UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Clotilde DEWEINDT

CARACTERISATION MOLECULAIRE DE L'ONCOGENE *LAZ3*, IMPLIQUE DANS LES TRANSLOCATIONS RECURRENTES DE LA REGION CHROMOSOMIQUE 3q27, DANS LES LYMPHOMES NON HODGKINIENS

Soutenue le 26 Septembre 1995 devant la commission d'examen :

PRESIDENT	:	Professeur A. VERBERT
RAPPORTEURS	:	Docteur C. BASTARD
		Professeur J. P. MAGAUD
EXAMINATEURS	:	Docteur J. P. KERCKAERT
		Docteur D. LEPRINCE
		Professeur S. BALL



Cette thèse est l'aboutissement d'un travail accompli dans l'unité 124 INSERM "OncoHémathologie Moléculaire" à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille où Madame M.H. Loucheux-Lefebvre, Directrice, a bien voulu m'accueillir. Je lui en suis très reconnaissante.

C'est pour moi l'occasion d'exprimer toute ma gratitude à Monsieur J.P. Kerckaert pour m'avoir accueillie dans son équipe et dirigée dans ce travail. Je le remercie de m'avoir fait bénéficier de son expérience, ainsi que pour sa rigueur scientifique et sa disponibilité.

Je tiens à remercier Monsieur A. Verbert qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Monsieur J.P. Magaud a bien voulu en être le rapporteur. Je le remercie vivement d'avoir accepté cette tâche difficile.

Je remercie tout particulièrement Monsieur C. Bastard d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail, qui a permis de démarrer cette longue et passionnante histoire.

Mes remerçiements s'adressent à Monsieur S. Ball, qui a bien voulu sièger à ce jury.

A Monsieur D. Leprince, qui depuis son arrivée à l'unité 124 a permis l'établissement d'une véritable équipe de Recherche motivée par la même thématique, où chacun a trouvé sa place et apporté sa contribution. Mes vifs remerciements s'adressent à S. Quief, F. Bernardin, O. Albagli, P. Dhordain, pour leur aide.

Je tiens à remercier tout le personnel de l'U 124 INSERM pour leur soutien constant.

Mes remerçiements s'adressent tout particulièrement à Madame M. Collyn d'Hooghe pour son soutien moral et ses précieux conseils.

Par ce mémoire je remercie mes parents qui grâce à leur éducation et leur amour m'ont permis d'arriver jusqu'à cette étape.

A Philippe, pour sa patience et son constant soutien.

TABLE DES MATIERES

8

9

10 11 12

14

15

17

18

23

INTRODUCTION ⁵

GENERALITES	
TRANSLOCATIONS ASSOCIEES AUX LEUCEMIES ET AUX LYMPHOMES	
I- Anomalies chromosomiques et activation d'oncogènes dans les hémopathies malignes.	
 a) Génétique moléculaire des proliférations de cellules lymphoïdes-B. 1- LeLymphome de BURKITT (LB) 2- LeLymphome Folliculaire (LF) 	
 3- La translocation t(11;14)(q13;q32) associée au lymphome à cellules du manteau. 	
4- La translocation t(14;19) dans les leucémies lymphocytaires chroniques (LLC)	
b) Translocations chromosomiques récurrentes et activation de proto- oncogènes dans les Leucémies aigües de type T.	
 c) Formation de protéines chimériques suite à une translocation chromosomique. 	
II- Mécanismes moléculaires des translocations impliquant les gènes	

n modulion of molocular of aco a anoto battons impliquantics genes	
des Immunoglobulines et du Récepteur T.	23
a) Mécanismes de recombinaison des immunoglobulines.	23
b) Séquences retrouvées à proximité des remaniements	24

chromosomiques et mécanismes de translocation.

PROTEINES POSSEDANT UN DOMAINE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE

 Généralités sur les motifs apparentés aux doigts de zinc; 	
II- Mise en évidence des protéines BTB/POZ.	31

III-C	lassification des protéines BTB/POZ.	32
	- Protéines interagissant avec le DNA.	32
	- Protéines BTB/POZ ayant un motif structural commun (répétition de 50 acides	38
	aminés et doublets Gly-Gly).	
	-classe de protéines contenant un domaine BTB/POZ sans aucun autre motif	42
	structural particulier.	
IV-	Fonction des domaines BTB/POZ.	44
	1- Interactions protéine-protéine.	44
	2-Une controverse: inhibition de la fixation à l'ADN?	46
	3- Comment ces domaines peuvent -ils assurer ces deux fonctions?	47
V. B	Protéines BTB/BOZ et état de condensation de la chromatine	40
V- F	Γ to control of the second control of the	49 49
	I-Les proteines du groupe trithorax. Effets de decondensation de la chromatine.	77
	2-Association des protéines BTB/POZ aux propriétés structurales et fonctionnelles	52
	des membres du groupe Polycomb Pc-G.	
VI-	Protéines BTB/POZ, protéines RING Finger, protéines du groupe	55
trith	orax modelage de la chromatine et association avec la transforma-	
tion	néoplasique.	
	1-Translocations associées aux LAP, t(15;17) et t(11;17) qui fusionnent une	55
	protéine Ring finger (PML) ou une protéine BTB/POZ (PLZF) au recepteur de	
	l'acide rétinoïque α.	
	2- "Posterior sex comb" (psc) et son homologue "suppressor of zeste" (su(z)2): 2	59
	protéines importantes dans la transformation observée chez la Drosophile.	

RESULTATS

IDENTIFICATION D'UN NOUVEAU MODELE PHYSIOPATHOLOGIQUE DANS LE LYMPHOME NON-HODGKINIEN.

I- Caractérisation moléculaire des translocations en 3q27 récurrentes 64 dans les LNH: clonage du point de cassure et identification du MTC. Article 1: Genes Chromosome & Cancer 8,149-154, 1993. Cloning of a breakpoint cluster region at band 3q27 involved in human non-Hodgkin's lymphoma.

Deweindt C., Kerckaert J.P., Tilly H., Quief S., Nguyen V.C. et Bastard C.

II- Clonage du gène LAZ3.

Article2: Nature genetics 5, 66-70, 1993.

LAZ3 a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome3q27 translocations in human lymphomas.

Kerckaert J.P., Deweindt C., Tilly H., Quief S., Lecocq G., et Bastard C.

III- Implications cliniques.

Article 3: Blood 83, 2423-2427, 1994.

LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: Correlation with Histology, Immunophenotype, Karyotype and Clinical outcome in 217 patients. Bastard C., **Deweindt C.**, Kerckaert J.P., Lenormand B., Rossi A., Pezzela F., Fruchart C., Duval C., Monconduit M., et Tilly H.

IV-Mécanismes d'activation du gène LAZ3.

Article 4: Oncogene 10, 2171-2178, 1995.

TTF, a gene encoding a small G protein, fuses to the lymphoma - associated gene by t(3;4) chromosomal translocation.

Dallery E., Galiègue-Zouitina S., Collyn-d'Hooghe M., Quief S., Denis C., Hildebrand M.P., Lantoine D., **Deweindt C.**, Tilly H., Bastard C., et Kerckaert J.P.

V- Détermination de la séquence cible nucléique de la protéine LAZ3/ BCL6.

<u>Article 5</u>: Genes Chromosome and Cancer13, 221-224. BCL6 encodes a sequence-specific DNA-binding protein. Baron B., Stanger R., Hume H., Sadhu A., Mick R;, Kerckaert J.P., **DeweindtC.**, Bastard C., Nucifora G., Zeleznick-Le N;, et Mc Keitan T.

VI- LAZ3, une protéine qui ne fonctionne pas comme un facteur de transcription classique diffusible.

<u>Article 6</u>: Oncogene (sous presse, janvier 1996) The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein to nuclear dots and mediateshomomerisation *in vivo*. Dhordain P., Albagli O., Ansieu S., Koken M.H., **Deweindt C**., Quief S., Lantoine D.,

Kerckaert J.P. et Leprince D.

VII- L'oncogène LAZ3 code un inhibiteur transcriptionnel, son domaine ¹²⁶ BTB/POZ représentant un domaine autonome de répression.

<u>Article 7</u>: Cell Growth and Differenciation(sous presse, décembre 1995) The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. **Deweindt C.**, Albagli O., Bernardin F., Dhordain P., Quief S., Lantoine D., Kerckaert J.P., Leprince D.

102

97

DISCUSSION

I- LAZ3 : facteur de bon ou mauvais pronostic ?	165
II- Mécanismes aboutissant à une dérégulation du gène LAZ3.	167
- Les réarrangements du gène <i>LAZ3</i> sont complexes.	167
- Mécanismes impliqués dans les réarrangements en 3q27.	168
- Dérégulation du gène LAZ3.	168
III- LAZ3, un facteur de transcription diffusible "classique" et/ ou un	170
- Localisation sub-cellulaire de la protéine LAZ3, dépendante du domaine BTB/POZ	170
- La localisation sub-cellulaire de la protéine LAZ3 est-elle le reflet de la fonction biologique de ce facteur?	171
- LAZ3 : un répresseur transcriptionnel, dépendant du domaine BTB/POZ?	172
- Le facteur LAZ3 : un modulateur de l'architecture de la chromatine et un trans- régulateur. Ambivalence liée aux effets multifonctionnels du domaine BTB/POZ?	174
IV-LAZ3 et la transformation cellulaire.	176

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

LAL	Leucémie Aigüe Lymphoblastique
LAL-T	LAL de type T
LAM	Leucémie Aigüe myeloïde
LAP	Leucémie Aigüe Promyélocytaire
LB	Lymphome de Burkitt
LC	Lymphome centrocytique
LDGC	Lymphome Diffus à Grandes Cellules
LF	Lymphome Folliculaire
LLC	Leucémie Lymphocytaire Chronic
LLC-B	LLC de type B
LLI	Lymphome lymphocytique intermédiaire
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LNH	Lymphome non Hodgkinien
Ig	Immunoglobuline
IgH	Chaine lourde des Ig
TCR	Récepteur de l'antigène T = $TCell Receptor$
BTB/POZ	Bric à Brac Tramtrack Broad Complex / Poxvirus Zinc finger
LAZ3	Lymphoma Assaciated Zinc finger gene on chromosome 3
PDGF-β	Platelet derived grouth factor
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger
Tr-G	groupe Trithorax = Trithorax group
PEV	Position Effect Variegation
ADN	Acide Desoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ORF	Open Reading Frame, cadre ouvert de lecture
MTC	Major translocation cluster
mbr	major breakpoint region
mcr	minor cluster region
EBV	Epstein Barr Virus
b-HLH	Helix Loop Helix de type basique
MT	Methyltransférase
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transférase
ZIP	Leucine Zipper
PCR	Polymerase chain reaction
RE	Reticulum endoplasmique
NPC	Nuclear Pore Complex
SNL	Signal de Localisation Nucléaire

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

pages

Tableau I :	Points de cassures et gènes dans les translocations chromosomiques	17
Tableau II :	Activation de gènes par formation de transcrits chimériques	22
Tableau III :	Consensus "Chi-like" retrouvé au niveau des point de cassures des réarrangements abérrants des oncogènes	24
Tableau IV :	Classification des protéines BTB/POZ	43
Figure 1 :	Représentation schématique des signaux de jonction des gènes d'Ig	23
Figure 2 :	Comparaison des motifs RING finger avec les autres motifs riches en cystéines	30
Figure 3 :	Varitions structurales entre les protéines BTB/POZ : des protéines se liant à l'ADN aux protéines se liant à l'actine	41
Figure 4 :	Alignement de séquences des domaines BTB/POZ	42
Figure 5 :	Un exemple de la PEV avec le gène white (w)	50
Figure 6 :	Rôle des domaines BTB/POZ dans la conversion entre euchromatine et hétérochromatine	55
Figure 7 :	A- Représentation de l'organisation génomique du gène LAZ3 B- 2 clones de l'ADNc chevauchant M47 et M55 C- Clone d'ADNc complet P566	86
Figure 8 :	Représentation du MTC localisant les points de cassures des diffé rents patients	87
Figure 9 :	Représentation des transcrits d'ARNm chimériques	88

INTRODUCTION

Les translocations chromosomiques récurrentes apportent des données importantes pour l'identification de nouveaux proto-oncogènes localisés au niveau, ou à proximité, des points de cassure chromosomique. Très souvent, ces gènes codent une protéine fonctionnant comme un facteur de transcription diffusible classique, et leur activation oncogénique peut être associée spécifiquement à certaines pathologies malignes.

L'analyse moléculaire de certaines de ces translocations chromosomiques contribue à la compréhension de la pathogénèse des Lymphomes malins-Non-Hodgkinien (LNH): un ensemble hétérogène de proliférations malignes de cellules lymphoïdes B et, moins fréquemment, de cellules T.

La translocation chromosomique t(14;18), qui cause une expression dérégulée du facteur anti-apoptotique BCL2, joue un rôle critique dans le développement du Lymphome Folliculaire (LF) qui présente 20 à 30% de tous les LNH diagnostiqués.

Le Lymphome de Burkitt (LB) et le lymphome à cellules du manteau, deux LNH moins fréquents, sont caractérisés par une translocation chromosomique qui cause la dérégulation de l'expression des gènes intervenant dans la progression du cycle cellulaire comme MYC et BCL1/CCN D1 respectivement.

Jusqu'en 1993, on connaissait peu de choses sur la pathogenèse moléculaire du Lymphome Diffus à Grandes Cellules (LDGC), le type de lymphome humain le plus fréquent et le plus agressif. Il représente environ 40% de l'ensemble des LNH diagnostiqués et est souvent associé à l'étape finale de progression du LF. Un faible pourcentage de LDGC présente un réarrangement de l'oncogène *MYC* et 20 à 30 % sont concernés par une altération de *BCL2* qui reflète l'origine folliculaire de la tumeur.

Aucune altération moléculaire n'avait été identifiée comme spécifique du LDGC. En 1992, Christian Bastard a montré que les translocations chromosomiques qui impliquent la bande 3q27 et quelques autres sites chromosomiques sont trouvés en cytogénétique dans 15% des cas de LNH, devenant ainsi la troisième anomalie chromosomique en fréquence dans les LNH associée de façon prédominante aux LNH Diffus à Grande Cellules de type B (LDGC).

Notre travail de thèse a pour origine l'étude moléculaire des translocations en 3q27.Ce qui nous a permis de montrer, avec d'autres, que la plupart de ces réarrangements impliquaient la même région majeure de translocation appelée "Major Translocation Cluster" (MTC) sur le chromosome 3 (Baron *et al*, 1993; Deweindt *et al*, 1993; Ye *et al* 1993).

-5-

L'ensemble de ces données cliniques, cytogénétiques et moléculaires suggérait donc fortement l'implication d'un nouvel oncogène dans cette région 3q27. Effectivement nous avons cloné cet oncogène nommé LAZ3 pour Lymphoma Associated Zinc finger gene on chromosome3 (Kerckaert et al., 1993), également appelé peu après BCL6 par d'autres auteurs (Ye et al., 1993) ou BCL5 (Miki et al., 1994).

Nous avons montré que ce gène LAZ3/BCL6 code une protéine de 79kDa contenant deux domaines fonctionnels identifiés. Sa région C-terminale posséde 6 motifs en doigts de zinc (zinc finger) de type C2H2, chacun séparé par une région conservée de 6 acides aminés (la séquence de liaison H/C) qui associe LAZ3/BCL6 à la sous famille Krüppel de protéines à doigts de zinc. La région amino-terminale de LAZ3/BCL6 est dépourvue des domaines déja décrits dans les autres protéines appartenant à la famille des protéines Krüppel à doigts de zinc:FAX ou KRAB. En revanche, elle contient une région de 120 acides aminés, hydrophobe et conservée, présente généralement en N-terminal de nombreuses protéines incluant des protéines à doigts de zinc et des protéines se fixant à l'actine. Cette région est appelée domaine **BTB** pour **B**road Complex, **T**ramtrack, **B**ric à Brac (Godt *et al.*, 1994), **POZ** pour **Po**xvirus, **Z**inc finger (Bardwell and Treisman., 1994), ou **BTB/POZ** (Albagli et al., 1995).

