

50376
1979
201

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE I

50376
1979
201

MEMOIRE

présenté à l'Université de Lille I
pour l'obtention du titre de Docteur de 3^{ème} Cycle
(Option Biochimie)

par Marie Laure BOUDIN

STRUCTURE ET ASSEMBLAGE
DES SOUS-UNITES APICALES DE LA CAPSIDE
DE L'ADENOVIRUS 2



Membres du Jury : Mr J. MONTREUIL - Président
Mr P. A. BOULANGER - Rapporteur
Mr L. HIRTH - Rapporteur
Mr G. BISERTE - Examineur
Mr J. KREMBEL - Examineur

Mémoire présenté le 6 Novembre 1979

Numéro d'ordre : 792

Ce travail a été effectué à la FRA 43, de l'INSERM, sous la direction de Monsieur le Professeur Pierre BOULANGER, que je remercie vivement, pour m'avoir accueillie dans son équipe, et pour m'avoir guidée dans mon travail.

Je remercie également, tous les membres du jury d'avoir accepté de juger cette thèse.

Je remercie, aussi, Monsieur le Professeur G. MARTIN pour m'avoir prêtée ses mutants, le Docteur G. Tamura (Tokyo) qui nous a fourni la tur icamycine et Mlle E. Fremaux pour la frappe de ce manuscrit.

Merci aussi, à chacun des membres de l'équipe, dont l'amitié et les conseils m'ont aidée dans ce travail.

_ TABLE DES MATIERES _

<u>INTRODUCTION</u>	p.	1
<u>HISTORIQUE_GENERALITES</u>	p.	3
<u>I - Généralités</u>	p.	4
A . Découverte. Classification.....	p.	4
B. Les protéines de l'adénovirus.....	p.	6
1 - Les protéines structurales.....	p.	6
2 - Les protéines non structurales.....	p.	9
C. Le génome.....	p.	10
<u>II - Le cycle lytique de l'adénovirus - morphogénèse du virion</u>	p.	11
A. Adsorption et pénétration.....	p.	11
B. La phase précoce.....	p.	13
C. La phase tardive.....	p.	13
1 - La réplication.....	p.	13
2 - Transcription et traduction.....	p.	16
D. Morphogénèse virale : assemblage des protéines du virion.....	p.	16
1 - Assemblage des protomères en capsomères et transport des protéines au noyau.....	p.	18
2 - Assemblage viral.....	p.	18
"in vivo".....	p.	18
"in vitro".....	p.	19
<u>III - L'apex de la capside</u>	p.	21
A. Structure.....	p.	21
B. Synthèse des protéines apicales.....	p.	23
C. Etude biochimique.....	p.	23
1 - Le penton complet.....	p.	23
2 - La fibre.....	p.	26
3 - La protéine IIIa.....	p.	26
D. Immunologie.....	p.	28
E. Propriétés physiologiques.....	p.	28
1 - Hémagglutination.....	p.	28
2 - Le point d'attache aux récepteurs membranaires..	p.	28

3 - Le point de décapsidation.....	p	28
4 - L'effet cytopathogène.....	p	30
5 - Inhibition de la multiplication virale et des synthèses macromoléculaires de la cellule hôte,.....	p	30
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	p	32
<u>PARTIE I</u> : Le IIIa.....	p	33
Introduction.....	p	34
Purification et Caractérisation (article 1).....	p	35
Maturation et encapsidation (article 2).....	p	59
Conclusion.....	p	83
<u>PARTIE II</u> : La base du penton : sa purification et caractérisation... p		87
Introduction.....	p	88
Purification et caractérisation (article 3).....	p	89
Conclusion.....	p	102
<u>PARTIE III</u> : Assemblage de la base et de la fibre en penton complet p		104
Introduction.....	p	105
Matériel et méthodes.....	p	106
A. Culture de cellules.....	p	106
1 - Cellules KB en suspension.....	p	106
2 - Cellules HeLa en monocouche.....	p	106
B. L'infection virale.....	p	106
C. Séparation cytoplasme-noyau.....	p	106
D. Purification des protéines.....	p	106
1 - Préparation des antigènes solubles.....	p	106
2 - Purification des protéines.....	p	107
E. Marquage.....	p	108
1. A la méthionine S ³⁵	p	108
2. A la Valine C ¹⁴	p	108
3. A la glucosamine C ¹⁴	p	108
F. Détermination du taux de protéines.....	p	108

G . Techniques électrophorétiques.....	p 108
1. Gel de polyacrylamide-SDS.....	p 108
2. Immuno_électrophorèse bidimensionnelle.....	p 109
3. Immuno.affino_électrophorèse.....	p 109
H. Préparation des immunosérums.....	p 110
1. Sérum anti_adénovirus 2.....	p 110
2. Sérum anti_base du penton.....	p 110
3. Sérum anti_fibre d'adénovirus 5.....	p 110
I. Immuno - précipitation par la protéine A de staphylococcus Aureus.....	p 110
J. Hydrolyse enzymatique.....	p 111
1. Les exopeptidases.....	p 111
2. Hydrolyse partielle par endopeptidases.....	p 111
K. Adsorption des anticorps antifibres de l'adénovirus 5 sur la fibre du 2.....	p 111

RESULTATS..... p 112

A. Assemblage "in vivo" de la fibre et de la base.....	p 112
B: Assemblage "in vitro" dans les extraits cellulaires.....	p 112
1 . Incubation avec un excès de base du penton purifiée (BP 125).....	p 112
2 . Incubation avec un excès de fibre purifiée (Fwt)	p 112
a - Avec des extraits cellulaires obtenus à 32°.....	p 112
b - Avec des extraits cellulaires obtenus à 39°.....	p 117
C. Assemblage "in vitro" du penton à partir de ses deux protéines purifiées; base et fibre.....	p 117
1 . Assemblage entre la base du penton du H2 ts 125 (BP 125) et la fibre de l'adénovirus 2 (Fwt).....	p 117
2. Assemblage entre la base du penton du H2 ts 115 et la fibre Fwt.....	p 117
3. Assemblage entre la base du penton du H2 ts 125 (BP 125) et la fibre du même mutant (F 125).....	p 117
D. Recherche des conditions d'assemblage.....	p 120
1 . Modification des conditions de l'assemblage "in vitro", hors des extraits cellulaires.....	p 120

a - Modification du milieu.....	p.	120
. le pH.....	p.	120
. la force ionique.....	p.	120
b - Modification des protéines avant assemblage.....	p.	120
. Pré-incubation de la fibre avec un sérum anti_fibre de l'adénovirus 5.....	p.	120
. Hydrolyse enzymatique de la fibre.....	p.	120
2 . Protéolyse du penton, intact ou dissocié en ses deux sous-unités.....	p.	121
3 . Rôle des chaînons glycaniques de la fibre dans l'assemblage du penton : Etude de la glycosyla- tion de la fibre libre et de la fibre liée à la base du penton.....	p.	124
a - La glycosylation de la fibre.....	p.	124
b - Hydrolyse enzymatique limitée de la fi- bre et du penton, marqué à la glucosa- mine C ¹⁴	p.	126
c - Hydrolyse enzymatique par la carboxy- peptidase Y de la fibre glucosamine C ¹⁴	p.	126
d - Etude de l'incorporation de glucosamine radioactive dans la fibre, syn thétis ée en présence de Tun icamycine.....	p.	128
 <u>DISCUSSION</u>	p.	130
 <u>CONCLUSION</u>	p.	139
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	p.	140

- INTRODUCTION -

Les sommets de la capsid de l'adénovirus semblent être le point de fragilité de la structure du virus. Par dialyse à 4°C contre un tampon à basse force ionique, le virus perd ses pentons et si la dialyse se poursuit à température ambiante, il perd aussi ses molécules de IIIa et les hexons péripentonaux (PRAGE et al., 1968)

De plus, les protéines de l'apex sont à l'origine de certaines propriétés du virus (cytopathogénicité, hémagglutination) et jouent un rôle important lors de l'infection : dans l'adsorption du virus sur la cellule hôte et probablement dans la décapsidation du génome.

Deux des protéines de l'apex ont été isolées : le penton et la fibre, et caractérisés (PETTERSSON, HOGLUND, 1969 ; PETTERSSON et al., 1968). Nous avons purifié et caractérisé la base du penton et la protéine IIIa.

L'environnement du IIIa dans le virus et la maturation de cette protéine ont également été étudiés. Nous nous sommes aussi intéressés à l'assemblage de la base et de la fibre. La base et la fibre, isolées et purifiées, ont été utilisées pour l'étude "in vitro" de cet assemblage.

HISTORIQUE - GENERALITES -

I - GENERALITES.

A. Découverte - Classification.

De forme icosaédrale, de taille relativement réduite (70 nm de diamètre), l'adénovirus est un virus non enveloppé, à DNA double brin. Isolé pour la première fois par ROWE (1953), il est retrouvé chez neuf espèces animales.

Chez l'homme, trente cinq sérotypes ont maintenant été découverts (GREEN et al., 1979). Une première classification, proposée par ROSEN (1960), les répertoriait en trois sous-groupes d'après leur capacité à hémagglutiner des érythrocytes de rat ou de singe. En 1965, HUEBNER les classait en quatre sous-groupes d'après leur pouvoir oncogène. Récemment, deux équipes viennent de proposer une nouvelle classification, en cinq sous-groupes, selon deux critères distincts :

- 1 - le poids moléculaire de quelques polypeptides de structure (WADELL, 1979).
- 2 - l'homologie des DNA (GREEN et al., 1979).

Ces deux classifications sont concordantes. La classification de GREEN et al. est représentée dans le tableau 1, ainsi que quelques caractères communs aux virus d'un même sous-groupe.

Le DNA des virus d'un même sous-groupe ont une teneur en base (G+C) équivalente, ce qui reflète l'homologie des DNA. De plus, les séquences de DNA dans la région transformante des virus sont homologues à l'intérieur d'un même sous-groupe (J.K. MACKAY et al., 1979). La différence qui existe entre le DNA de deux virus de groupes distincts se retrouve au niveau de certaines protéines : la longueur de la fibre varie d'un sous-groupe à l'autre, ainsi que le poids moléculaire des protéines V, VI, VII, et c'est sur cette dernière observation que Wadell a proposé cette classification en cinq sous-groupes (WADELL, 1979).

Groupe	Types	Homologie des DNA	DNA (% G + C)	Oncogénicité	Transformation des cellules	Homologie des régions transformantes	Groupes de Antigène T	Pathogénicité Epidémiologie
A	12, 18, 31	A* : 48-69% B* : 8-20%	Bas : 47-49%	Elevée	+	A* : 35-17% B* : 2-7%	A	infection des voies respiratoires . diarrhées
B	3, 7, 11, 14, 16, 21	A* : 89-94% B* : 9-20%	intermédiaire : 49-52%	Faible	+	A* : 85-99% B* : 2-12%	B	Pharyngoconjonctivite , pharyngite, pneumonie, cystite diarrhée . Epidémies de mala- dies respiratoires aiguës.
C	1, 2, 5, 6	A* : 99-100% B* : 10-16%	Haut : 57-59%	Aucune	+	A* : 98-100% B* : 1-15%	C	Infection voies respiratoires chez les enfants - infection du tissu lymphoïde .
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 à 30	A* : 94-99% B* : 4-17%	Haut : 57-59%	Aucune	+	-	D	Epidémies de kératoconjunctivites pharyngoconjunctivites pneumonies
E	4	B* : 4-23%	Haut	Aucune	?	-	légère réaction avec sérum ≠ T du 3, 7, 2	Epidémies de maladies respiratoires aiguës de pharyngoconjunctivites keratoconjunctivites. Pneumonies

Tableau 1 : Classification des Adénovirus humains d'après Green et al., (1979)

La classe des virus des types 32 à 35 est encore indéterminée .

A* : à l'intérieur du groupe ; B* : avec les autres types .



On peut noter également que les virus appartenant à un même groupe ont des propriétés biologiques voisines tels que l'hémagglutination, le pouvoir oncogène et la transformation. Les virus du groupe A sont fortement oncogènes, ceux du groupe B le sont faiblement et ceux des groupes C et D ne le sont pas. Mais, les virus de ces quatre groupes sont tous transformants "in vitro".

B. Les protéines de l'adénovirus.

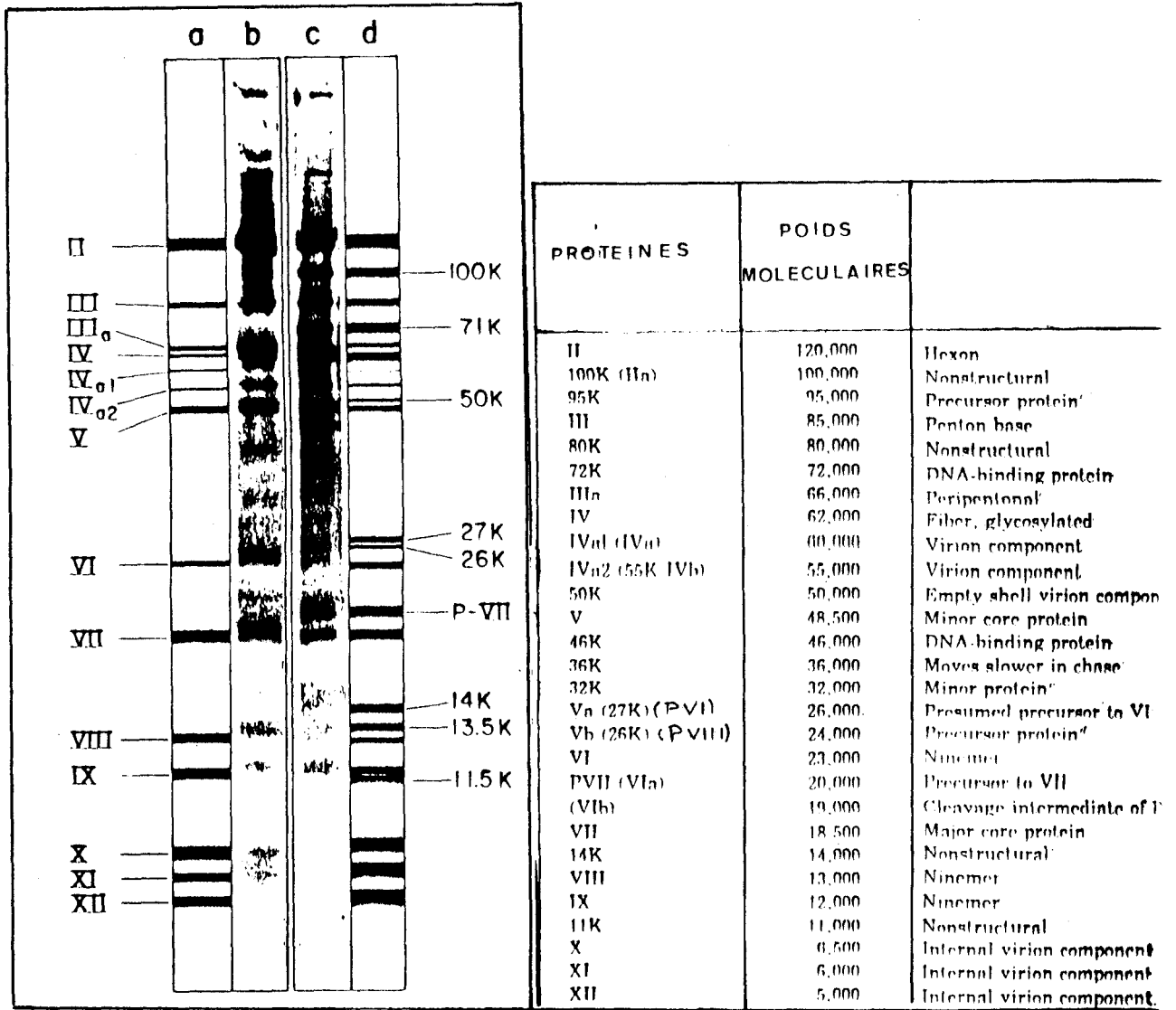
1. Les protéines structurales.

Les protéines de structure de l'adénovirus ont été mises en évidence par électrophorèse et immuno-électrophorèse en agarose (VALENTINE, PEREIRA, 1965 ; GINSBERG et al., 1966), puis les polypeptides correspondants ont été identifiés en gel de polyacrylamide-SDS (MAIZEL et al., 1968 ; ANDERSON et al., 1973) (fig. 1). Ce sont, presque toutes, des protéines tardives, c'est à dire synthétisées après le début de la répllication du DNA viral. L'iodination enzymatique, l'emploi d'agents pontants, d'immunsérums spécifiques ont permis d'établir un modèle hypothétique pour l'arrangement de ces protéines dans le virion. (EVERITT et al., 1975)(fig. 2).

La capside de l'adénovirus est constituée de 252 capsomères :
240 hexons et 12 pentons :

- les hexons sont situés sur les vingt faces et les trente arêtes de l'icosaèdre. Ils sont constitués de trois polypeptides identiques de 120 000 de poids moléculaire (BOULANGER et PUVION, 1974). Trois des protéines mineures sont associées à l'hexon : le VI, le VIII, le IX (EVERITT et al., 1975). Elles sont monomériques et ont un poids moléculaire respectif de 23 000 (23 K)*, 14 000 (14 K) et 12 000 (12 K). Les deux premières dérivent de précurseurs plus lourds : le pVI (27 K) et le pVIII (26 K) (OBERG et al., 1975 ; EDVARDSSON et al., 1976) ; la troisième, le IX, est trouvée dans les "groupes de neuf". Ces "groupes de neuf" sont constitués de neuf hexons et du IX, et sont obtenus par dissociation du virus au deoxycholate de sodium (DOC) à 56°, pendant 90 secondes (RUSSEL et al., 1971).

* K : kilodalton



- A -

- B -

Figure 1 : A - Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide-SDS de virus purifié, marqué à la méthionine S³⁵ (b) et d'un extrait total de cellules infectées (c) (Andersson et al., 1973)

B - Protéines produites au stade tardif de l'infection.
(d'après WEBER et al., 1977)

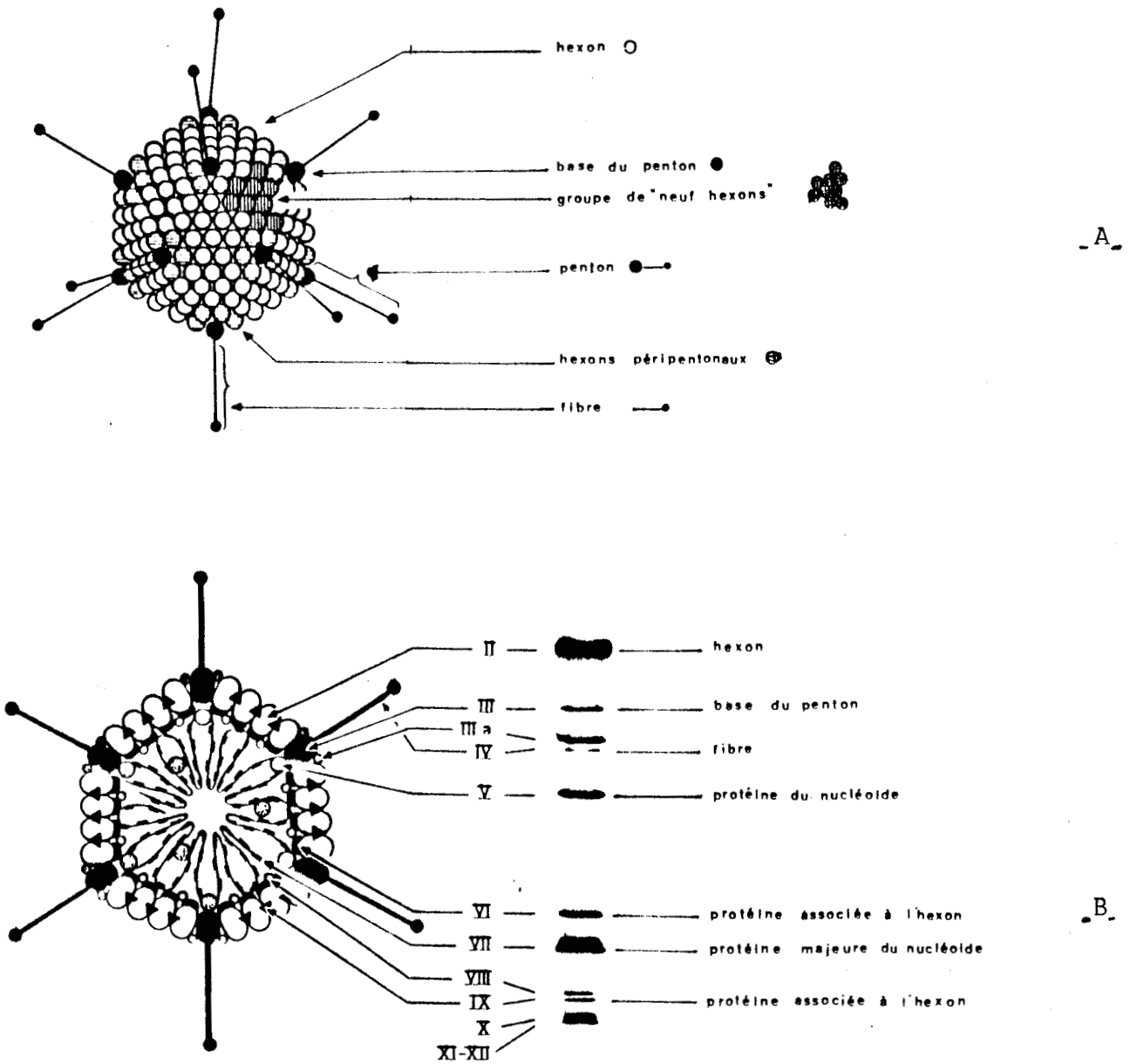


Figure 2 : Modèle de structure de l'adénovirus

A : schéma de la capside externe
(PHILIPSON et PETERSSON, 1973)

B : Schéma général de l'adénovirus 2
(EVERITT *et al.*, 1975)



Le IX a été trouvé au stade précoce du cycle viral, avant la synthèse du DNA (PERSSON et al., 1979, BOULANGER et al., 1979). Il n'est pas exclu que cette protéine ait, en plus, un rôle fonctionnel dans la transcription des gènes précoces.

- les pentons occupent les douze sommets de l'icosaèdre. Ils sont constitués de deux types de protéines (VALENTINE et PEREIRA, 1965) :

- 1 - la base du penton, insérée dans la capside, et entourée de cinq hexons dits "péripentonaux".
- 2 - la fibre, fixée sur la base, de forme allongée et terminée par un renflement.

Au niveau des hexons péripentonaux se trouve la protéine IIIa (EVERITT et al., 1973).

Plusieurs protéines sont associées au DNA : V, VII, X et 55 K (WINNACKER, 1978) et la IVa 2 (MIRZA et WEBER, 1979).

Le VII (17,5 K) dérive lui aussi d'un précurseur plus lourd le pVII (21 K) (ANDERSSON et al., 1973).

D'autres protéines n'ont pas encore été localisées : il s'agit du IVa₁, du XI, du XII .

2 . Les protéines non structurales.

D'autres protéines ont été mises en évidence dans des extraits de cellules infectées (Fig. 1). Ce sont des protéines viro-induites qui n'entrent pas dans la structure du virus mature. On connaît peu de chose à leur sujet et le rôle de certaines commence seulement à être élucidé. Il faut en distinguer deux sortes : celles synthétisées avant la réplication du DNA viral : les protéines précoces, et celles synthétisées après la réplication : les protéines tardives.

- 1 - Les protéines précoces sont, au moins, au nombre de 13 (SABORIO et OBERG, 1976). La plus étudiée est la protéine 72 K qui possède une affinité pour le DNA simple brin (VAN DER VLIET et al., 1975a) et qui aurait un rôle dans la réplication (VAN DER VLIET, SUSSENBACH

1975b, VAN DER VLIET et al., 1977). Les protéines E* 15K et E 42-55 K auraient un rôle dans la transformation des cellules (LEVINSON et LEVINF, 1977 ; BFRK et SHARPP, 1977). Récemment, il a été suggéré que la E 19 K, protéine glycosylée et associée à la membrane de la cellule hôte, pouvait créer un environnement favorable pour l'expression des gènes de l'adénovirus (PERSSON et al., 1979b). La protéine 50 K, trouvée chez les intermédiaires, aurait un rôle dans l'assemblage du virus (PERSSON et al., 1979a).

- 2 - Les protéines tardives non structurales sont la 100 K, et les protéines pVI, pVII, pVIII. Ces protéines n'existent pas dans le virus mature, mais on les trouve dans les intermédiaires d'assemblage. Le pVI, pVII, pVIII sont les précurseurs du VI, du VII, du VIII (ANDERSON et al., 1973 ; OBERG et al., 1975).

C. Le génome.

Le DNA de l'adénovirus est un DNA double brin, constitué de 35 000 paires de bases. Ses séquences terminales sont des séquences répétitives inversées (WOLFSON et al., 1972 ; GARON et al., 1972). Le DNA est circularisé par une protéine, la 55 K, qui se lie de façon covalente au dernier nucléotide du côté 5' de l'extrémité des deux chaînes (ROBINSON et al., 1973 ; REKOSH et al., 1977). Trois autres protéines : le V, le VII, le X, riches en arginine, sont liées elles aussi au DNA mais de manière non covalente (WINNACKER **, 1978). L'ensemble du DNA et de ses protéines associées constitue ce qu'on appelle : le nucléofde ou "core" viral. Son organisation pourrait être du même type que celle de la chromatine (CORDEN et al., 1976).

* E : "Early" symbole utilisée pour les protéines précoces

** : Revue générale

II - Le cycle lytique de l'adénovirus - Morphogénèse du virion.

La plus grande partie des études sur le cycle viral a été faite sur les cellules KB ou HeLa, cellules humaines maintenues en culture, en suspension ou en couche monocellulaire. Le cycle lytique dure 36 h.

A. Adsorption et pénétration

L'infection cellulaire débute quand le virion pénètre dans le cytoplasme et dépend donc de l'interaction initiale entre la cellule et le virus. L'adénovirus s'adsorbe sur la cellule par l'extrémité distale de sa fibre. Puis le virus pénètre dans le cytoplasme, soit directement (MORGAN et al., 1969), soit par invagination de la membrane de la cellule (CHARDONNET et DALES, 1970a,b).

Les particules retrouvées dans le cytoplasme, une heure après l'infection, sont sensibles à la DNase (SUSSENBACH, 1967 ; LAWRENCE et GINSBERG, 1967 ; LONBERG-HOLM et PHILIPSON, 1969 ; BOULANGER et HENNACHE, 1973) et ont changé de densité (SUSSENBACH, 1967 ; MIRZA et WEBER, 1979). Ces particules ont perdu leur activité hémagglutinante (SUSSENBACH, 1967). Elles ont donc perdu quelques composants, mais l'analyse de ces particules en gel de polyacrylamide-SDS, ne révèle l'absence d'aucune protéine (MIRZA et WEBER, 1979 ; LYON et al., 1978) bien qu'une légère variation stoechiométrique pour la fibre et le penton soit observée (LYON et al., 1978).

La libération du matériel génétique dans le noyau se fait à proximité des pores de la membrane nucléaire (CHARDONNET et DALES, 1970b). Le DNA sort de la capsid sous forme de "core" viral (MORGAN et al., 1969 ; LONBERG-HOLM et PHILIPSON, 1969, 1974), que l'on retrouve dans les extraits cytoplasmiques et nucléaires. Au niveau du noyau, le DNA est libéré sous forme de complexe avec la protéine terminale, avec perte du V, du VII, du IVa₂. Le DNA peut dès lors être transcrit, répliqué. De nouvelles particules virales vont se former. On distingue deux phases dans le cycle viral : la phase précoce et la phase tardive (Fig 3).

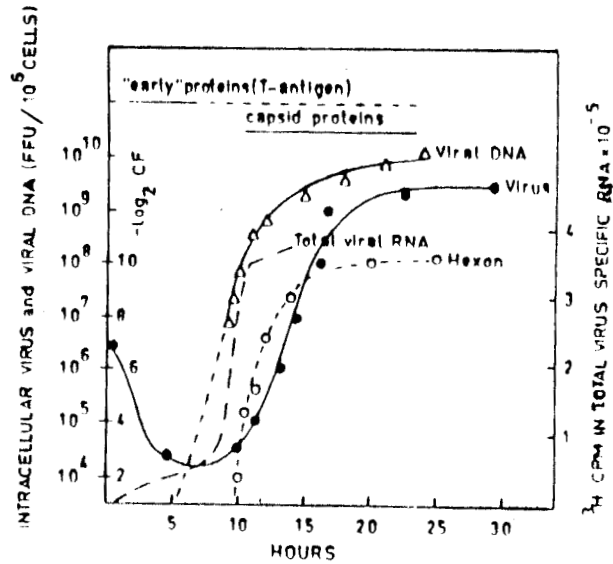


Figure 3 :

Courbe de croissance de l'adénovirus 2
(PHILIPSON et LINBERG*, 1974)

- virus intracellulaire mesuré par foyers de fluorescence
- synthèse de l'antigène hexon
- △— synthèse du DNA viral
- RNA viraux



B. La phase précoce.

La phase précoce de l'infection dure jusqu'à ce que la réplication du DNA viral commence. Certaines protéines précoces continuent à être synthétisées au stade tardif (LEWIS et al., 1976). Les RNA polymérases cellulaires sont responsables de la transcription des gènes viraux précoces.

Les mRNA précoces sont transcrits de quatre régions du DNA : deux sur le brin r et deux sur le brin l, et peut-être d'une cinquième sur le brin l. Les brins r et l du DNA sont définis par le sens de transcription :

- le brin r est transcrit de gauche à droite .
- le brin l est transcrit de droite à gauche .

La carte génétique (Fig. 4) montre les protéines localisées dans ces régions.

Les mRNA matures dérivent de précurseurs, par raboutage ou "splicing". (Ce phénomène sera expliqué pour les gènes tardifs). Ils possèdent les caractéristiques des mRNA de cellules eucaryotes : ils ont une extrémité 5' "coiffée" ($m^7G_5, A pN^m pN$ ou $m^7G_5, A^m pN^m pN$) et une séquence poly(A) du côté 3' (LEMAY, 1978).

C. La phase tardive.

1. La réplication.

La réplication virale commence 8 à 12 H. après l'infection et marque le début de la phase tardive. Les synthèses macromoléculaires de la cellule hôte sont inhibées, à l'exception des rRNA, qui interviennent dans la traduction des protéines tardives.

L'enzyme qui assure la réplication du DNA viral est d'origine cellulaire : c'est la DNA polymérase δ . La DNA polymérase α intervient également (ARENS et al., 1977 ; ABOUD et HORWITZ, 1979).

Des protéines virales sont indispensables à la réplication. Il s'agit de la 72 K et de la 55 K. La 72 K a un rôle dans l'initiation et l'élongation des chaînes, mais son fonctionnement est inconnu (VAN DER VLIET et al., 1977). La 55 K a, elle aussi, un rôle dans la réplication (STILLMAN et BELLET, 1979). Son rôle hypothétique est expliqué fig. 5. (REKOSH et al., 1977).

*: revue générale.

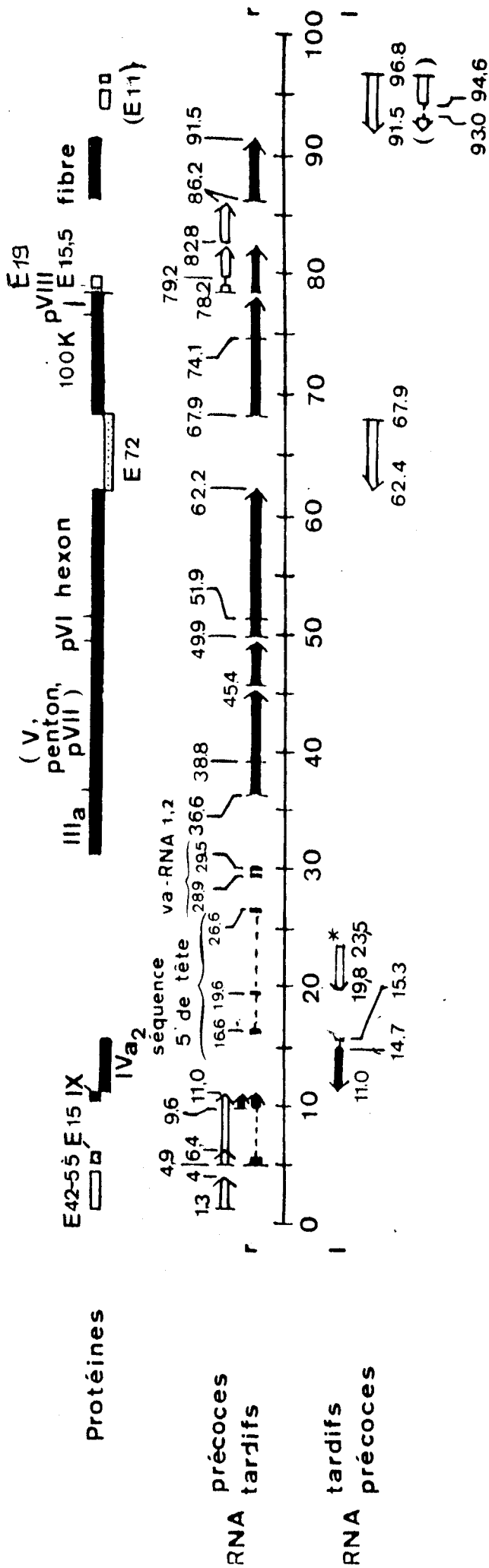


Figure 4 : Carte génétique de l'adénovirus 2.
(d'après LEMAY, 1978)

La zone précoce située sur le brin l, entre 19,8 et 23,5, a été déterminé par GALOS et al. (1979).

La E 19Kest située sur le brin r par PERSSON et al. (1979b).



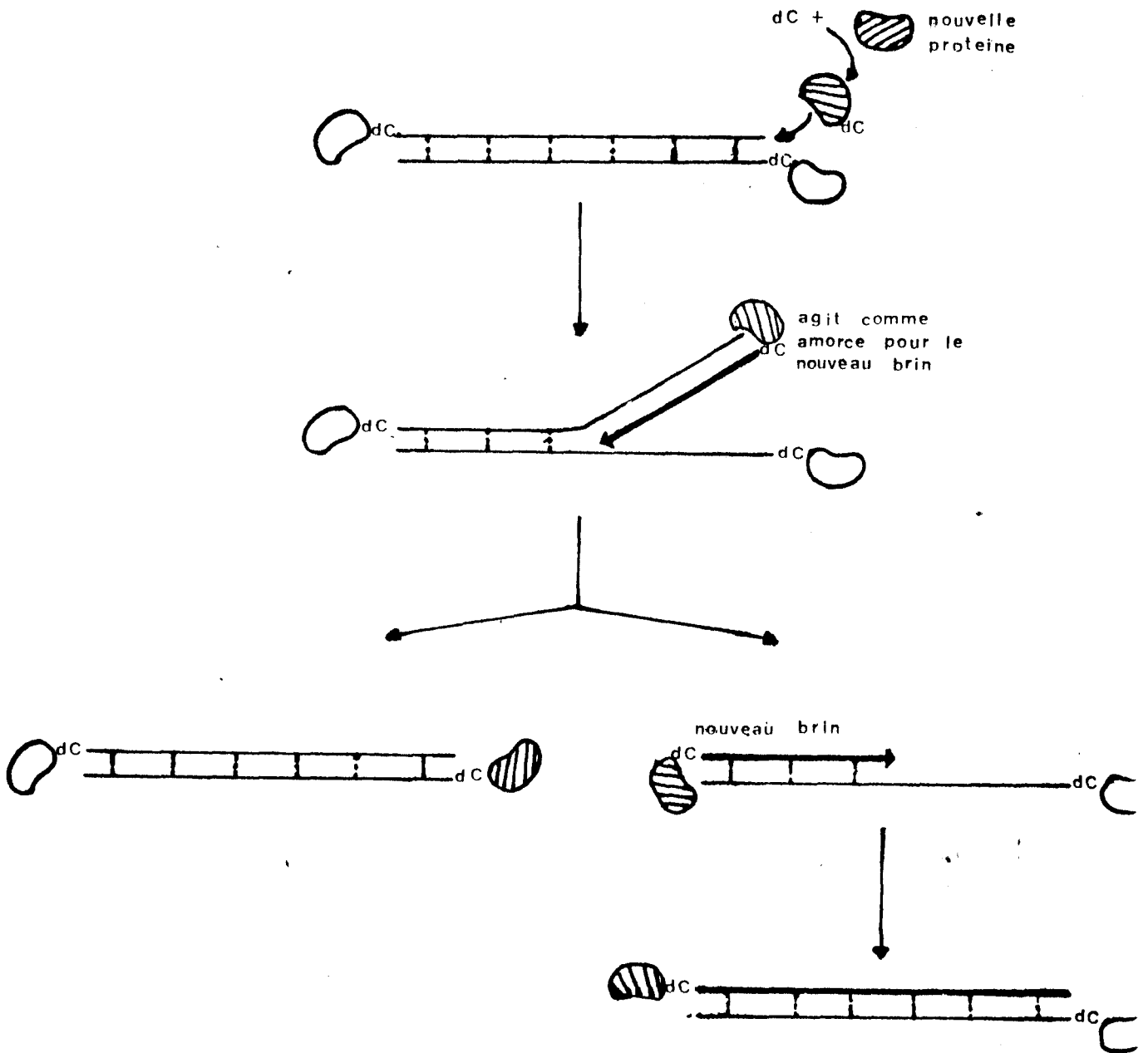


Figure 5: Modèle de répliation (REKOSH et al., 1977)

La protéine terminale se lierait à un résidu dc et servirait d'amorce pour la répliation

2 . Transcription et traduction .

Tous les mRNA tardifs, à l'exception du mRNA de la IVa2, sont transcrits sur le brin r du DNA (carte génétique, fig. 4).

Comme les mRNA précoces :

- ils sont transcrits par les enzymes cellulaires (WEINMANN et al., 1974)
- ils ont une extrémité 5' "coiffée" et une séquence poly (A) du côté 3' (MOSS et KOCZOT, 1976 ; PHILIPSON et al., 1971).
- ils proviennent d'un précurseur (LEMAY, 1978)*.

C'est par l'étude des mRNA des gènes tardifs de l'adénovirus, que le phénomène de raboutage a été démontré pour la première fois. Les mRNA matures des protéines codées sur le brin r, à droite de la position 16,6 sur la carte génétique, s'hybrident avec différentes zones non contiguës du DNA. Ceci s'observe, en microscope électronique, par la formation de boucles. Ces mRNA possèdent tous, à leur extrémité 5', trois mêmes séquences codées sur le DNA aux positions 16,6 ; 19,6 ; 26,6 (CHOW et al., 1977a). A la suite de ces séquences, vient la zone codante pour la protéine. Le "splicing" consiste en la juxtaposition de séquences de RNA codées par des zones non adjacentes du DNA génomique. Un modèle pour expliquer un tel phénomène a été proposé par KLESSIG (1974) (fig. 6). Le raboutage se produit après l'addition du poly (A) (NEVINS et DARNELL, 1978b).

Les mRNA matures sont transportés au cytoplasme pour leur traduction. Les séquences dites "de tête" seraient un bon emplacement pour la fixation de la petite sous-unité ribosomale (ZIFF et EVANS, 1978).

D. Morphogénèse virale : assemblage des protéines du virion .

L'étape finale de l'infection, la morphogénèse virale, débute vers la 10- 14ème heure après l'infection et se déroule dans le noyau. De nombreuses études ont été faites pour comprendre les mécanismes et déterminer les étapes qui conduisent à la formation d'une particule virale infectieuse, à partir des protéines et du DNA nouvellement synthétisés.

Plusieurs étapes sont nécessaires :

- l'assemblage des protomères en capsomères.
- le transport des protéines au noyau.
- la formation de la capside.
- l'incorporation du DNA dans les virions.



Figure 6 : Maturation des mRNA: le raboutage ou "splicing"

Modèle de KLESSIG (1977)

Les mRNA sont d'abord synthétisés sous la forme de mRNA précurseurs. Puis, la formation de boucles permet l'excision des séquences d'espacements. La maturation commence par le raboutage des séquences de tête, auxquelles viendra se lier, dans une seconde étape, la zone de structure.

1. Assemblage des protomères en capsomères et transport des protéines au noyau.

Peu de choses sont connues sur l'assemblage des polypeptides en protéines multimériques. Cet assemblage serait immédiat puisqu'on trouve les capsomères comme produit de synthèse, dans des systèmes "in vitro", à partir d'extraits de cellules KB (WILHEM, GINSBERG, 1972). Il faut cependant noter que dans d'autres systèmes "in vitro", constitués par des extraits de cellules de germes de blé ou des cellules ascites Erlich, les sous-unités ne s'assemblent pas (OBERG et al., 1975). L'étude de mutants défectifs pour le transport de l'hexon, tel que le H5 ts 147, confirme l'assemblage des polypeptides en capsomères dans l'extrait cytoplasmique (KAUFMANN, GINSBERG, 1976). Il semblerait que ce soit une condition du transport au noyau (GINSBERG et LUCIWI, 1978). Par ailleurs, les mutants défectifs pour le transport de l'hexon permettent de supposer l'existence d'une protéine de transport. Le pVI pourrait jouer ce rôle (KAUFMANN, GINSBERG, 1976). Le transfert dans le noyau serait rapide : moins de six minutes (VELICER, GINSBERG, 1970).

2. Assemblage viral.

→ In vivo

L'analyse de l'assemblage des protéines et de l'encapsidation du DNA est un moyen d'approche pour étudier les problèmes qui se posent lors de la formation d'une particule infectieuse, c'est-à-dire d'une particule complexe, biologiquement active; problèmes tels que :

- l'interaction des protéines entre elles, en vue de former une structure ordonnée stable : la capside.
- le clivage protéolytique des précurseurs.
- l'encapsidation du DNA.

Pour l'adénovirus, l'assemblage a été étudié :

- par l'analyse des particules intermédiaires d'assemblage en gel de polyacrylamide-SDS (ISHIBASHI, MAIZEL, 1974b ; EDVARSSON et al., 1976 ; SUNDQUIST et al., 1973 ; D'HALLUIN et al., 1978b)
- par l'étude de mutants bloqués à un stade de l'assemblage (WEBER, J., 1976 ; D'HALLUIN et al., 1978a).

Les intermédiaires d'assemblage ont été isolés par ultracentrifugation, sur gradient de sucrose, de chlorure de césium ou de métrizamide. L'étude de ces intermédiaires, de leur composition en protéines et de leur contenu en DNA, a permis

de montrer que le virus se forme par pénétration du DNA dans une capsidie préformée, et non pas, par l'organisation des protéines structurales en capsidie, autour du core viral.

Les différents intermédiaires d'assemblage qui ont été isolés sont des capsidies vides, c'est-à-dire sans DNA, des intermédiaires légers, des intermédiaires lourds, des jeunes virions et enfin des virions matures. Les principales étapes de la maturation du virus et les différents processus qui y prennent part sont schématisés sur la fig. 7. La teneur en DNA des différentes particules y est indiquée.

L'étude des protéines de ces intermédiaires a permis de montrer :

- l'existence de certaines protéines qui n'apparaissent jamais dans le virus mature
- le clivage de certains précurseurs pour donner des protéines de structure .

La 100 K, la 50 K, la 39 K n'existent pas dans le virus mature (EDVARDSSON et al., 1976 ; D'HALLUIN et al., 1978b). La 50 K jouerait un rôle dans la maturation, peut-être comme protéine "d'échaffaudage" (PERSSON et al., 1979a).

