50376 1987 17

N° d'ordre : 721



THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

Marie-Laure CAILLET-BOUDIN



ETUDE STRUCTURALE ET BIOCHIMIQUE DE LA FIBRE DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 2

Corrections faites après avis du jury

présentée le 25 mai 1987 devant la Commission d'Examen

Président :

J. MONTREUIL P. BOULANGER

- B. JACROT
- J.M. MASSON
- G. SPIK
- A. VERBERT

Ce travail a été effectué à l'Unité de Virologie Moléculaire de l'INSERM sous la direction de Monsieur le Professeur P.A. BOULANGER.

Je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté de juger ce mémoire.

- 2 -

Ce travail a bénéficié de plusieurs collaborations. Je tiens à remercier plus particulièrement :

- Monsieur le Professeur F. GALIBERT qui m'a accueillie dans son laboratoire pour la séquence nucléotidique du gène de la fibre du mutant H2 t<u>s</u> 125,

- Monsieur G. TORPIER qui a réalisé pour nous la microscopie électronique,

- Monsieur le Professeur A. TARTAR et Monsieur J.C. GESQUIERE pour la synthèse des peptides et leur couplage sur une protéine porteuse,

- Madame H. LOUCHEUX pour des études physicochimiques (dichroïsme circulaire - UV différentiel) qui n'ont malheureusement pu aboutir pour des problèmes d'aggrégation de la fibre mutée,

- Monsieur J.C. MICHALSKI pour la caractérisation du chaînon glycannique,

- Monsieur le Professeur P. DEGAND pour le passage des produits sur l'analyseur en acides aminés.

Merci également à tous les membres de l'équipe et plus particulièrement à ceux dont la collaboration réelle passe souvent plus inaperçue : Didier Petite pour les cultures de cellules saines et Virginie Delecroy pour la frappe de ce manuscrit.

TABLE DES MATIERES

IN	TR	ODUCTION	10
GΕ	NF	RALLTES	10
<u> </u>			ΤZ
1		SSIFICATION	4.0
•			13
11-	LES	PROTEINES DE STRUCTURE	16
	A-	L'hexon	16
	B-	Le penton	19
		1. Caractérisation biochimique	20
		a) la base du penton	
		b) la fibre	
		2. Propriétés immunologiques	22
		3. Propriétés physiologiques	25
		a) hémagglutination	20
		b) intéraction précoce avec la cellule	
		c) effet cytopathogène	
		d) inhibition de la multiplication virale et des synthèses	
		macromoléculaires de la cellule hôte	
		e) activités anti-transformante et anti-tumorale	
		f) induction de l'interféron	
	C -	Les protéines majeures du nucléoïde	29
	D-	Les protéines mineures	30
		1. le llla	30
		2. le VI	30
		3. le VIII	31
		4. le IX	31
		5. le IVa2	31
		6. les protéines IVa1, X, XI, XII et µ	31
		7. la protéine terminale	32
	E-	Les activités enzymatiques associées au virus	32
		1. protéine kinase	32
		2. protéase	32
[]]-	ARC	CHITECTURE DU VIRUS	30
	,		.U Z
	A-	Organisation de la capside	33
	B -	Le nucléoïde viral	33

IV- PRODUCTION VIRALE

	A-	Adsorption et pénétration	36
	B-	Phase précoce	37
		1. Localisation des gènes précoces	37
		2. Transcription et régulation	39
		3. Protéines précoces et leurs rôles	39
	-C-	Réplication	41
		1. Lieu de réplication	41
		2. Protéines impliquées	41
		3. Origine de réplication	41
		4. Mécanisme	42
	D-	Phase tardive	42
		1. Transcription et traduction des protéines tardives	42
		a) mRNA des protéines IX et IVa2	
		b) mRNA tardifs synthétisés à partir du MLP	
		c) Mécanisme d'épissage	
		2. Transcription et Traduction de la fibre	45
		3. VA-RNA	49
	E-	Assemblage	49
		1. Assemblage des capsomères et transport des protéines vers le	50
		noyau	
		2. Morphogénèse virale	50
		a) Particules intermédiaires vides	
		b) Encapsidation du DNA	
		c) Clivage des précurseurs	
тι	RAV	AUX PERSONNELS	54
Cł	H A P	I T R E I : ETUDE DE LA FIBRE DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 2	56
	A-	Introduction	57
	R-	Dissociation du penton complet en ses deux composants sous l'effet	59
	-	d'anticorps anti-fibre (Annexe 1)	
	C-	Assemblage in vitro de la base du penton et de la fibre (Annexe 2)	59
		1. Purification des protéines	59
		2. Assemblage in vitro	60
		3. Modification antigénique de la fibre	64
		4. Extrémité de la fibre impliquée dans l'assemblage	64

35

_			
D-	Polar	rité de la fibre	67
	1.	Liaison avec la base du penton	68
		a) approche directe	
		b) approche indirecte (Annexe 3)	
	2.	Liaison avec le récepteur cellulaire	71
E-	Glyc	osylation	74
	1.	Caractérisation du chaînon glycannique	76
		a) évaluation du taux de glucosamine	
		b) composition monosaccharidique	
		c) nature de la liaison	
	2.	Affinité pour une lectine	78
	3.	Localisation du chaînon glycannique	78
	4.	Comparaison de la glycosylation de la fibre libre ou assemblée	82
		avec la base du penton	
	5.	Comparaison de la glycosylation des fibres d'adénovirus de	82
		sérotypes différents	
F-	Varia	ation de migration de la fibre et des autres protéines virales en	83
	ael a	de polyacrylamide-SDS en fonction du degré de dénaturation	
	(Anr	nexe 4)	
	1.	Effet d'une dénaturation prolongée sur la migration des protéines	83
		en gel-SDS	
	2.	Recherche des causes des modífications électrophorétiques	83
	3.	Effet de chaque agent dénaturant sur la migration de la fibre	87
		en gel-SDS	
	4.	Relation rendant compte de la variation de la migration	87
	-	électrophorétique	
G-	Disc	ussion	88
Н-	Anne	exes: 1 - Antibody triggered dissociation of adenovirus	9 <u>u</u>
•••		penton capsomer Virology 113 781-786 (1981).	51
		2 - Assembly of adenovirus penton base and fiber	101
		Virology $116 - 582 - 604 (1982)$	TOT
		3 - Crystallization enzymatic cleavage and the polarity	110
		of the adepovirus type 2 fiber soumis à	TTO
		publication à Virology	
		μ - influence of the state of denaturation on the	144
		migration of adenovirus type 2 structural proteins	± 1 T
		in sodium dodocul cultate polycomulanido dolo	
		Electrophonesic 7 200 215 (1026)	
		$\underline{\text{Electrophoresis}}, \underline{1}, \underline{303-315} (\underline{1380}).$	

- 7 -

CHAPITRE II: ETUDE DE LA FIBRE DU MUTANT H2 ts 125 151

	A-	Introduction	152
	B-	Caractérisation biochimique du mutant H2 ts 125 (Annexe 5)	152
	C-	Effet de la mutation AlaVal sur la fonction et la conformation de la	
		protéine	154
		1. La mutation thermosensible entraîne des changements	
		conformationnels	154
		a) microscopie électronique	
		b) migration électrophorétique des fibres Fwt et F125 dans des	
		conditions fortement dénaturantes	
		gel de polycrylamide-SDS en gradient urée : 0 3 M	
		dénaturation par la chaleur	
		2. La mutation AlaVal pourrait être responsable du changement	157
		conformationnel	
		3. La mutation AlaVal est responsable du changement	157
		de migration électrophorétique	
		4. La mutation Ala-Val est responsable de la thermosensibilité	159
		5. Etude des révertants du mutant H2 ts 125	159
	D-	Discussion	162
	E-	Annexe : 5 - Biochemical and genetical characterization of a	167
		fiber-defective temperature sensitive mutant of type 2 adenovirus,	
		<u>Embo J., 2</u> , 1921–1927 (1983).	
со	NC	LUSION GENERALE - PERSPECTIVES	174
ΑP	PEI	NDICE TECHNIQUE	178
	A-	Culture cellulaire	179
		1. Cellules KB en suspension	179
		2. Cellules HeLa et 36 293 en culture monocouche	179
	B-	Infection virale	179
	C-	Purification du matériel biologique	179
		1. Préparation du virus et des antigènes solubles	179
		2. Purification des protéines	180
		3. Préparation du DNA viral	181
		a) purification du complexe DNA-protéine terminale	
		b) purification du DNA dépourvu de protéines	
		c) purification de fragments de DNA	
		4. Préparation de mRNA cytoplasmiques poly A ⁺	181

D-	<u>Séc</u>	limentation en gradient de saccharose	182					
E-	Pré	édiction de structures secondaires et calcul d'hydrophobicité						
F-	Techniques d'hydrolyse							
	1.	Hydrolyse des protéines	182					
		a) hydrolyse enzymatique						
		b) hydrolyse chimique en milieu légèrement acide						
	2.	Hydrolyse du DNA	183					
G-	Tec	hniques de marquage	183					
	1.	Marquage des protéines	183					
	2.	Marquage des sucres	183					
	3.	Marquage du DNA sur l'extrémité 5'	183					
H-	Tec	hniques électrophorétiques	184					
	1.	Gel de polyacryiamide-SDS	184					
	2.	Gel de polyacrylamide non dénaturant	184					
	3.	Gel de polyacrylamide en gradient urée	184					
	4.	Electrophorèse de transfert	185					
	5.	Isoélectrofocalisation	185					
	6.	Immuno-électrophorèse bidimensionnelle	185					
	7.	Immuno-affino-électrophorèse	185					
1-	Tec	hniques immunologiques	186					
	1.	Préparation des sérums	186					
		a) sérum anti-virus						
		b) sérum dirigé contre une protéine						
		c) sérum antipeptide						
	2.	Titrage par immuno-fluorescence	186					
	3.	Immuno-précipitation par Staphylococcus aureus	187					
	4.	Immuno-transfert	187					
	5.	Test ELISA	187					
J–	Tec	hniques génétiques	188					
	1.	Clonage	188					
	2.	Séquençage	188					
	3.	Analyse des mRNA à la nucléase S1	188					
	4.	Méthode de sauvetage d'une mutation	189					

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'adénovirus est le seul virus à DNA à posséder des projections apicales appelées fibres. Celles-ci sont ancrées par des liaisons non-covalentes au niveau de la base du penton, elle-même insérée dans la capside à chacun des sommets.

La fibre possède une structure hautement asymétrique et intervient dans plusieurs propriétés virales importantes (hémagglutination, adsorption virale).

Dans un premier temps, nous avons étudié la fibre de l'adénovirus de type 2 de type sauvage : son assemblage avec la base du penton, sa polarité, sa glycosylation et son comportement électrophorétique en fonction du degré de dénaturation ont été étudiés.

Dans un second temps, l'étude de la fibre du mutant H2 ts 125 nous a permis de localiser une zone importante dans le polypeptide de la fibre pour l'intégrité structurale et fonctionnelle de la protéine. Une hypothèse pouvant expliquer comment une mutation ponctuelle peut avoir des effets sur la conformation de toute une protéine et donc sur ses propriétés physiologiques a été émise.

Avant d'aborder les travaux personnels nous rappelons les connaissances essentielles au sujet de la structure et de la multiplication de l'adénovirus en insistant davantage sur les données concernant la fibre et le penton complet (qui correspond au complexe : base du penton - fibre).

- 11 -



1- CLASSIFICATION

Isolé pour la première fois par ROWE <u>et al.</u> (1953), l'adénovirus est un virus à DNA double brin, non enveloppé, de forme icosaèdrique et de taille relativement réduite (70 nm de diamètre).

L'ensemble des adénovirus constitue la famille des Adenoviridae, divisible en deux genres : les mastadénovirus, plus de 90 espèces et les aviadénovirus, environ 18 espèces. Il existerait peut être un troisième genre, des virus semblables aux adénovirus ayant été trouvés chez les animaux à sang froid (WIGAND <u>et al.</u>, 1982) (Tableau I). Cette classification est fondée sur l'absence de protéines montrant une antigénicité croisée, et des différences morphologiques. Très peu d'homologies existent entre le DNA des mastadénovirus et des aviadénovirus.

Chez l'homme, quarante et un sérotypes ont été identifiés (UHNOO <u>et al.</u>, 1983). 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 1967, HUEBNER proposait de les classer selon leur oncogénicité. PINA et GREEN (1965) ont montré que, pour les adénovirus humains, le pouvoir oncogène du virus croît quand la teneur en base G+C du DNA décroît. Depuis, trois autres critères ont été proposés pour la classification :

1- La migration électrophorétique de quelques polypeptides de structure en gel de polyacrylamide-SDS (WADELL, 1978).

2- Le degré d'homologie de séquence des DNA (GREEN et al., 1979),

3- L'analyse du génome par des endonucléases de restriction notamment par l'enzyme Sma !, dont le site de coupure (CCC GGG) reflète le contenu en bases G+C (WADELL et al., 1980).

Sur ces données, les quarante et un adénovirus humains ont été répartis en six sous-groupes (Tableau 2), chacun possédant des propriétés d'hémagglutination, un degré d'oncogénicité, une teneur en base G+C ainsi qu'un taux d'homologie de leur DNA qui leur sont propres. Cependant, l'analyse du DNA par certains enzymes de restriction permet de révéler des variants pour un sérotype donné (ADRIAN et al., 1985, FIFE et al., 1985).

Les sérotypes 2 et 5 (sous-groupe C) ont été plus particulièrement étudiés : ils sont faiblement pathogènes et se multiplient facilement dans des

Genre	Hôte	Non	Nomenclature	
		ldentifié	Probable	
Mastadénovirus	Homme	41	_	h1 - h41
	Primate non humain	24	-	sim1 - Sim20
	Bovin	9	-	bos1 - bos9
	Cochon	4	1	sus1 - sus4
	Mouton	5	2	ovi1 – ovi2
	Cheval	1	-	equ1
	Chien	1	1	can1
	Chèvre	-	1	cap1
	Souris	1	1	mus1
	Peromyscus		1	
	Opossum	-	1	
	Tupaia	1	-	tup1
Aviadenovirus	Volaille	9	3	gal1 - gal9
	Dinde	2	-	mel1 – mel2
	Oie		3	ans
	Faisan	-	1	pha
	Canard	-	1	ana
******	Grenouille		1	
	Truite	-	1	

TABLEAU 1

Nombre de sérotypes d'adénovirus isolés chez les différentes espèces animales hôtes (d'après WIGAND <u>et al.</u>, 1982)

Sou	is-groupe	. Type	Degré d'hom	plogie du DNA	.Teneur en base G+C	. Nombre de fragments de	Masse m des polypep	oléculaire app otides majeur§	arente internes	. Longueur de la fibre (en nm)	.Oncogénicité	. Sous-groupe . d'hémaggutination
			intra sous-groupe	inter sous-groupe	(pourcentag	e) restriction oftenus avec Sma I	v	VI	VII	-		
	A	12,18,31	48-69 %	8-20 \$	basse : 47-49 %	4-5	51-51,5 K	25,5-26 K	17,5-18K	28-31	Haute	IA
	В	3,7,11,14,16, 21, 34,35	89-94 %	9-20 %	Moyenne 49-52 %	8-10	53,5 K-54,5 K	24 K	17,8-18K	9-11	Faible	I
	с	1,2,5,6	99-100 %	10-16 🐐	Haute : 57-59 %	10-12	48,5 K	24 K	18,5K	23-31	Aucune	III
	D	8,9,10,13,15 17,19,20,22,23 24,25,26,27,28 29,30,32,33	94-99 %	4-17 %	Haute : 57-59 %	14-18	50-50,5 K	23,2 K	18,2K	12-13	Aucune	י גע ו ו
	£	4		4-23 %	Haute : 57	19	48 K	24,5 K	18K	17	Aucune	III
	F	40,41	62-69 \$ ¹	15 %	Moyenne 49-52 %	9-12	46-43,5 K	25,5 К	17,2-17,7K	28-33	Aucune	IV

~~ ·

<u>Tableau 2</u> : Classification des adénovirus humains avec leurs principales caractéristiques (d'après PETTERSSON and WADELL, 1985).

¹ Données de Van LOON <u>et al.</u>, 1985.

1



cellules en lignée continue. Les données présentées concernent donc principalement ces deux sérotypes.

11- LES PROTEINES DE STRUCTURE

Les protéines de structure de l'adénovirus ont été mises en évidence par électrophorèse et immunoélectrophorèse en agarose (VALENTINE and PEREIRA, 1965 ; GINSBERG <u>et al.</u>, 1966). Les polypeptides correspondants ont été identifiés en gel de polyacrylamide-SDS (MAIZEL <u>et al.</u>, 1968 ; ANDERSON <u>et al.</u>, 1973) (Fig. 1). Les protéines virales sont numérotées selon leur migration en gel de polyacrylamide-SDS, par ordre décroissant de la masse moléculaire apparente (MAIZEL <u>et al.</u>, 1968). Trois protéines virales ont un nom : il s'agit de l'hexon, de la base du penton et de la fibre. Elles correspondent respectivement aux polypeptides II, III et IV.

La séquence complète du DNA de l'adénovirus de type 2 permet de connaître la masse moléculaire exacte de chaque polypeptide. Une récente réestimation de la composition moléculaire du virus a ainsi été fondée sur la masse moléculaire du monomère et son contenu en méthionine (VAN OOSTRUM and BURNETT, 1985). Dans le tableau 3 sont regroupées les propriétés physico-chimiques des protéines structurales de l'adénovirus de type 2. Les protéines structurales qui ne proviennent pas d'un précurseur sont N-acétylées. Il s'agit notamment de l'hexon, de la base du penton, de la fibre, du V et du IX.

A- L'hexon

L'hexon constitue la protéine majeure de la capside, il représente 46 % de la masse totale du virus (DEVAUX <u>et al.</u>, 1983). Le sommet de la protéine serait de forme triangulaire tandis que la base serait hexagonale (BERGER <u>et al.</u>, 1978; NERMUT and PERKINS, 1979).

L'hexon est constitué de trois sous-unités monomériques identiques (BOULANGER and PUVION, 1974 ; JORNVALL <u>et al.</u>, 1974b), de 108 K chacune (JORNVALL <u>et al.</u>, 1981) et N-acétylées (JORNVALL <u>et al.</u>, 1974a). Le sommet de l'hexon est hydrophile, principalement chargé négativement (NERMUT and PERKINS, 1979) et porterait l'antigène ε type spécifique (NORRBY <u>et al.</u>, 1969 ; WILLCOX and MAUTNER, 1976). La base de la protéine serait hydrophobe et porterait le déterminant **x** groupe spécifique (NORRBY et al.,



FIGURE 1 :

Profil électrophorétique de l'adénovirus 2 sur gel de polyacrylamide-SDS. Les masses moléculaires apparentes et théoriques des polypeptides ainsi que la localisation des protéines dans le virus sont spécifiées.



Polypeptides	Composant de la	Masse mo	léculaire	Structure	Coefficient de	Point	Rayon de	Coefficient
		Native	Sous-unité	Quaternaire	Sédimentation	lsoélectrique	Stokes (en nm)	de friction (f/fo)
>! + 	Penton (12)	365	85 + 62	Pentamère Trimère	10,5	Non déterminé	5,6	1,00
-	Hexon (240)	324	108	Trimère	12,9	5,4 - 6,1	5,2	1,06
	Base du penton (12)	246-256	85	Pentamère	9,5	5,85	6,6	1,57
2	Fibre (12)	156 - 207	62	Trimère	9	5,3 - 6,6	7,1	1,9
>	Nucléoide (157)	47	48	Monomère	3,5	6,7	3,4	1,42
5	Associé à l'hexon (342)	50 - 72	24	Dimère ou trimère	3,8	5,81	4,7	1,45
VII	Nucléoĭde (833)	18 - 83	18,5	Momère tétramère	2,3	>7,5	3,3	18 †1'1
	Associé à l'hexon	13	13	Monomère	1,6	5,20	2,0	1,2
×	Groupe de 9 hexons (247)	23	14	Dimère	2,3	5,90	2,4	1,29
IIIa	Région des apex (74)	65	66	Monomère	9	5,95 - 6,08	2,7	1,02
100 K	Non structurale	116	100	Monomère	6,2	5,50 - 6,15	3,5	1,17
72 K	Non structurale	75	72	Monomère	3,5	6,7 - 7,1	4,5	1,61
TABLEAU 3 suivant les ré	: Propriétés physico sultats de DEVAUX et	-chimiques al., 1982.	des protéine	s de l'adénovirus 2	d'après LEMA	V et BOULAN	GER (1980), modifié
* Les chiffres BURNETT,	entre parenthèse rep 1985)	résentent le	e nombre de m	olécules de protéines	par particule	virale (données	de VAN (JOSTRUM and

BU

1969). Ce déterminant antigénique est commun à la plupart des adénovirus. Un adénovirus bovin et les adénovirus aviaires font exception (WIGAND <u>et al.</u>, 1982). L'hexon porte également un des antigènes responsables de la neutralisation du virus (WILLCOX and GINSBERG, 1963 ; WOHLFART <u>et al.</u>, 1985).

La comparaison des séquences de l'hexon des adénovirus de type 2 et 5 montre une très forte homologie pour les extrémités N- et C-terminales de la molécule. La région intermédiaire est plus hétérogène (KINLOCH <u>et al.</u>, 1984). Elle serait située sur le haut de la molécule altérant la surface de la capside sans modifier les intéractions hexon-hexon. Ceci confirme la localisation des déterminants antigéniques type spécifique sur la surface du virus (ROBERTS <u>et</u> al., 1986).

Une classe mineure d'hexon, l'hexon lent, a été décrite. Ces hexons ne sont pas trouvés dans la particule virale et pourraient provenir d'un clivage protéolytique (BOULANGER et al., 1978).

L'hexon contient une sérine active qui pourrait intervenir dans son propre assemblage (DEVAUX and BOULANGER, 1980), aucune activité enzymatique ne lui ayant été associée.

B- Le penton

Le penton occupe les sommets de l'icosaèdre. Il est en fait constitué de deux protéines (VALENTINE and PEREIRA, 1965) :

- la base du penton qui, insérée dans la capside, est entourée par cinq hexons dits péripentonaux,

- la fibre, dont la longueur varie en fonction du sous-groupe, et qui, fixée sur la base, s'étend vers l'extérieur.

Ces deux protéines ne sont pas liées de façon covalente : elles se dissocient en présence de chlorhydrate de guanidine 2,5 M, de pyridine à 8 % (NORRBY and SKAARET, 1967) ou de désoxycholate de sodium à 0,5 % (BOUDIN <u>et al.</u>, 1979).

Le penton peut être relâché du virion par dialyse contre de l'eau distillée (LAVER <u>et al.</u>, 1969) ou contre un tampon à basse force ionique tel que le Tris-maléate 5 mM, pH 6,8 (PRACE <u>et al.</u>, 1970).

La masse moléculaire du penton a été récemment estimée à 365.000 daltons sur des données de diffusion de neutrons, et des paramètres hydrodynamiques (DEVAUX <u>et al.</u>, 1982). Il posséderait un coefficient de sédimentation de 10,5 S (LEMAY and BOULANGER, 1980 ; DEVAUX et al., 1982).

Le penton isolé de cellules infectées peut se présenter sous forme d'aggrégats (NORRBY 1966 ; WADELL et al., 1969) :

- sous forme de dimères pour les virus appartenant aux sous-groupes C et pour quelques sérotypes, du sous-groupe B,

- sous forme de dodécons pour les virus du sous groupe D, E et les autres sérotypes du sous-groupe B. Les pentons seraient alors organisés autour d'un noyau central, les fibres étant orientées vers l'extérieur.

La fibre dans les cellules infectées peut aussi s'aggréger sous forme de dimères.

1. Caractérisation biochimique

a) la base du penton

En microscopie électronique, la base a une forme globulaire. Cependant, sur certaines images, un pourtour pentagonal est nettement visible ainsi qu'un trou central (PETTERSSON and HOGLUND, 1969 ; BOUDIN <u>et al.</u>, 1979).

Jusqu'à ces dernières années, il était admis que la base du penton était composée de cinq polypeptides identiques dont la masse moléculaire apparente était de 85 K (PETTERSSON and HOGLUND, 1969 ; BOUDIN et al., 1979 ; LEMAY and BOULANGER, 1980). Sur cette estimation de la masse moléculaire apparente et par des études physico-chimiques, il a été suggéré que la base native est de forme trimérique (DEVAUX et al., 1982). En fait, la séquence du gène de la base du penton permet de déterminer une masse moléculaire réelle du polypeptide de 63,296. Calculant le rapport entre les masses moléculaires l'incorporation théoriques déterminées d'après la séquence et en (³⁵S)-méthionine pour chaque protéine, VAN OOSTRUM et BURNETT (1985) ont proposé à nouveau une forme pentamérique pour la base native. Ces mêmes auteurs montrent un triplet au niveau de la base du penton après migration sur un gel en gradient de polyacrylamide-SDS (10-14 %). Avec un virus vieilli, la seconde bande disparaît, il ne subsiste que la première et la troisième bande.

Les auteurs ont émis l'hypothèse que la traduction pourrait commencer soit au 1er AUG (Met 1) de la phase de lecture, soit au 2ème (Met 6). Le premier polypeptide serait N-acétylé, le second ne le serait pas. Un clivage protéolytique serait dans ce second cas possible, il s'arrêterait au triplet de proline (situé aux positions 11, 12, 13 sur la chaîne polypeptidique). Le rapport de la plus grande bande sur la plus petite est de 2 : 3. La fibre pourrait s'associer avec trois chaînes courtes du polypeptide de la base du penton, deux des plus longues chaînes viendraient compléter l'édifice.

La base du penton est considérablement plus sensible à l'action d'enzymes protéolytiques que les autres protéines de la capside. L'antigénicité de la base du penton est détruite à haute concentration de trypsine, tandis qu'à basse concentration, l'antigénicité et la morphologie ne sont pas affectées mais l'effet cytotoxique qui lui est attribué est perdu (PETTERSSON and HOGLUND, 1969).

b) La fibre

La fibre a une structure hautement asymétrique : elle est fortement allongée et se termine par une petite sphérule. La longueur de la fibre varie selon le sous-groupe du virus (Tableau 2). Les virus du sous-groupe B possèdent les fibres les plus courtes (10 nm) et ceux du sous-groupe C les fibres les plus longues (23-31 nm). Les adénovirus aviaires ont la particularité de posséder deux fibres de longueurs différentes insérées en deux points différents sur la base (GELDERBLOM and MAICHLE-LAUPPE, 1982).

La fibre a pu être purifiée à partir d'extraits d'antigènes solubles (PETTERSSON <u>et al.</u>, 1968). Les fibres de l'adénovirus 5 et de l'adénovirus 2 ont pu être cristallisées (MAUTNER and PEREIRA, 1971 ; DEVAUX <u>et al.</u>, 1984). L'étude des cristaux par diffraction aux rayons X favorise une structure dimérique par rapport à une structure trimérique pour la fibre native (DEVAUX <u>et al.</u>, 1984). Cependant, d'après le tracé densitométrique de virus marqués à la $\binom{35}{5}$ -méthionine , VAN OOSTRUM et BURNETT (1985) proposent à nouveau une structure trimérique.

Le monomère de la fibre possède une masse moléculaire apparente en gel de polyacrylamide-SDS de 62 K. Ceci correspond bien à sa masse moléculaire théorique de 61,9 K (HERISSE et al., 1980, 1981). D'après la séquence du

- 21 -

génome, il n'y aurait qu'un seul gène correspondant à la fibre. La fibre native serait donc constituée par l'oligomérisation (dimère ou trimère) du même polypeptide. Cependant, par des gels en double dimension et en présence d'urée, DORSETT et GINSBERG (1975) séparaient deux polypeptides différents qui pourraient correspondre alors à des modifications post-traductionnelles.

La fibre native a un coefficient de sédimentation de 6 S et un pHi de 5,3 - 6,6 (LEMAY and BOULANGER, 1980).

Un modèle structural vient d'être proposé pour la fibre dimérique de l'adénovirus 2 (GREEN <u>et al.</u>, 1983) (Fig. 2A). D'après ce modèle, la protéine fibre contient une séquence de 15 acides aminés (AA), assez bien conservée, répétée 22 fois (Fig. 2B). Ces segments de 15 AA seraient constitués de deux feuillets B de 3 AA chacun, et de deux coudes B (l'un de 4AA, l'autre de 5AA). Dans ces segments, on distingue deux types de séquences consensus, appelées I et II. La fibre de l'adénovirus 3, beaucoup plus courte, posséderait ce même type de séquence répétée 6 fois (Fig. 2C) (SIGNAS <u>et al.</u>, 1985). La longueur de la répétition semble donc proportionnelle à la longueur de la fibre. L'empilement de ces petits feuillets B pourrait constituer le batônnet. La sphérule serait formée par oligomérisation de l'extrémité C-terminale (constituée de 181 AA).

La fibre est une glycoprotéine qui contiendrait deux résidus de N-acétylglucosamine sur chaque chaîne (ISHIBASHI and MAIZEL, 1974a). Il s'agirait d'une O-glycosylation (ISHIBASHI and MAIZEL, 1974a). Le rôle de la glycosylation est inconnu. Le mutant H5 <u>ts</u> 142 possède, à 39° C (température non permissive), une fibre non glycosylée qui possède les mêmes propriétés physiques que la fibre du virus de type sauvage, mais qui n'est pas détectable immunologiquement (CHENG CHEE SEUNG and GINSBERG, 1982). La fibre est la seule protéine de structure glycosylée de l'adénovirus.

2. Propriétés immunologiques

Le penton porte plusieurs déterminants antigéniques tant sur la base que sur la fibre. La base du penton porte un déterminant groupe spécifique, appelé déterminant B ainsi que des déterminants sous-groupe et type spécifiques. La complexité antigénique de la fibre croît avec sa longueur. Les adénovirus du groupe B, possédant les fibres les plus courtes, ne

FIGURE 2

Modèle structural de la fibre selon GREEN <u>et al.</u> (1983) et SIGNAS <u>et al.</u> (1985).

A) Modèle structural pour la fibre des adénovirus de type 2 et 3. La partie N-terminale de la molécule correspondrait à la queue, la partie C-terminale formerait la sphérule et la partie intermédiaire constituerait le bâtonnet.

B) Séquence des segments de 15 acides aminés de la fibre de l'adénovirus 2 intervenant dans la formation du bâtonnet. Le schéma supérieur représente l'enchaînement de coudes β et de feuillets β correspondant à un segment. Les résidus hydrophobes sont repérés par les points noirs. Le numéro des segments est reporté sur la gauche ainsi que le type de séquence consensus auxquels ils appartiennent. Les analogies avec les séquences consensus sont soulignées en trait mince et sont soulignées en trait épais les séquences très semblables.

C) Séquence des segments de 15 acides aminés de la fibre de l'adénovirus3, intervenant dans la formation du bâtonnet.

- 23 -



possèdent que le déterminant δ , type spécifique, localisé au niveau de la sphérule. Les fibres des adénovirus des sous-groupes A, C, D possèdent en plus un déterminant δ , sous-groupe spécifique, localisé au niveau du bâtonnet. La répartition des antigènes est résumée dans le Tableau 4.

Les anticorps type spécifique de la fibre inhibent l'attachement de la fibre aux cellules KB et HeLa (PHILIPSON et al., 1968).

Dernièrement, WOHLFART et ses collaborateurs (1985) ont étudié la pénétration et la production virale, quantifiée par immunotitration, lors de l'infection de cellules HeLa par du virus complexé avec différents anticorps. Ils montrent que l'hexon, la fibre et également la base portent des antigènes de neutralisation. Cependant avec un sérum anti-base, ils n'ont jamais pu obtenir plus de 45 % d'inhibition de la production virale.

3. Propriétés physiologiques

a) 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 indirecte quand on ajoute un immunsérum hétérotypique. Un immunsérum homotypique inhibe la capacité d'hémagglutination de la fibre (PETTERSSON <u>et al.</u>, 1968) (Fig. 3). C'est donc par l'extrémité de sa fibre que l'adénovirus réagit avec les érythrocytes.

b) interaction précoce avec la cellule

La toute première étape de l'infection consiste en la reconnaissance par la fibre des récepteurs spécifiques cellulaires. La fibre pure en concentration 10 à 100 fois plus élevée que le nombre de récepteurs (environ 10⁴ par cellule) inhibe l'attachement du virus (PETTERSSON et al., 1968).

Dans les temps précoces de l'infection virale, le virus devient sensible à la DNase I : la perte d'un ou de plusieurs pentons semble constituer une première étape pour la libération du DNA viral. Il a été montré que les particules virales avaient perdu quelques composants (LONDBERG-HOLM and PHILIPSON, 1969 ; MIRZA and WEBER, 1979), mais l'analyse par électrophorèse ne révèle l'absence

5		Antigène				
Proteine	Designation	Spécificité	Caractéristique			
Base du penton	β	Groupe inter et intra-sous groupe	_Porte l'activité toxique			
Fibre	Y	Sérotype	- réagit avec les anti- corps inhibant l'hémagglutination			
			- localisé dans la sphérule			
		Inter sous-groupe	- Commun aux membres des sous-groupes C et D			
	δ	Intra sous-groupe	 Localisé au niveau du bâtonnet 			
			 Présent seulement dans les sous groupes A, C, D et E. 			

TABLEAU 4 : Antigènes associés au penton (d'après PETTERSSON, 1984).



FIGURE 3

- A) Hémagglutination complète :
 - a par les dodecons constitués par l'agrégat de 12 pentons,
 - b par un dimère de pentons,
 - c par un dimère 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 aggrégat de virions,
 - b encombrement stérique dû aux anticorps anti-hexons fixés sur les hexons péripentonaux,
 - c par les anticorps type spécifique de fibre.

(d'après PHILIPSON and PETTERSSON (1973)).

- 27 -

d'aucune protéine particulière, seule une légère variation stoechiométrique est observée pour la base et la fibre (LYON <u>et al.</u>, 1978). Cependant les particules, isolées du cytoplasme (après pénétration du virus), sont précipitées en moins grande quantité par un sérum anti-penton que par un sérum dirigé contre le virus entier (CHARDONNET and DALES, 1970). Une des premières étapes de l'infection pourrait donc être la perte d'un ou de plusieurs pentons ou un changement de conformation de certains pentons (LONDBERG-HOLM and PHILIPSON, 1974).

c) effet cytotoxique

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

- 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, 8 à 24 h après l'infection.

- L'effet tardif qui provoque la lyse de la cellule et la libération de la descendance virale, 7 à 20 jours après l'infection.

L'effet cytotoxique précoce est dû au penton : le même phénomène est observé quand les cellules sont mises en présence de penton purifié $(0,1 \ \mu g/10^6$ cellules). C'est plus précisément la base du penton qui est responsable du processus puisque :

1) le penton, traité à basse concentration de trypsine ou complexé avec des anticorps anti-base du penton, n'induit plus le phénomène (PETTERSSON and HOGLUND, 1969),

2) les anticorps anti-fibre sont incapables de produire l'inhibition de l'effet cytopathogène (PETTERSSON and HOGLUND, 1969),

3) la base du penton seule peut induire cet effet (BOUDIN et al., 1979).

 d) inhibition de la multiplication virale et des synthèses macromoléculaires de la cellule hôte

Des hautes concentrations de fibre inhibent la réplication de l'adénovirus, du poliovirus et du virus de la vaccine (LEVINE and GINSBERG, 1967). Les biosynthèses de DNA, RNA et protéines cellulaires sont inhibées après un temps de latence de 20 à 25 h quand on ajoute de la fibre au milieu de culture (LEVINE and GINSBERG, 1967). Cependant, la concentration employée dans ces expériences excède la concentration finale durant l'infection. In vitro, LEVINE et GINSBERG (1968) ont montré que la fibre peut se lier au DNA viral ou cellulaire, natif ou dénaturé, à basse force ionique. Cette association inhiberait l'activité des DNA et RNA polymérases.

e) activité anti-transformante et anti-tumorale

La fibre, à haute concentration (100 à 200 µg/ml) diminue de plus de 50 % la transformation de cellules d'embryon de hamster par l'adénovirus simien SA-7 et de plus de 70 % la transformation de cellules de rein de rat par le virus du sarcome murin (LONG and KHOOBYARIAN, 1973 ; ABID and KHOOBYARIAN, 1976). La fibre de l'adénovirus 12 injectée à des souris, un ou deux jours avant l'injection du virus du sarcome de la souris Balb/C, protège l'animal par inhibition de la croissance tumorale. Cette inhibition ne semble pas être due à l'inhibition de la multiplication virale, ni à l'induction de l'interféron.

f) induction de l'interféron

La fibre purifiée possède une activité mitogène au niveau des lymphocytes B de la souris. Ce phénomène dépend de la concentration (GIBSON et al., 1982).

La fibre (200-400 µg/ml) induit la synthèse d'interféron de cellules en culture, soit des cellules de rate de souris Balb/C soit des macrophages. Il s'agirait de l'interféron de type I (TIENSIWAKYL and KHOOBYARIAN, 1983).

C- Les protéines majeures du nucléoïde

Deux protéines majeures sont retrouvées associées au DNA : il s'agit de la protéine V et de la protéine VII, respectivement de masse moléculaire 41,7 K et 18,5 K. Elles constituent avec le DNA viral le nucléoïde de la particule virale.

Le VII provient d'un précurseur de 22 K par protéolyse (ANDERSON <u>et al.</u>, 1973). Le précurseur est N-acétylé (FEDOR and DANIELL, 1980). De forme monomérique, il peut s'aggréger en tétramères (LEMAY and BOULANGER, 1980). Par réticulation, des dimères de VII ont également été identifiés au niveau du nucléoïde viral (SATO <u>et al.</u>, 1981). Le VII est une protéine basique et contient 24 % de résidus d'arginine (SUNG et al., 1977). 50 % des groupes phosphates du DNA pourraient être neutralisés par les charges basiques de la protéine VII (PRAGE and PETTERSSON, 1971). Son extrémité N-terminale est semblable à celle de quelques histones, notamment l'histone H4 (LISCHWE and SUNG, 1977).

La protéine V est moins bien connue, elle ne dérive pas d'un précurseur et est moins basique que le VII. Sa liaison avec le DNA est moins forte que le VII : les nucléoïdes isolés par traitement au sarcosinate de sodium sont dépourvus de V.

D. Les protéines mineures

Plusieurs protéines mineures sont trouvées dans la capside. Il s'agit du IIIa, du IVa₁, du IVa₂, du VI, du VIII, du IX, des protéines X à XII et de la protéine terminale.

1. Le Illa

Le IIIa, de forme sphérique (LEMAY <u>et al.</u>, 1980), est localisé aux sommets de la capside. VAN OOSTRUM et BURNETT (1984) estiment à 74 le nombre de résidus par sommets alors qu'il était estimé à 60 jusqu'à présent (BOUDIN <u>et al.</u>, 1980 ; DEVAUX <u>et al.</u>, 1982). Le IIIa s'étend vers l'intérieur de la capside et peut être réticulé avec le V et le VII (EVERITT <u>et</u> al., 1975).

Un précurseur N-acétylé, de 67 K, donne par clivage protéolytique au cours de la maturation virale la protéine de 65 K (BOUDIN <u>et al.</u>, 1980). Le Illa pourrait être important dans le maintien de la structure de la capside (DEVAUX et al., 1982) et pendant l'assemblage (D'HALLUIN et al., 1978a).

Le IIIa est phosphorylé par une protéine kinase associée au virus (AKUSJARVI et al., 1978 ; BLAIR and RUSSELL, 1978).

2. Le VI

Le VI, de masse moléculaire 24 K, provient d'un précurseur de 27 K par clivage enzymatique au niveau d'une liaison GIy-Ala (AKUSJARVI and PERSSON, 1981). Il existerait sous forme dimérique ou trimérique dans le virus (EVERITT and PHILIPSON, 1974 ; LEMAY and BOULANGER, 1980). Il y aurait 342 molécules de VI dans le virus (VAN OOSTRUM and BURNETT, 1985). Bien que le VI ait été trouvé à l'origine associé à l'hexon (EVERITT <u>et al.</u>, 1973), il a, plus récemment, été retrouvé dans des nucléoïdes purifiés (RUSSEL and PRECIOUS, 1982).

3. La protéine VIII

La protéine VIII a une masse moléculaire de 17,5 K bien que sa masse moléculaire apparente en gel de polyacrylamide-SDS soit plus faible (13 K). Elle provient également d'un précurseur (24,7 K) (GALIBERT <u>et al.</u>, 1979 ; HERISSE <u>et al.</u>, 1980). Le site de clivage n'est pas encore bien défini. Ce clivage entraînerait un changement drastique dans la forme de la molécule (LEMAY and BOULANGER, 1980). La protéine VIII serait associée à l'hexon (EVERITT et al., 1975).

4. Le IX

Le polypeptide IX, de masse moléculaire 14,3 K (ALESTROM et al., 1980) possède une extrémité N-terminale acétylée (BOULANGER <u>et al.</u>, 1979). Il est retrouvé associé aux groupes de neuf hexons.

5. Le IVa2

Le IVa2 de masse moléculaire de 56 K, a été localisé au niveau du nucléoïde (MIRZA and WEBER, 1979).

6. Les protéines IVa1, X, XI, XII et μ

Rien n'est connu au sujet des protéines IVa1, X, XI, XII, identifiées en gel de polyacrylamide-SDS (ANDERSON <u>et al.</u>, 1973). Elles n'ont pas été localisées dans la structure virale, et les gènes correspondants n'ont pas été identifiés. La protéine μ , identifiée par HOSOKAWA et SUNG (1976) et localisée au niveau du nucléoïde, pourrait correspondre à l'une des protéines X, XI, ou XII. Les autres protéines pourraient être le produit de clivage des précurseurs pVI, pVIII (REKOSH et al., 1977).

7. La protéine terminale

Une protéine de 55 K, appelée protéine terminale, est liée de façon covaiente à chacune des extrémités 5¹ du DNA (ROBINSON <u>et al.</u>, 1973 ; REKOSH <u>et al.</u>, 1977). Elle est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 87 K de masse moléculaire.

E. Activités enzymatiques associées au virus

Des activités enzymatiques sont associées à la capside virale :

1. protéine kinase

Une protéine kinase capable de phosphoryler le IIIa est associée aux particules virales hautement purifiées, dialysées contre un tampon à basse force ionique pour éliminer les pentons (AKUSJARVI <u>et al.</u>, 1978 ; BLAIR and RUSSELL, 1978). Mais l'activité enzymatique ne copurifie avec aucun polypeptide du virus.

L'ATP ou le GTP, et des ions divalents (Mg⁺⁺, Mn⁺⁺ ou Co⁺⁺) sont nécessaires à l'activité enzymatique. La nature de l'ion divalent modifie quantitativement et qualitativement la phosphorylation (TSUZUKI and LUFTIG, 1985).

2. protéase

Une protéase responsable du clivage des protéines internes du virus, est codée par le virus (WEBER, 1976). Il pourrait s'agir d'une protéine de 23 K (LIANG <u>et al.</u>, 1983). Cette activité est retrouvée dans les particules immatures (BHATTI and WEBER, 1979). C'est une enzyme à sérine active qui couperait aux liaisons Gly-Ala (TREMBLAY <u>et al.</u>, 1983 ; SUNG <u>et</u> <u>al.</u>, 1983).

III- ARCHITECTURE DE L'ADENOVIRUS

L'adénovirus est un virus de forme icosaédrique (HORNE <u>et al.</u>, 1959 ; VALENTINE and PEREIRA, 1965). Sa masse moléculaire a été récemment réévaluée, elle est de 185.10⁶ daltons pour DEVAUX <u>et al.</u> (1983) et de 148,7.10⁶ daltons pour VAN OOSTRUM et BURNETT (1985). Il est constitué par deux grandes unités structurales :

- la capside protéique

- le nucléoïde ou "core" viral, constitué par le DNA viral et ses protéines associées.

A- Organisation de la capside

L'iodination enzymatique, l'emploi d'agents pontants et d'immunsérums spécifiques ont permis d'établir un modèle hypothétique pour l'arrangement de toutes les protéines dans le virion (Fig. 4A). Plus récemment, des études de diffusion de neutrons ont confirmé la répartition des protéines entre l'extérieur et l'intérieur de la capside (Fig. 4B).

La capside est essentiellement composée de 240 hexons et 12 pentons, des hexons constituent les 20 faces et les 30 arêtes de l'icosaèdre et les pentons sont situés aux sommets. La particule virale traitée par du SDS, de l'urée, de la pyridine ou du désoxycholate de sodium, se dissocie en "groupes de neuf" (SMITH <u>et al.</u>, 1965 ; MAIZEL <u>et al.</u>, 1968 ; PRAGE <u>et al.</u>, 1970 ; RUSSELL <u>et al.</u>, 1971). Ils sont constitués par neuf hexons et forment les faces de la particule. Il semblerait que les interactions à l'intérieur d'un groupe de neuf hexons soient plus fortes qu'entre deux "groupes de neuf" voisins (NERMUT and PERKINS, 1979).

Récemment, les techniques physico-chimiques et notamment l'emploi des rayons X ont permis d'établir de nombreux modèles concernant l'arrangement des hexons à l'intérieur des "groupes de neuf" et à la surface de la capside (DEVAUX et al., 1983 ; BURNETT et al., 1985 ; ROBERTS et al., 1986).

Deux protéines mineures stabiliseraient la capside. Il s'agit des protéines VIII (LIU <u>et al.</u>, 1985) et IX (BOULANGER <u>et al.</u>, 1979). Cette dernière ne serait cependant pas indispensable (COLBY and SHENK, 1981).

B- Le nucléoïde viral

Le DNA de l'adénovirus est un DNA double brin, constitué d'environ 35000 paires de base (35937 pb pour l'adénovirus de type 2 dont le DNA a été entièrement séquencé). Les séquences terminales sont des séquences répétitives inversées (WOLFSON and DRESSLER, 1972 ; GARON <u>et al.</u>, 1972). Le DNA est circularisé par la protéine terminale de 55 K.





FIGURE 4

Organisation structurale de l'adénovirus.

A) Modèle structural schématique montrant la localisation et le voisinage de chacune des protéines (RUSSEL and PRECIOUS, 1982)

B) Modèle icosaédrique à trois couches obtenu par diffusion de neutrons, positionnant les protéines par rapport à la surface du virion (DEVAUX et al., 1983)

- 34 -

D'autres protéines ont été trouvées associées au DNA : il s'agit des protéines VII, V et μ . Les protéines VII et μ sont très riches en arginine. Il semblerait que le DNA ait une organisation de même type que celle de la chromatine :

1- l'action de la nucléase micrococcale sur le DNA viral libère des fragments de 150 paires de bases (CORDEN <u>et al.</u>, 1976 ; MIRZA and WEBER, 1982). Cet enzyme agit sur le DNA double brin, libre de protéines.

2- plusieurs auteurs ont mis en évidence des "billes sur fils" (NERMUT, 1979 ; MIRZA and WEBER, 1982 ; VAYDA <u>et al.</u>, 1983). Une bille serait constituée de DNA enroulé autour de six copies de protéine VII. Par irradiation aux rayons ultraviolets, les protéines VII et V sont liées au DNA (CHATTERJEE <u>et al.</u>, 1986). La protéine basique μ , identifiée par HOSOKAWA et SUNG (1976), pourrait être liée au DNA entre deux nucléosomes (VAYDA <u>et al.</u>, 1983). L'emploi d'agents pontants établit le voisinage entre cette protéine μ et la protéine V (CHATTERJEE <u>et al.</u>, 1985). Les interactions protéine V-DNA et protéine V-protéines du nucléoïde pourraient maintenir la structure du "core" dans les virions intacts (CHATTERJEE <u>et al.</u>, 1986).

Cependant, la localisation de la protéine V dans le nucléosome est sujet à quelques controverses. Par des expériences de pontage chimique, EVERITT et ses collaborateurs (1975) la situent en dessous des pentons. MIRZA et WEBER (1982) la considèrent comme un élément constitutif de la chromatine virale tandis que NERMUT (1978, 1979), par des techniques de cryo-décapage, montre une capside protéique enfermant le génome viral, le V pouvant former cette coque. Une association de la protéine V avec un dimère de la protéine V1, elle-même liée à l'hexon a également été mise en évidence (CHATTERJEE <u>et al.</u>, 1985). L'interaction entre le "core" et la capside pourrait donc se faire par l'intermédiaire de la protéine V.

VI- PRODUCTION VIRALE

Quand un adénovirus est en contact avec une cellule, plusieurs phénomènes sont possibles :

- le DNA viral s'intègre dans le DNA cellulaire : c'est la transformation (revues générales : GRAHAM, 1984 ; BERNARDS and VAN DER EB, 1984),

- le virus pénètre dans la cellule mais ne se multiplie pas : c'est le cycle abortif (revue générale : DELSERT, 1985),

- le virus se multiplie, ce qui entraîne la lyse de la cellule : c'est le cycle lytique.