On connaît actuellement 35 protéines à domaine **BTB/POZ** qui se répartissent en plusieurs classes selon la présence de motifs structuraux ou leur fonction putative. Une première classe comprend des protéines interagissant avec l'ADN dont une grande majorité contient des motifs en doigts de zinc de type C2H2. Une seconde classe regroupe des protéines possédant undomaine de liaison à l'actine. Une dernière classe est composée de protéines ne contenant pas de domaine particulier autre que le domaine **BTB/POZ**.

En dépit de leurs fonctions fortement divergentes, les protéines **BTB/POZ**, qui se fixent à l'actine ou à l'ADN, présentent une propriété commune : la faculté à organiser des complexes protéiques multimériques via leur domaine **BTB/POZ**. Certaines montrent, de plus, une localisation nucléaire ponctuée.

Dans ce mémoire, nous décrirons et discuterons les résultats ayant abouti au clonage et à la caractérisation de ce nouveau gène LAZ3/BCL6, ainsi que son implication dans plus de 37% des cas de LNH. La fonction normale potentielle ainsi que la dérégulation de LAZ3/BCL6 dans les LNH seront également évoquées. Auparavant nos généralités se diviseront en deux parties:

-6-

- la partie "Leucémies et Lymphomes" où nous décrirons les principales translocations chromosomiques, associées à ces pathologies hématopoïétiques, qui ont permis la découverte de gènes importants, ainsi que leurs modes d'activation et de dérégulation à la suite de ces translocations.

- La seconde traitera des protéines qui possèdent un domaine BTB/POZ, domaine d'interaction protéine-protéine. Cette partie nous permettra d'appréhender lors de la discussion un rôle putatif du facteur LAZ3/BCL6, facteur qui ne semble pas se comporter uniquement comme un facteur de transcription diffusible classique.

GENERALITES

TRANSLOCATIONS ASSOCIEES AUX LEUCEMIES

ET AUX LYMPHOMES

Il est maintenant largement établi que le cancer résulte de l'accumulation de multiples événements génétiques survenant à la suite d'altérations touchant un nombre limité de gènes. Ces altérations de l'ADN génomique se divisent en deux catégories:

1) Les altérations qui conduisent à la conversion de proto-oncogènes en oncogènes. Ce sont des mutations ponctuelles, des insertions, des délétions, des translocations, des amplifications. Elles ont un effet dominant.

2) Les altérations responsables de l'inactivation germinale ou somatique de gènes suppresseurs de tumeur: des mutations ponctuelles, des délétions ou les deux à la fois. Elles ont un effet récessif.

L'analyse moléculaire des aberrations chromosomiques spécifiques de certaines tumeurs, est un outil utilisé avec succès dans l'étude du rôle de gènes cellulaires localisés au niveau ou à proximité des points de cassure dans la pathogenèse tumorale.

Les progrès les plus notoires dans la connaissance de ces gènes et de leurs altérations ont été réalisés à partir de pathologies cancéreuses du colon et du tissu hématopoïétique. Les premiers exemples analysés au niveau moléculaire sont ceux de l'activation des oncogènes *MYC* (Dalla Favera *et al.*, 1983; Taub *et al.*, 1984), *ABL* (Shtivelman *et al.*, 1985) et *RAS* (Barbacid, 1987), respectivement dans le LB, la Leucémie Myeloïde Chronique (LMC) et le cancer du colon, et de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur comme *RB* dans le Rétinoblastome (Liu *et al.*, 1992) et de *P53* dans diverses tumeurs solides (Mashal *et al.*, 1990).

I- Anomalies chromosomiques et activation d'oncogènes dans les hémopathies malignes.

La grande majorité des aberrations chromosomiques, décrites dans la littérature comme étant associées spécifiquement à un type de pathologie cancéreuse, concerne les hémopathies malignes. Les tumeurs solides présentent généralement un caryotype très complexe en plus d'une hétérogénéité cellulaire importante, qui rend difficile l'association entre anomalies chromosomiques et types spécifiques de tumeurs. Cependant les investigations dans les tumeurs solides se sont concentrées sur les sarcomes, dont la cytogénétique a été fort étudiée. Les conséquences structurales de ces translocations résultent en la production de protéines chimériques dans le sarcome de Ewing, le liposarcome, le rhabdomyosarcome et le sarcome synovial.

Les anomalies cytogénétiques les plus fréquentes et les mieux connues sont les translocations. Les translocations récurrentes représentent 3% des anomalies observées dans les tumeurs (Mitelman, 1988). Elles perturbent l'organisation et la fonction de gènes qui contrôlent l'équilibre entre prolifération et différenciation. La majorité des gènes transloqués code pour des facteurs de transcription; leur expression est souvent dérégulée à la suite de leur juxtaposition aux éléments régulateurs des récepteurs des antigènes. Historiquement, on retiendra la première description faite en 1960, d'une aberration chromosomique : "le chromosome Philaldelphie" (PH) par Nowell et Hungerford, aberration associée dans 90 à 95% des cas de LMC. Ensuite, furent identifiées des translocations impliquant des régions chromosomiques contenant d'une part des gènes d'immunoglobulines (Ig) (translocations spécifiques de certaines proliférations de cellules lymphoïdes B) ou des gènes du récepteur de l'antigène des cellules T (TCR) (translocations associées à des proliférations T lymphoïdes) et d'autre part d'autres gènes (facteurs de croissances, homéogènes, facteurs de transcription,...) associés à diverses pathologies. Ces différentes données ont conduit à l'identification d'un bon nombre d'oncogènes. {cf tableaux I (page17) et II (page 22)}.

Il existe deux mécanismes essentiels qui conduisent à l'activation d'oncogènes à la suite de translocations chromosomiques dans les pathologies lymphoïdes:

- la dérégulation de l'expression d'un oncogène par juxtaposition, le plus souvent en 5', de séquences activatrices ("*enhancer*") ou promotrices des gènes d'immunoglobulines (Ig) ou du récepteur des cellules T (TCR). La séquence codante de l'oncogène n'est alors pas modifiée.

- La création d'un gène chimérique par juxtaposition en phase de deux gènes situés normalement sur des chromosomes différents qui code une protéine chimérique.

a)Génétique moléculaire des proliférations des cellules lymphoïdes-B:

Parmi les pathologies présentant des translocations récurrentes, les proliférations concernant les cellules lymphoïdes B représentent un groupe très particulier puisque, quasi constamment, y sont associés des réarrangements chromosomiques des régions 14q32, 2p11 et 22q11 portant respectivement les gènes des chaînes lourdes et les chaînes légères κ et l des immunoglobulines (Ig) (tableau I page17). Ceci a permis l'identification et la mise en cause de plusieurs oncogènes comme les oncogènes *MYC*, *BCL1*, *BCL2*, *BCL3*.

Parmi les translocations les mieux décrites, on trouve celles associées au lymphome de Burkitt (LB).

1) Le Lymphome de Burkitt (LB):

C'est un lymphome à petites cellules non clivées provenant d'une population de cellules B relativement immatures. C'est le modèle qui, historiquement, à permis de mieux comprendre le rôle joué par les gènes des Ig dans la genèse de ces tumeurs (Leder *et al.*, 1983).

L'analyse cytogénétique de ce lymphome montre plusieurs variants de translocation:

- une translocation t(8;14)(q24;q32) retrouvée majoritairement impliquant en 14q32 les chaines lourdes des Ig (IgH). Dans ce cas, les chaines légères des Ig synthétisées par les cellules tumorales sont soit du type κ soit du type λ .

- 2 variants de translocation mineurs t(2;8)(p12;q24) et t(8;22)(q24;q11) impliquant respectivement les chaines légères κ et λ des Ig.

Dans tous les cas, la translocation a toujours lieu entre une région des gènes d'Ig et une même région en 8q24. Le clonage de ces 3 types de translocation a permis d'impliquer en 8q24 le gène *MYC* (Dalla favera *et al.*, 1982; Taub *et al.*, 1982).

Il existe deux types de LB:

-Le LB endémique, de type Africain, dont plus de 97% des cas présentent dans le génome des cellules tumorales de multiples copies du virus d'Epstein Barr (EBV). Dans ce type de lymphome, la distance entre l'oncogène *MYC* et les IgH, à la suite du réarrangement, est variable. Le point de cassure en 8q24 se situe généralement à une grande distance en amont de la région promotrice de *MYC*.

-Le LB sporadique, Americain, de plus faible incidence il n'est que très occasionnellement associé à l'EBV. Ces LB sont invariablement caractérisés par un point de cassure beaucoup plus proche de MYC.

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer une activation putative de MYCdans le LB. Lors d'une translocation classique, la cassure est localisée dans la région 5' non codante de MYC ou à une distance variable de celle-ci (Leder *et al.*, 1983). Les exons codants du gène sont donc transposés sur le chromosome 14 en position "tête bêche" avec les gènes des Ig. Au contraire, les variants de translocation (ceux impliquant les chaînes légères des Ig) cassent le chromosome 8 en position télomérique par rapport au gène MYC. Dans ce cas, le gène MYC est rattaché aux régions constantes κ et λ des chaines légères des Ig en orientation "tête à queue". Toutes ces translocations activent le gène *MYC* de façon constitutive (Klein et Klein ., 1985). Cette activation est d'autant plus importante que les séquences codantes du 2ème et du 3ème exon sont toujours intactes et codent pour une protéine MYC de type sauvage.

Bien que les anomalies associées aux gènes des Ig ne modifient pas, en général, l'activité de l'oncogène, on observe souvent des taux et des tailles anormales de transcrit, des changements dans le promoteur utilisé, des mutations somatiques des insertions, des duplications, des délétions, des changements dans le contrôle transcriptionnel du gène MYC transloqué, qui constituent autant de mécanismes pouvant contribuer au processus tumorigène (Robertson, 1984; Rabbitts et Boehm, 1991). Il semble qu'il existe plusieurs façon d'activer MYC. Le concept général est celui d'une dérégulation; l'idée est que MYC juxtaposé aux gènes des Ig soit mis sous le contrôle d'éléments en cis et soit ainsi activé de façon constitutive par les régions "enhancers", activatrices et promotrices des gènes des Ig. Le gène MYC se conduirait alors comme s' il faisait entièrement partie du locus des Ig. La protéine MYC possède plusieurs domaines fonctionnels, incluant une région basique de fixation à l'ADN "helix loop helix" (b-HLH) et un motif de dimérisation "leucine zipper" (ZIP). L'activation de MYC par translocation compromet un réseau transcriptionnel qui implique 3 autres facteurs, chacun d'eux possédant également un domaine b-HLH et ZIP. MYC peut s'hétéro-dimériser avec une protéine MAX (Blackwood et Eisenman., 1991, Prendergast et al., 1991) qui peut se fixer à l'ADN et à 2 autres protéines MAD et Mxi-1 (Ayer et al., 1993, Zervoset al., 1993), l'homodimère MAX-MAX pouvant également se former. Pour toutes ces protéines, il est supposé exister un équilibre entre homo/hetéro-dimère dans les cellules normales. Le dimère MYC-MAX est actif transcriptionnellent tandis que MAX-MAD ou MAX-Mxi-1 ne le sont pas. Après translocation chromosomique, cet équilibre est détruit par une expression incorrecte de MYC. Comme le dimère MYC-MAX est nécessaire pour l'activation oncogénique, il en résulte probablement une régulation négative des gènes cibles amenant à l'oncogenèse.

Le mécanisme moléculaire déterminant l'activation de *MYC* dans le LB a trouvé une analogie dans d'autres types de néoplasies à cellules B, en particulier dans le Lymphome Folliculaire (LF).

2) Le Lymphome Folliculaire (LF).

Le LF représente l'un des types les plus communs de Lymphome Non-Hodgkinien

(LNH) aux Etats Unis et en Europe. Il est associé à la translocation t(14;18) la plus fréquente parmi les LNH (Offit *et al* .,1991,) retrouvée dans 55 à 70% des patients en Europe (Lambrechts *et al* ., 1992) et dans 70 à 95% des patients observés aux Etats Unis (Weiss *et al*.,1987). La majorité des patients présente un état disséminé de la maladie (stades III et IV), seulement 10 à 20% des cas sont diagnostiqués aux stades I et II impliquant une maladie localisée.

Cette translocation provoque la jonction entre la région des chaînes lourdes des Ig (IgH) en 14q32 et un gène localisé en 18q21: le gène *BCL2* (Bakhshi *et al.*, 1987; Cotter *et al.*, 1990). *BCL2* est un gène constitué de 3 exons avec un premier exon non codant.

Deux groupes de points de cassure (" *clusters*"), localisés dans 2 régions non codantes du gène *BCL2* ont été caractérisés: le "*major breakpoint region* "(mbr) et le "*minor cluster region*" (mcr). La région mbr est impliquée dans approximativement 60% des translocations et s'étend sur à peu près 150 pb (Bakhshi *et al.*, 1985; Cleary *et al.*, 1986; Cotter *et al.*,1991). Le mcr, moins fréquemment impliqué, s'étend sur une région de 500 bp (Weiss *et al.*,1987; Cleary *et al.*, 1986). Cette translocation constitue un bon marqueur pour la détection des cellules de LF et une cible adaptée pour l'utilisation de la PCR en diagnostic et pour l'étude de la "maladie résiduelle".

Quelle que soit la translocation t(14;18), les exons 2 et 3 codant la protéine restent toujours intacts et on observe toujours une surexpression de l'ARNm *BCL2*.

Vaux *et al*., en 1988, furent les premiers à montrer que *BCL2* pouvait augmenter la survie cellulaire. A la suite de la translocation chromosomique t(14;18), l'activation de *BCL2* par la région activatrice du gène des Ig semble augmenter la survie des cellules hématopoïètiques par blocage de l'apoptose (ou mort cellulaire programmée) (Vaux *et al.*, 1988; Tsujimoto., 1989; Reed., 1994). L'apoptose intervient dans de très nombreux processus de différenciation, et notamment dans la sélection des cellules de la réponse immune: lymphocytes T dans le thymus et lymphocytes B dans les centres germinatifs ganglionnaires. Mais BCL2 peut également bloquer l'apoptose induite par MYC (Bissonnette *et al.*, 1992), ce qui pourrait expliquer la nature agressive des leucémies et des lymphomes possédant des translocations impliquant ces 2 gènes. En effet, MYC peut activer à la fois la prolifération cellulaire et l'apoptose. L'activation concomitante de *BCL2* annulerait ainsi l'influence de MYC sur l'apoptose mais conserverait son effet inducteur de la prolifération conduisant à un fort avantage de croissance. Il apparait également, qu'en l'absence d'une activation concomitante du gène *MYC* l'expression de

BCL2 confère un mauvais pronostic aux patients.

De récentes observations en microscopie confocale et en microscopie éléctronique suggèrent que d'une part la protéine codée par le gène *BCL2* (protéine de 25 kDa) se localise dans l'enveloppe nucléaire, une partie du reticulum endoplasmique (RE) et à l'extérieur des membranes des mitochondries (Krajewski *et al.*,1993) et d'autre part un rôle possible de la protéine BCL2 dans certains aspects du transport nucléaire ou l'assemblage et la maintenance de l'enveloppe nucléaire, ainsi que dans la formation des complexes du pore nucléaire (NPCs). BCL2 semble contrôler le chemin de transduction du signal et cibler des signaux moléculaires dans des localisations intra cellulaires critiques, comme les jonctions mitochondriales ou les complexes des pores nucléaires (Krajewski *et al.*, 1993).

Cependant, de nombreuses questions restent encore sans réponse en ce qui concerne le mécanisme d'action de la protéine BCL2 dans la protection cellulaire à l'apoptose et ses associations possibles avec les mitochondries, l'enveloppe nucléaire et le RE.