Le clivage des précurseurs se fait en cours d'assemblage : seuls, les précurseurs sont trouvés dans les intermédiaires ; c'est le cas pour les protéines VI, VIII et VII du virus qui se trouvent sous forme de précurseurs : PVI, PVIII et PVII, dans les intermédiaires (ISHIBASHI et MAIZEL, 1974 b ; EDVARDSSON et al., 1976 ; WEBER, J., 1976). Le clivage est une des étapes finales de la maturation et transformerait les jeunes virions en virions matures. On ne connaît pas l'enzyme responsable du clivage, mais c'est un enzyme dépendante du virus : WEBER (1976, PHITTI, WEBER, 1979)

L'entrée du DNA dans la capsidie est un processus rapide (WEBER, 1976 ; D'HALLUIN et al., 1978b). Elle se ferait après la perte de la 39 K et de la 50 K, mais avant l'entrée du V et du pVII (D'HALLUIN et al., 1978 b ; EVERITT et al., 1977).

—> in vitro.

Une seconde voie d'approche pour comprendre les mécanismes

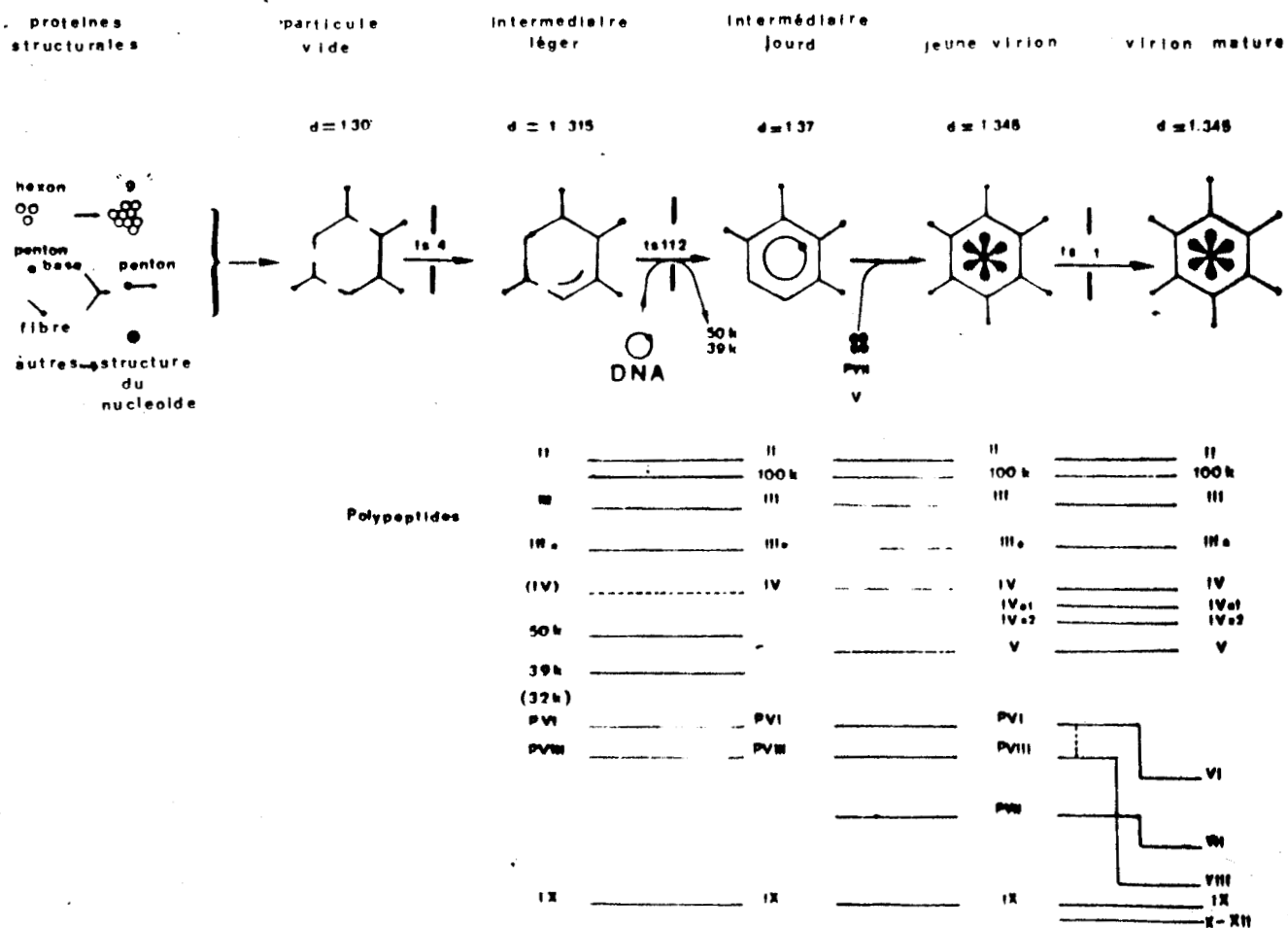


Figure 7 : Schéma de l'assemblage de l'adénovirus.

(d'après D'HALLUIN et al., 1978a, 1978b)



qui interviennent dans la formation du virus consiste à assembler "in vitro" les différents composants du virus (comme cela a déjà été fait pour de nombreux virus (FRAENKEL -CONRAT et WAGNER 1976).

Une première étude a été faite par WINTERS et RUSSEL (1971). En absence d'arginine, la production virale décroît de l'ordre de 3 à 4 fois. Mais le DNA synthétisé est capable de s'assembler en virion quand on ajoute des extraits de cellules infectées en présence d'arginine.

Une seconde étude a été faite par PEREIRA et WRIGLEY (1974). Ils ont dissocié du virus par action du déoxycholate de sodium, à 56°, pendant 90 secondes pour obtenir des groupes de neuf hexons. Ces groupes de neuf hexons sont constitués de capsomères hexons et de protéine IX. A bas pH, il y a réassociation de ces structures comme le montre la microscopie électronique. Ils ont obtenu différents stades de réassociation (Fig. 8) dont des structures à vingt faces. Chacune des faces est constituée d'un groupe de neuf hexons : il manque les hexons péripentonaux et les pentons des sommets pour obtenir une capsidite virale complète.

Récemment, Tibbetts a montré que sur simple incubation des capsides vides de l'adénovirus du type 3 avec du DNA, celui-ci pénètre dans la capsidite. "In vitro" comme "in vivo", c'est par son extrémité gauche que le DNA pénètre. (TIBBETTS, 1979).

III. L'apex de la capsidite.

L'apex de la capsidite joue un rôle important pour le virus : les protéines qui la constituent sont responsables de certaines propriétés virales (hémagglutination, effet cytopathogène) et sont à l'origine de mécanismes importants dans le cycle lytique (adsorption, décapsidation).

A. Structure.

Les douze sommets de la capsidite sont occupés par les pentons, et le IIIa est localisé au niveau des hexons péripentonaux. EVERITT et ses collaborateurs (1973) ont proposé un schéma pour rendre compte de l'arrangement

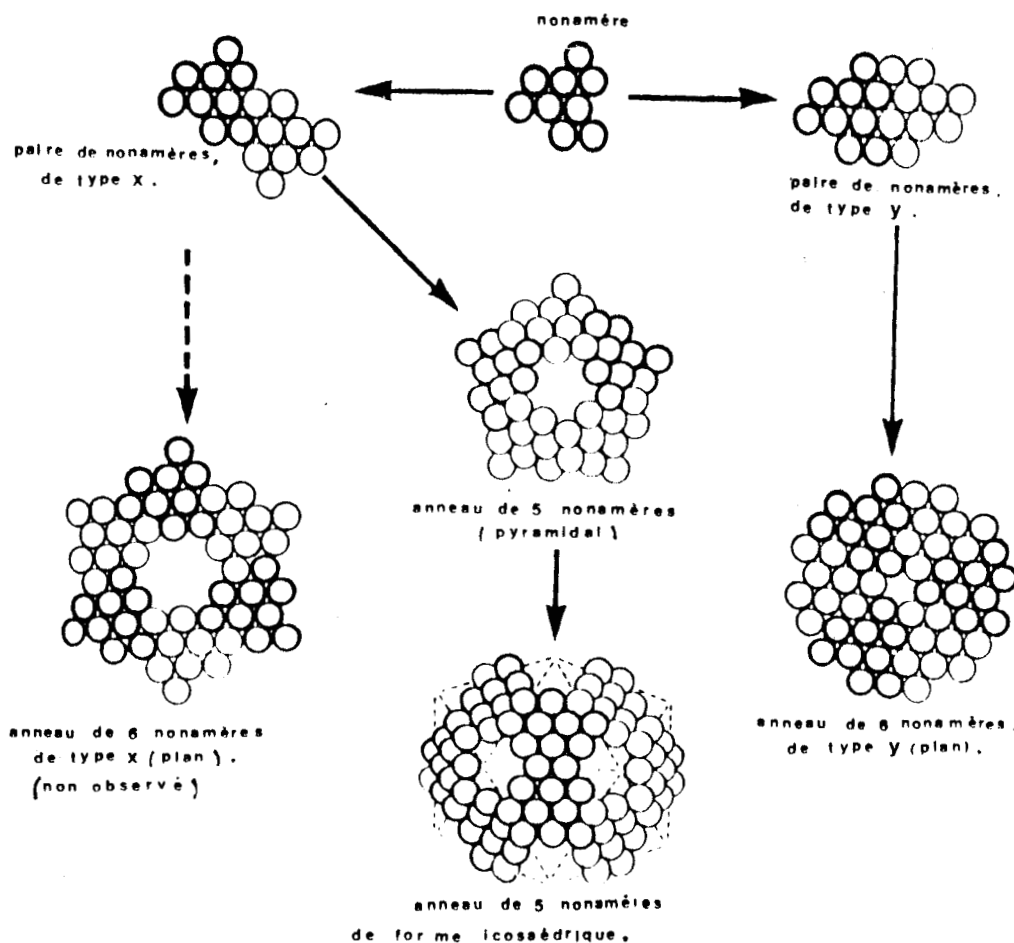


Figure 8 : Assemblage "in vitro" de l'adénovirus.

Reconstitution de la capside à partir des groupes de neuf hexons (ou nonamère), obtenus par dissociation du virus au déoxycholate de sodium (DOC).
 Différentes étapes de réassociations sont obtenues (PEREIRA et WRIGLEY, 1974).

structural des unités apicales (Fig. 9a). Le penton complet, vue en microscopie électronique, est montré en figure 9 b.

B . Synthèse des protéines apicales.

Les gènes codants pour le IIIa, la base du penton et la fibre sont situés sur le brin r du DNA. Ils ont été localisés plus précisément par microscopie électronique, hybridation DNA-RNA, traduction "in vitro" et par la méthode de "marker rescue" (Table 2). Les mRNA matures de ces protéines sont, comme ceux des autres protéines tardives, formés par raboutage mais le mRNA de la fibre possède trois autres séquences "de tête" en plus des trois premières déjà citées et dont les extrémités 5' sont situées aux positions 76,9 ; 78,6 ; 84,7 (CHOW, BROKER, 1978). Ces trois séquences pourraient représenter des étapes intermédiaires dans la maturation du mRNA.

C . Etude biochimique.

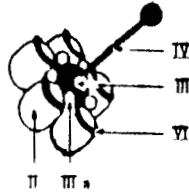
Les protéines de structure de l'adénovirus sont synthétisées en grand excès et seulement 10 à 20% de ces protéines sont assemblées en virus. Les protéines non encapsidées peuvent donc être obtenues purifiées et sous forme natives, en dehors du virion, à partir d'un lysat cellulaire.

1 - Le penton complet.

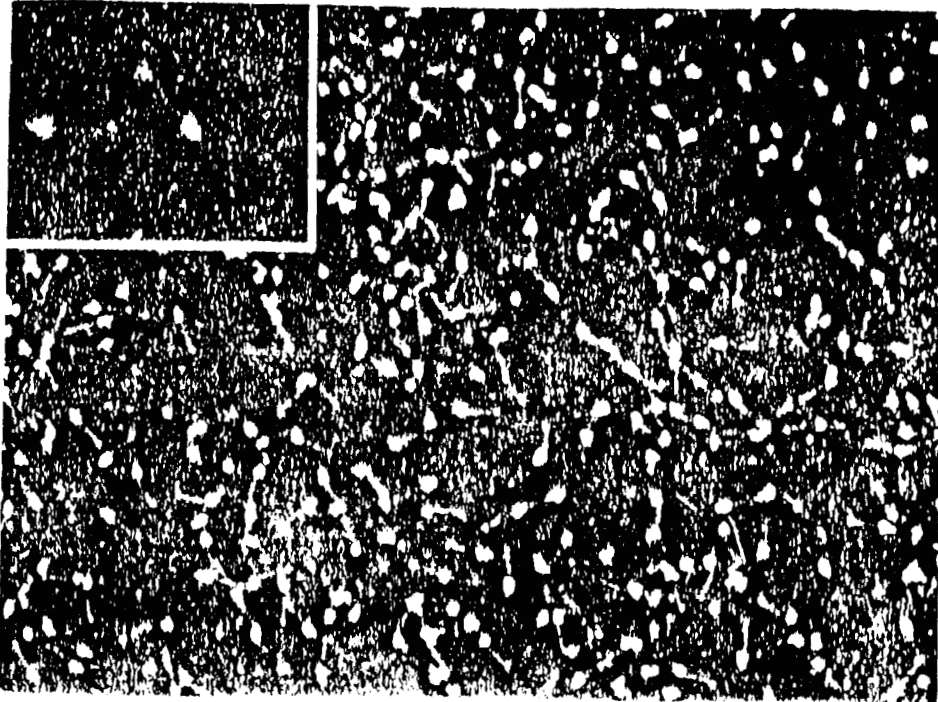
Le penton peut être relâché du virion par dialyse contre de l'eau distillée (LAVER et al., 1969) ou contre un tampon à basse force ionique tel que le Tris-maléate 5 mM, pH 6,2 (PRAGE et al., 1970).

Le poids moléculaire du penton complet a été estimé à 400 000 par PETERSSON et HOGLUND (1969), à 500 000 par WADELL (d'après PHILIPSON, LINDBERG, 1974). Son coefficient de sédimentation est de 10,5 S (PETERSSON HOGLUND, 1969). Par microscopie électronique, ces deux mêmes auteurs ont montré le contour pentagonal de la base et une cavité en son centre. La base est constituée de plusieurs sous-unités. La sensibilité de la base à la Trypsine varie pour les adénovirus d'un même sous-groupe.

La base du penton est séparable de la fibre par traitement du penton à la pyridine 8% (PETERSSON et HOGLUND, 1969), par 2,5 M



- A -



- B -

Figure 9 : Les protéines de l'apex.

A : Organisation générale (EVERITT et al., 1973)

B : Microscopie électronique du penton complet (base + fibre)

(LAVIER et al., 1969)



Protéines	Adénovirus 2		Adénovirus 5	
	Localisation par microscopie électronique (a)	Localisation par Traduction "in vitro" des mRNA (b)	Localisation par "marker rescue" *	
			J. ARRAND (c)	FROST (d)
III _a	-	24,1-40,9	27,5-57	31,5-37,3
III	38-46	29,1-57	-	-
IV	86,3-91,5	85,0-100	89-96	89,5-97,5

Tableau 2 : Localisation des gènes codants pour les protéines de l'apex :
le III_a ; le III (base du penton) ; le IV (la fibre)

* Le "marker rescue" est basé sur la formation ou non de plages, après infection des cellules par un mélange de DNA double brin d'un mutant thermosensible et d'un des fragments de restriction du virus du type sauvage.

a) CHOW et al., 1977b

b) LEWIS et al., 1977

c) ARRAND, 1978

d) FROST, WILLIAMS, 1978



chloridrate de guanidine (NORRBY, SKAARET, 1967). La liaison entre ces deux protéines n'est donc pas covalente.

2 - la fibre.

La fibre a été la seconde protéine de l'adénovirus à être cristallisée (MAUTNER, PEREIRA, 1971). La longueur de la fibre varie suivant le sous-groupe du virus (Tableau 3). Pour l'adénovirus du type 2, les dimensions de la fibre sont les suivantes :

- longueur: 20 nm.
- diamètre de la tige: 1.5-2.0 nm.
- sphérule terminale : 4 nm.

La fibre de l'adénovirus 2 a un pHi de 6,1 et un coefficient de sédimentation de 6,1S (PETTERSSON, HOGLUND, 1968). La fibre native est constituée de trois sous-unités polypeptidiques, de même poids moléculaire chacune (62 000), ce qui lui confère un poids moléculaire de 186 K (SUNDQUIST et al., 1973a). Dans des conditions dénaturantes, DORSETT et GINSBERG (1975) trouvent pour la sous-unité de l'adénovirus 5 (du même sous-groupe que l'adénovirus 2) un coefficient de sédimentation de 3S. Mais l'une des trois sous-unités n'a pas la même charge que les deux autres et se situerait au niveau de la sphérule.

ISHIBASHI et MAIZEL (1974a) ont montré que la fibre était glycosylée et qu'elle pouvait être marquée par la glucosamine radioactive.

Sa composition en acides aminés a été déterminée par SUNDQUIST et al (1973 (Tableau 4).

3 - La protéine IIIa.

Les polypeptides du IIIa et de la fibre ne sont pas toujours bien résolus en gel de polyacrylamide-SDS car le polypeptide IIIa a un poids moléculaire apparent, légèrement plus élevé que celui de la fibre : il est estimé à 66 000.

La IIIa n'était pas encore isolé et peu de choses étaient connues sur sa biochimie. Cependant, un marquage au P^{32} de cellules infectées montre que la IIIa est une phosphoprotéine (RUSSEL, BLAIR, 1977 ; AXELROD . . , 1978 ; AKUSJARVI et al., 1978). Le marquage au P^{32} du IIIa disparaît au cours de la chasse : il aurait donc un renouvellement rapide. Le IIIa est la seule protéine de structure phosphorylée.

Sous groupe	Longueur de la fibre en nm
A	28 - 31
B	9 - 11
C	23 - 31
D	12 - 13
E	17 - 18

Tableau 3 : Longueur de la fibre de l'adénovirus selon le sous-groupe
(d'après PHILIPON et LINDBERG, 1974)

	nombre de résidus pour 100	nombre de résidus pour 1 His
Lys	6,0 ± 0,1	8
His	0,8 ± 0,2	1
Arg	1,5 ± 0,3	2
Asp	13,1 ± 0,4	16
Thr ^b	11,1 ± 0,6	11
Ser ^c	11,2 ± 0,6	11
Glu	6,1 ± 0,5	8
Pro	5,2 ± 1,3	7
Gly	8,5 ± 0,6	11
Ala	6,5 ± 0,6	8
Val	5,3 ± 0,2	7
Ile	5,0 ± 0,1	6
Leu	9,9 ± 0,5	12
Tyr	2,8 ± 0,3	1
Phe	2,9 ± 0,1	1
Met	1,5 ± 0,1	2
Trp	1,6	2
Half cyst ^d	0,7 ± 0,1	1
Total 127 résidues or 15,900 daltons		

Tableau 4 : Composition en acides aminés d'après Sundquist et al., (1973a)



D . Immunologie.

Le penton porte plusieurs déterminants antigéniques :

- le déterminant β (VALENTINE-PEREIRA, 1965), porté par la base du penton est spécifique du groupe.
- le déterminant δ , spécifique du type, localisé au niveau du renflement terminal de la fibre.
- le déterminant δ , spécifique du sous-groupe, situé sur la tige de la fibre (VALENTINE, PEREIRA, 1965 ; PETTERSSON et al., 1968).

Le IIIa est lui aussi antigénique (EVERITT et al., 1975).

Aucune des trois protéines de l'apex n'induit la formation d'anticorps de neutralisation.

E . Propriétés physiologiques.

1. Hémagglutination.

L'hémagglutination des érythrocytes de rat ou de singe par les adénovirus a permis à ROSEN (1960) de faire une première classification.

Le virion intact provoque une hémagglutination complète. Le penton ou la fibre, purifiés, provoquent une hémagglutination indirecte quand on ajoute un immunsérum hétérotypique (Fig. 10a). Un immunsérum homotypique inhibe la capacité hémagglutinante de la fibre (PETTERSSON et al., 1968) (Fig. 10b). C'est donc par l'extrémité de sa fibre que l'adénovirus réagit avec les érythrocytes.

2. Le point d'attache aux récepteurs membranaires de la cellule hôte .

Le nombre de récepteurs spécifiques sur la membrane des cellules KB est d'environ 10^4 . La fibre pure, en concentration 10 à 100 fois plus élevée que le nombre de récepteurs, inhibe l'attachement du virus (PHILIPSON et al., 1968). La fibre, fixée sur sepharose permet d'isoler le récepteur membranaire par chromatographie d'affinité (HENNACHE, BOULANGER, 1977).

3 . Le point de decapsidation .

Pour la décapsidation du virus, après sa pénétration dans le cytoplasme, la perte d'un ou de plusieurs pentons semble constituer une première étape pour la libération du DNA viral. Il a maintenant été clairement montré que ces

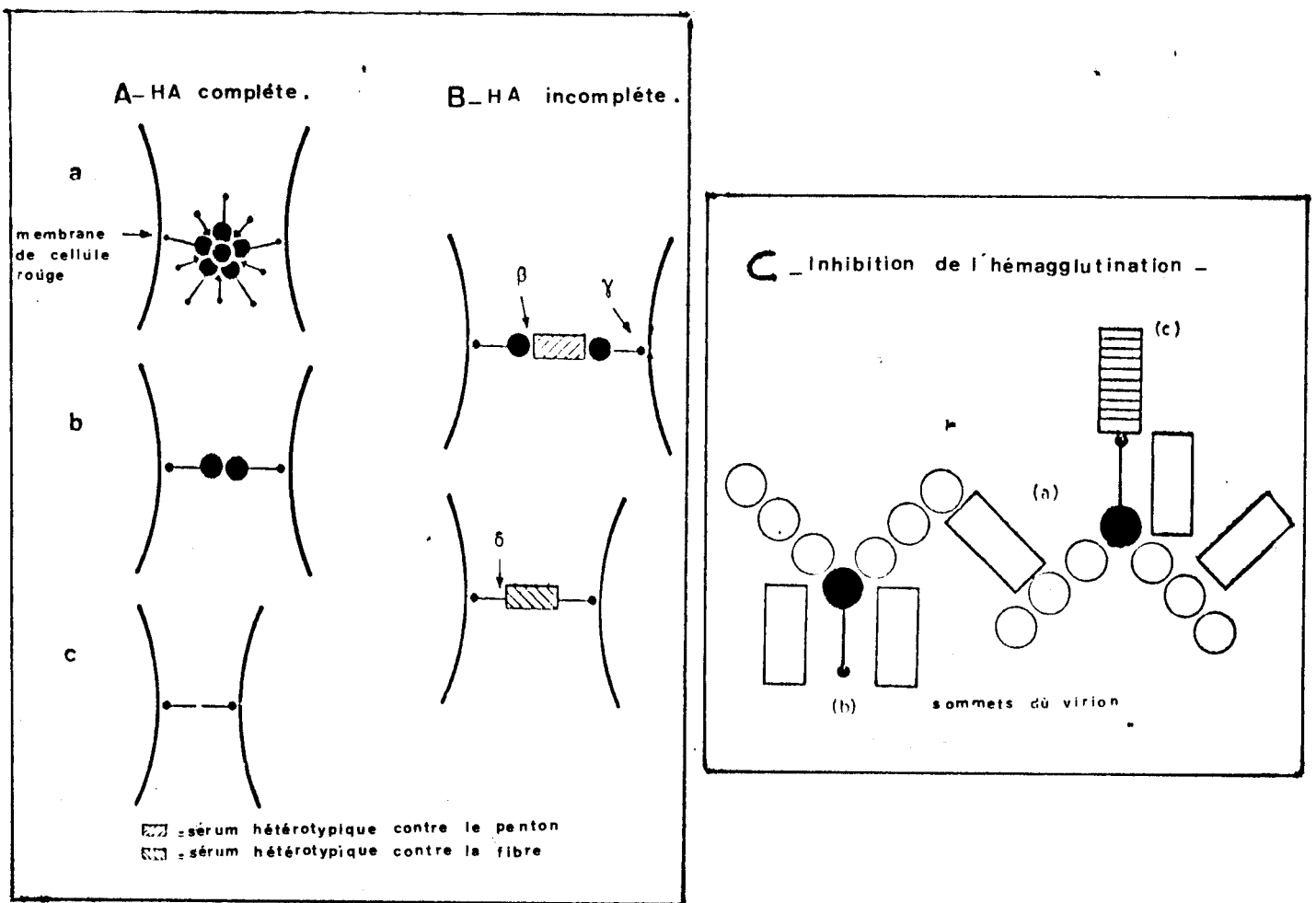


Figure 10 :

- A . Hémagglutination complète par les dodecons (constitué par l'agrégat de 12 pentons) par un dimère de pentons ou de fibres
- B . Hémagglutination incomplète par un monomère de penton ou de fibre. L'addition d'un sérum hétérotypique rend l'agglutination complète.
- C . Inhibition de l'hémagglutination par :
- a - agrégat de virion.
 - b - encombrement stérique du aux anticorps anti-hexons fixés sur les hexons péripentonaux.
 - c - par les anticorps antifibres spécifiques de type .

(d'après PHILIPSON, PETERSSON*(1973))



particules avaient perdu quelques composants (LONDBERG-HOLM, PHILIPSON, 1969 ; MIRZA, WEBER, 1979) mais l'analyse par électrophorèse, ne révèle l'absence d'aucune protéine particulière, seule une légère variation stoechiométrique est observée pour la base et la fibre (LYON *et al.*, 1978). Cependant les particules, isolées du cytoplasme après pénétration du virus, sont précipitées en moins grande quantité par un sérum anti-penton qu'un sérum dirigé contre le virus entier (CHARDONNET, DALES, 1970b). Une des premières étapes de l'infection pourrait donc être la perte d'un ou plusieurs pentons, ou un changement de conformation spatiale de certains pentons (LONBERG-HOLM, PHILIPSON, 1974).

4 L'effet cytopathogène.

Lors de l'infection d'une cellule par l'adénovirus, on distingue deux effets cytopathogènes :

- l'effet précoce, qui se caractérise par le détachement des cellules de leur support de verre. Il se produit quand les cellules sont infectées par un inoculum viral très riche.

- l'effet tardif, qui provoque la lyse de la cellule et la libération de la descendance virale.

L'effet cytopathogène précoce est dû au penton : le même phénomène est observé quand les cellules sont mises en présence de pentons purifiés. Et c'est plus précisément, la base du penton qui est responsable du processus puisqu'on ne l'observe plus quand le penton est traité à la trypsine ou quand on a ajouté au milieu des anticorps anti-bases. Les anticorps anti-fibres sont incapables de produire l'inhibition de ce phénomène (PETTERSSON et HOGLUND, 1969).

5. Inhibition de la multiplication virale et des synthèses macromoléculaires de la cellule hôte.

La fibre inhibe la multiplication virale à 50% quand on l'ajoute à $35 \mu\text{g}/10^6$ cellules KB. La biosynthèse du DNA, RNA et protéines est inhibée après un temps de latence de 20 à 25 h. (LEVINE, GINSBERG, 1967). La fibre se lie au DNA cellulaire, natif ou dénaturé, à basse force ionique. Elle empêcherait ainsi l'action des différentes polymérases (LEVINE, GINSBERG, 1968). Mais la fibre ne pourrait pas être responsable de l'arrêt des synthèses macromoléculaires "in vivo", car la concentration de fibre employée dans ces expériences excède la concentration finale durant l'infection. De plus, dans les cas d'infections par des mutants thermosensibles, défectifs dans la synthèse de

fibre à 39.5°, on observe quand même une inhibition des synthèses cellulaires alors que la synthèse de la fibre est bloquée (WILLIAMS et al. , 1974).

- TRAVAUX PERSONNELS -

PARTIE I :

Le IIIa :

- Sa purification et caractérisation (Article 1)
- Sa maturation et encapsidation (Article 2)

INTRODUCTION.

Le IIIa a été mis en évidence par gel de polyacrylamide-SDS comme constituant de la capsid de l'adénovirus (ANDERSON et al. , 1973 ; EVERITT et al. , 1973 ;1975). Il a été localisé au niveau de l'apex, associé aux hexons péripentonaux. En effet, la dialyse des particules virales, ayant perdus leurs pentons, contre un tampon à basse force ionique et à température ambiante, libère simultanément hexons péripentonaux et IIIa (PRAGE et al. , 1970).

Nous avons purifié le IIIa à partir des composants viraux solubles, contenus dans les extraits de cellules infectées par l'adénovirus de type 2, et à partir du virus mature. La protéine purifiée a servi à sa caractérisation physico-chimique (article 1) c'est-à-dire à la détermination de son poids moléculaire, de son coefficient de sédimentation de son pHi et de sa composition en acides aminés.

Puis, nous nous sommes intéressés à cette protéine dans le virus, à son environnement et à sa maturation lors de l'assemblage du virus (article 2). Il a été montré qu'il y a 60 molécules de IIIa par virion et que le IIIa dérive au cours de la maturation virale d'un précurseur: le pIIIa, par clivage protéolytique. Le blocage au stade de l'assemblage des particules chez des mutants défectifs pour le IIIa tend à prouver un rôle du IIIa au cours de la morphogénèse virale.

Human adenovirus type 2 protein IIIa.

I - Purification and characterization.

Pierre Lemay, Marie-Laure Boudin, Michèle Milleville
and Pierre Boulanger *

Laboratoire de Virologie Moléculaire
Institut National de la Santé et de
la Recherche Médicale
Place de Verdun, Lille
France

Running title : Characterization of Ad2 IIIa

* Author's address

Dr. Pierre Boulanger
Laboratoire de Virologie Moléculaire,
INSERM
Place de Verdun
59045 Lille Cedex
France

Summary

Protein IIIa from human adenovirus 2 was shown to exist as a major soluble antigenic component in the infected cell pool of virus material, when the cell extracts were analyzed in two-dimensional immunoelectrophoresis against hyperimmune antiviral sera. Protein IIIa was purified to apparent homogeneity by three methods, two using virus particles, one using infected-cell lysates as starting material. The three methods gave similar yields of IIIa.

Protein IIIa behaved as a spherical molecule with a sedimentation coefficient of 6.0 S, a frictional ratio of 1.02 and a molecular weight of $65,430 \pm 1,800$ in its native state, suggestive of the existence of one single polypeptide unit.

The N-terminus of the IIIa was found to be glycine. The amino acid composition revealed an unusually high content of serine, glycine and proline and a low content of lysine. Isoelectrophoretic analysis revealed a heterogeneous population with a major band at pI 5.95 and a minor band at pI 6.08.

Only group-specific antigenic determinants were detected in IIIa, which did not seem to induce neutralizing antibodies.

Introduction

The polypeptide composition of adenoviruses has been studied by sodium dodecyl sulfate (SDS) - polyacrylamide gel electrophoresis, after dissociation of the virus particles in SDS with heating (Maizel et al., 1968a and b ; Pereira and Skehel, 1971, Everitt et al., 1973 ; Anderson et al., 1973). The polypeptide pattern of human adenovirus type 2 (HAd2) shows nine major bands, of which eight have been assigned thus far to antigenically distinct structural entities (Philipson and Lindberg, 1974). At least seven protein species, numbered II, III, IIIa, IV, VI, VIII and IX (according to the accepted nomenclature for HAd2 proteins ; Everitt et al., 1973 ; Anderson et al., 1973), constitute the outer portion of the capsid, whereas two major species (V and VII) are an integral part of the DNA-containing inner core (Maizel et al., 1968b ; Russell et al., 1971 ; Everitt et al., 1973).

Most of the capsid proteins of adenoviruses are found as soluble antigenic components in the excess pool of virus material synthesized by the infected cell, a feature which has facilitated the purification, characterization and immunological identification of the virus capsid subunits (Philipson and Lindberg, 1974). The two-dimensional immunoelectrophoresis technique (Laurell, 1965) has been successfully applied to the detection, identification and quantification of the major HAd2 soluble antigenic components (Martin et al., 1975 ; Martin et al., 1978 ; Boulanger et al., 1979).

In this study, it is shown that a prolonged immunization of rabbit with highly purified HAd2 particles gave antisera revealing an extra peak of major viral antigen. This antigen was identified as belonging to the capsid protein IIIa. The present report describes its purification, and some of its physical, chemical and immunological characteristics.

Materials and Methods

. Cells

KB cells were grown in spinner culture in Eagle's basal medium supplemented with 5% horse serum. HeLa cells and human embryonic kidney (HEK) cells were grown as monolayers in Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% calf serum. HeLa and HEK cell monolayers were used for virus titrations by the plaque method.

. Virus

HAd2 wild-type (WT) was propagated in KB cells. HAd2 temperature-sensitive mutant H2 ts 115 has been isolated after nitrous acid treatment of a WT stock and phenotypically characterized as a fiber-defective ts-mutant (Martin et al., 1978). H2 ts 115 was cultured at permissive temperature (33°) for mutant stock production, and at non-permissive temperature (39°5) for production of H2 ts 115 soluble antigens. HAd3 was kindly provided by Dr R.G. Marusyk.

.Antisera

Polyspecific antiserum against HAd2 virion was obtained by multiple subcutaneous injections into rabbit of virus particles purified by two successive bandings in self-generating CsCl gradients. The injections were made in 10 X 50 μ l aliquots at 7 days intervals and the animal was exsanguinated after 10-12 weeks. A total amount of 2.0-2.5 mg of antigen was injected.

Monospecific antiserum towards protein IIIa was made by injection into a rabbit of IIIa - anti IIIa antibody precipitate freshly formed within the agarose gel of several cross immunoelectrophoresis plates (Martin et al., 1975). The antigen mixtures used were extracts of cells infected with H2 ts 115 at restrictive temperature, in which neither free fiber nor complete penton superimposed with IIIa in the two-dimensional pattern. A precipitating antiserum was thus obtained. A non-precipitating antiserum against IIIa was obtained by injection into a rabbit of protein IIIa purified from virus particles as described below. The presence of anti IIIa antibody was detected by immunoselection of labeled IIIa on protein A of Staphylococcus aureus cells as described below. About 0.2 mg of IIIa antigen was used per rabbit.

. Extraction and purification of HAd2 protein IIIa

The method used was basically the high salt, acid urea and alkaline urea extraction of virion low molecular weight proteins described by Everitt and Philipson (1974). However, it was found that IIIa was recovered at variance in either the acidic or alkaline urea extract. Since the first step was a dialysis of the virus preparation against 0.005 M Tris-HCl buffer, pH 8.1, a treatment

which has been shown to remove pentons and alter the vertices of the adenovirion (Laver *et al.*, 1969), the efficiency of this step might be conditioned by the virus concentration used.

The method of Everitt and Philipson (1974) was therefore used at different concentrations of virus particles. It was estimated that 1 mg of adenovirus protein corresponds to $3.4-3.5 \times 10^{12}$ physical virus particles.

. Method 1 :

Extraction of IIIa from HAd2 at low concentration of virions (1.0-1.5 mg of protein per ml). 130-150 mg of virus in 0.005 M Tris-HCl buffer, pH 8.1 was mixed with an equal volume of 10 M urea and incubated for 30 min at 25°. Solid NaCl was added to a final concentration of 2.2 M, and 0.1 volume of 1 M Na citrate buffer, pH 3.1. The mixture was incubated for 20 hr at 4° and centrifuged at 110,000g for 15 hr at 4°. The supernatant of the high salt, acid urea extract, contained 30-35 mg of protein, essentially as proteins II, IIIa, V, VI, VII, VIII and IX (Fig 2a).

The acid extract was dialyzed against 0.01M K phosphate buffer, pH 6.8, containing 4 M urea and 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), and chromatographed on a column (1 x 10 cm) of hydroxyapatite equilibrated in the same buffer (Boulanger and Puvion, 1973). 12-15 mg of protein was loaded on the column. A linear gradient of K phosphate buffer, pH 6.8, ranging from 0.01 to 0.50 M (100 ml total volume), and containing 4 M urea and 1 mM PMSF was applied to the column, and 1 ml fractions were collected with a flow rate of 2 ml/hr. Each fraction was monitored for absorbance at 278 nm and resistivity, and analyzed in SDS-polyacrylamide gel. Protein IIIa was found isolated in a first peak eluted at 0.02 M K phosphate (Fig. 3b) ; IIIa co-eluted with protein VI in a second peak at 0.08 M (Fig 3c) and traces of IIIa were also found associated with proteins II and IV eluting in a peak at 0.10 M.

. Method 2

Extraction of IIIa from HAd2 at high concentration of virions (2.5-3.0 mg of protein per ml). 80-100 mg of virus in 0.005 M Tris-HCl buffer, pH 8.1 was treated with 5 M urea and 2.2 M NaCl in 0.1 M Na citrate buffer, pH 3.1, as in method I. After centrifugation, the supernatant was found to contain 20-25 mg of protein, as proteins V, VI, VII, VIII and X. The pellet was then extracted with 0.25 M glycine - NaOH buffer, pH 8.6, containing 5 M urea, 2 M NaCl, 0.05% 2-mercaptoethanol and 1 mM PMSF, at a concentration of 1.0-1.5 mg of protein

per ml for 30 hr at 4° with stirring (Everitt and Philipson, 1974). After centrifugation at 140,000g for 15 hr at 4°, the supernatant, referred to as high salt-urea-alkaline extract, was found to contain proteins II, III, IIIa, IV and IX (fig. 2d). This extract was dialyzed against 0.02 M Tris-acetate buffer, pH 8.3, containing 4 M urea, 0.05% 2-mercaptoethanol, and 1 mM PMSF, concentrated by precipitation with 6 volumes of acetone at - 20° overnight and the precipitate dissolved in 0.1 M Tris-phosphate, buffer pH 8.6, containing 4 M urea. 12-15 mg of protein was thus recovered, as proteins II, IIIa and IX (Everitt and Philipson, 1974). These proteins were further separated by chromatography on QAE-A 25 Sephadex equilibrated in 0.1 M Tris-phosphate buffer, pH 8.6, 4 M urea, 0.01% 2-mercaptoethanol. Protein IX eluted with the starting buffer ; protein IIIa with the starting buffer containing 0.5 M NaCl, and protein II with 0.5 M NaCl in 0.75 M (NH₄)₂ formate buffer, pH 3.4, 4 M urea.

. Method 3 : Purification of protein IIIa from the HAd2-infected cell pool

The HAd2 soluble components were extracted with fluorocarbon and the cell extract precipitated with ammonium sulfate at 55% saturation and pH 6.5, as previously described (Boulanger and Puvion, 1973). The precipitate, redissolved in 0.05 M Na phosphate, pH 6.8, was chromatographed on DEAE-A 50 Sephadex equilibrated in the same buffer. IIIa eluted in the void volume along with fiber and protein IX (Boulanger and Puvion, 1973).

The non-retained material was concentrated by precipitation with ammonium sulfate (55% saturation, pH 6.5) and the precipitate redissolved in 0.01 M Tris-phosphate buffer, pH 8.6, containing 4 M urea, 0.01% 2-mercaptoethanol and 1 mM PMSF. IIIa was purified by chromatography on QAE-A 25 Sephadex equilibrated in the same buffer, as described above, and eluted at 0.5M NaCl.

In certain cases, an extra step of purification on hydroxyapatite in 0.01 M K phosphate buffer, pH 6.8, containing 4 M urea, and 1 mM PMSF, was necessary to eliminate cell protein contaminants. Protein IIIa was eluted at 0.02 M K phosphate, as in method 1.

. Polyacrylamide gel analysis

a) Analytical SDS polyacrylamide gel electrophoresis

Samples were dissolved in an equal volume of sample buffer and heated for 2 min at 100°. Sample buffer consisted of 0.0625 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 6 M urea, 4% SDS and 10% 2-mercaptoethanol. Polypeptides were analyzed in an SDS-containing 17.5% polyacrylamide gel (acrylamide : bisacrylamide ratio of 50:0.235) overlaid by a 5% spacer gel (acrylamide : bisacrylamide ratio of 50:1.33) in a discontinuous buffer system (Laemmli, 1970). The electrophoresis was carried out at a

constant voltage of 35 V, with bromophenol blue as marker. In certain cases gels were impregnated with PPO (2,5 diphenyloxazole) and exposed to Kodak X-Omat R film (Bonner and Laskey, 1974).

b) Analytical polyacrylamide gel electrophoresis

Native samples were electrophoresed at 2.5 mA per slot in slab gel of 7.5% polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide ratio of 50:1.33) buffered with 0.375 M Tris-HCl, pH 8.9. The resolving gel was overlaid by a spacer gel made of 3% polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide ratio of 10:2.5) in 0.125 M Tris-HCl buffer, pH 6.8. The electrode buffer was 0.05M Tris + 0.384 M glycine, pH 8.3.

c) Two dimensional analysis (isoelectric focusing/SDS-gel electrophoresis)

This was performed according to the method of O'Farrell (1975), with minor modifications. KB cell extracts were prepared by sonicating 5×10^6 labeled cells in 0.5 ml lysis byffer (9.5 M urea, 0.5% SDS, 2% Nonidet-P 40, 5% 2-mercaptoethanol, and 5% ampholines, consisting of 3.4% pH 5-7 and 1.6% pH 3.5-10). Aliquots (10-25 μ l) of the supernatant, containing at least 250,000 cpm were applied to the first dimension isoelectric focusing gel. This gel was prepared as described by O'Farrell (1975), except that the ampholine concentration was increased to 5%, consisting of a 2:1 ratio of pH 5-7 to pH 3.5-10 ampholines (LKB, Sweden). Gels were focused at 400 V for 20 hr.

Isoelectric points of proteins were estimated by reference to the pH gradient determined by analysis of a parallel isoelectric focusing gel. This gel was sliced into 1-cm pieces and incubated in 2 ml deionized, degassed distilled water for 1 hr at room temperature. The pH of each sample was determined in a standard pH meter.

The second dimension SDS gel was prepared as described above. The first dimension gel was immersed for 1 hr at room temperature in 18 ml of equilibrating buffer (10.5 ml of distilled water, 2.5 ml of 1.25 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, 4 ml of 10% SDS, 1 ml of 2-mercaptoethanol) with gentle shaking, prior to the second electrophoresis.

Immunological tests

a) Double immunodiffusion was performed in 0.9% agarose (Industrie Biologique Française, France) containing 0.14 M NaCl, and buffered with 0.02 M Na barbital buffer, pH 8.6.

b) Two-dimensional immunoelectrophoresis

This was carried out according to a modification of the basic technique of Laurell (1965) which has been described in detail elsewhere

(Martin et al., 1975 ; Martin et al., 1978).

c) Immunoprecipitation

Aliquots (20 μ l) of labeled antigen samples were mixed with 60 μ l of NET-N buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 M NaCl, 5 mM sodium EDTA, 0.05% Nonidet P40, 0.02% sodium azide) supplemented with 0.2% bovine serum albumin, and with 20 μ l of preimmunized or immunized rabbit serum. Incubation was for 18 hr at 4°.

Immune complexes were collected by adsorption to inactivated Staphylococcus aureus cells (Cowan I strain ; Kessler, 1975). An aliquot (10 μ l) of a 20% (w/v) washed cell suspension (in NET-N buffer) was added to the precipitation reaction and incubated for 30 min at room temperature. Cells were pelleted and washed three times in NET-N buffer. Labeled antigens were eluted from the S. aureus cells by resuspension of the cell pellet in 25 μ l of SDS-sample buffer, heated for 2 min at 100° and applied directly to the SDS-polyacrylamide gel.