Seul le cycle lytique sera développé ici, puisque c'est celui qui aboutit à la production de particules infectieuses, le problème de l'assemblage des différents constituants en une particule stable sera ainsi abordé.

Le cycle lytique est divisé en plusieurs étapes : la pénétration virale, la phase précoce, la réplication et la phase tardive. La phase précoce permet, après la pénétration virale, la synthèse de nombreuses protéines précoces dont bon nombre ont un rôle important dans la régulation de la transcription et dans la réplication virale. Pendant la phase tardive, les protéines de la capside sont synthétisées et le virus peut alors s'assembler. Cependant si ce découpage facilite l'exposé des connaissances actuelles, il est un peu simpliste dans la mesure où certaines protéines précoces sont encore synthétisées au stade tardif et où des protéines de structure sont synthétisées pendant des stades intermédiaires voire précoces.

A- Adsorption et pénétration

L'adénovirus s'adsorbe sur la cellule par la fibre. Récemment, il a été montré qu'à pH légèrement acide (pH 5), la base du penton pourrait intervenir dans l'adsorption (SVENSSON, 1985).

Les récepteurs cellulaires impliqués dans la pénétration de l'adénovirus ont principalement été identifiés par passage d'extraits membranaires sur des colonnes d'affinité avec la fibre ou le virus comme ligands. Selon les auteurs, les protéines impliquées sont :

- une 75 K pour MEAGER et al. (1976) (système Ad5-KB)

- une 78 K, une 42 K, une 34 K pour HENNACHE et BOULANGER (1977) (système Ad2-KB) et une 88 K et une 60 K trouvées par réticulation d'un extrait membranaire avec la fibre

- une 42 K, comme protéine à haute affinité pour SVENSSON <u>et al.</u> (1981) (système Ad2-HeLa).

L'attachement de l'adénovirus sur la cellule implique une certaine fluidité de la membrane (HENNACHE <u>et al.</u>, 1979) avec, notamment, un remaniement au niveau des stérois (HENNACHE <u>et al.</u>, 1982). Lors de l'infection, la membrane cellulaire s'invagine en entraînant le virus qui se trouve emprisonné dans une vésicule enveloppée : la clathrine recouvre cette vésicule. Puis la clathrine est déplacée : la vésicule ainsi formée est appelée réceptosome ou endosome (CHARDONNET and DALES, 1970 ; FITZGERALD et al., 1983). La base du
penton serait impliquée dans la rupture du réceptosome et donc dans la libération du virus dans le cytoplasme (SETH <u>et al.</u>, 1984a). Cela nécessite un pH acide au niveau de ces vésicules (SETH <u>et al.</u>, 1984b). Or un pH légèrement acide (pH 5) induit à la surface de la capside virale un changement réversible hydrophobique mis en évidence par la liaison du virus au Triton X114. Ceci pourrait permettre au virus de se lier à la membrane du réceptosome avant d'être relâché dans le cytoplasme (SETH et al., 1985).

Puis très vite il y a déstabilisation de la capside virale :

- le DNA viral devient accessible à la DNase (SUSSENBACH, 1967 ; LAWRENCE and GINSBERG, 1967 ; BOULANGER and HENNACHE, 1973 ; SVENSSON and PEARSSON, 1984) par perte de quelques pentons (LYON <u>et al.</u>, 1978),

- des protéines internes du virus deviennent accessibles aux protéines du cytosquelette (BELIN and BOULANGER, 1985).

Plusieurs protéines du cytosquelette ont été trouvées associées au virus sitôt après sa pénétration, telles que les microtubules (DALES and CHARDONNET, 1973 ; WEATERBEE <u>et al.</u>, 1977), l'alpha-tubuline, la vimentine et peut être les "stress protéines" (BELIN and BOULANGER, 1985). Cette interaction est probablement liée au transport du virus jusqu'au noyau.

Par l'étude de la décapsidation du mutant H2 <u>ts</u> 1, MIRZA et WEBER (1979) montrent que la décapsidation du virus libérerait d'abord le nucléoïde viral, puis le DNA qui resterait uniquement lié à la protéine terminale 55 K.

B- Phase précoce

La phase précoce commence sitôt après la pénétration du DNA viral dans le noyau. Les RNA polymérases il cellulaires sont responsables de la transcription des gènes viraux précoces.

1. Localisation des gènes précoces

Les mRNA précoces sont transcrits de quatre régions du DNA : deux sur le brin r et deux sur le brin l (Fig. 5). Les régions E1 et E2 sont divisées respectivement en E1A, E1B, E2A et E2B. Les brins r et l du DNA sont définis par le sens de la transcription par rapport à la carte génétique :

- le brin r est transcrit de gauche à droite,

- le brin I est transcrit de droite à gauche.



FIGURE 5

Carte génétique de l'adénovirus 2

Les flèches grasses représentent les mRNA exprimés au stade précoce, les flèches minces ceux synthétisés au stade intermédiaire, les flèches doubles ceux synthétisés au stade tardif. Les protéines assignées aux différentes régions sont indiquées (d'après AKUSJARVI <u>et al.</u>, 1986).

_ 38 _

Certains mRNA transcrits à partir du promoteur tardif majeur (MLP) ont également été mis en évidence au stade précoce (Fig. 4). La moitié de ces mRNA synthétisés possède la séquence i (voir phase tardive) (CHOW <u>et al.</u>, 1979).

2. Transcription et régulation

Les mRNA matures dérivent de précurseurs par épissage. Les différents mRNA synthétisés au temps précoce sont rappelés dans la Figure 5. Ces mRNA sont coiffés et polyadénylés. En avant du site de reconnaissance pour la coiffe, il existe une séquence consensus TATA pour tous les promoteurs à l'exception des promoteurs de la région E2. D'autres séquences, appelées séquences "enhancer" stimulent la transcription. Elles peuvent être placées en amont ou en aval du site de coiffe (revue : JONES, 1986). Les principales caractéristiques de la transcription précoce sont les suivantes :

- la régulation par la protéine 50 K de E1A des promoteurs des régions E1B, E3 et E4 du promoteur précoce de E2 (75 UG) et du promoteur majeur tardif (BERK <u>et al.</u>, 1979 ; RICCIARDI <u>et al.</u>, 1981 ; JONES and SHENK, 1979),

- l'inhibition, par la protéine E2 72 K, de la transcription de E4 (NEVINS and WRINKLER, 1980 ; HANDA <u>et al.</u>, 1983) et le renouvellement rapide des mRNA des protéines précoces par cette même protéine (BABICH and NEVINS, 1981),

- le changement de promoteur pour la E2 72 K lors du passage du stade précoce au stade tardif. Le promoteur précoce est situé à 75 UG (unité génome) sur la carte génétique, le promoteur tardif est situé à 72 UG.

3. Protéines précoces et leurs rôles

Les produits de traduction des mRNA des zones E1 et E2 sont maintenant bien identifiés. Il n'en est pas de même pour ceux des régions E3 et E4. Dans ces régions, un grand nombre de mRNA a été identifié et seulement quelques protéines leur ont été attribuées (Tableau 5).

Le rôle des protéines synthétisées au stade précoce commence seulement à être élucidé. Ces protéines interviennent dans des mécanismes importants. Outre le rôle que nous venons d'évoquer dans la régulation de la transcription, leurs rôles dans la transformation cellulaire, dans la réplication du DNA viral et dans l'arrêt des synthèses cellulaires viennent d'être clairement établis. Le Tableau 5 résume les fonctions principales attribuées à ces protéines.

Régions	Coordonnées sur la carte génomique	mRNA		Protéines	Forstions
		5' 3'	Taille	Froteines	ronetions
E1A	1,3 - 4,6	r r r	13 S 12 S 9 S	56X, 46K 47K, 40K 28K	 régulation de la transcription : des autres zones précoces des VA-RNA (a) autorégulation
					 transformation cellulaire (immortalisation effet de trans-dominance interséro- typique (c) activation des gènes cellulaires codant pour la protéine majeure induite par choc thermique et pour la Q-tubuline
E1B	4,6 - 11,2	r	22 S 13 S	50K 22K 15 - 19K	 transformation cellulaire liaison à la protéine cellulaire de transformation (P53) activité protéine kinase transportet maturation des mRNA tardifs maintien de l'intégrité du DNA viral et callulaire
E2A	61,7 - 66,5	1		72K	 réplication régulation des gènes précoces transformation épissage des mPNAS tardifs
EZB	11 - 31	1		87K 105K	 réplication virale : précurseur de la protéine terminale (87K) ADN polymérase (105K)
E3	75,5 - 86	r		ер 19К 13 к 14 к	- association aux antigènes d'histo- compatibilité
E4	91,3 - 99	1		11K 25 K (34 K) 14 K	 stimulation de la transcription des zones E2 et E1B (d) fonction requise pour la multiplication du virus associé à l'adénovírus (AAV) arrêt des synthèses cellulaires expression des gènes tardifs

<u>AELEAU 5</u> : Les protéincs précoces et leurs principales fonctions, Le tableau résume les données rassemblée s par AKUSJARVI <u>et al.</u> (1986) et, complétées par les données tirées des références suivantes :

- a) HOERFLER and ROEDER (1985)
- b) SMITH <u>et al.</u> (1985)
- c) DELSERT and D'HALLUIN (1984)
- 1) GODING <u>et al.</u> (1985)





C- Réplication

1. Lieu de la réplication

La réplication du DNA viral commence huit à douze heures après l'infection. Elle se fait au niveau de la matrice nucléaire (YOUNGHUSBAND and MAUNDRELL, 1982). A tout moment de l'infection, le DNA viral est quantitativement lié à la matrice nucléaire, mais sa sensibilité à la DNase l augmente au cours du temps à partir de la 12ème heure après infection (SMITH et al., 1985a).

2. Protéines impliquées

Plusieurs protéines (virales ou cellulaires) sont impliquées dans la réplication du DNA viral.

Les protéines virales sont :

1- le précurseur de la protéine terminale (pTP) qui intervient aussi bien dans le déclenchement que dans l'allongement des chaînes,

2- la DNA polymérase

3- la 72 K qui se lie au DNA simple brin, cette protéine intervient dans le déclenchement (van der VLIET and SUSSENBACH, 1975) et dans l'allongement (van der VLIET et al., 1977).

Les protéines cellulaires sont :

1- le facteur nucléaire l qui est nécessaire au déclenchement de la réplication. La protéine 72 K virale stimule le déclenchement de la réaction en présence du facteur l, mais l'inhibe en son absence (NAGATA et al., 1982).

2- le facteur nucléaire II qui est nécessaire à l'allongement du DNA. Le facteur II purifié contient une activité topoisomérase I (NAGATA et al., 1983).

3. Origine de la réplication

La réplication du DNA peut commencer à l'une ou l'autre des deux extrémités du génome viral. De nombreuses études ont permis la localisation de deux domaines importants pour l'origine de la réplication dans la zone terminale répétitive inversée. Ces domaines contiennent 4 blocs dont la séquence est hautement conservée dans tous les sérotypes (STILLMAN <u>et al.</u>, 1982). Le bloc 1 (les nucléotides de 9 à 18) correspondrait au site spécifique pour la fixation du complexe pTP-polymérase (RIJNDERS et al., 1983).

Les blocs 2, 3 et 4 (les nucléotides de 17 à 48) seraient nécessaires à la fixation <u>in vitro</u> du facteur nucléaire I (NAGATA <u>et al.</u>, 1983 ; GUGGENHEIMER <u>et al.</u>, 1984).

4. Mécanisme

Le début de la réplication nécessite la fixation sur le DNA du complexe pTP-polymérase, de la protéine 72 K et du facteur nucléaire l.

La fixation d'un résidu dCMP sur le précurseur de la protéine terminale permet l'amorce de la réplication : le brin parental non répliqué est déplacé. Ce brin pourrait se circulariser par hybridation des deux séquences terminales inversées et pourrait ainsi être à son tour répliqué (LECHNER and KELLY 1977) (Fig. 6A). Un modèle plus récent permet de schématiser le rôle des différentes protéines (virales et cellulaires) intervenant dans la réplication (GUGGENHEIMER et al., 1984) (Fig. 6B).

D- Phase tardive

1. Transcription et traduction des protéines tardives

Au stade tardif de l'infection sont synthétisées les protéines de structure du virus et des protéines non structurales qui interviennent lors de l'assemblage du virus. A l'exception des protéines IX (codée dans la région E1B) et IVa2 (codée sur le brin I) la transcription des messagers de ces protéines (une douzaine) commence au même promoteur appelé MLP (Major Late Promotor). Les protéines IX et IVa₂ sont considérées comme des protéines intermédiaires puisque leurs mRNA sont détectés dès la 5ème heure après infection (Fig. 5).

a) mRNA des protéines IX et IVa2

Le mRNA de la protéine IX est le seul mRNA parmi les mRNA de l'adénovirus qui ne subirait aucun épissage au cours de sa maturation (ALESTROM et al., 1980). Sa transcription est sous le contrôle de son propre (A)

B



FIGURE 6

Modèles de réplication du DNA de l'adénovirus.

A) Modèle de LECHNER et KELLY (1977) expliquant le mécanisme de déplacement du brin non répliqué.

B) Modèle de GUGGENHEIMER <u>et al.</u> (1984) montrant le rôle des protéines cellulaires et virales dans la réplication.

promoteur situé à l'intérieur de l'intron des mRNA de la région E1B mais posséderait le même site de polyadénylation que les mRNA de E1B.

Le mRNA de la protéine lVa2 possède son promoteur sur le brin I, situé à 210 paires de bases seulement du promoteur MLP (sur le brin r). Les deux promoteurs pourraient entrer en compétition pour les mêmes facteurs transcriptionnels (NATARAJAN <u>et al.</u>, 1984). Comme pour la région E2, il n'existe pas de séquence TATA en amont du site de reconnaissance pour la coiffe.

b) mRNA tardifs synthétisés à partir du MLP

Les mRNA tardifs synthétisés à partir du MLP sont classés en cinq familles (L1 à L5), chaque famille code pour plusieurs protéines. Les mRNA d'une même famille possèdent la même extrémité 3', mais l'extrémité 5' du corps du messager varie (CHOW <u>et al.</u>, 1977 ; MEYER <u>et al.</u>, 1977) (Fig. 5). Les mRNA sont coiffés (GELINAS and ROBERTS 1977) et polyadénylés.

Les mRNA transcrits à partir du MLP sont synthétisés sous la forme d'un long précurseur nucléaire, appelé produit de transcription primaire. Ils possèdent tous à leur extrémité 5' une séquence de deux cents nucléotides provenant de la juxtaposition de trois séquences de tête situées aux positions 16.6, 19.6 et 26.6, le corps du mRNA étant alors rabouté à la troisième séquence (BERGET <u>et al.</u>, 1977 ; CHOW <u>et al.</u>, 1977). La séquence tripartite stimulerait la traduction au temps tardif (LOGAN and SHENK, 1985 ; BERKNER and SHARP, 1985).

Cependant, d'autres séquences de tête peuvent être trouvées dans certains mRNA. Il s'agit de :

- la séquence i qui est située entre la seconde et la troisième séquence de tête, à la position 22 sur la carte génomique (CHOW <u>et al.</u>, 1979). Cette séquence est plus fréquemment trouvée dans les mRNA précoces transcrits à partir du MLP mais est également trouvée dans les mRNA tardifs correspondant aux zones L2, L3, L4, L5 (UHLEN et al., 1982).

- les séquences "x", "y" et "z" qui sont situées respectivement aux positions 76,9-77,3; 78,6-79,1 et 84,1-85,1 sur la carte génomique) et qui peuvent être présentes dans les mRNA de la fibre (CHOW et al., 1979).

La polyadénylation interviendrait lors du clivage du long précurseur (MANLEY et al., 1979). La polyadénylation en un des cinq sites donnés induit

la maturation d'un des mRNA de la famille correspondante. Le site d'épissage étant choisi, la traduction commence au premier codon AUG rencontré (MILLER et al., 1980).

c) Mécanisme d'épissage

L'étude des mRNA tardifs de l'adénovirus a permis la mise en évidence du phénomène d'épissage. La séquence tripartite de tête, notamment, fournit un bon modèle pour la compréhension d'un tel mécanisme.

L'épissage serait un phénomène séquentiel : l'excision du premier intron (entre les deux premières sequences de tête) interviendrait avant l'excision du second (entre les séquences de tête 2 et 3) (KEOHAVONG <u>et al.</u>, 1982 ; MARIMAN <u>et al.</u>, 1983).

Deux petits complexes ribonucléotidiques, les U1 sn RNP et U2 sn RNP interviendraient dans le mécanisme de raboutage (BLACK <u>et al.</u>, 1985 ; KARINER and MANIATIS, 1985). L'extrémité 5' des U1 et U2 RNA seraient importantes. L'extrémité 5' du U1 RNA est complémentaire de l'extrémité 5' de l'intron (LERNER et al., 1980).

L'étude <u>in vitro</u> de l'épissage a permis la mise en évidence de molécules intermédiaires de RNA : ces RNAs ont une structure en lasso. La formation du lasso nécessite l'intervention d'une séquence à l'intérieur de l'intron, côté 3', complémentaire de l'extrémité 5' de l'intron avec la libération du premier exon. Puis, il y a ligature des deux séquences de tête avec excision de l'intron (Fig. 7) (revue par SHARP, 1986).

L'épissage alternatif (qui correspond aux différentes possibilités qu'a un produit de transcription primaire de donner différents mRNA suivant les séquences raboutées) pourrait s'expliquer par des structures secondaires du RNA : par construction de plasmides, SOLNICK (1985) a montré qu'un exon "emprisonné" dans une structure en épingle à cheveux devient optionnel.

2- Transcription et traduction de la fibre

L'étude de la transcription du gène de la fibre est d'un grand intérêt dans la compréhension du mécanisme d'épissage : le pré-mRNA de la fibre correspond à 80 % du génome (soit environ 27000 nucléotides).



BU

FIGURE 7

Mécanisme d'épissage : il y a excision de l'intron (en trait mince) et épissage des deux séquences de tête L1 et L2 (en trait épais) (d'après PADGETT <u>et al.</u>, 1985).

Dans le noyau des cellules infectées, des précurseurs de 35 S et de 28 S du mRNA mature (22 S) de la fibre ont été mis en évidence par hybridation de fragments de DNA correspondant au gène de la fibre avec les mRNA poly A^+ nucléaires (CARLSON and RASKAS, 1980) (Fig. 8).

Il pourrait y avoir un contrôle de la région E4 sur l'accumulation des mRNA tardifs et notamment sur le mRNA de la fibre : la diminution de synthèse des mRNA nucléaires dans le mutant H5 dl 366 est identique pour les cinq régions tardives, mais il y a une forte réduction des mRNA cytoplasmiques des régions L3 et L5 (HALBERT <u>et al.</u>, 1985). Ce mutant possède une grande délétion (2269 paires de bases) dans la région E4. Cette région pourrait jouer un rôle direct ou indirect (éventuellement en complexe avec la E1B-55 K) soit dans la maturation du mRNA, soit dans son transport du noyau au cytoplasme, soit dans sa stabilité dans le cytoplasme.

Le mRNA mature de la fibre contient à son extrémité 5' les trois séquences de tête situées aux positions 16,6 ; 19,6 ; 26,6 sur la carte génomique. En plus de ces séquences de tête, 25 % des messagers de la fibre possèdent une quatrième séquence appelée "y" (78,6 UG - 79,1 UG). On trouve parfois une cinquième séquence appelée "z" (84,7 UG - 85,1 UG). Cette dernière séquence peut être trouvée seule avec les séquences de tête. Une sixième séquence "y" seule ou combinée avec "z" (CHOW and BROOKER, 1978). Le leader i est parfois présent dans les séquences de tête du mRNA de la fibre (UHLEN <u>et al.</u>, 1982). Ces séquences supplémentaires ne semblent pas être des précurseurs cytoplasmiques de la forme mature (LAWRENCE and RAMSEY, 1982). De plus, l'absence ou la présence de la séquence "y" ne semble pas affecter la traduction <u>in vitro</u> du mRNA de la fibre (CUNN <u>et al.</u>, 1978).

Cependant un mauvais épissage in vivo de ce mRNA pourrait être responsable de la restriction d'hôte observée lors de l'infection de culture de cellules de singe (telles que les CV1) par l'adénovirus. KLESSIG et CHOW (1980) ont mis en évidence de longues séguences supplémentaires entre la troisième séquence de tête et la zone codante dans des cellules de singe "×", "V" ou "z" infectées par l'adénovirus. Les séquences seraient indifféremment présentes ou absentes. Cependant, dans une étude plus récente, ANDERSON et KLESSIG (1984) montrent que les séquences "x" et "y" sont absentes des mRNA de fibre synthétisés dans ces cellules : la séquence "y" ne serait pas indispensable mais augmenterait l'efficacité de la traduction in vivo. Le mécanisme d'épissage de la cellule infectée n'est pas en cause puisque les



FIGURE 8

Précurseurs nucléaires du mRNA mature de fibre (d'après CARLSON and RASKAS, 1980)



mRNA poly A⁺ cytoplasmiques isolés de cellules de singes infectées par l'adénovirus et microinjectées dans des cellules de singe sont convenablement traduits (ANDERSON <u>et al.</u>, 1985). Les mRNA de la fibre synthétisés lors de l'infection de cellules de singe pourraient alors être altérés ce qui provoquerait soit une mauvaise présentation des messagers aux ribosomes soit une mauvaise compartimentalisation de ces messagers dans la cellule. Un tel défaut dans la localisation cellulaire des protéines synthétisées a été effectivement observé par CEPKO et SHARP (1983).

3. Les VA-RNA

Deux petits RNA associés au virus, le VA-RNA I et le VA-RNA II sont détectables dès l'étape précoce mais la synthèse du VA-RNA I est considérablement augmentée au stade tardif (SODERLUND <u>et al.</u>, 1976). Ils sont synthétisés par une RNA polymérase de type III (WEINMAN <u>et al.</u>, 1974) qui serait activée par une protéine de la région E1A (HOEFLER and ROEDER, 1985).

Par la construction de mutants possédant soit l'un soit l'autre de ces RNA, THIMMAPAYA et ses collaborateurs (1982) ont montré qu'une carence en VA-RNA I diminue fortement la synthèse protéique. Le VA-RNA I interviendrait dans l'initiation de la traduction (SCHNEIDER <u>et al.</u>, 1984). Il maintiendrait l'activité du facteur elF2 cellulaire (REICHEL <u>et al.</u>, 1985) en inhibant l'activité d'une protéine kinase dépendante d'un RNA double brin qui phosphoryle ce facteur elF2 (SIEKIESKE et al., 1985 ; O'MALLEY et al., 1986).

L'absence de VA-RNA I peut également entraîner une modification quantitative de la transcription des mRNA tardifs. Cependant, la spécificité du mécanisme de raboutage et l'efficacité d'accumulation des mRNA tardifs pourraient dépendre d'une protéine virale tardive puisque l'infection par le virus mutant d'une lignée de cellules HeLa ne possédant pas la kinase qui phosphoryle elF2 permet une production normale des mRNA tardifs (SVENSSON and AKUSJARVI, 1986).

E- Assemblage

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 synthétisé.

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 la capside.

1. Assemblage des capsomères et transport des protéines au noyau

La plupart des polypeptides viraux sont rapidement relâchés des polyribosomes et transportés au noyau dans une période de 3 à 6 minutes (HORWITZ et al., 1969 ; VELICER and GINSBERG, 1970). L'étude de mutants thermosensibles montre que la 100 K, protéine tardive non structurale, intervient dans la trimérisation de l'hexon monomère (FROST and WILLIAMS, 1978 ; OOSTEROM-DRAGON and GINSBERG, 1981). L'emploi d'immunsérum dirigé contre le monomère de l'hexon ou contre la 100 K révèle une étroite relation entre la chaîne polypeptidique de l'hexon et la 100 K. La 100 K interviendrait comme protéine d'échafaudage, en quantité stoechiométrique. Ce processus d'oligomérisation pourrait impliquer la sérine active accessible dans le monomère de l'hexon (DEVAUX and BOULANGER, 1980). L'étude du mutant H5 ts 147 suggère que le pVI pourrait intervenir dans le transport de l'hexon vers le noyau (KAUFMAN and GINSBERG, 1976). D'autre part, le transport de l'hexon est aussi inhibé dans le mutant H2 ts 107 muté dans le gène de la 100 K, ceci pourrait être dû à un défaut dans la structure trimérique de l'hexon du mutant (MORIN and BOULANGER, 1986).

2. Morphogénèse virale

L'assemblage viral a lieu dans le noyau. Il se ferait au niveau de la matrice nucléaire (KHITOO <u>et al.</u>, 1986). Pour comprendre la formation d'une particule infectieuse, des intermédiaires d'assemblage ont été recherchés au cours de l'infection de cellules, tant par du virus de type sauvage (SUNDQUIST <u>et al.</u>, 1973 ; ISHIBASHI and MAIZEL, 1974b ; EDVARDSSON <u>et al.</u>, 1976 ; D'HALLUIN <u>et al.</u>, 1978b ; MONCANY <u>et al.</u>, 1980) que par des mutants thermosensibles bloqués en un stade donné à température non permissive (WEBER, 1976 ; D'HALLUIN et al., 1978a ; MORIN and BOULANGER, 1984). L'ultracentrifugation permet une purification de ces particules intermédiaires. Leur contenu en protéines est analysé en gel de polyacrylamide-SDS. On distingue deux types de protéines : les protéines de la capside ou leurs précurseurs et des protéines non structurales, appelées protéines d'échafaudage, trouvées uniquement dans les intermédiaires d'assemblage.

Plusieurs schémas d'assemblage ont été proposés, le modèle le plus récent est celui de MORIN et BOULANGER (1984) (Fig. 9). D'une manière générale, il est admis que des capsides vides sont d'abord formées, qu'elles contiennent des précurseurs de polypeptides et des protéines d'échafaudage. Puis le DNA viral et les protéines du nucléoïde entreraient soit séparément, soit ensemble. Les protéines d'échafaudage seraient éliminées. L'étape finale de l'assemblage serait le clivage des précurseurs des protéines de la capside.

a) Particules intermédiaires vides

Peu de choses sont connues sur l'assemblage des capsides vides. MORIN et BOULANGER (1984) suggèrent que la 100 K, le pVII et le pVIII pourraient intervenir comme protéines d'échafaudage. D'autre part, PEREIRA et WRIGLEY (1974) ont montré qu'il y a réassociation possible, à bas pH, des "groupes de neuf hexons" en structures à vingt faces, il n'y manquerait que les hexons péripentonaux et les pentons. Ceci suggère que les "groupes de neuf" pourraient s'auto-assembler. Cependant <u>in vivo</u>, d'autres protéines telles que le IIIa, la base du penton, la fibre et le pVIII sont trouvées dans les capsides vides. Un mécanisme plus complexe que l'auto-assemblage doit donc contrôler la formation de la capside. D'autre part, l'absence d'arginine dans le milieu de culture entraîne la chute de la production virale (EVERITT <u>et al.</u>, 1971). II a récemment été montré que la carence en arginine réduit fortement la N-acétylation des protéines virales (AUBORN and ROUSE, 1984).

b) Encapsidation du DNA

L'entrée du DNA dans la capside a principalement été étudiée grâce aux sérotypes du sous-groupe B. En effet, ceux-ci sont caractérisés par la production d'une grande quantité de particules intermédiaires.



Schéma d'assemblage d'après MORIN et BOULANGER (1984) : les protéines structurales sont synthétisées dans le cytoplasme protéines d'échaffaudage) et en DNA. Le clivage des précurseurs des protéines structurales constitue la dernière étape de la de la cellule infectée, et transportées rapidement au noyau. Des particules intermédiaires vides sont d'abord formées, puis le DNA est encapsidé. Les différentes particules intermédiaires se distinguent par leur contenu en protéines (protéines structurales ou maturation. Des mutants thermosensibles qui ont permis la mise en évidence de certaines étapes sont indiquées.



Environ 10 % du DNA synthétisé est encapsidé. L'encapsidation se ferait par l'extrémité gauche du génome. En effet. cette extrémité est différentes classes préférentiellement retrouvée dans les de particules de l'adénovirus 7 (TIBBETTS, 1977 ; BROWN and WEBER, intermédiaires 1977). De plus, lors de l'incubation in vitro de capsides vides de l'adénovirus 3 et de DNA, il y a encapsidation par l'extrémité gauche (TIBBETTS and GIAM, 1979). HAMMARKJOLD and WINBERG (1980) montrent que la séquence s'étendant du nucléotide 290 à 390 à partir de l'extrémité gauche est nécessaire à l'encapsidation.

Cependant, cette séquence n'est pas indispensable pour l'encapsidation de DNA plasmidique par des particules vides de l'adénovirus 3 mais elle assurerait une meilleure protection vis-à-vis des nucléases cellulaires (KOSTURKO and VANECH, 1986).

Encapsidation et réplication du DNA viral semblent liées : des particules virales de l'adénovirus 5, directement liées au DNA en cours de réplication ont été visualisées par microscopie électronique (MONCANY <u>et al.</u>, 1980). Ceci pourrait correspondre à l'encapsidation du DNA viral en cours de synthèse. Des études sur l'effet de la novobiocine (D'HALLUIN <u>et al.</u>, 1980), l'étude de mutants thermosensibles (WEBER <u>et al.</u>, 1985) montrent une relation entre la synthèse de DNA et l'assemblage viral.

c) Clivage des précurseurs

L'obtention de particules virales infectieuses nécessite le clivage des précurseurs des protéines tardives. Dans les particules intermédiaires, on ne trouve que les précurseurs, tandis que les produits de clivage sont trouvés dans le virus immature H2 <u>ts</u> 1, bloqué au stade de jeune virion (WEBER, 1976). C'est une endoprotéinase virale, codée par la région L3 qui interviendrait dans le processus (HASSEL and WEBER, 1978 ; AKUSJARVI <u>et al.</u>, 1981 ; YEH-KAI <u>et al.</u>, 1983). Elle couperait spécifiquement aux liaisons Gly-Ala (TREMBLAY et al., 1983).

_ 54 _ TRAVAUX PERSONNELS

Les travaux personnels sont présentés sous forme de deux chapitres. Le premier concerne la fibre de l'adénovirus 2 de type sauvage tandis que le deuxième se rapporte à l'étude de la fibre d'un mutant thermosensible de l'adénovirus 2 : le mutant H2 <u>ts</u> 125, qui, à température non permissive ne synthétise pas de fibre antigénique et dont l'assemblage est bloqué au stade de particules intermédiaires vides.

Quand un travail a donné lieu à une publication, celle-ci est annexée en fin de chapitre. Les lecteurs pourront y trouver des compléments d'information. Seules les illustrations importantes pour la compréhension du travail sont incorporées dans le texte, avec également les figures des travaux non publiés.

<u>CHAPITRE I</u>

ETUDE DE LA FIBRE DE L'ADENOVIRUS DE TYPE 2

(Annexes : 1, 2, 3, 4)

A- Introduction

Les adénovirus sont les seuls virus animaux à posséder des projections apicales. En effet, aux douze sommets de la capside se trouvent les pentons constitués par l'assemblage de deux protéines : la base du penton et la fibre, cette dernière possédant une structure ressemblant à une antenne (VALENTINE and PEREIRA, 1965). Le penton joue un rôle fonctionnel important pour le virus et notamment dans les étapes très précoces de l'infection :

- la fibre, en se liant au récepteur cellulaire, permet la pénétration virale (PETTERSSON et al., 1968),

- la base du penton assurerait la lyse des endosomes (SETH <u>et al.</u>, 1984a),

 le penton, lors du déshabillage du virus, pourrait jouer un rôle important (perte de quelques pentons, déstabilisation ou modification conformationnelle) (LONDBERG-HOLM and PHILIPSON, 1974).

~ la base du penton exerce un effet cytotoxique sur les cellules infectées.

La fibre a été le sujet de nombreuses études. Elle a été purifiée, cristallisée et son gène a été séquencé. Notre travail vient compléter les connaissances au sujet de cette protéine tant par l'étude de son assemblage avec la base du penton que par une caractérisation plus structurale (polarité, glycosylation, variation de sa migration en gel-SDS suivant son degré de dénaturation).

Le premier problème que nous avons abordé est celui de l'assemblage de la fibre avec la base du penton. En effet, l'assemblage de ces deux protéines 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 peut être purifié à partir des antigènes solubles. La base est dissociable de la fibre en tampon guanidine-HCl (NORRBY and SKAARET, 1967), formamide (NEURATH <u>et al.</u>, 1968), pyridine 8 % (PETTERSSON and HOGLUND, 1969) et désoxycholate de sodium (DOC) 0,5 % porté à 56° C, (BOUDIN <u>et al.</u>, 1979). La liaison entre ces deux protéines n'est donc pas covalente. Il nous a semblé intéressant d'étudier cette association et de déterminer les caractéristiques qui gouvernent cet assemblage. Dans ce but, la dissociation du penton complet par des anticorps anti-fibre ainsi que l'asemblage <u>in vitro</u> des deux protéines (fibre et base du penton purifiées) en penton complet ont été étudiés. L'assemblage <u>in vitro</u> permet d'étudier un type donné d'interaction entre deux protéines distinctes.

Lors de cette étude, des digestions enzymatiques à l'aide de la carboxypeptidase Y semblaient impliquer l'extrémité C-terminale de la fibre dans la liaison avec la base. Cette orientation de la fibre par rapport à la capside virale a été controversée par un modèle établi sur des prédictions de structure secondaire (GREEN et al., 1983).

Afin de lever l'ambiguité au sujet de la polarité de la fibre, nous avons utilisé des sérums dirigés contre des peptides correspondant aux extrémités de cette protéine. Le but était de déterminer la capacité de reconnaissance de la fibre libre, ou engagée dans la base du penton, par les deux sérums. Un des sérums contre l'une des extrémités pouvait également inhiber l'adsorption et la pénétration virale en masquant le site de fixation de la fibre sur le récepteur cellulaire soit directement soit indirectement par encombrement stérique.

Afin de compléter la connaissance structurale de la fibre, nous nous sommes également intéressée à la glycosylation de cette protéine. En effet, la fibre est connue pour être la seule protéine tardive glycosylée de l'adénovirus. Elle peut être marquée par de la glucosamine radioactive et la liaison protéine-sucre serait alcali-labile (ISHIBASHI and MAIZEL, 1974a). Mais la structure et le rôle du glycanne n'étaient pas déterminés. Nous avons entrepris de caractériser davantage ce(s) chaînon(s) glycannique(s). Une étude comparative avec les fibres d'adénovirus d'autres sérotypes a été également entreprise.

Enfin, le dernier point abordé concerne la variation de la migration de la fibre en gel-SDS suivant les conditions de dénaturation. La fibre est une protéine hautement asymétrique (LEMAY and BOULANGER, 1980). La structure doit être maintenue par des liaisons très fortes. La résistance de certaines structures aux agents dénaturants peut être visualisée par l'étude de la migration de la protéine en gel-SDS suivant les conditions, et donc probablement l'efficacité, de la dénaturation. Normalement, une protéine totalement dénaturée migre dans un gel de polyacrylamide-SDS uniquement en fonction de sa masse moléculaire. Nous avons montré que les conditions classiques de dénaturation (urée 3 M, SDS 2,5%, mercaptoéthanol 5 %, 100° C, 2 min) ne semblent pas suffisantes pour abolir toute structure et que la migration de certaines protéines (notamment la fibre) en gel de polyacrylamide-SDS peut être influencée par les méthodes de dénaturation. Ce phénomène a également été observé pour d'autres protéines structurales du virus.

B- Dissociation du penton complet en ses deux composants sous l'effet d'anticorps anti-fibre (Annexe 1)

Les anticorps dirigés contre la fibre de l'adénovirus ont le pouvoir de dissocier le penton en ses deux composants. En immunoélectrophorèse bidimensionnelle, le penton se présente sous forme de deux pics superposés, le premier correspond à la base du penton, le second à la fibre. Ces deux pics sont bien distincts : aucune ligne antigénique ne relie les deux protéines. Si une bande d'agarose supplémentaire contenant des anticorps anti-fibre est placée entre le dépôt et l'agarose contenant des anticorps anti-adénovirus, toute la fibre du penton est retenue par les anticorps anti-fibre, tandis que la base est entièrement retrouvée dans la seconde bande d'agarose.

Les résultats d'immunoprécipitation du penton complet par la protéine A de <u>Staphylococcus aureus</u> avec le sérum anti-fibre confirment ce premier résultat. La quantité de base du penton immunoprécipitée avec la fibre par le sérum anti-fibre diminue quand les quantités de sérums utilisées augmentent. La base du penton dissociée par les anticorps anti-fibre et relâchée dans le surnageant lors de la première immunoprécipitation peut être retrouvée par une seconde immuno-précipitation à l'aide d'un sérum anti-base du penton.

C- Assemblage in vitro de la base du penton et de la fibre (Annexe 2)

1. Purification des protéines

La cellule infectée par l'adénovirus synthétise en grand excès des protéines virales appelées "antigènes solubles". Ceux-ci servent de matériel de départ pour la purification d'un grand nombre de protéines, et notamment de la fibre et de la base.

La fibre a été isolée à partir du mélange protéique viral synthétisé par le virus de type sauvage. Il est plus difficile de purifier la base du penton seule, non assemblée, ceci pour deux raisons : 1) on trouve peu de base libre dans les extraits de cellules infectées par le type sauvage ; 2) la base du penton seule et le penton complet ont le même comportement dans les différentes chromatographies employées. C'est pourquoi nous avons choisi de purifier la base à partir des antigènes solubles synthétisés à température non permissive (39° C) par le mutant H2 ts 125. Ce mutant ne synthétise pas de fibre stable à

39° C et donc pas de penton complet, la base libre se trouve alors en grande quantité.

La fibre et la base du penton ont donc été purifiées à partir des antigènes solubles obtenus après lyse des cellules infectées par le virus de type sauvage ou par le mutant H2 ts 125. Le protocole de purification utilisé pour les deux protéines est identique, seules les conditions d'élution changent. En résumé, des chromatographies sur colonnes de DEAE-Sephadex et d'hydroxylapatite ainsi que des précipitations à 55 % de saturation en sulfate d'ammonium permettent d'obtenir un degré de pureté satisfaisant : il n'y a pas de contaminants apparents en analyse sur gel de polyacrylamide-SDS (BOULANGER and PUVION, 1973 ; BOUDIN et al., 1979).

2. Assemblage in vitro

L'assemblage <u>in vitro</u> en penton complet des deux protéines purifiées s'est fait dans des conditions "standards" : incubation du mélange des deux protéines à 4° C, pendant une nuit.

Plusieurs moyens étaient à notre disposition pour déceler l'assemblage des deux protéines :

1) L'immunoélectrophorèse bidimensionnelle selon la technique de LAURELL (1965), modifiée par WEEKE (1973) qui permet de visualiser la formation du penton complet et d'évaluer, de manière simple, la quantité de protéines assemblées. Cette association se traduit par l'apparition d'un double pic dont le composant base du penton est relié à la base du penton libre et le composant fibre à la fibre libre (Fig. 10A).

2) Le gel de polyacrylamide en milieu non dénaturant : le penton complet apparaît sous la forme d'une troisième bande de migration différente de celle de la base du penton et de la fibre (Fig. 10B). La relative diffusion des bandes et la nécessité d'utiliser un densitomètre pour la quantification du complexe formé, nous ont fait renoncer à l'utilisation systématique de cette technique.

3) L'immunoprécipitation par la protéine A de <u>Staphylococcus aureus</u> du mélange d'incubation avec du sérum anti-base du penton : cette méthode a été plus particulièrement employée pour calculer la constante d'affinité de la fibre et de la base du penton.

FIGURE 10 : Assemblage in vitro de la base du penton et de la fibre

A) immuno-électrophorèse bidimensionnelle :

a : assemblage <u>in vitro</u> avec des quantités équivalentes de fibre et de base du penton. Le pic 1 correspond à la base du penton non assemblée, le pic 2 à la fibre liée à la base du penton, le pic 3 à la base du penton liée à la fibre, le pic 4 à la fibre libre.

- b : assemblage in vitro en excès de base du penton
- c : assemblage in vitro en excès de fibre
- d : autoradiographie de la plaque c où la fibre utilisée est radioactive
- B) Gel non dissociant. La piste a correspond à la fibre, la piste b à la base du penton, les pistes c,d,e à l'assemblage <u>in vitro</u> de la base du penton avec respectivement 7,5 ; 5 et 2,5 µg de fibre, la piste f au penton complet.

2) Le gel de pelvacrylanide en milieu nen dénetirent : le genteh complet apparaît sous la forme d'une troisiéme béride de migration différente to calte de la basa du gentor et de la fibre l'Eig 1981. La retative di fueton des bandes et a necessité d'atiliser un densitomètre nour la quéréfication du complete fatalé, nous ens foir renoncér à l'utilisation exercentiqué de ceste technique. Il d'une unopréficien par la constitué de ceste technique du de la fatalé, de la mélange d'acubation evec du seren estituése du parter cette mélimété de la tet de la genterie d'atiliser un densitomètre nour la quéréfication du complete fatalé, nous ens foir renoncér à l'utilisation exercision et de ceste technique. Il d'une parterier établiser du seren estituéses du parter cette mélimété de la tet de la pass du parterier en cour relevier la constante d'efficient de la fibre et de la pass du parteri.



La comparaison approfondie du penton formé dans la cellule et celui formé <u>in vitro</u> nous a permis de nous assurer que la liaison entre la base du penton et la fibre <u>in vitro</u> se fait de manière spécifique : la microscopie électronique, la constante de sédimentation, le pHi, la sensibilité à la carboxypeptidase Y, les tests d'hémagglutination indirecte ont révélé l'identité structurale, biochimique et physiologique des deux molécules.

La fibre a une forte affinité pour la base du penton. Une étude cinétique montre que le complexe se forme dans les deux premières minutes l'incubation. Cette réaction est réversible : en mélangeant de la fibre marquée à un extrait cellulaire infecté froid, la fibre du penton complet est révélée en autoradiographie, alors que le taux de penton complet est identique. Il y a donc échange de fibre marquée et de fibre froide et non pas formation de nouveaux pentons. La constante de dissociation de la réaction a été calculée par des protéine Α radioactivité retenue par la de expériences mesurant la Staphylococcus aureus en présence de sérum anti-base du penton et du mélange base froide - fibre marquée par la $({}^{14}C)$ -Valine . Une constante de 2.10⁻⁷ M en terme de molarité de fibre a été trouvée. La valeur de cette constante reflète une haute affinité des deux protéines l'une pour l'autre.

Les conditions optimales nécessaires à l'assemblage de la base du penton et de la fibre ont été recherchées. L'efficacité de l'assemblage est la même sur une large gamme de pH (5,5 à 9) et de force ionique (50 mM à 1 M NaCl). La présence de triton X100 (1-2 %) n'altère pas non plus l'interaction des deux protéines sauf si on porte le mélange à une température de 56° C pendant 90 secondes. Le DOC inhibe complètement la réaction même à froid, or les protéines puisqu'elles sont révélées en conservent leurs sites antigéniques immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Les détergents doivent donc intervenir, soit directement dans le site d'assemblage, soit en un site assez proche pour qu'il y ait répercussion des perturbations locales sur le site d'assemblage.

La reconnaissance des deux protéines met en jeu des régions hautement conservées pour les différents virus d'un même sous-groupe. En effet, les deux protéines de deux virus différents (telles que la base du penton de l'adénovirus 2 et la fibre de l'adénovirus de type 5) sont capables de s'associer. L'existence de recombinants intersérotypiques viables possédant la base d'un sérotype donné et la fibre de l'autre confirme ce résultat (D'HALLUIN et al., 1982).

3. Modification antigénique de la fibre

Certaines expériences ont permis de mettre en évidence une divergence dans la réponse antigénique de la fibre liée ou non. S'il existait une parfaite concordance antigénique entre la fibre assemblée et la fibre libre, on devrait observer une parfaite continuité des deux arcs de précipitation obtenus avec les deux types de fibres (libre ou liée) en immunoélectrophorèse bidimensionnelle. Or, une ligne supplémentaire de précipitation antigène--anticorps apparaît pour la fibre liée au penton (Fig. 11). Cette ligne est souvent masquée par la retombée du pic de la base du penton associée. Elle est cependant visible dans le cas où la base, en quantité minoritaire par rapport à la fibre, est totalement assemblée. Elle est plus facilement visible sur l'autoradiographie d'une plaque d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle d'un assemblage in vitro où seule la fibre est radioactivement marquée. Cette ligne de précipitation traduit donc une différence dans la réponse antigénique de la fibre assemblée ou non. L'apparition de ce (ou ces) nouveau(x) site(s)antigénique(s) peut(peuvent) correspondre à une modification structurale de la fibre, probablement dans ou à proximité de la région impliquée dans la liaison avec la base.

4. Extrémité de la fibre impliquée dans l'assemblage

La digestion par la carboxypeptidase Y du penton, dissocié ou non par le DOC en ses deux composants, semble impliquer l'extrémité C-terminale de la fibre dans l'assemblage avec la base. Avec ou sans traitement au DOC, la base du penton complet est hydrolysée de façon identique par la carboxypeptidase Y. Par contre, la fibre est hydrolysée plus rapidement quand elle est dissociée de la base du penton : l'hydrolyse pour un rapport enzyme/ substrat de 2 % (poids/poids), commence après 1 à 2 h d'hydrolyse à 37° C quand le penton est traité au DOC et est totale après 8 h ; tandis que pour un penton natif un début d'hydrolyse est seulement observé après 24 h d'incubation avec l'enzyme (Fig. 12). Dans le penton complet, la fibre semble protégée de l'hydrolyse enzymatique par la base et ne devient accessible qu'après hydrolyse de cette dernière.

Ceci semble être confirmé par l'étude de l'assemblage <u>in vitro</u> de la base avec de la fibre traitée à la carboxypeptidase Y. Dans ce cas, aucune formation de penton complet n'est observée.





FIGURE 11 : Modification antigénique de la fibre

- a) Un déterminant antigénique supplémentaire apparaît lors de l'assemblage de la fibre avec la base du penton (déterminant 4).
- b) et c) : Profils théoriques des plaques d'immuno-électrophorèse bidimensionnelle que l'on devrait obtenir si on a respectivement perte ou gain d'un motif antigénique sur la fibre lors de son assemblage.



FIGURE 12

Cinétique d'hydrolyse par la carboxypeptidase Y du penton, non dissocié (panneau A) ou dissocié au DOC (panneau B). Le rapport enzyme/substrat est de 2 % (poids/poids). Les échantillons sont prélevés au temps : 1 min (piste a), 2 min (b), 5 min (c), 10 min (d), 30 min (e), 1 h (f), 2 h (g), 4 h (h), 8 h (i) et 24 h (j). La fibre est plus rapidement hydrolysée par l'enzyme quand le penton est dissocié.

V : virus témoin.

Des activités contaminantes dans des préparations de carboxypeptidase Y ont été décrites. LEE et RIORDAN (1978) décrivaient une contamination protéolytique inhibée par la pepstatine A. Cependant, la présence de cet inhibiteur dans le milieu d'incubation n'inhibait pas l'hydrolyse de la fibre. Depuis, une autre activité endoprotéasique semblable à celle de la trypsine a été décrite (CARLSEN and CHRISTIANSEN, 1985). De plus, nos résultats ont été peu après controversés par un modèle structural de la fibre (voir discussion). Pour résoudre le problème ainsi posé par la polarité de la fibre, une étude à l'aide d'anticorps dirigés contre des peptides correspondant aux deux extrémités de la fibre semblait donc indispensable.

D- Polarité de la fibre

Dans le but d'étudier la polarité de la fibre, des peptides synthétiques correspondant aux treize premiers et aux douze derniers acides aminés de la chaîne polypeptidique ont été synthétisés. Ces peptides ont été couplés à l'anatoxine tétanique par traitement au glutaraldéhyde et seront notés N_{TT} et C_{TT} . Les peptides couplés ont été injectés à des lapins. Deux sérums ont été obtenus : le sérum anti- N_{TT} correspond à l'extrémité N-terminale de la molécule et le sérum anti- C_{TT} correspond à l'extrémité C-terminale. Ces sérums reconnaissent le peptide correspondant en test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Les titres obtenusétaient de 1/6400 pour les deux sérums.

Le peptide N est également reconnu par un sérum anti-fibre total. La réponse de ce sérum avec le peptide C est plus faible. Ceci montre que la fibre injectée à un lapin peut induire la formation d'anticorps dirigés contre l'extrémité N. Celle-ci serait donc naturellement exposée et antigénique. La réponse obtenue avec le peptide C est moins nette. Ceci pourrait s'expliquer par la nature assez hydrophobe de cette extrémité.