3) La translocation t(11;14)(q13;q32) associée aux lymphomes à cellules du manteau.

La translocation t(11;14) est une anomalie importante associée à certaines pathologies des cellules B, comme: les leucémies lymphocytaires de type B (LLC-B) (Juliusson et Gahrton,1990), les leucémies prolymphocytaire de type B (Brito-Batapulle *et al.*, 1987), les lymphomes lymphocytiques intermédiaires (LLI) (Leroux *et al.*, 1991; Vandenberghe *et al.*, 1991), les myélomes multiples (Van den Berghe *et al.*, 1984) et des leucémies à plasmocytes (Van den Berghe *et al.*, 1989). Cette translocation casse en 14q32 au niveau des chaînes lourdes des Ig (IgH) avec en 11q13 un oncogène putatif au locus *bcl1* (Tsujimoto *et al.*, 1985). Le point de cassure sur le chromosome 11 fut localisé initialement dans un "*Major Translocation Cluster*" *MTC* de 1Kb.

D'autres études ont montré, qu'en fait, les points de cassure se situaient dans une région assez grande de l'ADN, supérieure à 63Kb, télomérique par rapport au premier MTC (Meeker *et al.*,1991), et qu'il existait une seconde région regroupant des points de cassure dans un autre MTC localisé à environ 23 Kb en position télomérique par rapport au premier MTC.

Plus récemment encore, deux groupes (Mokotura et al., 1991, Withers et al.,

1991) ont pu identifier un gène candidat pour *BCL1* nommé *PRAD1* ou *CCND1* localisé à environ 110Kb en position télomérique par rapport aux régions MTC. Ce gène *BCL1* est un membre de la famille des gènes de cyclines dont l'expression est dérégulée dans les leucémies et les lymphomes présentant une t(11;14) (Withers *et al.*,1991; Rosenberg *et al.*, 1991; Seto *et al.*, 1992), probablement comme conséquence de la juxtaposition des "*enhancers*" des IgH localisés sur le chromosome 14.

Plusieurs auteurs ont montré l'incidence forte des réarrangements au locus *bcl1* dans les LLIs et également dans les lymphomes centrocytiques LC, ce qui suggère que la dérégulation de *BCL1* joue un rôle clef dans la pathogenèse de ces sous-types de lymphomes (Rimokh *et al.*, 1990, Medeiros *et al.*, 1990, Williams *et al.*, 1990, 1991).

4) Les LLC possédant une translocation t(14;19).

Le gène impliqué dans cette translocation a pu être caractérisé. Il s'agit du protooncogène *BCL3*, identifié par le clonage des points de cassure des translocations chromosomiques t(14;19) retrouvés dans la LLC (Ohno *et al.*, 1990). Le point de cassure sur le chromosome 14 implique la région "*switch*" associée à la région α constante des chaînes lourdes des Ig (IgH). De cette translocation résulte des orientations "tête à tête" entre les gènes affectés sur les chromosomes 14 et 19 qui ressemblent, par cet aspect, au variant de translocation t(8;14) retrouvé dans le LB (Ohno *et al.*, 1990).

L'expression de BCL3 est activée par la translocation, sans altération de la structure de la protéine codée. La structure déduite de BCL3 montre que cette protéine contient un motif de 30 acides aminés "*ankyrin repeat*", motif représentant un domaine d'interaction protéine-protéine retrouvé parmi d'autres protéines (Thompson *et al.*, 1991; Michaely et Bennett. 1992). Parmi ces protéines, on trouve l'ankyrine d'erythrocyte, une protéine du cytosquelette; des protéines de régulation du cycle cellulaire, comme la *cdc10* et *SWI6*; et les récepteurs transmembranaires *notch*, *TANI* et *int-3*, des facteurs de transcription, des protéines *ETS*, *GABP* α et des membres de la famille *rel*.

Les protéines les plus proches de BCL3 sont des protéines qui affectent l'activité et la localisation intracellulaire de NF κ B, protéine contenant 2 sous unités: la P50 et la P65. I κ B est une protéine qui contient 7 copies du motif ankyrin (Liou *et al.*, 1992) organisées d'une façon très similaire à celles de BCL3. Il inhibe l'activité de fixation à l'ADN de NF κ B en le séquestrant dans le cytoplasme (Baewerle et Baltimore., 1988). I κ B possède une affinité forte pour la P65 (Bauerle et Baltimore, 1989).

Si BCL3, de par sa structure, ressemble à I κ B, il représente une fonction distincte, car il interagit préférentiellement avec la sous-unité P50 de NF κ B (Wulczyn *et al.*, 1992) masquant ainsi son signal de localisation nucléaire (SLN). BCL3 ne semble pas uniquement fonctionner comme un inhibiteur, mais également comme un coactivateur pour la P50. BCL3 reconnait l'homodimère P50 qui agit normalement comme un suppresseur. De l'association préférentielle P50-BCL3 pourrait résulter une activation de la transcription (Inoue *et al.*,1993). La quantité d'ARNm *BCL3* est plus élevée dans des cellules leucémiques que dans des cellules normales (Ohno *et al.*,1990). Si *BCL3* est un oncogène, comment transforme t'il les cellules B?

En fait, dans les cellules normales, l'expression des facteurs de transcription rel/ NFKB est régulée de façon précise dans chaque type cellulaire; il en résulte une expression appropriée des gènes-cible régulés en cis par les sites KB. Par contre, dans une cellule qui possède un taux élévé de BCL3, le nombre d'homodimères P50 inactivés est plus important que dans des cellules normales, aussi certains gènes jouant un rôle dans la croissance cellulaire sont exprimés à un taux supérieur au taux normal. Ces cellules pourraient donc avoir un avantage de croissance ou un cycle cellulaire anormal, pouvant créer davantage d'altérations conduisant à des cellules malignes.

Quoi qu'il en soit, en transfection transitoire, le taux élevé de BCL3 supprime la transactivation médiée par le complexe P50-P65. Il est donc possible que l'expression de BCL3 dans les cellules leucémiques soit suffisamment élevée pour supprimer la transactivation médiée par P50-P65, ce qui pourrait conduire à la suppression de l'expression des gènes requis pour la différenciation cellulaire (Inoue *et al.*, 1993).

b) Translocations chromosomiques récurrentes et activation de protooncogènes dans les leucémies aiguës de type T.

Si on poursuit notre tour d'horizon sur l'activation de proto-oncogènes à la suite de translocations chromosomiques, dans le cas de translocations impliquant le gène du récepteur des cellules T (TCR), les leucémies aiguës de type T (LAL-T) présentent un nombre important de translocations récurrentes. La plupart implique des facteurs de transcription putatifs impliqués dans la différenciation et qui ne sont pas normalement exprimés dans les cellules T (Rabbit, 1994).

Le premier exemple est celui du gène *HOX11*, localisé sur le chromosome 10 bande q24, activé à la suite de la translocation chromosomique t(10;14) (q24;q11) et t(7;10)(q35;q24) dans les LAL-T (Dubé *et al.*, 1991;Lu *et al.*, 1991). Ce gène code une protéine contenant un homéodomaine qui peut se fixer à l'ADN et activer la transcription (Dear *et al.*, 1993). Comme il n'est pas exprimé dans les cellules T normales, le gène HOX11 doit activer des gènes cible dans les cellules T présentant une translocation en10q24 qui contribue à la LAL-T.

Plusieurs protéines, activées par translocation chromosomique dans les LAL-T, sont des protéines qui se fixent à l'ADN et contiennent un motif basique "*helix loop helix*" (bHLH); le gène *TAL1/SCL* en est un exemple bien étudié. Ce gène est aussi bien impliqué dans des translocations t(1;14) que dans 25% des cas de LAL-T chez l'enfant. Ce gène a subi une petite délétion dans sa région 5'non codante. La protéine normale codée par ce gène *TAL1* peut dimériser, par l'intermédiaire de son motif HLH, avec les protéines E47 et E12 (codées par le gène E2A) (Hsu *et al.*,1991) formant un complexe qui se fixe à l'ADN. La translocation chromosomique cause probablement une production ectopique de TAL1, activant ainsi une série de gènes cible normalement silencieux dans les cellules T.

Un modèle similaire peut être appliqué à d'autres protéines associées aux LAL-T par translocation chromosomique, comme les protéines RBTN/Ttg (Sanchez-Garcia *et al.*, 1993). Elles sont produites après les translocations chromosomiques t(11;14)(p13;q11) ou t(11;14)(p15;q11) et possèdent un motif LIM. Ce motif LIM, riche en cystéines, possède une structure ressemblant au motif en doigts de zinc. Il a antérieurement été suggéré que ce motif pouvait fonctionner comme un motif d'interaction protéine-protéine. En effet RBTN2 peut se fixer à la protéine à motif bHLH TAL1 (Wadman *etal.*,1994). RBTN2 peut induire des tumeurs clonales de type T chez la souris

-17-

Tableau I

Points de cassures et gènes dans les translocations chromosomiques

d'après T.H Rabbitts (1994) et Drexler et al. (1995)

type	Gène affecté	Gène affecté Pathologie	
helix-loop-helix basiques			
t(8;14)(q24;q32)	<i>c-MYC</i> (8q24)	LB, LAL	lgH
t(2;8)(p12;q24)	c-MYC(8q24)	LB, LAL	lgκ
t(8;22)(q24;q11)	<i>c-MYC(</i> 8q24)	LB, LAL	lgλ
t(8;14)(q24;q11)	<i>c-MYC</i> (8q24)	LAL-T	TCR-α
t(8;12)(q24;q22)	c-MYC(8q24), BTG(12q22)	LLC-B/LAL	TCR-α
t(7;19)(q35;p13)	<i>LYL</i> (19p13)		ΤCR-β
t(1;14)(p32;q11)	<i>TAL2</i> (9q34)	LAL-T	TCR-β
protéinesLIM		······································	
t(11;14)(p15;q11)	<i>RBTN1/Ttg1</i> (11p15)	LAL-T	TCR-δ
t(11;14)(p13;q11)	RBTN2/Ttg2(11p13)	LAL-T	ΤCR-δ/α/β
t(7;11)(q35;p13)		a series that the series of	
gènesHomeobox			
t(10;14)(q24;q11)	HOX11(10q24)	LAL-T	TCR-α/β
t(7;10)(q35;q24)	en onte a service de la constant de la constant de la constant, de la constant de la constant de la constant d La constant de la const	n a land in sin a land an an ann an	
protéines à doigts de zinc			
t(3;14)(q27;q32)	LAZ3/BCL6(3q27)	LNH/LDGC	lgH
t(3;4)(q27;p11)	<i>LAZ3/BCL6</i> (3q27)	LNH	lgH
autres			·····
t(11;14)(q13;q32)	BCL-1/PRAD1(11q13)	LLC-B et autres	IgH
t(14;18)(q32;q21)	BCL-2(18q21)	LF	IgH, IgL
inv14 & t(14;14)(q11;q32)	<i>TCL-1</i> (14q32.1)	LLC-T	TCR-Ca
t(10;14)(q24;q32)	<i>lyt-10</i> (10q24)	lymphome -B	lgH
t(14;19)(q32;q13.1)	BCL-3(19q13.1)	LLC-B	IgH
t(5;14)(q31;32)	<i>IL-3</i> (5q31)	LAL pré-B	IgH
t(7;9)(q34;q34.3)	TAN1(9q34.3)	LAL-Ţ	TCR-β
t(1;7)(p34;q34)	LCK(1p34)	LAL-1	Ι ΤCR-β
t(X;14)(q28;q11)	C6.1 <i>B</i> (Xq28)	LAL-I	ΙΟΚ-α

.

LB: Lymphome de Burkitt / LAL: Leucémie aiguë lymphoblastique / LLC: Leucémie lymphocytaire chronique / LNH: Lymphome non Hogkinien / LDGC: Lymphome diffus à grande cellules

transgénique; il est essentiel pour l'hématopoïèse normale chez la souris, pour la différenciation erythroïde (Warren *et al.*, 1994). Il semble que la transcription de gènes cible, qui ne sont normalement pas exprimés dans les cellules T, soit affectée après activation de RBTN2 à la suite de la translocation chromosomique. Quoi qu'il en soit, l'expression ectopique des protéines contenant un domaine LIM comme résultat de translocation dans les cellules T doit avoir un effet similaire aux expressions de *HOX11* et *TAL1*.

c) Formation de protéines chimériques suite aux translocations chromosomiques.

Un nombre important d'anomalies sont responsables de la formation de protéines chimériques.

Le premier exemple provint du clonage du point de cassure du chromosome"philadelphie" (PH) (Nowell et Hungerfold., 1960). Dans ces anomalies, le gène Abelson *ABL*, en 9q34, est fusionné avec un gène *BCR* en 22q11 (Bartram *et al.*, 1983). Cette fusion crée un marqueur spécifique de la tumeur et la conséquence fonctionnelle de cette protéine de fusion BCR/ABL créée est l'augmentation de l'activité tyrosine kinase intrinsèque d'ABL.

Les études de la fusion BCR/ABL ont donc été à l'origine des descriptions postérieures d'autres protéines de fusion, qui impliquent souvent des facteurs de transcription. Par exemple, on peut citer des protéines se fixant à l'ADN, comme PBX associée à la translocation t(1;19) (Kamps *et al.*, 1990, Nourse *et al.*, 1990) dans les LAL de type pré-B ou encore la fusion ETO/MG8, associée à la t(8;21) (Ohki.1993) dans les leucémies aigües myéloïdes, LAM. Cependant, il n'y a pas que des facteurs de transcription comme seules protéines impliquées dans des fusions à la suite de translocations. Par exemple, la fusion du gène de l'interleukine 2, IL2, avec ce qui semble être une protéine à domaine transmembranaire codé par le gène désigné *BCM* dans les lymphomes à cellules T (Laâbi *et al.*, 1992). Il y a aussi le cas intéressant du "*platelet-derived growth factor*" PDGF-B, un récepteur de type tyrosine kinase fusionné au facteur de transcription TEL un membre de la famille *ETS* dans les leucémies chroniques myélomonocytaires,(Golub *et al.*, 1994), et une tyrosine kinase, ALK, fusionnée à une protéine nucléolaire NPM, dans les LNH (Morris *et al.*, 1994).

Un exemple important de fusion de facteur de transcription est celui qui apparaît

après la translocation t(15;17)(q21;q11-22) dans les LAP. Cette translocation implique le gène codant le récepteur de l'acide rétinoïque α (RAR α) (pour revue voir Lavau C. et Dejean A., 1994). Les patients présentant une LAP entrent en rémission à la suite d'un traitement à l'acide rétinoïque (RA) tout trans, une disparition des blastes leucémiques par induction de la différenciation terminale est alors observée.

Le point de cassure implique le gène RAR α et un gène nommé *PML*. Le RAR α est un récepteur nucléaire dont le ligand est l'acide rétinoïque. En se fixant à l'ADN par l'intermédiaire d'une région en doigts de zinc, il activerait un certain nombre de gènes cible.

De la même manière la protéine PML est une protéine contenant un autre type de doigts de zinc le motif "*RING finger*"suivi d'un motif "*coil-coil*" pouvant constituer un motif d'interaction protéine-protéine. Le produit de fusion PML-RAR α contient la majorité des domaines fonctionnels des deux protéines.

Quel est le rôle de la chimère PML-RAR α ?

Le produit de fusion peut se fixer à l'ADN, mais la situation se complique par la capacité à fixer l'acide rétinoïque, la transcription des gènes devant s'opérer de manière RA dépendante.

Un variant de translocation t(11;17)(q23;q21) (Chen *et al.*, 1994) fusionne le RAR α à un autre facteur de transcription putatif **PLZF** pour "*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*", produisant une protéine de fusion ressemblant à PML-RAR α , dans laquelle une partie de RAR α est fusionnée à la partie amino-terminale de *PLZF* (incluant deux des neufs doigts de zinc) (Chen *et al.*, 1994). Les translocations dans les LAP pourraient donc confèrer de nouvelles spécificités de fixation à l'ADN par le RAR α .