. Gel filtration chromatography

The apparent molecular weight of native protein IIIa was estimated by molecular sieve chromatography on Sephacryl S-200 superfine (Pharmacia Fine Chemicals). The column (100 x 1.5 cm) was equilibrated in 0.02M Tris-HCl buffer, pH 8.1, containing 0.5 M NaCl, 1 mM Na EDTA and 10% glycerol. The flow rate was 10 ml/hr, and 1.9 ml fractions were collected at 4°. The column was calibrated with the following markers : beef liver catalase (247,000), rabbit muscle glycerol-3-phosphodehydrogenase (136,000), bovine serum albumin (67,000), ovalbumin (43,500), bovine pancreatic ribonuclease (12,600). Serum albumin (5 mg), ovalbumin (10 mg) and ribonuclease (10 mg) were depicted by adsorption at 278 nm. In order to obtain good resolution between serum albumin and ovalbumin, twice as much ovalbumin as serum albumin was used. 80 international units (IU) of glycerol-3-phosphodehydrogenase and 13,000 IU of catalase were loaded onto the column and assayed as described below.

. Sucrose density gradient centrifugation

The sedimentation coefficient of protein IIIa was estimated by velocity sedimentation through a linear gradient (5-27%,w/v) in 0.02M Tris-HCl, pH 8.1, containing 1 M NaCl, 10% glycerol, 1 mM Na EDTA. The gradients were centrifuged for 21 hr at 49,000 rpm and 4° in a Beckman S1 50.1 rotor. 0.2 ml fractions were collected through the bottom. The following markers were used : E. coli alkaline phosphatase (6.0S) and yeast 3-phosphoglycerate kinase (3.1 S).

6 IU of alkaline phosphatase and 18 IU of 3-phosphoglycerate kinase were loaded on each gradient and assayed as described below.

. Amino acid analysis

Samples of protein IIIa corresponding to 0.3-0.5 mg of protein were hydrolyzed for 24 and 72 hr at 110° with 5.6 N HCl in sealed tubes under nitrogen, and analyzed in a Beckman Multichrom amino acid autoanalyzer.

. N- terminal amino acid

N-terminal amino acid determination was performed according to the method of Casola *et al* (1974), using ^{14}C -DNS-Cl (104 mCi/mmol, 0.5 mCi/ml, CEA, Saclay, France). Autoradiography of two-dimensional thin layer plates were made by exposure to Kodak "Kodirex" film.

. Adenovirus neutralization test

The neutralizing activity of the antiserum towards protein IIIa was determined by inhibition of plaque formation in HeLa cell monolayers (Pettersson and Höglund, 1969).

. Protein

Protein concentration was assayed by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard.

. Radioactive labeling

HAd2 mature particles were labeled by adding ^{14}C -Valine (285 mCi/mmol ; Amersham, England) from 18 to 30 hr post-infection (p.i.), at 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ in culture medium containing 10% of the concentration of valine in normal medium.

Pulse-labeling was performed in KB cell suspension cultures, mock infected or infected with HAd2 at a m.o.i. of 100 PFU/cell. L(^{35}S)-methionine (50-100 $\mu\text{Ci/ml}$; 700-800 Ci/mmol, Amersham, England), was added for 30 min at different times p.i. in a methionine-deprived medium, and the cells were harvested just after the pulse. For chase experiments, the cells were centrifuged and resuspended in medium containing a normal concentration of cold methionine.

. Enzymes and enzymatic assays

Amino-peptidase M (amino acid arylamidase) from hog kidney (EC 3.4.11.2) was purchased from Boehringer (Mannheim, West-Germany), hog kidney leucine amino-peptidase (EC 3.4. 11.1) from Sigma (Saint-Louis, MO., USA) and baker's yeast carboxypeptidase Y (EC 3.4 12.-) from Pierce Chemicals (Rockford, Ill. USA). Hydrolysis with amino-peptidase or carboxypeptidase were performed at 37° for

30 hr with a ratio of enzyme : substrate of 3:100 and addition of enzyme in three aliquots at 0, 8 and 20 hr.

Beef liver catalase (EC 1.11.1.6), rabbit muscle glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GDH, EC 1.1. 1.8), bovine pancreatic ribonuclease (EC 3.1.4. 22), E. coli alkaline phosphatase (EC 3.1 3.1) and yeast 3-phosphoglycerate kinase (PGK, EC 2.7. 2.3) were purchased from Boehringer.

Catalase in gradient or chromatography fractions was assayed by the method of Bergmeyer (1955). PGK was assayed according to Bücher (1955) and GDH according to Krebs (1955); alkaline phosphatase was assayed by the method of Bessey et al. (1946). All assays were adapted with minor modifications to the Roche-Kontron Rotochem II A-36 centrifuge analyzer (unpublished).

. Nomenclature

The nomenclature proposed by Ginsberg et al. (1966) for the major capsid components of HA2 (hexon, penton base, penton and fiber) is used. The remainder of the structural proteins are referred to according to the terminology proposed by Maizel et al. (1968 b), and Anderson et al. (1973).

Results

Evidence for the existence of capsid protein IIIa as a major soluble antigenic component in HAd2-infected cell extracts : identification of IIIa on two-dimensional immunoelectrophoresis.

Rabbit antiserum obtained by hyperimmunization of animals with purified HAd2 virion revealed an extra peak (peak 4), of immune precipitate in two-dimensional immuno-electrophoresis (2D-IE) (Fig. 1a), not found thus far with previous sera (Martin et al., 1975 ; Martin et al., 1978). Because this extra peak might correspond to a cell or culture medium serum fraction contaminating the virion preparation, extracts of HAd2-infected cells labeled late p.i. (20 to 36 hr) were analyzed with the same antiserum in 2D-IE. Fig. 1b shows that the extrapeak was labeled, suggesting its viral origin.

The identification of the viral component corresponding to this peak 4 was carried out as follows. The precipitation line visible on a stained dried plate of 2D-IE and containing the precipitate of labeled antigen-antibody complexes was scratched off the plate, dissociated in SDS-urea-sample buffer with heating at 100° for 2 min and analyzed in SDS-polyacrylamide gel, with labeled HAd2 virion as marker. Fig. 1d shows that the antigen contained in precipitate peak 4 of Fig. 1 a and b (WT extract) and of Fig. 1 c (H2 ts 115 extract) migrated as a major polypeptide of about 66,000 daltons (66 K), corresponding to the major polypeptide IIIa of the HAd2 virion. Discrete bands of lower molecular weight species were visible and might correspond to contaminating proteins in the immune precipitate, or to proteolysis of the IIIa.

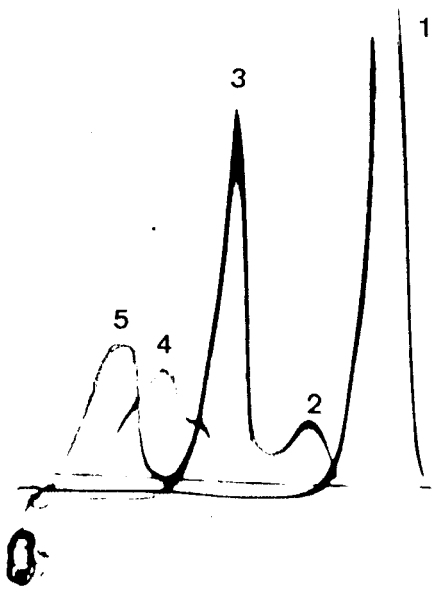
A similar technique of cutting out the precipitate of antigen-antibody complexes formed within the agarose gel, was used to obtain a monospecific antiserum. The immune precipitates of several 2D-IE plates (15-20 plates) were injected into a rabbit. However, with a HAd2 WT extract, peak 4 was partially masked by penton (peak 3) and fiber (peak 5). H2ts 115 mutant was used therefore as the absence of synthesis of antigenically detectable fiber, and thus the absence of penton, rendered easier the visualization and extraction of peak 4 (Fig. 1 c).

In order to determine whether the antigen present in precipitate peak 4 of 2D-IE belonged to a virion component, anti HAd2 virion polyspecific serum and monospecific antiserum against "component 4" were reacted in 2D-IE with deoxycholate-treated HAd2 virions. This treatment has been found to disrupt the virus capsid (Russell et al., 1971) and also the penton into its penton base and fiber moieties (Boudin et al., 1979). Fig. 1 e and f shows

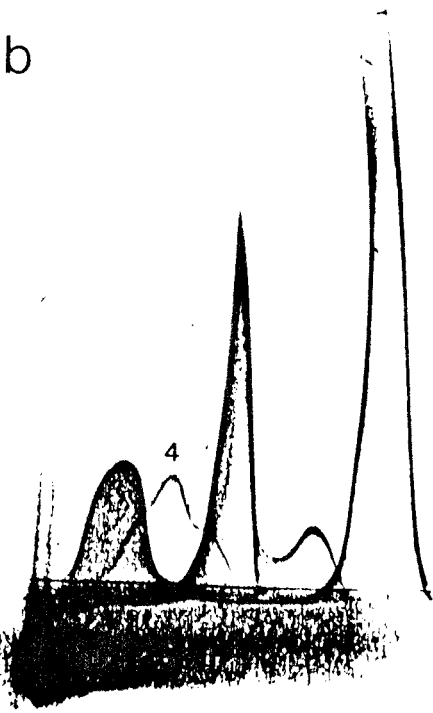
Figure 1

Identification of the antigen IIIa of Had2. (a) Two-dimensional (2D) immunoelectrophoresis of WT-infected cell extract, labeled with ^{35}S -methionine from 20 to 36 hr p.i. Staining : Coomassie blue. (b) Corresponding autoradiogram pattern. (c) 2D-analysis of extract from cells infected with fiber-defective H2 ts 115 mutant at restrictive temperature. (d) SDS-polyacrylamide gel analysis of immuno precipitate peaks formed in agarose with H2 ts 115-infected labeled extracts as in (c) : (1) hexon peak ; (2) penton base peak ; (4) IIIa ; (5) Fiber peak ; (v) control Had2 virion. (e) Had2 virion treated with 0.5% deoxycholate (DOC) and analyzed against a polyspecific antivirion serum. (f) HAd2 virion treated with 0.5% DOC and analyzed against the monospecific anti-IIIa. Loads were usually 10-20 μl of antigenic extract (3-5 mg of protein/ml) and 100-200 μl of antiserum.

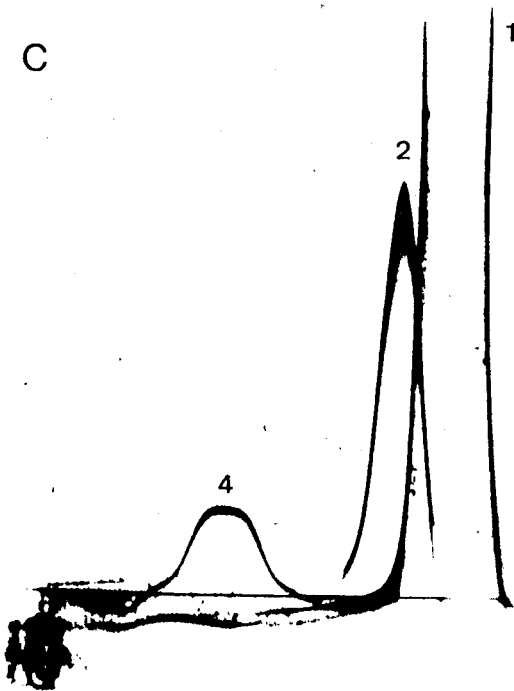
a



b



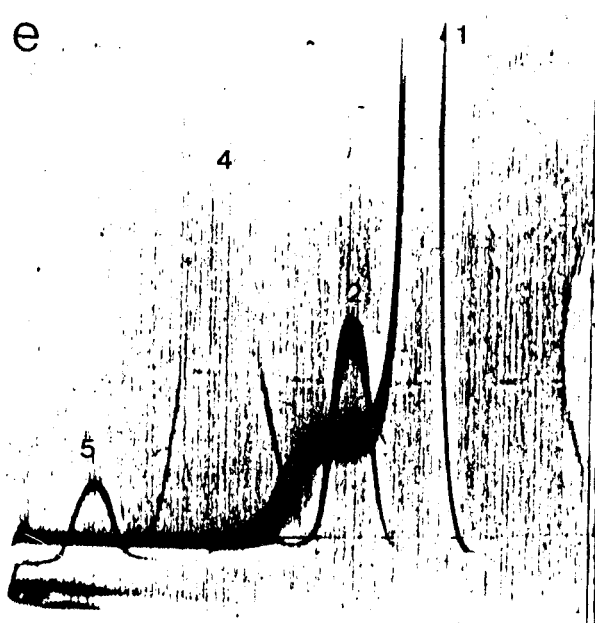
c



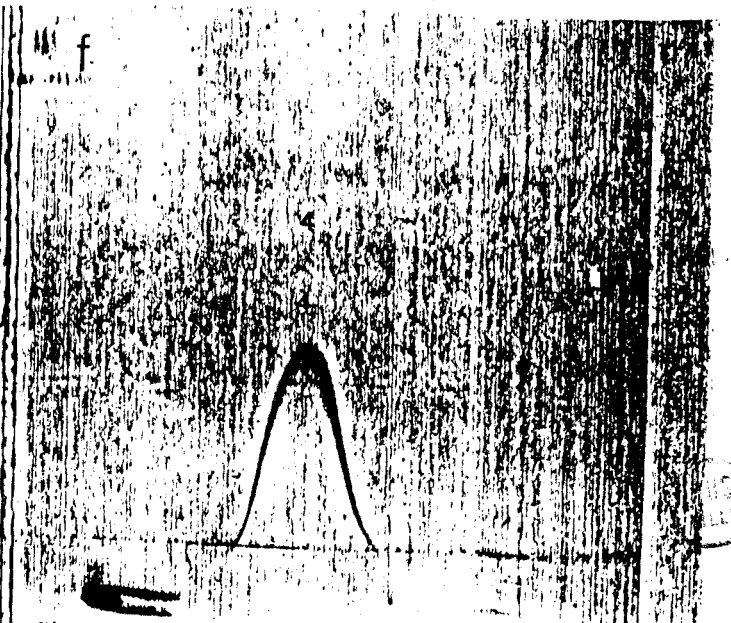
d



e



f



that the antigen of peak 4 existed as a virion component. Thus the results of 2D-IE and SDS-polyacrylamide gel analysis permitted the identification of protein IIIa as one of the major soluble structural components of the HAd2 capsid.

. Extraction and purification of protein IIIa

The different extraction procedures used gave approximately the same yield. In method 1, from 130-150 mg of purified virus, 2.0-2.2 mg of IIIa was obtained, viz. a yield of 1.4-1.7%. In method 2, from 80-100 mg of virion, 1.0-1.5 mg of IIIa was obtained, viz. a yield of 1.2-1.7%. Method 3 used the pool of infected-cell material as starting material: 1.0-1.5 mg of IIIa was obtained from 90-100 mg of material non-retained on DEAE-Sephadex, viz. a recovery of 1.0-1.6%.

However, virion-extracted protein IIIa was not recovered in the same fraction, depending upon the concentration of virus used. As shown on Fig. 2a, most of the IIIa was recovered in the acid urea extract, along with proteins II, V, VI, VII, VIII and IX, when low concentrations of virus were used. A certain amount of IIIa was also extracted by alkaline urea containing buffer (Fig. 2b). At higher concentrations of virus, most of the IIIa remained in the pellet of the acid urea treatment and was extractible at alkaline pH, along with proteins II, III, IV and IX. The different distribution of IIIa in the high and low concentration methods were repeatedly obtained by several operators (twice each).

IIIa isolated from the HAd2-infected cell pool of soluble components was referred to as "soluble IIIa", whereas IIIa isolated from virus particles was referred to as "virion-extracted IIIa". Most of the physicochemical and biochemical analyses were performed comparatively on both types of IIIa. Amino acid composition analyses were carried out only on virion-extracted protein IIIa.

. Physical parameters of the proteins IIIa

The behavior of protein IIIa in sucrose density gradient and in gel filtration chromatography permitted the determination of physical parameters S and D . The sedimentation coefficient was found to be $S = 6.0 \pm 0.1 \times 10^{-13}$ sec. The diffusion coefficient D , determined by gel filtration chromatography, was estimated to be $D = 7.85 \pm 0.10 \times 10^{-7}$ cm.sec⁻¹. From the amino acid composition (see below) a partial specific volume of $\bar{V} = 0.720 \pm 0.002$ ml/g was calculated. From S , D and \bar{V} , a molecular weight of $65,430 \pm 1,800$ was calculated which was close to the value of 66,000 determined for the molecular weight of the polypeptide unit of IIIa (Anderson *et al.*, 1973).

The Stokes radius was found to be 2.7 ± 0.1 nm, and the frictional ratio $f/f_0 = 1.02 \pm 0.01$. This gave an axial ratio of 1.0, whatever the hydration of the protein molecule (Siegel and Monty, 1966; Haschemeyer and Haschemeyer, 1973). The same values of S and D were found for either virion-extracted IIIa or soluble IIIa.

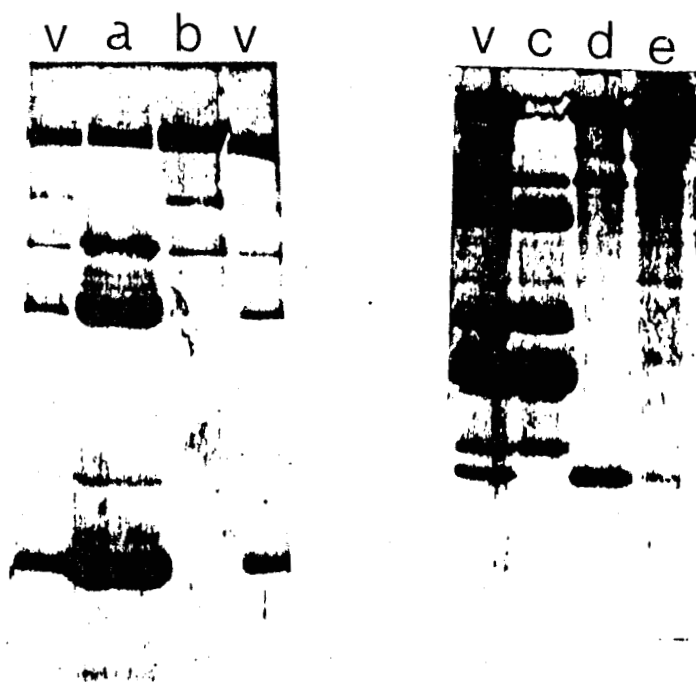


Figure 2

Extraction of protein IIIa from HAd2 virion at low (a, b) or high (c, d, e) virus particle concentrations. (v) : starting virus material ; (a) : acid-urea extract ; (b) alkaline urea extract ; (c) : acid urea extract ; (d) : alkaline urea extract ; (e) : remaining pellet after acid and alkaline urea extraction.

Table 1

Amino acid composition of HAd2 protein IIIa

Amino Acid (a)	Mol per 100 ml of all amino acid recovered
Asp	10.2
(b) Thr	5.8
(b) Ser	10.4
Glu	11.8
Pro	8.3
Gly	10.8
Ala	8.5
(c) Val	5.3
Half-Cys	traces
Met	1.2
(c) Ile	3.5
(c) Leu	7.4
Tyr	3.4
Phe	4.0
Lys	2.3
His	1.9
Arg	5.2
Trp	ND (d)

(a) Average of four determinations on 24 hr acid hydrolyzates

(b) Extrapolated to zero time hydrolysis

(c) Based on the average value of two 72 hr hydrolysis

(d) ND : not determined



Electrophoretic properties of the protein IIIa

Protein IIIa eluting at 0.02 M K phosphate buffer from hydroxyapatite after acid-urea extraction from the virion, migrated as a unique sharp band in SDS-polyacrylamide gel (Fig. 3b), and as a blurred band in non-dissociating 7.5% polyacrylamide gel (Fig. 3 i, j). This blurred band suggested some micro-heterogeneity in electric charge of protein molecules of the same polypeptide size.

When analyzed by isoelectric focusing, two uneven components were found in the preparations of virion-extracted IIIa : a major band with a pI of 5.95, and a minor band with a pI 6.08, this latter band representing 10-15% of the total protein bulk, as determined by scanning of stained monodimensional isofocusing polyacrylamide gels. Two-dimensional analysis (isoelectric focusing/ SDS-gel electrophoresis) of the samples of virion-extracted IIIa confirmed that the minor protein species of pI 6.08 migrated as a polypeptide of same molecular weight (66,000) as the major species, excluding the possibility of some minor proteolytic cleavage occurring during the extraction and purification procedure (Fig. 4). The IIIa eluting with protein VI from hydroxyapatite at 0.08 M K phosphate (Fig. 3c) focused at a unique pI of 5.95 (not shown).

Biochemical characteristics of protein IIIa

Amino acid composition analysis of protein IIIa revealed a high content of aspartic and glutamic acid (22%). Serine and glycine were also found in great amount, and proline accounted for more than 8% of the total amino acid recovered. Basic amino acids, and particularly lysine, were poorly represented and cystine was only detectable in trace amounts (Table 1).

Glycine was found as N-dansylated amino acid of virion-extracted IIIa, suggesting an unblocked N-terminus. This hypothesis was confirmed by the break-down of protein IIIa in the presence of aminopeptidase M (Fig 3e). IIIa seemed to be more resistant to leucine aminopeptidase (Fig. 3d), but revealed sensitive to carboxypeptidase Y digestion (Fig. 3f), an exopeptidase which can remove all the amino acids including proline, from the C-end of a polypeptide chain. Since this carboxypeptidase has been found to have some amidase activity (Hayashi and Hata, 1972 ; Hayashi et al., 1973), it might not be possible to assess if the carboxyl end of the IIIa chain was blocked by amidification.

Immunological properties of IIIa

Adenovirus type 2-, type 5- and type 3-infected cell extracts were tested by double immunodiffusion against the precipitating anti-IIIa serum. One continuous precipitation line was obtained between types 2, 5 and 3 extracts, with no visible spur between types 2 and 3, 2 and 5 and types 5 and 3 extracts, suggesting the presence of only group-specific determinants in IIIa (not shown). When

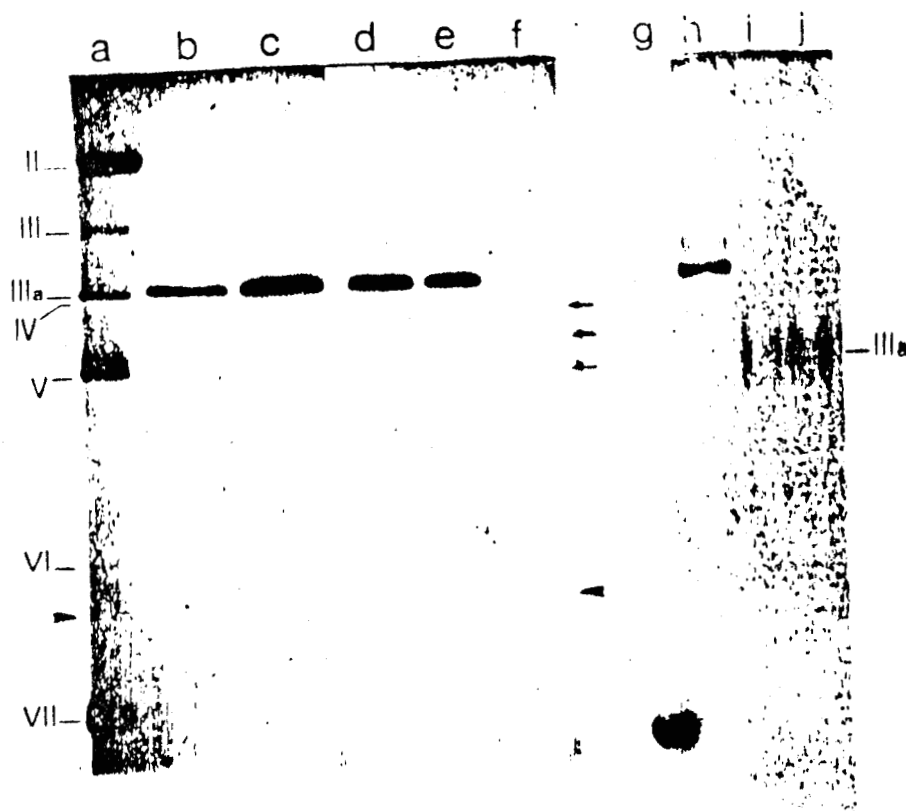


Figure 3

Polyacrylamide gel electrophoresis of protein IIIa, SDS-denatured (a-f), or as native sample (g-j). (a) : control virion ; (b) : IIIa obtained from hydroxyapatite at 0.02 M K phosphate (8µg of protein), (c) IIIa eluted from hydroxyapatite at 0.08 M and contaminated with protein VI ; (d) IIIa (same as in c) incubated with leucine aminopeptidase ; (e) IIIa digested with aminopeptidase M ; (f) : IIIa digested with carboxypeptidase Y ; (g) control bovine serum albumin ; (h) : control HAd2 hexon ; (i) : purified IIIa (4 µg of protein) ; (j) : purified IIIa (12 µg). Arrowhead indicates the position of protein VI spontaneous breakdown product in virion and virion-extracted protein samples (i, d, e). Arrows indicate cleavage products of IIIa occurring in the presence of aminopeptidase M (e).

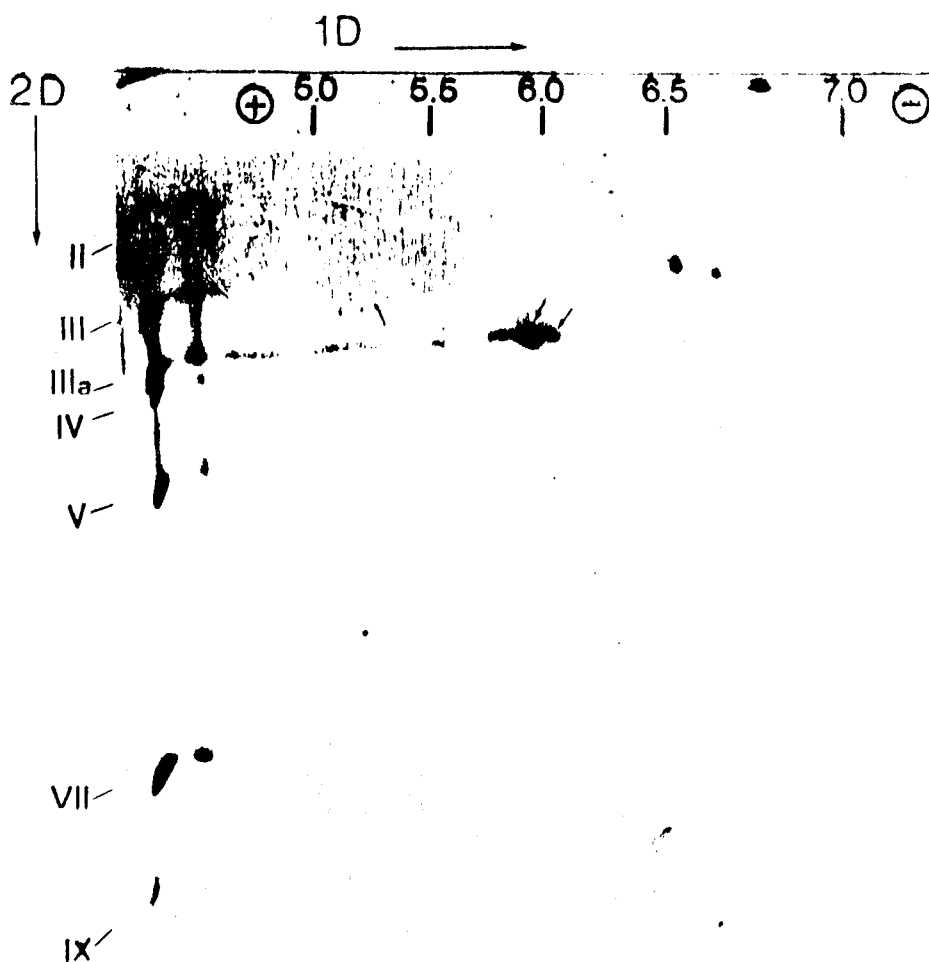


Figure 4

Two dimensional gel analysis of protein IIIa. Virion-extracted IIIa obtained from hydroxyapatite at 0.02 M K phosphate as indicated under methods was analyzed by isoelectric focusing in a first dimension (1D), and SDS-polyacrylamide in a second dimension (2 D). A major spot focused at pH 5.95 and a minor spot at 6.08, both corresponding to the polypeptide IIIa (66,000 daltons) of the virus marker (v).

assayed by the plaque technique, both precipitating and non-precipitating anti IIIa sera revealed no neutralization activity: no significant reduction of plaque number but a 4-5 fold reduction of fluorescent focus formation were observed. This suggests that protein IIIa was not a major neutralizing antigen.

. Time-course, synthesis of HAd2 protein IIIa

HeLa cell monolayers (6×10^6 cells per flask), infected with HAd2 were pulse-labeled for 30 min with ^{35}S -methionine at 0, 4, 6, 8, 10, 12, 18 and 24 hr p.i. After the pulse, the cells were harvested, disrupted by three cycles of freezing and thawing in hypotonic buffer (0.01 M Tris-HCl, pH 7.8, containing 1.5 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM Na EDTA and 1 mM PMSF) and centrifuged at 1,000 g for 5 min.

Aliquots of each supernatant were incubated with different antisera and immuno-precipitates were analyzed on a one-dimensional SDS-polyacrylamide gel. Anti-IIIa serum revealed the presence of protein IIIa at 10 hr p.i., with a maximum of synthesis at 20-24 hr p.i., i.e., following closely the time-course synthesis of hexon and of other late virus proteins (not shown).

Discussion

The protein IIIa from human adenovirus type 2 exists as an independent capsid antigen in the virion and as a major soluble component in the infected cell pool of virus material. Its synthesis occurs late in the infectious cycle, and is contemporary to hexon protein. IIIa has been purified to apparent homogeneity from the virion (virion-extracted IIIa) or from the cell pool of virus soluble components (soluble IIIa). Two purification procedures were used to obtain IIIa from HAd2 virion, based on the acid urea and alkaline urea extraction method developed by Everitt and Philipson (1974) to obtain low molecular weight virion proteins. The choice for one or the other procedure depends upon the concentration of virus particles in the starting material.

At low concentrations of virus particles (1.0-1.5 mg of virus protein per ml, corresponding to $3.5-5.0 \times 10^{12}$ physical particles per ml), IIIa was recovered mainly in the acid urea extract (Fig. 2a). At relatively high concentrations of virions (2.5-3.0 mg of virus protein per ml, corresponding to ca. $0.8-1.0 \times 10^{13}$ particles per ml) most of the IIIa was solubilized by alkaline-urea treatment (Fig. 2d). This was possibly due to the initial step of virus suspension dialysis against hypotonic 0.005 M Tris-HCl buffer, pH 8.1, a treatment which has been shown to disrupt the vertex structures of the virion and particularly to release penton capsomers (Laver *et al.*, 1969).

Virion-extracted or soluble IIIa behaved in the same way in sucrose density gradient or gel-filtration chromatography, suggesting similar physical parameters. The purified HAd2 protein IIIa had a relatively high sedimentation coefficient (6.0 S) and behaved as a spherical-shaped protein molecule with a Stokes radius of 2.7 nm in gel filtration on Sephacryl S-200, a frictional ratio of 1.02, and an axial ratio close to 1. The molecular weight of the HAd2 IIIa polypeptide unit has been previously estimated to be 66,000 in SDS-polyacrylamide gel (Anderson *et al.*, 1973). The physical parameters obtained here permitted the calculation of an apparent molecular weight of $65,430 \pm 1,800$ for the native IIIa, which implied the existence of a single polypeptide unit in protein IIIa.

A microheterogeneity in isoelectric focusing was found in IIIa preparations with 85-90% of IIIa focusing at a pI of 5.95 and 10-15% at 6.08. IIIa has been found to be one of the late phosphorylated polypeptides in adenovirus-infected cells and the major phosphorylated structural polypeptide in the adenovirion (Russell and Blair, 1977). It is possible that the difference observed in pI values reflects some minor variation in the phosphorylated state of virion-incorporated IIIa.

The amino acid composition of HAd2 IIIa showed features common with the other virion proteins such the richness in dicarboxylic amino acids and leucine and the scarcity of cysteine and histidine. However, an unusual feature of IIIa appeared to be its high content in serine, glycine and proline, and its low content in lysine (Table 1).

Immunological study of IIIa with precipitating and non-precipitating antisera showed that IIIa carried apparently only group-specific antigenic determinants, and that IIIa did not induce detectable neutralizing antibodies. The weak neutralization activity of these sera observed only with the FFU technique and not in plaque formation likely corresponded to virion aggregation in the case of the precipitating anti-serum and to delayed eclipsing in the case of the non-precipitating anti-serum (Udell, 1970).

Virion-incorporated IIIa was sensitive to aminopeptidase digestion and glycine was detected as free N-terminal amino group, suggesting an unblocked N-terminus. All the known primary transcription products of the type 2 adenovirus appear to be N-acetylated (Jörnvall et al., 1974 ; Boulanger et al., 1978 ; Boudin et al. 1979 ; Boulanger et al., 1979). Free N-ends have been found only in the cleavage products of N-blocked precursors PVII (Sung et al., 1977) and PVI (Sung et al., 1978). IIIa appeared also to be sensitive to carboxypeptidase digestion and to possess therefore a non-amidified C-terminus. In the following paper (Boudin et al., 1979), it is suggested that IIIa (or a precursor to IIIa) is cleaved by proteolysis at a stage between assembly intermediate particles and mature virions.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS (ERA 225), the INSERM (AT 50 77 82, FRA 43) and the Université du Droit et de la Santé (UER III). We thank Miss A.M. Testard and Mrs. C. Vercamer for skilled technical assistance, Mr. D. Petite for providing cell cultures and Miss C. Richet for amino acid analysis. The expert secretarial aid of Miss E. Fremaux was gratefully acknowledged. The authors are also indebted to Professor R.G. Marusyk for helpful criticism and discussion.

References

- ANDERSON, C.H., BAUM, P.R. and GESTELAND, R.F. (1973)
Processing of adenovirus 2-induced proteins. J. Virol., 12, 241-252.
- BERGMEYER, H.U. (1965)
Measurement of catalase activities. Biochem. Z., 327, 255-258.
- BESSEY, O.A., LOWRY, H.O. and BROCH, M.J. (1946)
Method for the determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. J. Biol. Chem., 164, 321-329.
- BONNER, W.M. and LASKEY, R.A. (1974)
A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem., 46, 83-88.
- BOUDIN, M.L., D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C. and BOULANGER, P.
Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation Virology, submitted.
- BOUDIN, M.L., MONCANY, M., D'HALLUIN, J.C. and BOULANGER, P. (1979)
Isolation and characterization of adenovirus type 2 vertex capsomer (penton base). Virology, 92, 125-138.
- BOULANGER, P. and PUVION, F. (1973)
Large-scale preparation of soluble adenovirus hexon, penton and fiber antigens in highly purified form. Eur. J. Biochem., 39, 37-42.
- BOULANGER, P., DEVAUX, C. and LEMAY, P. (1978)
Isolation and characterization of a slow-migrating class of adenovirus type 2 hexons. Virology, 84, 456-468.
- BOULANGER, P., LEMAY, P., BLAIR, G.E. and RUSSELL, W.C. (1979)
Characterization of adenovirus protein IX. J. Gen. Virol., 44, 783-800
- BÜCHER (1955)
Phosphoglycerate kinase from Brewer's yeast, in Methods in Enzymology Colowick and Kaplan ed, Acad. Press. New-York, vol 1, pp 415-422.
- CASOLA, L., DI MATTEO, G., DI PRISCO, G. and CERVONE, F. (1974)
Dansyl chloride binding to proteins. Quantitative estimation of N-terminal, lysyl and tyrosyl residues by the radioactive reagent. Anal. Biochem., 57, 38-45.
- EVERITT, E. and PHILIPSON, L. (1974)
Structural proteins of adenoviruses. XI. Purification of three low molecular weight virion proteins of adenovirus type 2 and their synthesis during productive infection. Virology, 62, 253-269.

- EVERITT, E., SUNDQUIST, B., PETERSSON, U. and PHILIPSON, L. (1973)
Structural proteins of adenoviruses. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2. Virology, 52, 130-147.
- GINSBERG, H.S., PEREIRA, H.G., VALENTINE, R.C. and WILCOX, W.C. (1966)
A proposed terminology for the adenovirus antigens and virion morphological subunits. Virology, 28, 782-783.
- HASCHEMEYER, R.H. and HASCHEMEYER, A.E.V. (1973)
Proteins : a guide to study by physical and chemical methods. Wiley J. and sons. New-York, London. pp 171-179.
- HAYASHI, R., and HATA, T. (1972)
Action of yeast proteinase C on synthetic peptides and poly- α , L-amino acids. Biochem. Biophys. Acta, 263, 673-679.
- HAYASHI, R., MOORE, S., and STEIN, W. M. (1973)
Carboxypeptidase from yeast. J. Biol. Chem., 248, 2296-2302
- JÖRNVALL, H., OHLSSON, H. and PHILIPSON, L. (1974)
An acetylated N-terminus of adenovirus type 2 hexon protein. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 304-310.
- KESSLER, S. (1975)
Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A antibody absorbant : parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol., 115, 1617-1624.
- KREBS, E.G. (1955)
Glyceraldehyde-3-phospho-dehydrogenase from yeast. In Methods in Enzymology, Colowick and Kaplan ed. Acad. Press New-York, Vol 1, pp 407-411.
- LAEMMLI, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227, 680-685.
- LAURELL, C.B. (1965)
Antigen-antibody crossed immunoelectrophoresis. Anal. Biochem., 10, 358-361.
- LAVER, W.G., WRIGLEY, N.G., and PEREIRA, H.G. (1969)
Removal of pentons from particles of adenovirus type 2. Virology, 39, 599-605.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J. (1951)
Protein measurements with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- MAIZEL, J.V. Jr., WHITE, D.O. and SCHARFF, M.D. (1968a)
The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components of the virion and a comparison of types 2, 7A and 12. Virology, 36, 115-125.

- MAIZEL, J.V. Jr., WHITE, D.O. and SCHARFF, M.D. (1968b)
The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion. Virology, 36, 126-136.
- MARTIN, G.R., WAROCQUIER, R. and BOULANGER, P.A. (1975)
Quantitation of adenovirus soluble antigens by crossed immunoelectrophoresis : application to serological characterization of mutants. Intervirology, 5, 162-172.
- MARTIN, G.R., WAROCQUIER, R., COUSIN, C., D'HALLUIN, J.C. and BOULANGER, P.A. (1978)
Isolation and phenotypic characterization of human adenovirus type 2 temperature-sensitive mutants. J. Gen. Virol., 41, 303-314.
- O'FARRELL, P.H. (1975)
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem., 250, 4007-4021.
- PEREIRA, H.G. and SKEHEL, J.J. (1971)
Spontaneous and tryptic degradation of virus particles and structural components of adenovirus. J. Gen. Virol., 12, 13-24.
- PETTERSSON, U. and HÖGLUND, S. (1969)
Structural proteins of adenoviruses. III. Purification and characterization of the adenovirus type 2 penton antigen. Virology, 39, 90-106.
- PHILIPSON, L. and LINDBERG, U. (1974)
Reproduction of adenoviruses. In "Comprehensive Virology" (H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner, eds). Vol 3, pp 143-227. Plenum Press, New York.
- RUSSELL, W.C. and BLAIR, G.E. (1977)
Polypeptide phosphorylation in adenovirus-infected cells. J. Gen. Virol., 34, 19-35.
- RUSSELL, W.C., Mc INTOSH, K. and SKEHEL, J.H. (1971)
The preparation and properties of adenovirus cores. J. Gen. Virol., 11, 35-46.
- SIEGEL, L.M. and MONTY, K.J. (1966)
Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. Biochim. Biophys. Acta., 112, 346-362.

SUNG, M.T., LISCHWE, M.A., RICHARDS, J.C. and HOSOKAWA, K. (1977)

Adenovirus chromatin I. Isolation and characterization of the major core protein VII and precursor pro-VII. J. Biol. Chem., 252, 4981-4987

SUNG, M.T., LISCHWE, M.A. and Mc CANEY, F. (1978)

Adenovirus proteins : isolation, characterization and the molecular nature for the processing of polypeptide VII. EMBO Workshop on the Molecular Biology of adenoviruses, Örenäs, Sweden, June 1978.

WADELL, G. (1970)

Structural and biological properties of capsid components of human adenoviruses. Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.

Human adenovirus type 2 protein IIIa.

II. Maturation and encapsidation

Marie-Laure Boudin, Jean-Claude D'Halluin,
Chantal Cousin and Pierre Boulanger *

Running title : Processing of HAd2 IIIa

Author's address

Dr. Pierre Boulanger
Laboratoire de Virologie Moléculaire, INSERM,
Place de Verdun
59045 Lille Cedex
France

* Author to whom all correspondence should be addressed

Summary

Evidence is presented that a HA₂ protein IIIa precursor (PIIIa) of 67,000 daltons exists in assembly intermediates and young virions and is processed into protein IIIa (66,000 daltons). This cleavage is suggested to occur at the N-terminus, and at a late stage of virus maturation, between young and mature virions. Sixty copies of IIIa were found to be present per mature virion or assembly intermediate particle, viz. one molecule per penton base subunit. The PIIIa polypeptide was antigenically different from IIIa, with a weaker antigenic reactivity towards anti-IIIa serum. This difference in antigenicity might reflect a variation in three-dimensional structure between the PIIIa polypeptide and IIIa, resulting from proteolytic cleavage. Immunoprecipitation of deoxycholate-disrupted HA₂ virions using anti-IIIa serum suggests some interaction between IIIa and the core protein VII in mature virions.

Four ts mutants defective in virion assembly and accumulating empty particles at 39.5°C were studied with regard to the occurrence of IIIa antigen in the cell pool of soluble antigens: H5 ts 58, H2 ts 4, H2 ts 112 and H2 ts 101 were shown to be phenotypically IIIa-defective, and to belong to three complementation groups. H2 ts 4 and H2 ts 112 were in the same complementation group, whereas H5 ts 58 and H2 ts 101 fell into two separate groups. Only the H5 ts 58 lesion has been precisely located in the IIIa gene. The IIIa antigen appears, therefore, to be a serological marker for adenovirus assembly.

Introduction

Protein IIIa from human adenovirus type 2 (HAd2) constitutes one of the major structural components of the virus capsid (Anderson et al., 1973 ; Everitt et al., 1973). In a preceding paper (Lemay et al., 1979), it has been shown that this protein can be detected at a late stage after infection as one of the major soluble antigenic components in the excess pool of virus material, as are hexon, penton base, complete penton and fiber. Some of the physical, biochemical and immunological characteristics of IIIa have been reported (Lemay et al., 1979).

The topography of IIIa and of the other virion components has been tentatively determined by sequential disintegration of the virion (Maizel et al., 1968b ; Laver et al., 1968 ; Prage et al., 1970; Russell et al., 1971 ; Everitt et al., 1973), or by chemical cross-linking and enzymatic iodination of the virion subunits (Everitt et al., 1975).

The present study deals with the stoichiometry and topology of protein IIIa within the adenovirion, and its modification during the virus maturation process. This analysis was aided by the use of temperature-sensitive mutants defective in late events involved in capsid morphogenesis : H2 ts 112 (D'Halluin et al., 1978a), H2 ts 4 (Khittoo and Weber, 1977), H2 ts 101 (Martin et al., 1978) and H5 ts 58 (Frost and Williams, 1978, Edvardsson et al., 1978).