Par test ELISA ou bien par immunotransfert, on montre que les deux sérums anti-peptide reconnaissent la fibre native. Le titre des sérums contre la protéine fibre en test ELISA est de 1/3200 pour chacun des sérums. Ces deux sérums sont également capables de reconnaître la fibre de l'adénovirus de type 5. La fibre de virus d'autres sérotypes (3,4,9) n'a pu être révélée par immunotransfert avec ces sérums. Ceci confirme la grande homologie qui existe entre les sérotypes 2 et 5 qui appartiennent au même sous-groupe (C) et révèle une hétérogénéité au niveau de la fibre d'autres sérotypes du moins en ce qui concerne les extrémités de la protéine.

- 1- Liaison avec la base du penton
 - a) approche directe

Dans le but de déterminer l'accessibilité des extrémités de la fibre dans le penton complet et donc d'orienter la protéine par rapport à la capside virale, la reconnaissance du penton complet par les deux sérums antipeptide a été recherchée. Après migration d'antigènes solubles viraux sur gel non dénaturant et transfert sur nitrocellulose, le sérum anti-C $_{TT}$ permet de détecter de la même manière la fibre seule et le penton complet. Le sérum anti-N_{TT} détecte préférentiellement la fibre seule à basse concentration (Fig. 13). Ceci semble impliquer une liaison avec la base du penton par l'extrémité N de la fibre bien qu'à plus haute concentration le sérum anti-N_{TT} révèle la fibre et le penton. Ceci pourrait être dû à une légère dénaturation du penton lors de sa fixation sur la feuille de nitrocellulose rendant ainsi la fibre du penton accessible aux anticorps anti-NTT. L'interaction de l'extrémité N de la fibre avec la base du penton devait donc être confirmée. Ceci fut fait par un autre type d'expérience : la dissociation du penton en ses deux composants sous l'effet du DOC modifie la réponse des anticorps en test ELISA. En effet, une nette augmentation de la densité optique avec le sérum anti-N_{TT} est observée quand le penton est dissocié. Cet effet n'est pas obtenu avec le sérum anti-CTT (Fig. 14B). Le DOC seul n'est pas suffisant pour provoquer la modification de la réponse avec le sérum anti-N $_{TT}$: la fibre traitée ou non au DOC est révélée de la même façon par les deux sérums (Fig. 14A). Le sérum anti-N_{TT} semble donc capable de reconnaître légèrement le penton complet en test ELISA, mais la dissociation du penton en ses deux composants par le DOC favorise nettement la fixation des anticorps anti- N_{TT} .

b) approche indirecte (Annexe 3)

Quand le modèle théorique de la fibre, établi d'après les données de prédiction de structure secondaire, est venu controverser la polarité que nous avions déterminée, les auteurs ont avancé l'hypothèse d'une contamination enzymatique de la carbopeptidase Y utilisée (GREEN <u>et al.</u>, 1983). Afin de vérifier cette hypothèse une cinétique d'hydrolyse du penton, dissocié ou non,

Sec. 1





FIGURE 13

Révélation de la fibre (F) ou du penton complet (P) par les différents sérums.

Les antigènes viraux sont déposés sur un gel non dénaturant, transférés sur une feuille de nitrocellulose et révélés par différents sérums, dilués au 1/1000 : a : sérum anti-base du penton, b : sérum anti-fibre, c et d : sérum anti-N_{TT}, employé au 1/1000e et au 1/200e, e et f : sérum anti-C_{TT}, employé au 1/1000e et au 1/200e.



FIGURE 14

Reconnaissance en test ELISA de la fibre (panneau A) et du penton (panneau B), traité ou non par le DOC, par le sérum anti- N_{TT} (symboles noirs) et le sérum anti- C_{TT} (symboles clairs).

- o,⊽: traitement au DOC
- ▼: sans traitement au DOC
- •, 0 : sérum anti-N_{TT}
- ▼, ▽: sérum anti-C_{TT}

a été refaite avec ce même enzyme et l'extrémité de la fibre hydrolysée dans nos conditions a été recherchée à l'aide des sérums antipeptide. La fibre hydrolysée avait la même réactivité vis-à-vis de l'anticorps anti- C_{TT} que la fibre de 62 K, et une réactivité fortement diminuée vis-à-vis du sérum anti- N_{TT} (Fig. 15). Ainsi, la dégradation observée proviendrait donc effectivement d'une activité enzymatique contaminante qui agirait dans la région N-terminale de la protéine. Il s'agirait d'une activité de type chymotrypsique. L'extrémité protégée par la base dans le penton complet serait donc l'extrémité N-terminale.

Un autre type d'expérience impliquait également l'extrémité N-terminale de la fibre dans l'interaction avec la base du penton : la base du penton ne peut pas s'assembler <u>in vitro</u> avec de la fibre spontanément hydrolysée. La fibre est, en effet, capable de s'hydrolyser spontanément par son extrémité N-terminale entre les acides aminés 17 et 18 (C. DEVAUX, EMBL, Grenoble). Cette expérience est à rapprocher de celle faite avec la fibre traitée à la carboxypeptidase Y, décrite précédemment lors de l'assemblage in vitro.

La révélation par un sérum anti-fibre total des produits de clivage chimique de la fibre aux liaisons acide aspartique-proline (HCI 10 mM) fournit un autre argument en faveur d'une telle orientation. En effet, une protéine hydrolysée peut être ou reconnue par le dénaturée ou non sérum K correspondant aux correspondant. Or, seule une bande de 44 2/3 N-terminaux de la fibre est fortement révélée après hydrolyse en milieu faiblement acide (Fig. 16). Les autres bandes (34 K, 20 K et 15 K) sont peu ou pas révélées par ce sérum. Les 2/3 N-terminaux de la fibre conserveraient donc une certaine intégrité antigénique et structurale. Ceci est compatible avec la structure en bâtonnet assignée à cette partie de la molécule dans le modèle de GREEN et al. (1983). De plus, un sérum dirigé contre la fibre de l'adénovirus 5 révèle surtout le fragment d'hydrolyse partielle de 44 K. Or, les déterminants sous-groupes spécifiques sont localisés sur la partie en bâtonnet de la fibre native (voir Tableau 4 dans les généralités). Ceci est donc compatible avec une structure en bâtonnet pour ce fragment de 44 K, correspondant aux 2/3 N-terminaux de la fibre.

2. Liaison avec le récepteur cellulaire

La première étape de l'infection virale débute par l'adsorption du virus sur la cellule hôte par l'intermédiaire de la fibre. L'une des extrémités de la fibre pouvait-elle être impliquée dans ce phénomène et en particulier l'extré-



FIGURE 15

Révélation par les sérums anti- N_{TT} (panneaux A et C) et anti- C_{TT} (panneaux B et D) des produits d'hydrolyse du penton, non dissocié (panneaux A et B) ou dissocié au DOC (panneaux C et D). Les échantillons sont prélevés au temps 0 (piste a), 2 (b), 5 (c), 10 (d), 30 min (e), 1 h (f), 2 h (g), 4 h (h), 6 h (i), 24 h (j). V : virus témoin.




FIGURE 16

Révélation par un sérum anti-fibre de l'adénovirus 2 de la fibre hydrolysée par l'acide chlorhydrique 10 mM

- autoradiographie de la fibre clivée a-
- révélation par le sérum anti-fibre de l'adénovirus 2 b-
- révélation par le sérum anti-fibre de l'adénovirus 5 c-
- révélation par le sérum anti-N $_{TT}$ d-
- révélation par le sérum anti-C_{TT} e-

- 73 -

mité C-terminale (l'extrémité N-terminale semblant réagir avec la base du penton) ?

- 74 -

Aucune des deux extrémités ne semble être impliquée dans la reconnaissance du récepteur cellulaire :

- les peptides préincubés avec les cellules avant infection ne perturbent pas la production virale mesurée par titrage en immunofluorescence. Il n'y a donc pas saturation des sites récepteurs.

- l'adsorption et la pénétration virales ne semblent pas être perturbées lorsqu'il y a préincubation du virus avec les sérums anti-peptide ou leurs anticorps purifiés avant infection. Cependant, le virus complexé avec les immunoglobulines anti-N_{TT} et anti-C_{TT} perd une partie de son infectivité, comme il a été montré par titrage en immunofluorescence de la production virale (Fig. 17). Avec les immunoglobulines anti-N_{TT}, le virus perd 70 % de son infectivité par rapport au virus incubé avec des immunoglobulines provenant du sérum d'un lapin non immunisé. Avec les immunoglobulines anti-C_{TT}, on observe une chute de 50 % du pouvoir infectieux. Les immunoglobulines ne semblant pas inhiber l'adsorption et la pénétration virale, l'effet observé sur l'infectivité pourrait avoir lieu à une étape postérieure (rupture de l'endosome, décapsidation) à moins que les anticorps dirigés contre la protéine porteuse (toxine tétanique) ne soient responsables de cet effet. Aucune des deux extrémités ne semble donc impliquée dans la liaison avec le récepteur cellulaire.

E- La glycosylation

Des études de marquage sur cultures cellulaires ont permis de mettre en évidence une incorporation de (14 C)- ou (3 H)-glucosamine par la fibre de l'adénovirus 2. Aucun autre monosaccharide tel que le galactose ou le mannose n'a pu être incorporé.

Ces expériences suggéraient l'existence de chaîne(s) glycannique(s) dans la molécule ; la N-acétyl-glucosamine (GlcNAc) étant indifféremment rencontrée dans les chaînes O-ou N-glycanniques (MONTREUIL, 1982). Dans les N-glycosyl protéines, la N-acétyl-glucosamine assure notamment le point d'ancrage de la chaîne oligosaccharidique sur la protéine. Plus récemment, une liaison de type GlcNAc-Ser a également été caractérisée dans certaines glycoprotéines chez le rat (TORRES and HART, 1984 ; HOLT and HART, 1986).



FIGURE 17



Inhibition de la production virale par les sérums. Le virus est incubé avant l'infection avec les immunoglobulines purifiées par passage sur colonne de protéine A sépharose des sérums suivants :

- : sérum anti-N_{TT}
- ▼ : sérum anti-C_{TT}
- : sérum anti-fibre

Le 100 % d'infection est obtenu par titrage de cellules infectées par du virus incubé avec des immunoglobulines non immunes de lapin.

Caractérisation du glycanne

1-

a) évaluation du taux de glucosamine

Après hydrolyse acide de la fibre (HCI 4 N - 24 h) et passage sur analyseur d'acides aminés, un pic correspondant à la glucosamine a été obtenu. Aucun pic correspondant à la galactosamine n'a été observé (Tableau 6). Le nombre de micromoles de glucosamine par gramme de protéine a pu être déterminé. Ceci permet d'estimer à un le nombre de résidus de glucosamine par chaîne polypeptidique. Cependant, si on considère le rapport entre le taux de glucosamine et celui des acides aminés dont le pourcentage estimé par la méthode correspond au pourcentage théorique établi d'après la séquence, et connaissant le nombre de chacun de ces acides aminés par chaîne polypeptidique on peut estimer à 4 le nombre de glucosamine par polypeptide.

b) composition monosaccharidique

La fibre, préalablement lavée par plusieurs précipitations successives (éthanol 50 %), est soumise à une méthanolyse acide (méthanol/HCl 0,5 N, 80°C, 24 h). Les monosaccharides libérés sont ensuite analysés en chromatographie en phase gazeuse sous forme de leurs dérivés trifluoroacétates selon la méthode de ZANETTA <u>et al.</u> (1972). Les résultats obtenus par cette méthode montrent la seule présence de N-acétyl-glucosamine et de glucose dans les rapports 1/4. La présence de N-acétyl_glucosamine a par ailleurs été confirmée par hydrolyse acide (acide trifluoroacétique 4 N, 4 h, 100° C), et analyse des monosaccharides libérés par chromatographie couche-mince (silicagel 60, solvant n-butanol/acide acétique/H₂O : 2:1:1).

Si l'on admet que le glucose est un contaminant fréquemment rencontré dans les préparations des protéines purifiées par gel-chromatographie, la fibre ne semble renfermer que de la N-acétyl glucosamine pour tout monosaccharide.

c) nature de la liaison

Afin de vérifier le point d'ancrage du ou des résidus de N-acétyl_glucosamine sur la protéine, deux approches ont été utilisées.

Dans un premier temps afin de vérifier l'hypothèse d'une liaison de type N-glycosidique, la protéine a été soumise à une hydrazinolyse

- 76 -

CHROMATOGRAMME: 7 POIDS DE SUBSTANCE HYDRATEE: Ø.225 POIDS SEC: •225 HYDROLYSE: 199 24H S=Ø.5 NMOLES DE NLEU AJOUTEE: 10 CODE NØ S NM MICROMOL. GR. RES * PAR GR. P. CENT RESIDU ASP. 8 10.2552 12.54 43.306 243-51 2.803 THR. 9 8 . 5514 32.719 183.98 1.860 9.48 SER. 10 8.6479 20.833 117-15 6.03 1.020 GLU. 14 7-8696 29.422 165+45 2.136 8.52 PRO -17 1.5928 19.563 110.00 1.068 5.67 GLY. 19 10.9274 24 . 156 135+83 0.774 7.00 ALA. 21 6.3599 25.209 141 - 75 1.008 7.30 VAL. 23 5 • 3736 25.977 146.07 1.446 7.52 CYS2 24 0.5735 3.417 19.21 0.196 0.99 MET. 25 2.2364 8.110 45.60 ؕ598 2.35 GLCN 26 0.6771 2.612 14-69 0.263 ILE. 30 4-3183 19 . 268 108.35 1.226 5+58 LEU. 31 9.9540 33.050 185.84 2.104 9.57 NLEU 32 2.0422 7.904 TYR. 33 2.9156 9.894 55.64 0.908 2.87 34 HE. 3.5998 12.041 0.997 67-71 3 - 49 LYS. 55 7.7891 22.910 128.83 1.652 6.63 HIS- 57 1 • 48 68 4.630 26.04 0.357 1.34 ARG 64 2.8592 10.797 60.71 0.948 3-13 345.302 1941+68 21.102 100.00

TABLEAU 6 : Passage sur analyseur d'acides aminés de la fibre hydrolysée par l'acide chlorhydrique 4 N, 24 h.

ECHANTILLON: | FWT 66 A |.

(MICHALSKI et al., 1984). Aucun oligosaccharide ou monosaccharide n'a pu être libéré par ce procédé.

Dans un second temps la protéine a été soumise à une β -élimination (NaOH 0,05 M, BH₄K 1 M, 37° C, 48 h). Après gel-filtration un pic de radioactivité micromoléculaire a pu être détecté, ce pic a été concentré, et chromatographié sur papier Whatman 3 (n-butanol/acide acétique/H₂O:4:1:5) par rapport à des témoins de di_N,N'-acétyl-chitobiositol et de N-acetyl-glucosaminitol. Un pic comigrant avec le N-acétyl-glucosaminitol a pu ainsi être identifié.

2- Affinité pour une lectine

Le test de l'immuno-affino-électrophorèse a été choisi pour chercher la lectine qui posséderait une affinité pour la fibre. Des trois lectines testées, seule la WGA (Wheat Germ Agglutinin) est capable de retarder la migration de la fibre (Tableau 7).

La fibre du virus ou d'un extrait de cellules infectées peut être effectivement révélée par la WGA marquée à la peroxydase, après transfert sur nitrocellulose.

3- Localisation du chaînon glycannique

Par étude des produits de clivage de la fibre, nous avons recherché le ou les sites de glycosylation.

Si les produits d'hydrolyse chimique de la fibre par l'acide chlorhydrique (HCI 10 mM, 56° C, 1 nuit) sont analysés, après transfert, à l'aide de la WGA marquée à la peroxydase, la bande de 44 K et, faiblement la bande de 20 K sont révélées. Si on hydrolyse de la même manière de la fibre marquée à la (¹⁴C)-glucosamine mais après migration sur gel de polyacrylamide-SDS et autoradiographie, on retrouve le marquage de la fibre native principalement au niveau de la bande de 44 K et aussi au niveau de la bande de 20 K lors d'une hydrolyse plus poussée (Fig. 18). La bande de 44 K correspond aux 2/3 N-terminaux de la molécule (voir polarité de la fibre). Les bandes de 34 K et de 15 K correspondant respectivement aux fragments C-terminaux d'hydrolyse partielle et d'hydrolyse totale ne sont pas marquées avec la (¹⁴C)-glucosamine. Il semblerait donc que ce soit le fragment 1/3 N-terminal de la molécule qui soit glycosylé sinon les deux produits d'hydrolyse partielle devraient être (MICHALSMI et al., 1984), Aucun digosaccharida ou annosaccharida n'a jur être

Bana un socond ratios la proteine a site sounisa o une G-élimination (NeOli 6,65 M. Bh_aX 1 M. 37° C. 43 h). Après gel-filtration un pic du radioscurité missionoleculates e pu être délacté, ce pic a été concentro, et chromatographic sussignoire Rhaman 3 (n-butanoifacide acétique/M_GRLIG) par repport a des técsoire de di H.N*-acétyl-chitoblositul et de N-acetyf-plucosculate. Un pic

FIGURE 18

Localisation du(des) chaînon(s) glycannique(s) sur le polypeptide de la fibre

A- Schéma localisant les liaisons Asp-Pro sur la fibre. Les masses moléculaires apparentes des produits d'hydrolyse sont indiquées.

6- Graummill sig Jast al

B- Autoradiographie d'une fibre marquée au (¹⁴C)-formiate (piste a) ou à la (¹⁴C)-glucosamine (piste b) déposée sur gels après hydrolyse en HCl 10 mM. En c), le même échantillon qu'en a) pour un temps d'exposition plus court.

Si ies produkts dihyotolyge chimique de to fibre par focies dijorhydriane itifici ta mit, 55° C. I muni, sond analysis, après transferit, 5 l'àlis de la MGA marquise à la peroxydate, la bande de 44 K et, fabiement is bande de 20 K sont révélées. Si on nydrolyse de la mène manière de la fibre narquise à la si trevelées. Si on nydrolyse de la mène manière de la fibre narquise à la si trevelées, de retrouve le marquege de la fibre getter principalement eu si trevelées de la terrouve le marquege de la fibre getter principalement eu si bande de la K et aussi au divenu de la bande de 20 K lone d'une hydrolyse plut poussie (Fig. 18), Le bande de 14 K correspond aux 10 de la K aurespondant respectivenent eus frande de 44 K correspond aux 10 de la K aurespondant respectivenent eus fragments de la fibre). Les bandes de 14 K al gentielle et d'hydrolyse totale se sont pas marquèses avec la l'¹⁶C optimesement d'hydrolyse dans date frage et la la fibre). Les bandes de 14 K al gentielle et d'hydrolyse totale se sont pas marquèses avec la l'¹⁶C optimesement d'hydrolyse dans date for a soccalivenent fig. N-terminal de la adieula de la fibre, de glycosylé sman es date gradet so fire la state d'une diversité state de la fibre) de la fibre de la fibre de la difficient de la K aurespondant respectivenent fie la sanchase avec la l'¹⁶C optimesement de la socieule que ce soit la l'agment fig. N-terminal de la adieule qui soit diversité state devrement est date produite d'hydrolyse



B

Migration (cm)
3,7
3,55
2,75
3,65



TABLEAU 7 : Migration de la fibre en présence de lectine (1 mg/ml d'agarose)

CON A : concanavaline A ; WGA : Wheat Germ Agglutinin ; LCA : Lens Culinaris Agglutinin glycosylés. Le(s) chaînon(s) glycannique(s) serai(en)t donc situé(s) sur le premier tiers N-terminal du polypeptide, soit sur un des 194 premiers acides aminés.

4- Comparaison de la glycosylation de la fibre libre ou assemblée avec la base du penton

La glycosylation de la fibre pouvait influencer son assemblage avec la base. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les taux de glycosylation de la fibre, libre ou assemblée. La quantité de fibre d'une préparation de fibre ou de penton complet peut être déterminée par la hauteur du pic obtenu en rockett (immunoélectrophorèse monodimensionnelle) ou bien par mesure de la radioactivité après marquage à la (³H)-valine. Dans ce cas, la fibre dissociée de la base par traitement au DOC est purifiée par chromatographie sur colonne d'hydroxylapatite. Le taux de glycosylation est, quant à lui, toujours déterminé par l'incorporation de (¹⁴C)-glucosamine. Dans tous les cas, le taux de glycosylation de la fibre, libre ou liée, semble identique (le rapport de glycosylation de la fibre liée sur la fibre libre variant selon les expériences entre 0,86 et 1,3, le rapport moyen étant de 1,16. Les peptides margués à la $({}^{14}C)$ -glucosamine et obtenus par clivage enzymatique de la fibre libre ou de la fibre du penton sont identiques dans les deux cas (Cf. Annexe 2). Le(s) site(s) de glycosylation(s) semble(nt) identique(s).

5- Comparaison de la glycosylation des fibres d'adénovirus de sérotypes différents

Aucune étude n'avait encore été faite sur la glycosylation éventuelle des fibres d'adénovirus des autres sérotypes. Nous avons étudié l'adénovirus 5, de même sous-groupe que l'adénovirus 2 (sous groupe C), les adénovirus 3 et 7 (sous-groupe B), l'adénovirus 4 (sous-groupe E) et l'adénovirus 9 (sous-groupe D).

Seules les fibres des adénovirus 2 et 5 incorporent de la (¹⁴C)-glucosamine. Aucun des virus étudiés n'incorpore du (³H)-mannose dans nos conditions.

L'affinité pour la WGA a été testée. Seule la fibre de l'adénovirus 2 est révélée par la WGA couplée à la peroxydase. La fibre du virus de sérotype 5 n'est pas détectée. Le chaînon glycannique de la fibre de ce virus serait donc différent de celui du sérotype 2.

- F- Variation de migration en gel de polyacrylamide-SDS de la fibre et d'autres protéines virales en fonction du degré de dénaturation (Annexe 4)
 - 1- Effet d'une dénaturation prolongée sur la migration des protéines virales en gel-SDS

Les conditions standards de dénaturation d'un échantillon avant sa migration sur gel de polyacrylamide-SDS consistent à porter à 100° C, pendant 2 minutes, l'échantillon mis au préalable dans un tampon urée 3 M, SDS 2,5 %, mercaptoéthanol 5 % final.

Si on prolonge le temps de dénaturation en laissant à 37° C l'échantillon dans son tampon dénaturant, on observe au cours du temps une modification du profil des bandes séparées par migration sur gel de polyacrylamide-SDS : la fibre disparaît et trois bandes de masse moléculaire apparente plus faible (53 K, 27 K et 25 K) apparaissent (Fig. 19A).

Le phénomène peut être accéléré et accentué en prolongant le temps d'ébullition de l'échantillon dans le tampon de dénaturation (Fig. 19B). En effet, une incubation à 100° C de 5 min, entraîne la perte non seulement de la fibre, mais aussi des protéines V et VI. On observe les protéines de 53 K, 27 K et 25 K. Pour 15 et 30 min d'ébullition, apparaît en plus une bande de 80 K. La base du penton et l'hexon ont une migration légèrement ralentie.

2. Recherche des causes des modifications électrophorétiques

La disparition de la fibre et l'apparition de bandes de masse moléculaire plus petite permettaient de penser qu'il pouvait y avoir hydrolyse de la fibre dénaturée. L'addition d'inhibiteurs de protéases tels que le PMSF (fluorure de phényl méthyl sulfonyl), le TPCK (N-tosyl-L-phénylalanine chlorométhyl cétone) et l'ECTA (éthylène-glycol-bis- β -amino éthyl éther -N,N,N',N' acide tétraacétique) ne modifie pas le profil obtenu lorsqu'ils sont ajoutés au mélange dénaturant lors de l'incubation prolongée à 37° C. De plus, les sérums dirigés contre les protéines majeures structurales de l'adénovirus (anti-fibre, anti-base du penton, anti-hexon) ne permettaient pas de détecter les bandes apparues après une incubation prolongée.



FIGURE 19

Effet d'une dénaturation prolongée sur la migration des protéines structurales virales en gel de polyacrylamide SDS : Panneau A : incubation à 37° C des échantillons dénaturés pistes a) 24 h ; b) 8 h ; c) 4 h ; d) 1 h ; e) 30 min Panneau B : temps d'ébullition des échantillons dans le tampon dénaturant de 2 (a), 5 (b); 15 (c), et 30 min (d). V : Virus témoin dénaturé selon les conditions standards (100° C, 2 min).

- 84 -



BU

FIGURE 20

Migration des protéines structurales virales en gel de polyacrylamide-SDS (rapport acrylamide/bis : 50 : 0,235) contenant un gradient urée : $0 \rightarrow 8$ M.

- 86 -

La formation éventuelle de pont(s) disulfure(s), la carbamylation possible en présence de traces de cyanate ainsi que les charges résiduelles sur la protéine dénaturée pouvaient expliquer les modifications observées. Ces différentes possibilités ont été étudiées et de tels effets n'ont pu être mis en évidence.

L'existence de structures secondaires résistantes aux conditions classiques de dénaturation pouvait également rendre compte du phénomène observé. Cette hypothèse a été étudiée en déposant du virus dénaturé selon les conditions classiques le long d'un gel de polyacrylamide-SDS contenant un gradient urée de 0 à 8 M. Le gradient est établi dans le sens horizontal et perpendiculaire à la migration. Sur un tel gel, on peut observer l'influence de quantités croissantes d'urée sur la migration des protéines. Dans ces conditions, on observe la variation de migration de la fibre. L'ordre de migration des polypeptides du IIIa et de la fibre vont s'inverser (Fig. 20). On observe également le dédoublement des protéines V et VI.

Puisqu'il existe dans les conditions classiques de dénaturation des structures résistantes, une dénaturation plus ou moins prolongée de bandes protéiques purifiées devait permettre de suivre et d'identifier ainsi les bandes nouvellement apparues lors de l'incubation prolongée d'un virus (à 37° C ou à 100° C) dans un tampon dénaturant. Les bandes majeures des protéines virales provenant d'un gel de polyacrylamide-SDS, sur lequel du virus dénaturé dans les conditions classiques avait été déposé, ont été reprises dans le tampon dénaturant classique et portées à 100° C pendant des temps différents s'échelonnant de 5 à 30 min. On observe ainsi un changement de migration du polypeptide fibre qui correspond à un changement de masse moléculaire apparente allant de 62 K à 80 K. Pour 5 min à 100° C, la fibre a une migration analogue à celle du IIIa (66 K). Ainsi pour une incubation prolongée à 37° C du virus dénaturé dans les conditions classiques, la disparition de la fibre s'explique par une co-migration avec le polypeptide Illa. Pour une dénaturation poussée à 100° C, la bande de 80 K correspond donc à la fibre. De même, les bandes de 53 K d'une part, de 27 K et 25 K d'autre part proviennent respectivement d'un changement de migration des polypeptides V et VI.

3. Effet de chaque agent dénaturant sur la migration de la fibre en gel-SDS

Une prolongation du temps d'ébullition et la présence d'urée semblent donc intervenir dans le degré de dénaturation des protéines virales et notamment de la fibre. La capacité des agents dénaturants (urée, SDS, mercaptoéthanol), seuls ou en mélange 2 à 2, à modifier la migration de la fibre et donc à abolir sa structure native et ses structures secondaires a été mesurée après des temps d'ébullition de 2 ou 30 min. Pour obtenir la bande de 80 K, l'urée combinée à une ébullition de 30 min est nécessaire. Cependant, un grand nombre de molécules restent sous forme native ou sous forme d'agrégats (de 2 ou plusieurs protéines natives). Le SDS semble lui nécessaire pour séparer les monomères de la fibre, une ébullition de 2 minutes en présence de ce détergent suffit pour dépolymériser la fibre mais une ébullition prolongée (30 min) ne permet pas l'obtention de la bande de 80 K. L'action combinée de ces deux agents dénaturants jointe à une ébullition de 30 min, est nécessaire pour n'observer que la bande de 80 K.

4. Relation rendant compte de la variation de la migration

La différence de migration en gel de polyacrylamide-SDS semble indiquer l'existence de fortes interactions entre différentes parties de la molécule. Les liaisons qui maintiennent la structure d'une protéine doivent être d'autant plus fortes que la molécule est asymétrique. De plus, l'urée semblant importante pour l'observation du phénomène, le taux d'hydrophobicité d'une molécule pourrait donc intervenir sur son comportement électrophorétique. La différence de migration observée se traduit par des masses moléculaires apparentes différentes. Une loi empirique reliant la différence des masses moléculaires apparentes, le taux d'hydrophobicité et le coefficient de friction a été recherchée. Cette loi a été établie à l'aide de toutes les protéines structurales de l'adénovirus. La relation suivante a été trouvée :

 $\Delta Mr (f/fo)$ $\Delta Mr = k ------H$

 Δ Mr représente la différence des masses moléculaires apparentes obtenues après une dénaturation de 30 min et de 2 min à 100° C, k un coefficient, f/fo le coefficient de friction (valeurs de LEMAY and BOULANGER, 1980), et H le taux d'hydrophobicité calculé sur onze acides aminés, d'après la méthode de KYTE and DOOLITTLE (1982).

G- Discussion

Depuis de nombreuses années, l'étude de l'interaction protéine-protéine et de l'assemblage <u>in vitro</u> de protéines purifiées en édifices plus complexes s'est développée. Plusieurs cas ont été abordés :

- 1- La polymérisation d'une protéine purifiée qui peut aboutir à la formation de filaments comme dans le cas des protéines du cytosquelette telle que l'actine (revue par POLLARD and COOPER, 1986)).
- 2- La réassociation d'une seule unité protéique avec elle-même dans le but de former une capside virale, comme dans le cas du virus de la mosaïque du tabac (revue par RICHARDS and WILLIAMS, 1976).
- 3- La réassociation d'une seule unité protéique avec elle-même en présence d'une protéine dite "d'échafaudage". Cette protéine intervient dans le mécanisme de formation de la capside sans en être un constituant. La formation du manteau du phage P22 en est un exemple (FULLER and KING, 1980).
- 4- L'interaction d'au moins deux protéines distinctes comme dans le cas de la formation de la queue du phage T4 (ARISAKA <u>et al.</u>, 1979) ou de l'assemblage des ribosomes (TINDALL and AUNE, 1981).

Pour l'adénovirus, PEREIRA et WRIGLEY (1974) ont obtenu à pH acide, à partir de groupes de neuf hexons, plusieurs étapes de réassociation de la capside virale dont des structures à 20 faces. Chacune des faces est constituée d'un groupe de 9 hexons : il manque les hexons péripentonaux et les pentons pour obtenir une capside virale. Pour rechercher les critères qui gouvernent la reconnaissance de deux protéines, nous nous sommes intéressée à un mode beaucoup plus simple qui met en jeu deux protéines distinctes, multimériques : la base du penton et la fibre.

L'assemblage <u>in vitro</u> en penton complet de la base du penton et de la fibre, purifiées séparément, est rapide et réversible. Aucune autre protéine ne semble nécessaire à la formation du complexe. La constante de dissociation $(2.10^{-7} \text{ M en terme de molarité de fibre})$ traduit une haute affinité des deux protéines l'une pour l'autre. La relative indépendance de l'assemblage vis-à-vis

du pH et de la force ionique et l'action des détergents suggèrent que des ponts hydrophobes sont impliqués dans le maintien du complexe. Ce sont des régions hautement conservées à travers les différents sérotypes de l'adénovirus qui sont impliquées dans l'affinité des deux molécules puisque des pentons chimériques peuvent s'assembler et être fonctionnels : il existe des recombinants viables qui ont de tels pentons (D'HALLUIN et al., 1982).

L'assemblage de la base du penton et de la fibre semble dépendre d'une certaine conformation de la fibre comme le montre l'apparition d'un nouveau site antigénique sur la fibre lors de l'assemblage ainsi que la dissociation du complexe par des anticorps anti-fibre. De tels effets ont été reportés chez d'autres modèles viraux. Par exemple, le complexe E1-PE2 des protéines de l'enveloppe du virus Sindbis se dissocie sous l'effet d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine E1 (CLEGG et al., 1983).

L'hydrolyse par la carboxypeptidase Y du penton dissocié ou non au DOC implique une des extrémités de la fibre dans l'assemblage avec la base du penton. Ceci semble être confirmé par l'impossibilité de reconstituer du penton complet quand la fibre est au préalable traitée par l'enzyme. Il semblait logique de penser qu'il s'agissait de l'extrémité C-terminale.

Cependant, i'étude entreprise l'aide à des sérums antipeptide correspondant aux extrémités de la fibre oriente la fibre dans le sens opposé et confirme donc le modèle proposé par GREEN et al. (1983) : l'extrémité N-terminale semble être impliquée dans l'assemblage avec la base du penton. Nous ne pouvons cependant dire si ce sont les treize premiers acides aminés qui sont impliqués ou si ce sont les résidus immédiatement voisins. En effet, le manque de reconnaissance de la fibre liée à la base par le sérum anti-N $_{TT}$ et la non-hydrolyse enzymatique de cette extrémité quand elle est associée à la base du penton peuvent s'expliquer par un manque d'accessibilité dû à un encombrement stérique.

Le modèle de GREEN <u>et al.</u> (1983) a été calculé pour une fibre dimérique et obtenu après constatation de répétitions d'une séquence d'une quinzaine d'acides aminés ou d'acides aminés équivalents. Cette séquence donnerait lieu à deux feuillets β anti-parallèles constitués par 3 résidus (voir Fig. 2B dans les Généralités). Cette répétition est observée du résidu 43 au résidu 400. L'empilement des feuillets β constituerait la tige, l'extrémité N-terminale de la fibre interagirait avec la base du penton et l'extrémité C-terminale constituerait la sphérule.

Un modèle semblable a été proposé pour la fibre de l'adénovirus 3 avec la même orientation (SIGNAS <u>et al.</u>, 1985). La différence de la longueur des bâtonnets déterminée par ces modèles est compatible avec celle observée sur des photos de microscopie électronique.

D'autre part, nous avons observé que les vingt premiers résidus de la région N-terminale de la fibre possèdent une structure analogue au "N-peptide signal" de protéines sécrétées. On peut effectivement distinguer trois régions dans la séquence N-terminale de la fibre constituée par les 19 premiers résidus (Fig. 21A).

- une région n-terminale de 8 résidus dont la charge nette est positive (+ 1 pour l'adénovirus 2, + 3 pour l'adénovirus 3).

- une région h hydrophobe, de 8 résidus, comprise entre 2 zones chargées.

- une région c chargée négativement (- 2 pour l'adénovirus 2, - 3 pour l'adénovirus 3).

La longueur de la région n (8 résidus) par rapport à la longueur de la séquence N (19 résidus) coïncide avec la moyenne établie par von HEIJNE (1986). La longueur de la région h (8 résidus) correspond à la longueur moyenne des régions équivalentes pour le peptide signal (von HEIJNE, 1985).

Sur le polypeptide de la base du penton, une séquence (de l'acide aminé 544 à l'acide aminé 555), constituée d'une zone hydrophobe encadrée par deux petites zones chargées, pourrait être complémentaire de la séquence N terminale de la fibre (Fig. 21B) : la charge des acides aminés autour de la zone hydrophobe de la base du penton est opposée à celle des résidus équivalents sur la fibre. Une liaison hydrophobe entre la fibre et la base du penton, maintenue par des liaisons ioniques serait donc possible. Ceci est compatible avec l'effet des détergents sur l'assemblage in vitro des deux protéines.

Cependant, ce type de liaison nécessite soit une base trimérique comme le suggéraient DEVAUX <u>et al.</u> (1982) soit la consolidation de l'assemblage de trois chaînes polypeptidiques de la base avec la fibre trimérique par deux autres polypeptides de la base comme le proposaient van OOSTRUM et BURNETT (1985).



- 91 -

(B)

F/Ad2	NH ₂	K R A R P S E D T (F) N P (Y) P (Y) D T E C O O H
BP/Ad2	NH2	· · · DARRRTC) P V V V K A L C O O H
	-	544 - + + +	+ 555
BP/Ad2	NH ₂	EDSKRRS() N 🖸 O S N D C O O H
	- ,	383	396



FIGURE 21

Comparaison de séquences

A : comparaison des extrémités des fibres (F) des sérotypes 2 et 3. La région N est divisible en trois régions n', h, c

B : comparaison de l'extrémité de la fibre (F) de l'adénovirus 2 avec deux séquences de la base du penton (BP)

Les acides aminés basiques sont notés par +, les acides aminés acides par -, les acides aminés hydrophobes sont cerclés.

Une autre séquence de même nature peut également être remarquée sur la base du penton (située entre les acides aminés 383 et 396). Cependant, le taux d'hydrophobicité de la zone centrale est plus faible et la charge sur l'une des régions encadrantes est de même nature que celle équivalente sur la fibre (Fig. 21B).

Outre l'étude de la polarité, l'emploi des anticorps anti-peptide nous a permis de montrer que les extrémités des fibres des adénovirus de divers sérotypes sont différentes : les anticorps ne révèlent pas les fibres des adénovirus des sérotypes 3, 4, et 9. Ceci reflète les différences structurales (longueur) et antigéniques observées pour ces protéines.

Un autre caractère structural distingue les fibres des différents sérotypes : il s'agit de la glycosylation. Seules les fibres des sérotypes 2 et 5 incorporent de la glucosamine radioactive. Aucune incorporation de mannose n'a été observée. Cependant, le motif glycannique des sérotypes 2 et 5 diffère puisque seul celui de la fibre de l'adénovirus 2 possède une affinité pour la WGA. L'affinité de la fibre du sérotype 2 pour la WGA permet la purification sur colonne de WGA-Sépharose (PERSSON et al., 1985).

C'est probablement à cause de son incorporation de glucosamine qu'il était généralement admis que le site de glycosylation de la fibre devait être l'un des neuf sites potentiels de N-glycosylation (HERISSE <u>et al.</u>, 1981 ; PETTERSSON, 1984 ; SIGNAS <u>et al.</u>, 1985), malgré les travaux d'ISHIBASHI et MAIZEL (1974a) qui montrent une liaison alcali-labile. Cependant, de nouvelles études menées sur la glycosylation de la fibre avec notamment l'identification de la N-acétyl-glucosamine après hydrolyse acide ou méthanolyse acide et la mise en évidence d'une liaison alcali-labile par β -élimination sont donc en faveur de l'existence d'une liaison de type GlcNAc-Ser/Thr dans cette protéine. Ces résultats sont donc en accord avec ceux d'ISHIBASHI et MAIZEL (1974a).

Le(s) résidu(s) de N-acétyl glucosamine(s) semble(nt) être situé(s) sur le tiers N-terminal du polypeptide. Il existe 52 résidus de sérine et thréonine dans cette région, ce qui représente 24,2 % des résidus (pourcentage comparable à celui de la molécule entière : 22,3 %). Cependant dans les 195 premiers résidus, deux petites zones ont un pourcentage plus élevé de ces deux résidus : une zone des résidus 79 à 124 (40 %) et une zone des résidus 172 à 188 (48 %). Ces deux zones sont situées sur le bâtonnet dans le modèle de GREEN <u>et al.</u> (1983).

Une hydrolyse enzymatique plus poussée de la fibre devrait nous permettre une meilleur localisation.

La glycosylation ne semble pas jouer un rôle dans l'assemblage de la fibre : le taux et les sites de glycosylation semblent identiques pour la fibre libre ou liée à la base du penton.

Le dernier point abordé dans l'étude de la fibre de l'adénovirus de type sauvage concerne le comportement électrophorétique de la fibre sur gel de polyacrylamide-SDS en fonction de son degré de dénaturation. Nous avons établi une relation entre la différence des masses moléculaires apparentes (qui traduit la variation de migration), le taux d'hydrophobicité et le coefficient de friction. L'action prolongée de l'urée est nécessaire pour observer une variation de la migration de la protéine, pouvant faire passer sa masse moléculaire apparente de 62 K à 80 K. Ceci tend à montrer que, dans les conditions classiques de dénaturation, certaines structures secondaires peuvent persister. Ceci pourrait expliquer la variation de la masse moléculaire apparente de certaines protéines mutées dont la mutation consiste en une seule substitution d'acide aminé. Un tel phénomène a été observé pour la fibre d'un mutant : le H2 ts 125 qui, à 39° C, ne synthétise pas de fibre antigénique (Cf. chapitre II).

ANNEXE 1

VIROLOGY 113, 781-786 (1981)

Antibody-Triggered Dissociation of Adenovirus Penton Capsomer

MARIE-LAURE BOUDIN AND PIERRE BOULANGER¹

Laboratoire de Virologie Meléculaire de l'INSERM (U-233), Place de Verdun, 59045, Lille, France

Received April 30, 1981; accepted May 12, 1981

By employing two-dimensional immunoelectrophoreses and immunoselection techniques on *Staphylococcus aureus* protein A, evidence was provided showing that adenovirus 2 penton capsomer could be dissociated into its two constituting entities, penton base and fiber. The dissociation was obtained with antifiber antibody, but not with antipenton base antibody. The dissociating effect was more pronounced with subgroupspecific antibody which is thought to react with the antigenic determinants located on the rod-like portion of the fiber. It was suggested that penton disruption was due to some antibody-induced conformational change of a critical portion of the fiber.

Human adenovirus (Ad) vertex capsomer-the so-called penton-is a complex structure formed of a penton base unit, anchored at each vertex of the virus icosahedral capsid, and of a projecting shaft terminated by a knob, the fiber (1-4). The fiber carries subgroup-specific, and typespecific antigenic determinants (5). It has been suggested that the latter are located in the terminal knob, whereas the former are carried by the shaft (6-8). The bonds involved in the linkage between the rodlike structure of the fiber and the penton base appear to be noncovalent, since the penton base and fiber can be readily separated by guanidine (6), pyridine (9), or sodium deoxycholate (10). Adenovirus type 2 (Ad2) fiber and penton, as well as hexon, are overproduced by the infected cell and can be obtained as soluble (i.e., nonvirionincorporated) components (2, 7, 9, 11). Ad2 fiber, of molecular weight 180,000, is probably composed of three identical subunits of 62,000-65,000 (12), whereas penton base behaves as a pentameric protein, constituted of a single type of polypeptide unit of molecular weight 85,000 (9, 10, 13). Variations occurring in the stoichiometry of different Ad2 penton immunoprecipitates analyzed in SDS-polyacrylamide gel, as

¹ To whom reprint requests should be addressed.

well as particular patterns of penton precipitates in two-dimensional immunoelectrophoresis (10, 14), led us to examine the fate of the penton edifice after reaction with antibodies directed toward the fiber or toward the penton base moiety.

As shown in Fig. 1, the two-dimensional immunoelectrophoretic pattern of Ad2 soluble components was composed of five major peaks of immunoprecipitates. The most anodic one, peak 1, has been identified as hexon, precipitate 2 as penton base, and the cathodic precipitate 5 as fiber (14). Both peaks 3 and 4 have been shown to correspond to penton: the inner peak 3, which forms a continuous precipitin line with peak 5, characteristic of a reaction of total antigenic identity (15), represents the antigenic determinants of the fiber contained in the penton, and the outer peak 4 in continuity with peak 2 represents the antigenic determinants carried by the penton base (14, 16).

The first unexpected feature of this immunoprecipitation pattern was the dissociation of the precipitates of penton base and fiber within the penton peak. The precipitates 3 and 4 should theoretically superimpose each other and form a single precipitin line linked to penton base peak toward the anode, and linked to the fiber peak toward the cathode. Moreover, SDS-

0642-6822/81/120781-06\$02.00/0 Copyright © 1981 by Academic Press, Inc. All rights of reproduction in any form reserved.



FIG. 1. Two-dimensional immunoelectrophoretic pattern of adenovirus type 2 (Ad2) soluble components. Antigen mixture, 10 µl, obtained from a wildtype Ad2-infected cell lysate, corresponding to 40-50 µg protein was first electrophoresed in the first dimension (1D) at 10 V/cm for 60 min under tap water refrigeration, then agarose strip transferred onto another glass plate and cross-immunoelectrophoresed in the second dimension (2D) against 100 μ l of polyspecific anti-adenovirion type 2 serum for 16 hr at 3 V/cm with cooling (10, 14, 16). Five peaks of immune precipitates were visible and were numbered 1 to 5 from anode to cathode. Precipitate peak 1 corresponded to hexon, precipitate 2 to penton base, precipitate 5 to fiber. Both peaks 3 and 4 corresponded to penton, peak 3 representing the fiber unit, peak 4 the penton base unit of the penton. A continuous precipitin line formed between peaks 2 and 4 on the one hand and between 3 and 5 on the other hand, characteristic of a reaction of total antigenic identity. Staining: Coomassie brilliant blue R-250.

polyacrylamide gel analysis of labeled Ad2 structural antigens contained within immunoprecipitates 3 and 4 has shown that penton base (polypeptide III) is the major labeled component in peak 4, and that fiber subunit (polypeptide IV) is the major polypeptide species in peak 3 (14). Both polypeptides were therefore encountered in an unexpected ratio, if one considers the penton as composed of five subunits of 85.000 (the penton base), and of three subunits of 62,000 (the fiber). The absence of superimposition of peaks 3 and 4 suggested that the formation of antigen-antibody complexes within the second-dimension gel induced the dissociation of penton, of which the penton base and fiber units precipitated in separate peaks (Fig. 1).

To test this hypothesis, two-dimensional immunoelectrophoreses were performed, in which two different antibodycontaining gels were used in the second dimension. An intermediate agarose gel contained antifiber antiserum, whereas the upper gel contained polyspecific antiadenovirion serum. This modification of the basic technique (15) has been developed for identification of an antigen in a mixture by a monospecific antiserum (17). The results of such an analysis are presented in Fig. 2. Antifiber immune serum contained in the intermediate gel (b) precipitated peak 5 (isolated fiber) and the inner peak 3 enclosed in peak 4, corresponding to the fiber engaged in the penton. A continuous precipitin line formed between peaks 5 and 3. In the upper agarose gel containing the polyspecific antiserum, hexon and penton base appeared as distinct antigenic entities, but a reaction of total antigenic identity occurred



FIG. 2. Two-dimensional immunoelectrophoresis of Ad2 soluble capsid components, using a monospecific antibody-containing intermediate gel (17). (a) Lower gel: first-dimension electrophoresis. (b) Intermediate agarose gel containing 100 μ l of a monospecific anti-Ad2 fiber immune serum. (c) Upper gel: agarose gel containing 100 μ l of a polyspecific anti-Ad2 virion serum. A reaction of total antigenic identity was evidenced between components 2 and 4 (penton base), and components 3 and 5 (fiber). A faintly stained peak, scarcely visible in the upper gel, and numbered 6, has been previously identified as capsid protein IIIa (21).

782

97



FIG. 3. (A) Autoradiogram of analytical SDS-polyacrylamide gel of [55S]methionine-labeled penton immunoprecipitated with different antisera. (a) Control adenovirus type 2 virion with its major polypeptide numbered II to IX according to the accepted nomenclature (13). II corresponds to hexon, III to penton base, and IV to fiber polypeptide unit. Aliquots of 10 µi of gradient fraction corresponding to soluble component 10.5 S and containing penton capsomer (polypeptides III and IV) along with traces of hexon (12 S (18, 19)), were incubated with 15 μ l of either saline (b), preimmune serum (c), anti-Ad2 penton base (d), anti-Ad2 fiber (e), anti-Ad5 fiber (f), or anti-Ad2 complete penton (g), in 75 µl of NET-N buffer at 4° overnight. NET-N: 0.15 M NaCl, 0.05 M Tris-Hcl, pH 7.5, 0.005 M Na EDTA, 0.005% Nonidet P-40. Sample (b) was analyzed as such. The immune complexes of the other samples were collected on protein A of Staphylococcus aureus cells, and analyzed on SDS-polyacrylamide gel, as described in detail in (16). The stoichiometry of penton base (III) and fiber polypeptide unit (IV) in the different immune complexes, determined by scanning the gel tracks, presented considerable variation. Antibodies against type 2 and 5 fiber precipitated more fiber than penton base, whereas antibody against penton base precipitated penton base and fiber in the same stoichiometric ratio than in the original nonprecipitated fraction, or in the precipitate obtained with an antipenton serum (see Table 1). (B) Analysis of immunoprecipitation of penton with two successive antisera. [35S]Methionine-labeled penton was first incubated with increasing amounts of anti-Ad2 fiber serum for 20 hr at 4° (c-h), and immune complexes collected by adsorption onto S. aureus protein A. Each supernatant of this immune reaction was then incubated with an aliquot of antipenton base immune serum for an additional 20 hr at 4°, and immune complexes again collected on S. aureus cells (j-o). Immune complexes were analyzed in SDS-polyacrylamide slab gel and autoradiographed. (a) Control Ad2 virion. (c-h) Immune complexes formed with 2 (c), 4 (d), 6 (e), 8 (f), 10 (g), and 15 µl (h) of anti-Ad2 fiber. (j-o) Immune complexes formed with antipenton base antibody in the reaction mixture supernatant of (c-h). between the free penton base (peak 2) and the penton base unit of the penton (peak 4). There was no visible spur between peaks 2 and 4, and no precipitin line connecting peak 4 to peak 3, suggesting the absence of any fiber in penton base precipitate, neither of any penton base in fiber precipitate.