Une situation analogue est celle des cellules de LAL pré-B qui possédent une translocation t(1;19). Dans ce cas, il y a fusion de la partie amino-terminale du facteur de transcription E2A, qui contient un domaine transactivateur, à l'homéodomaine du facteur de transcription PBX (Kamps *et al.*, 1990, Nourse *et al.*, 1990), remplaçant la partie bHLH de E2A. Les gènes cible fixant l'homéodomaine de PBX dans les protéines de fusion sont probablement activés et doivent intervenir dans le développement précoce de la tumeur.

La translocation t(17;19), assez rare dans les LAL-B, implique un autre produit de fusion, E2A/HLF, qui possède un domaine activateur de la transcription (Hunger *et al.*, 1992; Inaba *et al.*, 1992). La translocation chromosomique place le gène de fusion

sous le contrôle du promoteur E2A, actif dans les cellules lymphoïdes, qui stimule probablement des gènes cible normalement controlés par HLF.

Dans les leucémies de l'enfant, la région 11q23 est fréquemment affectée par une remarquable variété de translocations chromosomiques et de délétions, donnant naissance à des tumeurs de phénotype hématopoïétiques. Dans tous ces cas, le gène MLL (appelé aussi ALL-1, HRX, HTRX) (Gu et al., 1992, Tkachuk et al., 1992) est cassé dans une étroite région, au niveau des régions codantes du gène. Il en résulte une série de protéines chimériques, spécifiques des leucémies aiguës, cruciales dans le développement de la tumeur et conservant la partie amino-terminale de MLL. Le gène MLL code une protéine avec plusieurs motifs: une région N-terminale "AT hook" ou crochet AT, une région homologue aux méthyl-transférases (MT) de mammifères, une région avec des doigts de zinc et une partie C-terminale homologue au gène trithorax de drosophile (Gu et aL., 1992; Tkachuk et al., 1992), d'où son nom de HTRX (human Trithorax). Dans chaque translocation, la région contenant des doigts de zinc de MLL est perdue sur le dérivé du chromosome 11. Dans les t(11;19), ENL est fusionnée à MLL après la cassure du gène ENL, très proche de sa région N-terminale (Tkachuk et al., 1992), qui donne une chimère MLL-ENL qui fusionne les régions "AT hook" et MT à un segment protéique riche en résidus sérine et proline, pouvant donc jouer un rôle d'activation de la transcription. Des phénotypes différents de tumeurs peuvent exprimer des protéines chimériques similaires ou identiques, suggérant donc que le phénotype tumoral n'est pas dicté uniquement par la translocation seule. La région "AT hook" fixe le petit sillon de l'ADN et, de ce fait, doit favoriser l'accès à d'autres facteurs de transcription. Le rôle du domaine MT n'est pas clair mais il doit permettre aux protéines de fusion MLL de modifier l'état de l'ADN et donc d'affecter la transcription (Rabbitts., 1994).

En dépit de la grande variété des changements affectant la région 11q23, deux caractéristiques semblent apparaître:

- les régions en doigts de zinc de MLL sont perdues, abolissant probablement une activité de fixation spécifique à l'ADN.

- les régions "*AT hook*" et MT sont par contre maintenus, permettant une fixation non spécifique à l'ADN et une altération de la méthylation. Il semble que le partenaire de fusion ne soit pas important puisque MLL est tronqué.

Il est donc devenu évident que les protéines de fusion dans les leucémies sont finalement aussi importantes que les activations de proto-oncogènes par juxtaposition avec un gène antigène récepteur. Les translocations chromosomiques étudiées dans de nombreuses tumeurs hématologiques ont permis d'établir trois principes généraux:

- Translocations spécifiques et inversions sont impliquées dans l'étiologie de la tumeur, activant un proto-oncogène proche du point de cassure dans un grand nombre de tumeurs.

- De nombreuses translocations chromosomiques ou inversions impliquent les gènes des Ig et du TCR, normalement réarrangés dans le développement lymphoïde, qui parfois donnent naissance à la formation d'un transcrit de fusion tumeur spécifique.

- Le plus fréquemment, des facteurs de transcription sont affectés et il en résulte probablement l'activation de gènes cible en amont.

Tableau II

Activation de gènes par formation de transcrits chimériques d'après T.H Rabbitts (1994), et Drexler *et al.* (1995)

Types	gènes affectés	domaines protéiques*	protéines de fusion*	pathologies**
inv(14)(q11;q32)	TCRa(14q11)	TCRCa	VH-TCR ca	T/BLymphoma
	VH (14q32)	lgVH		
t(9;22)(q34q11)	cABL(9q34)	tyrosine kinase	serine + tyrosine kinase	LMC/LAL
	BCR (22q11)	serine kinase	na na 1111 na 112 martina anna an anna anna anna anna anna an	
t(1;19)(q23;p13.3)	PBX1 (1q23)	HD	AD+HD	LAL pré-B
	E2A(19p13.3)	AD-b-HLH		
t(17;19)(q22;p13)	HLF (17q22)	bZIP	AD +bZIP	LAL pré-B
	E2A (19p13.3)	AD-bHLH		
t(15;17)(q21;q11-22)	PML(15q21)	ZNF	ZNF+Domaines de fixation	LAP
	RARA (17q21)	recepteur Ac retinoic a	du DNA RAR et du ligand	
t(11;17)((q23;q21)	PLZF(11q23)	ZNF	ZNF+Domaines de fixation	LAP
	RARA(17q21)	RARa	du DNA RAR et du ligand	
t(4;11)(g21;g23)	MLL (11g23)	AThook/ZNF	AThook+ser-pro	LAL/LALpré-B/LANL
	AF4(4q21)	riche en ser et pro		
t(9;11)(q21;q23)	MLL(11q23)	AThook/ZNF	AThook+ser-pro	LAL/LALpré-B/LANL
	AF9/MLLT3(9p22)	riche en ser et pro		
t(11;19)(q23;p13)	MLL(11q23)	AThook/ZNF	AThook+ser-pro	LAL/LALpré-B/LANL
	ENL(19p13)	riche en ser et pro		
t(X;11)(p13;q23)	MLL(11q23)	AT hook / ZNF	AThook+ser-pro	LAL-T
	AFX1 (Xq13)	riche en ser et pro	anna an ann an an an an an an an an an a	
t(1;11)(p32;q23)	MLL (11q23)	AThook/ZNF	AThook+?	LAL
	AF1P (1p32)	homologue de Eps15		
t(6;11)(q27;q23)	MLL (11q23)	AThook/ZNF	AThook+?	LAL
	AF6 (6q27)	homologue de la myosine	an ana ana amin'ny tanàna amin'ny tanàna amin'ny tanàna amin'ny tanàna amin'ny tanàna mandritry dia mandritry t	
t(11;17)(q23;q21)	MLL(11q23)	AThook/ZNF	AThook+ZIP	LAM
	AF17 (17q21)	riche en cys/ZIP		
t(8;21)(q22;q22)	AML1 (21q22)	DNA binding	DNA binding + ZNF	LAM
e ten al de la cale de la celara	ETO/MTG8(8q22)	ZNF		
t(3;21)(q26;q22)	AML1 (21q22)	DNA binding	DNA binding+ZNF	LMC
	EVI1 (3q26)	ZNF		
t(6;9)(p23;q34)	DEK (6p23)	?	?+ZIP	LAM
	CAN (9q34)	ZIP	A . 710	1.4.00
9,97	SET (9q34)	ר חוד	(+2112	LAND
*(4:46)/=26:=42)	CAIV (9934)	2IF # 2	Шолты	lumahama T
t(4;16)(q26;p13)	IL2 (4q20)	ILZ 2/domoine TM	1L-2/ TWI	Lympnome i
(nu/2:2)/n42:n44.2.44)	BCM(10p13)	DNA binding activator	DMA hinding+2	I KILE
linv(2,2)(p13,p11.2-14)	NPC(2011 2614)	inconnu	DivA Duioung+!	LIND
inv(16)(n13 a22)	Myosin MYH11(16p13)	DNA binding?		LAM
	CBF-ß (16a22)			
t(5:12)(033:013)	PDGF-8(5a33)	Recepteurkinase	Kinase+DNA binding	LMMC
-1~!·-\144~!ba.ek	TEL(12p13)	Ets like DNA binding		
t(2;5)(p23;a35)	NPM(5q35)	phosphoproteine nucléolaire	Nterminal NPM+kinase	LNH
x + − / x − − − − − − − − − − − − − − − − −	ALK(2p23)	Tyrosine kinase		

AD: domaine transactivateur; HD: homéo-domaine; ZIP: motif leucine-zipper; ZNF: doigt de zinc;

** voir tableau I

II- Mécanismes moléculaires des translocations.

a) Mécanismes de recombinaison des Ig:

Au cours de la maturation lymphoïde, les gènes d'Ig et du TCR réarrangent leurs séquences constituées de parties variables **V**, de diversité **D** et de jonction **J** (Tonegawa.,1983). Ces recombinaisons s'effectuent grâce à l'intervention, dans un processus enzymatique, de la V-D-J recombinase qui reconnaît des séquences " signaux" spécifiques adjacentes aux différents segments **V**,**D** et **J** (Tonogawa *et al.*,1983). Ces séquences sont composées d'un héptamère séparé par 12 ou 23 paires de bases d'un nonamère. Les plus courantes pour les segments V des chaînes lourdes ou légères sont CACAGTG...ACA(A/T)AAACC ou pour les segments J,GGTTTTTGT...CACTGTG. Ces séquences conservées sont donc quasiment inverses-complémentaires entre elles, leur appariemment formant la boucle "12 mers 23 mers". L'intervention de la recombinase permet la jonction d'un segment avec un autre selon le schéma ci-dessous.



Figure 1: Représentation schématique des signaux de jonction des gènes d'Ig.

Ce processus est parfois imprécis. Au site de jonction, des nucléotides peuvent être délétés, substitués ou ajoutés constituant la "région N". Cette région est corrélée avec la présence de la TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transférase*) (Desiderio *et al.*, 1984).

Durant la commutation de classe des Ig, après stimulation antigénique, un gène VH se lie directement à un gène C γ ou C α . Dans ce cas, la recombinaison s'opère grâce à des séquences reliant les gènes VH et CH, séquences composées de répétitions en tandem du type TGAGC ou TGGGG (Kataoka *et al.*, 1981), nommées régions" Switch: S". Ces recombinaisons homologues sont réalisées par la recombinase spécifique de classe.

Ces séquences ressemblent à d'autres séquences dites "Chi" (Kenter et Brtshtein.1981; Smith., 1983), octamère GCTGGTGG. Stimulant la recombinaison homologue en général, elles facilitent la commutation de classe des chaînes lourdes des Ig.

b) Séquences retrouvées à proximité des remaniements chromosomiques et mécanismes de translocation:

Des erreurs de recombinaison mitotique survenant au cours des réarrangements des gènes des Ig ou du TCR pourraient expliquer la récurrence des translocations. On a éffectivement mis en évidence, à proximité des points de cassure, des signaux de recombinaison qui pourraient participer aux réarrangements de ces gènes. Ces signaux sont soit des séquences héptamère/nonamère (Tonogawa ., 1983) soit des séquences S (Schmizu et Honjo. 1984) ou des séquences Chi (Kenter et Birshtein., 1981).

Dans le cas du lymphome de Burkitt, l'étude des séquences situées de part et d'autre des translocations t(8;14), est particulièrement intéressante. Le LB africain des zones endémiques se distingue du LB sporadique, non seulement par son association avec l'EBV comme nous l'avons décrit précédemment, mais également par les séquences qui ont été retrouvées à proximité des différents points de cassure (Peluci *et al.*, 1986): des séquences heptamères/nonamères retrouvées dans les lymphomes africains reflètent des erreurs de recombinaison qui se produiraient lors des réarrangements VDJ qui conduisent aux gènes fonctionnels. Dans le cas du lymphome sporadique de type européen, des séquences S, retrouvées à proximité des points de cassure, témoignent d'erreurs qui surviendraient plutôt lors de la commutation de classe des Ig.

Des séquences susceptibles de faciliter les translocations ont également été recherchées à proximité de translocations récurrentes n'impliquant pas les gènes d'Ig ou des TCR. Des répétitions de "séquences Alu" ont été localisées à proximité du gène PBX1 impliqué dans la translocation t(4;11) des LAL pré-B (Djabali *et al.*, 1992).

Au niveau des régions de cassure dans les translocations impliquant des oncogènes,

Tableau III Consensus "chi-like" retrouvé au niveau des points de cassure des réarrangements abérrants des oncogènes d'après M. Krowczynska (1990)

(consensus: GC(A/T)GG(A/T)GG les séquences identigues au consensus sont soulignées).

oncogène	tumeur/lignée cellulaire	région impliquée	consensus	distance du point de cassure	origine du consensus
c-myc	Daudi	DJH	GCAGGTGG	0 bp	Ch 14
t(8;14)	EW36	Su, γ	<u>GCAGGTGG</u>	2 bp	Ch 14
	SKW-3	Jα	GCAGGAAG GCAGGAAG <u>GCTGGTGG</u>	2 bp 2 bp 42 bp	Ch 14 CH 14
bcl2 ((14:18)	FL 1003	JH6	GAAGGAGG	0 bp 9 bp	Ch 18
	ALL 144	JH4	GAAGGAGG	0 bp 9 bp	Ch 18
	JLN	JH4	GAAGGAGG	2 bp	Ch 18
	FL 7832	JH4	GAAGGAGG	53 bp	Ch 18
	SU-DHL-6	JH6	<u>GCAGGAGG</u> GAAGGAGG	62 bp 85 bp	Ch 18
	FL 1144	JH6	<u>GCAGGAGG</u> GAAGGAGG <u>GCAGGAGG</u>	94 pp 103 bp 112 bp	Ch 18
bci1	CLL 1386	JH4	TCAGGAGG	12 bp	Ch 11
t(11;14)	CLL 271	JH4	TCAGGAGG	7 bp	Ch 11
tc/2	8511	DDJγ	GAAGGAGG	10 bp	Ch 14
t(11;14)	LALW-2	DJγ	GCTGGGGG GCTGGGGG	24 bp 9 bp	Ch 14 Ch 14

il fut retrouvé des séquences octamères "chi-like", séquences GC (A/T) GG(A/T) GG (Krowczynska *et al.*, 1990). Dans ces translocations créées apparemment par la VDJ recombinase, cette séquence "chi-like" fut trouvée avec une forte probabilité ($p < 10^{-10}$), à quelques bases à peine du point de cassure. Trois réarrangements de *BCL2* se situent précisément à côté de ce consensus qui définit la bordure 5' du MTC de cet oncogène. Plusieurs cas de translocation impliquant l'oncogène *MYC* apparaissent également à 2 pb de cette séquence octamère. L'existence de cette séquence, au sein même du site de translocation, suggère donc une fonction dans le processus de recombinaison spécifique au site "chi". Elle représenterait un signal subsidiaire de recombinaison dans les réarrangements des gènes des Ig. Ce consensus semble donc être tout aussi important que les séquences signaux héptamère/nonamère pour la VDJ recombinase, dans certains groupes de réarrangements, ces séquences joueraient un rôle accélérateur de la "*VDJ recombinaison*"(Smith., 1983; Kenter et Birshtein. 1981).

PROTEINES POSSEDANT UN DOMAINE D'INTERACTION PROTEINE-PROTE**INE** DE TYPE BTB/POZ

I- Généralités sur les motifs apparentés aux doigts de zinc.