Viruses

Human adenovirus type 2 (HAd2), wild type (WT), originally obtained from J.F. Williams (Carnegi-Mellon Institute, Pittsburgh, PA.) was propagated at 37° on KB cells maintained in suspension culture.

The HAd2 temperature-sensitive mutant H2 ts 112 was isolated after nitrous acid treatment of a WT stock and phenotypically characterized (Martin et al., 1978 ; D'Halluin et al., 1978).

H2 ts 4, a mutant defective for DNA encapsidation (Weber et al., 1975 ; Khittoo and Weber, 1977) was a generous gift from J. Weber (Sherbrooke, Québec).

The adenovirus 5 mutant H5 ts 58 was originally isolated by J.F. Williams (Williams et al., 1971) and was obtained from W.C. Russell (Mill, London, U.K.).

Virus was titrated by the plaque assay or by the fluorescent focus unit assay (FFU, Philipson et al., 1968) at 37° for the WT and 33° for the ts mutants. The restrictive temperature was 39°5 for the ts mutants.

Cells

KB cells were grown in spinner culture in Eagle's basal medium supplemented with 5% horse serum. HeLa cells were grown as monolayers in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% calf serum. HeLa were used for plaque assays. The cells were infected at a multiplicity of infection of 25 to 50 PFU per cell.

Radioactive labeling

Adenovirus particles were labeled by adding ^{14}C -valine (250-300 mCi/mmol, Amersham, England) from 18 to 30 h p.i. at 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ in a valine-deprived culture medium (10% of the concentration of valine in normal medium). Adenovirions used as controls were extracted with fluorocarbon and purified by conventional techniques (Green and Pina, 1963).

Pulse-chase labeling experiments were performed in KB cells (6×10^6 cells/ml) in methionine-deprived medium. L-(^{35}S)-methionine (50 $\mu\text{Ci/ml}$, 700-800 Ci/mmol, Amersham, U.K.) was added for 30 min at different times p.i. Cells were harvested just after the pulse or chased by

dilution to 3×10^5 cells/ml in normal medium.

Infected cells were labelled with ^{32}P -orthophosphate as follows : Cells were taken at 18 h p.i., centrifuged and washed two times in phosphate free culture medium. The original culture medium was saved. The cells were resuspended at 6×10^6 cells/ml in phosphate-free medium and labeled for 1 h with $50 \mu\text{Ci/ml}$ of Na^{32}P -orthophosphate (200mCi/mmol , Amersham, U.K.). The chase was performed by diluting the cells in the original culture medium at 3×10^5 cells/ml. ^{32}P -labeled virus and assembly intermediate particles were extracted and purified as described below.

. Purification of adenovirus particles and of assembly intermediates (IM)

Three major species of HAd2-WT particles constituting the successive steps in virion assembly have been characterized in the following sequence : 1.315-IM , 1.370-IM , 1.345 young virions (YV), and 1.345 mature virions (MV), with reference to their buoyant density ($\text{g/ml} = \rho$) in CsCl (D'Halluin et al., 1978b). The method of extraction of the particles from infected cell nuclei, and of particle isolation on sucrose density gradients and CsCl gradients after reversible fixation has been described in detail elsewhere (D'Halluin et al., 1978 a, b).

For rapid isolation of the bulk of IM particles or top components of $\rho=1.30-1.31$ (Ishibashi and Maizel, 1974) another procedure was used. The IM and virion particles were extracted with fluorocarbon and separated on preformed discontinuous CsCl-glycerol gradient made as follows : 0.8 ml of $\rho=1.45$ CsCl in 40% glycerol, 1.4 ml of $\rho=1.33$ CsCl in 26% glycerol and 1.4 ml of $\rho=1.25$ CsCl in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4. The cell lysate (1.5 ml) was loaded on top of the gradient and the gradient was centrifuged for 3 h at 35,000 rpm in a Beckman SW 50 rotor. Mature and young virions, $\rho=1.345$, banded at the top of the $\rho=1.45$ layer. A band of light IM particles was obtained on top of the $\rho=1.33$ layer and the virus soluble components remained in the top zone at the limit of the $\rho=1.25$ layer.

. Immunological analyses

a) Antisera

Rabbit polyspecific anti-HAd2 virion protein component serum and rabbit monospecific anti-IIIa serum were obtained as described in the preceding paper (Lemay et al., 1979).

b) Two-dimensional (2D) immunoelectrophoresis

2D immunoelectrophoresis was carried out according to a modification of the basic technique of Laurell (1965), and has been described in detail elsewhere (Martin et al., 1978).

c) Immunoprecipitation

10-20 μ l of aliquots of ^{35}S -methionine or ^{14}C -valine-labeled antigen solutions were mixed with 15 μ l of preimmune or immune rabbit serum and 60 μ l of NET-N buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM Na EDTA, 0.05% Nonidet-P 40, 0.02% Na azide) supplemented with 0.02% bovine serum albumin, and incubated at 4° for 18 h. Immune complexes were adsorbed to inactivated Staphylococcus aureus cells (Cowan I strain, Kessler, 1975). An aliquot (10 μ l) of a 50% (w:v) washed S. aureus cell suspension in NET.N buffer was added to the immune precipitation mixture and incubated for 30 min at room temperature. S. aureus cells were pelleted by centrifugation and labeled antigens were extracted by heating the cell pellet in 25 μ l of SDS-urea sample buffer for 2 min at 100° and analyzed directly on SDS-polyacrylamide gel.

. Analytical SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Samples were dissolved in an equal volume of sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 6 M urea, 4% SDS, and 10% 2-mercaptoethanol) and heated for 2 min at 100°. Polypeptides were analyzed in an SDS-containing 15.5% polyacrylamide gel (acrylamide : bisacrylamide ratio of 50 : 0.235) overlaid by a 5% spacer gel (acrylamide : bisacrylamide ratio of 50 : 1.33) in the discontinuous buffer system of Laemmli (1970). The gels were stained with Coomassie brilliant Blue R-250, dried under vacuum and exposed to Kodak Kodirex film.

. Complementation tests

HeLa cell monolayers were doubly-infected at an input multiplicity of 5 PFU of each of two ts mutants per cell. After 2 h adsorption at 33°, unadsorbed virus was rinsed off and the cells treated for 30 min with an antiserum against HA2 virion, at a dilution of 1:100-1:200. The cells were rinsed again and further incubated at 39.5° for an additional period of 40 h. Control cell cultures were singly infected in parallel with 10 PFU of each mutant per cell. At the end of the incubation period, the cells were scraped from the dishes into the culture medium, disrupted by three cycles of freezing and thawing, and the virus production titrated using the fluorescent focus assay at 33°C.

Complementation index (CI) was given as the ratio of yield of the double infection to that of the higher of the two single infections at 39.5°, expressed as FFU/ml. Complementation was considered as positive when the CI was at least 10 (Williams et al., 1971 ; Martin et al., 1978).

. Comparative finger-printing

Comparative finger-printing of 67,000 (67K) precursor (PIIIa) and the 66K product (IIIa) were carried out on protein bands isolated from SDS-polyacrylamide gel and partially hydrolyzed with increasing amounts of protease (Cleveland et al., 1977).

. Proteases

Staphylococcus aureus protease V8 was purchased from Miles Laboratories (Slough, U.K.). Aminopeptidase M and leucine aminopeptidase were purchased from Boehringer (Mannheim, B.D.R.). Labeled protein samples were hydrolyzed with 0.02, 0.05, 0.10 and 0.20 μg of enzyme, respectively. Some samples were hydrolyzed with a mixture of the three enzymes in the same amounts.

. Protein

Protein concentration was assayed by the method of Lowry et al., (1951), using bovine serum albumin as the standard.

. Cell fractionation

It should be noted that the distinction between cytoplasmic and nuclear extracts was purely strategic, and that nuclear leaks were not considered. Nuclei were prepared as follows: cells were swollen in hypotonic reticulocyte standard buffer for 10 min at 0°, and disrupted by three strokes of a tight-fitting glass Dounce homogenizer. A pellet was obtained by centrifugation at 1,000g for 15 min, referred to as the nuclear extract whereas the supernatant was referred to as the cytoplasmic extract. Both nuclear and cytoplasmic extracts were dissolved, with heating, in an equal volume of SDS-sample buffer and analyzed in SDS-polyacrylamide gel.

Results

The stoichiometry of protein IIIa in mature adenovirions was studied by two different methods : (i) Scanning of the autoradiograms of several gel tracks of freshly prepared, SDS-urea-mercaptoethanol-dissociated, ^{14}C -valine-labeled HAd2 particles as shown in Fig 2 b and c. The amount of IIIa was determined in relation to protein IV, (IV being the polypeptide subunit of the fiber). This gave an average value of 1.88 ± 0.05 for the ratio of label in bands IIIa : IV. Assuming a molecular weight of 66K for the IIIa polypeptide unit, and of 62K for the IV polypeptide unit (Anderson et al., 1973), a number of 61.6 ± 1.8 copies of IIIa per virion was calculated. No correction was made for the differing valine content of IIIa (Lemay et al., 1979) and the other virion components, but valine seems to be evenly distributed among the virion proteins, when comparison is made between amino acid composition of total HAd2 virion and major capsid proteins (Philipson and Pettersson, 1973).

(ii) Quantitative estimation by 2-D immunoelectrophoresis of IIIa and fiber polypeptides contained in adenovirions dissociated with 0.5% Na deoxycholate (DOC) for 90 sec at 56°. The 2-D immunoelectrophoresis technique has been shown to be a useful method for quantification of HAd2 soluble components (Martin et al., 1975), and to quantitate antigenic components of the adenovirion, such as the penton base (Boudin et al., 1979). Using different concentrations of virion-extracted, DOC-treated IIIa as standards, reacted against a polyspecific anti-HAd2 virion serum, it was possible to obtain calibration curves giving the amount of protein IIIa in a given immune precipitate peak. The protein content of the standard samples was determined by the method of Lowry et al., (1951), and the enclosed surface area of the precipitates, expressed as square millimeters, obtained by automatic quantitative image analysis (Boudin et al., 1979). Similar calibration curves were obtained with purified, DOC-treated, fiber reacted against the same antiserum as that used for IIIa calibration. This immunological method of assaying the antigenic content of HAd2 virions gave a value of 1.90 ± 0.07 for the ratio of IIIa : fiber in DOC-treated virus particles, viz. a number of 62.3 ± 2.5 copies of IIIa per virion. For immunological reasons given below, a stoichiometric study of HAd2^{IM} particles was only possible with the gel scanning method. This method gave a ratio of IIIa : IV of 1.78 ± 0.05 for the 1.315-IM particle, corresponding to a number of about five IIIa subunits per apex projection (4.85 ± 0.15)

Evidence for processing of protein IIIa during the HAd2 infectious cycle

As shown in Fig 1b, SDS-gel analysis of extracts of whole KB cells infected with HAd2 and pulse-labeled with ^{35}S -methionine for 30 min at 18 h p.i. revealed the presence of the well-defined HAd2 virion components II, III, IIIa, IV, V, IX (Iveritt et al., 1973), virion component precursors

P-VI, P-VIII (Ishibashi and Maizel, 1974 ; Öberg et al., 1975) and P-VII (Anderson et al., 1973), and non-virion proteins such as the 100 K species and the 72 K DNA-binding protein (Van Der Vliet and Levine, 1970 ; Anderson et al., 1973 ; Linné et al., 1977 ; Van Der Vliet et al., 1978).

After a chase of 20 h, the cleavage products appeared, viz. VI, VIII, and VII, whereas the apparent molecular weight of the 72 K protein shifted to 75K (Fig. 1c). An increase in incorporation of label into the major bands II (hexon polypeptide), III (penton base), IV (fiber), V (core-1 protein) and IX was also observed.

The increase of radioactivity in band IV masked a slight change in the migration of IIIa, which superimposed with band IV in the chase pattern. This decrease in apparent molecular weight of IIIa, changing from 67 K to 66 K was clearly visible in the chase pattern of cytoplasmic and, especially, nuclear extracts (Fig. 1 i), in which the bands IIIa and IV were better resolved.

. Molecular weight of the IIIa polypeptide in HAd2 virion

The apparent molecular weight of the IIIa polypeptide unit was compared in the mature virion (MV) and IM particles. Two classes of IM particles were extracted from WT-infected cell nuclei and isolated on sucrose and CsCl gradients after reversible fixation : light IM banding at $\rho = 1.315$, and heavy IM at $\rho = 1.370$ (D'Halluin et al., 1978b). 1.315-IM accumulated in H2 ts 112-infected cells maintained at non-permissive temperature (D'Halluin et al., 1978a). Young virions (YV) were obtained by pulse-labeling cells infected with H2 ts 112 for 30 min at 18 h p.i. at 39.5° and chasing at 33° for 2 h. The peak of radioactivity at $\rho = 1.345$ in CsCl corresponds mainly to young virions containing partially cleaved precursors (Edvardsson et al., 1976 ; D'Halluin et al., 1978b).

Fig. 2 b shows that the 1.315-IM particles contained a polypeptide of 67K in place of polypeptide IIIa (66K) present in mature virions (Fig. 2 c). 1.370-IM particles also possessed a 67K species (Fig. 2 e, f). YV particles of H2 ts 112 obtained after a 2 h-chase at 33° showed a partial cleavage of the precursors P-VI, P-VIII and P-VII (30-50% of P-VII was cleaved into core protein VII), the disappearance of a 50K species, possibly a maturation protein (D'Halluin et al., 1978 a, b ; Persson et al., 1979) and the appearance of core protein V. In addition to these modifications, some 67K was still visible , whereas a 66K polypeptide corresponding to IIIa appeared (Fig. 2g).



Figure 1

Autoradiogram of SDS-polyacrylamide gel of WT-HAd2 induced polypeptides in KB cells. Cells were pulse-labeled with (^{35}S)-methionine for 1 h at 18 h p.i. and chased for 20 h. (a, d, g) Pulse in mock-infected cells; (b, e, h) pulse in HAd2-infected cells; (c, f, i) chase in HAd2-infected cells. (a, b, c) Whole cell extracts; (d, e, f) cytoplasmic extracts; (g, h, i) nuclear extracts. Anode is at the bottom. The arrows indicate the change in migration of IIIa polypeptide.



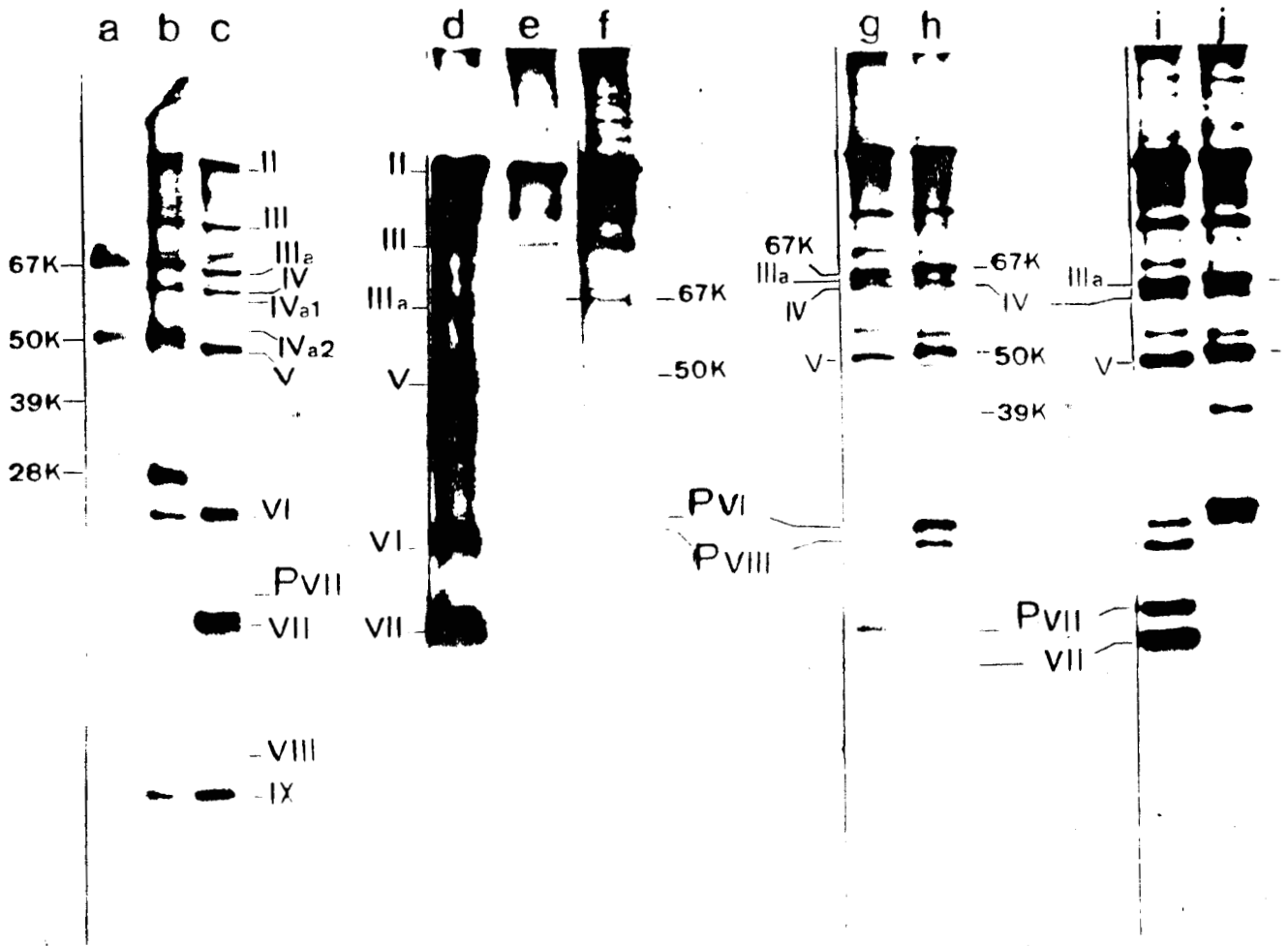


Figure 2

Polypeptide analysis of WT-HAd2 and H2 ts 112 particles labeled with (^{32}P)-orthophosphate (a) or (^{35}S)-methionine (b-j). (a, b) 1.315-IM particle of H2 ts 112 ; (c, d) WT-HAd2 mature virion ; (e, f) 1.37-IM particle of WT-HAd2 ; (g) 1.345-young virion of H2 ts 112 after 1 h -pulse-labeling at 39.5° and 2 h -chase at 33° ; (h) H2 ts 112 1.315-IM ; (i) 1.345-young virion of H2 ts 112 after 1 h -pulse at 39.5° and 8h -chase at 33° ; (j) H2 ts 112 1.315-IM obtained at 39.5°. Slot (f) is the same as (e) with a prolonged time of exposure on film. Slots (g) and (i) represent two different stages of young virion maturation, as shown by the different degree of processing of P-VII into VII.



At a later stage of evolution of the YV particles into MV particles, when 70-80% of the P-VII was cleaved into VII (8 h chase at 33°) no trace of 67 K polypeptide remained visible (Fig. 2i). The apparent processing of 67K into 66K seemed, therefore, to occur at a faster rate than that of P-VII into VII.

. Phosphorylation of IIIa in IM and MV particles

The change in apparent molecular weight of 67K into 66K might represent either proteolytic cleavage or a modification, such as phosphorylation, of IIIa between the stage of IM and MV particles. ³²P-labeling of H2 ts 112 IM particles showed that the 1.315-IM particles which accumulated at 39.5°, and which evolve into mature virions upon shift-down (D'Halluin et al., 1978a), contain four major phosphoproteins migrating as polypeptides of apparent molecular weight 67K, 50K, 39K and 28K, and two minor species of 90K and 24K respectively (Fig. 2a). This suggested that protein IIIa, a major phosphorylated protein in the mature virion (Russell and Blair, 1977) and present in phosphorylated form in 1.315-IM particles, was phosphorylated at an early stage possibly preceding its entry into IM particles. However, additional phosphorylation might not be excluded.

. Precursor-product relationship of 67K and IIIa

The 67K polypeptide from ³⁵S-methionine-labeled H2 WT 1.315-IM particles electrophoresed in SDS-polyacrylamide gel, and band IIIa from mature virions were cut off a stained gel and hydrolyzed with different concentrations of S. aureus protease V8, and the peptides resulting from the partial proteolysis analyzed in SDS-polyacrylamide gel (Cleveland et al., 1977) Fig. 3 shows that the peptide patterns were similar for 67K and IIIa with minor differences in the 20-24K and the 48-52K zones of the SDS gel. These peptide finger-prints had no relationship with the other major virion proteins such as hexon, penton base (not shown), or fiber (Fig. 3k-m).

. Antigenicity of IIIa in IM particles

When 1.315-IM particles of WT, H2 ts 112, and H2 ts 101 were disrupted with DOC and analyzed in 2-D immunoelectrophoresis, only two antigen peaks were found: hexon and fiber (Fig. 4). Neither IIIa, penton base, complete penton were visible. However, polypeptides III (penton base) and IIIa were present in these particles, and were detected in SDS-polyacrylamide gels (Fig. 2b) apparently in the same stoichiometric ratio to hexon and fiber polypeptides as in the mature virion (Fig. 2c). Similarly, penton base and IIIa were not detected in DOC-treated IM particles in double diffusion tests (not shown).

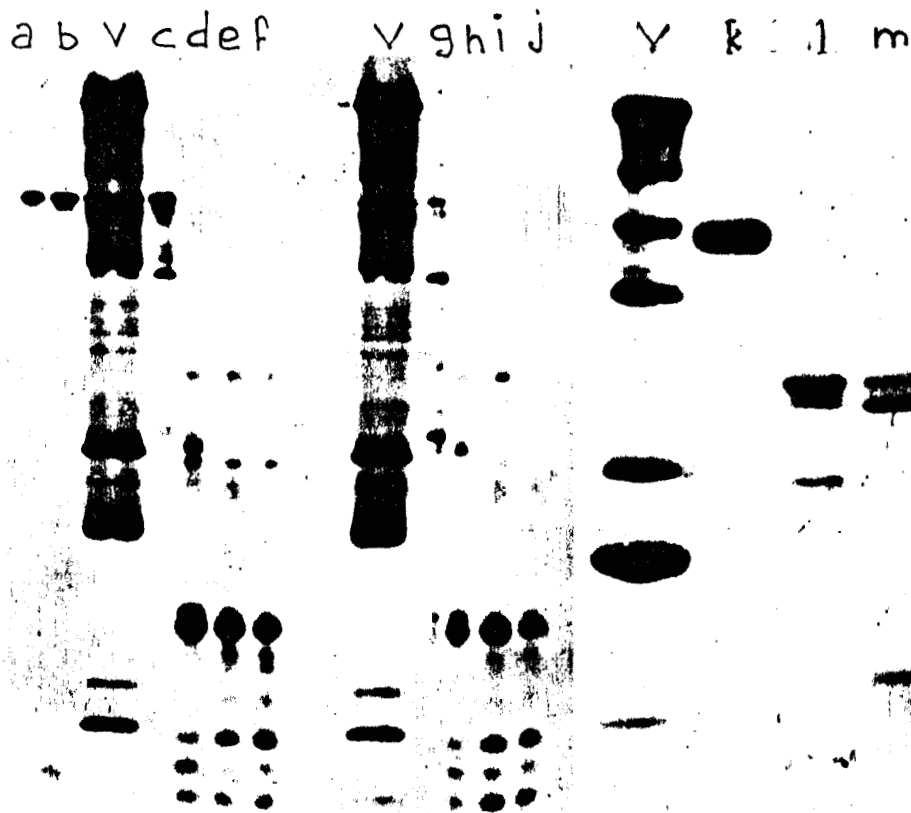


Figure 3

Comparative finger-prints in SDS-polyacrylamide gel of 67K from 1.315-IM particle and of IIIa from HAd2 mature virion. Gel slices were hydrolyzed in gel with 0.00 (a, b), 0.02 (c, g), 0.05 (d, h), 0.10 (e, i), 0.25 μ g (f, j) of *S. aureus* protease V8 for 30 min. (b-f) IIIa; (a, g-j) 67K band; (v) control HAd2 virion. For comparison, *S. aureus* protease V8 finger-prints of HAd2 fiber polypeptide are presented (k-m). Fiber was hydrolyzed with 0.00 (k), 0.05 (l) and 0.20 μ g (m) of protease V8 in the same conditions as above. (a-j) and (k-m) are separate gels. Note that the cross-linking of the polyacrylamide gel (acrylamide : bisacrylamide ratio of 50:1.33) is used to separate low molecular weight peptides but is not adequate to resolve the 67K and IIIa bands.

H2ts101
IM-DOC

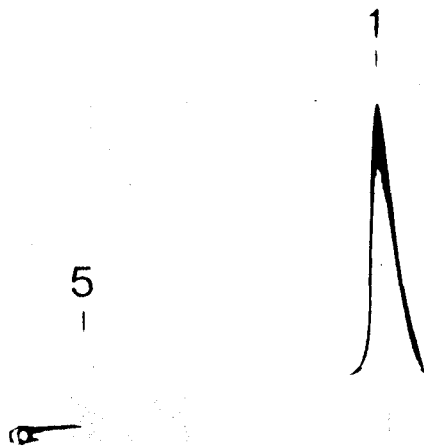


Figure 4

Two-dimensional immunoelectrophoresis pattern of 1.315-IM of H2 ts 101 disrupted with 0.5% deoxycholate (DOC). Peak 1 corresponds to hexon antigen, peak 5 to fiber antigen. No penton base, complete penton nor IIIa peak were visible.



Table 1

Complementation indices between IIIa-defective
ts mutants of H2 and H5 adenoviruses *

Mutant	H5 <u>ts</u> 58	H2 <u>ts</u> 4	H2 <u>ts</u> 101	H2 <u>ts</u> 112
H5 <u>ts</u> 58	-	3,235	96	30
H2 <u>ts</u> 4	-	-	382	3
H2 <u>ts</u> 101	-	-	-	35
H2 <u>ts</u> 112	-	-	-	-

* Complementation indices (CI) were calculated from the virus yields. As indicated in Methods, complementation was considered as positive when the CI was ≥ 10 .



The absence of antigenic reactivity might reflect a change in conformational state of 67K in the IM, or the masking of antigenic determinants by other viral component(s). ¹⁴C-valine-labeled WT 1.315-IM, 1.345 YV and MV particles were therefore disrupted with DOC, then incubated with anti-IIIa serum and the antigen-antibody complexes collected by adsorption onto *S.aureus* cells. YV particles were obtained by labeling WT-infected cells for 1 h at a late stage after infection (24 h) and chasing for 6 h. Particles obtained at $\rho=1.345$ in CsCl contained mainly YV as evidenced by the incomplete processing of P-VII into VII (Fig. 5f).

As shown in Fig. 5c, a 67K polypeptide was the major antigenic component selected from the DOC-disrupted IM by the IIIa-antibody, along with another component of lower molecular weight (56K) which migrated in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as polypeptide IVa2 of the mature adenovirion (Anderson *et al.*, 1973). Traces of hexon polypeptide were often visible, and likely corresponded to nonspecific trapping, as suggested by the precipitation of similar amounts of polypeptide II with a preimmune rabbit serum (Fig. 5d, i). In YV, IIIa also coprecipitated with a 56K protein and with discrete protein species migrating as virion proteins II, III, V, and as immature virus protein 100K, 39K and P-VIII (Fig. 5e). Most of these polypeptides were also precipitated by a preimmune serum (Fig. 5d). Anti-IIIa antibody precipitation of components of DOC-disrupted mature virions showed three major species corresponding to IIIa, V and VII, along with significant amounts of 56K (Fig. 5h). Stoichiometric analysis performed by gel scanning revealed that 8-10 copies of VII were precipitated per copy of IIIa.

Temperature-sensitive mutants of HAd2 and HAd5 phenotypically IIIa-negative and blocked in virion morphogenesis

H5 ts 58 has been shown to map in the region of the HAd5 genome corresponding to IIIa gene (Frost & Williams, 1978). The mutant is blocked in virion morphogenesis and accumulates empty particles at non-permissive temperatures (Edvardsson *et al.*, 1978). Three other mutants of HAd2 accumulating the same type of empty particles were studied in complementation tests with the H5 ts 58 : H2 ts 112 (D'Halluin *et al.*, 1978a), H2 ts 101 (Martin *et al.*, 1978), and H2 ts 4 (Khittoo and Weber, 1977). As shown in Table 1, these four mutants fell into three complementation groups, H2 ts 4 and H2 ts 112 belonging to the same group.

Extracts of cells infected with each of these mutants at permissive (33°) or non-permissive temperatures (39.5°) were studied antigenically in 2D immunoelectrophoresis. Fig. 6 shows that for these mutants the amount of soluble IIIa antigenic component was reduced, and was almost totally absent in extracts of H2 ts 4 cultured at 39.5°. The serological phenotype was therefore IIIa-negative for these four ts-mutants blocked at a late stage of virion morphogenesis.

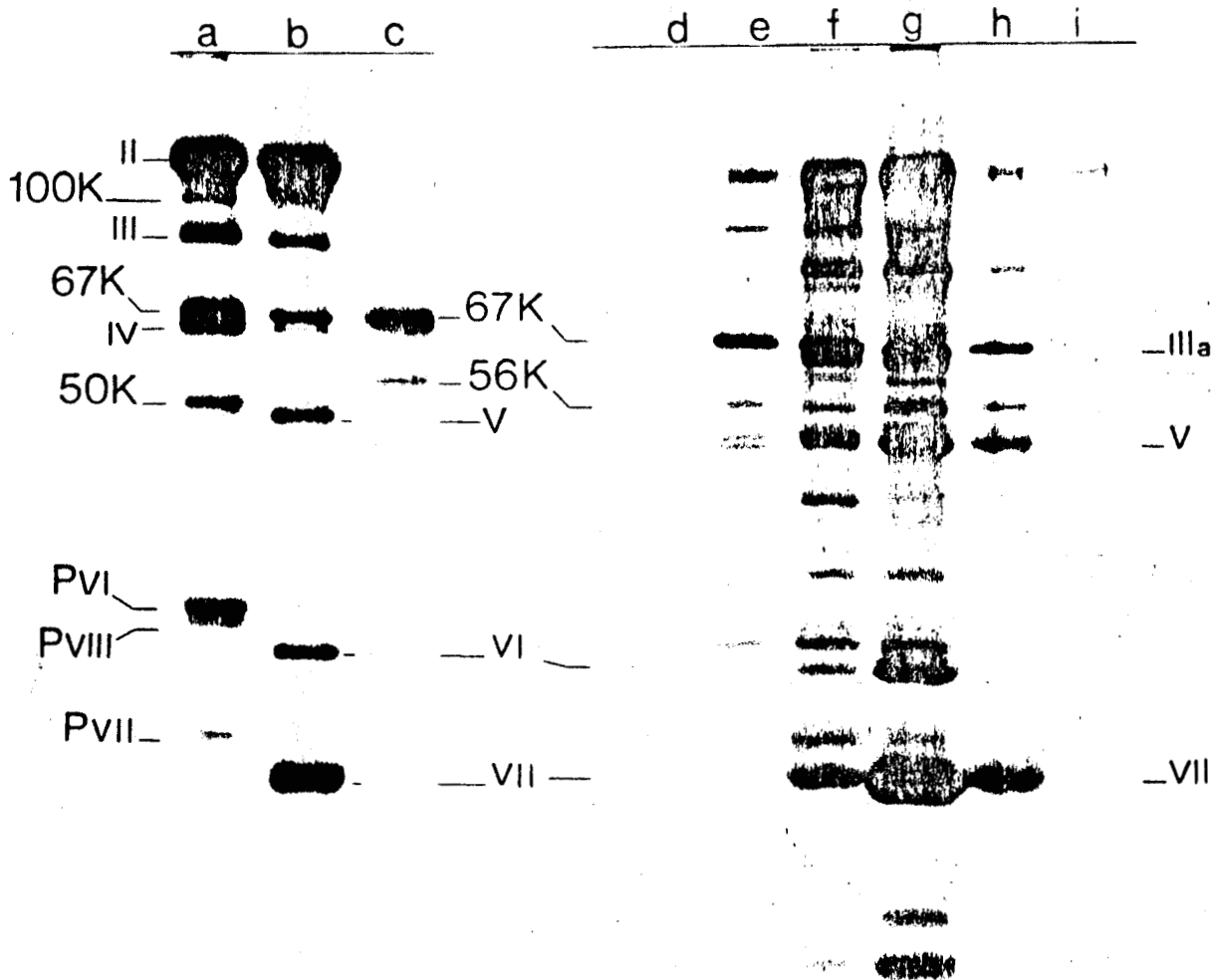


Figure 5

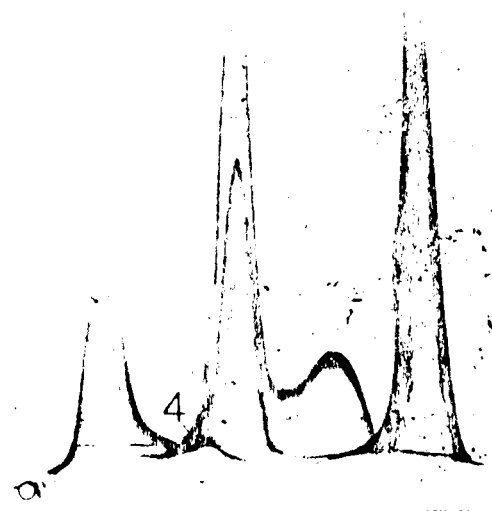
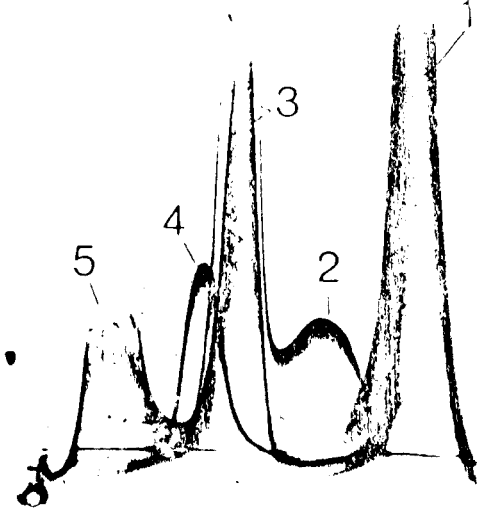
Anti-IIIa immunoselection on S.aureus cells of capsid antigens from DOC-disrupted particles. (a) Top components of WT-HAd2 ; (b) Control HAd2 virion ; (c) top components of WT-HAd2 incubated with anti-IIIa serum ; (d) DOC-treated young virions (YV) incubated with a preimmune serum ; (e) DOC-treated YV incubated with anti-IIIa ; (f) control YV ; (g) control mature virions ; (h) DOC-treated mature virion incubated with anti-IIIa ; (i) DOC-treated mature virion incubated with preimmune serum.

Figure 6

Two-dimensional immuno-electrophoretic pattern of cells infected with different ts mutants of types 2 and 5 adenoviruses, at permissive (33°) or non permissive (39.5°) temperatures. Peak 1 : hexon antigen ; peak 2 : free penton base ; peak 3 : complete penton with both fiber and penton base antigenic determinants ; peak 4 : antigen IIIa ; peak 5 : free fiber antigen. The decrease of IIIa peak between the 33° and 39.5° patterns is obvious. Note that the anti-HAd2 serum reveals only group specific antigens hexon, penton base and IIIa in HAd5 pattern.

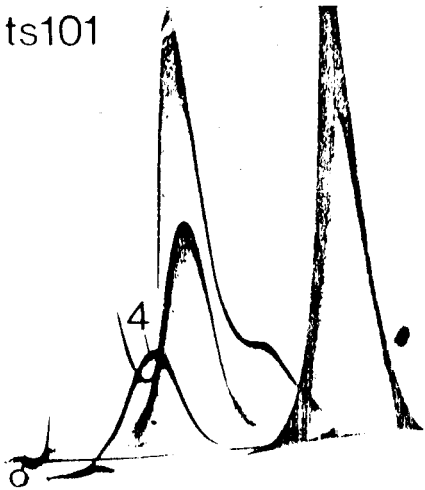
H2ts4

33°

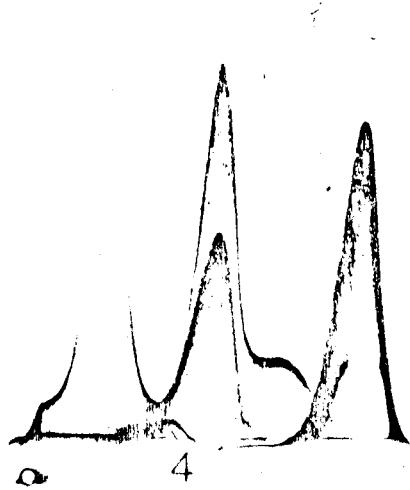


H2ts101

33°



39°



H2ts112

33°

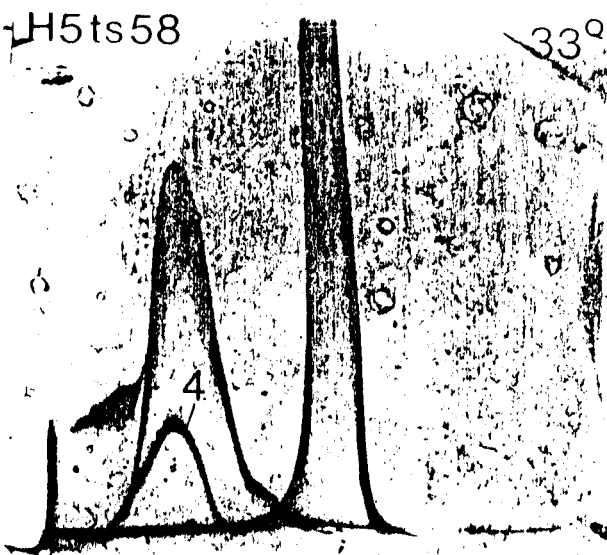


39°

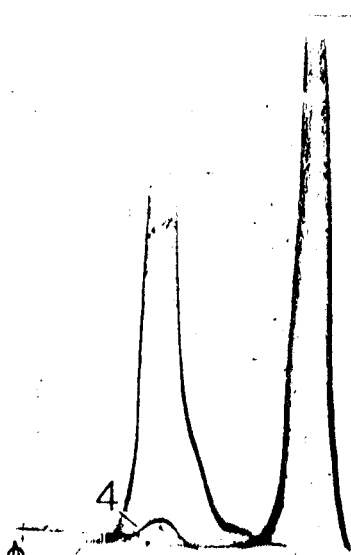


H5ts58

33°



39°



RHS LILLE

Discussion

Approximately 60 copies of component IIIa were estimated to occur in HAd2 virions, as calculated from data obtained by two different methods : (i) scanning of ^{14}C -valine-labeled virion polypeptides electrophoresed in SDS-polyacrylamide gel , and estimation of the amount of IIIa relative to fiber ; (ii) 2-D immunoelectrophoretic quantitation of IIIa antigen in DOC-disrupted virions. Both methods gave similar results. In the topographical model of the HAd2 virion proposed by Everitt et al., (1975), IIIa was placed at each of the twelve vertices of the virus icosahedron, having contacts with both penton base and peripentonal hexons, and was outwardly accessible. The number of 60 IIIa copies per HAd2 virion suggests that there is one molecule of IIIa per each of the five penton base subunits (Boudin et al., 1979). In the preceding paper (Lemay et al., 1979) it has been shown that IIIa is a spherical molecule consisting of one polypeptide unit of 65,500 daltons. No disulfide bond was formed between IIIa and either the hexon or penton base polypeptide units. A diagonal migration of polypeptide spots was obtained in two-dimensional SDS-polyacrylamide gel when HAd2 virion was dissociated with SDS-urea sample buffer in the first dimension gel and with or without 2-mercaptoethanol in the second dimension (data not shown).

Pulse-chase experiments of KB cells infected with HT-HAd2 suggested a modification of the IIIa polypeptide, with a change in apparent molecular weight from 67K to 66K. This modification was difficult to see, due to the chase of label into the neighboring major fiber polypeptide (Fig. 1). The same modification was observed at a late stage in the assembly pathway of HAd2 virions when a 67K polypeptide present in IM particles of $\rho=1.315$ and $\rho=1.37$ disappeared during the maturation of YV particles ($\rho=1.345$) to MV particles. The following sequence of events has been suggested : $1.315\text{-IM} \rightarrow 1.37\text{-IM} \rightarrow 1.345\text{-YV} \rightarrow 1.345\text{-MV}$ (D'Halluin et al., 1978b).

The 1.315 IM particles of H2 ts 112 accumulating at 39.5° evolve into mature virions upon shift-down to 33° (D'Halluin et al., 1978a) when H2 ts 112 -infected cells were pulse-labeled at 39.5° and chased at 33° , label appeared in 1.345-YV, and the change in apparent molecular weight of IIIa became even more visible, with the simultaneous presence of the 67K precursor and 66K product in some YV particles (Fig. 2). The precursor-product relationship between the 67K and 66K (IIIa) polypeptides was demonstrated by fingerprinting in SDS-polyacrylamide gel (Fig. 3). In the HAd2 ts 3 mutant in which the mutation affects the group of proteins IIIa-V-80K, it has been already observed that IIIa resolved into several bands migrating between 68K and 66K (Weber et al., 1977).

The possibility of a modification such as phosphorylation of 67K, to explain this molecular weight change is unlikely since the 67K species was already phosphorylated in the 1.315-IM (Fig. 2a). In addition, phosphorylation of the 72K single-strand DNA-binding protein (Linné *et al.*, 1977) resulted in an apparent increase in molecular weight, from 72K to 75K. However, a difference in the degree of phosphorylation between the 67K and 66K species or some other modification might provoke the migration shift observed (Fig. 1). A proteolytic cleavage, removing 10-15 amino acid residues might be an alternate explanation. Since glycine has been found at the N-terminus of virion-extracted IIIa (Lemay *et al.*, 1979) this cleavage would occur at the N-terminal end of the 67K polypeptide chain, as in the case of P-VII (Sung *et al.*, 1977) and of P-VI (Sung *et al.*, 1978). However, some proteolysis at the C-end could not be excluded. The precursor to IIIa would be processed during the maturation of YV particles at a faster rate than P-VII (Fig. 2), possibly by a virus-coded, or virus-induced protease (Weber, 1976 ; Bhatti and Weber, 1978).

Although polypeptide 67K was present in IM particles (Fig. 2), no IIIa antigen was detectable in 2-D immunoelectrophoresis of DOC-disrupted IM particles (Fig. 4). It should be noted that these particles were not fixed prior to purification and DOC-treatment and that a modification of the antigenicity due to the fixation procedure cannot be invoked. Several explanations might be proposed : (i) The 67K precursor to IIIa had an antigenicity different from that of the IIIa product ; (ii) The antigenic sites carried by the 67K species did not resist the DOC-treatment of the IM particles ; (iii) Some or all of the antigenic determinants of the IIIa precursor were masked by another virus component, the linkage of which resisted DOC ; (iv) These different hypotheses are not mutually exclusive.

It was found that IIIa antigenic component present in the cell pool of HAd2 capsid components resisted DOC-treatment (not shown), which excludes the second hypothesis. The possibility of another viral component binding to IIIa, with the resultant masking of IIIa antigenic sites, was explored by immunoprecipitation of DOC-disrupted virion and IM particles by anti-IIIa serum. A major protein of 56K daltons was always found coprecipitated with IIIa when immunoprecipitation was performed with DOC-treated IM particles (Fig. 5). The migration of this protein in SDS-polyacrylamide gel corresponded roughly to that of IVa2, a minor polypeptide of mature virions (Anderson *et al.*, 1973). The possible presence of contaminating anti-IVa2 antibody in the

antiserum was unlikely since IVa2 was never coprecipitated with IIIa from infected cell extracts. The same 56K species was found coprecipitated with IIIa from DOC-disrupted YV and MV particles (Fig. 5). Since IIIa is antigenically fully expressed in mature virions (Lemay *et al.*, 1979), the hypothesis of antigenic determinant masking by the 56K polypeptide might be ruled out. However the possibility of proteolytic breakdown of IIIa generating a major 56K species cannot be excluded.