This pattern suggested that virtually all the fiber was retained in the lower precipitate 3 and that the precipitate 4 was composed of a penton base which was released upon immunoprecipitation of the penton by an antibody against the fiber unit. Thus, an extra load of the antifiber antibody in the second dimension (intermediate gel, Fig. 2b) provoked a stronger dissociation of the penton components. Although the two-dimensional immunoelectrophoreses were performed under refrigeration, the penton dissociation might be due to a certain degree of heat denaturation of antigen-antibody complexes, produced by the electric current within the agarose gel. Control immunoprecipitation experiments were therefore carried out in liquid medium, using purified penton capsomers and the adsorption of immune complexes onto protein A of Staphylococcus aureus.

Ad2 penton capsomers were purified from the cell pool of [35 S]methionine-labeled virus components in sucrose density gradient, as a 10.5 S component (18, 19), easily separated from free fiber (6.1 S (7, 12)) and from isolated penton base (9,1 S(10, 18)). The 10.5 S penton was incubated with samples of different antisera. Monospecific anti-Ad2 fiber, anti-Ad5 fiber, anti-Ad2 penton, and anti-Ad2 penton base immune sera were prepared in our labora-

⁽b, i) Incubation of penton samples with 15 μ l of preimmune serum in a first reaction (b), or in a second reaction (i) performed on the supernatant of (b). Penton formed detectable immune complexes with 8 μ l of the anti-Ad2 fiber serum, and part remained in the supernatant as antipenton base-precipitable penton (bands III and IV, slots j-n). With 15 μ l of anti-Ad2 fiber serum (h), penton base released in the supernantant was precipitable with antipenton base antibody as intact polypeptide III, with no detectable fiber polypeptide (slot o).

SHORT COMMUNICATIONS

		Caller .	
	DI		
1 4	DI.		

STOICHIOMETRIC RATIO OF FIBER TO PENTON BASE IN PENTON-ANTIBODY COMPLEXES^a

	Radioactive	Radioactive label in penton component			
Antibody against	Penton base (polypeptide III)	Fiber (polypeptide IV)	Ratio IV/III		
Ad2 penton	61.1	38.3	0.63		
Ad2 penton base	62.2	37.8	0.61		
Ad2 fiber	37.7	62.3	1.66		
Ad5 fiber	14.8	85.2	5.88		
Nonimmunoprecipitated pento	n 64.7	35.2	0.55		
Theoretical ratio ^b	63.1	36.8	0.58		

^a Immune complexes formed between [³⁵S]methionine-labeled 10.5 S penton and different types of antibody were analyzed in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, as in Fig. 3A. The gel autoradiograms were scanned in an automatic scanner CLINISCAN (Helena Lab. Rockville, III.). Label content in polypeptides III and IV were normalized to 100%. The figures given were the average of three separate experiments.

^b The theoretical ratio was calculated from the protein content in polypeptide III (five subunits of molecular weight 85,000), polypeptide IV (three subunits of 62,000) (13), and corrected for the methionine content: 2.0 and 1.5% amino acid residues recovered, in penton base and fiber, respectively (10, 12).

tory by injecting rabbits with antigen-antibody complexes formed in agarose gel plates of two-dimensional immunoelectrophoresis, as previously described (10, 21). The immune complexes, formed for 16 hr at 4°, were collected onto S. aureus cells, Cowan I strain (20), and analyzed in SDSpolyacrylamide gel, as previously described (16, 21). Figure 3 A,d, shows that the antipenton base antibody did not seem to dissociate penton: the stoichiometry of penton base and fiber polypeptide subunits in this precipitate was similar to that observed in the starting nonprecipitated material (Fig. 3A, b), as well as in the precipitate obtained with the antipenton serum (Fig. 3A, g). In contrast, after reaction with antibody directed against the fiber of the same serotype (Ad2), the amount of labeled penton base in the immune complexes decreased significantly (Fig. 3A, e, and Table 1). This decrease was even more pronounced with antibody directed against the fiber of another serotype of the same subgroup, adenovirus serotype 5 (Fig. 3A, f). A proteolytic breakdown of the penton base during the incubation with the antiserum might be excluded, since intact penton base was recovered from the supernatant of the immune reaction, using antipenton base serum in a second step (Fig. 3, Panel B).

The presented results strongly suggest that the adenovirus penton structural units, viz., penton base and fiber, might be dissociated by antibodies directed toward the fiber projection. The dissociating effect occurred to a greater extent when heterotypic antibodies were used. Anti-Ad5 fiber antibody precipitated Ad2 fiber with a relatively low efficiency, but showed a high efficiency of penton dissociation (Fig. 3A, f). Since it is assumed that antibody toward Ad5 fiber reacted with subgroup antigenic determinants mainly located on the rod-like portion of the Ad2 fiber (5-8), these data implied that (i) the structural conformation of the projecting shaft was modified upon antibody binding, and (ii) that these conformational changes were critical for stability of the vertex capsomer. The fiber protein has been found to be mainly in the β -sheet conformation, a secondary structure which has been tentatively located in the shaft region (22).

Antibodies have been largely used in immunochemistry of enzymes, taking advantage of their inhibiting (23) and sometimes activating properties (24). Antibodies have also been used as immunological probes for detecting structural changes in proteins, but, for obvious reasons, most of these conformational studies have been carried out on enzymes (25, 26). Using spe99 -



FIG. 4. Two-dimensional immunoelectrophoretic analysis of purified Ad2 penton with antiserum against complete penton. Stacked peaks a, b, c, corresponding to different extents of precipitin reactions suggested various degrees of penton dissociation upon binding with antifiber antibody.

cific antibodies, two-dimensional immunoelectrophoretic analyses and affinity binding of immune complexes on protein A of S. aureus, evidence was provided that an adenovirus capsid structural unit, the penton, could be dissociated into its two constituting entities (penton base and fiber) by reaction with an antifiber antibody. However, adenovirus particles have been found to be immunoprecipitable when reacted with antifiber antibody for 30-60 min at 37° and at serum dilutions ranging from 1:200 to 1:100 (27, 28). These apparently conflicting results might be explained by minor differences in the conditions of immune reaction. In the present study samples were reacted with antifiber antibody at concentrations of 15 to 30 times higher than in (27, 28) and reaction allowed to proceed for 16 hr 4°. This explanation was supported by the frequent occurrences of several stacked immune precipitin lines within the penton peak in two-dimensional patterns, suggestive of different degrees of penton dissociation during antigen-antibody reaction (Fig. 4).

These data might also suggest that penton was more stable as a virion component than as an isolated capsomer, thus confirming previous findings that adenovirus capsid components, and particularly pen-

ton base and protein IIIa, were flexible structures capable of undergoing significant conformational and immunclogical changes during virion maturation (29, 30). Similar malleability of structural proteins have been described in bacteriophage morphogenesis (31). Physicochemical studies are required to elucidate the three-dimensional modifications involved. This type of investigation may lead to a better understanding of the mechanisms of virus capsid labilization occurring while adenovirus fibers attach to the cell membrane receptor (32, 33), and also to a better comprehension of the general mechanism of virus neutralization.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by INSERM (U-233), CNRS (ERA 070225), DGRST (Contract 80-7-0290), and the Université du Droit et de la Santé de Lille. We thank S. Wojcik for expert secretarial assistance, C. Vandeperre for illustrations, and D. Petite for cell cultures. We are indebted to Mark Lewy for revision of the manuscript.

REFERENCES

- HORNE, R. W., BRENNER, S., WATERSON, A. P., and WILDY, P., J. Mol. Biol. 1, 84-86 (1959).
- VALENTINE, R. C., and PEREIRA, H. G., J. Mol. Biol. 13, 13-20 (1965).
- 3. GINSBERG, H. S., PEREIRA, H. G., VALENTINE, R. C., and WILCOX, W. C., Virology 28, 782-783 (1966).
- 4. ROSEN, L., Amer. J. Hyg. 71, 120-128 (1960).
- NORRBY, E., and SKAARET, P., Virology 32, 489-502 (1967).
- 6. NORRBY, E., J. Gen. Virol. 5, 221-236 (1969).
- PETTERSSON, U., PHILIPSON, L., and HÖGLUND, S., Virology 35, 204-215 (1968).
- NORRBY, E., MARUSYK, H., and HAMMARSKJÖLD, M. L., Virology 38, 477-482 (1969).
- PETTERSSON, U., and HÖGLUND, S., Virology 39, 90-106 (1969).
- BOUDIN, M. L., MONCANY, M., D'HALLUIN, J. C., and BOULANGER, P. A., Virology 92, 125-138 (1979).
- 11. BOULANGER, P., and PUVION, F., Eur. J. Biochem. 39, 37-42 (1973).
- SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L., Virology 51, 252-256 (1973).
- ANDERSON, C. W., BAUM, S. G., and GESTELAND, R. F., J. Virol. 12, 241-252 (1973).
- MARTIN, R. G., WAROCQUIER, R., and BOULANGER, P., Intervirology 5, 162-172 (1975).

SHORT COMMUNICATIONS

- 100 -

- 15. WEEKE, B., Scand. J. Immunol. 2, 47-56 (1973).
- BOULANGER, P., LEMAY, P., BLAIR, G. E., and RUSSELL, W. C., J. Gen. Virol. 44, 783-800 (1979).
- AXELSEN, N. H., and SVENDSEN, P. J., In "Protides of the Biological Fluids" (H. Peeters, ed.), Vol. 19, pp. 561-564. Pergamon, Oxford, 1972.
- WILHELM, J. M., and GINSBERG, H. S., J. Virol. 9, 973-980 (1972).
- LEMAY, P., and BOULANGER, P., Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 131, 259-275 (1980).
- 20. KESSLER, S., J. Immunol. 115, 1617-1624 (1975).
- 21. LEMAY, P., BOUDIN, M. L., MILLEVILLE, M., and BOULANGER, P., Virology 101, 131-143 (1980).
- BOULANGER, P., and LOUCHEUX-LEFEBVRE, M. H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 194-201 (1972).
- SACHS, D. H., SCHECHTER, A. N., EASTLAKE, A., and ANFINSEN, C. B., J. Immunol 109, 1300-1310 (1972).

- ACCOLA, R., and CELADA, F., FEBS Lett. 67, 299– 302 (1976).
- LAZDUNSKI, C. J., PAGES, J. M., and LOUVARD, D., J. Mol. Biol. 97, 309-335 (1975).
- PAGES, J. M., VARENNE, S., and LAZDUNSKI, C. J., Eur. J. Biochem. \$7, 145-153 (1976).
- PRAGE, L., PETTERSSON, U., HÖGLUND, S., LON-BERG-HOLM, K., and PHILIPSON, L., Virology 42, 341-358 (1970).
- EVERITT, E., LUTTER, L., and PHILIPSON, L., Virology 67, 197-208 (1975).
- D'HALLUIN, J. C., MILLEVILLE, M., MARTIN, G. R., and BOULANGER, P., J. Virol. 33, 88-99 (1980).
- BOUDIN, M. L., D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., and BOULANGER, P., Virology 101, 144-156 (1980).
- KELLENBERGER, E., Biosystems 12, 201-223 (1980).
 BOULANGER, P., and HENNACHE, B., FEBS Lett. 35, 15-18 (1973).
- 33. HENNACHE, B., and BOULANGER, P., Biochem. J. 166, 237-247 (1977).

786

ANNEXE 2

VIROLOGY 116, 589-604 (1982)

Assembly of Adenovirus Penton Base and Fiber

MARIE-LAURE BOUDIN AND PIERRE BOULANGER¹

Laboratoire de Virologie Moléculaire (U-233) de l'Inserm, Place de Verdun, Lille, France

Received June 23, 1981; accepted September 22, 1981

Human adenovirus type 2 (H2) fiber isolated from the cellular pool of H2 wild-type (WT) soluble components was found to be capable of assemble in vitro with penton base obtained from the fiber-defective temperature-sensitive (ts) mutant H2 ts-125. This assembly occurred over a relatively broad range of pHs (5.5-9.0) and of ionic strengths (0.05-1.0). The extent of penton formation was estimated by two-dimensional immunoelectrophoresis. The legitimacy of the assembly in vitro was demonstrated by morphological, biochemical, and biological evidence. The assembly of the penton base with the fiber appeared to be a reversible reaction, with a dissociation constant $K_D = 2 \times 10^{-7} M$, in terms of fiber molarity. This value implied a high affinity of the penton base for the fiber. Comparative digestions by carboxypeptidase of uncombined fiber and of penton base-combined fiber suggested that the recognition site for assembly involved the last 20 amino acids of the C-terminal sequence of the fiber polypeptide chain. The same analysis performed on [14C]glucosamine-labeled fiber and penton seemed to indicate that the carbohydrate units carried by the fiber were positioned too far from the C-end to be directly involved in the recognition and assembly process of the penton base with the fiber. Chimeric penton produced in vitro by incubating fiber and penton base from different adenovirus serotypes, as well as in vivo by interserotypic ts⁺ recombinants suggested a group specificity of the recognition site on the fiber and a likely highly conserved C-terminal amino acid sequence. Assembly of penton base and fiber in vitro resulted in a significant change in the antigenicity of the penton base-combined fiber, which was thought to reflect some three-dimensional remolding.

INTRODUCTION

Adenoviruses are unique among animal viruses in their possession of apical projections (the pentons) which when isolated show hemagglutination and cell attachment properties (reviewed by Philipson and Pettersson, 1973). The penton capsomer is formed from two different entities: the penton base, anchored at each of the 12 vertices and presenting a fivefold symmetry, and the fiber, originally described as an antenna-like structure terminated by a knob (Valentine and Pereira, 1965). The shaft portion of the fiber is jointed to the penton base as a tenon in a mortise, and the bonds involved have been shown to be noncovalent. Penton can be readily dissociated with guanidine (Norrby, 1969),

¹ To whom reprint requests should be addressed.

pyridine (Pettersson and Höglund, 1969), or deoxycholate (Boudin *et al.*, 1979).

Cells infected with wild-type (WT) human adenovirus 2 (H2) or 5 (H5) produce large quantities of "soluble," i.e., nonvirion-incorporated capsid components hexon, penton, and fiber, but scarce amounts of free penton base. Free penton base is found accumulated as one of the major structural components in cells infected with fiber-defective, temperaturesensitive (ts) mutants of adenovirus maintained at the nonpermissive temperature 39.5° (Russell et al., 1972; Martin et al., 1978). The fiber-defective mutants H2 ts-115 and H2 ts-125 have been recently employed to purify and characterize adenovirus type 2 penton base (Boudin et al., 1979).

The aim of the present study was to analyze the mechanism of molecular recog-

589

0042-6822/82/020589-16\$02.00/0 Copyright © 1982 by Academic Press, Inc. All rights of reproduction in any form reserved. - 103 -

nition and assembly of the penton base with the fiber, mainly by using an *in vitro* assembly system in which H2 ts-125 penton base was reacted with H2 WT fiber. Data on the binding sites were also obtained from penton naturally formed *in vivo* within the infected cell.

MATERIALS AND METHODS

Virus and cell Human adenovirus types 2 (H2), 5 (H5), and 3 (H3) wild type (WT) were grown on KB cells maintained in suspension culture at 3×10^5 cells/ml in Eagle's minimum essential medium supplemented with 5% horse serum. H2 ts-125 mutant has been isolated after nitrous acid treatment of an H2 WT stock, and phenotypically characterized as a fiber-defective ts mutant (Martin *et al.*, 1978). Cells were infected at a multiplicity of infection of 25 to 50 PFU per cell.

Purification of H2 WT fiber and penton, and of H2 ts-125 penton base. Soluble fiber and penton were purified from H2 WT-infected KB cells by a four-step procedure comprising fluorocarbon extraction, ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex and hydroxyapatite chromatography (Boulanger and Puvion, 1973). Soluble penton base was obtained from KB cells infected with H2 ts-125 at the nonpermissive temperature 39.5°. The method of purification of H2 ts-125 penton base was basically the same as H2 WT penton, and has been described in detail elsewhere (Boudin et al., 1979).

Cross-immunoelectrophoresis. A modification of the basic technique described by Laurell (1965) was used for two-dimensional (2D) immunoelectrophoresis. Electrophoresis of adenovirus antigen mixture (10 µl, 5-10 mg/ml) was first performed in the horizontal direction in an agarose gel (first dimension) at 10 V/cm for 75 min, then the agarose strip transferred onto another glass plate. In the second electrophoretic step, performed at a right angle, proteins were forced into agarose gel containing rabbit anti-adenovirus antibody (100-200 µl antiserum in 12 ml agarose gel). Second-dimension run: 16 hr at 3 V/ cm. All electrophoreses were performed

with tap water cooling (Martin *et al.*, 1975); Boulanger *et al.*, 1979). The agarose plate was dried and stained with Coomassie blue R 250.

Quantification of immune precipitate peaks was made by measurement of the peak areas using the MOP/AM01-System (Kontron-Messgeräte) for quantitative image analysis. Calibration curves (micrograms of protein vs peak area, expressed as square millimeters) were constructed from peaks of 2D patterns obtained with purified protein samples (penton, penton base, or fiber). The protein content of the standard samples was determined by the method of Lowry *et al.* (1951).

Electron microscopy. Samples were stained with 1% uranyl formiate, buffered with 0.1 M Na cacodylate, pH 7.0, and examined in the Hitachi HU-12 electron microscope.

Protein isofocusing. Comparative isoelectric point determinations were made by agarose gel isofocusing. The electrophoresis was performed in 1% agarose gel containing 5% Ampholine, pH 3.5 to 9.5 (Pharmacia Fine Chemicals), for 20 min at 10 V/cm (constant voltage) followed by a 60-min run at 6 W (constant power). The pH gradient was determined by elution of 1-cm gel slices.

Preparation of antisera. Polyspecific antisera against WT H2 or WT H5 capsid components were obtained by multiple injections in the rabbit of virus particles purified by two cycles of CsCl banding. Monospecific antiserum against serotype 2 penton base, serotype 2 fiber, and serotype 5 fiber were made by repeated injections in the rabbit of the corresponding precipitin line freshly formed within the agarose gel of several 2D immunoelectrophoresis plates (usually 20 to 30 plates; Martin et al., 1975).

Sucrose density gradient centrifugation. Penton (penton base and its fiber projection) formed in vivo or in vitro was isolated in neutral sucrose gradient as a 10.5 S component, separable from the uncombined fiber (6.1 S; Sundquist *et al.*, 1973) and from the free penton base (9 S; Boudin - 104 -

et al., 1979). The gradients contained 5-27% sucrose (w/v) in 0.02 M Tris-HCl, pH 8.1, 1 M NaCl, 10% (v/v) glycerol, and 1 mM Na EDTA. The gradients were centrifuged for 21 hr at 49,000 rpm and 4° in a Beckman SW 50-1 rotor (Lemay and Boulanger, 1980).

Fractions (0.2 ml) were collected through the bottom. The gradients were calibrated with beef liver catalase (Cat, 11.2 S), *Escherichia coli* alkaline phosphotase (AP, 6.0 S), and yeast 3-phosphoglycerate kinase (PGK, 3.1 S). AP was purchased from Worthington; Cat and PGK from Boehringer. Enzyme markers were assayed as previously described (Lemay *et al.*, 1980) using a Rotochem II A 36 centrifuge analyzer (Roche-Kontron).

Hemagglutination (HA) tests. The penton formed in vivo ("natural") or in vitro ("artificial") was tested with respect to its indirect hemagglutination (IHA) properties. IHA tests were performed in a microtitration kit (Flow Laboratories). Serial twofold dilutions of penton samples isolated in a sucrose gradient as a 10.5 S component were incubated for 1 hr at 37° with aliquots of antipenton base serum (Kaolin adsorbed and heat inactived), diluted at 1:100 in phosphate-buffered saline. Thus antipenton base antibodies were used to bridge the incomplete hemagglutinin (the penton) via the penton base unit. Rat blood cells were added and incubation was then continued at 37° for 1 hr. The IHA titer was given by the reciprocal of the highest dilution producing a positive HA reaction.

Polyacrylamide gel electrophoresis. Unless otherwise stated polypeptide analysis was performed in a SDS-containing 17.5% polyacrylamide slab 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 described by Laemmli (1970). Samples were denatured by heating for 2 min at 100° in SDScontaining sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 6 M urea, 10% 2mercaptoethanol, 0.002% bromophenol blue). The gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250, dried under vacuum, and autoradiographed on Kodak Royal X-Omat-S film.

Labeling of viral proteins. Adenovirus proteins were labeled in vivo either with [³⁵S]methionine (5 μ Ci/ml, 600-700 Ci/ mmol, Amersham, U. K.) or with [¹⁴C]valine (1 μ Ci/ml, 250 mCi/mmol, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France), from 18 to 36 hr p.i., in a culture medium containing 10% of the concentration of the corresponding amino acid in the normal medium. [¹⁴C]Glucosamine (61 mCi/mmol, Commisariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) was added at 0.1 μ Ci/ml in a normal culture medium, from 15 to 36 hr p.i.

Enzymes. Chymotrypsin (EC 3.4.21.1) from bovine pancreas, $3 \times$ crystallized, was purchased from Worthington Biochemicals, *Staphylococcus* V8 protease (EC 3.4.21) from Miles Biochemicals. Yeast carboxypeptidase Y (EC 3.4.12) was purchased from Pierce Chemicals. DFP-treated carboxypeptidase A (EC 3.4.12.2) from bovine pancreas, $2 \times$ crystallized, and carboxypeptidase B (EC 3.4.12.3) from porcine pancreas, $2 \times$ crystallized, were both purchased from Sigma.

RESULTS

Assembly of Adenovirus 2 (H2) Penton Base with Fiber in Vitro

Incubation of H2 ts-125 penton base with H2 WT fiber in 0.05 M Na phosphate buffer, pH 6.8, at 4° overnight resulted in assembly of both units to form complete penton. In vitro assembly was assayed by 2D immunoelectrophoresis which resolves the two reactants and the product (Boudin et al., 1979; Boulanger et al., 1979). As shown in Fig. 1, when incubation medium contained equivalent amounts of penton base and fiber (in terms of micrograms of protein) the assembly process was partial, and large quantities of penton base and fiber remained as free uncombined units (Fig. 1a). By contrast all the available fiber could be assembled with penton base when a large excess of penton base was added (Fig. 1b). When a considerable excess of fiber was added to the incubation mixture, all the penton base appeared to



FIG. 1. Two-dimensional immunoelectrophoretic analysis of penton assembled in vitro. (a) Pattern of partial assembly of penton base (peak 1) and of fiber (peak 4), forming penton (peaks 2 + 3). 3.2 μ g of H2 ts-125 penton base and 3.2 μ g of H2 WT fiber were incubated in 0.05 *M* Na phosphate buffer, pH 6.8, at 4° overnight, in a total volume of 10 μ l. Precipitin line 2 corresponded to antigenic determinants carried by the fiber combined with the penton base; precipitin line 3 corresponded to the antigenic determinants carried by the penton base unit of the penton. (b) Complete assembly of fiber (1.5 μ g) into penton, in the presence of an excess (3.3 μ g) of penton base. (c) Complete assembly of penton base (1.6 μ g) into penton in the presence of a large excess of fiber (10.7 μ g). (a, b, c) Staining with Coomassie blue R-250. (d) Same plate as (c), autoradiographed on Kodak Royal X-Omat S film. Note that only peaks 2 and 4, corresponding to antigenic determinants carried by the fiber, are visible.

- 106 -

be linked to the fiber to form penton (Fig. 1c).

When $[^{14}C]$ valine-labeled fiber was used for assembly experiments, ^{14}C label appeared in the precipitin line corresponding to antigenic determinants of the fiber combined with the penton (Fig. 1d). This radioactive pattern confirmed that assembly occurred *in vitro* and ruled out possible minor alterations of the penton base or of the fiber unit, modifying their electrophoretic migration. Two-dimensional immunoelectrophoresis proved therefore to be a useful method to demonstrate the extent of assembly of penton base with fiber (Boudin *et al.*, 1979).

Legitimacy of the Assembly of Penton Base with Fiber in Vitro

Since nonspecific (or "illegitimate") interactions between H2 ts-125 penton base and H2 WT fiber could occur *in vitro*, several experiments were designed to control the specificity of the interactions and the congruence of the penton assembled *in vitro* with the penton formed *in vivo* within the infected cell.

(i) Electron microscopy. No visible difference was observed between penton synthesized in vivo and extracted from infected cells, and penton assembled in vitro, from H2 ts-125 penton base and from H2 WT fiber (not shown).

(ii) Immunology. When an excess of free H2 ts-125 penton base was incubated with a H2 WT-infected cell extract, the peak of immune precipitate of penton increased, and no additional precipitin line or spur appeared, suggesting a total antigenic identity between the penton preexisting in vivo and the penton formed in vitro (not shown).

(iii) Sedimentation pattern. Velocity sedimentation analysis in sucrose gradient showed that penton assembled in vitro cosedimented with penton formed in vivo, with an apparent sedimentation coefficient of 10.5 S (Lemay and Boulanger, 1980). This result excluded nonspecific aggregates between penton base and fiber.

(iv) Isoelectric focusing. Similarly, the penton formed in vivo and in vitro pos-

sessed the same pI of 5.9. Under the same conditions, native hexon focused at pH 5.5, native penton base at pH 5.2, and native free fiber at pH 6.4.

(v) Carboxypeptidase digestions. Pentons formed in vitro and in vivo, and isolated in sucrose gradient as 10.5 S components, were digested with carboxypeptidase Y (CPY; ratio of enzyme to substrate of 2:100) at 37°, and hydrolysis stopped at different times (0.5 to 24 hr) by addition of an equal volume of SDS-denaturing sample buffer, with heating for 2 min at 100°. As described below, the CPY digestion of the native fiber was limited to the cleavage of about 20-25 amino acids from the C-end. In contrast with the fiber, the penton base appeared to be much more sensitive to CPY. and its extensive proteolysis was evidenced by the occurrence of multiple low-molecular-weight polypeptide bands in polyacrylamide gel (see Fig. 5).

The kinetics of digestion of the fiber subunit of the penton by CPY were similar for both *in vivo* and *in vitro* penton samples (not shown), suggesting that the fiber was linked to the penton base via the same binding site carried by its shaft portion. In the case of an illegitimate association occurring *in vitro* between the fiber and the penton base (e.g., via the fiber terminal knob), the degree of protection of the Cterminal end of the fiber by the penton base would have been significantly lower than in a normal penton edifice assembled *in vivo* (see below).

(vi) Indirect hemagglutination (IHA). Antipenton base serum was used to bridge the pentons attached to the rat erythrocytes, and therefore behaving as an incomplete hemagglutinin. Penton formed in vivo ("natural") or in vitro ("artificial") was separated from the other capsid components or from unassembled subunits by sucrose gradient centrifugation. For an antipenton base serum dilution of 1:100, and a protein concentration of penton samples of 0.3 to 0.5 mg/ml, the IHA titer was found to be of the same order of magnitude in "natural" and "artificial" penton, ranging from 512 to 1024 units.

All these experimental data strongly

C

BOUDIN AND BOULANGER

a

suggested that penton assembled *in vitro* from free H2 ts-125 penton base and free H2 WT fiber on the one hand, and penton assembled *in vivo* within the adenovirusinfected cell on the other hand, were identical structures, possessing the same biological properties.

Parameters of the Reaction of Penton Assembly in Vitro

(i) Kinetics of assembly. Assembly of the penton base with the fiber occurred

FIG. 2. Displacement of penton base-combined fiber by an excess of free fiber. (a) Two-dimensional immunoelectrophoretic pattern of a nonlabeled H2 WT-infected cell extract. 50 µg of H2 WT soluble components were first electrophoresed in the horizontal direction (first dimension), then reacted in the second dimension against 150 µl of antiadenovirion serum. Peak 1, hexon; peak 2, free penton base; peak 5, free fiber; peak 4, penton base antigenic determinants of the penton; peak 3, fiber antigenic determinants of the penton. (b) Stained plate of the same H2 WTinfected cell extract as in (a) incubated with [14C]valine-labeled fiber (2 µg, 650 cpm). (c) Autoradiogram of the same plate as in (b). Radioactive label is visible in precipitin lines corresponding to the antigenic determinants carried by the fiber: line 5 (free fiber) and line 3 (fiber assembled with penton base). Inconstant peak (x) corresponds to a minor unidentified antigen.

rapidly. 2D immunoelectrophoreses performed after different periods of incubation at 4° revealed that a plateau of association was reached after 10 min of incubation of 0.05 M Na phosphate, pH 6.8. In some experiments, assembly was performed directly in the well of the agarose gel of the 2D plate, for 2 min at room temperature. The standard conditions for *in vitro* assembly were: 0.05 M Na phosphate buffer, pH 6.8, 1 mM PMSF, overnight at 4°.

(ii) Influence of the ionic strength. Assembly was tested in 0.05 M Na phosphate, pH 6.8, containing NaCl up to 2 M. It was found that penton could assemble at NaCl concentrations as high as 1 M.

594

ADENOVIRUS PENTON BASE AND FIBER ASSEMBLY



FIG. 3. Double-reciprocal plot of penton base and fiber assembly kinetics. The reciprocal of the rate of assembly reaction of fiber with penton base (1/V) was plotted as a function of the reciprocal of the fiber molarity, 1/[F]. 3 µl of penton base solution (6 µg protein) was reacted with increasing amounts of [14C]valine-labeled fiber $(0.25 \ \mu g/\mu l)$; 135 cpm/µl) in a final volume of 20 µl. Assuming a molecular weight of 180,000 for the fiber, 100 cpm corresponded to 1 pmol in the fiber preparation used here. The rate of reaction was given by the radioactivity immunoprecipitated by antipenton base serum (penton base-bound fiber), expressed as cpm · min⁻¹ at 25°. The intercept on X axis, at $-2.1 \times 10^{-6} M$, gave a $K_D = 4.7 \times 10^{-7} M$ in this experiment.

(iii) Influence of the pH. The incubations of H2 ts-125 penton base and H2 WT fiber were performed in 0.05 M phosphate buffer, whose pH varied from 4.5 to 9.5. The assembly of penton appeared unchanged between pH 5 and 9.

(iv) Influence of detergents. Triton X-100 (1% in final concentration) had no effect on assembly when added to the incubation mixture at 4°. However, when penton base and fiber were heated to 56° for 1 min in the presence of 1% Triton X-100, assembly decreased dramatically. In contrast with Triton, the ionic detergent sodium deoxycholate (DOC), at final concentrations of 0.5-1.0%, prevented the assembly of penton base with fiber to occur at 4°, even without heating the samples at 56° prior to incubation at low temperature.

(v) Influence of the ratio of penton base to fiber on the assembly process in vitro. As already suggested (see Fig. 1), the assembly of penton base with fiber seemed to be a reversible reaction, of the form

$$PB + F \stackrel{(1)}{\rightleftharpoons} P,$$

where PB represented the free penton base, F the free fiber, and P the penton, formed from one penton base and one fiber. The rates of formation and breakdown of penton would be given by

Rate of formation of $P = K_F(PB)(F)$,

Rate of dissociation of $P = K_R(P)$.

The dissociation constant K_D would be given by the ratio of these rates

$$K_D = \frac{K_R}{K_F} \, .$$

As shown in Figs. 1b, c, the amount of penton assembled *in vitro* could be markedly increased when the concentrations of either penton base (Fig. 1b) or fiber (Fig. 1c) or both were increased.

That the assembly reaction was reversible was supported by the following experimental argument. When an excess of radioactively labeled H2 WT fiber was incubated with a nonlabeled H2 WT-infected cell extract, label was found as expected in the peak of fiber on the 2D immunoe-

595


FIG. 4. Effect of the carboxypeptidase Y (CPY) digestion of free fiber on its assembly with penton base *in vitro*. (A) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of control undigested (a, c) and CPYdigested (b, d) fiber. (b) CPY to fiber ratio of 5:100, 4 hr of incubation at 37° . (d) Same ratio of enzyme to substrate as in (b), 24 hr of incubation at 37° . The CPY-resistant core of the fiber was a polypeptide unit of 60,000 daltons (60 K). corresponding to the loss of ca. 20 amino acids from the C-end. The 62 K polypeptide species corresponded to the polypeptide subunit of the undigested fiber. (v) Adenovirus 2 polypeptide markers. (B) Partial assembly of undigested fiber with equivalent amounts of penton base. (1) Free penton base; (2) intermediate peak of penton assembled *in vitro*; (3) excess of uncombined fiber. (C) Absence of assembly of penton base (1) with CPY-digested fiber (3). Fiber was digested with CPY for 24 hr at 37° (ratio of enzyme to substrate of 5:100). Note that the CPY-resistant core of the fiber (as in A, d) was still antigenic (peak 3).

lectrophoretic pattern, but also in the penton peak (Fig. 2). This suggested that cold fiber, already combined with penton base to form penton preexisting *in vivo*, was displaced by hot fiber added in large excess. The binding of labeled fiber to free penton base present in the extract might be excluded since there was no visible de-



FIG. 5. Kinetics of carboxypeptidase digestion of native and deoxycholate-dissociated penton. (A) Aliquots of native penton (30 μ g) were digested by carboxypeptidase Y (0.6 μ g) for 1 (a), 2 (b), 5 (c), 10 (d), 30 (e), 60 min (f), 2 (g), 4 (h), 8 (i), and 24 hr (j), respectively, and analyzed in a SDSpolyacrylamide gel. (B) Aliquots of the same penton sample were treated with 0.5% sodium de-oxycholate (DOC) at 56° for 90 sec before CPY digestion under the same conditions as in (A). The complete conversion of the fiber polypeptide unit 62 K to the 60 K species (CPY-resistant core) occurred after 8 hr of digestion of DOC-disrupted penton (B, i), whereas this conversion was still incomplete after 24 hr of digestion for native penton (A, j). The arrows indicate the breakdown polypeptides of the penton base. Note that the digestion of the penton base unit (85 K) was similar in (A) and (B), excluding a lower activity of the enzyme in the presence of DOC.

ADENOVIRUS PENTON BASE AND FIBER ASSEMBLY

BOUDIN AND BOULANGER

111 -



crease of the penton base peak on the 2D pattern (Fig. 2b).

(vi) Affinity constant for fiber and penton base. The H2 ts-125 penton base was considered as the active molecule, with a binding site on which the shaft portion of the fiber could adapt, and the fiber as the ligand. Assembly was thus conducted in vitro under standard conditions for 5 min at 25° with a constant concentration of unlabeled penton base in the incubation medium, and increasing amounts of [¹⁴C]valine-labeled fiber. At the end of the incubation period the samples were fivefold diluted and antipenton base serum



FIG. 6. Occurrence of intertypic chimera of penton in vitro. (a) Two-dimensional immunoelectrophoretic pattern of adenovirus type 5 (H5)-infected cell extract. 90 μ g of H5 soluble components was reacted against 150 μ l of antiadenovirus 5 serum. (b) Same H5 extract as in (a) incubated with an excess of purified H2 ts-125 penton base (5.3 μ g). The 2-D pattern exhibited a drastic increase of penton resulting from the assembly *in vitro* of H2 penton base and H5 fiber (peaks 3 and 4). (c) Superimposition of plates (a) and (b) showing the increase of the penton peak and the decrease of the peak of free fiber (peak 5). The hexon peak (1) served as an internal standard and showed that equivalent amounts of H5 antigens were crossreacted with antibodies in (a) and (b).

was added (usually 10 μ l for a final volume of incubation medium of 100 µl), and the reaction mixture further incubated for 4 hr at 37°. The immune complexes were then collected onto protein A of Staphylococcus aureus cells, Cowan I strain (Kessler, 1975), as previously described (Boulanger et al., 1979). Radioactivity adsorbed onto Staphylococcus aureus cells corre-sponded therefore to ¹⁴C-labeled fiber combined with penton base. The Lineweaver and Burk plot of the reciprocal of the rate of reaction (radioactivity immunoprecipitated per minute at 25°) versus the reciprocal of the substrate concentration (14Clabeled fiber added) gave a dissociation constant (K_D) for the assembly reaction ranging from 1×10^{-7} to 5×10^{-7} M, in five



ADENOVIRUS PENTON BASE AND FIBER ASSEMBLY

FIG. 7. Comparative peptide fingerprinting in SDS-polyacrylamide gel of [¹⁴Cjglucosamine-labeled penton and fiber. (A) Autoradiogram of chymotrypsin (CT)-digested fiber (a-c) and penton (d-f). Enzymic hydrolyses were performed for 30 min at 37° with 0.05 (a, d), 0.10 (b, e), and 0.25 μ g (c, f) of CT. (B) Autoradiogram of *Staphylococcus* V8 protease-digested fiber (g-i) and penton (j-l). Enzymic hydrolyses were performed at 37° for 30 min with 0.05 (g, j), 0.10 (h, k), and 0.25 μ g (i, l) of *Staphylococcus* V8 protease. Protein samples in (A) and (B) were denatured with 1% SDS and heating at 100° for 2 min prior to protease digestion. Peptides were electrophoresed in 24% acrylamide. (C) Autoradiogram of carboxypeptidase Y (CPY)-digested penton (n) and fiber (o). Penton and fiber were digested as native samples, at a ratio of enzyme to substrate of 4:100, at 37° for 24 hr. (m) Undigested fiber. (v) Adenovirus 2 polypeptide markers (17.5% polyacrylamide gel).

В

different experiments with an average of 2×10^{-7} M, in terms of fiber molarity. An example of such a determination is presented in Fig. 3. This value for K_D implied a high affinity of the penton base for the fiber.

Involvement of the C-Terminal Domain of the Fiber in Its Binding with the Penton Base

The native adenovirus fiber was found to be incompletely digested by carboxypeptidase Y (CPY). A polypeptide unit smaller in size by a molecular weight of 2000-2500 than the undigested fiber polypeptide (62,000) was obtained (Fig. 4A) CPY-digested fiber no longer assembled with penton base *in vitro* (Fig. 4C) suggesting that (i) the C-terminal portion of the fiber was involved in its binding with the penton base, and (ii) the C-end of the fiber polypeptide unit was positioned on the opposite side of the terminal knob.

In order to confirm this finding, the kinetics of CPY digestion of intact native penton formed in vivo was compared with that of the same penton dissociated by 0.5% deoxycholate at 56° (Boudin et al., 1979) into its two subunits, penton base and fiber. Figure 5 showed that the C-terminal end of the fiber was protected when penton was in its native state (Fig. 5A), whereas the fiber C-terminus was more rapidly degraded when the fiber was released from the penton base (Fig. 5B). For the same ratio of CPY to substrate (2%), the total conversion of the 62 K fiber polypeptide unit to the 60 K species occurred after 8 hr of incubation at 37° for the deoxycholate-treated penton (Fig. 5B, i). The conversion of 62 to 60 K was still incomplete after 24 hr of CPY digestion for the intact penton (Fig. 5A, j).

C

Specificity of Recognition between Fiber and Penton Base

When H2 ts-125 penton base was added in large excess to adenovirus type 5 (H5)infected cell extract, the peak of immune precipitate corresponding to free H5 fiber decreased and the peak corresponding to

BOUDIN AND BOULANGER

113 -



FIG. 8. In vitro assembled penton cross-immunoelectrophoresed against an antipenton serum. (a) Two-dimensional plate. All the available penton base was assembled in the presence of a large excess of fiber (see Fig. 1c). Precipitin lines corresponded to antigenic determinants carried by (1) uncombined fiber, (2) penton base portion of the penton, (3) penton base-combined fiber, (4) extraantigenic determinants present on the fiber bound to the penton base. (b) Artist's drawing of a 2D pattern suggesting a masking of antigenic determinants originally present on the uncombined fiber, after its binding with the penton base. Line 4 represented the extra-antigenic determinants present on the free fiber and masked on the penton base-bound fiber. Antigens corresponding to lines (3) and (4) were all contained in the precipitin line (1). (c) Artist's drawing of a 2D pattern evoking an exposure of additional antigenic sites on the fiber protein, after its binding with the penton base. Line 4 represented the theoretical pattern evoking an exposure of additional antigenic sites on the fiber protein, after its binding with the penton base. The antigenic determinants elicited by precipitin lines (1) and (4) were all contained in the precipitin lines (1) and (4) were all contained in the precipitin line (3). The experimental pattern (a) resembled the theoretical pattern depicted in (c). On *in vivo* patterns, the extra-antigenic determinants appearing on the penton base-combined fiber (line 4) are masked by the superimposition of penton base precipitin line (2). See also Fig. 2 (b, c).

ADENOVIRUS PENTON BASE AND FIBER ASSEMBLY



FIG. 8-Continued.

penton increased (Fig. 6). This suggested that penton base of adenovirus type 2 could assemble with fiber of serotype 5 and form a chimeric penton molecule. Similarly, incubation of an excess of H2 fiber in H5-infected cell lysate resulted in an increase of the peak of penton and a decrease of the peak of free penton base (not shown). This implied that penton base of serotype 5 could also assemble with fiber of serotype 2. Both serotypes 2 and 5 belong to the same serological subgroup (Rosen, 1960).

With adenovirus type 3, chimeric penton could also occur, although with a less efficiency (not shown). This was done with either penton base of serotype 2 bound to fiber of serotype 3, or penton base of serotype 3 bound to fiber of serotype 2. These data suggested that the molecular recognition between the fiber and the penton base was not type specific, but was group specific, or subgroup specific. This implied that the C-terminal amino acid sequence and/or the C-terminal three-dimensional structure of the fiber was highly conserved throughout the adenovirus serotypes.

Role of the Carbohydrate Units Carried by the Fiber in the Assembly of Penton

Adenovirus fiber has been found to be glycosylated (Ishibashi and Maizel, 1974).

In an attempt to determine whether the glycosylation of the fiber had an influence on assembly of fiber and penton base in vivo, the glycosylation sites of free and of penton base-combined fiber were compared. Aliquots of [14C]glucosamine-labeled fiber and penton, purified as previously described (Boulanger and Puvion, 1973), were denatured by heating with 1% SDS at 100° for 2 min and incubated at 37° for 1 hr with increasing amounts of chymotrypsin, or Staphylococcus V8 protease. [14C]Glucosamine-labeled peptides were analyzed in SDS-polyacrylamide gel. The autoradiograms revealed the same pattern in free fiber and in fiber associated with penton base (Fig. 7A, B). In addition, digestions of native penton and fiber by carboxypeptidase Y (CPY) revealed that all the [¹⁴C]glucosamine label was retained in a 60 K species, i.e., in the CPY resistant core of the fiber (Fig. 7C).

These data seemed to indicate that the fiber protein was glycosylated on the same sites, whatever its state, i.e., unassembled or assembled with the penton base. The CPY digestion pattern also revealed that the glycosylated sites were located at a distance of at least 20 amino acid residues upstream from the C-end. All these results suggested that the fiber protein was glycosylated *in vivo* independently from its assembly with the penton base, and that

the carbohydrate units were not directly involved in this binding.

Conformational Evolution of the Fiber during Its Assembly with the Penton Base

Assembly of penton base and fiber in vitro resulted in the exposure of additional antigenic determinants at the surface of the fiber protein. This was evidenced by two-dimensional immunoelectrophoresis (Fig. 8). Antigenic determinants carried by the free fiber were all contained in the penton base-combined fiber, whereas the latter possessed extra antigenic sites visible as a precipitin line not present in the free fiber (Fig. 8a, line 4). The antiserum used was an antipenton serum, i.e., an immune serum raised against the completed penton edifice. However, a certain degree of spontaneous dissociation of penton into free penton base and free fiber was constantly observed (Boudin and Boulanger, 1981).

This finding was somewhat unexpected since assembly of the fiber with the penton base should mask antigenic determinants carried by the portion of the fiber involved in the binding site. This suggested either (i) that the three-dimensional conformational changes which occurred in the fiber protein upon its binding with the penton base were drastic in comparison with the result of the masking of antigens at the binding site, or (ii) that the C-terminal portion of the fiber was weakly antigenic compared with the rest of the molecule.

DISCUSSION

Adenovirus fiber isolated from the cellular pool of H2 WT soluble components, and penton base from fiber-defective mutant H2 ts-125-infected cell extracts were found to be capable of assembly *in vitro* over a relatively broad range of pHs (5.5-9.0) and of ionic strengths (0.05-1). The extent of assembly of penton base and fiber to form penton was estimated by twodimensional immunoelectrophoresis. The penton base-fiber complex obtained was not the result of nonspecific interactions or aggregates between the two virus components but was a legitimate assembly of penton. This was evidenced by electron microscopy, immunological reactivity, sedimentation behavior, isoelectric focusing, hemagglutination properties, and resistance to exopeptidase digestions.

The assembly of the penton base with the fiber appeared to be a reversible reaction. To determine the affinity constant for fiber and penton base, increasing amounts of [14C]valine-labeled fiber were reacted in vitro with a constant concentration of cold penton base, and penton thus assembled immunoselected by antipenton base antibody onto Staphylococcus aureus protein A. The reaction velocity (V) was expressed as a function of the fiber concentration [F] considering the fiber as the substrate and the penton base as the active molecule with its binding site. A double-reciprocal plot 1/V versus 1/[F]yielded a straight line intercepting on Xaxis at $-1/K_D$. The mean value for K_D thus obtained, of 2×10^{-7} M in terms of fiber molarity, implied a high affinity of the penton base for the fiber. However, the low dissociation constant was probably not sufficient to explain why fibers were not released from virions upon storage in diluted solution. As previously suggested (Boudin and Boulanger, 1981), pentons might be more stable as virion incorporated than as soluble capsomers.

Attempts were also made to determine the dissociation constant K_D by incubating labeled penton base with unlabeled fiber and immunoselection by an antifiber serum. The inconsistency of the results obtained by this method led us to examine the fate of penton after reaction with antibodies directed toward the fiber or toward the penton base. It was found that the penton was dissociated into penton base and fiber when reacted with antifiber antibody, but not with antipenton base antibody (Boudin and Boulanger, 1981). The dissociating effect was more pronounced with subgroup-specific antibody, which is thought to react with the antigenic determinants carried by the shaft portion of the fiber (Noorby, 1969; Pettersson and Philipson, 1968; Norrby, et al., 1969). These findings suggested that the

adenovirus fiber could be modified in its three-dimensional structure upon antibody binding, and that this conformational change was critical for the stability of its binding with the penton base (Boudin and Boulanger, 1981).

Digestions of fiber and of penton by carboxypeptidase suggested that the fiber interacted with the penton base via its Cterminal end, and that this C-end lied opposite the terminal knob. The binding site on the fiber molecule seemed to involve the 20 last amino acids of the sequence and likely not the carbohydrate units located further toward the N-end. Assembly of penton base and fiber in vitro resulted in the exposure of additional antigenic determinants at the surface of the fiber protein, rather than in the disappearance of antigens masked by the penton base (Fig. 8). This result implied a significant conformational change of the fiber after its binding with the penton base. This confirmed previous data suggesting that the vertex subunits of adenovirus were made of flexible and malleable proteins, susceptible to undergoing three-dimensional modifications during virion assembly, virion maturation, and antibody binding (D'Halluin et al., 1980; Boudin et al., 1980; Boudin and Boulanger, 1981).

The C-terminal portion of the fiber appeared highly conserved throughout the adenovirus serotypes since chimeric penton could be formed in vitro by assembly of penton base and fiber belonging to different serotypes of the same subgroup (types 2 and 5), and of different subgroups (serotypes 2 and 3). The recognition site, at least in its three-dimensional structure, was therefore group specific, and not type specific. This result was confirmed by the occurrence of viable ts+ interserotypic recombinants, in which the fiber and penton base genes belonged to each one of the parental serotypes (Mautner, personal communication: D'Halluin et al. 1982). Thus a stable chimeric penton could occur in vivo as well as in vitro.

The recent determination (Herissé *et al.*, 1981) of the amino acid sequence of the fiber will permit a three-dimensional reconstruction of its C-end responsible for

the assembly with the penton base. The relative pH and ionic strength independence of the assembly, and the action of the detergents suggested that mostly hydrophobic bonds were involved in this binding.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM (ATP 72-79-104), CNRS (ERA 070225 and ATP Biologie Molécuiaire du Gène), DGRST (Contrat 30-7-0290), and the Faculté de Médecine de Lille. We thank S. Wojcik and V. Milleville for expert secretarial aid, D. Petite for providing cell culture, and C. Cousin for H2 ts-125 stocks.