Les interactions protéine - ADN sont impliquées dans des processus nombreux et fondamentaux comme la transcription, la réplication, la recombinaison et la restriction. Les interactions spécifiques avec l'ADN sont possibles grâce à l'existence de divers motifs structuraux des protéines. Parmi les motifs structuraux de liaison à l'ADN, il existe les structures en hélice-coude-hélice (Harrison *et al.*, 1991), les homéoprotéines (Gehring *et al.*, 1987). Certaines homéoprotéines possèdent d'autres motifs impliqués dans la reconnaissance de séquences d'ADN au voisinage du domaine homéo, comme le domaine *paired (prd)* (Bopp et al., 1986), ou le domaine POU (Herr *et al.*, 1988). Un autre domaine de liaison à l'ADN est représenté par le motif basique hélicoïdal *leucine zipper (b ZIP)* (Landschulz *et al.*, 1988; Vison *et al.*, 1989). Parmi ces motifs, les plus couramment utilisés semblent être les motifs pouvant fixer le zinc. Ils peuvent être subdivisés en 6 grandes classes.

Le motif à doigts de zinc le plus courant est représenté par le motif de type C2H2, caractérisé par 2 cystéines et 2 histidines conservées qui fixent "tetraédriquement" un atome de zinc, ce qui stabilise une structure secondaire comprenant deux feuillets β anti parallèles et une hélice α . La partie N-terminale de chaque hélice α est responsable des interactions spécifiques avec l'ADN, chaque doigt reconnaissant 3 paires de bases (Lovering *et al.*, 1993). Le prototype de ce motif est constitué par le facteur de transcription de la RNA polymérase III de xénope (TFIIIA) (Miller *et al.*, 1985). Le motif a ensuite été identifié chez la levure, la Drosophile et parmi les vertébrés, dans des protéines jouant un rôle important dans des fonctions de régulation comme la protéine *Krüppel* (Kr) de Drosophile (Sawer et Jäckle.,1993).

Le motif à doigts de zinc de type C4. Cette seconde classe a été décrite avec des protéines de la famille des récepteurs nucléaires stéroides, différent du doigt de zinc classique par le fait qu'il fixe deux atomes de zinc (Schwabe J.W.R & Rhodes D, 1991) pour former un domaine simplement replié avec 4 cystéines liant un atome de zinc. Le mode de fixation de ce domaine à l'ADN diffère de celui du doigt de zinc C2H2 classique car le récepteur se fixe comme un dimère à une séquence d'ADN palindromique.
Le motif GAL4.

La troisième classe est représentée par le motif de fixation à l'ADN du facteur de transcription de Levure GAL4 (Kraulis P. *et al.*, 1992), qui fixe deux atomes de zinc par 6 cystéines. Ce motif utilise également une hélice α pour une fixation spécifique à l'ADN.

Le motif GATA1.

GATA1 est un facteur de transcription murin codant une protéine se fixant à l'ADN et s'exprime principalement dans des cellules erythroïdes, mégacaryocytes et dans des cellules glandulaires et testiculaires. Cette protéine possède 2 domaines ressemblant au doigt de zinc de type <u>C-X2-C-X17-C-X2-C</u> (Whyatt *et al.*, 1993). La fixation du facteur GATA1 à l'ADN est réalisée grâce à ces 2 domaines de type doigts de zinc. Des protéines de la même famille, nommées GATA2, GATA3 et GATA4 furent identifiées à cause de leurs fortes homologies dans les régions en doigts de zinc. Tous ces facteurs GATA se fixent sur les consensus GATA avec une forte affinité (Ko *et al.*, 1993; Merika *et al.*, 1993)

Le motif *RING FINGER*.

C'est un motif riche en résidus cystéines qui provient de la séquence du gène humain RING1, gène proche du Complex Majeur d'Histocompatibilité (CMH) sur le chromosome 6. Ce motif est décrit comme <u>C-X2-C-X(9-27)-C-X(1-3)-H-X2-C-X2-</u> <u>C-X(4-48)-C-X2-C</u> (Freemont. 1993). Une cinquantaine de membres sont actuellement connus dans cette nouvelle famille qui comprend des gènes impliqués dans la régulation du développement et dans la différenciation cellulaire.

Il existe un variant du motif **RING FINGER** décrit ci-dessus où avec la 4ème cystéine est remplacée par une histidine. Cette 2ème famille de protéines RING comprend des protéines dont la fonction suggérée est l'interaction protéine-protéine ou protéine-membrane (Freemont. 1993; Borden *et al.*, 1995).

Une sous-classe parmi les protéines **RING FINGER** est définie par la présence d'un second motif riche en cystéines appelé" B-Box" et un motif "coiled coil" de localisation C-terminale par rapport au motif RING FINGER. Dans cette sous famille, on trouve les protéines RET, PML, T18, TIF ayant des propriétés de transformation cellulaire lorsqu'elles sont retrouvées sous forme de protéines de fusion chez l'homme et la souris (Freemont. 1993).

Le motif *LIM*.

-LIM homéodomaine

Ce dernier motif protéique apparenté au motif à doigt de zinc, riche en cystéines, est du type <u>C-X2-C-X(17-19)-H-X2-C-X2-C-X(10-20)-C-X2-D/H/C</u> (Schmeichel et Berckerle. 1994). On trouve ce motif dans une variété de protéines possédant des fonctions et des distributions sub-cellulaires diverses incluant des facteurs de transcription, des proto-oncogènes, des composants de la plaque d'adhésion et du cytosquelette. Ce motif LIM a tout d'abord été identifié dans 3 facteurs de transcription importants pour le développement Lin-11, Isl-1de rat et Mec 3 de *C.elegans* d'où l'acronyme LIM est dérivé (Freyd et al 1990; Karlsson et al 1990).

Chacun des membres de la famille LIM est composé de deux régions séparées et répétées en tandem du motif LIM lié à un domaine homéodomaine et un domaine potentiel d'activation de la transcription (LIM homéodomain). Depuis, un certain nombre de protéines requises pour la détermination du destin des cellules durant le développement ont maintenant été identifiées (Crawford et al 1994).

-LIM seul.

Cette seconde classe de protéines LIM appelées "LIM only" pour LIM seul, ne possède pas d'homéodomaine (domaine classique de fixation à l'ADN) mais sont caractérisées par 1 à 3 domaines LIM. Parmi les protéines rentrant dans cette sousclasse, un grand nombre sont supposées jouer un rôle dans la transmission du signal, le contrôle et le destin des cellules. En dépit du fait que les domaines LIM sont des caractéristiques prédominantes de certaines protéines possédant un rôle physiologique essentiel, la fonction de ce domaine n'a pas encore été réellement définie et une controverse persiste pour savoir si ce domaine intervient dans des interactions protéineprotéine et/ou protéine-acide nucléique (Freyd *et al.*, 1990, Rabbit et Boehm. 1990, Sadler *et al.*, 1992, Sanchez-Garcia et Rabbitts. 1994). Récemment l'étude d'une protéine de la plaque d'adhésion, la zyxin, possédant en C-terminal 3 domaines LIM, a montré qu'elle semble fonctionner comme une unité responsable des interactions protéine-protéine. En effet, un des trois domaines LIM de la zyxin a été montré suffisant pour l'établissement d'une association avec une protéine riche en cystéine: la protéine CRP (Michelsen *et al.*, 1994; Kosa *et al.*, 1994). L'analyse comparative d'éléments communs, en dehors des répétitions en doigts de zinc, a permis l'identification de domaines structuraux conservés, comme le domaine FAX (Knöchel *et al.*, 1989) trouvé dans un grand nombre de protéines ZFPs, protéines à doigts de zinc de Xénope. Le domaine KRAB (Krüppel Associated Box) ou BFP qui apparaît similaire (Rosati *et al.*, 1991) et un domaine identifié dans des protéines ZFPs chez l'homme, la souris et le xénope qui est responsable d'une activité transrépressive.

Un grand nombre de protéines à doigts de zinc qui contiennent la séquence conservée de 6 acides aminés H/C entre les 2 doigts, sont classées comme membre de la sous-famille *Krüppel* de protéines à doigt de zinc. Finalement, certaines protéines à doigts de zinc partagent avec des protéines de poxvirus et des protéines se fixant à l'actine une région, généralement amino-terminale, conservée nommée domaine **BTB/POZ** (Zollman, *et al.*, 1994; Bardwell et Treisman.1994) pour **B**ric à brac, Tramtrack, **B**road complex / **P**oxvirus Zinc finger. Cette région hydrophobe de 120 acides aminés est également appelée ZIN (Zinc finger Nterminal) (Numoto *et al.*, 1993) ou **TAB** (Sugawara *et al.*, 1994).

Doigt de zinc (ressemblant à TFIIIA) C1-X(2-4)-C2-X12-H3-X(3-4)-H4	
Récepteur nucléaire C1-X2-C2-X13-C3-X2-C4-X14-C5-X6-C6-X9-C7-X2-C8	
Domaine régulateur de la protéine kinase C C1-X2-C2-X(13-14)-C3-X2-C4-X7-C5-X7-C6	
GAL4 C1-X2-C2-X6-C3-X6-C4-X2-C5-X6-C6	
Boite-B (associée aux RING finger) C1-X2-H2-X7-C3-X7-C4-X2-C5-X5-H6-X2-H7	
MotifLIM C1-X2-C2-X(17-19)-H3-X2-C4-X2-C5-X2-C6-X(7-11)-C7-X8-C	8

RING finger C1-X2-C2-X(9-27)-C3-X(1-3)-H4-X2-C5-X2-C6-X(4-48)-C7-X2-C8

Figure 2: Comparaison des motifs RING finger avec les autres motifs riches en cystéine. Cystéine (C) et Histidine (H) en gras, X représente n'importe quel acide aminé. d'après **S. Freemont** (1993)

II- Mise en évidence des protéines BTB/POZ:

La notion de domaine BTB/POZ vint d'abord de la comparaison des protéines de drosophile : *tramtrack* (TTK) et *broad complex* (BRC).

<u>TTK</u> est une protéine de type C2H2 clonée par sa capacité à se fixer à l'ADN au niveau du promoteur du gène *fushi tarazu (ftz)*, un gène *pair- rule* (Harrison et Travers. 1990). TTK est un répresseur transcriptionnel des gènes *ftz*, *eve*, *odd*, *run*, et *en* (Xiong et Montel. 1993, Brown et Wu. 1993), et est également requis pour la détermination du destin des cellules au niveau de l'oeil de Drosophile. Ce gène *ttk* code 2 protéines de 69 et 88 KDa (P69 et P88) possédant deux paires de doigts de zinc (Read et Manley, 1992).

La protéine P69 fut purifiée sur la base de sa fixation sur les régions régulatrices de 2 gènes *pair-rule fushi tarazu (ftz)* (un membre de la classe des gènes *pair-rule* de segmentation exprimés dans l'embryon de Drosophile) et *even skipped (eve)*. Quant à la P88, elle a été montrée se fixant sur une région régulatrice du gène *engrailed (en)*, qui est un gène de polarité des segments. Les deux protéines P69 et P88 sont identiques sur leur 286 résidus N-terminaux mais possèdent une région C-terminale en doigts de zinc différente.

<u>BR-C</u> est activable par la 2B5-ecdysone et représente un élément essentiel dans la métamorphose de la Drosophile. Les clônes d'ADNc hybridant avec cette région génomique définissent une famille de 4 protéines (Dibello *et al.*, 1991) nommées de Z1 à Z4, possédant des ressemblances (Von kalm *et al.*, 1994). Toutes ces protéines possèdent en effet une région N-terminale de 431 résidus (appelé "*BR core*") fusionnée à une région C-terminale alternative de paire de doigts de zinc ainsi que d'autres domaines riches en acides aminés particuliers.

Au sein de ce "BRcore", 113 acides aminés N-terminaux présentent une forte homologie (55% d'identité) avec une région de même taille dans la protéine TTK (Dibello et al., 1991).

Par la suite, on découvrit une forte homologie de séquence entre le domaine Nterminal commun à BRC et TTK, et une partie amino terminale de 7 protéines virales de fonctions inconnues trouvées parmi 3 poxvirus distincts (Koonin *et al.*, 1992) et grâce au clonage préalable d'une protéine humaine à doigts de zinc : KUP (Chardin *et al.*, 1991). Ceci fut à l'origine de la découverte de ce domaine BTB/POZ retrouvé parmi de nombreux vertébrés et contenant actuellement 35 membres protéiques. L'i m - portance de ce nouveau domaine devint évidente ces deux dernières années avec le clonage de nouveaux membres, comprenant des protéines complètes ou des séquences codantes de parties de protéines, isolées par PCR ou par comparaison dans des bases de données. Ces membres se séparent en 3 classes distinctes en fonction de la présence de motifs structuraux particuliers et/ou de leur rôle biologique putatif.

III- Classification des protéinesBTB/POZ. (d'après la revue de Albagli et al., 1995).

Parmis les quelques 35 protéines contenant un domaine BTB/POZ connues à l'heure actuelle, la majeure partie (23) constitue une classe de protéines nucléaires contenant pour la plupart des doigts de zinc. Elles peuvent se diviser en 3 catégories:

- Des protéines isolées grâce à leur interaction avec des éléments de réponse dans des promoteurs cibles connus.

- Deux protéines impliquées dans des cancers humains: LAZ3/BCL6 dans les LNH et PLZF dans les LAP.

- Des protéines jouant un rôle dans la régulation du développement chez la Drosophile.

Les protéines BTB/POZ interagissant avec l'ADN.

La plupart des membres de cette classe sont des protéines comportant un motif en doigts de zinc. Parmi les gènes récemment clonés contenant un domaine BTB/POZ lié à un domaine en doigts de zinc, on trouve :

Le réprésseur transcriptionnel ZF5.

Il correspond à un ADNc murin isolé sur la base de ses capacités à se fixer à l'ADN (Numoto *et al.*,1993), codant une protéine de type C2H2, qui contient en C-terminal 5 doigts de zinc de type *Krüppel* et caractérisée par une portion N-terminale où 41 acides aminés sont homologues à la région amino-terminale de plusieurs autres protéines, comme la protéine KUP humaine et plusieurs protéines à doigts de zinc de drosophile. Ce domaine, appelé ZIN par ces auteurs, correspond en fait au domaine BTB/POZ. **ZF5** se fixe sur 2 sites dans le promoteur du gène *MYC* et sur 50 paires de base du promoteur

-32-

de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex. **ZF5** code un répresseur transcriptionnel, son domaine de répression étant localisé dans une région amino-terminale par rapport au domaine en doigts de zinc.

PLZF:

C'est un gène localisé sur le chromosome 11 qui est fusionné dans les Leucémies Aigues Promyélocytaires (LAP) au gène codant le récepteur α de l'acide rétinoïque (RAR α) donnant 2 protéines de fusion réciproques. L'une contient le domaine A du RAR α fusionné au C-terminal de PLZF, l'autre contenant le N-terminal de PLZF fusionné aux domaines B à Fcontenant l'ensemble des domaines fonctionnels du RAR α . PLZF code un facteur de transcription contenant une région C-terminale de type C2H2. Les 100 premiers acides aminés de la région N-terminale correspondent au domaine d'homologie avec les gènes LAZ3, ZF5, ttk. Ce domaine, supposé répresseur, pourrait induire des interactions protéine-protéine, PLZF serait capable de s'auto associer. PLZF contient également un domaine acide d'activation transcriptionnelle suggérant qu'il est capable de réguler positivement ou négativement la transcription (English *et al.*, 1994).

LAZ3/BCL6:

Il représente un proto-oncogène putatif, tronqué en 5' de ses régions codantes lors des translocations chromosomiques impliquant la région 3q27, dans les LNH (Kerckaert *et al.*, 1993, Ye *et al.*, 1993b; Miki *et al.*, 1994).

ZID (Zinc finger protein with Interaction Domain)

Le gène ZID code une protéine à doigts de zinc dont les 120 premiers acides aminés constituent un domaine de type BTB/POZ (Bardwell et Treisman.,1994). La partie en doigts de zinc de ZID interagit avec une région "CARG box" au niveau du promoteur de l'actine squelettique humaine. Le domaine BTB/POZ, agissant comme un domaine d'interaction protéine-protéine, inhiberait en transfection le domaine de fixation à l'ADN et apparaît localiser la protéine **ZID** dans des régions discrètes du noyau (Bardwell et Treisman., 1994).