These results suggest that some of the antigenic determinants present in IIIa are absent from the 67K precursor. Nevertheless, sufficient antigenic sites remained available on the 67K precursor to produce soluble complexes with anti-IIIa antibody selected by adsorption onto *S. aureus* cells, although insufficient to generate an antigen-antibody lattice within the agarose gel. This change in antigenicity might reflect a difference in three-dimensional structure between 67K and IIIa relative to the proteolytic cleavage. Similar modifications of penton base antigenicity upon maturation have been observed and studied in detail elsewhere (D'Halluin *et al.*, 1980).

Coprecipitation of significant amounts of VII and V with IIIa anti-serum suggests a neighbor relationship between IIIa and the core protein VII in MV particle, confirming previous results of chemical cross-linking of IIIa and VII within the virion of HAd2 (Everitt *et al.*, 1975). In addition, the data indicate a major difference in the structure of capsid vertices between YV and MV particles. Although results of immunoprecipitation have to be interpreted carefully, stoichiometric analysis by gel scanning revealed that 8-10 copies of VII were coprecipitated per copy of IIIa.

As IIIa might be implicated in capsid morphogenesis, several adenovirus ts mutants defective in virion morphogenesis (H5 ts 58, H2 ts 4, H2 ts 101 and H2 ts 112) were studied : all apparently phenotypically IIIa-defective at 39.5° (Fig. 6). The mutants fell into three complementation groups, one containing both H2 ts 4 and H2 ts 112. Only H5 ts 58 has been mapped precisely in the IIIa region (Frost and Williams, 1978). The H2 ts 4 mutation has been located in the IIIa-V gene region, and a mutation in core protein V has been suggested (Khittoo and Weber, 1977). All these mutants accumulate empty particles at 39.5°, and, for H2 ts 101 and H2 ts 112, these particles have been shown to be assembly intermediates evolving into mature virions upon shift-down to 33° (D'Halluin et al., 1978a ; Martin et al., 1978).

The absence or decrease of the antigenic component peak in 2-D immunoelectrophoresis patterns would reflect, therefore, a block in maturation process of adenovirus IM particles, with no maturation cleavage of the precursor (PIIIa) to IIIa, and PIIIa remaining in the cell pool and in the IM particle as a weakly antigenic 67K protein species. Thus the absence of detectable IIIa antigen in 2-D immunoelectrophoresis would be equivalent to the absence of cleavage of P-VII to VII, as observed in SDS-polyacrylamide gel for assembly-defective ts mutants (D'Halluin et al., 1978a), or for systems inhibiting the virion assembly (Warocquier and Boulanger, 1975).

Acknowledgements

This work was supported by the INSERM (ATP 50-77-82), the CNRS (ERA 225) and the Université du Droit et de la Santé (UER III). We are indebted to Miss E. Fremaux for secretarial aid, to Mr. Vandepierre and Mrs. Coulembiez for illustrations and to Mr. Petite for cell cultures. We thank Ray Marusyk for critical review of the manuscript. Our sincere thanks are also due to those who furnished the ts mutants : Joe Weber (H2 ts 4), Willie Russell (H5 ts 58), and Guy Martin (H2 ts 101 and H2 ts 112).

References

- Anderson, C.W., Baum, P.R., and Gesteland, R.F. 1973. Processing of adenovirus 2 induced proteins. J. Virol. 12, 241-252.
- Begin, M. and Weber, J. 1975. Genetic analysis of adenovirus type 2. I. Isolation and genetic characterization of temperature-sensitive mutants. J. Virol. 15, 1-7.
- Bhatti, A.R., and Weber, J. 1978. Protease of adenovirus type 2. In vitro processing of core protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 973-979 (ts 3).
- Boudin, M.L., Moncany, M., D'Halluin, J.C., and Boulanger, P. 1979. Isolation and characterization of adenovirus 2 vertex capsomer (penton base). Virology 92, 126-138.
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschna, M.W., and Laemmli, U.K. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.
- D'Halluin, J.C., Martin, G.R., Torpier, G., and Boulanger, P. 1978b. Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates J. Virol. 26, 357-363.
- D'Halluin, J.C., Milleville, M., Boulanger, P., and Martin, G.R. 1978a. Temperature-sensitive mutant of adenovirus type 2 blocked in virion assembly : accumulation of light intermediate particle. J. Virol. 26, 344-356.
- D'Halluin, J.C., Milleville, M., Martin, G.R. and Boulanger, P. 1980. Morphogenesis of human adenovirus 2 : study with fiber- and (penton base + fiber)-defective temperature-sensitive mutants. J. Virol., in press.
- Edvardsson, B., Everitt, E., Jörnvall, H., Prage, L., and Philipson, L. 1976. Intermediates in adenovirus assembly. J. Virology 19, 533-547.
- Edvardsson, B., Ustacelabi, S., Williams, J., and Philipson, L. 1978. Assembly intermediates among adenovirus type 5 temperature-sensitive mutants. J. Virol., 25, 641-651.
- Everitt, E., Lutter, L., and Philipson, L. 1975. Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking. Virology 67, 197-208.
- Everitt, E., Meador, S.A., and Levine, A.J. 1977. Synthesis and processing of the precursor to the major core protein of adenovirus type 2. J. Virol 21, 199-214.

- Everitt, E., Sundquist, B., Petterson, U. and Philipson, L. 1973. Structural proteins of adenovirus. X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2. Virology 52, 130-147
- Frost, E., and Williams, J.F. 1978. Mapping temperature-sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5 by marker rescue. Virology 91, 39-50.
- Green, M., and Pina, M. 1963. Biochemical studies on the adenovirus multiplication IV. Isolation, purification and chemical analysis of adenovirus. Virology 20, 199-207.
- Ishibashi, M., and Maizel, J.V., Jr. 1974. The polypeptides of adenovirus. V. Young virions, structural intermediates between top components and aged virions. Virology 57, 409-429.
- Kessler, S. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a Staphylococcal protein A antibody adsorbant : parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115, 1617-1624.
- Khittoo, G., and Weber, J. 1977. Genetic analysis of adenovirus type 2. VI. A temperature-sensitive mutant defective for DNA encapsidation. Virology 81, 126-137.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, London, 227, 680-685.
- Laurell, C.B. 1965. Antigen-antibody crossed electrophoresis. Analyt. Biochem. 10, 358-361.
- Laver, W.G., Pereira, H.G., Russell, W.C., and Valentine, R.C. 1968. Isolation of an internal component from adenovirus type 5. J. Mol. Biol. 37, 379-386.
- Lemay, P., Boudin, M.L., Milleville, M. and Boulanger, P. 1979. Human adenovirus type 2 protein IIIa. I. Purification and characterization. Virology, submitted to publication.
- Linné, T., Jörnvall, H., and Philipson, L. 1977. Purification and characterization of the phosphorylated DNA-binding protein from adenovirus-type-2-infected cells. Eur. J. Biochem. 76, 481-490.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Maizel, J.V., Jr., White, D.O., and Scharff, M.D. 1968. The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion. Virology 36 126-136.

- Martin, G.R., Warocquier, R., and Boulanger, P.A. 1975. Quantitation of adenovirus soluble antigens by crossed immunoelectrophoresis. Application to serological characterization of mutants. Intervirology 5, 162-172.
- Martin, G.R., Warocquier, R., Cousin, C., D'Halluin, J.C., and Boulanger, P.A. 1978. Isolation and phenotypic characterization of human adenovirus type 2 temperature-sensitive mutants. J. Gen. Virol 41, 303-314.
- Öberg, B., Saborio, J., Persson, H., Everitt, E., and Philipson, L. 1975. Identification of the in vitro translation products of adenovirus mRNA by immunoprecipitation. J. Virol. 15, 199-207.
- Philipson, L., and Pettersson, U. 1973. Structure and function of virion proteins of adenoviruses. In "Progress in Experimental Tumor Research" (F. Homburger, ed.), Vol. 18, pp. 2-55, S. Karger, Basel.
- Prage, L., Pettersson, U. Höglund, S., Lonberg-Holm, K. and Philipson, L. 1970. Structural protein of adenoviruses. IV. Sequential degradation of the adenovirus type 2 virion. Virology 42, 341-358.
- Russell, W.C., and Blair, G.E. 1977. Polypeptide phosphorylation in adenovirus-infected cells. J. Gen. Virol. 34, 19-35.
- Russell, W.C., McIntosh, K., and Skehel, J.J. 1971. The preparation and properties of adenovirus cores. J. Gen. Virol 11, 35-46.
- Sung, M.T., Lischwe, M.A., Richards, J.C., and Hosokawa, K. 1977. Adenovirus chromatin. I. Isolation and characterization of the major core protein VII and precursor Pro-VII. J. Biol. Chem. 252, 4981-4987.
- Sung, M.T., Lischwe, M.A., and Mc Caney, F. 1978. Adenovirus proteins: isolation, characterization and the molecular nature for the processing of polypeptide VI. EMBO Workshop on the Molecular Biology of Adenoviruses, Orenas, Sweden, June 1978.
- Van der Vliet, P., and Levine A.J. 1973. DNA binding proteins specific for cells infected by adenovirus. Nature New Biol. 246, 170-174.
- Van der Vliet, P., Keegstra, W., and Jansz, H.S. 1978. Complex formation between the adenovirus type 2 DNA-binding protein and single-stranded DNA. Eur. J. Biochem. 85, 389-398.

- Marocquier, R., and Boulanger, P.A. 1976. Adenovirus proteins maturation at 42°C. J. Gen. Virol. 30, 233-242.
- Weber, J., Begin, M., and Carstens, E.B. 1977. Genetic analysis of adenovirus type 2. IV. Coordinate regulation of polypeptides 88 K, IIIa and V. Virology 76, 709-729.
- Weber, J. 1976. Genetic analysis of adenovirus type 2. III. Temperature-sensitivity of processing of viral proteins. J. Virol. 17, 462-471.
- Williams, J.F., Gharpure, M., Ustacelabi, S., and Mc.Donald, S. 1971. Isolation of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5. J. Gen. Virol. 11 95-101.

CONCLUSION

Le polypeptide IIIa n'a été que relativement récemment reconnu dans les extraits de cellules infectées et dans le virus mature comme un des composants majeurs de la capsid du virion (ANDERSON et al., 1978 ; EVERITT et al., 1973). C'est une protéine phosphorylée (RUSSEL, BLAIR, 1977 ; AXELROD, 1978), qui apparait au stade tardif. Son taux de synthèse maximal, déterminé par expérience de marquage bref puis de chasse, est vers la 20-24^{ème} heure après infection.

Le IIIa a été purifié à partir du virus mature et à partir des composants solubles, d'extraits de cellules infectées par l'adénovirus de type 2. Trois méthodes de purification ont été utilisées suivant que le matériel de départ était du virus à basse ou à haute concentration, ou des antigènes solubles. Pour extraire le IIIa du virus, on utilise un milieu urée, à forte concentration saline, à pH acide quand la solution virale est peu concentrée, à pH basique quand elle est plus concentrée. La purification est achevée par chromatographie sur hydroxyapatite dans le premier cas, sur QAE-sephadex dans le second cas. Le IIIa des antigènes solubles est extrait par chromatographie sur DEAE-sephadex puis sur QAE-sephadex. Ces trois méthodes ont des rendements équivalents, et les IIIa, ainsi isolés, montrent les mêmes caractéristiques physico-chimiques.

La détermination des paramètres physiques a permis le calcul du poids moléculaire du IIIa : il est de 65,5 K. Par sa migration en gel de polyacrylamide-SDS, on lui attribue un poids moléculaire de 66 K. Le IIIa est donc une molécule monomérique, contrairement aux trois protéines majeures de la capsid. Son coefficient de sédimentation de 6S, son coefficient de friction de 1,02, indiquent une forme arrondie de la molécule de IIIa isolée.

Une certaine hétérogénéité du IIIa est suggérée par sa migration en gel de polyacrylamide en milieu non dissociant : il apparait comme une bande diffuse. L'isoélectrofocalisation du IIIa révèle deux bandes : une bande majeure de pI égal à 5,95 et une bande de pI 6,08 qui représente 10 à 15% de l'ensemble. Ces deux bandes ont le même poids moléculaire comme le montre un gel bidimensionnel. La différence de charge des deux composés peut alors être le résultat d'une différence dans le degré de phosphorylation et non pas celui d'un clivage protéolytique.

L'antigénicité du IIIa avait déjà été notée (EVERITT et al., 1975). Un immunsérum spécifique du IIIa révèle le IIIa des virus du type 2, 3, 5. Les arcs de précipitation se raccordent parfaitement, ce qui traduit l'identité des différents antigènes testés. Les anticorps sont donc spécifiques de groupe et n'ont aucun effet neutralisant sur le virus.

C'est grâce à son antigénicité que le IIIa peut être visualisé par immuno-électrophorèse en double dimension que ce soit à partir des antigènes solubles ou du virus dissocié au déoxycholate de sodium (DOC). Cette technique permet de quantifier le taux de protéines (MARTIN et al., 1975) et de comparer les antigènes entre eux. Ceci a permis de montrer d'une part, une différence d'antigénicité entre le IIIa des intermédiaires et celui du virus et, d'autre part, une diminution du pic IIIa dans des extraits de cellules infectées par des mutants bloqués au niveau de l'assemblage : le H2 ts 4, le H2 ts 112, le H2 ts 101 et le H5 ts 58, à température non permissive. Cette méthode nous a également renseignés sur le nombre de IIIa par virus. Le taux de IIIa est comparé à celui de la fibre, dont on connaît le nombre par particule virale : 12. Il y a 5 molécules de IIIa pour 1 molécule de fibre, soit 60 molécules de IIIa par virion. Ceci est confirmé par densitométrie de l'autoradiogramme en gel de polyacrylamide-SDS du virus marqué à la valine ^{14}C . Or la base du penton est constituée de 5 sous-unités : il y aurait donc une molécule de IIIa par sous-unité pentonale. D'autre part, les immuns-complexes formés par les anticorps anti-IIIa incubés avec le virus et sélectionnés sur *S. Aureus* contiennent, outre le IIIa, du V, du VII, et une protéine de 56 K. Donc, bien que le IIIa soit une protéine accessible de l'extérieur de la capsid (EVERITT et al., 1973), elle serait aussi en relation avec l'intérieur de la capsid. La liaison IIIa-VII avait déjà été notée par EVERITT (EVERITT et al., 1975). Le scanning de l'autoradiographie du gel révèle 8 à 10 molécules de VII par IIIa. Pour la protéine de 56 K, il est impossible de dire si elle correspond à un produit de dégradation du IIIa ou à la IVa2 qui a le même poids moléculaire. Puisque le IIIa est une protéine externe (EVERITT et al., 1973, 1975) et qu'il semble au voisinage de protéines internes, il est possible que le IIIa incorporé au virus ait une forme allongée et non pas la forme arrondie qu'elle a à l'état isolé.

Dans des extraits de cellules infectées par l'adénovirus de type sauvage, WEBER (1977) a remarqué que le IIIa pouvait être résolu en trois bandes

de 66 à 68 K. L'analyse en gel de polyacrylamide-SDS des composants du virus et des intermédiaires montre une variation de migration au niveau du IIIa : celui des intermédiaires migre plus lentement. Son poids moléculaire est d'environ 67 K. Le IIIa des intermédiaires peut alors être un précurseur du IIIa du virus mature : le PIIIa :

- d'une part, la transformation du PIIIa en IIIa peut-être suivie par l'analyse en gel de polyacrylamide-SDS, des intermédiaires d'un mutant, le H2 ts 112, lors d'un marquage à 39°5 suivi d'une chasse à 32°.
- d'autre part, l'homologie entre les deux protéines est montrée par protéolyse limitée selon la technique de CLEVELAND (1977).

Le PIIIa et le IIIa sont phosphorylés et le changement de poids moléculaire ne peut alors qu'être dû à une protéolyse du PIIIa en IIIa. Par dansylation, on trouve le glycofolle comme résidu N Terminal du IIIa. Ce processus pourrait être analogue au clivage du PVI et du pVII qui libère une extrémité N terminale : alanine pour le VII (SUNG et al., 1977), lysine pour le VI (SUNG et al., 1978) alors que les deux précurseurs sont N acétylés. Le PIIIa diffère aussi du IIIa du virion par son antigénicité. En immuno-électrophorèse bidimensionnelle, les intermédiaires dissociés au DOC semblent ne pas contenir d'antigène IIIa alors que celui-ci est révélée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Cependant, il est encore antigénique puisqu'il peut être précipité par adsorption de l'immun-complexe avec *S. Aureus*. Le pouvoir antigénique du PIIIa est donc beaucoup plus faible que celui du IIIa.

L'immun-précipité, formé par incubation d'anticorps anti-IIIa avec des intermédiaires, contient, en plus du PIIIa, la même protéine de 56 k déjà entraînée avec le IIIa du virus mature.

L'étude de mutants bloqués dans l'assemblage, montre une diminution du taux d'antigène IIIa en immuno-électrophorèse bidimensionnelle : les extraits des cellules infectées par les mutants : H2 ts 112, H2 ts 101, H2 ts 4

et H5 ts 58, ont un pic de IIIa fortement diminué, à température non permissive. Ces mutants sont défectueux dans l'encapsulation du DNA à température restrictive : aucune trace de DNA n'est décelée dans les particules du H2 ts 4, du H5 ts 58 (KHITTOO, WEBER 1977 ; EDVARSSON et al., 1978) ; un segment de DNA de 7-11S est incorporé dans les particules du H2 ts 112 (D'HALLUIN et al., 1978 a) Déjà KHITTOO et WEBER (1977) avaient parfois observé une migration plus lente du IIIa pour le mutant H2 ts 4. Ces quatre mutants appartiennent à trois groupes de complémentation différents : le H2 ts 4 et le H2 ts 112 appartiennent au même groupe. La mutation du H5 ts 58 est localisée au niveau du gène du IIIa (FROST-WILLIAMS, 1978) et celle du H2 ts 4 dans la région codante pour le IIIa et le V. Ni la mutation du H2 ts 112, ni celle du H2 ts 101 n'ont été localisées.

Le IIIa pourrait donc avoir un rôle important pour la formation des particules matures infectieuses.

Partie II :

La base du penton : sa purification et caractérisation.

(Article 3)

Introduction

Aux douze sommets de la capside, se trouvent les pentons avec une projection fibreuse. Ces pentons ont pu être purifiés (PETTERSSON, HOGLUND, 1969) ainsi que la fibre isolée à partir des extraits de cellules infectées par l'adénovirus 2. Dans ces extraits, la base du penton est en très faible quantité et ne peut pas être séparée du penton complet. L'obtention de la base par dissociation du penton (NORRBY, SKAARET, 1967 ; NEURATH et al., 1968 ; PETERSON, HOGLUND, 1968) entraîne une altération de la structure de la protéine et celle-ci ne peut pas être utilisée pour une étude physico-chimique.

C'est pourquoi nous avons choisi d'isoler la base du penton à partir de mutants de l'adénovirus 2: le H2 ts 115 et le H2 ts 125, mutants thermosensibles defectifs dans la synthèse de fibre à température restrictive (MARTIN et al., 1978). Dans ces conditions, on n'a pas de formation de pentons complets, et la base seule s'accumule dans les extraits cellulaires et peut être purifiée. La base isolée a été caractérisée. Son poids moléculaire, son pHi, son coefficient de sédimentation et sa structure quaternaire ont été déterminés.

Isolation and Characterization of Adenovirus Type 2 Vertex Capsomer (Penton Base)

MARIE-LAURE BOUDIN, MAURICE MONCANY,*¹ JEAN-CLAUDE D'HALLUIN,
AND PIERRE A. BOULANGER²

*Unité de Recherches de Virologie No. 102 de l'INSERM, Place de Verdun, Lille, France, and
Unité de Physiologie des Virus, IRSC, Villejuif, France

Accepted September 25, 1978

Using two temperature-sensitive mutants of human adenovirus 2, H₂ ts-115 and H₂ ts-125, both defective in fiber production at 39.5°, it was possible to isolate appreciable amounts of vertex capsomer (penton base) devoid of fiber projection. The penton base was purified by Freon extraction, ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex, and hydroxyapatite chromatography. The final product was homogeneous by two-dimensional immunoelectrophoresis, analytical ultracentrifugation, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and electron microscopy. The penton base thus isolated had a sedimentation coefficient of 9.1 S and an apparent molecular weight of about 500,000. Stoichiometric analysis of the penton base and fiber components of adenovirion, performed by biochemical and immunological methods, suggested that there are five subunits of 85,000 daltons per penton base structure. This finding and the sedimentation data implied an elongated shape for the vertex capsomer. The penton base had an isoelectric point of 5.8. No free N-terminal amino acid was detectable and the amino acid composition showed a relatively high content of dicarboxylic amino acids, leucine, and significant amounts of cysteine. The penton base had a cell-detaching effect, but did not seem to induce neutralizing antibodies. No endonuclease activity was found associated with the purified penton base obtained after hydroxyapatite chromatography, or even after the DEAE-Sephadex step.

INTRODUCTION

The penton of human adenovirus is a complex structure consisting of a shaft projection (the fiber) attached to the vertex capsomer anchored in the capsid, the so-called penton base (Valentine and Pereira, 1965). The complete penton has already been purified and characterized (Pettersson and Höglund, 1969). However, because of its lability and scarcity in the excess pool of adenovirus-soluble components, the free penton base has not yet been extensively purified and characterized as an independent structural entity. Free penton base antigen has been previously obtained by disruption

of complete penton with concentrated guanidine-HCl (Norrby and Skaaret, 1967), formamide (Neurath *et al.*, 1968), and pyridine (Pettersson and Höglund, 1969). All these procedures present the major drawback of altering the structural and functional integrity of the protein, which cannot thereafter be used for further physical and immunological characterization. Isolation of penton base antigen from adenovirus type 5-infected cell extract by preparative polyacrylamide gel electrophoresis has been described, but the low final recovery appears to be the main limitation of this technique (Winters *et al.*, 1970).

Two temperature-sensitive (ts) mutants of human adenovirus type 2 (H₂), H₂ ts-115 and H₂ ts-125, which were isolated in our laboratory have been found to be defective in fiber synthesis at the restrictive temperature 39.5° (Martin *et al.*, 1975, 1978).

¹ Present address: Department of Microbiology, Biozentrum der Universität Basel, CH-4056 Basel, Switzerland.

² Author to whom all correspondence should be addressed.

At the late stage of infection of KB cell cultures with these fiber (-) mutants at 39.5°, free vertex capsomer is found accumulated as one of the major structural antigens in the pool of virus-soluble components. The same accumulation of free penton base at the nonpermissive temperature has also been noted with ts fiber (-) mutants of type 5 adenovirus (Russell *et al.*, 1972). This study describes the purification and characterization of the adenovirus type 2 penton base obtained with the mutants H₂ ts-115 and H₂ ts-125.

MATERIALS AND METHODS

Virus and cell. Human adenovirus type 2, wild type (WT), originally obtained from Dr. J. F. Williams (Carnegie-Mellon Institute, Pittsburgh, Pa.) was grown on KB cells maintained in suspension culture at 3×10^5 cells/ml in Eagle's minimal essential medium supplemented with 5% horse serum.

Adenovirus type 2 temperature-sensitive mutants H₂ ts-115 and H₂ ts-125 have been isolated after nitrous acid treatment of a wild-type stock and phenotypically characterized as fiber-defective ts-mutants (Martin *et al.*, 1978).

Cells were infected at a multiplicity of infection of 25 to 50 PFU per cell.

Production of ts-115 and ts-125 soluble antigens. At 36 hr after infection at 39.5°, the H₂ ts-115- or H₂ ts-125-infected cells were harvested, washed in isotonic medium, and disrupted by three cycles of freezing and thawing in 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0. The virus material was then extracted twice with fluorocarbon (Freon 113), as previously described (Boulanger and Puvion, 1973). Although no infectious virions were produced at nonpermissive temperature, possible incomplete virus particles or assembly intermediates were separated from the pool of soluble components by centrifugation in a Beckmann L 5-50 centrifuge with an SW-27 rotor for 90 min at 20,000 rpm and 4°. The pellet was discarded and the supernatant constituted the source of soluble antigens.

Purification of adenovirus penton base.

All the operations were conducted at 4°, with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride added in all buffers as protease inhibitor. The H₂ ts-115- or H₂ ts-125-soluble components were first precipitated with ammonium sulfate at 55% saturation and pH 6.5 for 18 hr at 4°. The precipitate formed was collected, dissolved in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.8, and further fractionated by ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrated in the same buffer. The column (15 × 2.0 cm), refrigerated at 4°, was loaded with 50 to 80 mg of protein obtained from 2 liters of infected cells.

After an extensive rinsing with the equilibrating buffer, a linear gradient of NaCl in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.8, ranging from 0.0 to 0.5 M (200-ml total volume) was applied to the column and 3-ml fractions were collected with a flow rate of 12 ml/hr. Each fraction was monitored for absorbance at 278 nm and for resistivity and analyzed by rockett immunoelectrophoresis against an anti-adenovirus antiserum, as described below.

The fractions corresponding to the peak of penton base eluted at 0.12 M NaCl were pooled and reprecipitated with ammonium sulfate at 55% saturation and pH 6.5. The precipitate was dissolved in, and dialyzed against, 0.01 M potassium phosphate, pH 6.8 and further chromatographed on a hydroxyapatite column. Hydroxyapatite was home-made, according to the method of Main *et al.* (1959). The column (0.9 × 9 cm) was equilibrated in 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.8, and the elution was performed with a linear 0.02 to 0.50 M potassium phosphate gradient at a constant pH of 6.8. The fractions corresponding to the main peak eluted at 0.1 M phosphate were pooled and the penton base was concentrated by precipitation with ammonium sulfate at 55% saturation and pH 6.5.

Polyacrylamide gel electrophoresis. Native samples were electrophoresed at 5 mA per tube (in disc gel) or 2.5 mA per slot (in slab gel) in 6% polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide ratio, 30:0.8) buffered with 0.375 M Tris-HCl, pH 8.9 and overlaid with a spacer gel made of

Ad₂ PENTON BASE

3% polyacrylamide (acrylamide:bisacrylamide ratio, 10:2.5) in 0.125 M Tris-HCl buffer, pH 6.8. The electrode buffer was 0.05 M Tris-0.384 M glycine, pH 8.3. Polypeptide analysis was carried out in sodium dodecyl sulfate (SDS)-containing polyacrylamide gel. Samples were denatured by heating for 2 min at 100° in an equal volume of 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 6 M urea and analyzed on 15.5% polyacrylamide slab gel (ratio of acrylamide:bisacrylamide, 50:0.235) overlaid by a 3% spacer gel (ratio of acrylamide:bisacrylamide, 50:1.33) in the discontinuous SDS-buffer system of Laemmli (1970).

Preparation of antisera. Polyspecific antiserum against adenovirus type 2 was obtained by multiple injections in the rabbit of virus particles purified by two CsCl bandings (Martin *et al.*, 1975).

Monospecific antiserum against the penton base was made by repeated injections in the rabbit of the immune precipitate of penton base-anti-penton base antibody freshly formed within the agarose gel of several cross-immunoelectrophoresis plates (Martin *et al.*, 1975).

Cross-immunoelectrophoresis. A modification of the basic technique described by Laurell (1965) was used for two-dimensional immunoelectrophoresis and has been described in detail elsewhere (Martin *et al.*, 1975). Quantification of immune precipitate peaks was made by two different methods: (i) the measurement of the peak areas, in square millimeters, using the MOP/AM 01-system for quantitative image analysis (Kontron-Messgeräte); (ii) weighing of transfer paper drawn on the precipitate outline.

Rockett immunoelectrophoresis was performed according to the method of Weeke (1973).

Adenovirus neutralization test. The neutralizing activity of the antiserum was determined by two techniques. Serial two-fold dilutions of the antiserum were assayed for inhibition of cytopathic effect or inhibition of plaque formation on HeLa cell monolayers (Philipson *et al.*, 1968; Pettersson and Höglund, 1969).

Cell-detaching (CD) activity of penton

base. Aliquots (0.25 ml) of twofold serial dilutions of penton base in Eagle's minimal essential medium were added to twice-washed monolayers of HeLa cells in test tubes (3×10^5 cells per tube). The cells were prior labeled for 24 hr with [³H]thymidine (10 μ Ci/ml, 30 Ci/mmol). After incubation at 37° for 2 hr, the medium containing the cells detached from the glass was removed and its radioactivity was determined on filter. The cells remaining attached to the support were then resuspended in 0.25 ml of 1 M NaOH and counted for radioactivity. The titer corresponds to the reciprocal of the dilution of penton base antigen giving 50% of glass-detached cells (one CD unit per 0.25 ml of the sample).

Analytical ultracentrifugation. Sedimentation coefficients of samples dissolved in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 (1-2 mg of protein/ml) were determined at 20° and 59,750 rpm in the Model E Spinco ultracentrifuge, using Schlieren optics. The sedimentation values were extrapolated to zero concentration.

Electron microscopy. Samples were negatively stained with 2% uranyl acetate, pH 4.6, and examined in the Elmiscop I electron microscope.

Isoelectric point determination. The isoelectric points of protein samples were determined in an isoelectrofocusing unit (LKB 2117 Multiphor). Electrofocusing was performed for 16 hr at 600 V in 5% polyacrylamide gel (ratio of acrylamide:bisacrylamide, 29:0.9) with 10% Ampholine, pH 4-6. The pH gradient was determined at the end of the run by means of a contact microelectrode.

Amino acid analysis. Samples of 0.25 to 0.50 mg of protein were hydrolyzed in sealed tubes under nitrogen with 5.6 N HCl at 110° for 24 and 72 hr. The hydrolysates were analyzed on a Beckman Multichrom B amino acid autoanalyzer.

N-terminal amino acid analysis. The N-terminal residue was determined by a modification of the technique described by Casola *et al.* (1974), using ¹⁴C-labeled dansyl chloride (DNS-Cl; sp act 104 mCi/mmol, 0.5 mCi/ml; CEA, Saclay). Forty micrograms of penton base (corresponding to

approximately 100 pmol of native protein of 400,000 daltons and 500 pmol of polypeptide subunit of 80,000 daltons were heat-denatured at 100° for 5 min with 0.5% SDS, prior to dansylation. The reaction mixture, made up in microtube, contained: 25 μ l of SDS-denatured penton base solution, 5 μ l of 2 M NH_4 -bicarbonate, pH 9.6, and 10 μ l of ^{14}C -labeled DNS-Cl solution in acetone. The microtube was shaken on a Vortex mixer and incubated at 37° for 4 hr. Cold 20% trichloroacetic acid (50 μ l) and 5 μ l of carrier bovine serum albumin (10 mg/ml) were then added. After standing on ice for 1 hr, the microtube was centrifuged and the protein precipitate was washed twice with 50 μ l of 1 N HCl and hydrolyzed with 25 μ l of 5.6 N HCl at 110° for 16 hr, after placing the microtube within a sealed test tube containing 1 ml of 5.6 N HCl at the bottom. The hydrolysates were dried in a vacuum desiccator and extracted four times with redistilled neutralized ether. The ether extracts were then redissolved in 3 μ l of acetone-acetic acid (2:1 by volume) and spotted onto a 5 \times 5-cm polyamide sheet. Thin-layer chromatography was carried out in 1.5% formic acid (first dimension) and benzene-acetic acid (90:10 by volume; second dimension). After being dried, the thin-layer plates were autoradiographed (Boulanger *et al.*, 1978).

Iodination of penton base. Purified native penton base was labeled *in vitro* with ^{125}I (NaI, 210 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), using the chloramine-T method (Hunter and Greenwood, 1962). The specific activity obtained was 5×10^6 cpm/ μg of protein.

Gel filtration chromatography. The apparent molecular weight of native penton base was estimated by molecular sieve chromatography on Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals). The column (100 \times 2.5 cm) was equilibrated in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.5, containing 0.2 M NaCl. The column was calibrated with the following markers: adenovirus type 2 virions, apoferritin, *Escherichia coli* β -galactosidase, and bovine serum albumin.

Endonuclease activity. The method of Reif *et al.* (1977) was used. Two micrograms of purified adenovirus 2 DNA, labeled with

^{14}C thymidine (sp act 2000 cpm μg^{-1}) was incubated with penton base preparations in 0.5 ml of 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.1 M NaCl and 0.001 M MgCl_2 for 4 hr at 37°. The reaction was stopped by addition of sodium EDTA and sarkosyl, up to 0.02 M and 2%, respectively. DNA was then analyzed by centrifugation in a neutral sucrose gradient (5–20%) made up in 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 M NaCl and 0.001 M sodium EDTA. The gradients were centrifuged for 5 hr at 35,000 rpm and 4° in an SW 41 rotor. Fractions were collected dropwise from the bottom and assayed for acid-precipitable radioactivity.

One unit of endonuclease was defined as the amount of enzyme which caused one double-strand break per molecule of Ad 2 DNA in 1 hr at 37°, using 1 μg of substrate DNA per assay, under the standard conditions mentioned above (Reif *et al.*, 1977).

Purified type 2 adenovirus particles, disrupted by dialysis against 0.005 M Tris-maleate buffer, pH 6.4 (Laver *et al.*, 1969) was used as positive control of endonuclease activity. The amount of penton base protein in adenovirus particle was estimated by a theoretical calculation based on the existence of 12 vertex capsomers composed of five subunits of 85,000 daltons: The value of 3.5% was thus found.

Protein. Protein concentrations were determined by the method of Lowry *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard.

Bifunctional crosslinking reagents. Glutaraldehyde (25%) was purchased from Merck (Darmstadt, R.F.A.). Dimethyl-suberimidate, dithiobis(succinimidylpropionate), and 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrodiphenyl sulfone were purchased from Pierce Chemical Co., (Rockford, Ill.). Penton base (1.0–1.5 mg/ml) was reacted with each of the crosslinking reagents at final concentrations of 5, 10, 25, 50, and 100 mM for 1 hr at room temperature. The reaction was stopped by addition of SDS up to 1% and heating for 2 min at 100°. The crosslinked material was then analyzed in SDS-containing pore-gradient polyacrylamide gel ranging from 4 to 18% in acrylamide concentration.

Ad₂ PENTON BASE

RESULTS

Although both H₂ ts-115 and H₂ ts-125 were used at the beginning of this work for purification of penton base, most of the biochemical studies then concerned the H₂ ts-125 penton base, which is now routinely prepared for reconstruction experiments of complete penton *in vitro* (to be published).

Purification of the H₂ ts-115 and H₂ ts-125 Penton Base

Fluorocarbon (Freon 113) extraction combined with high-speed centrifugation used as the first step of separation of soluble antigens from virus particles is a widely employed procedure (Pettersson and Höglund, 1969; Boulanger and Puvion, 1973). Although cells infected with H₂ ts-115 or H₂ ts-125 mutant at nonpermissive temperature do not produce detectable amounts of mature virus particles, the first step was still used in order to eliminate cell debris, and possible incomplete virus particles. The Freon extract was then precipitated with ammonium sulfate at 55% saturation and pH 6.5. The precipitate formed for 18 hr at 4° was then redissolved in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.8.

Analysis of this precipitate by polyacrylamide gel electrophoresis and two-dimensional immunoelectrophoresis revealed that it contained two major components identified by comparison with WT components (Martin *et al.*, 1975; Boulanger and Puvion, 1976) as hexon and penton base (Figs. 1c and d). No detectable fiber antigen was found, either in two-dimensional plate, or in acrylamide gel (peak and band 5).

The next step consisted of DEAE-Sephadex A-50 chromatography of the ammonium sulfate precipitate. This method has been shown to separate the three major adenovirus type 2-soluble antigens, hexon, penton, and fiber: WT adenovirus type 2 fiber is not retained on the ion-exchanger under our conditions and elutes in the excluded peak; penton eluted at 0.1 M NaCl, and hexon at 0.3 M NaCl in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 6.8 (Boulanger and Puvion, 1973). When ammonium sulfate precipitate

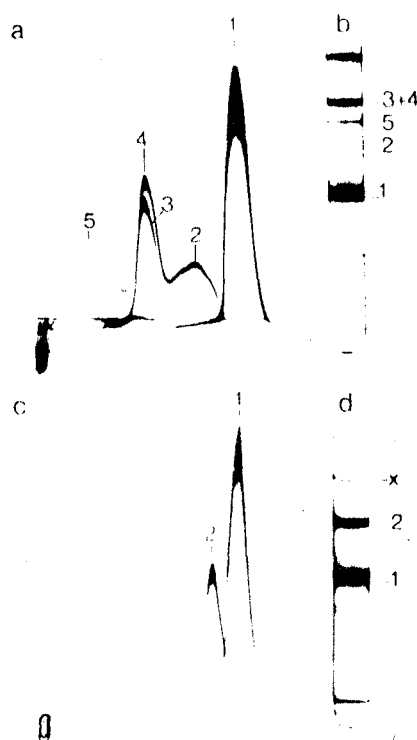


FIG. 1. Immunological and biochemical analysis of extracts of cells infected with WT adenovirus (a, b) and with H₂ ts-115 (c, d) at 39.5°. Ammonium sulfate precipitates were analyzed in two dimensional immunoelectrophoresis (a, c) against 100 μ l of WT-adenovirus antiserum, and in nondissociating 6% polyacrylamide disc gel (b, d). The different peaks of immune precipitate on the plates and bands on the gels correspond to: 1, hexon; 2, free penton base; 3, antigenic determinant of fiber contained in the complete penton; 4, antigenic determinant of the penton base of the complete penton; 5, free fiber. Band x most likely corresponds to aggregates of the penton base. Protein loads were: (a) 120 μ g; (b) 100 μ g; (c) 40 μ g; (d) 100 μ g. Staining: Coomassie brilliant blue R-250.

of H₂ ts-115 or H₂ ts-125 Freon extract was chromatographed on DEAE-Sephadex, two major peaks were obtained with the NaCl gradient: The first peak eluted between 0.075 and 0.150 M NaCl, with a maximum at 0.125 M, and the second between 0.2 and 0.3 M NaCl. Rockett immunoelectrophoresis performed with an antiserum against adenovirus particles showed that these two peaks belonged to two different virus antigens and permitted the fractiona-

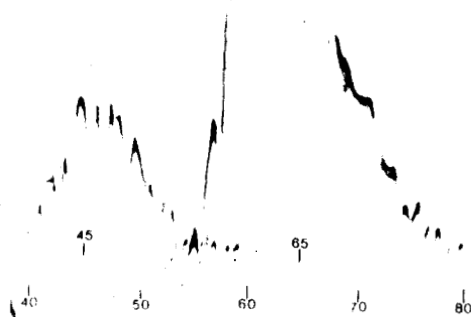


FIG. 2. Rockett immunoelectrophoresis analysis of chromatographic fractions from DEAE-Sephadex. Ammonium sulfate precipitate of H₂ ts-115 or H₂ ts-125, as analyzed in Figs. 1c and d, was fractionated on a DEAE-Sephadex A-50 column. The NaCl gradient was applied at fraction 30. A 5- μ l sample of the fractions from 0.08 to 0.40 M NaCl were cross-immunoelectrophoresed against 100 μ l of anti-adenovirus 2 immune serum. The absorbances of fractions 45 and 62 at 278 nm were 0.3 and 0.6, respectively. Fractions 40–53 correspond to penton base antigen, fractions 56–80 to hexon antigen. The anode is at the top of the plate. Staining: Coomassie brilliant blue R-250.

tion of these virus components with minimum overlapping and reciprocal contaminations (Fig. 2). The first peak (fractions 40–53) corresponded to vertex capsomers, the second peak (57–77) corresponded to hexon capsomer, as shown by analytical electrophoresis on polyacrylamide gel and crossed immunoelectrophoresis.

The fractions corresponding to each peak were pooled and adenovirus-soluble antigens were concentrated by precipitation with 55% ammonium sulfate. At this stage, the penton base was still contaminated by traces of hexon, as shown by two-dimensional immunoelectrophoresis (Fig. 3a) and analytical polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 3b).

Purification was achieved by chromatography on a hydroxyapatite column. Penton base eluted at 0.125 M potassium phosphate, whereas contaminating hexon eluted at 0.18 M (Boulanger and Puvion, 1976). The fractions containing the penton base antigen were pooled and further subjected

to a precipitation with ammonium sulfate at 55% saturation. Penton base thus obtained was found to be devoid of most cellular and viral contaminants (Figs. 3c–e). The final recovery is rather low: From 5 to 80 mg of starting material, 1.0 to 1.5 mg of purified penton base was obtained.

Analytical Polyacrylamide Gel Electrophoresis

The native adenovirus penton base purified as described above gave one major band in polyacrylamide gel electrophoresis at pH 8.9 (Figs. 3d and e). A minor band, which was often visible on nondissociating polyacrylamide gel, disappeared on dissociating SDS-polyacrylamide gel and most likely corresponded to some aggregated form of

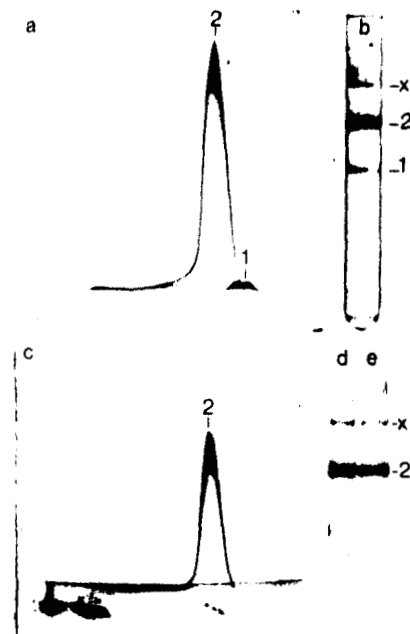


FIG. 3. Two-dimensional immunoelectrophoresis and polyacrylamide gel analysis of penton base at different stages of purification. (a, b) Penton base preparation after DEAE-Sephadex chromatography (ammonium sulfate precipitate of fractions 41–51 of Fig. 2). (c, d, e) Penton base after hydroxyapatite chromatography. 1, hexon; 2, penton base; x, possible oligomers of penton bases. Protein loads were: (a) 5 μ g; (b) 50 μ g; (c) 5 μ g; (d) 20 μ g; (e) 10 μ g. Antiserum: (a) 100 μ l; (c) 150 μ l. (b) Disc gel; (d, e) slots of a slab gel. Staining: Coomassie brilliant blue R-250.

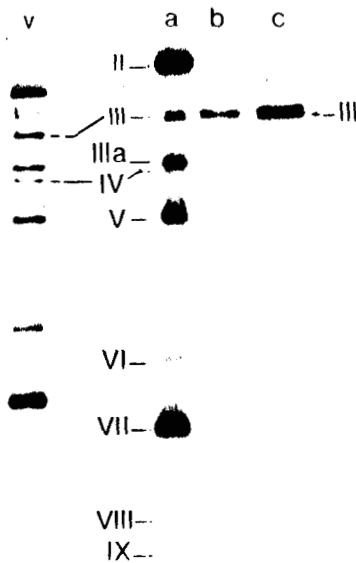
Ad₂ PENTON BASE

FIG. 4. Analytical SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of penton base preparation. (a) control virion (80 µg of protein); (b, c) purified penton base; (b) 2 µg; (c) 8 µg. Staining: Coomassie brilliant blue R-250. (v) autoradiogram of [¹⁴C]valine-labeled adenovirion (20,000 cpm). The anode is at the bottom.

penton bases. The unique band seen on SDS-polyacrylamide gel pattern of freshly purified penton base (Figs. 4b and c) corresponded to the major component III of adenovirion, according to the nomenclature of Maizel *et al.* (1968). The apparent molecular weight of the vertex capsomer polypeptide unit is estimated to be 85,000 (Anderson *et al.*, 1973; Philipson and Lindberg, 1974).