REFERENCES

- BOUDIN, M. L., and BOULANGER, P. (1981). Antibodytriggered dissociation of adenovirus penton. Virology 113, 781-786.
- BOUDIN, M. L., D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., and BOU-LAGNER, P. (1980). Adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation. *Virology* 101, 144-156.
- BOUDIN, M. L., MONCANY, M., D'HALLUIN, J. C., and BOULANGER, P. A. (1979). Isolation and characterization of adenovirus type 2 vertex capsomer (penton base). Virology 92, 125-138.
- BOULANGER, P., LEMAY, P., BLAIR, G. E., and RUS-SELL, W. C. (1979). Characterization of adenovirus protein IX. J. Gen. Virol. 44, 783-800.
- 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.
- D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., and BOULANGER, P. (1982). Physical mapping of adenovirus type 2 ts mutations by restriction nuclease analysis of interserotypic recombinants. J. Virol., in press.
- D'HALLUIN, J. C., MILLEVILLE, M., MARTIN, G. R., and BOULANGER, P. (1980). Morphogenesis of human adenovirus type 2 studied with fiber- and fiber and penton base-defective temperature sensitive mutants. J. Virol. 33, 88-99.
- HÉRISSÉ, J., RIGOLET, M., DUPONT DE DINECHIN, S., and GALIBERT, F. (1981). Nucleotide sequence of adenovirus 2 DNA fragment encoding for the carboxylic region of the fiber protein and the entire E4 region. Nucleic Acids Res. 9, 4023-4041.
- ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J. V. JR. (1974). The polypeptides of adenovirus. VI. Early and late glycopolypeptides. *Virology* 58, 345-361.
- KESSLER, S. (1975). Rapid isolation of antigens from cells with a *Staphylococcal* protein A antibody adsorbant: Parameters of the interaction of anti-

- 117 -

body-antigen complexes with protein A. J. Immunol. 115, 1617-1624.

- 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.
- LEMAY, P., and BOULANGER, P. (1980). Physicochemical characteristics of structural and nonstructural proteins of human adenovirus 2. Ann. Virol. 131, 259-275.
- LEMAY, P. BOUDIN, M. L., MILLEVILLE, M., and BOU-LANGER, P. (1980). Adenovirus type 2 protein IIIa. I. Purification and characterization. *Virology* 101, 131-143.
- 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.
- MARTIN, G. R., WAROCQUIER, R., and BOULANGER, P. (1975). Quantitation of adenovirus soluble antigens by crossed immunoelectrophoresis: Application to serological characterization of mutants. *Intervi*rology 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, 503-314.

- NORRBY, E. (1969). The structural and functional diversity of adenovirus capsid components. J. Gen. Virol. 5, 221-236.
- NORRBY, E. MARUSYK, H., and HAMMARSKJÖLD, M. L. (1969). The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. V. Identification of antigen specificities available at the surface of virions. *Virology* 38, 477-482.
- 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., and PHILIPSON, L. (1973). Structure and function of virion proteins of adenoviruses. In "Progress in Experimental Tumor Research" (F. Homburger, ed.), Vol. 18, pp. 2-55. Karger, Basel.
- ROSEN, L. (1960). A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. Amer. J. Hyg. 71, 120-128.
- 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.
- SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1973). Structural proteins of adenoviruses. IX. Molecular weight and subunit composition of the adenovirus type 2 fiber. Virology 51, 252-256.
- VALENTINE, R. C., and PEREIRA, H. G. (1965). Antigens and structure of the adenovirus. J. Mol. Biol. 13, 13-20.

ANNEXE 3

CRYSTALLIZATION, ENZYMATIC CLEAVAGE AND THE POLARITY OF THE ADENOVIRUS TYPE 2 FIBER

Christiane DEVAUX^{*1,2}, Marie-Laure CAILLET-BOUDIN², Bernard JACROT¹ and Pierre BOULANGER^{2,**}.

¹European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation, c/o Institut LAUE-LANGEVIN, 156X 38042 GRENOBLE CEDEX, FRANCE.

²Unité de Virologie U-233 de l'INSERM, Place de Verdun, 59045 LILLE, FRANCE.

Keys words: adenovirus, fiber, crystal, assembly, polarity.

Running title: Adenovirus 2 fiber polarity.

*To whom all correspondence should be adressed.

**Present address: Molecular Biology Institute and the Department of Microbiology, University of California, Los Angeles, California 90024, USA.

ABSTRACT

Crystals of the fiber protein of adenovirus type 2 have been grown. Analysis of these crystals (type I crystals) showed that they were composed of fiber polypeptide with a lower apparent molecular weight (60K) than that of the soluble or virion-incorporated fiber (62K). N-terminal sequencing revealed that the fiber polypeptide chain of 60K was cleaved at tyrosine 17 from the N-end. The C-terminus remained intact. Assays with protease inhibitors suggested that the spontaneous cleavage of the fiber occurring upon its crystallization was due to a cellular, calcium-dependent, chymotrypsin-like protease co-purifying with the fiber and activated during hydroxyapatite chromatography. Crystallization of fiber purified in the presence of chymostatin provided crystals of a different structure under the electron microscope (crystals of type II), and composed of 62K fiber polypeptide units. The 62K fiber from the type II crystals, as well as the 62K fiber isolated from infected cell extracts were capable to associate with penton base in vitro to form penton capsomer. The 60K fiber has lost this capacity, suggesting that the N-terminus of the fiber is involved in the binding with the penton base. The accessibility of the N and C-termini of the fiber inside the penton structure was probed by anti-peptide sera after limited proteolysis. The results are consistent with a polarity of the fiber in which its Nterminus is in contact with the penton base, the C-terminus being distally oriented, thus confirming the model proposed by Green et al. (EMBO J. 2,1983,1357-1365).

INTRODUCTION

121 -

Adenoviruses are a family of icosahedral viruses. One of the capsid proteins, the fiber, is responsible for the attachment of the virus to the cell receptors (Hennache and Boulanger, 1977; Hennache et al., 1979; Svensson et al., 1982). It is non-covalently linked to another viral protein, the penton base, located at each of the twelve vertices of the icosahedral capsid on a five fold symmetry axis. In electron microscopy the fiber appears as a rod-like structure, whose length varies with the serotype, terminated by a knob of about 40 Å in diameter. Adenovirus type 2 fiber is 270 Å in length and its polypeptide unit is formed of a chain of 582 amino acids giving a molecular weight of 62,056 (reviewed by Pettersson, 1984; Philipson, 1983). Analysis of the sequence revealed a 15-residue motif, repeated 22 times from residues 43 to 400. Green et al (1983) have proposed a model in which this repeat unit would constitute the shaft of the fiber (210 Å). In this model the N-terminus of the fiber is in contact with the penton base. This is in contrast to the polarity of the fiber previously suggested (Boudin & Boulanger, 1982), and based on the analysis of in vitro assembly of fiber and penton base after different carboxypeptidase treatments.

Recent studies of the stoichiometry of fiber and penton base polypeptide units within the virion and the penton (Boudin & Boulanger, 1981; Boudin et al., 1979; Van Oostrum & Burnett, 1985) and recent crystallographic data (Devaux et al.,1984; and unpublished data) raise questions as to the validity of the dimeric model proposed by Green et al.(1983). A trimeric nature, consistent with previous sedimentation and electrophoretic analysis (Boulanger & Devaux, 1983; Lemay & Boulanger, 1980; Sundquist et al., 1973), might therefore be reconsidered, as well as its polarity.

In the present study we have analyzed the limited proteolysis of the fiber which occurred "spontaneously" during the crystallization process. Sequencing of the protein termini was performed and studies with various proteolytic enzymes and specific inhibitors led to the characterization of the cleavage site. Comparative analysis of *in vitro* interaction of the cleaved and intact fiber with the penton base and immunological studies using antipeptide sera, indicate that the N-terminus of the fiber is in contact with the penton base, and that the Cterminus has a distal orientation with respect to the virus capsid. The previous assignment of the C-terminus for this contact was based on the inhibition of the fiber-penton base interaction by treatment of the fiber with carboxypeptidase Y (Boudin & Boulanger, 1982). We demonstrate by enzymatic and immunological studies that commercial preparations of carboxypeptidase Y are contaminated by an endoprotease which also cleaves the fiber at tyrosine 17.

MATERIALS AND METHODS

1. Purification and crystallization of the fiber. KB cells growing in suspension were infected by adenovirus type 2 for 40 h and then harvested and processed as previously described (D'Halluin et al., 1978) . Fiber was purified from the pool of cellular, non-assembled viral proteins, according to the three step procedure of Boulanger and Puvion (1973) with minor modifications. The source of adenovirus fiber and penton was Freon extracts from adenovirus 2 wild type-infected cells. The source of penton base was Freon extracts from H2ts125-infected cells, maintained at the non-permissive temperature. H2ts125 is a fiber-defective mutant which accumulates unassembled penton base at

39.5°C (Boudin & Boulanger, 1982). The Freon extracts were precipitated with ammonium sulfate at 55% saturation and the precipitate was chromatographed on a DEAE-Sepharose column equilibrated with 40 mM Tris-HCI buffer, pH 7.65. Elution was performed using a linear NaCI gradient. Fiber eluted at 70 mM NaCI , penton base at 170 mM and complete penton at 130 mM. Penton base and penton were used directly after DEAE-Sepharose chromatography. Fiber was further purified by chromatography on an hydroxyapatite (HAP) column . Fiber was eluted at 65 mM KCI .lts crystallization was performed by the hanging drop method (Devaux et al., 1984).

2. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Protein samples were denatured with SDS and 2-mercaptcethanol and polypeptides analyzed on a 13% (w:v) acrylamide, 0.08%bis-acrylamide slab gel overlaid by a 5% acrylamide, 0.13% bis-acrylamide stacking gel, in the discontinuous buffer system of Laemmli (1970). All gels and buffers contained 0.1% SDS . For analysis of proteins under non-denaturating conditions, samples were dissolved in 62.5 mM Tris-HCI pH 6.8 containing 10% glycerol and electrophoresed in a 5% (w:v) acrylamide, 0.13% bisacrylamide slab gel overlaid by a 3% acrylamide, 0.75% bis-acrylamide in the same buffers as above, but without SDS.

3. <u>Protein immunoblotting.</u> Electrophoretic transfer from SDS-polyacrylamide gels to nitrocellulose (NC) membranes was performed in 0.025M Tris-glycine pH 8.3 ,0.05% SDS and 20% methanol , at 36 Volts and 4°C for 6h. After transfer, the NC blots were soaked in phosphate buffer saline (PBS) containing 5% non-fat dry milk (Johnson et al. 1984) and 0.05% Tween 20 (PMT buffer) for 2h at 20°C , then incubated with a 1:500 to 1:1,000 fold dilution of anti-serum for 1h in PMT. Unbound antibodies were removed by extensive washing with PMT buffer and bound antibodies were detected by reaction with ³⁵S-methionine-

- 123 -

labeled protein A (2 uCi /100 cm² of NC) and autoradiography, or by peroxydase-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (Institut Pasteur, Paris) and diamino-3,3'benzamidine tetrachlorhydrate- H_2O_2

4. <u>Peptides and antipeptide sera.</u> The N-terminal tridecapeptide met-lys-argala-arg-pro-ser-glu-asp-thr-phe-asn-pro, and the C-terminal dodecapeptide thrasn-ser-tyr-thr-phe-ser-tyr-ile-ala-gln-glu were synthesized by a solid phase method (Merrifield et al.,1982). They were purified by gel filtration and preparative reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC), then conjugated to lysylated tetanus toxoid and injected subcutaneously into rabbits (Beachey et al.,1984).

5. <u>Determination of the N-terminal sequence</u>. The N-terminal sequence was performed by automated sequential Edman degradation. PTH-aminoacids were identified by HPLC.

6. Determination of the C-terminal sequence. 5nM of soluble, undigested fiber and 5 nM of fiber dissolved from the crystals in 0.2 M N-ethylmorpholine acetate, pH 7, were dialyzed against the same buffer and incubated at 37°C for 30 min, 1h and 2h with carboxypeptidase A or B (ratio enzyme: substrate of 1:40). All carboxypeptidase solutions were dialyzed against incubation buffer before use to remove possible traces of free amino acids. Undigested proteins were precipitated by glacial acid acetic.The liberated amino acids were identified by 2D-thin layer chromatography (TLC) in the following conditions. First dimension : 2-propanol / 2-butanone /1N HCl (60:15:25), second dimension : 2-methyl 2- butanol / 2-butanone / acetone / methanol / 0.885M ammonia solution / H2O (50:20:10:15:5:15). Revelation: 1% ninhydrin, 0.1%cadmium.

7. <u>Proteolytic digestions.</u> Assays with different enzymes were conducted at 37°C in 10 mM sodium phosphate pH 7.0 for various lengths of time, as detailed in the figure legends. Carboxypeptidase A, diisopropyl fuorophosphate-treated carboxypeptidase A (CPA-DFP), carboxypeptidase B, trypsin, trypsin-TPCK and chymotrypsin were purchased from Sigma Products, Carboxypeptidase Y, from Pierce Chemicals. Protease inhibitors: pepstatin A, leupeptin and chymostatin (Sigma Products) were used at a concentration of 25 ug/ml (Umazawa, 1976).

RESULTS

1. Characterization of adenovirus crystal fiber.

Adenovirus 2 fiber was purified from the cellular pool of viral components, as described in Materials and Methods. This unassembled fiber is referred to as "soluble" fiber. It was processed for crystallization immediately after purification. Crystals appeared in 3 to 10 days at room temperature (Devaux et al., 1984). They were washed three times with 10 mM phosphate at pH 6.1 (the pH of crystallization) in order to eliminate uncrystallized material, centrifuged for 5 min at 10,000 g, and dissolved in 10 mM Tris-HCl pH 7.5. Freshly isolated soluble fiber, fiber dissolved from crystals (this latter one being referred to as "crystal" fiber), and fiber incorporated into the virions were comparatively analyzed by SDS-PAGE (Fig.1A). Freshly purified soluble fiber (as well as fiber maintained frozen at -20°C) migrated with an apparent molecular weight (MW) of 62,000 (62K) in an SDS-gel, as did the fiber dissociated from the virus. This value was in agreement with the molecular weight calculated from the sequence (62,056). In contrast, fiber dissolved from the crystals migrated with a lower apparent MW of about 60,000 (60K).

- 125 -

In order to determine whether this difference of migration corresponded to a cleavage of the polypeptide chain, and if so, at which terminal end, the crystal fiber (60K) was electrophoresed in an SDS-polyacrylamide gel, electrically transferred on an NC membrane and analyzed with two different antisera. One was raised against a synthetic tridecapeptide corresponding to the sequence of the N-terminus of the adenovirus type 2 fiber (anti-N serum); the other one was directed towards a synthetic dodecapeptide corresponding to the C-terminal sequence (anti-C serum). Figures 1B and1C show that the 62K fiber reacted strongly with both anti-N and anti-C sera, whereas the 60K crystal fiber gave only a positive reaction with the anti-C serum.

Automated Edman degradation of the 60K crystal fiber gave the following Nterminal sequence: asp-thr-glu-thr-gly-pro-pro-thr-val-pro (data not shown). The comparison with the sequence of the adenovirus type 2 fiber placed without ambiguity the beginning of the N-terminus of the crystal fiber (60K) at asp 18: acetyl-<u>met-lys-arg-ala-arg-pro-ser-glu-asp-thr-phe-asn-pro-val-tyr-pro-tyr</u>⁽¹⁷⁾asp-thr-glu-thr-gly-pro-pro-thr-val-pro. A cleavage has thus occurred at the tyrosyl-aspartyl bond at position 17, removing an N-terminal heptadecapeptide.

Kinetics of enzymatic degradation of the C-terminus from the 62K soluble fiber and from the 60K crystal fiber were difficult to obtain. However, 2D TLC analysis of the carboxypeptidase A hydrolyzates showed similar patterns of liberated amino acids for both soluble fiber (62K) and crystal fiber (60K). The main spots found were: glu, gln, ala, ile, ser, phe, tyr (not shown). The Cterminal sequence of the fiber is: thr-phe-ser-tyr-ile-ala-gln-glu (Pettersson, 1984). No amino acid appeared after incubation with carboxypeptidase B which preferentially liberates the basic residues. In spite of its large specificity no detectable digestion was obtained with carboxypeptidase Y.

- 126 -

The fiber processing occurring during crystallization was studied in the absence or in the presence of various protease inhibitors. Solutions of freshly purified soluble fiber were left at room temperature for several days and analyzed by SDS-PAGE. After 48h, up to 50% of the fiber was cleaved into a 60K product . After 72h, all the 62K was converted into 60K (not shown). The degradation time varied greatly from one preparation to another. The conversion of 62K into 60K occurred at the same rate in the presence of leupeptin (a trypsin inhibitor) or of pepstatin A (an acid protease inhibitor), but was inhibited by the chymotrypsin inhibitor chymostatin. It occurred at a slower rate in the presence of the chelating agent EDTA (1 mM), or when the temperature was kept at 4°C. Samples kept at -20°C for several months were not degraded.

127 .

EDTA (1 mM) and chymostatin (25 ug/ml) were therefore added to all buffers throughout the whole purification procedure, and in some cases HAP chromatography was replaced by preparative isoelectric focusing (IEF). Using these conditions, the fiber remained intact (62K in SDS-PAGE), even when the solutions were left at room temperature for a week. Several types of crystals were obtained in which the fiber polypeptide migrated with an apparent MW of 62K. One of these crystals (crystal of type II), processed for the electron microscopy, is shown in Fig. 2 B, and compared to a crystal of spontaneously cleaved, 60K fiber (type I crystal; Fig.2A). The crystal of cleaved fiber showed repeats of four planes of tightly packed knobs, whereas in the crystal of uncleaved fiber, planes of kncbs appeared in separated groups of two. Image analysis is now being undertaken and will be presented elsewhere.

In order to reproduce the spontaneous cleavage, freshly purified fiber was incubated with different enzymes and analyzed by SDS-PAGE. The conversion 62K-->60K appeared with kinetics depending upon the enzyme used (Fig.1A). Chymotrypsin cleaved the fiber more rapidly than trypsin, and than carboxypeptidases A and Y. With TPCK-treated trypsin, the cleavage was greatly delayed. No apparent cleavage ocurred when carboxypeptidase Y was treated by chymostatin prior to incubation with the fiber, or when a DFPcarboxypeptidase A was used (Fig.1B).

The different digested fiber samples were analyzed by immunoblotting with anti N-terminus and anti-C-terminus serum. All bands migrating with a MW of 60K reacted with the anti-C serum (Fig.1C), but failed to react with the anti-N serum (Fig.1B). This indicated that the N-terminus of the fiber polypeptide was degraded by protease(s) contaminating the commercial preparations of enzymes used here. Inhibition of the fiber cleavage by chymostatin suggested that the contaminating protease was a chymotrypsin-like enzyme. N-terminal analysis of the 60K fiber polypeptides resulting from the different enzyme cleavages, showed aspartic acid as the N-terminal residue. This again confirmed that a chymotrypsin-like cleavage had occurred after tyrosine 17.

3- In vitro association of soluble fiber and crystal fiber with penton base.

In the virion the fiber is non-covalently bound with the penton base. When solutions of fiber and penton base are mixed and incubated under neutral conditions, the two proteins may assemble into complete penton *in vitro* (Boudin and Boulanger, 1982). The *in vitro* association of different fiber samples with penton base was assayed by electrophoresis in a non-denaturating polyacrylamide gel. As shown in Fig.3, a band of complete penton appeared

on the gel when undigested (62K) soluble fiber, or 62K fiber dissolved from a crystal (such as the one presented in Fig.2B: crystal of type II) were incubated with penton base. When 60K fiber dissolved from another type of crystal (type I crystal; Fig.2A) was incubated with penton base, no assembled penton capsomer was detectable (Fig.3, lane9). In addition, none of the preparations of fiber which migrated with an apparent MW of 60K in SDS-PAGE were found to be capable to associate with the penton base to form a penton capsomer (not shown).

4. Anti-peptide immunoblot analysis of fiber associated with or dissociated from the penton base.

The penton of adenovirus can be dissociated by treatment with 0.5% sodium deoxycholate (DOC) at 56°C into its two subunits, the penton base and the fiber (Boudin et al., 1979). Taking advantage of this property, the accessibility of the termini of the fiber associated with the penton base (as it exists in the penton) or dissociated from the penton base with DOC, was comparatively analyzed using anti C-terminus or anti N-terminus serum after incubation with carboxypeptidase Y (CPY). Intact penton and DOC-treated penton samples were incubated with CPY at 37°C for different lengths of time, then electrophoresed in SDS-PAGE and electrically transferred onto NC membranes. The blots were immunologically reacted with anti-C or anti-N serum. As shown in Fig.4, the anti-C serum reacted with the fiber from the untreated or DOC- treated penton with the same intensity (Fig.4 B,D). Whether the fiber is associated or not with the penton base, CPY did not digest its Cterminus. The slight decrease in the apparent MW of the fiber polypeptide suggested a cleavage occurring at the other end. This was confirmed by the immunoblot with the anti-N serum. The fiber associated with the penton base in

the penton structure showed a full reactivity towards the anti N-terminus serum throughout the kinetics of CPY digestion. Only after 24h of digestion (Fig.4, lane 10) was observed a decrease in the fiber signal. In contrast, the fiber released from the penton base with DOC appeared to be degraded at a much faster rate, and the fiber signal was drastically reduced after 1h of CPY digestion (Fig.4, lane 6). The fiber associated with the penton base was therefore protected against digestion with CPY which, in this set of experiments, acted as an endopeptidase instead of as an exopeptidase.

DISCUSSION

Several preparations of purified fiber have been crystallized at room temperature. Fiber dissolved from these crystals was analyzed in SDSpolyacrylamide gels. Compared to the migration of virion-incorporated fiber, and of soluble fiber freshly isolated from cell extracts, the crystal fiber polypeptide migrated with a lower apparent molecular weight : 60K instead of 62K. Immunoblotting analysis showed that the 60K band did not react with a specific serum directed against a synthetic peptide corresponding to the Nterminus of the fiber, but was fully reactive with a serum directed against the Cterminus. Sequence analysis of the N-terminus of the 60K fiber dissolved from type I crystals indicated that a cleavage occurred at tyr 17 during the crystallization process. When 60K crystal fiber was incubated *in vitro* with penton base, there was no detectable assembly of penton capsomer.

The same processing of the 62K polypeptide chain into a 60K product could also be observed when solutions of purified fiber were left at room temperature. The conversion 62K-->60K was prevented by chymostatin, a specific inhibitor of chymotrypsin, or by EDTA. It was generally complete within 72h, but

- 130 -

depended greatly on the batch of infected cells and on the type of purification. Most of the time it appeared immediately after HAP chromatography. When HAP was replaced by another purification step (e.g. preparative isoelectrofocusing) or when purification was performed in the presence of a chymotrypsin inhibitor, or of a cheiating agent, it became possible to obtain, at room temperature, crystals in which fiber remained intact (62K), and capable of interacting *in vitro* with the penton base to form a penton structure.

The conversion of 62K into 60K could also be reproduced by incubation of the fiber with different proteases (Fig.1). The rate of conversion appeared to be more rapid with chymotrypsin (2h) than with the other enzymes (24h at least for a complete desappearance of the 62K band). This conversion did not occur when carboxypeptidase A was treated with DFP (a serine-protease inhibitor) or drastically decreased when trypsin was treated with TPCK and carboxypeptidase Y with chymostatin . The commercial enzymes used here seemed therefore to be contaminated by a chymotrypsin-like enzyme. This is well-known for trypsin. Preparations of carboxypeptidase Y have already been reported to contain an acidic endopeptidase activity sensitive to pepstatin A (Lee & Riordan, 1978) or contaminated with a trypsin-like endopeptidase (Carlsen & Christiansen, 1985).

All our observations showed that adenovirus fiber purified by DEAE-Sepharose and hydroxyapatite (HAP) suffered a cleavage before and/or during crystallization at room temperature. This occurred at tyrosine 17 from the Nterminus of the fiber polypeptide chain. Comparative analysis of the enzymatic and "spontaneous" cleavage of the fiber strongly suggested that an enzyme sensitive to chymostatin and to EDTA, probably a calcium-dependent, chymotrypsin-like cellular protease, co-purified with the fiber and was activated

- 131-

- 132 -

by calcium ions during HAP chromatography. The fact that we were able to obtain crystals composed of uncleaved fiber when HAP was omitted (type II crystals, Fig. 2B) supports this hypothesis. The characteristics of this protease seem to significantly differ from those of the adenovirus-coded endopeptidase, a chymotrypsin-like, non metallo, serine protease (Bhatti & Weber,1979; Chatterjee & Flint, 1987). Fiber lacking its terminal end, and migrating as a 60K polypeptide in an SDS-polyacrylamide gel, was found to be incapable of assembling with penton base *in vitro* to form penton capsomer (Fig.3). Immunoblot analysis of the fiber termini probed with anti-peptide sera showed that the N-terminus was protected from proteolysis when the fiber was associated with the penton base, as it is in the penton capsomer or the virus capsid (Fig.4).

All the data presented here are therefore consistent with a model in which the N-terminal end of the fiber is in close contact with the penton base and plays a critical role in penton assembly. The previous assignement of the Cterminus for this contact was based on the inhibition of the association of the fiber with the penton base by carboxypeptidase Y (Boudin & Boulanger, 1982). However, we found that most of the commercial preparations of CPY were contaminated by an endopeptidase which cleaved the fiber polypeptide chain near its N-terminus, at tyrosine 17. This limited proteolysis made the fiber incapable of assembly with the penton base to form the penton structure. The polarity of the fiber deduced from the present work is in agreement with the orientation of the fiber shaft proposed by Green et al. (1983). However, the oligomeric nature of the fiber still remains questionable, and this latter model should be revised if the fiber is in fact a trimer.

REFERENCES

Beachey, E.H., Tartar, A., Seyer, J.M., and Chedid, L. (1984). Epitope-specific protective immunogenicity of chemically synthesized 13-, 18- and 23-residue peptide fragmens of streptococcal M protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2203-2207.

Bhatti, A.R., and Weber, J. (1979). Protease of adenovirus type 2: partial characterization. Virology 96, 478-485.

Boudin, M.L. and Boulanger, P. (1981). Antibody-triggered dissociation of adenovirus penton. Virology <u>113</u>, 781-786.

Boudin, M.L. and Boulanger, P. (1982). Assembly of adenovirus penton base and fiber. Virology <u>116</u>, 589-604.

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 <u>92</u>, 125-132.

Boulanger, P. and Devaux, C. (1983). Native molecular weight of adenovirus proteins : on the oligomeric structure of the fiber. Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>110</u>, 913-918.

Boulanger, P. and Puvion, F. (1973). Large-scale preparation of soluble adenovirus hexon, penton and fiber antigens in highly purified form. Eur.J.Biochem. <u>39</u>, 37-42.

Carlsen, J. and Christiansen, K. (1985). Use of carboxypeptidase Y in studies of the mode of insertion of cytochrome b5 into lipid vesicles. Anal.Biochem. <u>148</u>, 542-545.

Chatterjee, P.K., and Flint, S.J. (1987). Adenovirus type 2 endopeptidase : an unusual phosphoprotein enzyme matured by autocatalysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>84</u>, 714-718.

Devaux, C., Berthet-Colominas, C., Timmins, P.A., Boulanger, P. and Jacrot, B. (1984). Crystal packing and stoichiometry of the fibre protein of adenovirus type 2. J. Mol. Biol. (1984). <u>174</u>, 729-737.

D'Halluin, J.C., Martin, G.R., Torpier, G. and Boulanger, P. (1978). Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates. J. Virol. 26, 357-363.

Green, N.M., Wrigley, N.G., Russell, W.C., Martin, S.R. and McLachlan, A.D. (1983) Evidence for a repeating cross- sheet structure in the adenovirus fibre. EMBO J. <u>2</u>, 1357-1365.

Hennache, B. and Boulanger, P. (1977).Biochemical study of KB-cell receptor for adenovirus. Biochem. J. <u>166</u>, 237-247.

Hennache, B., Torpier, G. and Boulanger, P. (1979). Freeze-fracture study of adenovirus-induced KB cell surface alterations. Exp. Cell Res. <u>124</u>, 139-150.

Johnson, D.A., Gautsch, J.W., Sportman ,J.R. and Elder,J.H. (1984). Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. Gene Anal. Techn. <u>1</u>, 3-8.

Lee, H-W. and Riordan, J.F. (1978). Does carboxypeptidase Y have intrinsic endopeptidase activity? Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>85</u>, 1135-1142.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) <u>227</u>, 680-685.

Lemay, P. and Boulanger, P. (1980). Physicochemical characteristics of structural and nonstructural proteins of human adenovirus 2. Ann.Virol. <u>131</u>, 259-275.

Merrifield, R.B., Vizioli, L.D., and Boman, H.G. (1982). Synthesis of the antibacterial peptides Acropin A (1-33). Biochemistry 21, 5020-5031.

Pettersson, U. (1984) Structural and nonstructural adenovirus proteins. In " The adenoviruses." pp 205-270, Ginsberg H.S. ed, Plenum Press, NY.

Philipson, L. (1983). Structure and assembly of adenoviruses. In "Current topics in microbiology and immunology", vol. 109, pp1-52, Doerfler W. ed, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

Sundquist, B., Pettersson, U., Thelander, L. and Philipson, L. (1973). Structural proteins of adenoviruses. IX. Molecular weight and subunit composition of adenovirus type 2 fiber. Virology <u>51</u>, 252-256.

Svensson, U., Persson, R. and Everitt, E. (1982) Virus-receptor interaction in the adenovirus system. I. Identification of virion attachment proteins of the HeLa cell plasma membrane. J.Virol. <u>38</u>, 70-81.

Umazawa, H. (1976). Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. In " Methods in Enzymology" Vol. 45, pp678-695, Lorand L. ed, Academic Press, NY.

Van Oostrum, J. and Burnett, R.M. (1985). Molecular composition of the adenovirus type2 virion. J. Virol. <u>56</u>, 439-448

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr R.Franck (EMBL, Heidelberg) for the sequencing of the N-terminal part of the crystal fiber and Pr J.C. Gesquière (Faculté de Pharmacie and Institut Pasteur, Lille) for the synthesis and the coupling of the C and N-terminal peptides. D. Petite is thanked for providing cell cultures and E. Truche for her expertise in IEF.

Figure 1.

(A) Comparative electrophoretic migration in an SDS-polyacrylamide gel of enzymatically digested adenovirus 2 fiber . (lane 1): 60K fiber dissolved from a crystal; (lanes 2,3) : control, untreated soluble fiber (62K) ; (4-18): soluble fiber samples incubated with: trypsin (T; lanes 4-6); TPCK-treated trypsin (T-TPCK; lanes 7-9) ; chymotrypsin (CT; lanes 10-12); carboxypeptidase Y (CPY; lanes 13-15); and carboxypeptidase Y pre-treated with chymostatin (CPY-CS; lanes 16-18) during 2h (lanes 4,7,10,13 & 16), 5h (5,8,11,14 & 17) and 20h (6,9,12,15 & 18). Virion polypeptides (V) were used as markers : (h): hexon ; (b): penton base; (f): fiber. All incubations were conducted at 37°C with a ratio of enzyme: substrate of 1:10. Coomassie blue staining.

(B) Immunoblot analysis of fiber samples, probed with serum anti-N-terminal peptide (B). (1): control, undigested 62K soluble fiber; (2-6): fiber incubated with: CT for 2h (2) and 20h (3); with CPY for 2h (4) and 20h (5); with DFP-treated carboxypeptidase A (CPA-DFP) for 20h (6); (7): 60K crystal fiber. Autoradiogram.

(C) Immunoblot analysis of (1) 62K soluble fiber, and (2,3) 60K crystal fiber, probed with serum anti-C-terminal peptide. Bound antibodies were detected by reaction with ³⁵S-methionine labeled protein A and autoradiography.

Figure2.

Electron micrographs of crystals of uncleaved and N-terminal cleaved fibers. (A): Crystal of type I, corresponding to N-cleaved fiber 60K (as shown in Fig.1, lane 1). (B): crystal of type II, composed of uncleaved 62K fibers. Microcrystals

were gently crushed, deposited on a carbon-coated grid and negatively stained by 1% uranyl acetate. Grids were examinated in a Jeol 100 CX electron microscope operated at 80 kV.

Figure 3.

In vitro association of penton base with different forms of fiber assayed by electrophoresis in a non-denaturating polyacrylamide gel. (lane 1): adenovirus 2 major soluble capsid components; (h): hexon; (b): penton base; (f): fiber; and (p): penton capsomer. (lane 2): penton, (lane 3): penton base, and (lane 6): soluble fiber, all of them purified from the cellular pool of viral material; (lane 7): 60K fiber dissolved from a type I crystal; (lane 4): 62K fiber dissolved from a type Il crystal. Soluble and crystal fiber samples shown in lanes 6,4, and 7 were incubated with penton base sample (as in lane 3) in neutral conditions, as described elsewhere (Boudin & Boulanger, 1982). The incuubation mixtures were analyzed in lanes 8 (62K soluble fiber + penton base), 9 (60K crystal fiber + penton base), and 5 (62K crystal fiber + penton base). Complete assembly of penton occurred with the 62K crystal fiber (5), partial assembly with the 62K soluble fiber. No assembled penton is detectable with 60K fiber (lane 9). Note that the soluble 62K fiber (6) appeared as a diffuse band, consistent with the observed heterogeneity in pl, and that the 60K crystal fiber (7) presented a faster migration due to the loss of one positive charge from the N-end. Coomassie blue staining.

Figure 4.

Western blot analysis of carboxypeptidase Y (CPY)-treated fiber associated or dissociated from the penton base. Intact penton (A and B) and penton dissociated by 0.5 % sodium deoxycholate (DOC) for 90 sec at 56°C (C and D)

were incubated with CPY during 0, 2, 5, 10, 30 min, 1, 2, 4, 6 and 24h at 37°C (lanes 1-10), with a ratio enzyme: substrate of 2%, and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-N-terminal serum (A and C) and anti-C-terminal serum (B and D). Adenovirus proteins are in lanes 11. Fiber-bound antibodies were detected by peroxydase-labeled anti rabbit IgG antibody.



and the polarity of the adenomius 2 fiber

figure 1.

Jage

'V

Cu/stallization, enzymetrie

Devaup et al.







Devaup et al figure 4 Crystallization, enzymatic cleavage and the polarity of the adenounus 2 film ANNEXE 4
Marie L. Caillet-Boudin Pierre Lemay

Laboratoire de Virologie Moléculaire, INSERM U. 233, CNRS UAC 114, Lille

Influence of the state of denaturation on the migration of adenovirus type 2 structural proteins in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels

The changes in the migration of adenovirus type 2 structural proteins in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels following various denaturation conditions or periods have been studied. Several factors such as proteolytic cleavages, disulfide bridges, carbamylation or residual charge effects which could lead to altered migration were screened. Resistant high order structures sensitive to the action of urea might cause these variations. A likely relationship between the difference of apparent molecular weight, frictional coefficient and hydrophobicity has been established.

1 Introduction

Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) has been widely used in the last twenty years to determine the molecular weight of numerous protein polypeptide subunits. Despite the improvements brought to the resolution of the systems described by Shapiro *et al.* [1] or Weber and Osborn [2] by the Laemmli modification [3], alterations in the electrophoretic mobility of various proteins

Correspondence: Dr. Pierre Lemay, Laboratoire de Virologie Moléculaire, INSERM U. 233, CNRS UAC 114, 2, Place de Verdun, F-59045 Lille Cedex, France

Abbreviations: SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; Ad2, adenovirus type 2

© VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, 1986

were soon reported. For example, glycosylation [4], phosphorylation [5] or high proline contents [6, 7] were claimed to alter the migration of proteins during SDS-PAGE. Moreover, single amino-acid substitutions can influence the mobility of SDS-protein complexes [7]. A fine analysis of such substitutions has been made for instance with the cellular oncogene ras [8]. In a previous report [9], a single amino acid substitution was described for the fiber protein of the adenovirus mutant Ad2 ts 125. The resulting effect is a shift down of the apparent molecular weight from 62 000 to 59 500. Conformational changes were evoked to explain this resulting abnormal SDS-gel pattern. In order to examine further the influence of resistant secondary structures on the mobility of the fiber protein of adenovirus type 2 (Ad2) proteins, different methods of protein denaturation were used prior to SDS-gel

0173-0835/86/0707-0309 \$02.50/0

310 M. L. Caillet-Boudin and P. Lemay

analysis. The alterations of mobility were recorded and a possible relationship which links the changes in apparent molecular weight to the frictional coefficient and the hydrophobicity was deduced.

2 Materials and methods

2.1 Cell cultures and viruses

Ad2 particles were produced in suspension cultures of KB cells grown in Joklik modified Eagle medium. The viruses were purified as previously described [10]. Virus fiber protein was isolated from the pool of soluble antigens according to Boulanger and Puvion [11].

2.2 Uniform labelling of viral proteins

This was achieved by adding 1 μ Ci of [¹⁴C]sodium formiate (specific activity 50–60 mCi/mM, Amersham, UK) per mL of infected cell cultures for 15 h at 15 h post-infection.

2.3 Analytical SDS-PAGE

Unless otherwise stated, samples were dissolved in an equal volume of a buffer made of 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8, containing 6 M urea, 5 % SDS, 10 % 2-mercaptoethanol and 0.005 % Bromophenol Blue and heated at 100 °C for various periods as mentioned in the text. This buffer will be further referred to as standard sample buffer. Polypeptides were analyzed in SDS-containing 17.5 % polyacrylamide resolving gels (acrylamide/bisacrylamide ratio of 50:0.235) in a Bio-Rad Model 220 slab gei cell. The stacking gel was made of 5 % acrylamide gel (acrylamide/bis-acrylamide ratio of 50:1.33). The discontinuous buffer system of Laemmli [3] was used. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue (Serva Blue, R-250), dried under vacuum and exposed to Kodak X-Omat S film. Molecular weight standards were the adenovirus type 2 polypeptides as described by Anderson et al. [12] or for higher molecular weights by the use of the high molecular weight calibration kit of Pharmacia, containing thyroglobulin (330 000), ferritin, half-moiety (220 000), albumin (67 000), catalase (60 000), lactate dehydrogenase (36 000), ferritin (18 500).



Figure 1. Variability of adenovirus type 2 structural protein mobility in SDS gel following various periods of denaturation. (A) Viral particles incubated for 24 h, 8 h, 4 h, 1 h and 30 min at 37 °C (lanes at 0 e) in the standard sample buffer (see Section 2.3) after a 2 min boiling period. (B) Viral particles incubated at 100 °C for 2, 5, 15 and 30 min in the standard sample buffer (lanes a to d). SDS-PAGE in a 17.5 % gel. V, indicates viral particles denatured for 2 min at 100 °C in the sample buffer (standard conditions). 25, 27, 53 and 80 Kd (Kd stands for kilodalton) indicate new protein bands appearing upon denaturation.

Electrophoresis 1986, 7, 309-315

2.4 Analytical SDS-PAGE in urea gradient

Viral proteins heat-denatured for 2 min at 100 °C in the standard sample buffer were analyzed in 15 % acrylamide gels containing a 0-8 M urea gradient oriented in a perpendicular direction with regard to the electrophoretic field (reviewed in [13]). The sample was loaded all along the top of the gel.

2.5 Protein blotting

This was done according to Towbin *et al.* [14]. Western blots were incubated with rabbit sera raised against fiber, hexon or penton base, followed by incubation with a horseradish peroxidase conjugate directed against rabbit immunoglobulins and then developed by 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride in presence of hydrogen peroxide [14].

2.6 Hydrophobicity calculation

Values were obtained from the data furnished by a computerized version (program "PROTEINS", P. Lemay, unpublished) of the Kyte and Doolittle algorithm [15].

3 Results

3.1 Influence of long incubation periods in denaturing mixtures on electrophoretic patterns

Virus particles were boiled for 2 min in the standard sample buffer and further incubated for 30 min, 1 h, 4 h, 8 h and 24 h at 37 °C before being loaded onto SDS gels. A slight modification of the mobility of the hexon (polypeptide II [12] and penton base (polypeptide III) was observed after a 24 h incubation period as well as the disappearance of the fiber polypeptide (IV) (Fig. 1A, lanes a-c). Three new bands of apparent molecular weight of 53 000, 25 000 and 27 000 were seen. The mobility of polypeptides IIIa, VII, VIII and IX remained unchanged under the same conditions. These changes were not observed when virus particles were incubated at 37 °C in the standard sample buffer without previous boiling (not shown). This phenomenon might be speeded up by operating at high temperature (viz. 100 °C). Virus particles were boiled for 2, 5, 15 and 30 min in the standard sample buffer before they were run on SDS gels. After 5 min at 100 °C, the 62 000 band corresponding to the fiber polypeptide disappeared and bands of 53 000, 25 000 and 27 000 apparent molecular weight appeared. The intensities of bands corresponding to proteins V and VI were reduced (Fig. 1B, lane b). After 15 and 30 min at 100 °C, the changes were more pronounced, i. e. polypeptides IV, V and VI disappeared whereas new bands of 80 000, 53 000 and 27 000 appeared. Variations were also observed in the migration of polypeptides II and III. Again, polypeptides IIIa, VIII and IX retained the same electrophoretic mobility (Fig. 1B, lanes c, d).

3.2 Possible factors leading to altered migrations

3.2.1 Proteolytic cleavages

To determine whether the bands appearing at 53 000, 27 000 or 25 000 were cleavage products of Ad2 major structural

Denaturation of adenovirus type 2 structural proteins 311

proteins (hexon, penton base or fiber), Western blots were performed. Virus particles were denatured for 2 min at 100 °C further incubated for 48 h at 37 °C, electrophoresed on SDS gels and blotted onto a nitrocellulose sheet. The Western blots were incubated as described in Section 2.5. No peroxidase label was seen at the location of the bands corresponding to the 53 000, 27 000 and 25 000 apparent molecular weight zones (not shown). This suggested that no cross-reactivity exists between these bands and the major components of the viral capsid but it cannot be excluded that the sera raised against the three major structural proteins are unable to recognize cleavage products of these proteins. The precise identification of the 53 000, 27 000 and 25 000 apparent molecular weight bands will be discussed !ater. Moreover, the same alterations of the electrophoretic patterns were observed for particles denatured for 2 min at 100 °C in the standard sample buffer and incubated at 37 °C for 48 h in the presence of protease inhibitors such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), N-tosyl-L-phenyalalanine chloromethyl ketone (TPCK) or ethyleneglycol-bis-\beta-aminoethylether-N,N.N',N' tetraacetic acid (EGTA). Thus, the 53 000, 27 000 and 25 000 apparent molecular weight components would not be the result of a proteolytic cleavage of virion components.



Figure 2. Variation of mobility of the viral proteins in 7.5 %, 10 %, 12.5 % and 15 % SDS-acrylamide gels. (-----) Denaturation time: 2 min at 100 °C in the standard sample buffer. (...) Denaturation time: 30 min at 100 °C in the standard sample buffer. ($\Delta \triangleq$) polypeptide II; $\Box \blacksquare$) polypeptide III; ($\triangleleft \triangleleft$) polypeptide IIIa; ($\Diamond \blacklozenge$) polypeptide IV; ($\bigcirc \blacklozenge$) polypeptide V; ($\nabla \lor$) polypeptide VI.

312 M. L. Caillet-Boudin and P. Lemay

3.2.2 Disulfide bridges

Virus particles were incubated with 5 mM iodoacetamide (5 mM final concentration) prior to heating at 100 °C. The denaturation was allowed to proceed for 15 and 30 min under a nitrogen atmosphere. Here again, the same alterations of the electrophoretic patterns were observed (not shown).

3.2.3 Carbamylation

Cyanates are known to be present in commercial urea preparations. Carbamylation of ε -lysine residues might occur during the denaturation step and then affect the electrophoretic pattern. To avoid such a modification, the sample buffer was made with ultrapure urea purchased from Schwarz-Mann (Cambridge, MA), claimed to be free of detectable cyanates by the supplier. Before its addition to the denaturation buffer, the freshly prepared urea solution was further deionized by treatment with a Dowex AG 501 × 8 mixed bed resin. Furthermore, poly-L-lysine (5 or 10 µg) was added to the sample as a competitor. In all cases, whether after 2 or 30 min of boiling, or with 5 or 10 µg poly-L-lysine added, the same alterations in the electrophoretic patterns were seen (not shown).

3.2.4 Residual charge effects

As shifts in mobility were seen for some proteins following various protocols of denaturation, a residual charge effect cannot be excluded which would affect the migration of those proteins. If no charge effects are involved, then a linear relationship is found when plotting the percentage of polyacrylamide of the gel versus the logarithm of the distance covered by Electrophoresis 1986, 7, 309-315

a given protein [16]. This linear relationship was effectively observed in our system with gels ranging from 7.5 to 15 % in polyacrylamide and denaturation times of 2 and 30 min at 100 °C in standard sample buffer (Fig. 2).

3.2.5 Existence of resistant structures

Urea gradient gel analysis: Viral particies were heat denatured for 2 min at 100 °C in standard sample buffer and loaded onto a 15 % acrylamide slab gel containing a 0-8 M urea gradient oriented in the horizontal direction [13]. Under these conditions (Fig. 3), the fiber polypeptide IV shifted above polypeptide IIIa and polypeptide V appeared as a doublet, as also polypeptide VI.

Long term denaturation of isolated viral bands: In order to identify the newly appearing bands, viral proteins were heat denatured for 2 min at 100 °C and run on a 17.5 % SDS gel. Protein bands were excised from the gel and heated for 30 min at 100 °C in standard sample buffer before loading onto a second gel. This made it possible to confirm that (i) polypeptide IV (fiber) shifted from 62 000 to 80 000 apparent molecular weight; (ii) polypeptide V shifted from 48 500 to 53 000; (iii) polypeptide VI shifted from 24 000 to 27 000. Hexon and penton base proteins also shifted (Fig. 4). Additionally, this analysis revealed that the fiber protein co-migrated together with polypeptide IIIa after a long incubation period at 37 °C or 5 min of boiling in the sample buffer, thus explaining the disappearance of this band from the gels shown in Fig. 1 (Fig. 4). After prolonged boiling this intermediate band shifts to the 80 000 apparent molecular weight band. Similarly, the 25 000 apparent molecular weight band corresponded to an intermediate product of the denaturation of protein VI (Fig. 4).



Figure 3. Urea-gradient gel electrophoresis of heat denatured Ad2 proteins in standard sample buffer. Viral proteins were allowed to migrate through a 15 % SDS-polyacrylamide gel containing a 0-8 M urea transverse gradient. Fiber polypeptide clearly shifted above polypeptide IIIa.

Electrophoresis 1986. 7. 309-315

313



Figure 4. Identification of the new bands appearing upon long denaturation times. (A) Hexon II (lanes a to d), penton base III (lanes e to h), and fiber IV (lanes i to 1). (B) Core protein V (lanes a to d), protein VI (lanes e to j) and core protein VII (lanes k, 1). Bands from a first SDS gel were excised and treated for varying periods of time at 100 °C in standard sample buffer before being loaded onto a second SDS gel. Boiling times: $2 \min (A, lanes a, e, i; B, lanes a, e, j); 5 \min (A, lanes b, f, j; B, lanes b, f); 10 \min (B, lane g); 15 min (A, lanes c, g, k; B, lanes c, h); 30 min (A, lanes d, h, 1; B, lanes d, i, k). V, viral particles heat-denatured for 2 min and 100 °C in the standard sample buffer. Arrowhead points on the 25 000 form of protein VI and arrows indicate the 27 000 form of this protein.$

BU

Table 1. Changes in electrophotette mounty of Auz vital proteins depending on the composition of the denaturation outer	Table 1	. Changes in e	electrophoretic mobility	of Ad2 viral protein	s depending on the con	mposition of the denaturation buffer"
---	---------	----------------	--------------------------	----------------------	------------------------	---------------------------------------

Boiling period	2 min				30 min			
Protein	SSB ^{b)}	SSB	SSB-Urea -ME	SSB-ME	SSB-SDS -ME	SSB-SDS	SSB-Urea	SSB-Urea -SDS
II (Hexon)	120 000	135 Kd	+	135 Kd	135 Kd	135 Kd	+	+
III (Penton base)	85 000	90 Kd	+	90 Kd	90 Kd	90 Kd	+	+
IIIa	66 000	+	+	+	+	+	+	+
IV (fiber)	62 000	80 Kd	+	80 Kd	80 Kd	80 Kd	+	+
V	48 500	53 Kd	+	53 Kd	53 Kd	53 Kd	+	+
VI	24 000	27 Kd	+	27 Kd	27 Kd	27 Kd	+	+
VII	18 500	17.5 Kd	+	17.5 Kd	17.5 Kd	17.5 Kd	+	+
VIII	13 000	+	+	+	+	+	+	+
IX	12 000	+	+	+	+	+	+	+

a) Samples were incubated for 2 or 30 min at 100 °C in an equal volume of standard sample buffer omitting one or two of the following compounds: 6 M urea, 5 % SDS or 10 % 2-mercaptoethanol. Abbreviations: SSB, standard sample buffer, ME, mercaptoethanol; + indicates a band with an apparent molecular weight similar to that obtained under standard conditions (SSB, 2 min, 100 °C); Kd, kilodalton. b) Apparent molecular weight values of Anderson *et al.* [12].