CLONE 18

En criblant une banque d'ADNc avec des sondes oligonucléotidiques contenant des éléments du gène DPA du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II, un clône d'ADNc nommé clone 18 a été isolé (Sugawara *et al.*, 1994). Ce clone code une protéine de 688 acides aminés contenant en C-terminal de la protéine 11 motifs en doigt de zinc de type C2H2.

Les 160 résidus N-terminaux de clone 18, possédent de fortes homologies et similarités aux protéines (humaines de souris et de drosophile) ce qui le classe parmi la sous famille de protéines à doigts de zinc de type Krüppel. Ce domaine N-terminal a été désigné par ces auteurs TAB, pour "Tramtrack Associated Box" (Sugawara 1994). D'après les homologies structurales de sa région N-terminale avec des protéines impliquées dans le contrôle du développement, clone 18 est supposé fonctionner comme un facteur de transcription se fixant à l'ADN qui régulerait la différenciation cellulaire. Cependant si clone 18 est impliqué dans l'activation du locus DPA du CMH de classe II durant le développement des cellules B, quelques questions restent sans réponse. En effet, des tests de transactivation ont montré que les 125 premiers acides aminés aminoterminaux n'activent pas la transcription. La région N-terminale (acides aminés 1 à 195) possède un pouvoir transactivateur faible. La protéine entière transactive peu, seuls les acides aminés 1 à 444 transactivent, en raison d'une région acide probablement transactivatrice, localisée parmi les acides aminés 216 à 254 entre la région N-terminale et les doigts de zinc. Cependant, dans le cas du clone 18, contrairement à ce qui est décrit pour ZID, ce domaine BTB/POZ n'empêcherait pas la fixation des doigts de zinc sur sa cible nucléique représentée par les éléments S et J du gène DPA (Sugawara et al., 1994).

$\gamma FBP-B.$

Dans le but de rechercher des éléments régulateurs qui interviennent dans l'expression spécifique du gène du cristallin chez la souris, 3 clônes d'ADNc, codant des protéines contenant chacune 5 motifs en doigts de zinc, ont été isolés grâce à leur capacité à se fixer spécifiquement au motif de fixation γ F1 des régions promotrices du gène de la γ F-cristalline. Ces ADNc représentant des produits différents dûs à l'épissage alternatif d'un même gène, le γ FBP(Liu *et a*l., 1994). Une de ces isoformes, le γ FBP-B, code une protéine de 641 acides aminés . Elle présente dans sa portion C-terminale un motif C2H2 et une homologie N-terminale aux protéines BTB/POZ. Cette isoforme fonctionne comme un répresseur transcriptionnel dans les cellules du cristallin et son expression est régulée durant le développement du cristallin, ce qui suggère un rôle de cette isoforme dans l'expression du gène du γ F cristalline qui est régulée au cours du développement. Le profil d'expression de ces isoformes, γ FBPs, suggère un rôle régulateur dans la spécification et/ou différenciation du sclérotome.

Les facteurs Z13 et le répresseur du promoteur Adh de Drosophile.

Ces facteurs sont cités comme communication personnelle dans deux publications récentes (Bardwell et Treisman., 1994; Xue et Cooley., 1993) et ne sont pas présents dans la banque de donnée. Il semblerait cependant que le répresseur du promoteur Adh de Drosophile serait le facteur GAGA (Couderc J.L. communication personnelle)

Le facteur de transcription de Drosophile GAGA. (Soeller et al., 1993)

Le facteur GAGA fut identifié comme une protéine se fixant sur le promoteur du gène de drosophile Ultrabithorax (Ubx) (gène important dans le développement de la drosophile), et stimule sa transcription in vitro. Les sites de fixation de ce facteur GAGA sont retrouvés parmi les promoteurs de plusieurs autres gènes de Drosophile: Ubx (Biggin et Tjian., 1988)), hsp70 (Lee et al., 1992), hsp26 (Lu et al., 1993), E74 (Thummel.1989), krüppel (Kerrigan et al., 1991), eve (Read et al., 1990), ftz (Topol et al., 1991), ainsi que le gène codant l'alcool deshydrogénase (Adh) (Benyajati et al., 1992), la chaine B2 de la laminin et les histones H3 et H4. Ce facteur fut d'abord considéré comme un activateur transcriptionnel classique (Biggin et Tjian., 1988) et plus récemment, des études in vitro et in vivo ont montré que ce facteur activait la transcription en agissant comme un anti-répresseur en générant des régions promotrices sans nucléosomes (Tsukiyama et al., 1994). Deux modèles ont été proposés pour expliquer le mode d'action de la protéine GAGA (Farkas et al., 1994). Les sites de fixation pour cette protéine sont nécessaires pour une activation optimale et l'accessibilité à la nucléase dans le transgène de fusion hsp26-lacZ, suggérant que la fonction de GAGA est de "préparer" les séquences régulatrices de ces cibles dans un état ouvert sans nucléosome et donc de prédisposer les gènes cible pour leur activation transcriptionnelle. GAGA semble neutraliser l'activité inhibitrice de l'histone H1 (Raff et al., 1994). Il a donc été suggéré que cette protéine soit un anti-répresseur qui prévient la fixation non spécifique de l'histone H1 dans des régions critiques des promoteurs cibles (Croston et al., 1994).

Le facteur de Drosophile lola (longitudinal lacking) (Giniger et al., 1994).

Des mutations dans le gène *lola* provoquent des anomalies dans le développement de la trajectoire de l'axone dans le système nerveux central embryonnaire de la Drosophile. Donc, **lola** serait un facteur de transcription putatif requis pour la croissance et la direction de l'axone chez la Drosophile. Il agirait de la même façon que d'autres gènes tels que *logo*, *Notch* et *delta*. Le gène *lola* code 2 protéines de localisation nucléaire par épissage alternatif, protéines contenant un motif N-terminal de type BTB/POZ. Comme *ttk* et *BRC*, l'un des 2 produits caractérisés du locus *lola* contient des motifs en doigts de Zinc, l'autre forme de la protéine exprimée préférentiellement dans les neurones ne posséde pas de motif de fixation à l'ADN identifiable. La région de type BTB/POZ de lola pourrait être impliquée dans des interactions de type protéine-protéine avec un domaine de liaison à l'ADN permettant la fonction de régulateur transcriptionnel (Giniger *et al.*, 1994).

Dans ce groupe nous avons également inclus le gène Bric à Brac (bab) de Drosophile.

Le gène bab fut cloné comme un ADNc incomplet de 381 paires de bases codant une protéine nucléaire qui contient dans sa région amino-terminale un domaine de type BTB mais dont la partie C-terminale n'est pas connue. Ce gène est requis pour le développement des membres et des ovaires chez Drosophila melanogaster (Godt et al., 1993). Des mutants pour bab possèdent un phénotype de type homéotique au niveau de la patte. De plus, bab est exprimé selon un gradient discontinu le long de l'axe distal du tarse. Au niveau des ovaires de la Drosophile, la protéine BAB est requise pour un développement harmonieux des filaments terminaux des ovaires à l'état larvaire, eux même requis pour le développement des ovarioles. Des mutations de bab conduisent à la formation d'ovaires désorganisés et à l'obtention de femelles stériles. Une analyse fonctionnelle du domaine BTB de BAB montre que la moitié de la région aminoterminale possède une activité de dimérisation, les résidus 1 à 51 étant nécéssaires et suffisants pour la fixation (Chen et al., 1995). Les acides aminés 1 à 49 forment une structure en hélice α qui posséde une face hydrophobe et riche en résidus leucine sur à peu près la moitié de cette structure. L'analyse de mutants ponctués montre l'importance de ces résidus pour la dimérisation. Il semble également que les résidus lysine 43 et acide aspartique 35 (K43 et D35) soient nécessaires pour la dimérisation, en effet, un changement dans la charge de ces résidus empêche la fixation avec un domaine BTB

sauvage. Seuls les doubles mutants possèdent la capacité de se fixer entre eux, ce qui suppose qu'une interaction ionique entre ces 2 résidus D35 et K43 serait requise pour l'interaction entre 2 domaines BTB/POZ (Chen *et al.*, 1995). Il a récemment été montré que le locus *bab* contient un deuxième gène,BTBII, qui possèderait un domaine BTB/ POZ très similaire aux autres BTB/POZ, ce qui laisserait supposer qu'il permet également une homo ou hétéromérisation. Il semble que ces deux gènes interagissent durant le développement de l'oeuf et de l'ovaire. D'autre part, BTBII à BTBVII (Zollman *et al.*, 1994) qui représentent 5 nouvelles séquences partielles de gènes de Drosophile ont été clonés par PCR en utilisant des amorces dégénérées provenant du domaine conservé BTB/POZ de *bab*.

La plupart des protéines de cette classe sont donc des protéines qui contiennent des motifs en doigts de zinc, une exception est constituée par l'enhancer de la "PEV (Position Effect Variegation) E(var)3-93D".

Ce facteur est dépourvu de motif en doigts de zinc dans sa partie C-terminale mais est riche en répétitions d'acides aminés acides et basiques, une caractéristique souvent associée aux protéines fixant l'ADN avec une spécificité assez lâche (Dorn *et al.*, 1993). Le gène qui code **E(var)3-93D** est localisé dans la région 3D sur le bras 3R du chromosome de la Drosophile.

Chez la Drosophile, les mutations qui modifient la *PEV* (état de condensation locale de la chromatine, connecté avec l'inactivation de gènes) ont souvent été utilisées avec succès pour disséquer génétiquement les composants de la chromatine (Henikoff. 1990).

La région acide N-terminale semble importante pour l'interaction avec le DNA et le domaine hydrophobe conservé impliqué dans des interactions protéine-protéine. Des mutations E(var) entraînent également une expression inappropriée des gènes homéotiques.

Les protéines BRC, le facteur GAGA, E(var)3 93D, BAB et TTK sont classées dans un sous-groupe appelé groupe *ttk*. Le pourcentage d'identité pour le domaine BTB/ POZ dans ce sous-groupe est de 49% comparé à 24% entre les protéines de ce sous groupe et les autres protéines BTB/POZ (Zollman *et al.*, 1994).

Seconde classe de protéines BTB/POZ:

Elle est constituée:

des protéines virales provenant de 3 groupes distincts de poxvirus (Koonin *et al.*,
1992) nommés Vaccinia, Myxoma et Shope Fibrosarcoma,

- du gène Kelch de Drosophile (Xue et Cooley. 1993),

- des protéines putatives déduites du séquençage du chromosome III de Caenorhabditis elegans (Wilson et al., 1994).

Ces protéines ont une caractéristique structurale commune : une région Nterminale BTB/POZ liée à 6 répétitions de 50 acides aminés, terminée par des doublets GLY-GLY (Cooley et Theurkauf. 1994; Way *et al.*, 1995)

Le groupe des poxvirus:

Le séquençage du génome complet des virus à ADN, comme le virus de l'herpès et des poxvirus, suggère que, durant leur évolution, ces virus capturent un nombre de gènes cellulaires. Le virus de la vaccine, prototype des poxvirus, code des protéines ayant un degré important de similitude avec des protéines cellulaires. La séquence complète du génome du virus de la vaccine a été déterminée: 198 régions codent des protéines majeures et 65 régions chevauchantes codent des protéines mineures, pour un total de 263 gènes potentiels (Goebel *et al.*, 1990). Tandis que quelques similitudes avec des protéines de fonction connue ont été identifiées, la fonction de la majorité des protéines déduite des cadres ouverts de lecture reste à déterminer.

Récemment, de fortes similitudes ont été observées entre une protéine du virus de la vaccine et une protéine **MIPP**("Mouse Intracisternal Promoter Placental") d'expression placentaire murine. *MIPP* code une protéine dont la région carboxy-terminale est composée de 4 répétitions de type gly-gly trouvées par exemple dans la protéine C2L du virus de la vaccine (Upton *et al.*, 1990; Chang Yeh *et al.*, 1991). La protéine C2L fait partie d'une famille de protéines de poxvirus qui ont toutes cette structure répétitive.

En recherchant, grâce au programme BLAST, dans des banques de données, des homologies de séquences avec les protéines virales, on retrouve des similitudes avec des protéines cellulaires, en particulier avec les domaines BTB/POZ d'autres facteurs de transcription, comme les protéines BRC de Drosophile ou KUP humaine. En ce qui concerne les doublets de glycine, on les retrouvait aussi bien dans des protéines qui ne possèdent pas de domaine BTB/POZ, comme la protéine MIPP, que dans des protéines virales dont le rôle reste encore largement inconnu. Le rôle de ce motif GLY-GLY restait à élucider. Ceci jusqu'à la découverte et au clonage récent, l'année dernière, des gènes Kelch de Drosophile et Scruin de limulus (Way *et al.*,1995).

La protéine Scruin de la limule:

Les faisceaux d'actine retrouvés dans le processus de formation de l'acrosome de la limule représentent un modèle intéressant pour comprendre la structure d'un amas de filaments d'actine, la biologie cellulaire de la réaction acrosomale et la biochimie des protéines qui se fixent à l'actine. L'acrosome du sperme de la limule est constitué de longs doigts de 80µm supportés par des groupes de filaments d'actine. Ces filaments en amas sont maintenus ensemble par une protéine **Scruin** de 102 kDa identifiée initialement en 1975 par Tilney (Tilney *et al.*, 1975). **Scruin** représente un cas particulier dans lequel on connait plus sa structure tridimentionnelle que ses propriétées biochimiques. Cette protéine est organisée en 2 domaines globulaires, chacun composé de 6 répétitions de 50 acides aminés (se rapporter à la figure 2 page 38): un domaine se fixant **au sous** domaine 1 de l'actine, l'autre au sous domaine 3 d'une sous unité adjacente du même filament d'actine. La séquence en acides aminés déduite de ce gène *scruin* reflète son organisation.

La protéine Scruin ne possède aucune homologie avec des protéines fixant l'actine déjà connues, mais il existe des homologies entre les résidus de 50 acides aminés (motif répété de scruin) et un nombre de protéines dont le premier cadre ouvert de lecture de Kelch une protéine de drosophile (36% d'identité) (Xue et Cooley. 1993), MIPP (Mouse IAP promoted Placental Protein) (Chang-Yeh *et al.*,,,1991), un homologue de MIPP retrouvé dans *Caenorhabditis elegans* (Wilson *et al.*,1994), une protéine d'*Arabidopsis* (Genbank numéro d'accés X71915), la galactose oxydase, ainsi qu'un nombre élevé de protéines de la famille des poxvirus: A55R; FEL; C2Let B10R chez le virus de la vaccine (Goebel *et al.*,1990), D16L.C7L.J6Ret B20R chez les petits poxvirus majeurs de la variole (Goebel *et al.*,1990), T6.T8.T9R parmi les shope fibroma virus (Massung *etal.*,1993), P65 d'ectromelia virus (Senkevich *et al.*, 1993).

La protéine Kelch:

Le gène codant Kelch donne en fait un transcrit inhabituel contenant 2ORF: ORF1

et ORF2, séparés par un codon stop UGA. 2 produits protéiques proviennent des ARNm de *kelch*: une protéine courte provenant de l'ORF1, une plus longue provenant de l'ORF2 comme le résultat d'une suppression partielle du codon UGA.