Aging of penton base at 4° resulted in the appearance of discrete bands on SDS-polyacrylamide gel, with molecular weights ranging from 55,000 to 25,000, without detectable loss of immunological reactivity in two-dimensional immunoelectrophoresis (not shown).

Immunological Characteristics

The purified penton base gave one single symmetrical peak in cross-immunoelectrophoresis (Figs. 3c and 7d-f), with a migration intermediate between hexon (the most anodic peak) and complete penton (Fig. 1a).

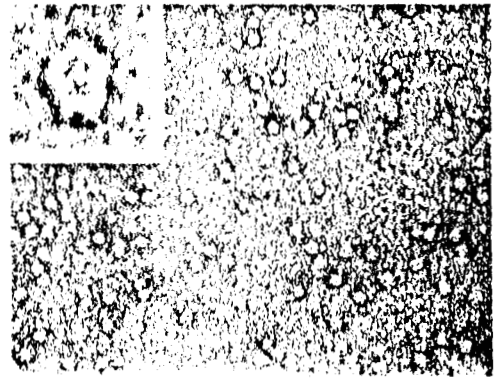


FIG. 5. Electron micrograph of purified penton base negatively contrasted with 2% uranyl acetate, pH 4.6. ×150,000. Inset: Enlargement of a penton base showing a pentagonal contour. ×1,360,000.

The monospecific antiserum prepared against penton base revealed also penton base of adenovirus type 5, confirming the presence of group-specific determinants on vertex capsomer (Pettersson and Höglund, 1969;

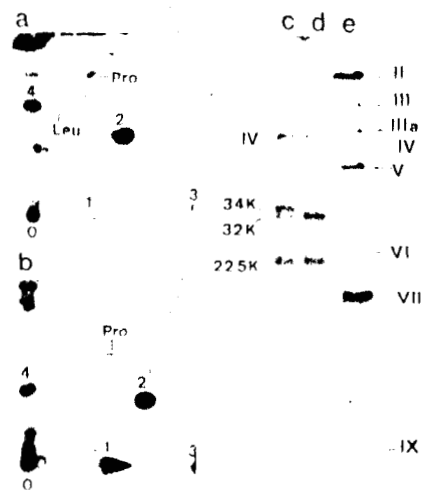


FIG. 6. N-terminal determination and polypeptide analysis of complete penton preparation aged at 4° for 30 days. (a, b) Autoradiograms of [¹⁴C]DNS-amino acid two-dimensional chromatograms. (c-e) Coomassie blue-stained SDS-polyacrylamide gel. (a, c) Aged penton before aminopeptidase digestion. (b, d) Aged penton after aminopeptidase digestion. (e) Control type 2 adenovirion. (O), Origin; spot 1, DNS-OH; spot 2, DNS-NH₂; spot 3, DNS-ε-lysine; spot 4, breakdown products of the [¹⁴C]DNS-Cl reagent.

BOUDIN *ET AL.*

TABLE 1
COMPARATIVE AMINO ACID COMPOSITIONS
OF PENTON BASE, PENTON, FIBER, AND
HEXON OF ADENOVIRUS TYPE 2

Amino acid ^a	Penton base	Complete penton	Free fiber ^b	Hexon ^c
Asp	10.4	13.5	13.1	14.0
Thr ^d	6.1	9.3	11.1	7.7
Ser ^d	6.0	8.6	11.2	7.2
Glu	12.1	8.5	6.4	9.0
Pro	5.8	7.4	5.2	6.3
Gly	7.3	7.2	8.5	7.0
Ala	7.9	6.7	6.5	7.2
Val ^e	6.1	5.9	5.3	5.4
½-Cys	1.0	Not detectable	0.7	Traces ^f
Met	2.0	1.9	1.5	1.7
Ile ^g	4.2	4.8	5.0	3.6
Leu ^g	9.2	8.4	9.9	7.9
Tyr	3.2	3.2	2.8	5.6
Phe	3.8	3.6	2.9	4.5
Lys	6.8	4.8	6.0	4.5
His	1.9	1.4	0.8	1.7
Arg	5.3	3.8	1.5	5.3
Trp ^h	0.9	1.1	1.6	1.3

^a Given as number of residues per 100. Average of three determinations.

^b Sundquist *et al.* (1973b).

^c Boulanger *et al.* (1978).

^d Extrapolated to zero-time hydrolysis.

^e Based on the 72-hr hydrolysis value.

^f Each hexon polypeptide chain has one free cysteine (Jörnval *et al.*, 1974b).

^g Determined by the method of Liu and Chang (1971).

Philipson and Lindberg, 1974). There was no cross-reaction with adenovirus type 5 or type 2 fiber.

When assayed by the cytopathic effect or plaque formation, the anti-(penton base) antiserum showed no neutralization activity, suggesting that the purified penton base structure had no major neutralizing activity.

Analytical Ultracentrifugation

Purified vertex capsomers sedimented as a single symmetrical peak in 0.01 M potassium phosphate buffer, pH 6.8, with an $s_{20,w}$ value of 9.1 ± 0.1 S.

Isoelectric Point Determination

The isoelectric point was found to be 5.8 for the penton base, viz., 0.1 pH units higher

than that of soluble hexon (Boulanger *et al.*, 1978).

Electron Microscopy

The purified vertex capsomers were controlled by electron microscopy, after negative staining with uranyl acetate. The preparations examined were found to be devoid of free fibers and of complete pentons. They were constituted of roughly polygonal structures of 7.5 to 8.0 nm in diameter, with a central cavity of about 3 nm in diameter. The pentagonal outline, previously discerned (Pettersson and Höglund, 1969), was frequently observed (Fig. 5).

Amino Acid Composition

Table 1 shows the amino acid composition of isolated penton base, compared with that of hexon, complete penton, and free fiber (Sundquist *et al.*, 1973b). The penton base appeared relatively poor in hydroxy amino acids, and rich in dicarboxylic amino acids and in leucine. It also contained significant amounts of cysteine.

N-Terminal Amino Acid

A faint spot of [¹⁴C]DNS-proline was constantly visible on the autoradiograms of thin-layer two-dimensional chromatograms, suggesting the existence of a non-blocked N-terminus for the penton base protein or the occurrence of endopeptidase and/or exopeptidase digestion. The same N-terminal amino acid analysis was performed on soluble adenovirus 2 fiber and complete penton. No indication of free N-terminus was found for the isolated fiber nor in fresh preparation of complete penton. However, aging of complete penton at 4° for 10 to 30 days revealed two spots of dansyl amino acids, corresponding to proline and leucine (Fig. 6a). When the aged preparation of complete penton was subjected to aminopeptidase digestion for 24 hr at 37° (leucine aminopeptidase, Sigma Co.; ratio of enzyme to substrate, 1:50), only the spot of proline was detected (Fig. 6b).

When the aged preparation of complete penton was analyzed on SDS-polyacrylamide gel, the polypeptide band of 85,000

Ad₂ PENTON BASE

daltons (85K) corresponding to the penton base unit had almost disappeared, whereas three bands of respective molecular weights 34K, 32K, and 22.5K were visible (Fig. 6c). After aminopeptidase digestion, the preparation of aged penton base showed only two bands of 32K and 22.5K, with an increase of staining of the 32K species (Fig. 6d).

Determination of the Quaternary Structure of the Native Penton Base

Four different approaches were used to determine the number of polypeptide subunits in the vertex capsomer.

(a) *Molecular weight estimation of the native protein by gel-filtration chromatography.* The native penton base eluted from a column of Sepharose 4 B between *E. coli* β -galactosidase (MW 515,000) and apoferritin (MW 467,000). Its apparent molecular weight appeared therefore to be about 500,000.

(b) *Stoichiometry of penton base and fiber polypeptides in adenovirion.* Freshly prepared adenovirus particles, labeled with [¹⁴C]valine, were denatured by heating in SDS-2-mercaptoethanol-urea and electrophoresed in SDS-containing polyacrylamide gel. Scanning of the autoradiograms of several gel tracks of dissociated adenovirions, as shown in Fig. 4v, gave an average value of 2.06 for the ratio of label of bands III:IV, the polypeptides of penton base, and fiber, respectively. No correction was made for the valine content of proteins, since amino acid analysis shows that valine was in similar amounts in penton base and fiber (Table 1).

(c) *Crosslinking of penton base subunits.* Native penton base was tentatively crosslinked with glutaraldehyde, dimethyl suberimide, dithiobis(succinimidyl propionate), and 4,4'-difluoro-3,3'-dinitrodiphenyl sulfone, at various concentrations of reagents (10 to 100 mM). The first three reagents are specific for the ϵ -amino group of lysines, and the last one for the tyrosine phenol ring. The crosslinked products were analyzed in SDS-containing pore-gradient gel, ranging from 4 to 18% in acrylamide concentration.

At low concentrations of reagents, no

crosslinked species could be identified except traces of species of 170,000 daltons, which most likely corresponded to dimers of penton bases (not shown). At high concentrations of reagents, the penton base subunit band of 85,000 daltons disappears, and high molecular weight crosslinked material remained at the top of the gel (not shown). Series of crosslinked oligomers of penton base subunits were never observed.

(d) *Quantification of penton base and fiber antigens in adenovirion.* The two-dimensional immunoelectrophoresis technique has been shown to be a useful method for quantification of adenovirus-soluble antigens (Martin *et al.*, 1975). Using penton base isolated as described above and purified fiber (Boulanger and Puvion, 1973) as standards, it was possible to obtain calibration curves giving the amount of penton base and fiber antigens in a given immune precipitate peak. The protein content of the standard samples was determined by the method of Lowry *et al.* (1951) and the surface of the precipitates was expressed either as milligrams of transfer paper cut along the peak outline (Martin *et al.*, 1975) or as square millimeters obtained by automatic quantitative image analysis. This calibration technique is illustrated in Figs. 7a-g.

Treatment of adenovirus particles with 0.5% sodium deoxycholate for 1.5 min at 56° has been shown to disrupt the capsid into cores, groups of nine hexons, and apex structures consisting of peripentonal hexons and pentons (Russell *et al.*, 1971; Pereira and Wrigley, 1974). Figure 7h shows that penton was also dissociated into its components, penton base (peak 2) and fiber (peak 5). The calibration curves of free penton base and free fiber antigens treated in the same way with 0.5% deoxycholate (Fig. 7g) gave the following ratios of penton base: fiber antigen ranging from 2.08 to 2.27 in different preparations of deoxycholate-treated adenovirion, with an average value of 2.2.

Biological Effect of Penton Base

A clear-cut cell-detaching effect was found at a level of 0.1 to 0.2 μ g of penton base protein per 3×10^5 cells.

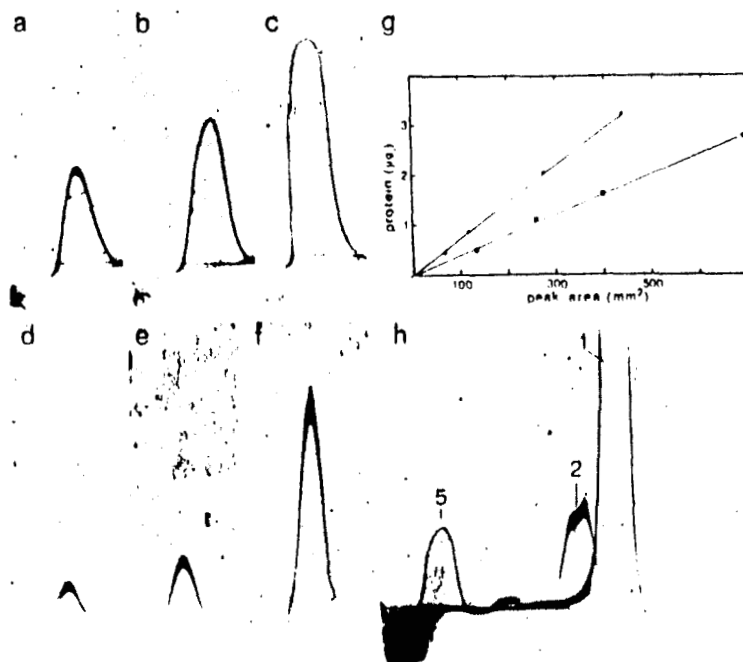


FIG. 7. Immunological method of estimation of penton base and fiber protein within the adenovirus. Increasing quantities of deoxycholate-treated fiber and penton base antigen were cross-immunoelectrophoresed against constant amounts of adenovirus 2 antiserum. A few examples of immune precipitate peaks thus obtained with isolated fiber (a-c) and with penton base (d-f) are presented here. Loads were: (a) 2 μ l; (b) 3 μ l; (c) 5 μ l (fiber protein concentration: 0.55 mg/ml); (d) 1 μ l; (e) 2 μ l; (f) 8 μ l (penton base protein concentration: 0.41 mg/ml). (g) Calibration curves obtained with penton base (■) and with fiber (●). (h) Deoxycholate-disrupted adenovirus (60 μ g of protein) showing the separation of penton base 2 from fiber 5 subunits of the complete penton. Calibration curves, as in g, give the respective amounts of 2 μ g of penton base in peak 2 and of 0.9 μ g of fiber in peak 5.

Endonuclease Activity of Penton Base

No detectable endonuclease activity was found associated with the penton base at the final stage of purification (hydroxyapatite column) nor after the DEAE-Sephadex A-50 chromatography step. In contrast, an endonuclease activity was present in the original Freon extract of H₂ ts-115 and H₂ ts-125 infected cells.

DISCUSSION

The chemical and immunological study of adenovirus vertex capsomer has thus far been impaired by the very small amounts, if any, of free penton base in adenovirus WT-infected cell extracts (Fig. 1b) compared to complete penton and free fiber. Penton base can be obtained from isolated complete penton by separation of the base

from the fiber moiety with urea, guanidine, or detergent (Philipson and Pettersson, 1973). However, the penton base has been found to be a very labile structure, sensitive to proteolytic enzymes (reviewed by Philipson and Pettersson, 1973), a feature which renders the biochemical and immunological characterization of penton base isolated under denaturing conditions difficult. It has also been suggested that free penton base found in infected cell extract results from an artifactual disruption of complete penton. The results of our two-dimensional immunoelectrophoretic analyses of freshly prepared WT-infected cell extracts seems to rule out this hypothesis and suggested that penton base as such preexists *in vivo* (Fig. 1a). This confirmed earlier studies of the synthesis and transport of adenovirus proteins in pulse-chase

ROUDIN ET AL.

gested that the polypeptide 34K had leucine on the N-end and was sensitive to aminopeptidase hydrolysis up to a proline residue and a 32K polypeptide core. The nonmodified 22.5K species might therefore correspond to the N-end piece with a blocked N-terminus. Thus, the occurrence of proline as the N-terminal amino acid in the penton base and complete penton preparations would likely represent the result of "spontaneous" endo- and exoproteolytic cleavages at specific points of the penton base polypeptide chain.

One of the open questions concerning the structure of penton base capsomer was the number of polypeptide subunits contained in the native protein. Five subunits have been suggested (Philipson and Lindberg, 1974), mainly on the basis of a local pentagonal symmetry at the apex of the adenovirus icosahedron, and on a roughly pentagonal contour in electron microscopy (Pettersson and Höglund, 1969). Cross-linking with bifunctional reagents has proved to be a useful method for the determination of the quaternary structure of oligomeric proteins (Davies and Stark, 1970; Coggins *et al.*, 1976) and has been successfully applied to adenovirus 2 hexon protein (Boulangier and Puvion, 1974). However, in contrast to hexon, no preferred crosslinked oligomeric species of penton base subunits corresponding to pentamers were detected, even at low concentrations of protein and high concentrations of bifunctional reagents. Reactions with high concentration of penton base resulted in crosslinked material with high molecular weight which could not penetrate the polyacrylamide gel. This suggested that there were no neighboring lysine residues in the penton base oligomeric edifice, at least in the bridge span of the bifunctional reagents used here, and that intermolecular crosslinks took place more readily than intramolecular ones. This also implied a relative abundance of lysine residues at the surface of the penton base, explaining its sensitivity to trypsin digestion (Pettersson and Höglund, 1969).

In gel-filtration chromatography, native penton base behaved as a protein with a molecular weight of about 500,000. In SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis, a molecular weight of 85,000 was found for the penton base subunit. Stoichiometric analyses of penton base and fiber components of adenovirion were performed by two different analytical methods: (i) scanning of SDS-gel autoradiograms of [¹⁴C]valine-labeled adenovirus particles dissociated with SDS gave an average ratio of penton base to fiber of 2.06. (ii) quantitative estimation by two-dimensional immunoelectrophoresis of penton base and fiber antigens contained in adenovirion dissociated with deoxycholate gave an average ratio of 2.2. Assuming that penton base is constituted of five subunits of 85,000 daltons, and that fiber is composed of three subunits of 62,000 daltons (Philipson and Lindberg, 1974), the theoretical value for the ratio of penton base to fiber would be 2.28. This corresponds with our experimental data. It seems therefore reasonable to conclude that the penton base is formed of five subunits of 85,000 daltons.

An intriguing result is the value of 9 S found for the sedimentation coefficient of the native penton base. This value is congruent with the value previously estimated by indirect techniques (Wilhelm and Ginsberg, 1972). However, this sedimentation coefficient seems low for a globular protein of 425,000 daltons. Horse spleen apoferritin, with a molecular weight of 467,000, and a frictional coefficient of 1.14, characteristic for a roughly spherical molecule, has a sedimentation coefficient of 17.6; Jack bean urease (483,000 daltons) has a frictional coefficient of 1.18 and a sedimentation coefficient of 18.6 (Sober, 1970). The value of 9 S implies an elongated shape for adenovirus vertex capsomer, with a frictional ratio f/f_0 greater than 1.5. A roughly conical morphology has already been described for the base of the penton, 13 nm in height and 9 nm in diameter at its base (Laver *et al.*, 1969).

Electron microscopy shows that the penton base had a round or roughly pentagonal contour, with a central cavity. This observation and the sedimentation data suggested that the vertex capsomer is seen standing on end on the microscopic grid. The central

BUS
LILLE

Ad₂ PENTON BASE

cavity could constitute the attachment site of the fiber projection. In this case, the penton base would be seen from its external pole.

No endonuclease activity was found associated with the penton base peaks of hydroxyapatite and DEAE-Sephadex chromatography. However, our anti-(penton base) immune serum has been shown to block the endonuclease of adenovirus types 2, 3, and 5 (Marusyk, personal communication). This antiserum was prepared by injections in the rabbit of penton base antigen-antibody complexes formed in agarose gel during two-dimensional immunoelectrophoresis of cell extracts performed at low ionic strength. This confirms that the penton-associated endonuclease found in different adenovirus serotypes (Marusyk *et al.*, 1975) corresponds to an enzyme of cellular origin, separable from penton base at high ionic strength (Reif *et al.*, 1977). The H₂ ts-125 penton base is now routinely prepared in our laboratory for *in vitro* assembly study with the WT adenovirus 2-soluble fiber.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (ERA-225), the Institut National de la Recherche Médicale (ATP 28-76-60; AT 50 77 82 and ASR 1) and the Université du Droit et de la Santé de Lille (UER III). We thank Dr. J. Eggert for his help with the English manuscript and Mr. J. Croquette for his expert secretarial aid. We also thank Mrs. C. Cousin and Mr. C. Lagrou for providing cell cultures and virus stocks. Both H₂ ts-115 and H₂ ts-125 mutants were kindly supplied by Dr. G. Martin.

REFERENCES

- ANDERSON, C. W., BAUM, S. G., and GESTELAND, R. F. (1973). Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J. Virol.* 12, 241-252.
- BOULANGER, P., DEVAUX, C., and LEMAY, P. (1978). Isolation and characterization of a slow-migrating class of adenovirus type 2 hexons. *Virology* 84, 456-468.
- BOULANGER, P. A., and PUVION, F. (1973). Large-scale preparation of soluble adenovirus hexon, penton and fiber antigens in highly purified form. *Eur. J. Biochem.* 39, 37-42.
- BOULANGER, P., and PUVION, F. (1974). Adenovirus assembly: Cross-linking of adenovirus type-2 hexons *in vitro*. *Eur. J. Biochem.* 43, 465-470.
- BOULANGER, P. A., and PUVION, F. (1976). Occurrence of a peculiar type of adenovirus 2 penton oligomer. *Interferology* 7, 126-134.
- CASOLA, L., DI MATTEO, G., DI PRISCO, G., and CERVONE, F. (1974). Dansyl chloride binding to proteins: Quantitative estimation of N-terminal, lysyl and tyrosyl residues by the radioactive reagent. *Anal. Biochem.* 57, 38-45.
- COGGINS, J. R., HOOPER, E. A., and PERHAM, R. N. (1976). Use of dimethyl suberimidate and novel periodate-cleavable bis(imido esters) to study the quaternary structure of the pyruvate dehydrogenase: Multienzyme complex of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 15, 2527-2532.
- DAVIES, G. E., and STARR, G. R. (1970). Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 66, 651-656.
- EVERETT, S. F., and GINSBERG, H. S. (1958). A toxin-like material separable from type 5 adenovirus particles. *Virology* 6, 770-771.
- HORWITZ, M. S., SCHARFF, M. D., and MAIZEL, J. V., JR. (1969). Synthesis and assembly of adenovirus 2: I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres, and morphogenesis of the virion. *Virology* 39, 682-694.
- HUNTER, W. M., and GREENWOOD, F. C. (1962). Preparation of iodine ¹²⁵I-labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature (London)* 194, 495-498.
- JÖRNVALL, H. (1975). Acetylation of protein N-terminal amino groups: Structural observations on α -amino acetylated proteins. *J. Theor. Biol.* 55, 1-12.
- JÖRNVALL, H., OHLSSON, H., and PHILIPSON, L. (1974a). An acetylated N-terminus of adenovirus 2 hexon protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 56, 304-310.
- JÖRNVALL, H., PETERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1974b). Structural studies of adenovirus type 2 hexon protein. *Eur. J. Biochem.* 48, 179-192.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature (London)* 227, 680-685.
- LAURELL, C. B. (1965). Antigen-antibody crossed immunoelectrophoresis. *Anal. Biochem.* 10, 358-361.
- LAYER, W. G., WRIGLEY, N. G., and PEREIRA, H. G. (1969). Removal of pentons from particles of adenovirus type 2. *Virology* 39, 599-605.
- LIU, T. Y., and CHANG, Y. H. (1971). Hydrolysis of proteins with *p*-toluene sulfonic acid: Determination of tryptophan. *J. Biol. Chem.* 246, 2842-2848.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

BOUDIN ET AL.

- MAIN, R. K., WILKINS, M. J., and LOLE, L. J. (1959). A modified calcium phosphate for column chromatography of polynucleotides and proteins. *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 6490-6495.
- MAIZEL, J. V., JR., WHITE, D. O., and SCHARFF, M. D. (1968). The polypeptides of adenovirus: I. Evidence for multiple protein components and the structure of the virion. *Virology* **36**, 126-136.
- MARTIN, R. G., WAROCQUIER, R., and BOULANGER, P. (1975). Quantitation of adenovirus soluble antigens by crossed immunoelectrophoresis: Application to serological characterization of mutants. *Intervirology* **5**, 162-172.
- MARTIN, G. R., WAROCQUIER, R., COUSIN, C., D'HALLUIN, J. C., and BOULANGER, P. (1978). Isolation and phenotypic characterization of human adenovirus type 2 temperature-sensitive mutants. *J. Gen. Virol.* **41**, 303-314.
- MARUSYK, R. G., MORGAN, A. R., and WADELL, G. (1975). Association of endonuclease activity with serotypes belonging to the three subgroups of human adenoviruses. *J. Virol.* **16**, 456-458.
- NEURATH, A. R., RUBIN, B. A., and STASNY, J. T. (1968). Cleavage by formamide of intercapsomer bonds in adenovirus type 4 and 7 virions and hemagglutinins. *J. Virol.* **2**, 1086-1095.
- NORRBY, E., and SKAARET, P. (1967). The relationship between soluble antigens and the virion of adenovirus type 3: III, Immunological identification of fiber antigen and isolated vertex capsomer antigen. *Virology* **32**, 489-502.
- PEREIRA, H. G. (1958). A protein factor responsible for the early cytopathic effect of adenoviruses. *Virology* **6**, 601-611.
- PEREIRA, H. G., and WRIGLEY, N. G. (1974). *In vitro* reconstitution, hexon bonding, and handedness of incomplete adenovirus capsid. *J. Mol. Biol.* **85**, 617-631.
- PETTERSSON, U., and HÖGLUND, S. (1969). Structural proteins of adenoviruses: III, Purification and characterization of the adenovirus type 2 penton antigen. *Virology* **39**, 90-106.
- PETTERSSON, U., PHILIPSON, L., and HÖGLUND, S. (1967). Structural proteins of adenoviruses: I. Purification and characterization of adenovirus type 2 hexon antigen. *Virology* **33**, 575-590.
- PHILIPSON, L., and LINDBERG, U. (1974). Reproduction of adenoviruses. In "Comprehensive Virology" (H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner, eds.), Vol. 3, pp. 143-227. Plenum Press, New York.
- PHILIPSON, L., LONBERG-HOLM, K., and PETTERSSON, U. (1968). Virus receptor interaction in an adenovirus system. *J. Virol.* **2**, 1064-1075.
- PHILIPSON, L., and PETTERSSON, U. (1973). Structure and function of virion proteins of adenoviruses. In "Progress in Experimental Tumor Research" (F. Homburger, ed.), Vol. 18, pp. 2-55. S. Karger, Basel.
- PRAGE, L., PETTERSSON, U., HÖGLUND, S., LONBERG-HOLM, K., and PHILIPSON, L. (1970). Structural proteins of adenoviruses: IV, Sequential degradation of the adenovirus type 2 virions. *Virology* **42**, 341-358.
- REIF, U. M., WINTERHOFF, U., LUNDHOLM, U., PHILIPSON, L., and DOERFLER, W. (1977). Purification of an endonuclease from adenovirus-infected KB cells. *Eur. J. Biochem.* **73**, 313-325.
- RUSSELL, W. C., MCINTOSH, K., and SKEHEL, J. J. (1971). The preparation and properties of adenovirus cores. *J. Gen. Virol.* **11**, 35-46.
- RUSSELL, W. C., NEWMAN, C., and WILLIAMS, J. F. (1972). Characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5: Serology. *J. Gen. Virol.* **17**, 265-279.
- SOBER, H. A., ed. (1970). "Selected Data for Molecular Biology, Handbook of Biochemistry." The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.
- SUNDQUIST, B., EVERITT, E., PHILIPSON, L., and HÖGLUND, S. (1973a). Assembly of adenoviruses. *J. Virol.* **11**, 449-459.
- SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1973b). Structural proteins of adenoviruses: IX, Molecular weight and subunit composition of the adenovirus type 2 fiber. *Virology* **51**, 252-256.
- SUSSENBACH, J. S. (1967). Early events in the infection process of adenovirus type 5 in HeLa cells. *Virology* **33**, 567-574.
- VALENTINE, R. C., and PEREIRA, H. G. (1965). Antigens and structure of the adenovirus. *J. Mol. Biol.* **13**, 13-20.
- VELICER, L. F., and GINSBERG, H. S. (1970). Synthesis, transport and morphogenesis of type 5 adenovirus capsid proteins. *J. Virol.* **5**, 338-352.
- WADELL, G., and NORRBY, E. (1969). Immunological and other biological characteristics of pentons of human adenoviruses. *J. Virol.* **4**, 671-680.
- WEEKE, B. (1973). Crossed immunoelectrophoresis in a macrotechnique. *Scand. J. Immunol.* **2**, 47-56.
- WILHELM, J. M., and GINSBERG, H. S. (1972). Synthesis *in vitro* of type 5 adenovirus capsid proteins. *J. Virol.* **9**, 973-980.
- WILLCOX, N., and MAUTNER, V. (1976a). Antigenic determinants of adenovirus capsids: I, Measurements of antibody cross-reactivity. *J. Immunol.* **116**, 19-24.
- WILLCOX, N., and MAUTNER, V. (1976b). Antigenic determinants of adenovirus capsids: II, Homogeneity of hexons and accessibility of their determinants in the virion. *J. Immunol.* **116**, 25-29.
- WINTERS, W. D., BROWNSTONE, A., and PEREIRA, H. G. (1970). Separation of adenovirus penton base antigen by preparative gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.* **9**, 105-110.

Conclusion

La base du penton a été isolée à partir des protéines solubles produites par deux mutants : le H2 ts 115 et le H2 ts 125. La purification s'effectue en trois étapes successives :

- la chromatographie sur colonne de DEAE-sephadex.
- la chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite.
- la précipitation au sulfate d'ammonium à 55% de saturation.

La pureté du produit final est montrée par :

- électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.
- l'immuno-électrophorèse bidimensionnelle.
- la microscopie électronique.

La protéine a gardé sa forme native au cours de son extraction, comme le montre son antigénicité inchangée, et la microscopie électronique.

La base du penton induit la formation d'anticorps spécifiques de groupe : les anticorps dirigés contre la base de l'adénovirus 2 révèlent aussi la base de l'adénovirus 5. Les anticorps n'ont aucun pouvoir de neutralisation sur le virus.

L'analyse en acides aminés de la base montre un contenu élevé en acides aminés dicarboxyliques et en leucine, et une faible teneur en acides aminés hydroxylés. L'acide aminé en position N terminal est bloqué, comme pour l'hexon (JÖRNVALL et al., 1974 ; BOULANGER et al., 1978) et les précurseurs du VI, du VII (SUNG et al., 1977, 1978).

Le pI de la base, déterminée par isoélectrofocalisation est de 5,8.

La base du penton est constituée de plusieurs sous-unités. Son contour pentagonal, observé en microscopie électronique, avait été montré par PETERSSON et HOGLUND, 1969). Ceci faisait penser à une structure pentamérique pour la protéine native (PHILIPSON, 1974). Le "scanning" d'autoradiographie du virus analysé en gel de polyacrylamide-SDS et l'étude en immuno-électrophorèse du virus dissocié au DOC confirment le nombre de 5 pour les sous-unités de la base. Le poids moléculaire théorique est donc de 425 000. Cependant, le poids moléculaire déterminé par chromatographie de tamisage

moléculaire, est un peu plus élevé : il est d'environ 500 000.

Par centrifugation sur gradient de sucrose, on trouve un coefficient de sédimentation de 9,1S. Vu son poids moléculaire, la base native doit être de forme allongée.

Les propriétés du virus attribuées à la base, par l'étude du penton complet soumis à différents traitements (addition d'anticorps spécifiques, ou hydrolyse par la trypsine) (PETTERSSON et HOGLUND, 1969) ont été vérifiées pour la base isolée : la base pure peut reproduire l'effet cytopathogène du virus mais n'a aucune activité endonucléasique. Une telle activité avait été trouvée associée à la base (MARUSYK et al., 1975), mais serait dissociée de la base à haute force ionique (REIF et al., 1977).

Partie III

Assemblage de la base et de la fibre
en penton complet

Introduction

"in vivo" la base du penton et la fibre sont associées en penton complet (VALENTINE, PEREIRA, 1965). Cet assemblage est stable puisque c'est sous la forme de penton qu'on trouve la plus grande partie de la base synthétisée et que le penton complet est purifiable des antigènes solubles. La base est dissociable de la fibre en tampon guanidine, HCl (NORRBY, SKAARET 1967), formamide (NEURATH et al., 1968) et pyridine 8% (PETTERSSON et HOGLUND 1969) et en DOC 0,5% porté à 56°, (BOUDIN et al., 1979). La liaison entre ces deux protéines n'est donc pas covalente.

Nous nous sommes intéressés à cette association de la base et de la fibre en penton. Nous avons recherché les facteurs qui influencent cette association et qui interviennent donc dans l'interaction entre ces deux protéines.

Nous avons étudié la formation du penton :

- 1 - "in vivo" dans des extraits cellulaires cytoplasmiques ou nucléaires.
- 2 - "in vitro", dans les extraits, par addition de base ou de fibre purifiées.
- 3 - "in vitro", hors des extraits cellulaires, par incubation des deux protéines purifiées : la base du penton d'une part, la fibre d'autre part.

Cette étude est basée, principalement, sur l'immuno-électrophorèse bidimensionnelle qui permet de visualiser l'association de la base et de la fibre en penton (MARTIN et al., 1975).

La fibre isolée sera notée par F, la base du penton par BP, avec en indice: wt, quand la protéine sera celle de l'adénovirus 2 de type sauvage ; un nombre, correspondant au numéro du mutant thermosensible de l'adénovirus 2 quand la protéine sera isolée de mutants.

Matériel et méthodes

A . Culture de cellules.

1 - cellules KB en suspension.

Les cellules KB sont maintenues en suspension à 37°, dans du milieu de Eagle, modifié par Joklik et contenant 5% de sérum de cheval décomplémenté.

2 - cellules HeLa en monocouche.

Les cellules HeLa sont cultivées dans des flacons Falcon à 37°, dans du milieu minimum essentiel (MEM), contenant 10% de sérum de veau décomplémenté.

B . L'infection virale.

L'adsorption du virus se fait à 37° dans du milieu sans sérum, pendant une heure, après concentration des cellules. Puis les cellules sont diluées à leur concentration initiale. On ajoute du sérum de veau à 2% final. Puis les cellules sont mises à la température voulue.

C . Séparation cytoplasme-noyau.

Les extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été faits à partir des cellules HeLa. L'infection est arrêtée par lavage des cellules à l'eau physiologique à 4°. Les cellules sont reprises par du RSB (Tris 20 mM, KCl 10 mM Mg Cl₂ 1,5 mM, pH 7.4) laissées 10 mn dans la glace et cassées par dix coups de DOUNCE. On centrifuge dix minutes à 650 g, dans une centrifugeuse Sorvall RC3. Le surnageant constitue l'extrait cytoplasmique, le culot contient les noyaux. Pour éliminer le cytoplasme accroché aux noyaux, ceux-ci sont lavés dans du RSB-Triton 0,25% et après avoir donné 10 coups de DOUNCE, on centrifuge à nouveau. Les noyaux sont alors repris dans un tampon à 0,1% Triton final et passés 20 secondes aux ultra-sons. Après une centrifugation de 10 mn à 12 000 g, on recueille le surnageant.

D . Purification des protéines.

1 - Préparation des antigènes solubles .

La préparation des antigènes solubles est faite à partir des cellules KB. Les cellules infectées sont lavées avec du PBS, (solution isotonique de chlorure de sodium tamponnée en phosphate)

Puis les cellules, après une centrifugation de 10 mn à 650 g, sont concentrées dix fois dans du Tris hypotonique (Tris 10 mM - NaCl 50 mM-EDTA 1mM, pH 8.1). Ces étapes se font à 4°.

Puis les cellules sont congelées-décongelées par trois fois. A l'extrait cellulaire, on ajoute alors une quantité égale de Fréon 113 et on homogénéise trois minutes à l'ultra-Turrax avant de centrifuger, 25 minutes, à 6 500g (dans une centrifugeuse Sorvall RC3). La phase aqueuse est reprise, déposée sur un gradient discontinu de chlorure de césium et centrifugée dans une ultracentrifugeuse Beckman L2 80 mm à 25 K, dans un rotor SW 41.

Le gradient est constitué comme suit :

- 2 ml de CsCl de densité 1,45; 40% glycerol
- 3 ml de CsCl de densité 1,33; 26% glycerol
- 3 ml de CsCl de densité 1,25

La fraction supérieure, correspondant aux antigènes solubles, est reprise et précipitée au sulfate d'ammonium à 55% de saturation, pendant 16 heures à 4°. Le précipité est ensuite dissout dans du phosphate de sodium 50 mM, pH 6,8 et dialysée contre ce même tampon.

2 - Purification des protéines.

La fibre et le penton complet sont isolés à partir des composants solubles de l'adénovirus du type sauvage, cultivé à 37° pendant 36 heures tandis que la base du penton est celle du H2 ts 125 ou du H2 ts 115, cultivés à 39°, pendant 36 heures.

Les antigènes solubles sont chromatographiés sur DEAE-Sephadex. La fibre est éluée dans le pic exclu. La base du penton et le penton sont élués par un gradient de chlorure de sodium dans le tampon de phosphate de sodium 50 mM, pH 6,8, à une force ionique correspondant à 0,12 M NaCl. (BOULANGER et PUVION, 1973).

L'éluition des protéines est suivie par lecture de la DO à 278 nm. Les fractions recueillies sont de 3 ml. Les tubes correspondant aux pics sont rassemblés, précipités au sulfate d'ammonium à 55% de saturation, repris dans

un tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 6.8 et dialysés contre le même tampon.

La purification est achevée par passage sur colonne d'hydroxyapatite. Les protéines sont éluées par un gradient de phosphate de potassium, de 10 mM à 500 mM. La fibre est éluee à 0,2 M, la base et le penton à 0,1M.

Les pics de protéines sont à nouveau repérés par lecture de la DO à 278 nm. Les fractions correspondantes sont précipitées au sulfate d'ammonium reprises dans du tampon phosphate et dialysées contre le même tampon. La fibre est alors conservée à -20° et la base et le penton à -70° car ils sont particulièrement sensibles à toute protéolyse. De même, pour éviter la dégradation du penton et de la base, leur extraction se fait en présence de P.M.S.F. (fluorure de phenyl methyle sulfonyl) aux taux de 1 mM dans toutes les solutions.

E - Marquage.

1 . A la methionine³⁵S .

Aux cellules, lavées en milieu privé en méthionine, on ajoute de la methionine ³⁵S (Amersham, U.K.) à 20 μ Ci/ml, à la 69ème heure quand les cellules sont maintenues à 32° . Le marquage dure alors 3 heures.

2 . A la valine ¹⁴C.

Les cellules sont marquées à la valine ¹⁴C (Amersham, 280 mCi/mn dès la 16 ème heure jusqu'à la fin du cycle.

3 . A la glucosamine ¹⁴C.

La glucose amine ¹⁴C est ajoutée à la 14ème heure de l'infection, à 100 μ Ci/l (activité spécifique 60,8 Ci/mMole, 279 μ Ci/mg). La glucosamine vient du CEA.

F - Determination du taux de protéines.

Le taux de protéines est déterminé par la méthode de LOWRY et al., (1951)

G - Techniques électrophorétiques .

1 - Gel de polyacrylamide, SDS.

L'électrophorèse est faite en plaques verticales. Les échantillons sont dénaturés à 100° , pendant 2 mn, après y avoir ajouté un volume

égal de tampon Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS, 10% mercapto-ethanol; 6 M urée et 0,01% de bleu de bromophenol. Ils sont déposés sur un gel d'espacement : 5% acrylamide (rapport acrylamide-bisacrylamide 50 : 1,33) dans un tampon Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8; SDS 0,1%. Le gel de résolution est fait à partir d'une solution d'acrylamide de 17,5% (rapport acrylamide-bisacrylamide 50 : 0,235) dans un tampon Tris-HCl 0,375 M, pH 8,9; SDS 0,1%.

Le tampon d'électrophorèse est une solution de Tris 0,025 M, glycine; 0,192 M, SDS 0,1%. L'électrophorèse dure 16 heures, à un voltage constant de 30 volts (3 volts/cm).

Les gels sont alors colorés au bleu de coomassie R 250 ou passés dans une solution de DMSO-PPO 20%, avant d'être séchés et autoradiographiés.

2 - Immuno-électrophorèse bidimensionnelle.

C'est la technique de LAURELL (1965) et modifiée par WEEKE (1973).

C'est une électrophorèse sur plaque horizontale (110 x 90) en agarose 1% dans du tampon véronal, pH 8,6, 0,2 M (tampon d'électrophorèse). La première migration se fait sous 100 volts aux bords de la plaque, celle-ci étant réfrigérée par un courant d'eau, pendant 80 minutes. Puis le gel est coupé en bandes de 2 cm de large, 10 cm de long, correspondant à chaque échantillon, qui sont transportées sur une seconde plaque (100 x 100) pour la seconde dimension. On coule 12 ml d'agarose à 1% contenant du sérum dirigé contre les antigènes viraux en quantité variable suivant la quantité du dépôt. La migration dure 16 h, à 25-30 volts aux bords de la plaque.

Les plaques sont alors pressées sous du papier absorbant pendant 45 min., puis lavées au sérum physiologique 30 min., à l'eau distillée 15 min., et séchées avant d'être colorées au bleu de coomassie brillant R 250.

3 - Immuno-affino-electrophorèse.

On suit le même procédé que pour l'immuno-électrophorèse bidimensionnelle précédemment décrite. Mais on ajoute à l'agarose 1%, 100 μ g/ml de lectine de lentilles LCA pour la première dimension.

H - Préparation des immunosérums.

1 - Sérum anti-adénovirus 2.

Le sérum polyspécifique est obtenu par une série de 4-5 injections, à un lapin, de virus, dissocié par sonication et dilué de moitié, avec de l'adjuvant de Freund complet.

2 - Serum antibase du penton.

On injecte à un lapin l'arc de précipitation anticorps-antigènes obtenus par immuno-électrophorèse bidimensionnelle des antigènes du H2 ts 115, obtenus à 39°. Une dizaine de plaques de Laurell sont faites dans ce but. On découpe l'agarose de part et d'autre du tracé du pic. L'agarose recueilli est fragmenté et repris dans du sérum physiologique avant d'être dilué avec l'adjuvant de Freund.

3 - Sérum antifibre d'adénovirus 5.

On injecte à un lapin l'arc de précipitation correspondant à la fibre, obtenu par immuno-électrophorèse des antigènes solubles de l'adénovirus contre un sérum polyspécifique.

I - Immuno-précipitation par la protéine A de staphylococcus Aureus.

La technique a été décrite par CRAWFORD et LANE (1977). Le complexe antigène-anticorps est adsorbé sur la protéine A de *S. Aureus*. 10 µl de la solution d'antigène sont incubés, pendant une nuit, à 4°, avec 10 µl d'immunosérum, 75 µl d'une solution de NENT-N (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NONIDET P.40 0,05% et sérum albumine bovine à 1 mg/ml).

Le lendemain, on ajoute 10 µl de la suspension de *S. Aureus* et après avoir laissé une demi-heure à température ambiante pour que se forme le complexe, on lave le précipité, on le reprend en tampon dénaturant, et on le chauffe à 100°, pendant 2 mn. Le précipité est analysé sur gel de polyacrylamide-SDS.

I - Hydrolyse enzymatique.

1 - les exopeptidases.

Les incubations sont faites à 37°, pendant 18 H. L'enzyme est ajouté à 1 ou 2% final (Poids/poids). L'aminopeptidase M provient de Boehringer (Mannheim, BPR), la carboxypeptidase Y de Miles (Slough, UK).

2 - hydrolyse partielle par endopeptidases.

Les digestions enzymatiques partielles ont été réalisées selon la méthode de CLEVELAND (1977) pour les protéines purifiées. Les échantillons sont dénaturés en milieu SDS-glycérol par chauffage à 100°, pendant 2 mn. Puis l'enzyme est ajouté à différentes doses (0,05 µg; 0,1 µg; 0,25 µg). L'incubation enzymatique dure une demi-heure à 37°. Puis l'hydrolyse est arrêtée par chauffage à 100°, 2 mn. Les enzymes utilisés sont :

- la protéase de S. Aureus V₈ (Miles, Slough U.K.)
- la chymotrypsine (Worthington)

K - Adsorption des anticorps antifibre de l'adénovirus 5 sur la fibre du 2.