314 M. L. Caillet-Boudin and P. Lemay

3.3 Influence of the different denaturing reagents

Viral proteins: Standard sample buffers were made omitting one or two of the denaturing agents (viz. urea, SDS or 2-mercaptoethanol) and Ad2 particles were boiled in these various buffers for 2 or 30 min in order to obtain only the highly denatured species. The samples were then analyzed on SDS gels. The results are summarized in Table 1. Urea and prolonged boiling seemed to be the most important factors to achieve full denaturation of the viral polypeptides.

Fiber protein: Isolated fiber protein was denatured for 2 or 30 min at 100 °C in standard sample buffer omitting one or two of the three denaturing agents. The samples were loaded onto SDS gels (Fig. 5). When urea alone was present in the sample buffer a doublet with an apparent molecular weight of 160 000 was seen which may correspond to native fiber protein; also seen, after a 30 min boiling period, were bands of about 330 000 apparent molecular weight. These latter bands might correspond to fiber dimers or aggregates. These bands represented minor components relative to the polypeptide band but these experiments demonstrated the necessity of the three denaturing agents and long incubation time to attain complete degradation of the fiber oligomer.

Electrophoresis 1986, 7, 309-315

4 Discussion

The experiments described herein showed that 2 min of boiling of several Ad2 proteins in a mixture of urea, SDS and 2-mercaptoethanol was not sufficient to destroy all the structures of the molecules. Proteins IIIa, VII, VIII and IX did not seem to possess a strong structural organization but in protein VII a more resistant structure exists which needs a urea treatment of 2 min at 100 °C in order to disappear. On the other hand proteins II, III, IV, V and VI exhibited various electrophoretic mobilities, and thus different apparent molecular weights with regard to their level of denaturation. This was not due to residual charge effects (see Section 3.2.4 and Fig. 2) nor to proteolytic cleavages nor to chemical modifications (i. e. carbamylation or disulfide bridges) but appears to result from incomplete denaturation since (i) prolonged boiling times (30 min), and (ii) the presence of urea led to a variation in electrophoretic mobility. Protein cleavages had been reported to occur during boiling prior to electrophoresis [17]. In our experiments, such cleavages do not seem to exist since isolated protein bands shift to higher values after long denaturation periods. However, we cannot exclude that a protein might be cleaved in the standard sample buffer and that its cleavage



Figure 5. Effects of various agents on fiber denaturation. Purified labelled fiber was heat denatured for 2 min (lanes a, c, e, g, i, k, m) or 30 min (lanes b, d, f, h, j, l, n) at 100 °C. The denaturing mixtures were: standard sample buffer (lanes a, b); standard sample buffer without mercaptoethanol (lanes c, d); standard sample buffer without urea (lanes e, f); standard sample buffer without urea nor mercaptoethanol (lanes g, h); standard sample buffer without SDS nor mercaptoethanol (lanes i, j): standard sample buffer without SDS (lanes k, l) and standard sample buffer without urea nor SDS (lanes m. n). V, corresponds to viral particles denatured at 100 °C for 2 min in the standard sample buffer. Arrows point to fully denatured fiber polypeptide whereas arrowheads indicate native or dimers or aggregates of the fiber protein. Gel is 17.5 % with respect to acrylamide concentration.

Electrophoresis 1986, 7, 309-315



Figure 6. Diagram showing the likely relationship between the apparent difference in molecular weight (ΔMw), appearing after a long denaturation period at 100 °C, the frictional coefficient (f/f_o) and the hydrophobicity (H) of the Ad2 viral proteins.

products could associate to each other to give higher apparent molecular weight values.

The difference of mobility in SDS gels observed for several proteins after an extended incubation time in the sample buffer would indicate the existence of strong interactions between parts of these molecules. This might be linked to the (a)symmetry of these proteins and thus to their frictional coefficient because the binding involved in a/an (a)symmetric molecule must be strong to stabilize the structure. Furthermore, urea seemed to be a determining component of the denaturation cocktail to obtain fully denatured molecules. Thus, the hydrophobicity of the molecule might be implied. The differences of mobility result in different apparent molecular weights. An empirical rule linking variation in apparent molecular weight to the frictional coefficient and the hydrophobicity for a given protein was found. This relationship is expressed as

$$\Delta M_{\rm r} = + k \times \frac{\Delta M_{\rm r} (f/f_{\rm o})}{H}$$

where ΔM_r represents the variation in apparent molecular weight for a protein observed after a 2 or 30 min incubation

Denaturation of adenovirus type 2 structural proteins 315

time at 100 °C in the sample buffer, k a coefficient, f/f_o the frictional coefficient (values of Lemay and Boulanger [18]) and H the hydrophobicity determined on the basis of an 11 residue scanning range [15]. A smooth curve was obtained, except for the hexon (Fig. 6), thus confirming the influence of the (a)symmetry of a molecule and the hydropathic index of a protein on its behavior on SDS gel.

We thank Mrs. V. Delecroy for kind secretarial aid. This work was supported by the INSERM (U. 233), the CNRS (U.A.C. 114) and the Université du Droit et de la Santé de Lille.

Received January 27, 1986

5 References

- Shapiro, A. L., Vinuela, E. and Maizel, J. V., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1967, 28, 815-820.
- [2] Weber, K. and Osborn, M., J. Biol. Chem. 1969, 244, 4406-4412.
 [3] Laemmli, U. K., Nature 1970, 227, 680-685.
- [4] Leavitt, R., Schlesinger, S. S. and Kornfeld, S., J. Virol. 1977, 21, 375-385.
- [5] Axelrod, N., Virology 1978, 87, 366-383.
- [6] Halbert, D. N., Spector, D. J. and Raskas, H. J., J. Virol. 1979, 31, 621-629.
- [7] De Jong, W. W., Zweers, A. and Cohen, L. H., Biochem. Biophys. Res. Comm. 1978, 82, 532-539.
- [8] Seeburg, P. H., Colby, W. W., Capon, D. J., Goeddel, D. V. and Levinson, A. D., *Nature* 1984, 312, 71-75.
- [9] Boudin, M. L., Rigolet, M., Lemay, P., Galibert, F. and Boulanger, P., EMBO J. 1983, 2, 1921-1927.
- [10] D'Halluin, J. C., Martin, G. R., Torpier, G. and Boulanger, P. J. Virol. 1978, 26, 357-363.
- [11] Boulanger, P. and Puvion, F., Eur. J. Biochem. 1973, 39, 37-42.
- [12] Anderson, C. W., Baum, P. R. and Gesteland, R. F., J. Virol. 1973, 12, 241-252.
- [13] Goldenberg, D. P. and Creighton, T. E., Anal. Biochem. 1984, 138, 1-18.
- [14] Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979, 76, 4350–4354.
- [15] Kyte, J. and Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132.
- [16] Thorun, W. and Maurer, H. R., in: Maurer, R. H. (Ed.), Disc Electrophoresis and Related Technique of Polyacrylamide Gel Electrophoresis, de Gruyter, Berlin 1971, pp. 8-17.
- [17] Kowit, J. D. and Maloney, J., Anal. Biochem. 1982, 123, 86-93.
- [18] Lemay, P. and Boulanger, P., Ann. Virol. 1980, 131, 259-275.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA FIBRE DU MUTANT H2 ts 125

(Annexe 5)

La fibre d'un mutant d'adénovirus : le H2 <u>ts</u> 125, a la particularité d'être constituée, même à température permissive (33° C), de monomères dont la masse moléculaire apparente en gel de polyacrylamide-SDS est de 59,5 K, soit de 2,5 K plus petite que celle du virus de type sauvage (D'HALLUIN <u>et al.</u>, 1980). Ce mutant a été isolé, dans notre laboratoire, par G. MART!N et ses collaborateurs (1978), en traitant à l'acide nitreux un stock d'adénovirus de type sauvage. Malgré sa migration électrophorétique anormale, l'assemblage de la base du penton avec la fibre synthétisée à 33° C de ce mutant est inchangé et le virus produit est infectieux. Ceci signifie que l'interaction de cette fibre de 59,5 K avec les protéines virales (telle que la base du penton) ou cellulaires (tels que les récepteurs nécessaires à l'adsorption virale) n'est pas perturbée. Cependant, les cellules infectées par le mutant à température non permissive (39° C) ne synthétisent pas de fibre antigénique et l'assemblage viral semble bloqué au stade de particules intermédiaires vides bien qu'il persiste une légère production virale (D'HALLUIN <u>et al.</u>, 1980).

La nature de la mutation de la fibre du mutant H2 ts 125 (substitution, délétion) ainsi que ses conséquences possibles (changement de codon d'initiation ou de terminaison, nouvel épissage, changement conformationnel de la protéine) ont été recherchées. En localisant la mutation et en déterminant l'effet produit, nous voulions définir les conséquences structurales qui en résultaient et attribuer ainsi à un domaine donné de la molécule une importance structurale voire physiologique.

Cette étude a confirmé nos observations sur l'influence de certaines structures secondaires sur la migration d'une protéine en gel de polyacrylamide-SDS.

Dans cette étude, la fibre de l'adénovirus de type sauvage sera notée Fwt et celle du mutant H2 ts 125 : F125.

B- Caractérisation biochimique du mutant H2 ts 125 (Annexe 5)

Puisque ce mutant possède, même à 33° C, une fibre plus courte que celle de l'adénovirus de type sauvage, nous avons recherché les causes possibles de cette diminution de masse moléculaire apparente. Nous avons

d'abord émis l'hypothèse que la mutation avait fait apparaître sur le DNA un nouveau codon d'initiation ou de terminaison. La comparaison des deux extrémités de la fibre du virus sauvage et celle du mutant nous a permis d'éliminer ces deux hypothèses. En effet, la synthèse <u>in vitro</u> de ces protéines marquées à la proline suivie d'une analyse dans un séquenceur automatique d'acides aminés permet de retrouver la proline, dans les deux cas, aux positions 6, 13 et 16. Ceci assure une identité de l'extrémité N-terminale. L'identité des extrémités C- terminales a été établie par les études de digestion enzymatique par les carboxypeptidases A et Y. Celle-ci sera confirmée par l'emploi de sérum anti-C_{TT} et par la séquence du gène de la fibre.

L'analyse comparative des génomes du virus muté ou non à l'aide d'enzymes de restriction élimine l'hypothèse d'une délétion, celle-ci étant déjà peu probable du fait de l'agent mutagène utilisé. Ce résultat est lui aussi confirmé par la séquence du gène des deux fibres.

La fibre est une protéine glycosylée. Or, la glycosylation peut entraîner des variations dans la migration en gel de polyacrylamide-SDS. Nous avons vérifié l'incorporation de glucosamine radioactive dans la fibre du mutant. Celleci semble normalement glycosylée.

La fibre est, comme la plupart des protéines de structure de l'adénovirus 2, N-acétylée. Ceci protège la protéine des dégradations protéolytiques. La fibre du mutant est marquée de la même manière que celle du virus de type sauvage par du (14 C)-acétate de sodium . De plus, par des expériences de marquage bref, suivi de chasse, le passage d'une forme 62 K à 59,5 K n'a jamais été mis en évidence. Il est donc peu probable qu'une digestion limitée par l'une des extrémités soit responsable de la diminution de la masse moléculaire apparente.

Le polypeptide F125 est capable de s'associer en forme multimérique ayant un coefficient de sédimentation 6S.

La nature ainsi que la localisation précise de la mutation du H2 ts 125, ne pouvait alors être déterminée que par la comparaison de la séquence de DNA du gène des deux fibres Fwt et F125. La séquence de la fibre du virus de type sauvage ayant déjà été effectuée dans le laboratoire du Dr. F. GALIBERT (HERISSE and GALIBERT, 1981 ; HERISSE <u>et al.</u>, 1981), nous avons été accueillie dans ce même laboratoire pour établir la séquence du gène de la fibre du mutant. Les fragments <u>Eco</u> RI E (de coordonnées 83,6 - 89,8 sur la carte génomique) et <u>Hind</u> III F (de coordonnées 89,5 - 97,2) du DNA du mutant H2 ts 125 ont été intégrés respectivement dans les plasmides pBR328 et pBR322. Le gène de la fibre étant situé sur le génome entre les coordonnées 86,1 et 91,2, le fragment <u>Eco</u> RI E contient le début du gène et le fragment <u>Hind</u> III F la fin du gène. La séquence a été déterminée selon la méthode de MAXAM et GILBERT (1980). Deux mutations ont été trouvées : la première transforme un codon CTT (correspondant à la Leucine) en un codon TTT (codon de la Phénylalanine) et la seconde un codon GCT (Alanine) en un codon GTT (Valine). La seconde mutation faisant apparaître une séquence GT, signal de début d'intron lors du phénomène de raboutage (Revue par S. MOUNT, 1982), l'hypothèse de la création d'un nouveau site de raboutage lors de la maturation du mRNA de la fibre F125, bien qu'improbable à cause de la séquence environnante, ne pouvait cependant pas être exclue. L'analyse à la nucléase S1 des mRNA des fibres Fwt et F125 a permis d'éliminer cette hypothèse.

Pour expliquer la migration aberrante de la fibre du mutant, il ne restait plus qu'à invoquer un changement de conformation de la protéine, partiellement exprimée à 33° C, mais qui à 39° C, rend la molécule immunologiquement non détectable. Ce changement de conformation peut être dû à l'une ou l'autre des deux mutations. La première mutation correspond à un changement décrit comme conservatif dans la littérature, tandis que le second est non conservatif (DAYHOFF, 1969). Les conséquences d'une mutation ponctuelle sur la migration en gel de polyacrylamide-SDS ont été décrites maintenant pour de nombreuses protéines telles que des protéines oncogènes (TABIN <u>et al.</u>, 1982) ou la protéine NS du virus de la stomatite vésiculaire (RAE and ELLIOTT, 1986).

C- Effet de la mutation Ala -> Val sur la fonction et la conformation de la fibre

- 1. La mutation thermosensible entraîne des changements conformationnels
 - a) microscopie électronique

Puisque la fibre du mutant H2 <u>ts</u> 125 semblait plus "légère" que celle du virus sauvage, nous avons comparé, à partir de photos de microscopie électronique, la longueur de la fibre des deux virus. Les mesures ont été faites sur des clichés de penton : la longueur de la fibre mesurée correspond à la distance entre le point d'ancrage de la fibre dans la base du penton et l'extrémité de la sphérule. La moyenne de la longueur d'environ deux cents fibres est de 280 Å \pm 28 Å pour la fibre du virus sauvage (Fwt) et de 294 Å \pm 23 Å pour la fibre du mutant (F125). De façon surprenante, ces mesures montrent que la fibre du mutant F125 est d'environ 14 Å (soit 5 %) plus longue que celle du virus sauvage. La mutation a donc une influence structurale visible. (Fig. 21 bis).

b) migration électrophorétique des fibres Fwt et F125 dans des conditions fortement dénaturantes

Nous avons montré que sous l'effet d'une plus grande dénaturation, la migration électrophorétique de la fibre était ralentie. Puisque la diminution de la masse moléculaire apparente de la fibre F125 semblait être due à une modification structurale, une dénaturation poussée de la fibre F125 pouvait anéantir la différence des masses moléculaires apparentes avec la fibre Fwt.

 \rightarrow Gel de polyacrylamide-SDS en gradient urée : 0 \rightarrow 8M

Le mélange des virus de type sauvage et du mutant H2 <u>ts</u> 125 est déposé, après dénaturation dans les conditions classiques, sur un gel de polyacrylamide-SDS contenant un gradient d'urée. Sur un tel gel, on observe le changement de migration des fibres Fwt et F125 : en urée 8M les deux fibres Fwt et F125 comigrent. La migration en présence d'urée semble donc identique pour les deux fibres (Fig. 22A).

→ Dénaturation par la chaleur

On observe, en effet, une variation de migration des deux fibres en fonction du temps d'ébullition en milieu dénaturant. La chaleur dénature progressivement toute la molécule de fibre comme en témoigne la diffusion des bandes observées après 10, 20 et 30 min d'ébullition dans le tampon de dénaturation. Après 30 minutes d'ébullition, on observe une population un peu moins hétérogène qu'après vingt minutes, et la migration des deux fibres : Fwt et F125 semble identique (Fig. 22B). La mutation de la fibre F125 induit donc un changement de conformation hautement résistant aux agents dénaturants.



Histogrammes correspondant aux différentes mesures (en Å) de longueur des fibres : Fwt : a et F125 : b. Les photos de microscopie électroniques montrent des échantillons de pentons sur lesquels les mesures ont été faites.





Migration électrophorétique des fibres Fwt et F125 sous conditions fortement dénaturantes

- A- Dénaturation par l'urée : un mélange de virus de type sauvage et du mutant H2 ts 125, dénaturés selon les conditions standards et marqués au (¹⁴C)-formiate de sodium est déposé sur un gel de polyacrylamide-SDS contenant un gradient urée : 0 → 8 M. Après transfert, on incube avec un sérum anti-IIIa et anti-fibre puis avec la protéine marquée à la (³⁵S)-méthionine pour renforcer la visualisation de ces protéines. Ce transfert est alors autoradiographié.
- B- Denaturation par la chaleur : Migration des fibres Fwt (pistes 1, 3, 5, 7, 9) et F125 (pistes 2, 4, 8, 10) en fonction du temps d'ébullition dans le tampon dénaturant. Pistes 1 et 2 : 2 min ; pistes 3 et 4 : 5 min ; piste 5 et 6 : 10 min ; pistes 7 et 8 : 20 min ; pistes 9 et 10 : 10 min.

La mutation Ala → Val pourrait être responsable d'un changement conformationnel

Durant ces dernières années de nombreuses méthodes de prédiction de structure secondaire à partir de la séquence protéique ont été décrites. La plus connue est celle de CHOU et FASMAN (1978). L'étude de diffraction aux rayons X d'une vingtaine de protéines leur a permis de déterminer les probabilités qu'a un acide aminé donné, dans un environnement donné, de se trouver dans telle ou telle conformation (hélice α , feuillet β , structure inordonnée). D'autres méthodes sont fondées sur l'hydrophobicité. C'est le cas de la méthode de BUSETTA et HOSPITAL (1982) et de celle de CID et al. (1982). Pour chaque méthode, les différentes structures sont définies par des règles assez strictes. Dans quelques cas, la structure prédite peut devenir invraisemblable soit par la présence d'un certain résidu dans l'environnement immédiat, soit par un trop petit nombre d'acides aminés consécutifs décrits dans une configuration. La comparaison des trois méthodes permet de lever de telles ambiguités et un modèle théorique de structure secondaire pour le polypeptide de la fibre Fwt, dont la structure primaire est connue (HERISSE and GALIBERT, 1981 ; HERISSE et al., 1981), a pu ainsi être établi. Le pourcentage de chaque structure calculé d'après notre modèle est en accord avec résultats obtenus les par dichroisme circulaire (BOULANGER and LOUCHEUX, 1972 ; GREEN et al., 1983)), bien que ces études aient été faites sur le polypeptide natif et non sur le monomère. Si on considère les deux zones mutées de la fibre F125, seule la mutation à la position 434 est susceptible de modifier la structure par rapport à la fibre Fwt, en favorisant une structure en feuillet β par rapport à une hélice α (Fig. 23). Cette mutation augmente le taux d'hydrophobicité dans cette zone.

La mutation Ala -- Val est responsable du changement de migration électrophorétique

L'hydrolyse partielle de la fibre F125 aux liaisons Asp-Pro par l'acide chlorhydrique 10mM donne un fragment N-terminal de 44 K identique à celui obtenu par hydrolyse de la fibre Fwt. Mais on obtient un fragment



FIGURE 23

Prédictions de structure secondaire. du monomère des fibres F_{wt} et F_{125} . La mutation Leu—Phe est localisée par la pointe d'une flèche, la mutation Ala—PVal par une flèche.

- 158 -

C-terminal d'hydrolyse partielle d'environ 32 K, soit de 2 K plus petit que le fragment équivalent de la fibre Fwt. Ceci est montré par autoradiographie d'un gel après hydrolyse des fibres Fwt et F125, marquées sur toute la chaine peptidique au (14 C)-formiate de sodium et par immunotransfert avec révélation par des sérums anti-N_{TT} et anti-C_{TT}. Ce fragment contient la mutation Ala \rightarrow Val (Fig. 24). Ce résultat confirme que la mutation Ala \rightarrow Val est responsable d'un changement de conformation

4. La mutation Ala -> Val est responsable de la thermosensibilité

Pour déterminer qu'elle est la mutation (position 105 ou 434) responsable de l'effet thermosensible, nous avons fait des expériences de sauvetage de la zone mutée du DNA du H2 <u>ts</u> 125 par un fragment correspondant de DNA du virus sauvage.

Nous avons transfecté des cellules 36 293 avec du complexe DNA-protéine terminale du mutant H2 <u>ts</u> 125, soit seul, soit en présence de fragments d'enzymes de restriction du DNA de l'adénovirus de type sauvage : le fragment <u>Eco</u> RI E (de coordonnées 83,6 - 89,8 sur la carte génomique) qui correspond à la première mutation (Leu \rightarrow Phe), le fragment <u>Eco</u> RI C (de coordonnées 89,8 - 100) qui correspond à la seconde mutation (Ala \rightarrow Val), et le fragment <u>Xhol</u> B (de coordonnées 82,9 - 100) qui contient le gène entier de la fibre (Fig. 25). La mutation du H2 <u>ts</u> 125 devait pouvoir être sauvée par l'un de ces fragments de DNA, ce qui se traduirait par la production d'adénovirus phénotypiquement de type sauvage à 39° C.

Des plages de production virale ont été obtenues à 39° C par les co-transfections avec les fragments <u>Eco</u> RI C et <u>Xho</u> I B (Tableau 8). La mutation Ala \rightarrow Val est donc responsable de la thermosensibilité. Cette mutation est ainsi responsable du changement de conformation de la protéine mutée et de l'effet thermosensible. La conformation de cette zone semble donc nécessaire au maintien d'une protéine fonctionnelle.

5. Etude des révertants du mutant H2 ts 125

Cinq révertants du H2 <u>ts</u> 125 isolés par C. COUSIN dans notre laboratoire possèdent des fibres dont la migration électrophorétique est normale, c'est-à-dire dont la masse moléculaire apparente du monomère est de 62 K. Ces virus sont donc phénotypiquement semblables au virus de type sauvage. La



₿

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13





DNA-transfectant	Nombre de plages
DNA wt - 55 K	30
DNA 125 - 55 K	2
DNA 125 - 55 K + Eco RI E wt	° (BU
DNA 125 - 55 K + Eco RI C wt	10
DNA 125 – 55 K + Xhol D wt	50

de DNA utilisés sont représentés en dessous.

<u>TABLEAU 8</u> : Sauvetage de la mutation du H2 <u>ts</u> 125 par un fragment de DNA du virus de type sauvage. Le nombre de plages obtenues à 39° C (température non permissive) est indiqué. réversion a-t-elle permis le retour au génotype sauvage ou a-t-elle induit une mutation dans une zone voisine capable de restaurer l'activité et la migration de la fibre ?

La mutation qui donne lieu à la substitution Ala-Val crée sur le DNA un site supplémentaire pour l'enzyme de restriction Spe I par rapport au génome du virus de type sauvage et détruit un site Alu I (Fig. 26A). L'introduction du site de coupure Spe I permet le clivage du fragment Spe I C de 5521 paires de bases (pb) en deux fragments de 5206 pb et de 315 pb. En effet, sur gel d'agarose, le fragment Spe I C du H2 ts 125 apparaît plus petit que celui du virus de type sauvage (Fig. 26B). Les cinq révertants testés ne possèdent plus ce nouveau site Spe I, ils ont retrouvé le génotype sauvage pour cette mutation, ou acquis une nouvelle mutation à l'intérieur du site de spécificité de l'enzyme. Cette dernière hypothèse n'est pas vraisemblable puisque tous les révertants ont retrouvé le site Alu I : la restauration du site Alu I se traduit par la conversion d'un fragment de 22 pb du H2 ts 125, marqué en 5' et provenant de l'hydrolyse par Alu I du fragment Eco RI C/Hinf 6 en un fragment de 9 pb analogue à celui du virus de type sauvage (Fig. 26C). Ceci signifie que les révertants ont retrouvé le génotype sauvage pour cette mutation.

La réversion au niveau du site responsable de la substitution Leu — Phe a été vérifiée par séquençage du fragment <u>Hha</u> qui contient cette mutation (du nucléotide 31 218 à 31 360). La séquence des révertants de cette zone (obtenue par la méthode de MAXAM et GILBERT, 1980) est identique à celle du type sauvage.

D- Discussion

La caractérisation de la mutation de la fibre de l'adénovirus H2 ts 125 a été entreprise afin de déterminer une zone importante pour l'intégrité structurale et fonctionnelle de la protéine. La mutation du H2 ts 125 induit un changement de masse moléculaire apparente de la fibre du mutant (59,5 K) par rapport à celle du virus sauvage (62 K). Ni la transcription de la fibre, ni sa traduction, ni les évènements post-traductionnels (tels que glycosylation et N-acétylation) ne sont modifiés chez ce mutant.

La séquence du gène muté a mis en évidence deux mutations ponctuelles qui transforment respectivement un codon Leu en codon Phe et un codon Ala en codon Val (aux positions 105 et 434 sur la protéine) : $Leu_{105} \longrightarrow Phe_{105}$, $Ala_{434} \longrightarrow Val_{434}$.



La mutation Ala \rightarrow Val agit sur la migration de la fibre en gel de polyacrylamide-SDS et sur sa thermosensibilité. Cette mutation induit, même à température permissive, un changement de conformation de la protéine visible en microscopie électronique. Le changement de conformation doit être tel à 39° C que la fibre n'est plus révélé par le serum anti-fibre et que l'assemblage est bloqué au stade de particules intermédiaires vides. Les fibres des révertants du H2 <u>ts</u> 125 ont toutes une migration analogue à celle du virus de type sauvage. Ceci confirme que la variation de la migration en gel de polyacrylamide-SDS (donc le changement de conformation) et la thermosensibilité de la protéine sont liées. L'effet de telles mutations ponctuelles sur la structure des protéines et les conséquences sur leur activité fonctionnelle sont décrites dans la littérature depuis ces cinq dernières années. Le changement de mobilité en gel de polyacrylamide-SDS dû à une mutation ponctuelle a notamment été decrit pour le proto-oncogène <u>ras</u> dans les cellules du cancer de la vessie (TABIN et al., 1982).

Les révertants de ce virus mutant ont retrouvé le génotype sauvage. Il se pourrait que les deux mutations soient liées. Cependant, 1) seule la mutation Ala \rightarrow Val semble responsable des modifications structurales et de la thermosensibilité, et 2) le fragment <u>EcoRI</u> C du virus de type sauvage permet d'obtenir des plages de productions virales à température non permissive (39° C) par co-transfection avec le complexe : DNA-protéine terminale 55 K du virus H2 <u>ts</u> 125. Ce fragment <u>EcoRI</u> C correspond à la mutation Ala \rightarrow Val. Cependant, la co-transfection du DNA du mutant avec le fragment <u>Xho</u> IB du virus de type sauvage permet une meilleure production virale à 39° C. Ceci peut être dû au fait que la recombinaison des DNA du H2 <u>ts</u> 125 et du virus de type sauvage nécessaire au sauvetage de la mutation a plus de chance d'être réalisée sur un grand fragment que sur un petit, d'autant que la mutation GCT \rightarrow GTT dans le fragment <u>EcoRI</u> C est située seulement à 66 nucléotides de l'extrémité du fragment.

Le changement de conformation de la protéine mutée favorise la formation d'agrégats lors de la purification et de la concentration de la protéine mutée. Ceci a rendu impossible les études physico-chimiques que l'on voulait entreprendre (dichroïsme circulaire, spectroscopie en UV différentielle, étude de cristaux) pour mesurer les perturbations conformationnelles de la protéine lors du passage de la température permissive (33° C) à température non-permissive (39° C). Ce même phénomène de formation d'agrégats a été décrit pour une mutation du répresseur cl du phage λ (HECHT et al., 1984). Cette mutation correspond à la même substitution : Ala \longrightarrow Val. La valine est l'acide aminé le plus fréquent dans les structures en feuillet β (CHOU and FASMAN, 1974). Dans notre modèle de structure secondaire du monomère de la fibre, cette mutation pourrait en effet prolonger une structure en feuillet β au détriment d'une hélice $\boldsymbol{\alpha}$. Ceci pourrait entraîner une instabilité dans cette zone de la molécule. Ce modèle est tout à fait différent de celui proposé pour le dimère de la fibre par l'équipe de GREEN (1983). Nous n'avons pas pris en compte les structures éventuelles qui pourraient être stabilisées dans une structure multimérique ou par la répétition d'une séquence.

Néanmoins, si l'on compare les deux modèles obtenus par prédiction de structure secondaire, le nôtre obtenu pour le polypeptide et celui de GREEN <u>et</u> al. (1983) obtenu pour un dimère, on peut observer que :

- pour le modèle monomérique, la mutation Leu — Phe ne semble entraîner aucune modification et que la mutation Ala — Val permet un prolongement d'une structure en feuillet β (du résidu 418 au résidu 438).

- pour le modèle dimérique, la substitution de la leucine par la phénylalanine ne semble pas perturber l'empilement des feuillets β , ces deux résidus sont hydrophobes. Au contraire, la substitution de l'alanine par la valine introduit un résidu fortement hydrophobe et souvent trouvé dans les feuillets β . Cette mutation pourrait peut être prolonger la structure en bâtonnet par création de quatre nouveaux petits feuillets β (entre les résidus 400 et 440), si on considère qu'il est suffisant d'avoir deux résidus hydrophobes aux bornes d'un feuillet (Fig. 27). La valine pourrait ainsi stabiliser les deux feuillets voisins à celui dans lequel elle se trouve (antérieur et postérieur). Ceci serait compatible avec la dominance de structure en feuillet β que nous avons déterminée dans cette région du polypeptide.

Cette hypothèse permet d'une part d'expliquer l'effet de la mutation sur l'augmentation de la longueur de la fibre F125 par rapport à celle de la fibre Fwt : le prolongement du bâtonnet par l'empilement de quatre nouveaux feuillets β pourrait expliquer la différence de longueur de 14 Å observée entre les deux fibres. La distance théorique entre deux feuillets étant de 4.73 Å, l'addition de 4 feuillets entraîne une augmentation théorique de longueur des bâtonnets de 19 Å. La variation du diamètre de la sphérule due à la diminution de 40 du nombre d'acides aminés qui la constitue ne peut être évaluée. D'autre part, il est probable que les nouvelles liaisons fortement hydrophobes crées par cette mutation et nécessaires à la prolongation de la structure en bâtonnet, sont, du moins en partie, résistantes dans les conditions standards de dénaturation.

$$\mathbf{()}$$

$$\mathbf{($$

Prolongement possible de la structure en bâtonnet pour la fibre F₁₂₅ FIGURE 27 : par la formation de nouveaux feuillets B.

Cette hypothèse permet donc également d'expliquer la diminution de la masse moléculaire apparente de la fibre mutée F125.

Néanmoins, pour que cette hypothèse soit exacte, il faut admettre un nombre de résidus (9,8,7,4) plus important dans les coudes β que celui prévu dans le modèle (4 et 5). De telles anomalies existent dans le modèle original : pour les séquences consensus 2,8,11,16 et surtout pour les séquences 17 et 19. La superposition de deux coudes "anormaux" pourrait expliquer la déstabilisation de la molécule à température non-permissive.

Cette mutation à la jonction entre la structure en bâtonnet et la sphérule pourrait avoir des répercussions conformationnelles sur ces deux structures (bâtonnet et sphérule), donc sur toute la protéine. Ceci permettrait de comprendre comment une mutation ponctuelle sur une chaîne polypeptidique de 582 acides aminés, et qui affecte une protéine si fortement asymétrique, peut perturber le rôle fonctionnel de cette protéine. ANNEXE 5

Biochemical and genetical characterization of a fiber-defective temperature-sensitive mutant of type 2 adenovirus

Marie-Laure Boudin, Muriel Rigolet¹, Pierre Lemay, Francis Galibert¹ and Pierre Boulanger*

Laboratoire de Virologie Moléculaire de l'INSERM (U. 233), Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, and ¹Laboratoire d'Hérnatologie Expérimentale, Centre Hayem, Hôpital Saint Louis, 75475 Paris Cédex 10, France

Communicated by P. Boulanger

Received on 27 June 1983; revised on 29 July 1983

The adenovirus type 2 fiber mutant H2 ts 125 synthesized an unstable, temperature-sensitive fiber polypeptide with an apparent mol. wt. smaller by 2500 than the wild-type (62 K). The polypeptide of 59.5 K was found to be stable at the permissive temperature (33°C). H2 ts 125 fiber synthesized in reticulocyte lysates had the same apparent mol. wt. of 59.5 K as the mutant fiber produced in vivo. Neither structural nor functional differences between wild-type and mutant fibers were detected in the N-terminal and C-terminal sequences, excluding the occurrence of a new initiation or termination codon. Restriction analysis of H2 ts 125 DNA also ruled out the hypothesis of a deletion mutant. The 59.5 K mutant fiber unit was normally glycosyated, N-acetylated, assembled into 6S oligomeric fiber and incorporated into virions. DNA sequencing of the H2 ts 125 fiber gene revealed two point mutations at nucleotides 3970 (C*TT-T*TT) and 4958 (GC*T-GT*T), corresponding to two amino acid changes at positions 105 and 434, respectively. The 105 mutation consisted of a conservative change Leu-Phe; the 434 interchange was Ala-Val, usually considered as nonconservative. Th possibility of a donor site for splicing created by the mutation at codon GTT was eliminated on the basis of S1 nuclease analysis data. All these results suggested that either one or both mutations concerned highly organized domain(s) of the fiber polypeptide chain, resulting in aberrant mobility in SDS-polyacrylamide gels and temperaturesensitivity.

Key words: adenovirus 2/fiber protein/DNA sequence/fiber gene/ts mutants

Introduction

Sets of temperature-sensitive (ts) mutants of adenoviruses have been selected in several laboratories to determine the role of adenovirus gene products involved in viral replication and morphogenesis, as well as to study various aspects of the virus-cell interactions (reviewed by Ginsberg and Young, 1977). The adenovirus 2 mutant H2 ts 125 has been isolated in our laboratory after mutagenization of a wild-type (WT) stock, and partially characterized (Martin *et al.*, 1975). It is altered in the production of antigenically reactive fiber and accumulates light assembly intermediate particles (or top components) at the non-permissive temperature (D'Halluin *et al.*, 1980: Martin *et al.*, 1978).

H2 ts 125 has been recently mapped between coordinates 81 and 100 on the genomic map (D'Halluin *et al.*, 1982), a position which overlaps the fiber gene (85.5-91.8 map units) (Miller *et al.*, 1980). It has been found to be altered in the

© IRL Press Limited, Oxford, England.

fiber structure: the fiber polypeptide unit (polypeptide IV) is of lower apparent mol. wt. in SDS-polyacrylamide gel than the WT fiber polypeptide unit (D'Halluin *et al.*, 1980). A further biochemical characterization of the H2 *ts* 125 is presented here, and the genetical lesion determined by DNA sequencing of the mutant fiber gene.

Results

Synthesis, post-translational modifications and virion incorporation of fiber in H2 ts 125 mutant

Synthesis of fiber polypeptide in H2 ts 125 infected-cells and virion incorporation. KB cells were infected with WT or H2 ts 125 at 10 f.f.u./cell at 39.5° C and pulse-labeled for 1 h at 16 h after infection. The cell culture was then divided into two portions, one being harvested just after the pulse, the other one being chased for 8 h at 39.5° C. Virus-ccded polypeptides were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Figure 1A shows that in the H2 ts 125 pattern at 39.5° C, the apparent mol. wt. of the fiber polypeptide (IV) was 2500 lower than that in the WT. Careful determination by electrophoresis in 30-cm slab gels with mol. wt. standards (Pharmacia LMW calibration kit) gave the value of 59 500 for H2 ts 125 fiber, instead of 62 000 for WT fiber (theoretical value: 61 882; Hérissé et al., 1981). The label in



Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel analysis of WT and mutant fiber polypeptides in cells and virions. (A) Pulse-chase experiments at 39.5° C. The cells were labeled with [³⁵S]methionine for 1 h at 16 h after infection. (p) 1 h pulse, (c) 8 h chase. (B) Stained gel (Coomassie blue) showing WT and H2 *ts* 125 virus particles produced at the permissive temperature. In cells as well as in virion, the fiber polypeptide (IV) has an apparent mol. wt. of 62 000 in WT and 59 500 in H2 *ts* 125.

^{*}To whom reprint requests should be sent.

M.-L. Boudin et al.



Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel analysis of the post-translational modifications of the WT and mutant fibers. (A) Glycosylation. The WT-and H2 ts 125-infected cells were labeled with (¹H]glucosamine for 8 h at 16 h after infection. (v): control [¹H]glucosamine-labeled virion; (h): [¹H]glucosamine-labeled hexon marker; (wt): [¹H]glucosamine-labeled wild-type extract; (ts): [¹H]glucosamine-labeled H2 ts 125-mutant extract. (B) N-acetylation. WTand H2 ts 125-infected cells were labeled with [¹C]sodium acetate for 24 h at 56 h after infection at 33°C. (v): Control [¹C]sodium acetate for; (wt): WT-extract; (ts): H2 ts 125 extract. Gels A and B were revealed by fluorography at -70° C. the mutant fiber polypeptide migrated with an apparent mol. wt. of 59.5 K, instead of 62 K for the WT.

59.5 K polypeptide disappeared during the chase at 39.5° C. A shorter fiber polypeptide unit was also found incorporated in the H2 *ts* 125 virus particles assembled at the permissive temperature (Figure 1B).

Glycosylation of H2 ts 125 fiber. The hypothesis of a defect in the glycosylation process of the fiber protein at 39.5°C, which could result in a different electrophoretic migration (Leavitt *et al.*, 1977; Persson *et al.*, 1980), was examined by labeling H2 ts 125-infected cells with [³H]glucosamine for 8 h at 16 h after infection. The fluorographic pattern of an SDS-polyacrylamide gel revealed that the major late glycoprotein was a 62 K species in the WT and a 59.5 K species in the H2 ts 125 (Figure 2A).

N-acetylation of H2 ts 125 fiber. The possibility of an absence of N-acetylation of the fiber polypeptide chain, thereby rendering it sensitive to cellular aminopeptidase(s) was explored as follows. WT- and H2 ts 125-infected cells were labeled with [¹⁴C]acetate for 24 h at 56 h after infection at 33°C or for 8 h at 16 h after infection at 39.5°C. The cells were disrupted by sonication in hypotonic buffer (10 mM Tris-hydrochloride, pH 7.5, 50 mM NaCl) and the cell extract centrifuged at 10 000 g for 60 min. The supernatant was analyzed by SDS-PAGE. As shown in Figure 2B, most of the primary translational products of WT adenovirus were N-acetylated: II, 100 K, III and IV appeared as the major ¹⁴C-acetylated adenovirus polypeptides; minor bands of [¹⁴C]acetate-labeled IIIa, V, 39 K, pVI and pVIII were also visible. In H2 ts 125-infected cell extract, a major species of ¹⁴C-N-



Fig. 3. Cell-free translation of WT and H2 s 125 late mRNAs. (v): control [14C]valine-labeled virion polypeptide markers. (a) WT mRNAs translated in vitro in the presence of 2 mM MgCl₂, 130 mM KCl; (b) H2 ts 125 mRNAs with 3 mM MgCl₂, 13 mM KCl; (c) H2 ts 125 mRNAs translated as in (a); (d) parotid gland collagen mRNAs used as control.



Fig. 4. Comparative carboxypeptidase digestions of WT and H2 ts 125 fibers. Samples of purified [15 S]methionine-labeled fiber were incubated with carboxypeptidase (CP) A (A), carboxypeptidase B (B), a mixture of both carboxypeptidases A and B (A + B), carboxypeptidase Y (Y), or no carboxypeptidase (0) and analyzed in SDS-gel. (wt): wild-type fiber; (ts): mutant fiber. The same type of carboxypeptidase-resistant core was obtaine ed with single CPA, CPY or double CPA + CPB digestion: 60 K and 57.5 K for WT and mutant fibers, respectively. Both types of fibers seemed insensitive to CPB action. v: control virion.

acetylated 59.5 K was observed in place of the 62 K fiber polypeptide unit present in the WT, at either 39.5° or 33° C. The H2 ts 125 polypeptide unit of 59 500 daltons was therefore normally N-acetylated. The H2 ts 125 fiber also showed the same resistance to aminopeptidase M digestion as

Characterization of a fiber-defective ts mutant of adenovirus type 2



Fig. 5. Assembly of penton base and mutant fiber *in vitro*. 2D pattern of H2 *ts* 125-infected cell extract maintained at 33° C and analyzed before (a) and after (b) addition of a large excess of unlabeled penton base. The significant decrease of the peak of free fiber (peak 5), suggested an *in vitro* binding with penton base to form penton (peak 3). Note the simultaneous increase of penton base peak and the dilution of label in cold penton base (peak 2).

the WT fiber (not shown). This suggested that the 59.5 K molecule did not derive from the 62 K unit by cleavage at the N terminus.

Assembly of H2 ts 125 fiber polypeptide chains into 6S oligomer

Sedimentation analyses of H2 ts 125-infected cell extracts were carried out to evaluate the capacity of fiber polypeptide chains to assemble into 6S fiber capsomers. Fiber polypeptide units of 59.5 K, synthesized at 39.5°C, were found in the 10-11S region of the gradient, as penton base-attached fibers, and in the 6S domain co-sedimenting with *Escherichia coli* alkaline phosphatase (6.0S). Immunoselection on *Staphylococcus aureus* protein A or immunodetection by Western blotting of fiber antigenic determinants confirmed the presence of antigenic fiber in the 10.5S and 6S regions of the gradient, but also in the 3.0-3.5S zone, where the free fiber polypeptide chains sedimented (not shown). These results suggested that the H2 ts 125 made 59 500 mol. wt. fiber polypeptides capable of self-assembling at the nonpermissive temperature to form 6S oligomeric fibers.

In vitro synthesis and N-terminal sequence of mutant fiber

Total cytoplasmic RNA, obtained from WT- or H2 ts 125infected cells, at 20 h after infection, was translated *in vitro* in reticulocyte lysate, and the products acid-precipitated. As shown in Figure 3, the cell-free translated mutant fiber behaved as a 59.5 K polypeptide, as did the H2 ts 125 fiber unit synthesized *in vivo*. This seemed to exclude a change in posttranslational modification of the mutant fiber as a hypothesis to explain its lower apparent mol. wt.

The [³H]proline-labeled WT and mutant fibers were purified by electroelution from an SDS-gel (Anderson and Lewis, 1980) and sequenced in an automatic sequencer. Proline was recovered at positions 6, 13 and 16 for both fibers, as predicted from the sequence of WT DNA (Hérissé and Galibert, 1981). This confirmed the structural identity of WT and mutant fiber N termini.

Structural analysis of the C terminus of the H2 ts 125 fiber [³⁵S]Methionine-labeled WT and H2 ts 125 fibers purified as previously described were digested with three different carboxypeptidases, A, B and Y, at a ratio of enzyme to substrate of 5:100 for 24 h at 37°C, and enzymic cleavage products analyzed by SDS-PAGE. Carboxypeptidase Y (CP-Y) removed 2000 daltons from the C end of both fibers, corresponding to ~20 amino acids: the WT fiber of 62 K was cleaved to a CP-Y-resistant core of 60 K, and the H2 ts 125 fiber (59.5 K) to a 57.5 K core. The same type of cleavage was obtained with CP-A, wheras both WT and H2 ts 125 fibers proved insensitive to CP-B action (Figure 4). Pepstatin A-treated CP-Y (Lee and Riordan, 1978) cleaved off the same amino acid chain length from both fibers as did untreated CP-Y, which seemed to exclude a cleavage by contaminating endopeptidases. In addition, SDS-denatured fibers from WT and H2 ts 125 showed the same pattern of CP-A digestion as native fibers (not shown). This also suggested that cleavage did occur at the C end and was limited by the first basic residue (a lysine) at position 19 upstream from the carboxyl terminus (Hérissé et al., 1981). A mixture of CP-A and CP-B resulted in the same CP-resistant cores as with CP-A alone. All these results were compatible with the published amino acid sequence of adenovirus 2 fiber carboxylic region (Hérissé et al., 1981).

The limited digestions of native fibers obtained with a mixture of CP-A and CP-B, as well as with CP-Y, was probably due to some secondary structure of the fiber protein, rather than to the presence of a particular amino acid residue. This hypothesis was supported by the fact that WT fiber was totally digested by CP-Y after SDS denaturation (not shown). The identity of WT and H2 ts 125 carboxypeptidase-resistant cores suggested therefore a structural identity of the C-terminal end between both types of fiber. This was confirmed by the determination of the amino acids released from the C terminus by carboxypeptidase.