Le gène de drosophile *kelch* fut isolé d'une mutation affectant le transport cytoplasmique durant la maturation de l'oocyte et rendant les femelles stériles. En réalité, chaque cellule souche donne naissance à un oocyte et 15 cellules nourricières dont le cytoplasme est transporté dans le futur oocyte à travers des ponts intracellulaires appelés "Ring Canal" pour "canal en anneau". 4 protéines sont en fait nécessaires à la construction d'un "ring canal" fonctionnel (Robinson *et al.*, 1994) : une protéine contenant des résidus tyrosine phosphorylée, de l'actine filamenteuse, le produit du gène *hu-li-taï (hts)* qui est un homologue du gène de l'adducin (Yue et Spraddling. 1992) et finalement Kelch. La protéine Kelch apparaît en fait tardivement dans ce processus. Dans les mutants pour cette protéine, la distribution de l'actine est sévèrement affectée. Ceci suggère que Kelch n'est pas nécessaire pour l'assemblage du "ring canal" mais plutôt que cette protéine est importante pour le maintien de l'actine du cytosquelette au niveau des parois intérieures du "ring canal" (Robinson *et al.*, 1994).

Kelch possède 6 segments répétés, chacun d'une longueur de 50 acides aminés. Il existe 25 à 50% d'identité entre ces répétitions et 7 acides aminés invariants entre toutes ces répétitions (se rapporter à la figure 2 page 38). La séquence de l'ORF1 de *kelch* révèle une forte homologie avec des protéines virales de la famille du virus de la vaccine, "shope sarcoma virus".

Protéines putatives déduites de la séquence du chromosome III de C. elegans: (Wilson *et al.*,1994) leur fonction reste inconnue

- Protéines virales :

Le rôle des protéines virales à domaine BTB/POZ reste donc largement inconnu. Quoi qu'il en soit, les dernières étapes du cycle viral d'infection des poxvirus induisent un assemblage important de microvillosités à la surface des cellules de l'hôte, suggérant un effet sur l'actine du cytosquelette (Cooley et Theurkauf 1994).



Figure 3

Variations structurales entre les protéines BTB/POZ: des protéines se liant à l'ADN aux protéines se fixant à l'actine. (D'après O. Albagli *et al.*, 1995).

(les motifs GLY-GLY sont représentés par les boîtes contenant des G, chaque répétition G formant probablement un motif de fixation à l'actine).

Dernière classe des protéines comportant un domaine BTB/POZ.

Dans cette catégorie, sont répertoriées des protéines qui contiennent un domaine BTB/POZ en l'absence de tout autre motif structural clairement défini.

On y classe les séquences partielles de 2 ADNc humains (Adams et al., 1993) Ces ADNc sont issus d'une banque de cerveau humain d'enfant, banque construite spécifiquement pour la production d' "*expressed sequence tags*" (ESTs). Un séquençage au hasard a été effectué pour identifier de nouveaux gènes : 10,000 séquences ESTs ont été déposées dans des banques de données, ce qui correspond à environ 2/3 des gènes humains. EST 3, 4 et 5 représentent des séquences *tags* de cerveau humain contenant un domaine BTB/POZ, EST3 et 4 sont clairement regroupées parmi les protéines à doigts de zinc lorsqu'on utilise le programme CLUSTAL.

Protéines putatives déduites du séquençage génomique de C. elegans (Sulton et al., 1992)

Un domaine BTB/POZ est également retrouvé dans la moitié carboxy-terminale de 2 protéines putatives de *C elegans*, à la suite du séquençage de 2,2 mégabases (Mb) sur les 100 Mb que comporte le génome de *C. elegans*. Les gènes codant ces 2 protéines sont localisés sur le chromosome III (Wilson *et al.*, 1994).

Le produit du gène de Drosophile germ cell less (gcl) (Jongens et al., 1992).

La première étape du processus de détermination du devenir des cellules de l'embryon de Drosophile consiste en la formation d'une lignée de précurseurs germinaux. Le nom de ce gène, *gcl*, vient du fait que des mutants pour ce gène ne forment pas de cellules germinales. C'est un gène maternel, dont l'ARNm est localisé au niveau du pôle postérieur de l'oeuf et nécessaire à la formation du pôle cellulaire. La protéine **Gcl** de 65 kDa, faiblement acide, contenant un domaine BTB/POZ, est de localisation périnucléaire, suggérant qu'elle est associée avec les granules polaires, de plus, elle possède la même localisation que la protéine **vasa**, connue comme étant un composant du granule polaire (Hay *et al* .,1988 et 1990). Les mères qui possèdent une fonction réduite de **Gcl** donnent naissance à une progéniture stérile qui ne possède pas de cellules germinales. **Gcl** semble donc posséder une fonction relative à la voie de spécification des cellules germinales.

.

Figure 4 Alignement de séquences des domaines BTB/POZ. d'après **O. Albagli** *et al.*, 1995

DNA BINDING	GROUP
ttk	QRFC RWNNHQSN SVFDQLLHAETFTDVTLAV-EGQH KAHKAVLSACSPYFNTLFVSH
lola	QQFC RWNNHQST ISVFDTLLENETLVDCTLAA-EGKFIKAHKVVLSACSPYFATLLQEQ
BTB-VII	QQFC RWNNHQPNF SVCSSLLHNGTLVDVTLAA-EGRQLQAHKIVLSACSSYFQALFTTN
bab	QQFC RWNNYQTNUTTIFDQLLQNECFVDVTLAC-DGRSMKAHKMVLSACSPYFQTLLAET
BR-C-Z2	OHFCURWNNYOSSUTSAFENURDDEAFVDVTLAC-EGRSUKAHRVVLSACSPYFRELLKST
BTB-III	DHYSTRWNNHONHILLRAFDALLKTRTLVDVTLVCAE-TSTRAHKMVLSACSPEEORVEAET
E(var)3-93DB	EQFS CWNNFNTNUSAGFHESLCRCDLVDVSLAA-EGQIVKAHRLVLSVCSPFFRK-FTOM
GAGA	SLYS TWGDYGTS WSAL LIRCHGDLVDCTLAA-CGRSFPAHKIVLCAASPELLDLLKNT
BTB-V	OYFS RWNNYONT TSVFOOLREDLSFVDVTLSC-EHGS KAHKVVLSACSTYFORILLEN
cl18	MDGSFVOHSVRVIOELNKOREKGOYCDATLDV-GGLVFKAHWSVLACCSHOFOSLYCDG
LAZ3	ADSC OFTRHASD ULNINGLESS DILTDVVIVV-SREQF AHKTVLMACSGLEYS FTDQ
PLZF-B	GMIO ONPSHPTG CKANO RLAGTLCDVV MV- SOEFHAHRTVLACTSKMFEILFHR-
KUP	DTASHSLV QOLNMORE FGFLCDCTVAI-GDVYFKAHRAVLAAFSNYFKM FI
ZID	DVLHFOFEOOGDVYLOKKNILLROONLFCDVSIYIND-TEFOCHKVILAACSTEMRDOFLLT
ACTIN BINDING	g group
kelch	GOYSNEOHTARSFDAMNE RKOKOLCDVILVA DVE HAHRMVLASCSPYFYA FTS-
EP65	MD DDIKHNRRA SNISSLLDNDILCDVI TIG GEE KAHKT LAACSKYFRTLFTTP
VC2L	ESVIFSI-NGEI COVNKE A-SPYNFFKRIOD
MT'8	M SYPLYKIFLKGKICDVE VA-ECKS AHOLVISAYSKYFYNIFNGN
MT9	SRTLLRFLEDGA SDVT VVACD-STFL HKV LSLHSDYFYRLENGD
VF3L	MP FUNTVYCKN LALSMTKKFK IDAI-CGN IVNST LKKLSPY RTHLROK
т16н12 б	MNFOYTLTO-MPKLPMTFD:CULSFYSNYBRVIABSSK
1101112.0	
OTHERS	
acl	DTTOPKKKKLLTTTOYIYKAI FKEEKNSDVA MAL K-VWHLHKVYKS-OSPVAYT ANG-
EST5	MADVHEVVGPPGA-TRTVPAHKYVLAVGSSVEYA FYG-
т16н12 5	SOLFKUPPCRLADDMYGLEDNKOFSDENHVCKSDLGSPTOTFHTHKA HAARSRVIISA
C50C3 8 T	DEDUSTEE OEEMPEV RANNESMWEDE UFTDC I HVGNKH KAHLC U GONSPUEKS ESSP
DNA BINDING	GROUP
ttk	PEK-HPWVIIK-D-WPYSD KSIMD WYRGWSWDOERITAFIRVADSIR
lola	YDK-HPIFILIK-D-WKYOEIRAMD WYRGEWNISODOIIAAM KAAESIO KGISDNR
BTB-VII	PCO-HP VILK-D-VOYDDIKT ODWYYGWNYSOEOUPH IKTAPMIK KGIA MP
bab	PCO-HP VILL R-D-WNWSDIKA W PMYRGP NVSODO GPILLRIAPMIK GLADVT
BB-C-72	PCK-HPVIIIIO-D-VNFMDIJHAJV/22 VHG2VNVHOKSIJOSFUKTAEVURVSGITOOO
BTB-III	PCK-HP////IK-D-FRGWV/OA
E(var)3-93DB	PSNTHA VEWN-N-VSHSAUKDIN OPWYCGWNWKODAUPAF STAPSIO KCUTDND
GAGA	PCK-HP.W.IA-G-VNANDIEAIA
BTB-V	PCK-HPT HIPAD-HIFTDIKT DE VRGE DVTESENO
c118	SGGSWIIPAGFAEIFGLINDEFWICHIAITSGNRDOULANREUR PEAVEL
LAZ3	LKCNLSUNDDER-WNPEGFCIULDEWWYSRUNDREGNIMAWATAMYLOVEHWDTC
PLZE-B	NSOHYTIDETSPKTFOODIAWAYWYTWOAKAEDIODIAWYAAFIIAEEEYAE
KUP	HOTSECHKUOPTD-HOPDIFSYMHIMVICKGPKOIVDHSRIEE CIRFIHADYISHIA
710	
210	OSKHVRITTIOSAEVGRKILLSCYTGAIEVKRKEILKYITTAASYNOVHIIVEKG
210	QSKHVRITTLQSAEVGRKLLLSCYTGAIEVKRKEILKYLTAASYLQXVHIVEKC
210	QSKHVRUTILQSAEVGRKLLLSCYTGAUEVKRKEULKYUTAASYLQXVHUVEKC
ACTIN BINDING	QSKHVRUTILQSAEVGRKLLLSCYTGAUEVKRKEULKYUTAASYLQXVHUVEKC
ACTIN BINDING	QSKHVRUTILQSAEVGRKLLLSCYTGATEVKRKEULKYUTAASYUQYVHUVEKG 3 GROUP FEESROARU-TLOSVDARABELDUDA WUATVEVNEDNVOVUUTVANLUOTDVRDAG
ACTIN BINDING kelch EP65	QSKHVRUTIIQSAEVGRKIILSCYTGATEVKRKEILKYITAASYIQXVHUVKG 3 GROUP FEESRQARI-TLQSVDARAHELIIDX YTATVEVNEDNVQVHITAANLIQTTDVRDAG MIIRDLVTRVNLOMFDKDAVKNIVOMYNRHUS-SMNVIDVEKCADYLLIDDIVTDG
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L	QSKHVRITILQSAEWGRKLLLSCYTGATEVKRKEILKYLTAASYLQXVH VKC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELLI DYTATVEVNEDNVQVLLTAANLLOTDVRDAC MIIRDLVTRVNLOMFDKDAVKN VQLYNRHIS-SMNVIDVLKCADYLLDDLVTDC HHLKDEAIILNGUNYHAFESLLDYMRWKKINITINNVEMLVAAVIIDVPPVVDLC
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8	QSKHVRITIIQSAEWGRKIILSCYTGALEVKRKEILKYITAASYIQYVH VKC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELLI DYYTATVEVNEDNVQVIIITAANLIQ TDVRDAC MIIRDLVTRVNLOMFDKDAVKN VQIIYNRHIS-SMNVID KKCADYLLIDDLVTDC HHLKDEA IINGINYHAFESLLDYMRWKKINITINNVEM UVAAVIID PPVVDLC FLEKN-VDVIDLA-DYKTVFDVIY MYTESIELHKGNTESUFSLVHYHO KPUIKKC
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9	QSKHVRITIIQSAEWGRKIILSCYTGALEVKRKEILKYITAASYIQYVHIV K <u>G GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELLI DI YTATVEVNEDN QVIIITAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLQMFDKDAVKNIVQIIYNRHIS-SMN ID KCADYLLIDDLVTDC HHLKDEA IINGINYHAFESLLDYMRWKKINITINN EM LVAAVIID PP VDLC FLEKN-VDVIDLA-DYKTVFD YY MYTESIE HKGNTESIFSLVHYLO KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDA RTVFT MYAGCDG NDR-TIDDLQSI VLADYLG TKLVDEG
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L	QSKHVRITIIQSAEWGRKIILSCYTGALEVKRKEILKYITAASYIQYVH V KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELLI DI YTATVEVNEDN QVIIITAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLQMFDKDAVKN VQI YNRH S-SMN ID KCADYLLIDDLVTDC HHLKDEA IINGINYHAFESLLDYMRWKK NITINN EM LVAAVIID PP VDLC FLEKN-VDV DL A-DYKTVFD YY MYTESIE HKGNTESIFSLVHYLQ KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDAVRTVFT MYAGCDG NDR-TIDDIQSI VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLDIDIHS_TS VIXSYTGKVYLDSH-NVVNLDRASILTSVEF IYT
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L T16H12.6	QSKHVRITIIQSAEWGRKILLSCYTGALEVKRKEILKYTTAASYLOXVHIV KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELLI DI YTATVEVNEDN QVILTAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLOMFDKDAVKNIVQI YNRHIS-SMN ID IKCADYLLIDDLVTDC HHLKDEA IINGINYHAFESLLDYMRWKKINITI-NN EM LVAAVITD PP VDLC FLEKN-VD DL A-DYKTVFD Y MYTESIE HKGNTESIFSLVHYLO KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDAVRTVFT MYAGCDG NDR-TIDDLQS VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLDIDIHSLTS VI SYTGKVYLDSH-NVVNLDRASILTSVEFIIYTC FRDSKSTTHRIRL-ISAPDUHLLUTIPKAFEQG KPNISLOKAVE/DEPSAF40.SIPL9YI
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L T16H12.6	QSKHVRITIIQSAEWGRKILLSCYTGALEVKRKEILKYLTAASYLOXVH V KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELLI D. YTATVEVNEDN QVILTAANLLO TD RDAC MIIRDLVTR NLOMFDKDAVKN VQI YNRHIS-SMN ID KCADYLLIDDLVTDC HHLKDEA IINGINYHAFESLLDYMRWKK NITINN EM LVAAVIID PP VDLC FLEKN-VDV DL A-DYKTVFDV Y MYTESIE HKGNTESIFSLVHYLO KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDAVRTVFT MYAGCDG NDR-TIDDIQSI VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLDIDIHSLTS VI SYTGKVYLDSH-NVVNLDRASILTSVEFIIYTC FRDSKSTTHRIRL-ISAPDUHLIJTIPKAFEQG KPNISLQKAVELDEPSAFLQ SIPLDYI
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L T16H12.6 OTHERS	QSKHVRITIIQSAEWGRKIILSCYTGALEVKRKEILKYITAASYIQYVH V KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELLI D. YTATVEVNEDN QVIITAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLQMFDKDA KN QQI YNRH S-SMN ID KCADYLIDDLVTDC HHLKDEA IINGINYHAFESLLDYMRWKK NITINN EM LVAAVID PP VDLC FLEKN-VD DL A-DYKT FD YY MYTESIE HKGNTES FSLVHYLQ KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDA RT FT MYAGCDG NDR-TIDD QS VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLDIDHSLTS VI SYTGKVYDDSH-NVVNLDRASILTSVEF IYTC FRDSKSTTHRIRL- SAPDUHLDTIPKAFEQG KPNISLQKAVED PSAFLQ SIPLDYI
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L T16H12.6 OTHERS qc1	QSKHVRITIIQSAEWGRKILLSCYTGALEVKRKEILKYTTAASYLOVVH V KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELL D. YTATVEVNEDN QVIITAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLQMFDKDA KN QU YNRH S-SMN ID KCADYLLDDLVTDC HHLKDEA TINGINYHAFESLLDYMRWKK NITINN EM LVAAVITD PP VDLC FLEKN-VDV DL A-DYKT FD YY MYTESIE HKGNTES FSLVHYLQ KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDA RT FT MYAGCDG NDR-TIDD QS VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLDIDIHSTS VI SYTGKYYDSH-NVVNLDRASILTSVEF IYTC FRDSKSTTHRIRL- SAPD HLLITIPKAFEQG KPNISLQKAVE DEPSAFLQ SIPLDYI
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L T16H12.6 OTHERS GC1 EST5	QSKHVRITIIQSAEWGRKILLSCYTGALEVKRKEILKYTTAASYLOVVH V KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELL D. YTATVEVNEDN QVIIITAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLQMFDKDA KN QQI YNRH S-SMN ID KCADYLLDDLVTDC HHLKDEA TINGINYHAFESLLDYMRWKK NITINN EM LVAAVID PP VDLC FLEKN-VDV DL A-DYKT FD YY MYTESIE HKGNTESIFSLVHYLQ KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDA RT FT MYAGCDG NDR-TIDDIQS VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLDIDIHSLTS VI SYTGKVYDDSH-NVVNLDRASILTSVEF IYTC FRDSKSTTHRIRL-ISAPDIHLLITIPKAFEQG KPNISLQKAVEIDEPSAFLQ SIPLDYI TWREAQONF QITI DDRITVASIDA/GSMYSDEIEIESADVIS FATATLFH DGEIDKC DLAEVKSEI-HIPDVEPAAFLILLK MYSDE D EADTVI-ATHYAKKYX P MAKX
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L T16H12.6 OTHERS gcl EST5 T16H12.5	QSKHVRITIIQSAEWGRKILLSCYTGALEVKRKEILKYTTAASYLOXVH V KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELL D. YTATVEVNEDN QVIIITAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLOMFDKDA KN QU YNRH S-SMN ID KCADYLLDDLVTDC HHLKDEA IINGINYHAFESLLDYMRWKK NITINN EM UVAAVID PP VDLC FLEKN-VD DL A-DYKT FD YY MYTESIE HKGNTES FSLVHYLQ KPLIKKC FTSP-DTVTIDA-TDDA RT FT MYAGCDG NDR-TIDD QS VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLDIDIHSITS VI SYTGKVYDDSH-NVVNUDRASILTSVEF IYTC FRDSKSTTHRIRL- SAPDUHLLITIPKAFEQG KPNISLQKAVED PSAFLQ SIPLDYI TWREAQONF QITI DDRITVASIDA/GSMYSDEIEIESADVIS FATATLFH DETIKC DLAEVKSEI-HIPDVEPAAFLIJK MYSDE D EADTVI -ATUYAAKKYX P TAKXC HMQESDTN TTVDD EPEV RELLVY MYTGQTKYIEQM-AQSI AAADKYQ DRIKVMG
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L T16H12.6 OTHERS gcl EST5 T16H12.5 C50C3.8	QSKHVRITIIQSAEWGRKILLSCYTGALEVKRKEILKYTTAASYLOVVH V KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELL D. YTATVEVNEDN QVIITAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLOMFDKDAVKN VQI YNRH S-SMN ID KCADYLLDDLVTDC HHLKDEA IINGINYHAFESLLDYMRWKK NITINN EM UVAAVID PP VDLC FLEKN-VDV DL A-DYKT FD YY MYTESIE HKGNTESIFSLVHYLQ KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDA RT FT MYAGCDG NDR-TIDDIQS VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLDIDIHSLTS VI SYTGKVYLDSH-NVVNLDRASILTSVEF IYTC FRDSKSTTHRIRL-ISAPDUHLLITIPKAFEQG KPNISLQKAVEDEPSAFLQ SIPLDYI TWREAQONF QITI DDRITVASLDAV GSMYSDEIEIESADVIS LATATLFH DCHIDKC DLAEVKSEI-HIPDVEPAAFLILK MYSDEID EADTVL-ATLYAAKKXX P DAKXC HMQESDTN TTVDD EPEV RELLV MYTGQTKYIEQM-AQSL AAADKYQ DRIKVMC NMIEAQKGE HT DAKYDS RAVE FMYTGATESLESQGN DE HATADKYEVLM KDOC
ACTIN BINDING kelch EP65 VC2L MT8 MT9 VF3L T16H12.6 OTHERS gcl EST5 T16H12.5 C50C3.8	QSKHVRITIIQSAEWGRKILLSCYTGALEVKRKEILKYLTAASYLOVVH V KC <u>3 GROUP</u> FEESROARI-TLQSVDARAHELL D. YTATVEVNEDN QVILTAANLIQ TD RDAC MIIRDLVTR NLQMFDKDA KN QQ YNRH S-SMN ID KCADYLLDDLVTDC HHLKDEA TINGINYHAFESLLDYMRWKK NITINN EM UVAAVID PP VDLC FLEKN-VD DL A-DYKT FD YY MYTESIE HKGNTES FSLVHYLQ KPLIKKC FTSP-DTVTLDA-TDDA RT FT MYAGCDG NDR-TIDD QS VLADYLG TKLVDEC YTKNKDPVTRVCLD DIHSTS VI SYTGKVYDSH-NVVNLDRASILTSVEF IYTC FRDSKSTTHRIRL- SAPDUHLLTIPKAFEQG KPNISLQKAVED PSAFLQ SIPLDYI TWREAQONF QITI DDRITVASIDA/ GSMYSDEIEIESADVIS FATATLFH DCHIKKC DLAEVKSEI-HIPDVEPAAFLILK MYSDEID EADTVI ATUYAAKKYX P DAKXC HMQESDTN TTVDD EPEV RELLV MYTGQTKYIEQM-AQSI AAADKYQ DRIKVMC NMIEAQKGE HI DAKIDS RAVV FMYTGATESLESQGN DE LATADKYEVLMIKDOC