Les anticorps dirigés contre la fibre de l'adénovirus du type 5 sont précipités au sulfate d'ammonium à 33% de saturation. Puis ils sont repris dans du sérum physiologique et dialysé contre l'eau physiologique. Le mélange fibre de l'adénovirus 2 et antifibre de l'adénovirus 5, est incubé pendant 20 h, à 4°. Plusieurs dilutions de la solution d'anticorps ont été essayées.

A . Assemblage "in vivo" de la fibre et de la base .

Des cellules HeLa sont infectées, à 32°, par l'adénovirus 2 de type sauvage, par des mutants fibre (-) : le H2 ts 115 et H2 ts 125 et un mutant dont la synthèse de fibre et de base est diminuée : le H2 ts 104 (MARTIN et al., 1978). L'infection est arrêtée à la 64^{ème} heure, après un marquage à la méthionine ³⁵S de 3 heures. Pour chaque extrait, nous avons séparé le cytoplasme, des noyaux. Le contenu de chacune des fractions est analysé en immuno-électrophorèse bidimensionnelle. Le pic 1, celui qui migre le plus loin vers l'anode, correspond à l'hexon; le 2 à la base du penton; le 3 au penton complet, avec le déterminant base et le déterminant fibre, et le pic 5 à la fibre seule.

Le profil des différents extraits cytoplasmiques est montré sur la figure 1. Pour le virus du type sauvage et pour le mutant H2 ts 104, il existe peu de base de penton libre. Pour le mutant H2 ts 115, il y a peu de penton complet tandis qu'une grande quantité de base est accumulée. De plus, ce pic est hétérogène, ce qui traduit une certaine dégradation de la base. La fibre et la base semblent s'associer difficilement. Pour le mutant H2 ts 125, le taux de fibre synthétisée est moindre que pour le virus sauvage. Dans certains extraits, elle est même synthétisée en défaut par rapport à la base : il n'existe plus de fibre libre, et le pic de la base du penton est augmenté. Chez ce mutant, la fibre et la base semblent avoir la même capacité à s'assembler que chez le sauvage.

Le profil des fractions nucléaires est identique pour les 4 virus testés. (Fig. 2). Il y a peu ou pas de penton complet pour la fraction du H2 ts 104 : le pic de base est diminué.

B . Assemblage "in vitro", dans les extraits cellulaires.

1 - Incubation avec un excès de base du penton purifiée (BP₁₂₅)

Les extraits cellulaires obtenus à 32° ont été incubés, 20 heures, à 4° après addition de base du penton purifiée, du H2 ts 125, la fibre étant en excès dans chacune de ces fractions. Par la technique d'immuno-électrophorèse, on observe une augmentation du pic du penton tandis que celui de la fibre diminue, traduisant donc un assemblage. Des molécules de BP₁₂₅ ajoutées à l'extrait se sont donc assemblées en

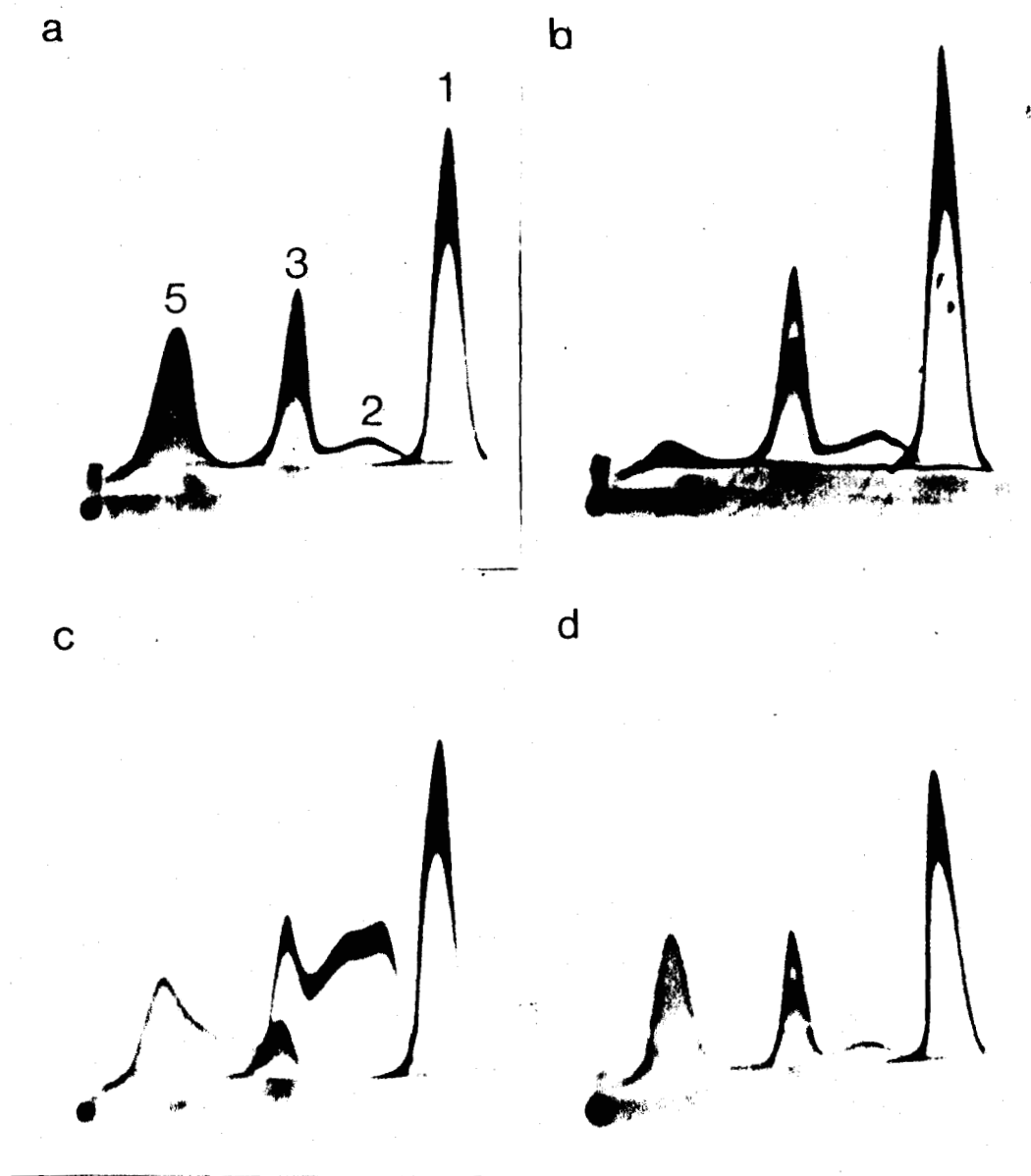


Figure 1 · Autoradiographie des immunoélectrophorèses bidimensionnelles des extraits cytoplasmiques (10 μ l) de cellules infectées :
 (a) par l'adénovirus 2 de type sauvage ; (b) par le H2 ts 125 ;
 (c) par le H2 ts 115 ; (d) par le H2 ts 104. 120 μ l d'immunsérum anti-adénovirus sont incorporés dans l'agarose pour la seconde dimension.

1 : Hexon ; 2 : base du penton ; 3 : penton (base + fibre)

5 : Fibre



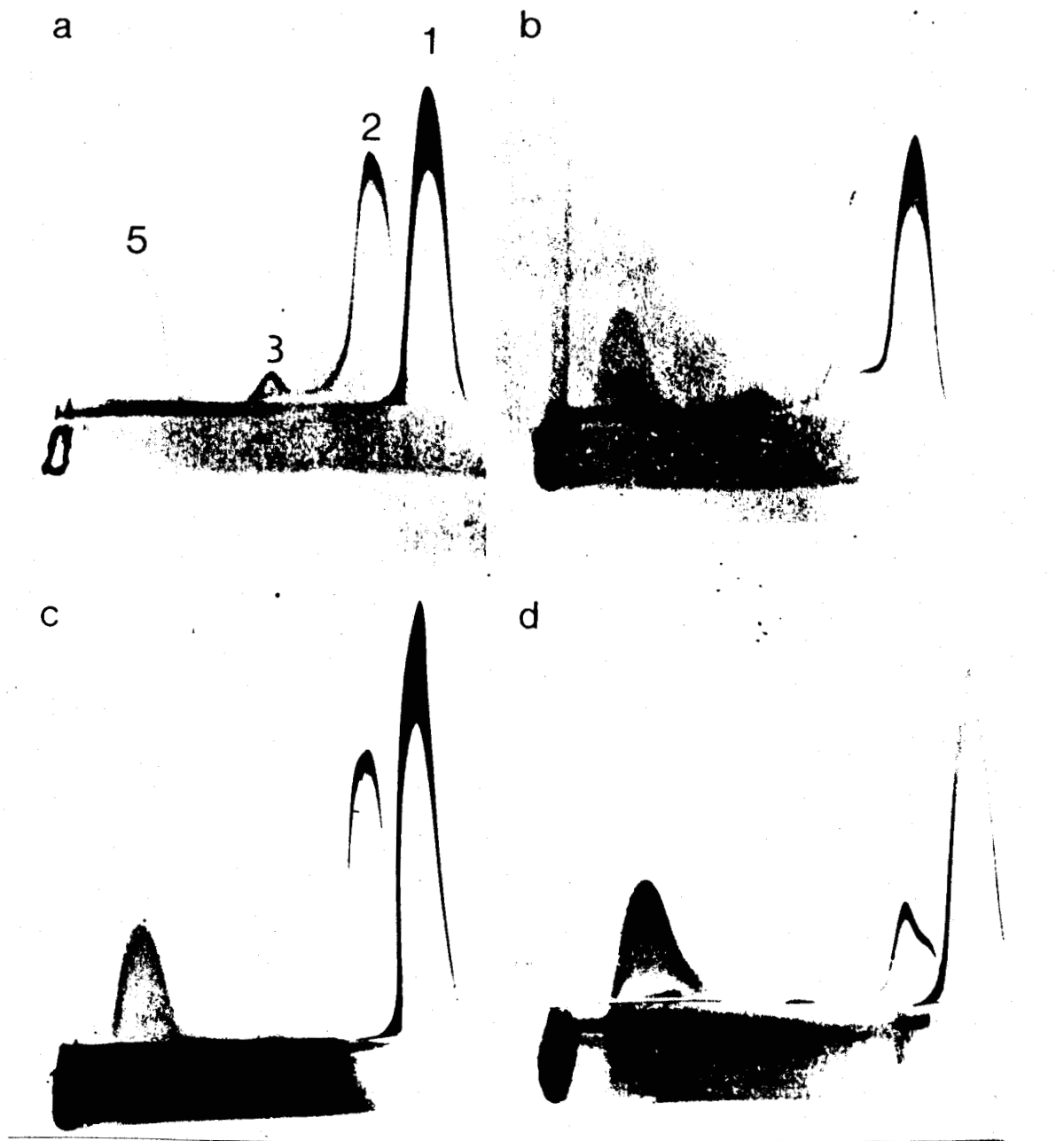


Figure 2 : Autoradiographie des immuno_électrophorèses bidimensionnelles des extraits nucléaires (20 μ l) de cellules infectées par a) l'adénovirus 2 ; b) le H2 ts 125 ; c) le H2 ts 115 ; d) le H2 ts 104. 20 μ l d'immunsérum anti_adenovirus 2 sont incorporés à l'agarose pour la seconde dimension.

1) Hexon ; 2) base du penton ; 3) penton ; 5) fibre

penton, en se liant à la fibre excédentaire. Cet assemblage est observé dans l'extrait cytoplasmique, comme dans l'extrait nucléaire. L'assemblage dans les extraits provenant des cellules infectées par le virus de type sauvage est montré figure 3. Le même assemblage est observé dans les fractions cellulaires provenant des mutants.

Le pourcentage de fibre assemblée peut être quantifié par pesée du papier calque, découpé selon le tracé des pics de fibre libre et de fibre assemblée. Après addition de base du penton, le pourcentage de fibre assemblée augmente.

2. Incubation avec un excès de fibre purifiée (Fwt).

a - Avec des extraits cellulaires obtenus à 32°

Quand les extraits cytoplasmiques et nucléaires, des cellules infectées par l'adénovirus 2 de type sauvage sont incubés 20 heures à 4°, avec de la fibre purifiée de l'adénovirus 2 du type sauvage, il n'y a pas augmentation du pic du penton.

De même avec les extraits des cellules infectées par les mutants, il y a peu ou pas de formation de nouvelles molécules de penton après incubation avec de la fibre Fwt, sauf pour l'extrait cytoplasmique de cellules infectées par le H2 ts 125, quand la base libre est synthétisée en excès par rapport à la fibre. Dans ce dernier cas, il y a assemblage. Pour rendre compte de la formation de nouvelles molécules de penton, autrement que par l'augmentation du pic correspondant en immuno-électrophorèse bidimensionnelle, nous avons incubé cet extrait, non marqué, avec de la fibre Fwt, marqué à la valine ^{14}C . Par autoradiographie de la plaque d'électrophorèse, on voit de la radioactivité dans le pic de fibre libre comme dans le pic du déterminant fibre du penton.

Cet assemblage entre la base et la fibre a également été démontré par immuno-précipitation. A l'extrait du H2 ts 125, incubé avec la fibre Fwt, valine ^{14}C , on ajoute des anticorps dirigés contre la base du penton. L'immunoprécipité est adsorbé sur *S. Aureus*. Après dénaturation, le complexe est analysé sur gel de polyacrylamide-SDS : seule, la fibre du penton nouvellement formé apparaît sur l'autoradiographie.

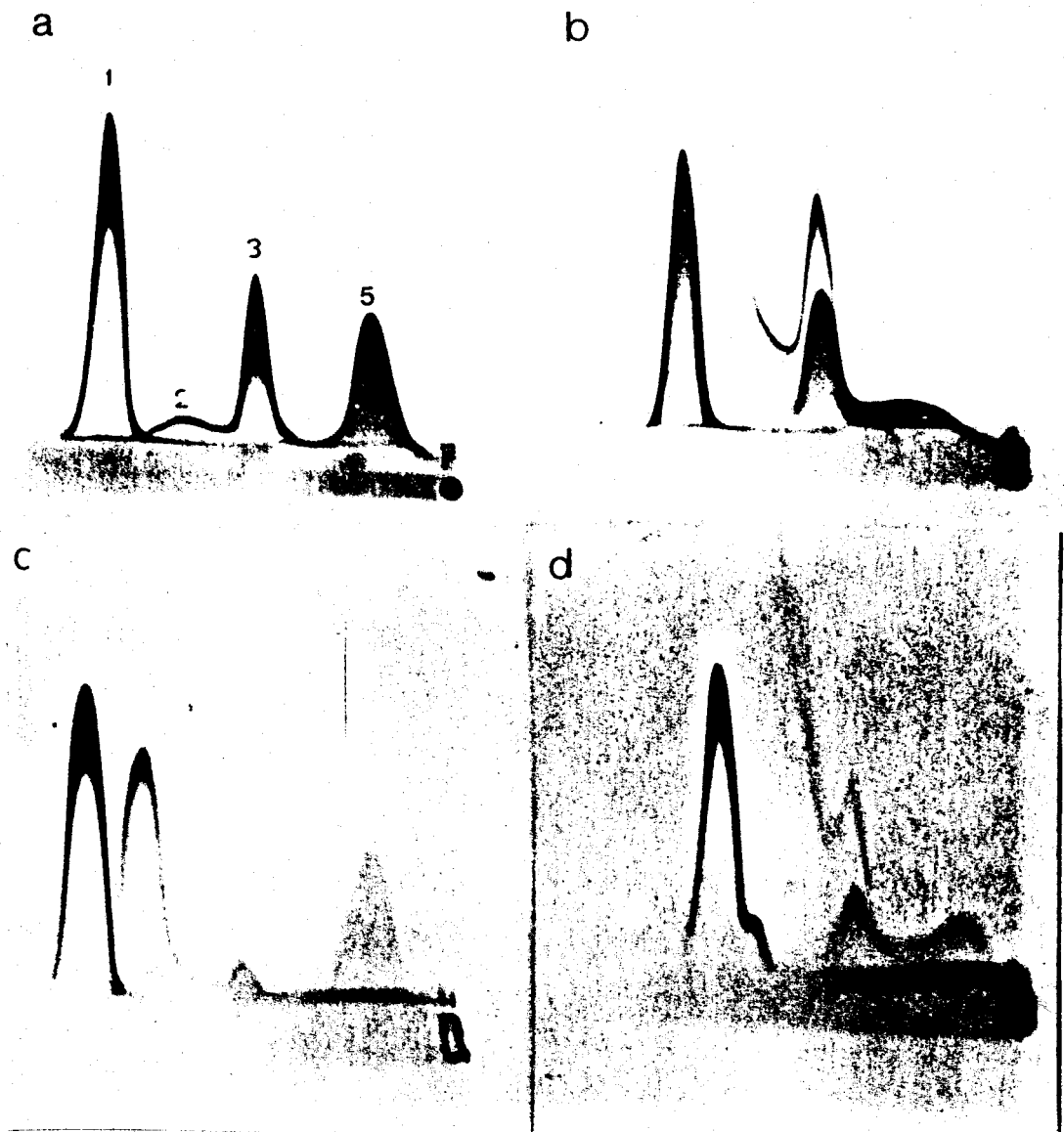


Figure 3 : Assemblage en penton par addition d'un excès de base du penton du H2 ts 125 (BP_{125}) dans les extraits de cellules infectées par le virus de type sauvage.

a) et b) cytoplasme : 10 μ l ; Immunsérum anti-adénovirus 120 μ l.

c) et d) noyaux 20 μ l ; Immunsérum anti-adénovirus 20 μ l.

b) et d) addition de 2,5 μ g de BP_{125} .

On observe l'augmentation du pic du penton, et diminution du pic de fibre en b) et d). Le pic de base du penton est moins visible à cause de l'excès de base ajouté.

1) Hexon ; 2) base du penton ; 3) penton

5) fibre

b - avec des extraits cellulaires obtenus à 39°.

Ces mêmes expériences ont été faites avec des extraits obtenus à 39°.

Pour les extraits obtenus à partir de cellules infectées par l'adénovirus 2, de type sauvage, les profils obtenus sont identiques à ceux obtenus à 32°.

Pour les extraits obtenus par l'infection des mutants, il n'y a plus de fibre synthétisée et donc pas de penton. Dans ces conditions, la base du penton de l'extrait total du H2 ts 125, comme celle de l'extrait total du H2 ts 104 s'assemble après incubation avec la fibre du type sauvage (Fwt) (fig. 4). La base du penton obtenue à 39° est donc capable de s'assembler avec de la fibre ajoutée à l'extrait.

C - Assemblage "in vitro" du penton, à partir de ses deux protéines purifiées : base et fibre .

1 - Assemblage entre la base du penton du H2 ts 125 (BP 125) et la fibre de l'adénovirus 2 (Fwt) .

La fibre Fwt et la base BP₁₂₅, mélangées, sont incubées 20 heures, à 4°. En immunodiffusion bidimensionnelle, on observe un pic correspondant au penton (fig. 5a). Si la fibre est marquée à la valine ¹⁴C, la radioactivité se retrouve au niveau du pic de fibre excédentaire et au niveau du déterminant fibre du penton. (fig. 5d).

Par un excès de fibre, on élimine le pic de base et par un excès de base on élimine le pic de fibre (Fig. 5 b,c).

2 - Assemblage entre la base du penton du H2 ts 115 et la fibre Fwt .

Aucun assemblage n'est décelé en immuno-électrophorèse bidimensionnelle, après incubation de la base du H2 ts 115 et de la fibre de l'adénovirus 2 de type sauvage.

3 - Assemblage entre la base du penton du H2 ts 125 (BP125) et la fibre du même mutant (F125).

De même, l'incubation de la base du H2 ts 125 et de la fibre, de ce même mutant, synthétisée à 32°, ne donne pas naissance à des molécules de pentons.

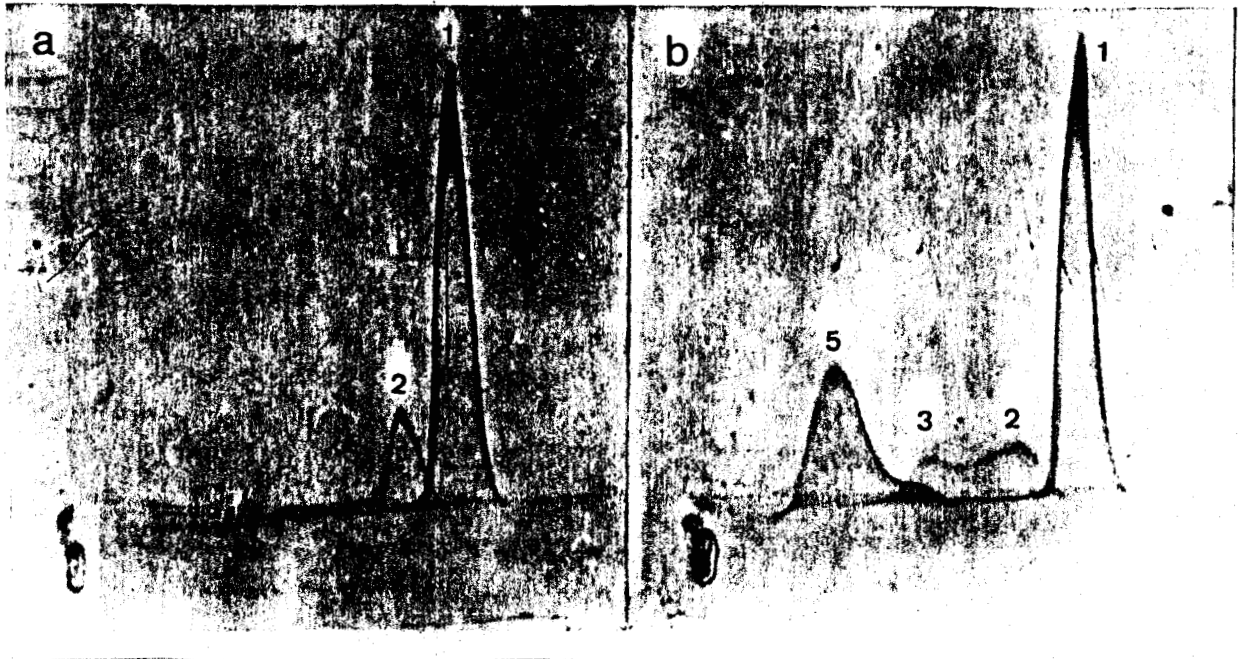


Figure 4 : Assemblage dans un extrait cellulaire (20 μ l) (cytoplasme + noyau) de cellules infectées par le H2 ts 125 à 39°, par addition de fibre Fwt (4 μ g) en b), 120 μ l d'immunsérum antiadénovirus sont incorporés à la gélose en seconde dimension.

1) Hexon ; 2) base ; 3) Penton ; 5) fibre

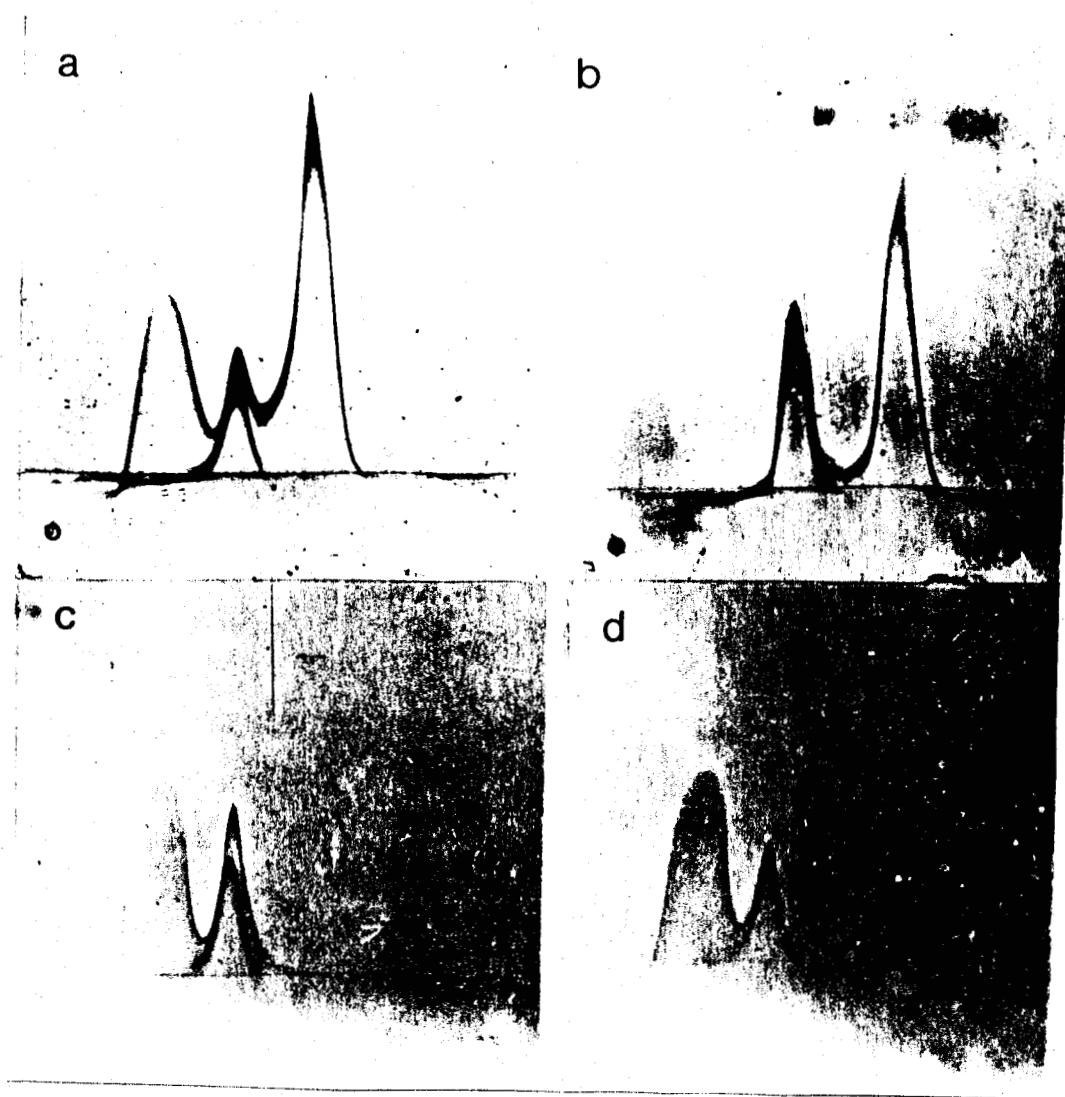


Figure 5 : Assemblage en penton, de la base du penton (BP_{125}) et de la fibre (Fwt) purifiées. Le penton formé est détecté par immuno-électrophorèse bidimensionnelle (immunsérum anti-Ladénovirus 2 : 120 μ l) :

- a) BP_{125} 3,3 μ g ; Fwt 3,2 μ g.
- b) BP_{125} 3,3 μ g ; Fwt 2,3 μ g.
(toute la fibre est assemblée)
- c) BP_{125} 1,6 μ g ; Fwt marquée à la valine ^{14}C : 8 μ g
(toute la base est assemblée)
- d) autoradiographie de la plaque c)

D . Recherche des conditions d'assemblage .

1 . Modification des conditions de l'assemblage "in vitro" , hors des extraits cellulaires .

a - Modification du milieu .

→ le pH .

Le milieu d'incubation est amené à différents pH : pH 5,5, pH 6,8 ; pH 8,2, par des tampons phosphates. Le pH 5,5 étant inférieur aux pHi des protéines étudiées, le pH 6,8, voisin de la neutralité, étant utilisé comme tampon de référence et le pH 8,2, nettement supérieur aux pHi. Aucune modification n'apparaît dans l'assemblage, aux différentes conditions de pH utilisées.

→ la force ionique .

La base du penton et la fibre sont incubées dans les conditions suivantes : 0,1 M ; 0,2 M et 0,3 M NaCl en tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 6.8.. Aucune modification dans l'assemblage n'est observée dans ces différentes conditions.

b - Modification des protéines avant assemblage .

→ Pré-incubation de la fibre avec un sérum anti-fibre de l'adénovirus .

La fibre possède deux groupes de déterminants antigéniques (VALENTINE et PEREIRA, 1965) : les déterminants spécifiques de type, situés au niveau de la sphérule, les déterminants spécifiques de sous-groupe, le long de la tige.

Si la partie de la fibre qui réagit avec la base contient des déterminants spécifiques de sous-groupe ou si ceux-ci sont situés à proximité de la zone d'assemblage, la fibre complexée aux anticorps spécifiques de sous-groupe, devrait s'assembler avec une efficacité moindre que la fibre libre.

La fibre du virus de type sauvage, incubée 20 h à 4°, avec des anticorps dirigés contre la fibre de l'adénovirus de type 5, s'assemble avec la base avec une efficacité égale à celle de la fibre libre, non complexée avec les anticorps.

→ hydrolyse enzymatique de la fibre .

Nous avons recherché quelle extrémité des chaînes polypep-

tidiques était impliquée dans l'assemblage.

Dans ce but, nous avons traité la fibre à la carboxypeptidase Y ou à l'amino-peptidase M, avant de l'incuber avec de la base du penton. Les deux enzymes employés sont des exopeptidases, la première agissant à partir de l'extrémité C terminale, la seconde à partir de l'extrémité N terminale, et ne sont pas arrêtées par un résidu de proline. Les solutions enzymatiques sont employées en rapport enzyme-substrat de 1%.

L'action de l'aminopeptidase M sur la fibre n'influe pas sur le taux d'assemblage.

La fibre native traitée à la carboxypeptidase Y, bien qu'encore antigénique, ne s'assemble plus avec la base (fig. 6 a). L'action de l'enzyme est arrêtée par addition de PMSF (fluorure de phényle méthyle sulfonyle), avant d'ajouter la base du penton. L'hydrolyse de la fibre par la carboxypeptidase Y semble donc inhiber l'assemblage avec la base du penton. De plus, en gel de polyacrylamide-SDS (fig. 6 c), on voit que la chaîne polypeptidique de la fibre, traitée par la carboxypeptidase Y, perd 2000 à 3000 de poids moléculaire. L'aminopeptidase M n'a aucun effet, mais on sait que l'extrémité N terminale de la chaîne polypeptidique de la fibre est bloquée par N acétylation.

2. Protéolyse du penton, intact ou dissocié en ses deux sous-unités.

Puisque l'action de la carboxypeptidase Y semble empêcher tout assemblage entre la base et la fibre, nous avons comparé l'hydrolyse par cet enzyme, du penton natif et du penton traité au DOC, le DOC dissociant la base et la fibre (BOUDIN *et al.*, 1979). La carboxypeptidase Y est employée au rapport enzyme-substrat de 2%. Nous avons prélevé des échantillons à différents temps de l'hydrolyse. L'action enzymatique est arrêtée par dénaturation, à 100°, en milieu SDS, mercaptoéthanol, urée. Les produits de la digestion enzymatique sont analysés sur gel de polyacrylamide-SDS (fig. 7).

La cinétique de dégradation de la base est la même, qu'elle soit

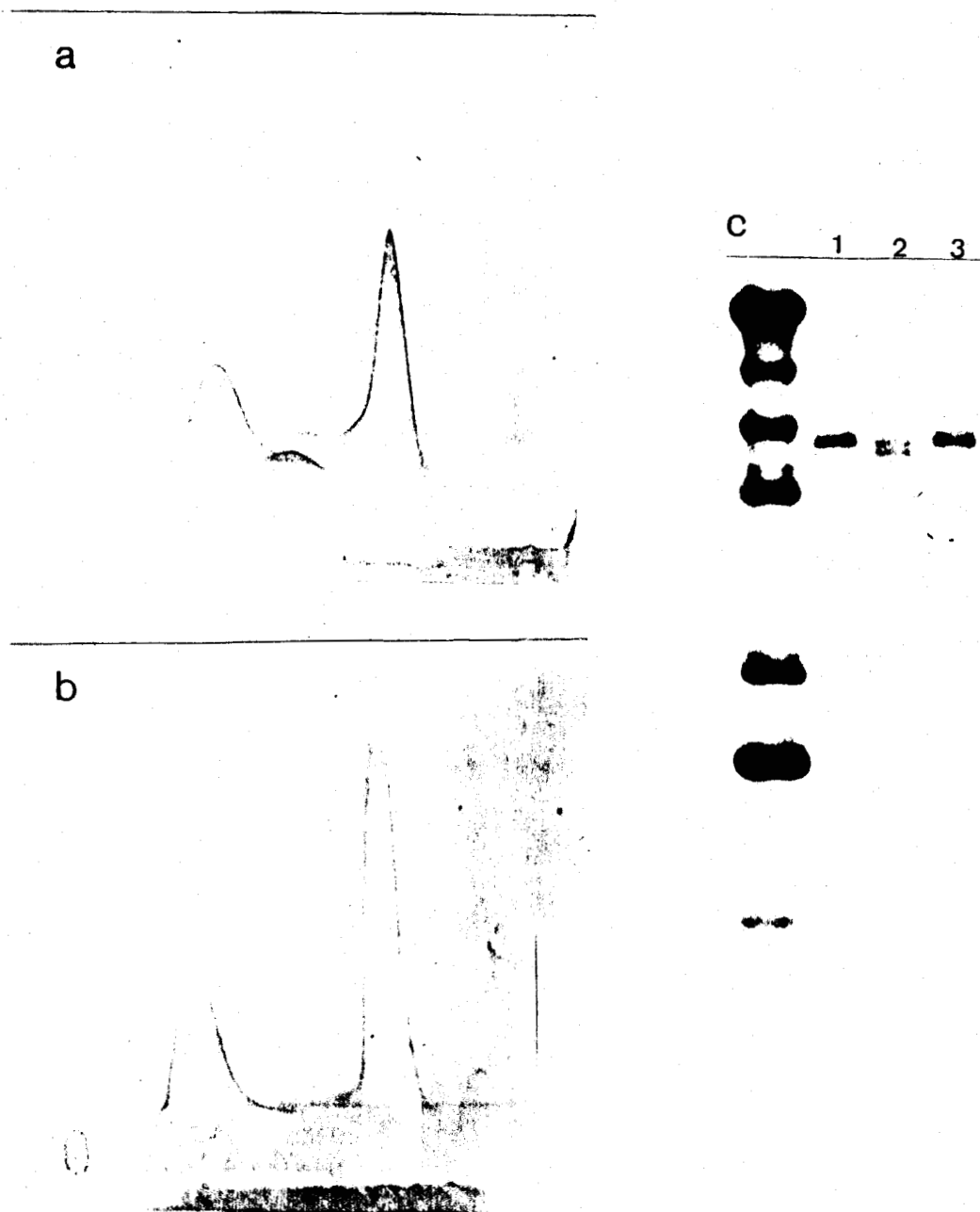


Figure 6 : Inhibition de l'assemblage entre la base du penton BP₁₂₅ (3 µg)

et la fibre Fwt (4 µg), par digestion de la fibre par la carboxypeptidase Y :

a) fibre native ; b) fibre hydrolysée par l'enzyme, Immunsérum : 100 µl

c) gel de polyacrylamide-SDS . 1 - fibre native ; 2 - fibre traitée à la carboxypeptidase Y ; 3 - fibre traitée à l'aminopeptidase M.

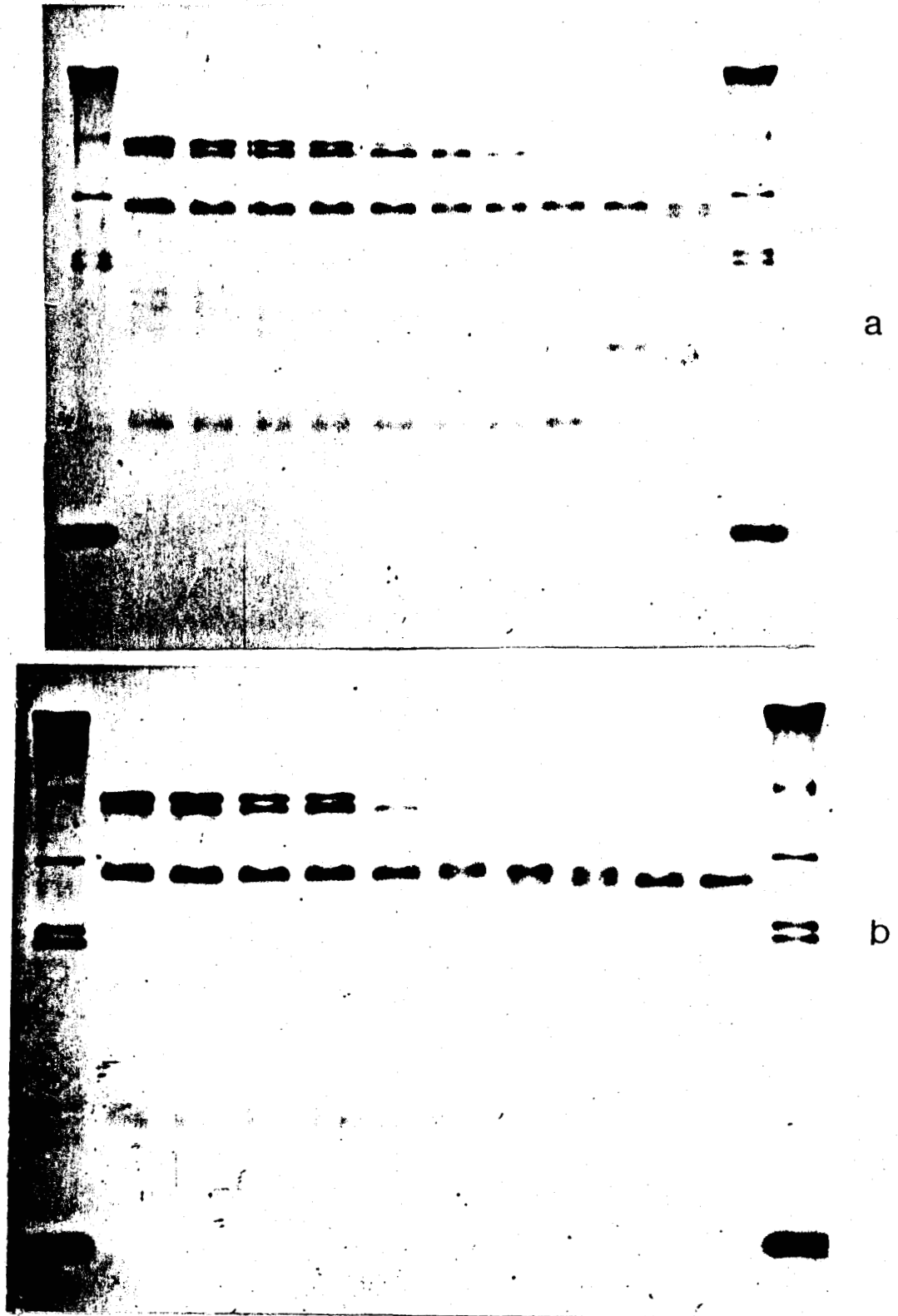


Figure 7): Hydrolyse par la carboxypeptidase Y du penton, natif en a) et dissocié au DOC en b).

Les temps d'hydrolyse sont, de gauche à droite, de 1 mn, 2 mn, 5 mn, 10 mn, 30 mn, 1 heure, 2 heures, 4 heures, 8 heures et 24 heures.

associée ou non à sa fibre. La digestion de la fibre diffère suivant qu'elle est associée ou non à la base :

- toute la fibre est hydrolysée dès la 8^{ème} heure quand la fibre est séparée du penton. Près de la moitié de la fibre est déjà hydrolysée à la 2^{ème} heure.
- quand la fibre est encore associée à la base, la moitié de la fibre, seulement est hydrolysée au bout de 24 heures.

L'extrémité C terminale des chaînes polypeptidiques de la fibre semblent donc être protégées par la base, dans la molécule de penton.

3. Rôle des chaînes glycaniques de la fibre dans l'assemblage du penton : Etude de la glycosylation de la fibre libre et de la fibre liée à la base du penton.

a - La glycosylation de la fibre.

Par incorporation de glucosamine radioactive, ISHIBASHI et MAIZEL (1974a) ont montré que la fibre de l'adénovirus, incorporée ou non dans le virion, est glycosylée. Il y aurait deux molécules de glucosamine par chaîne polypeptidique. Il n'y a pas d'incorporation de galactose, ni de fucose, ni de mannose. La fibre serait la seule protéine tardive du virus à être glycosylée. Une protéine précoce, la E 19K, est aussi glycosylée (ISHIBASHI et MAIZEL, 1974a ; PERSSON et al., 1979).

La fibre purifiée a une migration retardée en immuno-électrophorèse bidimensionnelle quand on ajoute à l'agarose, pour la première dimension, de la lectine de lentille (L.C.A.) (fig. 8). Dans ces conditions, le pic de fibre est nettement élargi par rapport au pic de fibre obtenu en l'absence de lectine. Ceci semble traduire une certaine hétérogénéité de la glycosylation de la fibre.

Il était donc permis de se demander si la glycosylation de la fibre, ou le taux de glycosylation, ne pouvait pas conditionner l'assemblage de la base et de la fibre. Dans ce but, nous avons purifié la fibre et le penton complet, marqués à la glucosamine ^{14}C , et analysé les peptides marqués à la glucosamine ^{14}C , obtenus par hydrolyse enzymatique partielle.

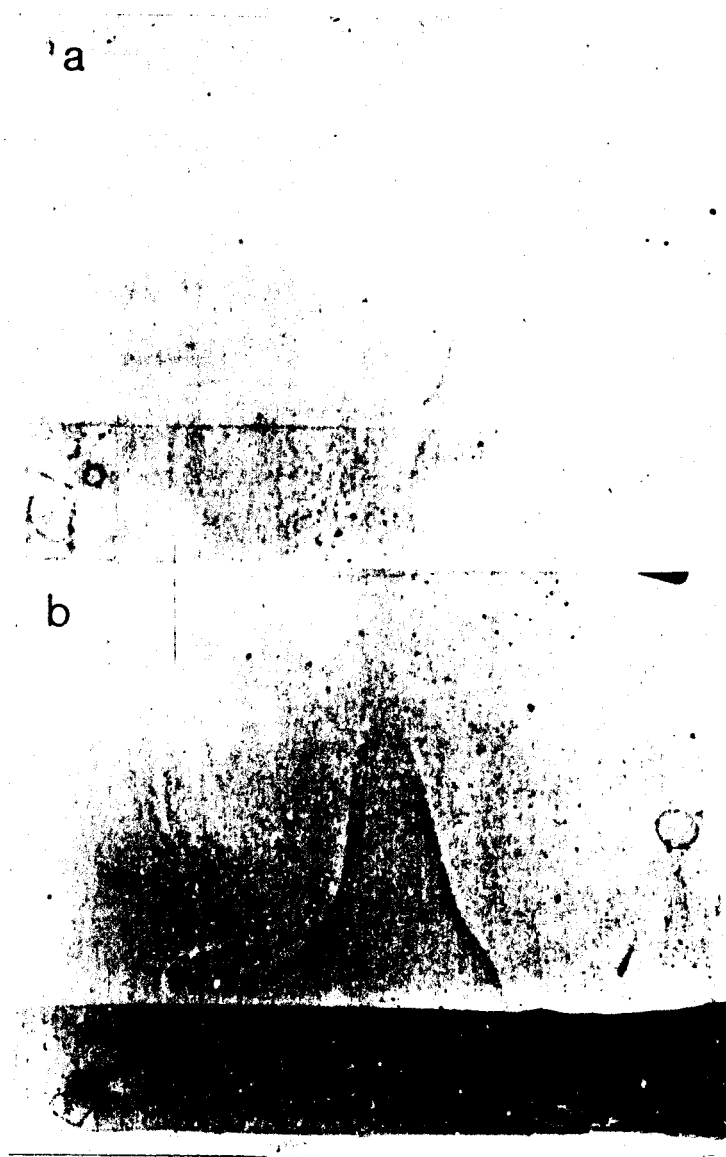


Figure 8: Immuno-affino-électrophorèse de la fibre. Le dépôt de fibre est de 4 µg.

a) plaque témoin en absence de LCA.

b) LCA : 100 µg/ml, pour la première dimension.