WT and H2 ts 125 fibers were labeled in infected cells with a mixture of [¹⁴C]amino acids and subjected to CP-Y digestion. The fiber core and residual enzyme were precipitated with 10% formic acid and the acidic supernatant dried in a vacuum dessicator. The dry residue was dissolved in 10% pyridine and analyzed by two-dimensional (2D) chromato-

96.15	3700
E3 TACTTTGCCCGGTCTGGCAGACTTCTGTGGAAGTTGGGGCA	CATAGGTATACTGTGTCTTTGGCCCCGAGGT GTATCCATATGACACAGAAACCGGGCCTCCA
MetLysArgAlaArgProSerGluAspThrPheAsnProVa	lTyrProTyrAspThrGluThrGlyProPro
3750	3800
талслабобаллаблатобоблабаласлалотоботтасслал Астотобосоттествессстссяртобттелессслатоботт	ССТАТОТТСА С С С С С С С С С С С С С С С С С С
ThrValProPheLeuThrProProPheValSerProAsnGlyPh	eGinGluSerProProGlyValLeuSerLeu
	3650
CCGCAGAGGCTTGGAAACCTGTGGAGGGTGCGGTACGAACGCGA CGCGTCTCCGAACCTTTGGACACCTCCCACGGCATGCTTGCGCT	АТТТТАССССТССССАСААТСССАТСТСТТС ТАЛААТССССАСССАСААТСССАТСАТСТАСССТАСАА
ArgValSerGluProLeuAspThrSerHisGlyMetLauAlaLe	uLysMetGlySerGlyLeuThrLeuAspLys
3900	3950
CGGCCTTTGGAGTGGAGGGTTTTACATTGGTGACAATGAGTCGG GCCGGAAACCTCACCTC	TGAATTI TTITGTTICAGTTIGTATTCAAAC
AlaGlyAsnLeuThrSerGlnAsnValThrThrValThrGlnPr	oLeuLysLysThrLysSerAsnIleSerLeu
	4000
CTOTGGAGGCGTGGTGAAFGTTAATGGAGTCCCCGGGATTGTCA GACACCTCCGCACCACTTACAATTACCTCAGGCGCCCTAACAGT	COTTOGTOGCÓAGGAGACTATCAATCATCG GCAACCACCGCTCCTCTGATAGTTACTAGC
AspThrSerAlaProLEUThrIleThrSerGlyAlaLeuThrVa PHE	1AlaThrThrAlaPrcLeuIleValThrSer
4050	4100
CCCCGAGAATCGCATGTCACTGCGGGGTGACTGGCACGTCT GCCGCTCTTAGCGTACAGTCACAGCCCCACTGACCGTGCAAGA	GAGGITTGATTCGTAACGATGATTTCCCGGG CTCCAAACTAAGCATTGCTACTAAAGGGCCC
GlyAlaLeuSerValGlnSerGlnAlaProLeuThrVaiGlnAs	oSerLysLeuSerIleAlaThrLysGlyPro
	4150
TAATGTCACAGTCTACCTTTCGA2 COGGC GTCTGTAGTCGGGG ATTACAGTGTCAGATGGAAAGCTAGCCCTGCAAACATCAGCCCC	GCAGAGACCGTCACTGTCGCTGTGGGAATGA CCTCTCTGGCAGTGACAGCGACACCCTTACT
TATTACAGTGTCAGATGGAAAGCTAGCCGGACGTTGTAGTCGGGG ATTACAGTGTCAGATGGAAAGCTAGCCCTGCAACATCAGCCCC IleThrValSerAepGlyLysLeuAlaLeuGinThrSerAlePr	GGAGAGACCOTCACTGTCGCTGTGGGAATGA CCTCTCTGGCAGTGACAGCGACACCCTTACT OLeuserGlySerAspSerAspThrLeuthr
TATICALSKITALCITCULTUGALGGALGTTTTATIGAGCCC ATTACALSTICALSTICALGALGGALGCALGCALGALGALGALGGALGALGCALGC	GARAGACCUTACTGTCGCTGTGGGAATGA CCTCTCTGGCAGTGACAGCGACACCCTTACT OLeuSerGlySerAspSerAspThrLeuThr 4250
TATTICALSTICALTICLETTCCCCCCCCCCCALCALCOCCCC THICKSTSTCALTCALTACCCCCCCCCALCALCACCCC IleThrVsISerAspGlyLysLeuxlaLeuGInThrSerAlaPr 4200 CATTGACGTAGTGGGGGGGGGTGATGATGCGGTGCCCATGGAACCCC GTMCTGCALTCACCCCCGCTACALACCGGGTGCCCCATGGAACCCCCGGTGCCCCATGGGGGGGG	GAADAACCSTCACTGTCSCTGTGGGAATGA CCTCTCTGGCAGTGACAGCGACACCCTTACT oLeuSerClySerAspSerAspThrLeuThr 4250 GTAATTGTACCTTCTAGGATAATAACATTTA GTAATTGTACGTAGGATAATAATTATGTAAT

4300	
ТТАССТТТТАТССТТААТТТАТТССССАССААССТТСАТССТСТТТСАСССТАТСТСАТСА	AT
AsnGlyLysIleGlyIleLysIleSerClyProLeuGlnVelAlaGlnAsnSerAspThrLeuThrVelValTh	r
4350 4400	
ССТОСТССАСАСТОВСКАСТИТАТТТОВАССААТСТКОСТТСААССТСССАТААССААТАСТААСТАСТА ССЛОСТАСТАССАТТСААССААТСТСССТТАСААССАААСТАССАСС	20
GlyPrcGlyValThrValGluGlnAsnSerLeuArgThrLysValAlaGlyAlaIleGlyTyrAspSerSerAs	in
4450	
ТТЕТАССТТТАЛТТТБОССССССССССТВОССТАТАТТТАТТСТСАЛСАЛТТАЛСЯТСТАСАССТАЛТОССТАЛ МСЛТЕСАЛАТТАЛАЛСОСССССССССТВОССТВОСТАТАЛТАЛСАЛСТТСТВАЛТАТССАЛТТАСССАТ	-
AsnMetGluIleLysThrGlyGlyGlyMetArgIleAsnAsnAsnLeuLeuIleLeuAspValAspTyrProPh	
4500 4550	
стассаюттотттолоскодалттолососотосотобосалататалтасотасайтаттоластюта сатостелалелаластасототталастосососососостотататталтосатотокталеттосае	TA
AspAlaGlnThrLysLeuArgLeuLysLeuGlyGlnGlyProLeuTyrIleAsnAlaSerHisAsnLeuAspIl	
4600	
тталтаттатсковалтатовалалаттасотасттоттатватттттасссттелатеотатттттал	G
AsnTyrAsnArgGlyLeuTyrLeuPheAsnAlaSerAsnAsnThrLysLysLeuGluValSerIleLysLysSe	
4650 4700	,
ТСАССТОАТТТСАЛАСТАТТАТСАСОСТАТССАТАТТТАСОТССТТТСССАССТСАЛАСТАТОТТСТОТАС АСТОСАСТАЛАСТТСАТАТАТАТАСССАТАССТАТАЛАТССАССАЛАСССССАЛАСТАТОТТСОТАС	A
SerGlyLeuAsnPheAspAsnThrAlaIleAlaIleAsnAlaGlyLysGlyLeuGluPheAspThrAsnThrSe	
4750	
стелелаятствтаятсявстваттітталттталссалассягалстватаститассасаебалста даятстеславатасалессилталаласталалттаястстваелтакаласалассаятасала	
GluSerProAspIleAsnProfleLysThrLysIleGlySerGlyIleAspTyrAsnGluAsnGlyAlaMetIl	e
GluSerProAspIleAsnProfieLysThrLysIleGlySerGlyIleAspTyrAsnGluAsnGlyAlaMetIl 4800 4850	
GluserProAspIleAsnProfieLysThrLysIleGlySerGlyIleAspTyrAsnGluAsnGlyAlaMetIl 4800 4850 TGATTTGAACCTCGCCAAATTGGAACTGTTGACAACTGTTGGGGGCGATTACCATTGTTTTTACTACTGCGGGGGGTTACCATTGGGAACCAAAAATGATGACAACTG	AT

.7 490

TOGGACACCTGTTGGGGTCTGGGTAGAGGATTGACGTCTTAAGTAAG	AA TT
ThrLeuTrpThrThrPrqAspProSerProAsnCysArgIleHisSerAspAsnAspCysLysPheThrLeuV	41
4950 500	0
GANTGTTTTAČACCCTCAGTTCATGATGGAGATCGACGAAACCGACATAGACCTCTAGAAAGTAGGTÄGT CTTACAAAATGTGGGGGCCAGTACTACTGCTACTGGAGATCTTTCATCCATGA GTT	CA
LeuthrLysCysGlySerGInvalLeuALAThrvalAlaAl3LeuAlavaISerGlyAspLeuSerSerMett	nr
5050	
ссотойскае откака и полнатория и Соследото сала стата и полнатория и	I
eq:GiyThrValAlaSerValSerIlePheLeuArgPheAspGlnAsnGlyValLeuMetGluAsnSerSerLeuLeuArgPheAspGlnAsnGlyValLeuMetGlyValLeuMetGluAsnSerSerLeuLeuArgPheAspGlnAsnGlyValLeuMetGluAsnSerSerLeuLeuArgPheAspGlnAsnGlyValLeuMetGlyValLeuMetGluAsnSerSerLeuLeuArgPheAspGlnAsnGlyValLeuMetGluAsnSerSerLeuLeuArgPheAspGlnAsnGlyValLeuMetGluAsnSerSerLeuLeuArgPheAspGlyValLeuMetGluAsnSerSerSerLeuLeuArgPheAspGlyValLeuMetGluAsnSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerSerS	
5100 515	0
ттоталтолосттоллятоттасосттолоттолтасоттасотатототототасотоласоталятасо лалолтастооллетттасалятообластоллетоллятосалятосалятосаотосотоодаттатос	GA
LysHisTyrTrpAsnPheArgAsnGlyAsnSerThrAsnAlaAsnProTyrThrAsnAlaValGlyPheMerP	ro
5200	
ттосладатеосолтлосттатосоттелосттора солтатата теотласлотеллателлето солсетле ласеттетлосотлесслалаесскала отобато солталлатале такол тотелето солсетт солто	CA
AsnLeuLeuAlaTyrProLysThrGlnSerGlnThrAlaLysAsnAlaIleValSerGlnValTyrLeuHisG	17
5250 530	0
статтталттадатастаталатасталтатосалттассяталсттасятелесттоватесятся а даталалсталастатастастассаттасастталтасастастасталтсасасалаластассая стал	CG
AspLysThrLysProMetIleLauThrlleThrLeuAsnGlyThrSerGluSerThrGluThrSerGluValS	er
5350	
телателеятисления тетасское в состттех соттетато те состателя и состато с состато с соста с соста с соста с сост Коттастстите с те соста с соста	TG
ThrTyrSerMetSerPheThrTrpSerTrpGluSerGlyLysTyrThrThrGluThrPheAlaThrAsnSerT	yr
5400 <u>91.2</u>	
TGGAAGAGGATGTAACGGGTCCTT 5'r chain ACCTTCTCCTACATTGCCCAGGAA 3'l chain	

TOGAAGAGGATGTAACGGGTCCTT 5'r chair ACCTTCTCCTACATTGCCCAGGAA 3'l chair ThrPheSerTyrIleAlaGlnGlu COOH

Fig. 6. Nucleotide sequence of adenovirus 2 fiber gene and sites of mutation of H2 ts 125. The mutated codons are framed. The arrows indicates the cleavage site for EcoRI at map position' 89.7. Map coordinates for the fiber gene are underlined. Nucleotides are numbered according to Hérissé et al. (1981).

Characterization of a fiber-defective ts mutant of adenovirus type 2

graphy. The 2D patterns were found to be identical for WT and H2 ts 125 fibers, with four major spots of tyrosine, threonine, glutamic acid and isoleucine (not shown).

Functional integrity of the C-terminal sequence of the H2 ts 125 fiber

It has been recently shown that the attachment of the fiber with the penton base involves the C-terminal end of the fiber, and that this C end lies opposite the distal knob (Boudin and Boulanger, 1982). In the light of this, if the H2 ts 125 fiber was capable of assembly with the penton base in vitro and/or in vivo, this would imply a functional integrity of the C-terminal end of the mutant fiber. The presence of penton in extracts of cells infected with H2 ts 125 at 33°C, as evidenced by immunological analyses and by electron microscopy (not shown) as well as in H2 ts 125 virion (Figure 1B), indicated that the assembly of H2 ts 125 penton base and fiber could occur in vivo. The asembly could also occur in vitro, as shown in Figure 5. When [35S]methionine-labeled extracts of cells infected with the mutant at 33°C were incubated overnight at 4°C (Boudin and Boulanger, 1982) with a large excess of cold H2 ts 125 penton base isolated as previously described (Boudin et al., 1979), the peak of free fiber decreased, as a result of its binding with penton base to form penton (Boudin and Boulanger, 1982). This suggested that the H2 ts 125 mutation did not alter the biological function of the fiber C end.

DNA sequencing of the H2 ts 125 fiber gene

All the data reported above suggested, therefore, that point mutation(s) were responsible for aberrant mobility of H2 ts 125 fiber in SDS-PAGE, and also plausibly temperature-sensitivity. The two halves of the H2 ts 125 fiber gene, corresponding to fragments *Eco*RI-E and *Hind*III-F were cloned and sequenced according to the same strategy as that used for the WT fiber gene (Hérissé and Galibert, 1981; Hérissé et al., 1981).

The sequence derived from the H2 ts 125 fiber mutant was identical to that of the WT except for two point mutations. At position 3970, on the sense strand, a C residue was replaced by a T, changing the CTT triplet to a TTT triplet. At position 4958, a C residue was also replaced by a T residue changing the previous GCT triplet to GTT. A detailed map indicating the sites of mutation is presented in Figure 6.

S1 endonuclease analysis of H2 ts 125 fiber message

Since the mutation at nucleotide 4958 could create a donor site for a splice, comparative S1 analysis of WT and H2 ts 125 fiber mRNAs was designed to test this hypothesis. Hybridization was performed with short fragments containing either one or the other point mutations, but also with longer genomic fragments corresponding to either the lefthand or right-hand moiety of the fiber gene. No difference between WT and H2 ts 125 S1 patterns was observed, suggesting that no splicing occurred in the mutant fiber.

Discussion

A temperature-sensitive, fiber-defective mutant of type 2 adenovirus, H2 ts 125, has been isolated and phenotypically characterized (D'Halluin *et al.*, 1980; Martin *et al.*, 1978). It maps in the fiber gene (D'Halluin *et al.*, 1982). Further biochemical characterization showed that the mutant-infected cells made a fiber polypeptide unstable at the non-permissive temperature (39.5° C), and smaller by a mol. wt. of 2500 than

that of the WT, viz., 59.5 K instead of 62 K. The 59.5 K fiber polypeptide also occurred at the permissive temperature (33°C), but appeared stable at this temperature (Figure 1).

Several hypotheses can be formulated to explain the biochemical properties of the fiber mutant. (i) A mutation on the amino end might result in the lack of acetylation of the N-terminal amino acid of the polypeptide chain, thereby rendering it sensitive to cellular aminopeptidase(s). (ii) A mutation lying somewhere within the amino acid sequence might reveal preferred site(s) for cellular endopeptidase(s) cleavage, located at 20 amino acids either from the anino or carboxy end. (iii) The H2 ts 125 mutation might change the nucleotide sequence to a stop codon, leading to a shorter polypeptide chain. (iv) Alternatively, a mutation could suppress the normal initiation codon and create a new initiation codon at ~60 nucleotides downstream. (v) Point mutation(s) might provoke a change in the three-dimensional structure of the mutant fiber which affects its migration in SDS-gel and its morphology under the electron microscope. (vi) The mutant H2 ts 125 might be a deletion mutant originally present in the mutagenized WT stock, and selected for its temperaturesensitive phenotype. (vii) Point mutation might create a new acceptor or donor splice site used in conjunction with other consensus sequences provoking the occurrence of a short intron.

The data presented here ruled out a number of these alternatives. The mutant fiber polypeptide was normally glycosylated, acetylated and assembled into 6S oligomeric, antigenically reactive fiber. In pulse-labeling experiments, a fiber polypeptide unit of 62 K was never found in H2 ts 125infected cells, which seemed to exclude that the 59.5 K polypeptide might derive from a 62 K species by proteolytic cleavage. The H2 ts 125 fiber was also capable of assembly in vivo and in vitro with penton base to form penton. This suggested a functional integrity of the C-terminal sequence of the mutant fiber, since the C end of the fiber has been found to be involved in the linkage with the penton base unit (Boudin and Boulanger, 1982). However, recent structural data are consistent with a model of attachment of fiber with penton base via its N-terminus (Green et al., 1983). Nevertheless, biochemical analyses revealed that the N and C termini of the mutant fiber were undistinguishable from those of the WT fiber, excluding the four first hypotheses. Restriction analysis of H2 ts 125 DNA also excluded a deletion within the fiber gene.

Since an unambiguous answer might only be furnished by the nucleotide sequence of the H2 ts 125 fiber genome, *Eco*RI-E and *Hind*III-F fragments from H2 ts 125 DNA, overlapping the gene for fiber, were cloned and sequenced. Two point mutations were found at nucleotides 3970 and 4958, corresponding to two amino acid changes at positions 105 and 434, downstream from the N end. The first change was of a conservative type (Leu-Phe), whereas the second one consisted of a non-conservative interchange Ala-Val (Dayhoff, 1969). The codon change GC*T-GT*T might create a donor site for splicing, according to the splice junction consenses sequences (Mount, 1982). A spliced sequence within the fiber gene might explain a shorter fiber polypeptide unit. However, the S1 analysis data showed no evidence for the existence of a splice within the fiber gene.

Taken altogether, these data suggested that either one or both point mutations concerned highly organized domain(s) of the fiber polypeptide chain, having a major influence on its

M.-L. Boudin et al.

electrophoretic mobility and its temperature stability. Both WT and mutant fiber protein sequences are now being computerized to determine the possible conformational changes resulting from either one or the other mutation. In addition, to elucidate the mechanism of the temperature-sensitivity of adenovirus mutant fiber, antibodies are being prepared against synthetic peptides reproducing the WT and mutated amino acid sequences.

Materials and methods

Cell cultures and viruses

Suspension cultures of KB cells were grown in Eagle spinner medium suplemented with 5% horse serum. HeLa cells were cultured as monolayers in Dulbecco-modified Eagle medium supplemented with 10% calf serum. H2 temperature-sensitive mutant H2 ts 125 was isolated in our laboratory after nitrous acid treatment of a WT stock (Martin et al., 1978). Stocks of ts mutants were grown on HeLa cell monolayers maintained at 33°C. Adenovirus was titrated by the plaque assay or by the fluorescent focus units (f.f.u.) assay (Philipson *et al.*, 1968) on a HeLa cell monolayer at 37°C. The cells were usually infected at a multiplicity of infection of 10-100 f.f.u./cell. Purification of virus and viral DNA

Adenovirus particles produced at 37°C by the WT or at 33°C by the H2 ts 125 were extracted from infected cells with Freon 113 and purified in self-generating CsCl gradients, as previously described (D'Halluin et al., 1978). Virai DNA was isolated as a DNA-terminal protein complex. Virus particles were disrupted by adding an equal volume of 8 M guanidinium chloride made in 0.2 M Tris-hydrochloride, pH 8.1, 20 mM Na EDTA, 4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) for 10 min in the cold. The virus lysate was then chromatographed on a Sepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals) column (60 x 1.5 cm) equilibrated in 0.1 M Tris-hydrochloride, pH 8.1, 10 mM Na EDTA, 2 mM 2-nercaptoethanol. The excluded peak was adjusted to 3.06 M in CsCl and the DNA-terminal protein complex was banded in a Kontron TFT 65 fixed angle rotor for 72 h at 33 000 r.p.m. and 20°C.

Labeling conditions

Virus polypeptides in infected cells. Pulse-chase labelings of virus-coded proteins were performed in KB cells (6 x 106 cells/ml) in methionine-deprived medium. L-{35S]Methionine (50 µCi/ml) was added for 1 h at 16 h after infection at 39.5°C. The cells were either harvested just after the pulse, or after a chase of 8 h at 39.5°C. Label was chased by dilution to 3 x 10⁵ cells/ml in medium prewarmed to the required temperature and containing 10 times the normal concentration of cold methionine.

Uniform labeling of the WT and mutant fibers. The adenovirus fiber was uniformly labeled in vivo by adding a mixture of [14C]amino acids (10 μ Ci/ml) to a cell culture with an amino acid concentration 10 times lower than that of the normal medium. Labeling was performed for 24 h at 56 h after infection at 33°C, and the fiber purified as previously described (Boudin and Boulanger, 1982; Boulanger and Puvion, 1973). Labeling of carbohydrate units of adenovirus fiber was carried out by the addition of [3H]glucosamine to the cell culture (50 µCi/ml) for 8 h at 16 h after infection at 39.5°C

N-terminal labeling of adnenovirus fiber. Most of the primary translocation products of adenovirus have been shown to be acetylated (Jörnvall et al., 1974). Fiber was labeled on its N terminus by addition of [14C]sodium acetate (Fedor and Daniell, 1980) (10 µCi/ml) for 24 h at 56 h after infection at 33°C or for 8 h at 16 h after infection at 39.5°C. Labeled virus-coded proteins and glycoproteins were analyzed in SDS-containing polyacrylamide gels. Analytical SDS-PAGE. Samples were dissolved in an equal volume of

sample buffer (0.0625 M Tris-hydrochloride, pH 6.8, containing 6 M urea, 5% SDS, 10% mercaptoethanol and 0.005% bromophenol blue) and heated for 2 min at 100° C. 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 (Serva blue, R.250), dried under vacuum and exposed to Kodak Royal X-OMAT S film. H-labeled bands were revealed by fluorography at -70° C, after impregnating the gels with PPO in DMSO (Bonner and Laskey, 1974).

2D immunoelectrophoresis

2D analyses were carried out as described in detail elsewhere (Martin et al., 1975, 1978).

Assembly of fiber capsomers

Antigenically reactive trimeric hexons sediment at 12-13S, pentons at 10.5S and penton base at 9.1S (Boudin *et al.*, 1979; Lemay and Boulanger, 1980; Pettersson and Höglund, 1969; Velicer and Ginsberg, 1970). Fiber capsomers sediment as 6.1S components (Lemay and Boulanger, 1980; Sundquist et al., 1973; Wilhelm and Ginsberg, 1972), whereas unassembled fiber polypeptide chains sediment at ~3.4S (Velicer and Ginsberg, 1970). To evaluate the capacity of the fiber polypeptide chains to assemble into the 6S oligomeric form, H2 ts 125-infected HeLa cells were pulse-labeled with [³⁵S]methionine for 1 h at 18 h after infection. After three washes in Trissaline, the cells were collected by centrifugation and resuspended in 0.5 ml of extraction buffer (20 mM Tris-hydrochloride, pH 7.5, 10 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 2 mM PMSF) and disrupted by sonication. NaCl was added up to 0.15 M final concentration and the extract was centrifuged for 1 h at 100 000 g and 4°C. The supernatant was brought to 1 M NaCl and analyzed by velocity sedimentation in a sucrose gradient. The gradients contained 5-27% sucrose (w:v) in 0.02 M Tris-hydrochloride, pH 8.1, 1 M NaCl, 10% (v:v) glycerol and 1 mM Na EDTA. The gradients were centrifuged for 21 h at 49 000 r.p.m. at 4°C in a Beckman SW 50.1 rotor (Lemay and Boulanger, 1980). Fractions (0.2 ml) were collected through the bottom of the centrifuge tube. The gradients were calibrated with beef liver catalase (11.2S), E. coli alkaline phosphatase (6.0S), human blood amylase (4.5S) and yeast 3-phosphoglycerate kinase (3.1S). Enzyme markers were assayed as previously described (Lemay and Boulanger, 1980), using a Rotochem II A 36 centrifugal analyzer (Roche-Kontron). Adenovirus 2 fiber was revealed in gradient frac-tions by immunoselection on *S. aureus* ceils (Kessler, 1975), or by Western blotting (Towbin et al., 1979), using an anti-fiber rabbit serum (Boudin and Boulanger, 1981).

Carboxypeptidase digestions

Samples of WT and H2 ts 125 fibers produced at 33°C and purified as previously described (Boulanger and Puvion, 1973) were digested with carboxypeptidase A, B or Y at a ratio of enzyme to substrate of 5:100 for 24 h at 37°C in 0.05 M sodium phosphate buffer pH 6.8. Hydrolyzates were analyzed in SDS-PAGE as described above. Amino acids cleaved off the C terminus were analyzed in the acid-soluble supernatant by 2D cellulose t.l.c. in the following solvent system. First dimension: 2-propanol/2-butanone/1 N-HCl (60/15/25). Second dimension: 2-methyl-2-butanol/2-butanone/acetone/ methanol/0.885 M ammonia solution/H2O (50/20/10/5/5/15).

In vitro synthesis and N-terminal sequence of H2 ts 125 fiber

Total cytoplasmic RNA was obtained from WT- and H2 ts 125-infected cells harvested at 20 h after infection at 37°C, according to Anderson et al. (1974), Anderson and Lewis (1980), and translated *in vitro* in reticulocyte lysate/[³H]proline (New England Nuclear, Dreieich, FRG). K⁺ and Mg²⁺ concentrations were brought to 150 mM and 2 mM, respectively. [³H]-Proline-labeled products synthesized *in vitro* were analyzed in SDS-polyacrylamide gel and [3H]proline-labeled fiber was purified by electroelution (Anderson and Lewis, 1980). Proline has been found at positions 6, 13 and 16 on the fiber N end (Anderson and Lewis, 1980; Hérissé and Galibert, 1981). The N terminus of [3H]proline-labeled WT and mutant fibers was sequenced in a Beckman 890 C automatic sequencer, using apomyoglobin as carrier. The radioactivity of each cycle was determined in a liquid spectrometer.

Enzymes

Peptidases. Diisopropylfluorophosphate-treated carboxypeptidase A, from bovine pancreas, 2 x crystallized and carboxypeptidase B, from porcine pancreas, 2 x crystallized, were both purchased from Sigma. Yeast carboxy-peptidase Y was purchased from Pierce Chemicals, and treated with pepstatin-A (Sigma) according to Lee and Riordan (1978). Aminopeptidase M, from hog kidney, was obtained from Boehringer.

Restriction endonucleases. EcoRI, Smal, HindIII and Bg/II and SphI (D'Halluin et al., 1983) were purchased from Boehringer; Xbai from Miles Laboratories; Hhal from BRL, and Hinfl from Amersham. All reaction mixtures for restriction cleavage contained 1 µg of viral DNA. Each reaction buffer was made according to the manufacturer's recommendations. Viral DNA was cleaved as DNA-terminal protein complex, and pronase (Calbiochem) added for 15 min at 37°C before loading the gel (10 μ g/sample). S1 nuclease. This was purchased from Miles Laboratories.

Enzymes sedimentation markers. Beef liver catalase and yeast 3-phosphoglycerate kinase were purchased from Boehringer, and E. coli alkaline hosphatase from Worthington Biochemicals. Human blood amylase was obtained from a patient with acute pancreatitis.

DNA cloning and sequencing

EcoRI-E fragment of H2 ts 125 DNA was cloned in pBR328 and HindIII-F fragment in pBR322. Clones were selected according to their susceptibility to various antibiotics and characterized by gel electrophoresis. Nucleotide se-quences were derived using the Maxam and Gilbert method. Following the

CONCLUSION GENERALE

PERSPECTIVES

L'étude que nous avons entreprise concerne la fibre de l'adénovirus 2 de type sauvage et du mutant H2 ts 125.

La fibre a un rôle fonctionnel important pour le virus puisque l'adsorption virale sur le récepteur de la cellule hôte se fait par l'intermédiaire de cette protéine. Dans le but de mieux connaître cette protéine, son assemblage avec la base du penton (protéine dans laquelle la fibre est ancrée de manière non covalente), sa structure (notamment sa polarité, sa glycosylation et sa migration en gel de polyacrylamide-SDS suivant les conditions de dénaturation) et l'effet d'une mutation sur son intégrité structurale et fonctionnelle ont été étudiés.

Nous avons tout d'abord montré que la base du penton et la fibre purifiées séparément sont capables de se réassocier <u>in vitro</u>, en l'absence de toute autre protéine détectable. La constante de dissociation de la fibre pour la base est basse (2.10^{-7}) . L'assemblage des deux protéines est réversible et semble dépendre d'une certaine conformation de la fibre : le penton est dissocié en ses deux composants sous l'effet d'anticorps anti-fibre et un nouveau site antigénique semble apparaître sur la fibre assemblée.

La fibre assemblée ou non à la base du penton semble glycosylée de la même manière. Le glycanne possède une affinité pour la WGA (Wheat Germ Agglutinin) et ne serait constitué que de N-acétyl-glucosamine, liée à la protéine par une liaison de type O-glycosidique. La glycosylation varie suivant les sérotypes étudiés. Seules les fibres des adénovirus 2 et 5 possèderaient de la glucosamine. Cependant, la fibre de l'adénovirus 5 n'est pas reconnue par la WGA.

D'autre part, trois autres de nos résultats sont en faveur du modèle de GREEN <u>et al.</u> (1983). Ce modèle a été obtenu pour une structure dimérique de la fibre. Cette structure dimérique avait été proposée par DEVAUX <u>et al.</u> (1984) sur des données de diffraction aux rayons-X. L'hypothèse du trimère n'était pas totalement exclue. Par des rapports de mesure d'incorporation de (^{35}S) -méthionine sur le nombre de méthionine dans chaque protéine d'un virus marqué à la (^{35}S) -méthionine, van OOSTRUM et BURNETT (1985) confirmaient le modèle trimérique. De nouvelles études cristallographiques favoriseraient aussi le modèle trimérique (DEVAUX et JACROT, communication personnelle). Les auteurs du modèle de la fibre n'ont pas précisé si un tel modèle était encore valable pour une structure trimérique ou s'il y avait incompatibilité. De

plus, parmi les 44 feuillets β constituant le bâtonnet, sept étaient d'après la théorie de CHOU et FASMAN décrits comme des structures en hélice α . Les mesures de dichroïsme circulaire donnent un pourcentage de 15 à 20 % de structure en hélice α , ce qui est supérieur au taux prédit par leur modèle.

Bien qu'imparfait, ce modèle a cependant le mérite d'être applicable à la fibre d'un autre sérotype (Adénovirus 3) avec un nombre de feuillets constituant le bâtonnet plus petit, compatible avec la différence de longueur des fibres des deux sérotypes (SIGNAS et al., 1985).

L'orientation de la fibre proposée par ce modèle a été confirmée par notre étude de la polarité de la fibre à l'aide d'immunsérums dirigés contre des peptides synthétiques correspondant aux extrémités N et C du polypeptide : l'extrémité N-terminale de la fibre semble impliquée dans la liaison avec la base du penton.

Ce modèle permet également d'émettre une hypothèse attrayante pour le mode d'action de la mutation de la fibre F125 tant au point de vue structural que fonctionnel : la substitution Ala --- Val pourrait prolonger la structure en bâtonnet de la fibre par l'addition de quatre nouveaux feuillets β . En effet, cette substitution qui est responsable du changement de migration électrophorétique en gel de polyacrylamide-SDS et de la thermosensibilité de la protéine F125 introduit un acide aminé hydrophobe fortement inducteur de la structure en feuillet β . Cette hypothèse permet d'expliquer : 1) la diminution de la masse moléculaire apparente du polypeptide en gel de polyacrylamide-SDS par la création de nouvelles liaisons hydrophobes résistantes aux conditions standards de dénaturation, 2) l'augmentation de la longueur observée en microscopie électronique et 3) la répercussion de la mutation sur toute la protéine.

Enfin, le modèle de GREEN et al. (1983) permet également de comprendre migration électrophorétique les variations de de la fibre en qel de polyacrylamide-SDS en fonction de son degré de dénaturation. La structure en bâtonnet constituée par l'empilement de petits feuillets β implique de nombreuses liaisons hydrophobes, ce qui est compatible avec une certaine résistance à la dénaturation et avec le rôle essentiel de l'urée pour l'obtention d'une protéine totalement dénaturée. Une relation entre la différence des masses moléculaires apparentes, le degré d'hydrophobicité et le coefficient de friction a pu être établi pour rendre compte des variations de migration électrophorétique des protéines suivant les conditions de dénaturation.

Cependant, notre étude soulève plusieurs problèmes que nous pourrions essayer de résoudre :

- le site d'assemblage de la base avec la fibre pourrait-il correspondre effectivement à la séquence complémentaire de celle située sur l'extrémité N de la fibre, analogue au peptide signal des protéines secrétées ?

- par quel site sur la fibre y-a-t-il liaison au récepteur cellulaire ?

- y-a-t-il glycosylation des fibres d'autres sérotypes (3,4,7,9,12) ? Quel est le rôle du chaînon glycannique ?

Il serait également intéressant d'aborder d'autres problèmes, d'ordres plus fonctionnels et physiologiques :

- pourquoi certains virus mutés sur la fibre sont-ils bloqués au stade de particules intermédiaires vides ?

- les fibres des divers sérotypes diffèrent en plusieurs points : longueur, antigénicité, glycosylation. Existe-t-il un ou plusieurs récepteur(s) cellulaire(s) pour les différents sérotypes ?
APPENDICE TECHNIQUE

A- Cultures cellulaires

1. Cellules KB en suspension

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

2. Cellules HeLa et 36 293 en culture monocouche

Les cellules HeLa et les cellules 36 293 sont cultivées dans des flacons Falcon à 37° C, dans du milieu minimum essentiel d'Eagle (MEM), contenant 5 % de sérum de veau foetal et 5 % de sérum de veau nouveau-né δ_{-} irradié.

B- Infection virale

Les adénovirus (sérotypes 2, 3, 4, 5, 7, 9) sont mis à multiplier dans des cellules KB en suspension. L'adsorption du virus se fait à 37° C 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. La durée de l'infection est de 5 jours à 33° C ou de 40 h à 37° C et 39° C.

C- Purification du matériel biologique

1. Préparation du virus et des antigènes solubles

La préparation du virus et des antigènes solubles est faite à partir de cellules KB infectées, lavées avec du sérum physiologique (NaCl 150 mM) et concentrées dix fois dans du Tris hypotonique (Tris 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA ImM, pH 8,1). Ces étapes se font à 4° C.

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 coussin de chlorure de césium de densité 1,43, centrifugée dans une ultracentrifugeuse Beckman, 60 min à 25 K, dans un rotor SW 27 (Beckman).

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

Le virus de densité 1,34 se concentre en une bande opalescente au niveau du coussin de chlorure de césium. Il est repurifié sur gradient autoformé de chlorure de césium (rotor SW 50, à 30 K, pendant 16 h)

2. Purification des protéines

La fibre et le penton complet sont isolés à partir des antigènes solubles de l'adénovirus du type sauvage, cultivé à 37° C pendant 40 heures tandis que la base du penton est celle du H2 <u>ts</u> 125, cultivé à 39° C, 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 en tampon de phosphate de sodium 50 mM, pH 6.8, à une force ionique correspondant à 0,12 M NaCI. (BOULANGER and PUVION, 1973).

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'hydroxylapatite. Les protéines sont éluées par un gradient de phosphate de potassium, de 10 mM à 500 mM. La fibre est éluée à 0,2 M, la base et le penton à 0,1M.

Les fractions correspondant à la protéine sont précipitées au sulfate d'ammonium, reprises dans du tampon phosphate et dialysées contre le même tampon. La fibre est alors conservée à -20° C, la base et le penton à -70° C 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 phényl méthyl sulfonyl) à la concentration de 1 mM dans toutes les solutions.

3. Préparation du DNA viral

a) purification du complexe DNA - protéine terminale

Le DNA lié à la protéine terminale (55 K) se purifie par passage sur une colonne de Sépharose 4B, après dissociation de la capside virale par du chlorure de guanidine 8M (Tris 200 mM, mercapto éthanol 4 mM, chlorure de guanidine 8 M)

Le complexe DNA-55 K est purifié par ultracentrifugation en chlorure de césium 3,06 M final (correspondant à une densité de 1,7), dans un rotor SW 50, à 35 000 rpm, pendant 72 h.

b) purification du DNA dépourvu de protéines

Le DNA s'obtient en hydrolysant du virus à la pronase (1 mg/ml) en présence de 0,5 % de sarcosinate de sodium pendant 2 h à 50° C.

Le DNA est purifié par ultracentrifugation en chlorure de cesium 3,06 M, comme précédemment décrit.

c) purification de fragments de DNA

Le DNA hydrolysé est déposé sur un gel d'agarose 1 %. Le fragment à purifier est mis à migrer dans un gel d'agarose à 0,3 %. La bande est alors découpée. Un cycle de huit congélations-décongélations, une centrifugation à 10 000 rpm et le passage sur filtre millex puis sur minicolonne Elutip (Schleicher et Schüll) permettent d'obtenir le fragment purifié et concentré.

4- Préparation de mRNA cytoplasmiques poly A⁺

Des cellules KB infectées sont reprises dans 4 à 10 volumes du tampon suivant : Tris 10 mM pH 7, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0,5 % NP 40. Après 10 min à 4° C, les cellules sont cassées par 10 coups d'homogénéiseur de Dounce et centrifugées à 1000 g pendant 5 min. La phase soluble correspond au cytoplasme, auquel on ajoute un volume de TSE (Tris 10 mM pH 7, NaCl 150

mM, EDTA 5 mM, SDS 1 %) avant de faire 3 extractions successives par le mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (dans les proportions 24/24/1). Les mRNA poly A⁺ sont sélectionnés par passage sur colonne d'oligo-dT-cellulose (Sigma) en tampon Tris 10 mM, pH 7,6, NaCl 0,6 M, EDTA 1 mM, SDS 0,2 %. L'élution se fait en tampon Tris 10 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM.

D- Sédimentation en gradient de saccharose

Les antigènes solubles sont déposés sur un gradient de saccharose 5-27 % dans un tampon 20 mM Tris HCI pH 8,1, 1 M NaCl, 10 % glycérol et 1 mM EDTA. Le gradient est centrifugé 21 h, à 49 000 rpm dans un rotor SW 50 (LEMAY and BOULANGER, 1980).

E- Prédiction de structures secondaires et calcul d'hydrophobicité

Les trois méthodes de prédiction de structures secondaires utilisées sont celles de CHOU et FASMAN (1978) de BUSETTA et HOSPITAL (1982) et de CID <u>et al.</u> (1982). La première méthode est fondée sur la probabilité de trouver un acide aminé donné dans une conformation donnée, déterminée par des études aux rayons X de molécules connues. Les deux autres méthodes font appel à l'hydrophobicité de la molécule.

Le taux d'hydrophobicité d'une molécule est calculé selon la méthode de KYTE et DOOLITTLE (1982), le calcul se faisant de proche en proche sur une séquence longue de 7 acides aminés.

- F- Techniques d'hydrolyses
 - 1- Hydrolyse des protéines
 - a) hydrolyse enzymatique

Les incubations sont faites à 37° C. L'enzyme est ajouté dans un rapport de 2 ou 4 % final (poids/poids) par rapport au substrat. La carboxypeptidase Y provient de chez Pierce, la carboxypeptidase A de chez Serva, la protéase Staph V8 de chez Miles, la chymotrypsine de Worthington Biochemical Corporation. b) hydrolyse chimique en milieu légèrement acide

Le protocole de RITTENHOUSE et MARCUS (1984) a été légèrement modifié. Les échantillons sont ajustés à 10, 25 ou 50 mM final en HCl et laissés pour hydrolyse à 56° C pendant au moins 16 h.

2- Hydrolyse du DNA

Les enzymes de restriction sont employées à 1 ou 2 unités par microgramme de DNA. La température et le tampon d'hydrolyse varient en fonction de l'enzyme utilisée. Nous utilisons les conditions recommandées par le fournisseur.

G- Techniques de marquage

1- Marquage des protéines

Le marquage des protéines au $({}^{14}C)$ -formiate de sodium (Amersham) ou au $({}^{14}C)$ -acétate de sodium (CEA) se fait par addition de 10 à 20 µCi/ml dans le milieu de culture. Le marquage à la $({}^{14}C)$ -valine (CEA) nécessite de changer le milieu pour éliminer la valine froide. Un marquage court (0 à 2 h) nécessite une privation de valine de 20 min avant l'addition du produit radioactif. Un marquage long (supérieur à 2 h) nécessite l'addition de valine froide à une concentration 10 fois plus faible par rapport au milieu initial.

2- Marquage des sucres

L'incorporation de (14 C)-glucosamine ou (3 H)-glucosamine (CEA) se fait par addition du produit marqué dans le milieu de culture à la concentration de 20 µCi/ml.

L'incorporation de $({}^{3}H)$ -mannose a été essayée en milieu Eagle modifié, dépourvu de glucose et après concentration des cellules (10⁷ cellules dans 1 ml de milieu). 50 µCi de produit radioactif sont ajoutées pour 1 ml de milieu.

3- Marquage du DNA sur l'extrémité 5'

Le marquage sur l'extrémité 5' d'un fragment de DNA nécessite une déphosphorylation par l'action d'une phosphatase (PL Biochemical inc.), 1 h à 65° C. Le DNA, après précipitation à l'éthanol, est repris dans le tampon : Tris 10 mM pH 9,5 EDTA 0,2 mM, spermidine 2 mM et laissé 2 min à 92° C avant l'addition d'ATP- $\delta - ({}^{32}P)$ (NEN), de la kinase du phage T4 (PL Biochemical inc.), et de 5 mM MgCl₂ pour permettre la phosphorylation de l'extrémité 5'.

H- Techniques électrophorétiques

1- Gel de polyacrylamide-SDS

Les échantillons sont dénaturés à 100° C, pendant 2 mn, après y avoir ajouté un volume égal de tampon Tris-HCI, pH 6,8 ; 4 % SDS ; 10 % mercapto-éthanol ; 6 M urée et 0,01 % de bleu de bromophénol. Ils sont déposés sur un gel d'espacement 5 % d'acrylamide (rapport acrylamide/bis : 50 : 1,33) suivi du gel de résolution en 15 % d'acrylamide (rapport acrylamide/bis 50 : 0,235) dans un système en tampons discontinus (LAEMMLI, 1970), les 2 gels contenant du SDS. Le tampon d'éléctrophorèse est une solution de Tris 0,025 M, glycocolle 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, séchés et autoradiographiés.

2. Gel de polyacrylamide non dénaturant

On utilise le même système en tampons discontinus mais le gel de résolution est, suivant les indications, soit en 6 % d'acrylamide (rapport acrylamide/bis : 50 : 1, 33), soit en 10 % d'acrylamide (rapport acrylamide/bis : 50 : 0,235) en absence de SDS. Le tampon de migration est concentré deux fois par rapport à celui utilisé pour les gels SDS.

3. Gel de polyacrylamide en gradient urée

Le même système en tampons discontinus est utilisé. Le gel de résolution en 15 % d'acrylamide (rapport acrylamide/bis : 50 : 0,235) contenant du SDS, est constitué comme suit : 1 ml de gel contenant de l'urée 8 M, 6 ml de gel contenant le gradient urée : $0 \longrightarrow 8$ M, 1ml de gel ne contenant pas d'urée. La migration se fait perpendiculairement au gradient (revue par GOLDENBERG and CREIGHTON 1984).

4. Electrophorèse de transfert

Le transfert de protéines d'un gel de polyacrylamide à une feuille de nitrocellulose se fait dans le tampon suivant : Tris 25 mM, pH 8,9, glycocolle 192 mM, méthanol 20 %. Il dure 1 h-1 h 30, sous réfrigération.

5. Isoélectrofocalisation

L'électrophorèse se fait dans un gel d'agarose à 1 % contenant 5 % d'ampholines pH 3,5 à 9,5 (Pharmacia Fine Chemical) pour 20 min à 10 V/cm (voltage constant) suivi par une migration de 60 min à 6 W (puissance constante). Le gradient de pH est déterminé par élution de bandes de gel de 1 cm.

6. Immunoélectrophorèse bidimensionelle

C'est la technique de LAURELL (1965), modifiée par WEEKE (1973). C'est une électrophorèse sur plaque horizontale (110 x 90) mm en agarose 1 % dans du tampon véronal, pH 8.6, 0,2 M (tampon d'électrophorèse). La première migration se fait pendant 90 minutes sous 100 volts aux bords de la plaque, celle-ci étant réfrigérée par un courant d'eau. Puis le gel est coupé en bandes correspondant à chaque échantillon. Pour la seconde dimension, l'agarose 1 % contient l'antisérum dirigé contre les antigènes viraux (en quantité variable suivant la quantité du dépôt). La migration dure 16 h, sous une différence de potentiel de 25-30 volts aux bords de la plaque.

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

7. Immuno-affino-électrophorèse

On suit le même procédé que pour l'immunoélectrophorèse bidimensionnelle précédemment décrite. Mais pour la première dimension, on ajoute, à l'agarose 1 %, 1 mg/ml de la lectine choisie.

I- Techniques immunologiques

1. Préparation des sérums

a) sérum anti-virus

Le virus est cassé par désintégration sonique, dilué de moitié par addition d'adjuvant de FREUND, avant d'être injecté à des lapins. On fait quatre à cinq injections successives toutes les semaines. Le sang est prélevé 10 jours après la dernière injection.

b) sérum dirigé contre une protéine

Ces sérums ont été obtenus par injections intradermiques soit de l'arc de précipité antigène-anticorps provenant de plaques d'immunoélectrophorèse bidimensionnelle (sérum anti-fibre de l'adénovirus 2 et de l'adénovirus 5, sérum anti-base du penton, sérum anti-hexon) ou de la protéine purifiée (sérum anti-fibre de l'adénovirus 2). En général, cinq injections à huit jours d'intervalle suffisent pour obtenir un sérum assez puissant.

c) sérum antipeptide

Les peptides N et C de la fibre ont été synthétisés en phase solide par la méthode de BARANY et MERRIFIELD (1980). Les peptides sont couplés à la toxine tétanique par le glutaraldéhyde. Les peptides couplés sont injectés à des lapins toutes les trois semaines. Une série de cinq injections a permis d'obtenir les sérums anti- C_{TT} et anti- N_{TT} .

2. Titrage par immunofluorescence

Les cellules Hep 2 sont infectées par 200 µl de suspension virale de plus en plus diluée. 40 h après infection, les cellules sont fixées par une solution de méthanol/PBS (95 : 5 V/V). Après plusieurs lavages dans le tampon PBS, on incube les cellules avec du sérum anti-virus total dilué au centième pendant 30 min. Après plusieurs lavages à l'eau physiologique, on révèle les cellules infectées liées aux anticorps anti-virus par un sérum fluorescent de chèvre anti-immunoglobulines de lapin. La lecture des cellules infectées se fait sous microscope en lumière ultra-violette.

3. Immunoprécipitation par <u>Staphylococcus aureus</u>

La technique a été décrite par CRAWFORD et LANE (1977). Le complexe antigène-anticorps est adsorbé sur la protéine A de <u>S. aureus</u>. 10 μ l de la solution d'antigène sont incubés, pendant une nuit, à 4° C, avec 10 μ l d'immunsérum et 75 μ l d'une solution de NET-N (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Nonidet P.40 0,05 %, sérum albumine bovine à 1 mg/ml).

Le complexe antigène-anticorps est piégé par 10 µl de suspension de <u>Staphylococcus aureus</u>, une demi-heure à température ambiante. Le précipité est lavé, repris par du tampon dénaturant et analysé sur gel de polycrylamide-SDS.

4. Immunotransfert

Le transfert se fait par électrophorèse (voir techniques électrophorétiques). La feuille de nitrocellulose est saturée en lait (lait 5 % en tampon Tris salin : 10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl), à 45° C pendant 1 h. Le tampon est alors renouvelé et le sérum est ajouté, après dilution variant du 1/1000 au 1/200 suivant indication, pour un temps d'incubation minimum d'une heure et demie, à température ambiante. Le transfert est lavé quatre fois 10 min, par du tampon Tris-salin, deux des lavages comportent du tween 0,05 % et du NP-40 0,05 %. Les anticorps fixés sur la feuille de nitro-cellulose sont révélés par des anticorps anti-lapin marqués à la peroxydase ou bien par la protéine A marquée à la (35 S)-méthionine (Amersham).

5. Test ELISA

Les tests ELISA sont faits sur des micro-plaques ELISA (DYNATECH). 1 μ g de peptide ou 5 μ g d'antigéne sont dilués dans un mi de tampon PBS (150 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HP0₄, 15 mM KH₂PO₄, 0,5 mM MgCl₂, 6H₂O, 1 mM CaCl₂ pH 7,2). 100 μ g de ces dilutions sont ajoutés par puits, et laissés pour adsorption pendant une nuit.

Les plaques sont lavées deux fois avec du PBS, puis saturées avec de la sérum albumine bovine (2 %) dans le tampon PBS, pendant 30 min à 37° C. L'incubation avec le sérum dilué dure 2 h à 37° C. Après trois lavages, 100 µl d'immunoglobulines de chèvre anti-lapin marquées à la peroxydase et dilués au millième sont ajoutés par puits. Le substrat pour la peroxydase est préparé en mélangeant 0,75 mg d'orthophénylène diamine dans 25 ml de tampon

phosphate-citrate (100 mM sodium citrate, 100 mM phosphate disodique dans le rapport 2 volumes/5 volumes) et 20 μ l d'eau oxygénée. 100 μ l de cette préparation sont ajoutés par puits. La réaction est arrêtée par addition de 100 μ l d'acide chlorydrique IN.

Quand la spécificité du sérum est testée par compétition entre la fibre et les peptides, la fibre est adsorbée sur la boîte et le sérum est d'abord incubé avec le peptide avant son addition dans le puits.

J- Techniques génétiques

1- Clonage

Le fragment de DNA <u>Eco</u> RI est inséré dans le plasmide pBR 328 (coupé <u>Eco</u> RI), le fragment <u>Hind</u> III F dans le plasmide pBR 322 (coupé par Hind III).

La transfection d'une souche <u>E. coli</u> par les plasmides se fait par méthode de précipitation au phosphate de calcium. La sélection des clones ayant intégré les plasmides contenant l'insert se fait par sensibilité aux antibiotiques. Les plasmides pBR 328 qui ont inséré <u>Eco</u> RI E ont perdu le gène de résistance au chloramphénicol. Les plasmides pBR 322 qui ont inséré <u>Hind</u> III F ont perdu le gène de résistance à la tétracycline. Dans les deux cas, les plasmides conservent leur résistance à l'ampicilline.

2. Séquençage

Le clonage permet d'obtenir en grande quantité le matériel à séquencer. Le fragment <u>Eco</u> RI E est coupé par <u>Alu</u> I et <u>Hha</u> I. Le fragment <u>Hind</u> III est coupé par <u>Hinf</u> I. Les fragments sont marqués en 5' par addition de ATP- δ -(³²P) et de polynucléotide kinase. La méthode de séquençage utilisée est celle de MAXAM et GILBERT (1980).

3. Analyse des mRNA à la nucléase S1

L'analyse à la nucléase S1 se fait selon la méhtode de BERK et SHARP (1978). Les mRNA cytoplasmiques poly A^+ de cellules infectées par le

virus de type sauvage ou par le mutant sont mis à hybrider avec le brin r des fragments de DNA <u>Eco</u> RI E/<u>Hha</u> I 6 ou avec un fragment <u>Hind</u> III F/<u>Hinf</u> I 4.

Les fragments sont marqués sur l'extrémité 5'. Les hybrides sont traités à la nucléase S1 et analysés en gel de polyacrylamide de 4,5 ou 5 % (rapport acrylamide/bis acrylamide : 29 : 1).

4. Méthode de sauvetage d'une mutation

La méthode a été décrite par FROST et WILLIAMS (1978). Les cellules 36 293 sont transfectées par la méthode de précipitation au phosphate de calcium par le mélange d'un fragment de DNA du virus de type sauvage (\underline{Eco} RI E, \underline{Eco} R I C, \underline{Xho} I B) avec le DNA du mutant H2 \underline{ts} 125 lié à sa protéine terminale. Les cellules sont alors placées à 39° C pour sélectionner les virus qui ont perdu leur critère de thermosensibilité par recombinaison avec le fragment du virus de type sauvage.