On laisse migrer deux heures pour la 1ère dimension. Dans ces conditions, on observe nettement la différence de migration de la fibre, en présence ou en absence de LCA.

b - Hydrolyse enzymatique limitée de la fibre et du penton, marqués à la glucosamine C^{14}

La fibre et le penton, marqués à la glucosamine ^{14}C , ont été dénaturés, à 100° , en milieu SDS-glycérol. Les quantités de pentons complets et de fibre ont été calculées de façon à avoir la même concentration de fibre dans les deux cas, soit $6 \mu g$. Les échantillons sont alors incubés pendant une demi-heure, à 37° , avec respectivement $0,05 \mu g$; $0,01 \mu g$ et $0,25 \mu g$ de chymotrypsine ou de protéase de *S. Aureus* V8. L'hydrolyse enzymatique est arrêtée par chauffage à 100° . Les échantillons sont alors analysés sur gel de polyacrylamide-SDS (20% acrylamide). L'autoradiographie du gel (fig. 9) montre que les polypeptides marqués sont identiques pour la fibre libre et celle du penton. Les concentrations d'enzymes utilisées sont les mêmes pour les solutions de fibre libre et celle de penton; le rapport enzyme-substrat est donc différent, le penton étant constitué de base et de fibre. Ceci peut donc expliquer le retard observé dans l'apparition des produits de clivage du penton traité à la chymotrypsine.

c - Hydrolyse par la carboxypeptidase Y de la fibre - glucosamine C^{14}

Puisque l'extrémité C terminale des chaînes polypeptidiques de la fibre semble être impliquée dans l'interaction avec la base, nous avons traité à la carboxypeptidase Y la fibre marquée à la glucosamine ^{14}C . Le gel de polyacrylamide-SDS montre le changement de poids moléculaire des chaînes polypeptidiques, mais le marquage persiste. Les chaînons glycaniques ne seraient pas localisés au voisinage de l'extrémité C terminale des chaînes (du moins, pas dans les 20 à 30 résidus d'acides aminés de la chaîne polypeptidique) et n'interviendraient pas directement dans l'assemblage avec la base.

Une autre question était de savoir si la fibre non glycosylée était capable de s'assembler. Nous avons alors étudié la synthèse des antigènes viraux par des cellules infectées en présence de Tunicamycine.

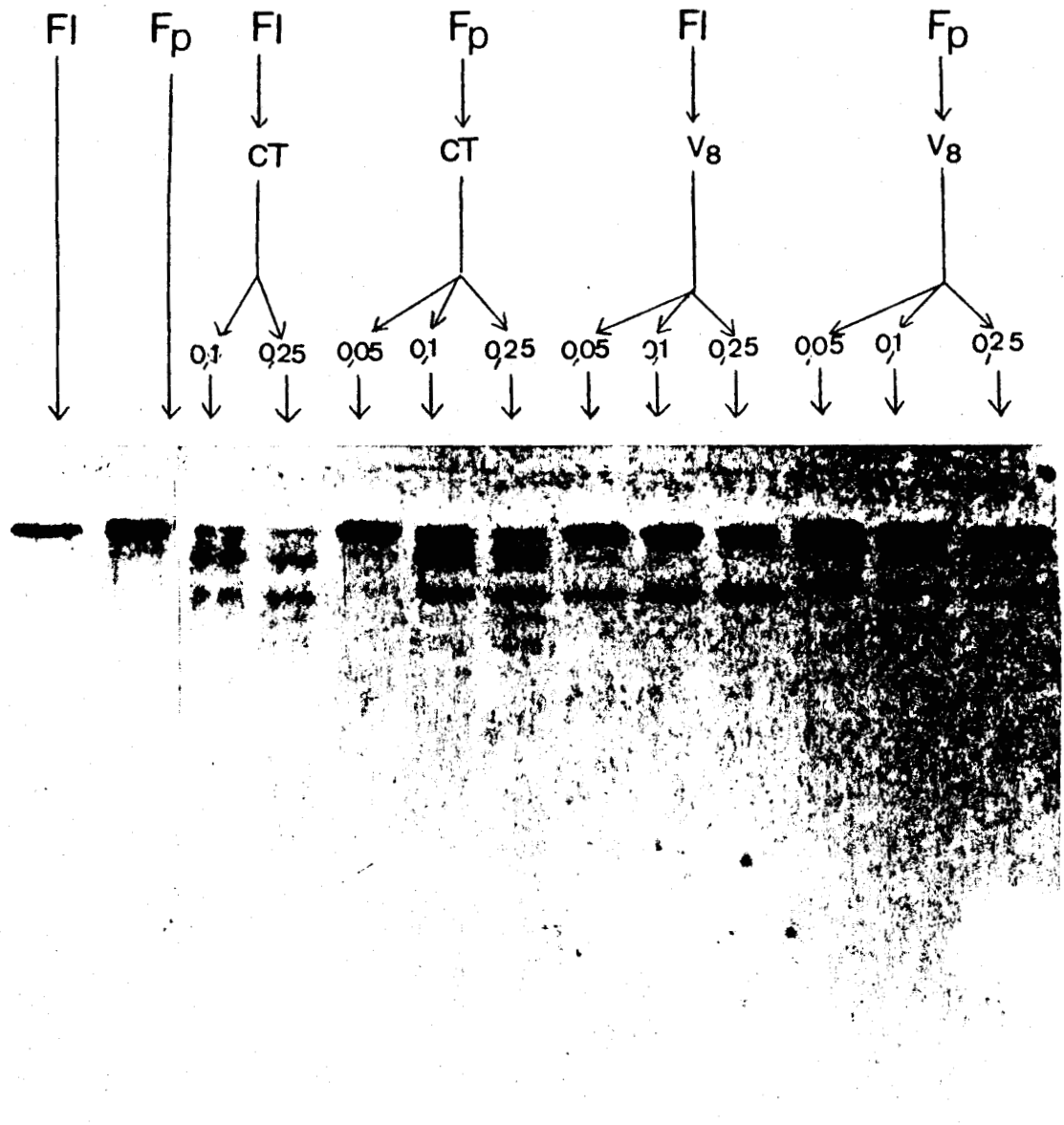


Figure 9 : Comparaison des peptides marqués à la glucosamine ^{14}C , provenant de la digestion enzymatique de la fibre des antigènes solubles (FI) et de la fibre du penton (Fp). Les enzymes utilisés sont la chymotrypsine (CT) et la protéase de *S. Aureus* V8 ; aux doses de 0,05 µg, 0,1 µg et 0,25 µg. Gel polyacrylamide (20%)-SDS.

Etude de l'incorporation de glucosamine radioactive dans la fibre, synthétisée en présence de Tunicamycine

Nous avons ajouté, dans le milieu de culture des cellules HeLa infectées par l'adénovirus 2, de la tunicamycine, à différents temps de l'infection et à différentes doses. La tunicamycine est un antibiotique inhibiteur de la glycosylation (TAKATSUKI et TAMURA, 1971 ; SCHWARTZ *et al.*, 1976). Elle inhibe spécifiquement la N glycosylation.

La tunicamycine a été ajoutée à 1 heure, 8 heure et 19,30 heure après infection, aux doses de 2,5 µg/ml et 5 µg/ml. 50 µCi de glucosamine ³H est ajoutée à la 21^{ème} heure après l'infection. Les cellules sont recueillies à la 24^{ème} heure. La radioactivité des différents échantillons est rapportée dans le tableau 1 (20 µl de chaque échantillon sont précipités au TCA et déposés sur filtre pour le comptage.)

		Tm ajoutée à:	
		2,5ug/ml	5ug/ml
cellules non infectées		17154 cpm	
témoin sans tunicamycine		10403 cpm	
cellules infectées	Tm ajoutée → 1h post infection	2913 cpm	2134 cpm
	→ 8 h post infection	3781 cpm	4177 cpm
	→ 20 h post infection	8256 cpm	9756 cpm

Tableau 1 :

L'incorporation de la glucosamine radioactive, par rapport aux cellules témoins infectées en absence de tunicamycine, est réduite de :

- 4 fois, quand la tunicamycine est ajoutée à la première heure post-infection.
- 2,5 fois, quand elle est ajoutée à la 8^{ème} heure (c'est-à-dire au début de la phase tardive).
- 1,2 fois, quand elle est ajoutée à la 20^{ème} heure post-infection.

L'autoradiographie du gel montre une diminution de la radioactivité au niveau de la fibre. L'inhibition de la glycosylation de la fibre de l'adénovirus 2 par la tunicamycine est donc fonction de la période du cycle viral. L'antibiotique est beaucoup plus efficace quand il est ajouté au début de l'infection. Il est impossible de dire si la réduction de la glycosylation de la fibre est due :

- à un effet direct de la tunicamycine sur la glycosylation de la fibre. Dans ce cas, la durée de l'action de la tunicamycine intervient.
- à une conséquence de la non-glycosylation de la protéine précoce glycosylée, la E 19 K, ou de protéines cellulaires
- ou si l'absence d'effet de la tunicamycine sur la glycosylation de la fibre après la 8^{ème} heure n'est pas due, simplement, à un changement de la perméabilité de la membrane cellulaire au cours de l'infection.

L'analyse en électrophorèse bidimensionnelle de ces extraits permet d'observer la formation du penton. Le taux de penton complet est à peu près constant par rapport à l'extrait obtenu, en absence de tunicamycine, même quand celle-ci est ajoutée à la première heure après infection : la fibre semble donc capable de s'assembler en présence d'un inhibiteur de la N glycosylation.

Production des antigènes à 32° C					Phénotype à 39°
	HX	BP	P	F	
Ad ₂ wt	+++	+	++	++	(WT)
H2 ts 125	+++	+	++	±	F (-)
H2 ts 115	+++	+++	±	++	F (-)
H2 ts 104	+++	+	++	++	P (-)

Tableau 2

Comparaison du profil des extraits cytoplasmiques de cellules infectées par différents mutants, obtenus par immuno-électrophorèse bidimensionnelle.

On constate que, même à température permissive (32°), le penton du H2 ts 115 s'assemble mal et que pour le H2 ts 125, il y a peu ou pas de fibre synthétisée en excès.



Discussion.

Le penton est l'un des composants majeurs de l'adénovirus (VALENTINE, PEREIRA, 1965). On le trouve dans le virion et à l'état "soluble", c'est à dire non incorporé dans les particules virales.

Dans les fractions cytoplasmiques des cellules infectées par le virus de type sauvage, l'analyse immuno-électrophorétique bidimensionnelle révèle l'hexon, le penton complet (base + fibre), la base du penton et la fibre à l'état libre. La fibre et la base du penton pourraient donc s'assembler en penton dans le cytoplasme, avant d'être transportées au noyau.

Nous avons, dans les mêmes conditions, infecté des cellules à 32°, température permissive, par des mutants thermosensibles fibre (-) (H2 ts 115 et H2 ts 125), ou par des mutants pour lesquels le taux de fibre et de base sont diminuées, le H2 ts 104 (penton (-)). Les fractions cytoplasmiques de ces cellules sont comparées avec celle obtenue après infection par le virus de type sauvage. Un tableau comparatif est présenté (tableau 2).

La réponse des cellules infectées par le H2 ts 104 est à peu près identique à celles infectées par le virus de type sauvage.

Dans les fractions cytoplasmiques des cellules infectées par le H2 ts 115, on observe une accumulation de la base du penton libre. Le pic est large et hétérogène. Ceci correspond vraisemblablement à une dégradation de la base. La base est une protéine fragile, facilement protéolysée. La base du H2 ts 115, même à une température permissive serait encore plus fragile que celle du type sauvage. Le taux de fibre synthétisée est comparable à celui des extraits des cellules infectées par le virus de type sauvage. L'aptitude de ces deux protéines à s'assembler semble plus faible que celles du virus de type sauvage.

Les cellules synthétisent moins de fibres quand elles sont infectées par le H2 ts 125, que lors de l'infection par le virus de type sauvage. La fibre du H2 ts 125 est parfois synthétisée en défaut par rapport au taux de base du penton : il n'y a pas de fibre libre, celle-ci se trouve entièrement assemblée en penton. L'assemblage entre la base et la fibre du H2 ts 125 semble aussi

	Extraits obtenus à 32°		Extraits obtenus à 39°	
	Addition de	Addition de	Addition de	Addition de
	Fwt	BP ₁₂₅	Fwt	BP ₁₂₅
(1) C/ WT	-	+	-	+
(2) N/WT	-	+	-	+
(1) C/ts 125	+	+	+	
(2) N/ts 125	-	+		
(1) C/ts 115	-	+	±	
(2) N/ts 115	-	+		
(1) C/ts 104	-	+	+	
(2) N/ts 104	-	+		

Tableau 3

Incubation "in vitro" dans les extraits de cellules infectées par le virus de type sauvage ou par les mutants H2 ts 125, H2 ts 115 et H2 ts 104, par addition d'un excès de base du penton (BP₁₂₅) ou de fibre (Fwt).

- (1) C : cytoplasme des cellules infectées
(2) N : noyau des cellules infectées



efficace que pour le virus du type sauvage, en dépit du fait que la chaîne polypeptidique unitaire de la fibre de ce mutant soit de plus faible poids moléculaire que celle du type sauvage (D'HALLUIN et al., 1979).

Dans les extraits nucléaires des cellules infectées à 32°, on ne retrouve pas ou très peu de penton complet. L'infection des cellules est arrêtée à la 72^{ème} heure (ceci correspond à une infection de 24 h à 37°) pour obtenir une synthèse maximum des composants solubles, avec une incorporation minimum dans le virus. Il n'y a pas de penton complet bien que la base du penton et la fibre soient en excès. Plusieurs explications sont possibles :

- soit une fuite préférentielle, du penton non incorporé dans le virus, du noyau vers le cytoplasme, lors du fractionnement cellulaire, ce qui semble peu probable .
- soit une accumulation du penton dans le cytoplasme, avant un transport massif plus tardif dans le cycle viral. Cependant nous n'avons jamais observé de différences significatives dans les taux de penton du cytoplasme au cours de la phase tardive du cycle.
- soit, plus vraisemblablement, une incorporation rapide dans les virions intranucléaires des pentons transportés au nucléoplasme. En faveur de cette hypothèse, plaide le fait que l'on trouve du penton dans les intermédiaires d'assemblage très précoces, comme les particules sans DNA, de densité 1,315 en CsCl (D'HALLUIN et al., 1978). Le penton ne vient pas réaliser la "fermeture" de la capsid de l'adénovirus. Il est présent au stade de la morphogénèse et il semble bien que la capsid reçoive son contenu en DNA par un orifice, situé sur une face de l'icosaédre (LEMAY et BOULANGER, communication personnelle).

Pour évaluer la capacité de la base du penton et de la fibre, synthétisées en excès lors de l'infection, à s'assembler en penton, nous avons ajouté à ces extraits soit de la base du penton purifiée du H2 ts 125, soit de la fibre (Fwt) (tableau 3).

La base BP125, ajoutée aux différents extraits, cytoplasmiques ou nucléaires, obtenus à 32°, s'assemble avec la fibre excédentaire de ces extraits. Cet assemblage est observé aussi dans l'extrait de cellules

infectées par le H2 ts 115, pour lequel l'assemblage des deux protéines semble "in vivo" plus difficile que pour les autres virus étudiés. Le défaut d'assemblage en penton du H2 ts 115 pourrait provenir d'une modification de la base, qui semble plus sensible à la dégradation que celle du virus du type sauvage. L'addition de fibre de type sauvage dans ces mêmes extraits n'augmente pas , la quantité de penton complet de l'extrait.

Dans les extraits cytoplasmiques, en général, la base excédentaire est en faible quantité par rapport au penton, et ne s'assemble pas après addition de fibre, sauf dans les extraits cytoplasmiques du H2 ts 125 pour lesquels il n'existe pas de fibre libre. Dans ce cas, la base semble être synthétisée en excès et peut être assemblée.

Dans les extraits nucléaires, la base du penton, plus abondante que dans l'extrait cytoplasmique, ne s'assemble pas non plus avec la fibre ajoutée. Puisque dans ces extraits : (1) il existe un excès de base et de fibre ; (2) que la fibre en excès est capable de s'assembler en présence de la base du H2 ts 125 ; (3) et que la base ne s'assemble pas avec un surplus de fibre du virus du type sauvage, la base de l'extrait pourrait être responsable de ce non-assemblage.

La base du penton des extraits de cellules infectées par le H2 ts 125 et H2 ts 104 à 39° est capable de s'assembler après addition dans l'extrait, de la fibre. Ceci exclut l'hypothèse de dégradation de la base au cours du fractionnement cellulaire pour expliquer le non assemblage de la base obtenue à 32°. Il semble que toute la base capable de s'assembler à température permissive est assemblée, et que la base libre soit modifiée et devienne incapable de s'assembler. En outre, une modification de la base pourrait peut-être expliquer la différence de migration observée entre la base des extraits obtenus à 32° et celle des extraits obtenus à 39° ; la base des extraits à 39° migre plus loin vers l'anode (fig. 10) en immuno-électrophorèse bidimensionnelle.

La base du penton du H2 ts 125, obtenue à 39°, et la fibre du virus du type sauvage, purifiées, s'assemblent en penton par incubation du mélange des deux protéines, à 4°, pendant 20 heures (pour permettre un maximum d'assemblage). En modifiant le pH et la force ionique du milieu d'incubation, on n'observe aucune modification du taux d'assemblage, ce qui suggère qu'il s'agit d'une reconnaissance de sites protéiques ou interviennent peu les acides aminés à groupements ionisables. La fibre traitée à la carboxypeptidase Y ne s'assemble plus. Elle reste antigénique puisqu'elle est révélée en immuno-électrophorèse

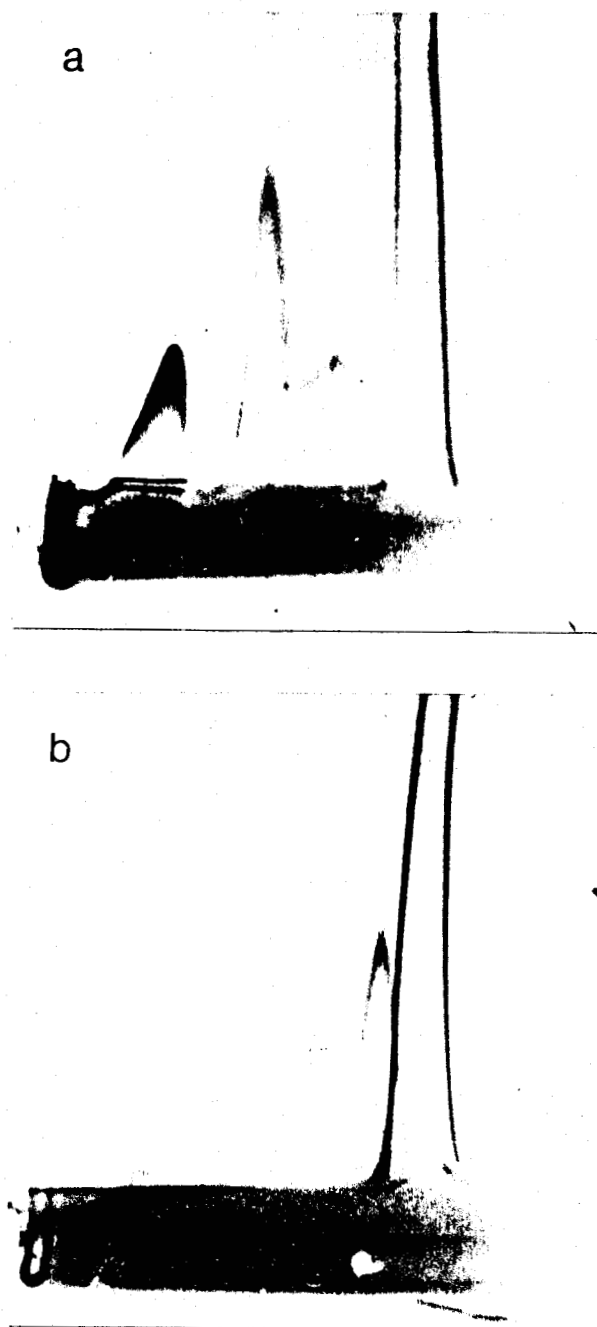


Figure 10 : Différence de migration en immuno-électrophorèse de la base du penton du virus du type sauvage a) et de celle du mutant H2 ts 125, obtenue à 39° b). La première semble incapable de s'assembler avec un excès de fibre, tandis que la seconde s'assemble.

bidimensionnelle. En gel de polyacrylamide, on voit que cette fibre a perdu un fragment de chaîne polypeptidique, de 2000 à 3000 de poids moléculaire.

Ce peptide pourrait être indispensable à l'assemblage et pourrait contenir la partie de la fibre qui interagit avec la base. Ceci semble être confirmé par la cinétique d'hydrolyse du penton complet et du penton dissocié au DOC, par la carboxypeptidase Y. La vitesse de dégradation de la base par l'enzyme est la même que le penton soit dissocié ou non, en DOC. Mais celle de la fibre est beaucoup plus rapide (dès la 2^{ème} heure) quand le penton est dissocié. La base du penton, dans le penton complet, semble donc protéger la fibre de l'action de l'enzyme et celle-ci n'est dégradée qu'au bout de 24 heures à 37°. L'extrémité C terminale des chaînes de la fibre contiendrait donc la séquence d'acides aminés qui assure l'assemblage avec la base, probablement au niveau de la cavité centrale, vue au microscope électronique (PETERSSON, HOGLUND, 1969 ; BOUDIN *et al.*, 1979).

Cette extrémité C terminale ne semble pas contenir de chaînes glycaniques: la fibre marquée à la glucosamine ¹⁴C, traitée à la carboxypeptidase Y, reste radioactive malgré une perte de 2000 à 3000 de poids moléculaire. La partie glycanique ne semble pas intervenir dans l'assemblage entre la base et la fibre.

De plus, l'addition de tunicamycine, dans le milieu de culture des cellules infectées, n'empêche pas l'assemblage de la fibre avec la base du penton, même quand l'antibiotique est ajouté au stade précoce de l'infection. Ceci suggère que les résidus de sucre n'interviennent probablement pas dans l'assemblage : ni dans le site d'assemblage, ni comme signe de reconnaissance des fibres capables de s'assembler.

Nous avons alors comparé les peptides radioactifs, obtenus par digestion par la chymotrypsine ou par la protéase de *S. Aureus* V8, de la fibre libre et de la fibre du penton, marquées à la glucosamine ¹⁴C. Les mêmes peptides sont obtenus. Il y aurait donc le même nombre de sites de glycosylation dans les 2 cas.

L'effet de la tunicamycine sur le marquage de la fibre fait penser que la liaison sucre-protéine est de nature N glycosydique. La liaison N glycosidique est retrouvée généralement dans les glycoprotéines virales. Pour vérifier

	BP ₁₂₅	BP ₁₁₅
Fwt	+	-
F ₁₂₅	-	NT*

Tableau 4

Assemblage "in vitro" du penton par incubation de la base du penton et de la fibre purifiée. La base du penton est extraite des composants solubles du H2 ts 125 ou du H2 ts 115, obtenus à température non permissive (39°). La fibre est purifiée des composants solubles du virus de type sauvage cultivé à 37° ou du H2 ts 125, cultivé à température permissive (32°).

* NT : Non Testé

la nature de cette liaison, nous avons étudié en milieu alcalin la stabilité de cette liaison. Différentes concentrations de soude sont employées, variant de 1 mN à 500 mN. Les échantillons sont laissés 1 h à 37°. En gel de polyacrylamide-SDS, on constate que la radioactivité due à la glucosamine de la fibre marquée disparaît à la même vitesse que la radioactivité polypeptidique. L'hydrolyse de la partie glycanique ne semble pas être favorisée par rapport à l'hydrolyse de la chaîne protéique. Ceci confirmerait une liaison N glycosidique. La labilité en milieu alcalin de la chaîne protéique de la fibre peut s'expliquer par sa richesse en sérine et thréonine (22% au total).

"In vitro", hors des extraits cellulaires, on observe l'assemblage en penton de la base et de la fibre, purifiées. Les résultats des incubations faites avec différentes bases et différentes fibres sont résumés dans le tableau 4. L'assemblage en penton est obtenu avec la fibre du virus du type sauvage et la base du penton du H2 ts 125, mutant pour lequel la formation du penton, à 32°, est normale comparativement au taux du penton des composants solubles du virus de type sauvage. La base du H2 ts 115 purifiée ne s'assemble pas avec la fibre du virus du type sauvage. Ceci confirme la mauvaise capacité de cette base à s'assembler même "in vivo", à température permissive.

La fibre du H2 ts 125 a été purifiée. Elle ne s'assemble pas "in vitro" avec la base extraite des composants solubles du H2 ts 125. "In vivo" l'assemblage a lieu, mais cette fibre a perdu une vingtaine d'acides aminés par rapport à la fibre du sauvage.

Toutes ces expériences n'excluent pas la possibilité d'existence d'un facteur nécessaire à l'assemblage de la base et de la fibre, ou au maintien de la structure assemblée.

Si ce facteur existe, il serait élué avec la fibre ou avec la base, au cours de leur purification bien qu'il ne soit pas visible en gel de polyacrylamide-SDS. On ne peut pas dire non plus, si la base libre des extraits cellulaires ne s'assemble pas parce qu'elle est modifiée ou si la base est dégradée parce qu'elle ne s'assemble pas.

L'assemblage de la base et de la fibre a été suivi par immuno-électrophorèse bidimensionnelle, méthode qui permet de détecter directement la formation de penton. L'autoradiographie de plaques sur lesquelles est déposée de la fibre radioactive, incubée avec de la base ou avec un extrait cellulaire non marqué, montre de la radioactivité au niveau du pic du penton, et donc la

formation de nouvelles molécules. Par autoradiographie de gel polyacrylamide-SDS, on voit que les immun-complexes formés par incubation d'anticorps-antibases de penton avec ces extraits, au préalable incubés avec la fibre, entraînent de la fibre marquée. Ceci est une nouvelle preuve de l'assemblage.

- CONCLUSION -

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à deux des protéines de l'apex de la capsid : le IIIa et la base du penton, et à l'assemblage de la base avec la fibre.

Nous avons isolé le IIIa à partir du virus mature, et à partir des composants solubles du virus. Le IIIa est une protéine monomérique de 65 500 daltons. Le IIIa est sous forme arrondie à l'état isolé, mais sa forme est probablement plus allongée quand il est inséré dans la capsid, expliquant les différences d'antigénicité du IIIa observées entre les intermédiaires d'assemblage et les particules matures. Le IIIa se trouve au voisinage des hexons péripentonaux du V du VII, et peut être du IVa2. Il ya une molécule de IIIa par sous-unité de base du penton. Le IIIa dérive d'un précurseur: le PIIIa, de 67 000 daltons de poids moléculaire. Chez des mutants bloqués, dans l'assemblage du virus, au stade d'intermédiaires, ne renfermant pas de DNA (H2 ts 4 et H5 ts 58), ou seulement un fragment (H2 ts 112), il y a peu d'antigène IIIa à température restrictive. Le IIIa pourrait jouer un rôle dans la maturation du virus.

La base du penton a été purifiée à partir des composants solubles d'un mutant, le H2 ts 125 ou le H2 ts 115, obtenus à température restrictive. Elle est constituée de 5 sous-unités de 85 000, ce qui lui confère un poids théorique de 425 000. L'extrémité N terminale de ses chaînes semble bloquée par N acétylation.

Ces deux protéines : le IIIa et la base du penton sont antigéniques mais ni l'une, ni l'autre n'induisent la formation d'anticorps neutralisant le virus, bien que de tels antigènes soient localisés au niveau de l'apex de la capsid (PHILIPSON, PETERSSON, 1973).

La base du penton des composants solubles du virus est trouvée principalement sous sa forme assemblée. L'assemblage entre la base et la fibre se fait probablement dans le cytoplasme, avant transport aux noyaux comme le montre le fractionnement cellulaire. Il dépendrait peu du pH ou de la force ionique du milieu. L'extrémité C terminale de la fibre serait impliquée dans l'assemblage avec la base.

Le taux de l'assemblage *in vivo* et *in vitro* dépend de l'origine des protéines : si elles proviennent du virus du type sauvage ou de mutants. Puisqu'on observe des variations dans la reconnaissance des sites pour

l'assemblage en penton parmi les mutants d'un seul type de virus, il serait intéressant d'étudier l'assemblage entre la base du penton de l'adénovirus 2 et la fibre de virus d'un type différent, et même d'un sous groupe différent. Par blocage de certains acides aminés, on essaiera de déterminer les résidus impliqués dans l'assemblage du penton. Une étude plus poussée devrait nous permettre de déterminer si l'assemblage de la base et de la fibre dépend ou non d'un facteur d'assemblage viral ou viro-induit.

_ BIBLIOGRAPHIE _

BIBLIOGRAPHIE

Page

ABOUD, M.M., et M.S. HORWITZ, 1979..... Nucl. Ac. Res., <u>6</u> , 1025-1039	13
AKUSJARVI, G., PHILIPSON, L., et U. PETERSSON, 1978..... Virology, <u>87</u> , 276-286	26
ANDERSON, C.W., BAUM, P.R. et R.F. GESTELAND, 1973..... J. Virol., <u>12</u> , 241-252	6, 7, 9, 10 34, 83
ARENS, M., YAMASHITA, T., PADMANABHAN, R., TSURVOT, et M. GREEN, 1977 J. Biol. Chem., <u>252</u> , 7947-7954	13
ARRAND, J. 1978 J. Gen. Virol., <u>41</u> , 573-586	24
AXELROD, N., 1978..... Virology, <u>87</u> , 366-383	26, 83
BERK, A.J. et P.A. SHARP, 1977..... Cell, <u>12</u> , 721-732	10
BOULANGER, P.A., DEVAUX, C. et P. LEMAY, 1978..... Virol., <u>84</u> , 456-468	102
BOULANGER, P.A. et B. HENNACHE, 1973..... Febs Letters, <u>35</u> , 15-18	11
BOULANGER, P.A. et F. PUVION, 1973..... Eur. J. Biochem., <u>39</u> , 37-42	107
BOULANGER, P.A. et F. PUVION, 1974 Eur. J. Biochem., <u>43</u> , 465-470	6
BOULANGER, P.A., LEMAY, P., BLAIR, G.E. et W.C. RUSSEL, 1979..... J. Gen. Virol., <u>44</u> ,	9
CHARDONNET, Y., et S. DALES, 1970a..... Virology, <u>40</u> , 462-477	11
CHARDONNET, Y. et S. DALES, 1970b..... Virology, <u>40</u> , 478-485	11
BHATTI et WEBER, 1979..... Virology, <u>96</u> , 478-479	19



CHOW, L.T. et T.R. BROKER, 1978.....	23
Cell, <u>15</u> , 497-510	
CHOW, L. T., GELINAS, R.E., BROKER, T.R. et J.M. ROBERTS,.....	16
1977a	
Cell, <u>12</u> , 1-8	
CHOW, L.T., LEWIS, J.B., ROBERTS, J.M., PETTERSSON, U. et.....	24
T.R. BROKER, 1977b	
Cell, <u>11</u> , 819-836	
CLEVELAND, D.W., FISCHER, S.G., KIRSCHNER, M.W. et.....	85, 111
U.K. LAEMMLI, 1977	
J. Biol. Chem., <u>252</u> , 1102-1106	
CORDEN, J., ENGELKING, H. et G.D. PEARSON, 1976.....	10
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., <u>73</u> , 401-404	
CRAWFORD, L.V. et D.P. LANE, 1977.....	110
Biochem. Biophys. Res. Commun., <u>74</u> , 323-328	
D'HALLUIN, J.C., MARTIN, G.R., TORPIER, G. et P.A. BOULANGER,.....	18, 20, 86
1978a	
J. Virol., <u>26</u> , 357-363	
D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M., BOULANGER, P.A. et.....	18, 29, 20
G.R. MARTIN, 1978b	132
J. Virol., <u>26</u> , 344-356	
D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M., MARTIN, G.R. et.....	132
P.A. BOULANGER, 1979	
J. Virol., soumis à publication	
DORSETT, P.H. et H.S. GINSBERG, 1975.....	26
J. Virol., <u>15</u> , 208-216	
EDVARDSSON, B., EVERITT, E., JORNVALL, H., PRAGE, L. et.....	6, 18, 19
L. PHILIPSON, 1976	
J. Virol., <u>19</u> , 533-547	
EDVARDSSON, B., U. STACELEBI, S., WILLIAMS, J. et.....	83
L. PHILIPSON, 1978	
J. Virol., <u>25</u> , 641-651	



EVERITT, E., LUTTER, L. et L. PHILIPSON, 1975	6, 7, 28
<i>Virology</i> , <u>67</u> , 197-208	34, 81
EVERITT, E., SUNDQUIST, B., PETTERSSON, V. et L. PHILIPSON	9, 21, 25
1973	34, 83, 84
<i>Virology</i> , <u>52</u> , 130-147	
EVERITT, E., MEADOR, S.A. et A.S. LEVINE, 1977.....	19
<i>J. Virol.</i> , <u>21</u> , 199-214	
FRAENKEL-CONRAT, H. et R. WAGNER, 1976	21
<i>Comprehensive Virology</i> , <u>6</u>	
FROST, E. et J.F. WILLIAMS, 1978.....	24
<i>Virology</i> , <u>91</u> , 39-50	
GALOS, R.S., WILLIAMS, J., BINGER, M.H. et S.J. FLINT, 1979.....	14
<i>Cell</i> , <u>17</u> , 945-950	
GARON, C.F., BERRY, K.W. et J.F. ROSE, 1972.....	10
<i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i> , <u>69</u> , 2391-2395	
GINSBERG, H.S. et P. LUCIOW, 1978.....	18
<i>International Virology IV, La Haye</i>	
GINSBERG, H.S., PEREIRA, H.G., VALENTINE, R.C., et	6
W.C. WICCOX, 1966	
<i>Virology</i> , <u>28</u> , 782-783	
GREEN, M., MACKEY, J.K., WOL, W., et P. RIGDEN, 1979.....	4, 5
<i>Virology</i> , <u>93</u> , 481-492	
HENNACHE, B. et P.A. BOULANGER, 1977.....	28
<i>J. Biochem</i> , <u>166</u> , 237-247	
HUEBNER, R.J., CASEY, M.J., CHANNOCK, R.M. et K. SCHEEL,	4
1965	
<i>Proc. Nat. Acad. Sci. USA</i> , <u>54</u> , 381-388	
ISHIBASHI, M. et J.V. MAIZEL, 1974a.....	26, 124
<i>Virology</i> , <u>58</u> , 345-361	
ISHIBASHI, M. et J.V. MAIZEL, 1974b	18, 19
<i>Virology</i> , <u>57</u> , 409-424	



JÖRNVALL, H. , PETTERSSON, U. et L. PHILIPSON, 1974.....	102
Biochem. Biophys. Res. Commun. , <u>56</u> , 304-310	
KAUFMANN, R.S. , et H.S. GINSBERG, 1976.....	18
J. Virol. , <u>19</u> , 643-650	
KHITOO G. et J. WEBER, 1977.....	86
Virol. , <u>81</u> , 126-137	
KLESSIG, D.F. , 1977.....	16, 17
Cell, <u>12</u> , 9-21	
LAURELL, C.B. , 1966.....	109
Anal. Biochem. , <u>10</u> , 358-361	
LAVER, W.G. , WRIGLEY, N.G. et H.G. PEREIRA, 1969.....	23, 25
Virology, <u>38</u> , 599-605	
LAWRENCE, W.C. et H.S. GINSBERG, 1967.....	11
J. Virol. , <u>1</u> , 851-867	
LEMAY, P. , 1978.....	13, 15, 16
Bulletin de l'Institut Pasteur, <u>76</u> , 133-162	
LEVINE, A.J. et H.S. GINSBERG, 1967.....	30
J. Virol. , <u>1</u> , 747-757	
LEVINE, A.J. et H.S. GINSBERG, 1968.....	30
J. Virol. , <u>2</u> , 430-439	
LEVINSON, A. et A.J. LEVINE, 1976.....	10
Virology, <u>76</u> , 1-11	
LEWIS, J.B. , ATKINS, J.F. , BAUM, P.R. , SOLEM, R. ,	13
GESTELAND, R.F. et C.W. ANDERSON, 1976	
Cell, <u>7</u> , 141-151	
LEWIS, J.B. , ANDERSON, C.W. et J.K. ATKINS, 1977.....	24
Cell, <u>12</u> , 37-44	
LONDBERG-HOLM, K. et L. PHILIPSON, 1969.....	11, 30
J. Virol. <u>4</u> , 323-338	
LONDBERG-HOLM, K. et L. PHILIPSON, 1974.....	11
Monog. Virol. , <u>9</u> ,	



LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et R.J. RANDALL, 1951.....	108
J. Mol. Biol., <u>193</u> , 265-275	
LYON, M., CHARDONNET, Y. et S. DALES, 1978.....	11, 30
Virology, <u>87</u> , 81-88	
MACKEY, J.K., WOLD, W.S., RIGDEN, P. et M. GREEN, 1979.....	4
J. Virol., <u>29</u> , 1056-1065	
MAIZEL, J.V., WHITE, D.O. et M.D. SCHARFF, 1968.....	6
Virology, <u>36</u> , 115-125	
MARTIN, G.R., WAROCQUIER, R. et P.A. BOULANGER, 1975.....	84, 105
Intervirology, <u>5</u> , 162-172	
MARTIN, G.R., WAROCQUIER, R., COUSIN, C., D'HALLUIN, J.C., et P.A. BOULANGER, 1978.....	88, 112
J. Gen. Virol., <u>41</u> , 303-314	
MARUSYK, R.G., MORGANA, R. et G. WADELL, 1975.....	100
J. Virol., <u>16</u> , 456-458	
MAUTNER, V. et H.G., PEREIRA, 1971.....	26
Nature, <u>230</u> , 456-457	
MIRZA, M.A. et J. WEBER, 1979.....	9, 11, 30
J. Virol., <u>30</u> , 462-471	
MORGAN, C., ROSENKRANZ, H.S. et B. MEDNIS, 1969.....	10
J. Virol., <u>4</u> , 777-796	
MOSS, B., et F. KOCZOT, 1976.....	16
J. Virol., <u>17</u> , 385-392	
NEURATH, A.R., RUBIN, B.A. et J.T. STASNY, 1968.....	88, 105
J. Virol., <u>2</u> , 1086-1095	
NEVINS, J.R. et J.E. DARNELL, 1978a.....	16
Cell, <u>15</u> , 1476-1493	
NORBBY, E. et P. SKAARET, 1967.....	26, 88, 105
Virology, <u>32</u> , 489-502	
OBERG, B., SABORIO, J. PERSSON, T., EVERITT, E., ET L. PHILIPSON, 1975.....	6, 10, 18
J. Virol., <u>15</u> , 199-207	
PEREIRA, H.G. et N.G. WRIGLEY, 1974.....	21, 22
J. Mol. Biol., <u>85</u> , 617-631	



PERSSON, H., MATHISEN, B., PHILIPSON, L. et.....	9, 10, 19
U. PETERSSON, 1979a	
Virology, <u>93</u> , 198-209	
PERSSON, H., PETERSSON, U. et M.B. MATHEWS, 1978.....	10
Virology, <u>90</u> , 67-79	
PERSSON, H., SIGNAS, C. et L. PHILIPSON, 1979b.....	121
J. Virol., <u>29</u> , 938-948	
PETERSSON, U. et S. HOGLUND, 1969.....	2, 23, 30, 88
Virology, <u>39</u> , 90-106	102, 103, 105
PETERSSON, U., PHILIPSON, L. et S. HOGLUND, 1968.....	2, 26, 28
Virology, <u>35</u> , 204-215	
PHILIPSON, L. et U. LINDBERG, 1974.....	12, 23, 27
Compr. in Virol., <u>3</u> , 143-207	102
PHILIPSON, L., LONDBERG-HOLM, K. et U. PETERSSON, 1968.....	28
J. Virol., <u>2</u> , 1064-1075	
PHILIPSON, L. et U. PETERSSON, 1973.....	7, 29, 138
Progress in experimental tumor Research, <u>18</u> , 2-45	
PHILIPSON, L., WALL, R., GLICKMAN, G. et J.E. DARNELL, 1971....	16
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., <u>68</u> , 2806-2809	
PRAGE, L., PETERSSON, U., HOGLUND, S., LONDBERG-HOLM.....	2, 23, 34
K., et L. PHILIPSON, 1970	
Virology, <u>42</u> , 341-358	
REIF, U.M., WINTERHOFF, U., LUNDHOLM, U., PHILIPSON, L.,.....	103
et W. DOERFLER, 1977	
Eur. J. Biochem., <u>73</u> , 313-325	
REKOSH, D.M.K., RUSSEL, W.C. et A.J.D., BELLET, 1977.....	10, 13
Cell, <u>11</u> , 283-295	
ROBINSON, A.J., YOUNGHUSBAND, H.B. et A.J.D. BELLET, 1973.....	10
Virology, <u>56</u> , 54-69	
ROSEN, L., 1960.....	4
Ann. J. Hyg., <u>71</u> , 120-128	
ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROT, R.H. et	4
I.G. GWARD, 1953.....	
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., <u>84</u> , 570-573	
RUSSEL, W.C., Mac INTOSH, K. et J.J. SKEHEL, 1971.....	6
J. Gen. Virol., <u>11</u> , 35-45	



VELICER, L. et H.S. GINSBERG, 1970.....	18
J. Virol., <u>5</u> , 338-352	
WADELL, G., 1979.....	4
Intervirology, <u>11</u> , 47-57	
WEBER, J., 1976.....	18, 19
J. Virol., <u>17</u> , 462-471	
WEBER, J., BEGIN, M. et E.B. CARSTENS, 1977.....	7, 84
Virology, <u>76</u> , 709-724	
WEEKE, B., 1973	106
Scand. J. Immunol., <u>2</u> , 47-56	
WEINMANN, R., RASKAS, H.J. et R.G. ROEDER, 1974.....	16
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., <u>71</u> , 3426-3440	
WILHELM, J.M. et H.S. GINSBERG, 1972	18
J. Virol., <u>9</u> , 973-980	
WILLIAMS, J.F., YOUNG, S.H. et P.E. AUSTIN, 1974	31
Symposium on Quantitative Biology, <u>29</u> , 427-439	
WINNACKER, E.L., 1978.....	9, 10
Cell, <u>14</u> , 761-773	
WINTERS, W.D. et W.C. RUSSEL, 1971	21
J. Gen. Virol., <u>10</u> , 181-194	
WOLFSON, J. et D. DRESSLER, 1972.....	10
Proc. Nat. Acad. Sci. USA., <u>69</u> , 3054-3057	
ZIFF, E.B. et R.M. EVANS, 1978	16
Cell, <u>15</u> , 1463-1475	