K- Microscopie électronique

Les échantillons sont colorés en formiate d'uranyl 1 %, tamponné avec du cacodylate de sodium 0,1 N, pH 7, 0, et examinés dans un microscope électronique Hitachi HU 12. Les mesures de longueur des fibres Fwt et F125 ont été faites en utilisant un analyseur d'image quantitatif MOP/AMO1 (Kontron Messgeräte), sur des molécules de penton.elles correspondent à la distance entre le point d'ancrage de la fibre dans la base du penton et l'extrémité de la sphérule.Le grossissement final est de 195000. Plus de 200 mesures ont été faites (221 pour la fibre Fwt et 235 pour la fibre F125), sur des molécules choisies dans 7 ou 8 clichés différents.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ABID, S., and KHOOBYARIAN, N., 1976. Inhibition of murine sarcoma virus induced transformation by adenovirus structural proteins. J. Gen. Virol., 31, 437-440.

ADRIAN, T., WIGAND, R., and HIERHOLZER, J.C., 1985. Immunological and biochemical characterization of human adenovirus from subgenus B. II- DNA restriction analysis. Archives of Virology, 84, 79-89.

AKUSJARVI, G., and PERSSON, H., 1981. Gene and mRNA precursor for polypeptide VI from adenovirus type 2. J. Virol., <u>38</u>, 469-482.

AKUSJARVI, G., PETTERSSON, U., and ROBERTS, R.J. 1986. Structure and function of the adenovirus-2 genome. Adenovirus DNA. The viral genome and its expression, pp. 53-97, ed. par W. Doerfler, Martinus Hijhall publishing.

AKUSJARVI, G., PHILIPSON, L., and PETTERSSON, U. 1978. A protein kinase associated with adenovirus type 2. <u>Virology</u>, <u>87</u>, 276-286.

AKUSJARVI, G., ZABIELSKI, J., PERRICAUDET, M., and PETTERSSON, U., 1981. The sequence of the 3' non-coding region of the hexon mRNA discloses a novel adenovirus gene. Nucl. Acid. Res., 9, 1-9.

ALESTROM, P., AKUSJARVI, G., PERRICAUDET, M., MATHEWS, M.B., KLESSIG, D.F., and PETTERSSON, U., 1980. The gene for polypeptide IX of adenovirus type 2 and its unspliced messenger RNA.

Cell, 19, 671-681.

- 191 -

ANDERSON, K.P., and KLESSIG, D.F., 1984.

Altered mRNA splicing in monkey cells abortively infected with human adenovirus may be responsible for inefficient synthesis of the virion fiber polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4023-4027.

ANDERSON, C.W., BAUM, P.R. and GESTELAND, R.F., 1973. Processing of adenovirus 2 induced proteins. J. Viroi., 12, 241-252.

ANDERSON, K.P., WONG, E.A., and KLESSIG, D.F., 1985. Microinjection of mRNA enhances translational efficiency of human adenovirus fiber message in monkey cells. Mol. Cell. Biol., <u>5</u>, 2870-2873.

ARISAKA, F., TSCHOPP, J., VAN DRIEL, R., and ENGEL, J., 1979. Reassembly of the bacteriophage T4 tail from the core-baseplate and the monomeric sheath protein P18 : a co-operative association process. J. Mol. Biol., 132, 369-386.

AUBORN, K., and ROUSE, H., 1984. The mechanism of the arginine dependent function in adenovirus type-2 infected cells : late viral polypeptides are under-acetylated. <u>Virus Res.</u>, <u>1</u>, 615-624.

BABICH, A., and NEVINS, J.R., 1981. The stability of early adenoviruses mRNA is controlled by the viral 72 Kd DNA binding protein. Cell, 26, 371-379.

BARANY, G., and MERRIFIELD, R.B., 1980. Solid-phase peptide synthesis. The peptides, Vol. 2, pp1-284, E. Gross and J. Meienhofer eds. Academic press inc. New York.

BELIN, M.T., and BOULANGER, P. 1985. Cytoskeletal proteins associated with intracytoplasmic human adenovirus at an early stage of infection. Exp. Cell. Res., 160, 356-370. BERGER, J., BURNETT, R.M., and FRANKLIN, R.M., 1978. Small angle X-ray scattering studies on adenovirus type 2 hexon. Biochim. Biophys. Acta, 535, 233-240.

BERGET, S.M., MOORE, C., and SHARP, P.A., 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3171-3175.

BERK, A.J., and SHARP, P.A., 1978. Structure of adenovirus 2 early mRNAs. Cell, 14, 695-711.

BERK, A.J., LEE, F., HARRISON, T., WILLIAMS, J. and SHARP, P.A., 1979. Pre-early adenovirus 5 gene products regulate transcription and processing of early viral messenger RNAs. Cell, 17, 935-944.

BERKNER, K., and SHARP, P., 1985. Effect of the tripartite leader on synthesis of a non viral protein in an adenovirus 5 recombinant. Nucl. Acid. Res., <u>13</u>, 841-857.

BERNARDS, R., and van der EB, A.J., 1984. Adenovirus : transformation and oncogenicity. Biochem. Biophys. acta., 783, 187-204.

BHATTI, A.R., and WEBER, J. 1979. Protease of adenovirus type 2 : Partial characterization. Virology, 96, 478-487.

BLACK, D.L., CHABOT, B., and STEITZ, J.A., 1985. U2 as well as U1 small nuclear ribonucleoproteins are involved in premessenger RNA splicing. Cell, 42, 737-750.

BLAIR, G.E., and RUSSEL, W.C., 1978. Identification of a protein kinase activity associated with human adenoviruses. Virology, 86, 157-166. BOUDIN, M.L., D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., and BOULANGER, P., 1980. Human adenovirus type 2 protein IIIa - II - Maturation and encapsidation. Virology, 101, 144-156.

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 HENNACHE, B. 1973. Adenovirus uncoating : an additional evidence for the involvement of cell surface in capsid labilization. Febs Letters, 35, 15-18.

BOULANGER, P., and LOUCHEUX, M.H. 1972. Conformational study of adenovirus type 2 hexon and fiber antigens. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 194-201.

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.A., and PUVION, F., 1974. Adenovirus assembly : Cross-linking of adenovirus type 2 hexons in vitro. Eur. J. Biochem., 43 465-470.

BOULANGER, P., DEVAUX, C., and LEMAY, P., 1978. Isolation and characterization of a slow-migrating class of adenovirus type 2 hexon. 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.

BROWN, M., and WEBER, J., 1982.Discrete subgenomic incomplete particles of adenovirus type 2.J. Gen. Virol., 62, 81-89.

BROWN, D.T., WESTPHAL, M., BURLINGHAM, B.T., WINTERHOF, U., and DOERFLER, W., 1975. Structure and composition of adenovirus type 2 core. J. Virol., 16, 366-387.

BURNETT, R., 1985.

The structure of the adenovirus capsid. II. The packing symmetry of hexon and its implications for viral architecture. J. Mol. Biol., 185, 125-143.

BURNETT, R.M., GRUTTER, M.G., MARKOVIC, Z., and WHITE, J.L., 1979 The molecular envelope of adenovirus type 2 hexon and its interactions in the viral capsid.

J. Supramol. Struct. Suppl., 3, 92-99.

BUSETTA, B., and HOSPITAL, M., 1982. An analysis of the prediction of secondary structures. Biochim. Biophys. Acta., 701, 111-118.

CARLSEN, J., and CRISTIANSEN, K. (1985). Use of carboxypeptidase Y in studies of the mode of insertion of cytochrom b5 into lipid vesicles. Anal. Biochem., 148, 542-545.

CARLSON, D.P., and RASKAS H.J., 1980. Structure and metabolism of adenovirus RNAs containing sequences from the fiber gene. J. Mol. Biol., 141, 249-265.

CEPKO, C.L., and SHARP, P.A., 1983. Aberrant distribution of human adenovirus type 2 late proteins in monkey kidney cells. J. Virol., <u>46</u>, 302-306.

CHARDONNET, Y., and DALES, S., 1970. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. Virology, 40, 462-477. CHATTERJEE, P.K., VAYDA, M.E., and FLINT, S.J., 1985. Interactions among the three adenovirus core proteins. J. Virol., 55, 379-386.

CHATTERJEE, P.K., VAYDA, M.E., and FLINT, S.J., 1986. Identification of proteins and protein domains that contact DNA within adenovirus nucleoprotein cores by ultra-violet light crosslinking of oligonucleotides ³²P-labelled in vivo. J. Mol. Biol., 188, 23-37.

CHENG CHEE SEUNG, C., and GINSBERG, H.S., 1982. Characterization of a temperature sensitive fiber mutant of type 5 adenovirus and effect of the mutation on virion assembly. J. Virol., 42, 932-950.

CHOU, P.Y., and FASMAN, G.D., 1978. Empirical predictions of protein conformation. Ann. Rev. Biochem., 47, 251-276.

CHOW, L.T., and BROKER, T.R., 1978. The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late mRNAs. Cell, 15, 497-510.

CHOW, L.T., BROKER, T.R., and LEWIS, J.B., 1979. Complex splicing patterns of RNAs from the early regions of adenovirus 2. J. Mol. Biol., 134, 265-303.

CHOW, L.T., GELINAS, R., BROKER, T., and ROBERTS, R., 1977. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA.

<u>Cell</u>, <u>12</u>, 1-8

CID, H., BUNSTER, M., ARIAGADA, E., and CAMPOS, M., 1982. Prediction of secondary structure of proteins by means of hydrophobicity profiles. <u>FEBS Letters</u>, <u>150</u>, 247-254. CLEGG, J.C.S., CHANAS, A.C., and GOULD, E.R., 1983. Conformational changes in sindbis virus E1 glycoprotein induced by monoclonal antibody binding.

J. Gen. Virol., 64, 1121-1126.

COLBY, W.W., and SHENK, T., 1981. Adenovirus type 5 virions can be assembled in vivo in the absence of detectable polypeptide IX. J. Virol., 39, 977-980.

CORDEN, J., ENGELKING, M., and PEARSON, G.D., 1976. Chromatin-like organization of the adenovirus chromosome. Proc. Natl. Acad. Sci., 73, 401-404.

DALES, S., and CHARDONNET, Y., 1973. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement of the inoculum. Virology, 56, 465-483.

DAYHOFF, M.O. 1969. Atlas of protein sequence and structure. Vol. 4 published by the National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, M.d.

DELSERT, C., 1985. Permissivité et hiérarchie de transdominance intersérotypique dans le système adénovirus humain – cellules simiennes. Thèse de 3ème cycle.

DELSERT, C., and D'HALLUIN, J.C., 1984. Genetic expression of human adenoviruses in simian cells. Evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis. Virus Res., 1, 365-380.

DEVAUX, C., and BOULANGER, P.A., 1980. Reactive serine in human adenovirus hexon polypeptide. Virology, 102, 94-106. DEVAUX, C., BERTHET-COLOMINAS, C., TIMMINS, P.A., BOULANGER, P., and JACROT, B., 1984. Crystal packing and stoichiometry of the fibre protein of adenovirus type 2. J. Mol. Biol., 174, 729-737.

DEVAUX, C., TIMMINS, P.A., and BERTHET-COLOMINAS, C., 1983. Structural studies of adenovirus type 2 by neutron and X-ray scattering. J. Mol. Biol., 166, 119-132.

DEVAUX, C., ZULAUF, M., BOULANGER, P., and JACROT, B., 1982. Molecular weight of adenovirus serotype 2 capsomers : a new characterisation. J. Mol. Biol., 156, 927-939.

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 particles. J. Virol., 26, 344-357.

D'HALLUIN, J.C., MARTIN, G.R., TORPIER, G., and BOULANGER, P.A., 1978b. Adenovirus type 2 assembly analysed by reversible cross-linking of labile intermediates. J. Virol., 26, 344-363.

D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M., and BOULANGER, P., 1980. Effect of novobiocin on adenovirus DNA synthesis and encapsidation. Nucl. Acid. Res., 8, 1625–1641.

D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M., MARTIN, G.R., and BOULANGER, P., 1980. Morphogenesis of human adenovirus type 2 studied with fiber and fiber and penton base defective temperature-sensitive mutants. J. Virol., 33, 88-99.

DUNN, A.R., MATHEWS, M.B., CHOW, L.T., and SAMBROOK, J., 1978. A supplementary adenoviral leader sequence and its role in messenger translation. Cell, 15, 511-526.

EDVARDSSON, B., EVERITT, E., JORNVALL, H., PRAGE, L., and PHILIPSON, L., 1976. Intermediates in adenovirus assembly. J. Virol., 19, 533-547.

EVERITT, E., and PHILIPSON, L., 1974. Structural proteins of adenovirus. 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., LUTTER, L., and PHILIPSON, L., 1975. Structural proteins of adenovirus. 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., SUNDQUIST, B., PETTERSSON, 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.

EVERITT, E., SUNDQUIST, B., and PHILIPSON, L., 1971. Mechanism of arginine requirement for adenovirus synthesis. I. Synthesis of structural proteins.

J. Virol., 8, 742-753.

FEDOR, M.J., and DANIELL, ., 1980. Acetylation of histone like proteins of adenovirus type 5. J. virol., 35, 637-643.

FIFE, K.H., ASHLEY, R., and COREY, L., 1985. Isolation and characterization of six new genome types of human Ad. type 1 and 2.

J. Clin. Microbiol., 21, 20-23.

FITZGERALD, D., PADMANABHAN, R., PASTAN, I., and WILLINGHAM, M., 1983. Adenovirus-induced release of epidermal growth factor and pseudomonas toxin into the cytosol of KB cells during receptor-mediated endocytosis. <u>Cell</u>, <u>32</u>, 607-617.

FROST, E., and WILLIAMS, J., 1978. Mapping temperature sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5 by marker rescue. Virology, 91, 39-50.

FULLER, M.T., and KING, J., 1980. Regulation of coat protein polymerization by the scaffolding protein of bacteriophage P22. Biophys. J., 10, 381-401.

GALIBERT, F., HERISSE, J., and COURTOIS, G., 1979. Nucleotide sequence of the Eco RI F fragment of adenovirus 2 genome. Gene, 6, 1-22.

GARON, C.F., BERRY, K.W., and ROSE, J.F., 1972. A unique form of terminal redundancy in adenovirus DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2391-2395.

GELDERBLOM, H. and MAICHLE-LAUPPE, I., 1982. The fiber of fowl adenoviruses. Arch. Virol., 72, 289-298.

GELINAS, R.E., and ROBERTS, R., 1977. One predominant 5' undecanucleotide in adenovirus 2 late messenger RNAs. Cell, 11, 533-544.

GIBSON, M., TIENSIWAKUZ, P., and KHOOBYARIAN, N., 1982. Adenovirus fiber protein functions as a mitogen and an adjuvant. Cell Immunol. 73, 397-403. 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.

GODING, C., JALINOT, P., ZAJCHOWSKI, D., BOEUF, H., and KEDINGER, C., 1985. Sequence-specific trans-activation of the adenovirus Ella early promoter by the viral EIV transcription unit. EMBO J., 4, 1523-1528.

GOLDENBERG, D.F., and CREIGHTON, T.E., 1984. Gel electrophoresis in studies of protein conformation and folding. Anal. Biochem., 138, 1-18.

GRAHAM, F.L., 1984. Transformation by an oncogenicity of human adenoviruses. The Adenoviruses, pp339-382, Ginsberg Ed., Plenum Press.

GREEN, M., MACKEY, J.K., WOL, W., and RIGDEN, P., 1979. Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-Ad31 form five groups (A-E) based on upon DNA genome homologies. <u>Virology</u>, <u>93</u>, 481-492.

GREEN, N.M., WRIGLEY, N.G., RUSSEL, W.C., MARTIN, S.R., and Mc LACHLAN, A.D., 1983. Evidence for a repeating cross β sheet structure in the adenovirus fibre. EMBO J., 2, 1357-1365.

GUGGENHEIMER, R.A., STILLMAN, B.W., NAGATA, K., TAMANOI, F., and HURTWITZ, J. (1984). DNA sequences required for the <u>in vitro</u> replication of adenovirus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, <u>81</u>, 3069-3073.

HALBERT, D.N., CUTT, J.R., and SHENK, T., 1985. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shut-off. J. Virol., <u>56</u>, 250-257. HAMMARSKJOLD, M.L., and WINBERG, G., 1980. Encapsidation of adenovirus 16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end of the genome. Cell, 20, 787-795.

HANDA, H., KINGSTON, R.E., and SHARP, P.A., 1983. Inhibition of adenovirus early region 4 transcription in vitro by a purified viral DNA binding protein. <u>Nature</u>, <u>302</u>, 545-547.

HASSELL, J.A., and WEBER, J., 1978. Genetic analyses of adenovirus type 2. VIII. Physical locations of temperature sensitive mutations. J. Virol., 28, 671-678.

HECHT, M.H., STURTEVANT, J.M., and SAUER, R.T., 1984. Effect of single amino acid replacement on the thermal stability of the NH2-terminal domain of phage repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5685-5689.

HENNACHE, B., and BOULANGER, P., 1977. Biochemical study of KB-cell receptor for adenovirus. Biochem J., 166, 237-247.

HENNACHE, B., TORPIER, G., and BOULANGER, P., 1979. Freeze-fracture study of adenovirus-induced KB cell surface alterations. Exp. Cell Res., 124, 139-150.

HENNACHE, B., TORPIER, G., and BOULANGER, P., 1982. Adenovirus adsorption and sterol redistribution in KB cell plasma membrane. Exp. Cell Res., 137, 459-463.

HERISSE, J., and GALIBERT, F., 1981. Nucleotide sequence of the EcoRI E fragment of adenovirus 2 genome. <u>Nucl. Acid. Res.</u>, 9, 1229–1240.

HERISSE, J., COURTOIS, G., and GALIBERT, F., 1980. Nucleotide sequence of the EcoRI D fragment of adenovirus 2 genome. Nucle. Acid. Res., 8, 2173-2191. HOEFFLER, W.K., and ROEDER, R.G., 1985. Enhancement of RNA polymerase III transcription by the EIA gene product of adenovirus. Cell, 41, 955-963.

HOLT, G.D., and HART, G.W., 1986. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-sacchararide linkage, O-linked glcNAC. J. Biol. Chem., 261, 8049-8057.

HORNE, R.W., BRENNER, S., WATERSON, A.P., and WILDY, P., 1959. The icosahedral form of an adenovirus. J. Mol. Biol., 1, 84-86.

HORWITZ, M.S., SCHARFF, M.D., and MAIZEL, J.V., Jr., 1969. Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomers and morphogenesis of the virion. Virology, 39, 682-694.

HOSOKAWA, K., and SUNG, M.T., 1976. Isolation and characterisation of an extremely basic protein from adenovirus type 5. J. Virol., <u>17</u>, 924-934.

HUEBNER, R.J., 1967. Adenovirus-directed tumor and T antigens. Pollard M. (ed.) Perspectives in Virology, 5, 147-166.

HUEBNER, R.J., CASEY, M.J., CHANNOCK, R.M. and SCHEEL, K., 1965. Tumors induced in hamsters by a strain of adenovirus type 3 : sharing of tumorantigens and neoantigens with those produced by adenovirus type 7 tumors.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 54, 381-388.

ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J.V., 1974a. The polypeptides of adenovirus. VI. The early and late glycopeptide. Virology, 58, 345-361. ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J.V., 1974b. The polypeptides of adenovirus. V. Young virions, structural intermediates between top components and aged virions. Virology, 57, 409-424.

JONES, N.C., 1986. Genetic elements governing adenoviral gene expression. Adenovirus DNA, The viral genome and its expression, pp161-193. W. DOERFLER ed. Martinus NIJHOFF publishing.

JONES, N., and SHENK, T., 1979. An adenovirus type 5 early gene function regulates expression of other early viral genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., <u>76</u>, 3665-3669.

JORNVALL, H., AKUSJARVI, G., ALESTROM, P., VAN BAHR-LINDSTROM, H., PETTERSON, U., APELLA, E., FOWLER, A.V., and PHILIPSON, L., 1981. The adenovirus hexon protein : the primary structure of the polypeptide and its correlation with the hexon gene. J. Biol. Chem., 256, 6181-6186.

JORNVALL, H., OHLSSON, H., and PHILIPSON, L., 1974a. An acetylated N-terminus of adenovirus 2 hexon protein. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 304-310.

JORNVALL, H., PETTERSON, U., and PHILIPSON, L., 1974b. Structural studies of adenovirus type 2 hexon protein. Eur. J. Biochem., 48, 179-192.

KAUFMAN, R.S., and GINSBERG, H.S., 1976. Characterization of a temperature-sensitive, hexon transport mutant of type 5 adenovirus. Virology, 19, 643-650.

KEDINGER, C., BRISON, O., PERRIN, F., WILHELM, J., 1978. Structural analysis of replicative intermediates from adenovirus type 2 infected HeLa cell nuclei.

J. Virol., 26, 364-379.

KEOHAVONG, P., GATTONI, R., Le MOULLEC, J.M., JACOB, M., STEVENIN, J., 1982. The orderly splicing of the first three leaders of the adenovirus-2 major late transcript. Nucl. Acid. Res., 10, 1215-1229.

KHITOO, G., DELORME, L., DERYC, U., TREMBLAY, M., WEBER, J.,
BIBOR-HARDY, V., and SIMARD, R., 1986.
Role of the nuclear matrix in adenovirus maturation.
Virus research., 05, 391-403.

KINLOCH, R., MACKAY, N., and MAUTNER, V., 1984. Adenovirus hexon-sequence comparison of subgroup C serotypes 2 and 5. J. Biol. Chem., 259, 6431-6436.

KLESSIG, D.F., and CHOW, L.T., 1980. Incomplete splicing and deficient accumulation of the fiber messenger RNA in monkey cells infected by human adenovirus type 2. J. Mol. Biol., 139, 221-242.

KOSTURKO, L., and VANECH, M., 1986. In vitro encapsidation of plasmid DNA into human adenovirus empty capsids. Virus Research., 6, 123-132.

KRAINER, A.R., and MANIATIS, T., 1985. Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for pre-mRNA splicing <u>in vitro</u>. Cell, 42, 725-736.

KYTE, J. and DOOLITTLE, R.F., 1982.A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.J. Mol. Biol., 157, 105-132.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; <u>Nature</u>, <u>227</u>, 680-685. LAVER, W.G., PEREIRA, H.G., RUSSEL, W.C., and VALENTINE, R.C., 1968. Isolation of an internal component from particles of adenovirus type 2. J. Mol. Biol., 37, 379-386.

LAVER, W.G., WRIGLEY, H.G., and PEREIRA, H.G., 1969. Removal of pentons from particles of adenovirus type 2. Virology, 39, 599-605.

LAWRENCE, W.C., and GINSBERG, H.S., 1967. Intracellular uncoating of type 5 adenovirus deoxyribonucleic acid. J. Virol., 1, 851-867.

LAWRENCE, C.B., and RAMSEY, W.J., 1982. Adenovirus type 2 fiber mRNA synthesis : no evidence for a cytoplasmic processing pathway. J. Virol., <u>44</u>, 226-234.

LECHNER, R.L., and KELLY, T.J., 1977. The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. Cell, 12, 1007-1020.

LEE, H.M., and RIORDON, J.F. (1978). Does carboxypeptidase Y have intrinsic endopeptidase activity ? Biochem. Biophys. Res. Comm., 85, 1135-1142.

LEMAY, P., and BOULANGER, P., 1980. Physiochemical characteristics of structural and non structural proteins of human adenovirus 2. Ann. Virol. 131, 259-275.

LEMAY, P., BOUDIN, M.L., MILLEVILLE, M., and BOULANGER, P., 1980. Human adenovirus type 2 protein IIIa- I. Purification and characterization. Virology, 101, 131-143.

LERNER, M.R., BOYLE, J.A., MOUNT, S.M., WOLIN, S.L., and STEITZ, J.M., 1980. Are Sn RNPs involved in splicing ? Nature, 283, 220-224. LEVINE, A.J., and GINSBERG, H.S., 1967. Mechanism by which fiber antigen inhibits multiplication of type 5 adenovirus. J. Virol 1, 747-757.

LEVINE, A.J., and GINSBERG, H.S., 1968. Role of adenovirus structural proteins in the cesation of host cell biosynthetic functions. J. Virol., 2, 430-439.

LAURELL, C.B., 1965. Antigen- antibody crossed immuno-electophoresis. Anal. Biochem., 10, 358-361.

LIANG, Y.K., AKUSJARVI, G., ALESTROM, P., PETTERSSON, U., TREMBLAY, M., and WEBER, J., 1983. Genetic identification of an endoproteinase encoded by the adenovirus genome. J. Mol. Biol., 57, 217-222.

LISCHWE, M.A., and SUNG, M.T., 1977. A histone like protein from adenovirus chromatine. Nature, 267, 552-554.

LIU, G.Q., BABISS, L.E., VOLKERT, F.C., YOUNG, C.S.H., and GINSBERG, G.S., 1985. A thermolabile mutant of adenovirus 5 resulting from a substitution mutation in the protein VIII gene. J. Virol., 53, 920-925.

LOGAN, J., and SHENK, T., 1985. Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 3655-3659.

LONDBERG-HOLM, K. and PHILIPSON, L., 1969. Early events of virus-cell interaction in an adenovirus system. J. Virol. 4, 323-338.

LONDBERG-HOLM, K., and PHILIPSON, L., 1974. Early interaction between animal viruses and cells. Monog. Virol., 9, 1-148. LONG, W., and KHOOBYARIAN, N., 1973.

Effect of adenovirus soluble antigens on virus synthesis and transformation in diploid cells.

J. Natl. Cancer inst., 51, 1527-1533.

LYON, M., CHARDONNET, Y., and DALES, S., 1978. Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. V. Polypeptides associated with the penetrating inoculum. <u>Virology</u>, <u>87</u>, 81-88.

MAIZEL, J.V., WHITE, D.O., and SCHARFF, M.D., 1968. The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, core, top components and the structure of the virion. <u>Virology</u>, <u>36</u>, 126-136.

MANLEY, J.L., SHARP, P.A., and GEFTER, M.L., 1979. RNA synthesis in isolated nuclei : identification and comparison of Ad2 encoded transcripts synthesized in vitro and in vivo. J. Mol. Biol., 135, 171-197.

MANLEY, J.L., SHARP, P.A., and GEFTER, M.L., 1982. RNA synthesis in isolated nuclei : processing of adenovirus 2 late mRNA precursor. J. Mol. Biol., 159, 581-599.

MARIMAN, E., VAN BEEK-REINDERS, R.J., and VAN VENROOIJ, W.J., 1983. Alternative splicing pathway exist in the formation of adenoviral late messenger RNAs.

J. Mol. Biol., 163, 239-256.

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.

MAUTNER, V., and PEREIRA, H.G., 1971. Crystallisation of a second adenovirus protein (the fiber). <u>Nature</u> (London), <u>230</u>, 456-457. MAXAM, A.M., and GILBERT, W., 1980. Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages. Methods in enzymol., 65, 499-559.

MEAGER, A., BUTTERS, J.D., MAUTNER, V., and HUGHES, R.C., 1976. Interactions of KB-cell glycoprotein with an adenovirus capsid protein. Eur. J. Biochem., 61, 345-353.

MEYER, J., NEUWALD, P.D., LAI, S.P., MAIZEL, J.V., and WESTPHAL, H., 1977. Electron microscopy of late adenovirus type 2 mRNA hybridized to double-stranded viral DNA. J. Virol., 21, 1010-1018.

MICHALSKI, J.C., PETER-KATALINI, J.P., EGGE, H., PAZ-PARENT, J., MONTREUIL, J., and STREKER, G. (1984). Behavior of the 2-acetamido-2-deoxy- -D-glucopyrannosyl residue during sequential hydrazinolysis, N-reacetylation, reduction and methylation of glycoasparagines. Carbohydr. Res., 134, 177-189.

MILLER, S.J., RICCIARDI, R.P., ROBERTS, B.E., PATERSON, B.M., and MATHEWS, M.B., 1980. Arrangement of messenger RNAs and protein coding sequences in the major late transcription unit of adenovirus 2. J. Mol. Biol., 142, 455-488.

MIRZA, M.A., and WEBER, J., 1979. Uncoating of adenovirus type 2. J. Virol., 30, 462-471.

MIRZA, M.A., and WEBER, J., 1982. Structure of adenovirus chromatin. Biochim. Biophys. Acta., 696, 76-86.

MONCANY, M., REVET, B., and GIRARD, M., 1980. Characterization of a new adenovirus type 5 assembly intermediate. J. Gen. Virol., 50, 33-47. MONTREUIL, J., 1982. Glycoproteins, <u>Comprehensive Biochemistry</u>, Neuberger A., Van Deenen L., eds Elsevier, Amsterdam, Vol. 19B (II), 1-188.

MORIN, N., and BOULANGER, P., 1984. Morphogenesis of human type 2 : sequence of entry of proteins into previral and viral particles. Virol., 136, 153-167.

MORIN, N., and BOULANGER, P., 1986. Hexon trimerization occuring in an assembly-defective, 100 K temperature sensitive mutant of adenovirus 2. <u>Virol.</u>, <u>152</u>, 11-31.

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A., ENOMOTO, T., LICHY, J.H., and HURTWITZ, J., 1982. Adenovirus DNA replication in vitro : identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6438-6442.

NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A., and HURWITZ, J., 1983. Adenovirus DNA replication in vitro : synthesis of full length DNA with purified proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4266-4270.

NATARAJAN, V., MADDEN, M.J., and SALZMAN, N.P., 1984. Proximal and distal domains that control in vitro transcription of the adenovirus IVa₂ gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6290-6294.

NERMUT, M.V., 1978. Structural elements in adenovirus cores : studies by means of freeze-fracturing and ultrathin sectioning. <u>Arch. Virol.</u>, <u>57</u>, 323.

NERMUT, M.V., 1979. Structural elements in adenovirus cores : evidence for a "core shell" and linear structures in "relaxed" cores. <u>Arch. Virol.</u>, <u>62</u>, 101-106. NERMUT, M.V., 1980. The architecture of adenoviruses : recent views and problems. Arch. Virol., 64, 175-190.

NERMUT, M.V., and PERKINS, W.J., 1979. Consideration of the three dimensional structure of the adenovirus hexon from electron microscopy and computer modeling. <u>Micron</u>, <u>10</u>, 247-260.

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.

NEVINS, J.R., and WRINKLER, J.J., 1980. Regulation of early adenovirus transcription : a protein product of early region 2 specifically repress region 4 transcription. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u>, <u>77</u>, 1893-1897.

NORRBY, E., 1966. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. I. Morphological characteristics. <u>Virology</u>, <u>28</u>, 236-246.

NORRBY, E., 1969. The structural and functional diversity of adenovirus capsid components. J. Gen. Virol., 5, 221.

NORRBY, E., and SKAARET, P., 1967.

The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. III. Immunological identification of fiber antigen and isolated vertex capsomer antigen.

Virology, 32, 489-502.

NORRBY, E., MARUSYK, H.L., and HAMMARSKJOLD, M.L., 1969. The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. V. Identification of antigen specificities available at the surface of virions. Virology, 38, 477-482. O'MALLEY, R.P., MARIANO, T.M., SIEKIERKA, J., and MATHEWS, M.B., 1986.
A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA-RNA I. <u>Cell</u>, <u>44</u>, 391-400.
OGIER, G., CHARDONNET, Y., and DOERFLER, W. 1977.
The fate of type 7 adenovirions in lysozomes of HeLa cells.
<u>Virology</u>, <u>77</u>, 66-77.
OOSTEROM-DRAGON, E.A., and CINSBERG, H.S., 1981.
Characterization of two temperature sensitive mutants of type 5 adenovirus with mutations in the 100 000 daltons protein gene.
<u>J. Virol.</u>, <u>40</u>, 491-500.

PADGETT, R.A., GRABOWSKI, P.J., KOWARSKA, M.M., and SHARP, P.A., 1985. Splicing messenger RNA precursors : branch sites and lariat RNAs. TIBS, 10, 154-157.

PEREIRA, H.G., and WRIGLEY, N.G., 1974. <u>In vitro</u> reconstitution, hexon-bonding and handleness of incomplete adenovirus capsid. J. Mol. Biol., 85, 617-631.

PERSSON, R., WOHLFART, C., SVENSSON, U., and EVERITT, E., 1985. Virus-receptor interaction in the adenovirus system : characterization of the positive cooperative binding of virions on HeLa cells. J. Virol., 54, 92-97.

PETTERSSON, U., 1984. Structural and non structural adenovirus proteins. In "The adenoviruses", pp205-270, eds. H.S. Ginsberg, Plenum Press, N.Y.

PETTERSSON, U., and HOGLUND, S., 1969. Structural protein of adenoviruses. III. Purification and characterization of the adenovirus type 2 penton antigen. Virology, 39, 90-106. PETTERSSON, U., and WADELL, G., 1985. Antigenic structure of the adenoviruses. Immunochemistry of viruses. The basis for serodiagnosis and vaccines, pp295-319, ed. M.H.V. van Reggenmortel, and A.R. Neurath Elsevier Sciences Publishers B.V.

PETTERSSON, U., PHILIPSON, L., and HOGLUND, S., 1968. Structural proteins of adenoviruses. II. Purification and characterization of the adenovirus type 2 fiber antigen. <u>Virology</u>, <u>35</u>, 204-215.

PINA, M., and GREEN, M., 1965. Biochemical studies on adenoviruses multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 447-451.

PHILIPSON, L., LONBERG-HOLM, K., and PETTERSSON, U., 1968. Virus receptor interaction in an adenovirus system. J. Virol., 2, 1064-1072.

PHILIPSON, L., and PETTERSSON, U., 1973. Structure and function of virion proteins of adenoviruses. Proc. Exp. Tumor Virus Res., 18, 2-45.

POLLARD, T., and COOPER, J., 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. Ann. Rev. Biochem., 55, 987-1037.

PRAGE, L., and PETTERSSON, U., 1971. Structural proteins of adenoviruses. III. Purification and properties of an arginine rich core protein from adenovirus type 2 and 3. <u>Virology</u>, <u>45</u>, 364-373.

PRAGE, L., PETTERSSON, U., HOGLUND, S., LONDBERG-HOLM, K., and PHILIPSON, L., 1970. Structural proteins of adenoviruses. IV. Sequential degradation of the adenovirus type 2 virion. <u>Virology</u>, 42, 341-358.
RAE, B.P., and ELLIOTT, R.M., 1986. Characterization of the mutation responsible for the electrophoretic mobility differences in the NS proteins of vesicular stomatitis virus new jersey complementation.

J. Gen. Virol., 67, 2635-2643.

REICHEL, P.A., MERRICK, W.C., SIEKIERKA, J., and MATHEWS, M.B., 1985. Regulation of a protein synthesis initiation factor by adenovirus-virus-associated RNA I. Nature, 313, 196-200.

REKOSH, D.M.K., RUSSEL, W.C., and BELLET, A.J.D., 1977. Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA. Cell, <u>11</u>, 283–295.

RICCIARDI, R.P., JONES, R.L., CEPKO, C.L., SHARP, P.A., and ROBERTS, B.E., 1981. Expression of early adenovirus genes requires a viral encoded acidic polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6121-6125.

RICHARDS, K.E., and WILLIAMS, R.C., 1976. Assembly of tobacco mosaic virus in vitro. Structure and assembly - Assembly of small RNA viruses - <u>Comprehensive</u> Virology, 6, 1-38, ed. H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner.

RIJNDERS, A.W.M., VAN BERGEN, B.G.M., VAN DER VLIET, P.C., and SUSSENBACH, J.S., 1983.

Specific binding of the adenovirus terminal protein precursor. DNA polymerase complex to the origin of DNA replication. Nucl. Acids Res., 11, 8777-8789.

RITTENHOUSE, J., and MARCUS, F., 1984. Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers. Annal. Biochem., 138, 442-448. ROBERTS, M.M., WHITE, J.L., GRUTTER, M.G., and BURNETT, R.M., 1986. Three dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. Sciences, 232, 1148-1151.

ROBINSON, A.J., YOUNGHUSBAND, H.B., and BELLET, A.J.D., 1973. A circular DNA protein complex from adenoviruses. <u>Virology</u>, <u>56</u>, 54-69.

ROSEN, L., 1960. A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. Am. J. Hyg., 71, 120-128.

ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROTT, R.H. and WARD, T.G., 1953. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids underoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 84, 570-573.

RUSSELL, W.C., and PRECIOUS, B., 1982. Nucleic acid binding propeties of adenovirus structural polypeptides. J. Gen. Virol., 63, 69-79.

RUSSEL, W.C., Mc INTOSH, K. and SKEHEL, J.J., 1971. The preparation and properties of adenoviruses cores. J. Gen. Virol., 11, 35-45.

SATO, K., and HOSOKAWA, K., 1981 The structure of adenovirus chromatin revealed by ultra-violet light-induced cross-linking. Biochim. Biophys. Res Commun., <u>101</u>, 1318-1323.

SCHNEIDER, R.J., WEINBERGER, G., and SHENK, T. 1984. Adenovirus VA-RNA facilitates the initiation of translation in virus infected cells.

<u>Cell</u>, <u>37</u>, 291-298.

SCHNEIDER, R.J., SAFER, B., MUNEMITSU, S.M., SAMUEL, C.E., and SHENK, T., 1985. Adenovirus VA-RNA I prevents phosphorylation of the eukaryotic initiation factor 2 alpha subunit subsequent to infection. Proc. Natl. Acad. Sci USA., 82, 4321-4325.

SETH, P., FITZGERALD, D., GINSBERG, H., WILLINGHAM, M.C., and PASTAN, I. 1984a. Evidence that the penton base of adenovirus is involved in potentiation of toxicity of pseudomonas exotoxin conjugated to epidermal growth factor. Mol. Cell. Biol., 4, 1528-1533.

SETH, P., FITZGERALD, D., WILLINGHAM, M.C., and PASTAN, I., 1984b. Role of a low-ph environment in adenovirus enhancement of the toxicity of a <u>pseudomonas</u> exotoxin epidermal growth factor conjugate. J. Virol, <u>51</u>, 650-655.

SETH, P., WILLINGHAM, M.C., and PASTAN, I., 1985. Binding of adenoviurs and its external proteins to triton X-114 dependence on pH.

J. Biol. Chem., 260, 14431-14434.

SHARP, P.A., 1986.
Analysis of splicing of mRNA precursors <u>in vitro</u>.
<u>DNA Tumor viruses</u>. Control of gene expression and replication, pp245-249,
Cancer Cells.Cold Spring Harbor Laboratory.

SIEKIERKA, J., MARIANO, T.M., REICHEL, P.A., and MATHEWS, M.B., 1985. Translational control by adenovirus : lack of virus-associated RNA I during adenovirus infection results in phosphorylation of initiation factor eIF-2 and inhibition of protein synthesis.

Proc. Naltl. Acad. Sci. USA., 82, 1959-1963.

SIGNAS, C., AKUSJARVI, G., and PETTERSON, U., 1985. Adenovirus 3 fiber polypeptide gene : implications for the structure of the fiber protein.

J. Virol., 53, 672-678.

SMITH, H.C., BEREZNEY, R., BREWSTER, J.M., and REKOSH, D., 1985. Properties of adenoviral DNA bound to the nuclear matrix. Biochem., 24, 1197-1202.

SMITH, K.O., GEHLE, W.D., and TROUSDALE, M.D., 1965. Architecture of the adenovirus capsid. J. Bacteriol., 90, 254-261.

SMITH, D.H., KEGLER, D.M., and ZIFF, E.B., 1985. Vector expression of Ad. type 5 E1a proteins : evidence for E1a antoregulation. Mol. Cell. Biol., 5, 2684-2686.

SODERLUND, H., PETTERSON, U., VENNSTROM, B., and PETTERSON, U., 1976. A new species of virus coded low molecular weight RNA from cell infected with Adenovirus 2. Cell, 7, 585-593.

SOLNICK, D., 1985. Alternative splicing caused by RNA secondary structure. Cell, 43, 667-676.

SPINDLER, K.R., ENG, C.Y., and BERK, A.J., 1985. An adenovirus early region 1A protein is required for maximal viral DNA replication in growth arrested human cells. J. Virol, <u>53</u>, 742-750.

STILLMAN, B.W., TOP, W.C., and ENGLER, J.A., 1982. Conserved sequences at the origin of adenovirus DNA replication. J. Virol, <u>44</u>, 530-537.

SUNDQUIST, B., EVERITT, E., PHILIPSON, L., and HOGLUND, S., 1973. Assembly of adenoviruses. J. Virol, 11, 449-459.

SUNG, T., CAO, T.M., MICHAEL, A., LISCHWE M.A., and COLEMAN, R.T., 1983. Molecular processing of adenovirus proteins. J. Biol. Chem., 258, 8266-8272. 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.

SUSSENBACH, J.S., 1967. Early events in the infection process of adenovirus type 5 in HeLa cells. Virology, 33, 567-574.

SUSSENBACH, J.S., and VAN DER VLIET, P.C. The mechanism of adenovirus DNA replication. <u>The molecular biology of adenovirus</u>. Current Topics in microbiology and immunology, <u>109</u>, pp53-75, ed. W. Doerfler Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokyo.

SVENSSON, U., 1985. Role of vesicles during adenovirus 2 internalization into HeLa cells. J. Virol, 55, 442-449.

SVENSSON, U., and AKUSJARVI, G., 1986. Defective RNA splicing in the absence of adenovirus-associated RNA I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 83, 4690-4694.

SVENSSON, U., and PERSSON, R., 1984. Entry of adenovirus 2 into HeLa cells. J. Virol., 51, 687-694.

SVENSSON, U., PERSSON, R., and EVERITT, E., 1981. Virus-receptor interaction in the adenovirus system : I. identification of virion attachment proteins of the HeLa cell plasma membrane. J. Virol., <u>38</u>, 70-81.

TABIN, C., BRADLEY, S.A., BARGMANN, C.I., WEINBERG, R.A., PAPAGEORGE, A.G., SCOLNICK, E.M., DHAR, R., LOWY, D.R., CHANG, E.H., 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. <u>Nature</u>, <u>300</u>, 143-149. THIMMAPAYA B., WEINBERGER, C., SCHNEIDER, R.J., and SHENK, T., 1982. Adenovirus VA I RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. Cell, 31, 543-551.

TIBBETTS, C., 1977. Viral DNA sequences from incomplete particles of human adenovirus type 7. Cell, 12, 243-249.

TIBBETTS, C., and GIAM, C.Z., 1979. <u>In vitro</u> association of empty adenovirus capsids with double-stranded DNA. J. Virol., 32, 995-1005.

TIENSIWAKUL, P., and KHOOBYARIAN, N., 1983. Adenovirus fiber protein produces synthesis of interferon in mouse spleen and macrophage cultures. Intervirology, 20, 52-55.

TINDALL, S.H., and AUNE, K.C., 1981. Assessment by sedimentation equilibrium analysis of a heterologous macromolecules interaction in the presence of self-association : interaction of S5 with S8. Biochem., 20, 4861-4866.

TORRES, C.R., and HART, G. 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked glcNAC. J. Biol. Chem., 259, 3308-3317.

TREMBLAY, M., DERY, C., TALBOT, B., and WEBER, J., 1983. In vitro cleavage specificity of the adenovirus type 2 proteinase. Biochim. Biophys. Acta., 743, 239-245.

TSUZUKI, J., and LUFTIG, R.B., 1985. An unexpected effect of divalent cations on the adenovirus endogenous protein kinas : alteration in the specifity of phosporylation. Virus Res., 2, 95-105. UHLEN, M., SVENSSON, M., JOSEPHSON, S., ALESTROM, P., CHATTOPADHYAYA, J.B., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L., 1982. Leader arrangement in the adenovirus fiber mRNA. <u>Embo. J.</u>, 1, 249-254.

UNHOO, I., WADELL, G., SVENSSON, L., and JOHANSSON, A. (1983). Two new serotypes of adenoviruses cansing infantil diarrhea. Dev. Biol. Stand., 55, 311-318.

VALENTINE, R.C., and PEREIRA, H.G., 1965. Antigens and structure of the adenovirus. J. Mol. Biol., 13, 13-20.

VAN DER VLIET, P.C., and SUSSENBACH, J.S., 1975. An adenovirus type 5 gene function required for initiation of viral DNA replication. Virology, 67, 415-426.

VAN DER VLIET, P.C., LANDBERG, J., and JANSZ, H.S., 1977. Evidence for a function of the adenovirus DNA-binding protein in initiation of DNA synthesis as well as in elongation on nascent DNA chains. Virology, 80, 98-110.

VAN DER VLIET, P.C., LEVINE, A.J., ENSINGER, M., and GINSBERG, H.S., 1975. Thermolabile DNA binding proteins from cell infected with a temperaturesensitive mutant of adenovirus defective in viral DNA synthesis. J. Virol., 15, 348-354.

VAN LOON, A.E., ROZIJN, T.H., DE JONG, J.C., and SUSSENBACH, J.S., 1985. Physicochemical properties of the DNAs of the fastidious adenovirus species 40 and 41. Virology, 140, 197-200.

VAN OOSTRUM, J., and BURNETT, R.M., 1985. Molecular composition of the adenovirus type 2 virion. J. Virol., 56, 439-448. VAYDA, M.E., LEONE, K., and FLINT, S.J., 1983. The structure of nucleoprotein cores released from Ad2. Nucl. Acid. Res., 11, 441-460.

VELICER, L.F., and GINSBERG, H.S., 1970. Synthesis, transport and morphogenesis of type 5 adenovirus capsid proteins. J. Virol., 5, 338-352.

VON HEIJNE, G., 1985. Signal sequences. The limits of variation. J. Mol. Biol., 184, 99-105.

VON HEIJNE, G., 1986. Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. J. Mol. Biol., 189, 239-242.

WADELL, G., 1978. Classification of human adenoviruses by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of structural polypeptides. Intervirology, 11, 47-57.

WADELL, G., HAMMARSKJOLD, M.L., WINBERG, G., VARSANYI, T.M., and SUNDELL, G., 1980. Genetic variability of adenoviruses. Ann. N.Y. Acad. Sci., 354, 16-42.

WADELL, G., NORRBY, E., and SKAARET, P., 1969.
The soluble hemagglutinins of adenoviruses belonging to Rosen's subgroup III.
I. The rapidly sedimenting hemagglutinin.
Arch. Gesamte Virus Forsch., 26, 32-40.

WEATHERBEE, J.A., LUFTIG, R.B., and WEI HING, J.A., 1977. Binding of adenovirus to microtubules. II. Depletion of high molecular weight microtubule associated protein content reduces specificity of <u>in vitro</u> binding. J. Virol., <u>21</u>, 732-742. WEBER, J., 1976.
Genetic analysis of adenovirus type 2. 111. Temperature sensitivity of processing of viral proteins.
J. Virol., 17, 462-471.

WEBER, J., DERY, C., MIRZA, M., and HORVATH, J., 1985. Adenovirus DNA synthesis is coupled to virus assembly. Virology, 140, 351-359.

WEEKE, B., 1973. Crossed immunoelectrophoresis in a macrotechnique. Scand. J. Immunol., 2, 47-56.

WEINMANN, R., RASKAS, H.J., and ROEDER, R.G., 1974. Role of DNA-dependent RNA polymerase II and III in transcription of the adenovirus genome late in productive infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3426-3430.

WHITE, D.O., SHARFF, M.D., and MAIZEL, J.V.Jr., 1969. The polypeptides of adenoviruses. III. Synthesis in infected cells. Virology, 38, 395-406.

WIGAND, A., BARTHA, A., DREIZIN, R.S., ESCHE, H., GINSBERG, H.S., GREEN, M., HIERHOLZER, J.C., KALTER, S.S., McFERRAN, J.B., PETTERSSON, U., RUSSEL, W.C., and WADELL, G., 1982. Adenoviridae, second report. Intervirology, 18, 169-177.

WILLCOX, W.C., and GINSBERG, H.S., 1963. Production of specific neutralizing antibody with soluble antigens of type 5 adenovirus.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 114, 37-42.

WILLCOX, N., and MAUTNER, V., 1976. Antigenic determinants of adenovirus capsids. I- Measurement of antibody cross-reactivity.

J. Immunol., 116, 25-29.

WOLFSON, J., and DRESSLER, D., 1972. Adenovirus DNA contains an inverted terminal redundancy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64, 3054-3057.

WOLHFART, C., SVENSSON, U., and EVERITT, E., 1985. Interaction between HeLa cells and adenovirus type 2 virions neutralized by different antisera. J. Virol., 56, 896-903.

YEH-KAI, L., AKUSJARVI, G., ALESTROM, P., PETTERSSON, U., TREMBLAY, M. and WEBER, J., 1983. Genetic identification of an endoproteinase encoded by the adenovirus genome. J. Mol. Biol., 167, 217-222.

YOUNGHUSBAND, H.B., and MAUNDRELL, K., 1982. Adenovirus DNA is associated with the nuclear matrix of infected cells. J. Virol., 43, 705-713.

ZANETTA, J.P., BRECKENRIDGE, W.C., VINCENDON, G., 1972.

Analysis of monosaccharides by gas-liquid chromatography of the O-methyl glycosides as trifluoroacetate derivatives. Application to glycoproteins and glycolipids.

J. Chromatogr., 69, 291-301.