Tableau IV

Classification des Protéines BTB/POZ

		NOM	ESPECE	MOTIFS + ISOFORMES	FONCTION
Proteines BTB/POZ à doigts de zinc, se fixant à l'ADN		ТТК	Drosophile	* Z(2) P69+P88: mêmeBTB/POZ et doigts de zinc différents	répression des gènes de segmentation pair-rule h, eve, runt, odd.
	ΤK	BRC	Drosophile	Z(2) 4 protéines. Z1 à Z4: même BTB/POZ, doigts de zn différents	orchestration de la métamorphose chez la drosophile
	Pe T	GAGA	Drosophile	Z(1)	regule Ubx; Hsp70, 26; Krüppel; eve; ftz; Adh; anti repression en amont en créant des zones sans nucléosomes.
	grou	lola	Drosophile	Z(2) BTB/POZ commun, 1 avec doigts Zn, 2 sans	croissance et direction de l'axone chez la drosophile
	-sno	BAB	Drosophile	cDNA partiel, pas de doigts de Zn identifiés	morphogénèse larvaire, nécessaire au bon developpement proximo-distal des antennes et des pattes
	•1	BTB II à VII	Drosophile	cDNA partiel pas de doigts de Zn identifiés	clonage par PCR de séquences partielles avec des amorces dégénérés des résidus conservés du BTB/POZ
		E(var)3-93D	Drosophile	Z(0), riche aa acides et basiques, 2 isoformes C-ter différents	régulateur positif du gènes bithorax, rôle dans la décondensation de la chromatine?
	ķènes	PLZF	Homme	Z(9), +/ - le domaine entre les doigts de Zn et le BTB	transcrit de fusion PML-RAR a associé aux translocations t(11;19) dans les LAP
	Oncog	LAZ3	Homme	Z(6), une protéine 79kD	impliqué dans 30% des LNH (LDGC) associé aux translocations t(3;14) t(2;3) t(3;22)
		ZF5	Souris	Ζ(5), ?	Fixation sur le promoteur de MYC, represseur transcriptionnel de MYC, domaine répresseur N-terminal
	RES	ZID	Homme	Z(4), ?	non transactivateur et non transreprésseur sur sa cible: les régions CARG sur le promoteur de l'a actine squelettique
	AUT	clone 18	Homme	Z(11), une seule protéine identifiée	régulation du gène DPA du CMH de classe II
		γFBP	poulet	Z(5),Z(3),mêmeBTB/POZ, doigts de Zn différents en N-ter	répression du promoteur du gène g F du cristallin de façon spécifique à l'isoforme
BTB/POZ	+ Gly-Gly	A55R, C2L	poxvirus	[GLY-GLY](5)	fonction inconnue, fixation de ligands homologues autres que le DNA
		Kelch	Drosophile	[Gly-Gly](6) 2 isofomes, même BTB/POZ, C-ter différent	formation du ring canal, pont intracellulaire pour le transport cytoplasmique durant la maturation de l'oocyte
		2 protéines	c. elegans		fonction inconnue.
	seul	EST3 et EST4	Homme	Z(?), 2 cDNA partiels	fonction inconnue
		2 protéines	c. elegans	2 cDNA	fonction inconnue
		gcl	Drosophile	protéine de 65kD	nécessaire à la formation du pole cellulaire de l'oeuf, mutant gcl sans cellules germinales localisation granule polaire

*Z: motif en doigt de zinc (Le nombre de motifs est indiqué entre parenthèses).

• • • • • •

IV-Fonctions des protéines BTB/POZ. (d'après la revue de Albagli et al., 1995).

1-Interactions protéine - protéine:

Le domaine BTB/POZ, remarquablement hydrophobe, apparaît, d'après sa séquence en acides aminés et des programmes de prédictions de structure, constitué d'une alternance de structures en hélice α et en feuillets β (Bardwell et Treisman 1994). Au niveau de l'hélice α putative, centrale, qui est fortement conservée entre les domaines BTB/POZ, il existe une répétition de 7 résidus hydrophobes qui sont caractéristiques des domaines de dimérisation (Bardwell et Treisman. 1994). Toutes ces données suggèrent que le domaine BTB/POZ constitue un nouvel exemple de domaine participant à des interactions protéine-protéine.

Dans le cas de la protéine BTB/POZ BAB, une analyse de prédiction de sa structure montre l'existence d'une hélice α dans la moitié 5' de la partie N-terminale avec une face fortement hydrophobe. Une analyse par mutagénèse montre une forte corrélation entre les résidus nécessaires à la fixation protéine-protéine et la conservation de cette face hydrophobe. Montrant ainsi que BAB, par ses 49 premiers acides aminés correspondant à une hélice α , permet une interaction protéine-protéine (Chen *et al.*, 1995). Une analyse de la moitié 5'de la région N-terminale d'autres protéines fut également effectuée utilisant le programme "helical wheel program", parmi les membres très conservés du groupettk contenant: bab, ttk, BRC, lola, BTBII, BTBII, BTBV, BTBVI, GAGA, E(var)3-93D, 9 membres sur les 11 contiennent cette face dans laquelle tous les résidus sont hydrophobes, à l'exception de Evar 3-93D qui contient une serine en position 21 et TTK une thréonine en position 28. On remarque que, pour la plupart des protéines contenant un domaine BTB/POZ qu'elles fassent partie du groupe ttk, des protéines de vertébrés à doigt de zinc comme: LAZ3/BCL6, PLZF, KUP, ZFPJ, ZF5, ZID, FBP, des protéines de *C.elegans* ou encore de poxvirus, il existe une face contenant des résidus hydrophobes qui permettrait cette interaction entre protéines.

Bardwell et Treisman ont également montré que des domaines BTB/POZ sont capables d'interaction protéine-protéine. En effet, le domaine BTB de ZID est capable de multimériser in vitro; ZID interagit préférentiellement avec lui même, formant des interactions homotypiques. Par contre, le domaine BTB/POZ de ZID ne peut pas interagir avec celui de GAGA, ZF5 ou de la protéine virale Sal 17R. D'autres interactions homotypiques ont été mises en évidence comme dans le cas des domaines BTB/POZ deTTK (Bardwell et Treisman. 1994), de PLZF (Shaknovich *et al.*, 1994) ou de Kelch (Li *et al.*, 1994).

Ce domaine BTB/POZ permet également des interactions hétérotypiques comme dans le cas de TTK dont le domaine BTB/POZ permet la formation d'un hétérodimère avec le facteur GAGA, par une interaction aussi efficace qu'avec lui même (Bardwell et Treisman 1994). Ceci démontre la possible interaction entre domaines BTB/POZ hétérologues et suggère qu'il existerait une sélectivité de fixation dont les limites et les déterminants restent à élucider.

Bien que la stoechiométrie de ces complexes ne soit pas très claire, plusieurs études suggèrent cependant que le domaine BTB/POZ pourrait permettre des interactions multimériques in vivo. Ces interactions pourraient nécéssiter l'ensemble de la protéine plutôt que le domaine BTB/POZ seul. En effet, dans le cas de ZID des dimères sont observés avec les domaines BTB/POZ, des multimères avec la protéine complète en gradient de sucrose (Bardwell et Treisman. 1994). En gradient de sucrose, Bardwell et Treisman observent des protéines de grande taille, suggérant la formation de complexes multimériques. Dans le cas de BAB (Godt et al., 1993), GAGA (Raff et al., 1994), PLZF (Shaknovich et al., 1994), ZID (Bardwell et Treisman. 1994), LAZ3/BCL6 (Dhordain et al., 1995) il est suggéré que ces protéines forment in vivo des sous-structures nucléaires discrètes visibles grâce à une analyse immunologique. Des analyses en immunofluorescence sur des formes mutantes de ZID montrent que la distribution nucléaire in vivo de cette protéine dépend du domaine BTB/POZ. En effet, une protéine ZID qui contient le domaine POZ est de localisation nucléaire, formant des points de taille variable, le mutant sans domaine POZ quant à lui est localisé dans le noyau d'une façon plus diffuse et plus faiblement dans le cytoplasme, montrant l'importance de ce domaine BTB/POZ pour une localisation nucléaire discrète (Bardwell et Treisman. 1994).

Le même type de résultat est obtenu avec la protéine Kelch (Cooley et Theurkauf. 1994). Une expression bactérienne de son domaine BTB/POZ peut homodimériser en solution. Lors de la formation du "ring canal", l'homodimère Kelch pourrait créer un complexe par l'intermédiaire de ces répétitions GLY-GLY, formant une structure apparentée à la structure formée par les protéines Scruin et capables d'interagir avec la sousunité actine comme nous l'avons décrit dans le III (Cooley et Theurkauf. 1994).

Dans le cas de la protéine LAZ3/BCL6, la localisation de la protéine visible en immunofluorescence montre une localisation nucléaire ponctuée présentant des points de taille variable pour la protéine LAZ3/BCL6 complète et une localisation nucléaire plus diffuse, granuleuse dans le cas d'une construction qui ne contient pas le domaine BTB/POZ (Dhordain *et al.*, 1995). L'utilisation d'une chimère, récepteur des oestrogène-LAZ3/BCL6 (inductible par les oestrogènes, qui permet de restaurer la fonction de la protéine LAZ3/BCL6), montre en transfection une localisation cytoplasmique et périnucléaire pour la forme non induite et nucléaire ponctuée après induction par les oestrogènes (Dhordain *et al.*, 1995). La localisation nucléaire ponctuée de LAZ3/BCL6 semble dépendre de la présence du domaine BTB/POZ, comme c'est le cas pour la protéine ZID (Bardwell et Treisman., 1994).

Tout ceci semble donc suggérer que les domaines BTB/POZ isolés sont capables de former des interactions sous forme de dimères, voire multimères, qui nécessiteraient la protéine entière.

2- Une controverse: l'inhibition de la fixation à l'ADN.

La seconde propriété de ce domaine BTB/POZ, semble être l'inhibition, *in vitro* et *in vivo*, de la fixation à l'ADN. Cette propriété fut explicitée pour les protéines ZID,GAGA et TTK. Des analyses de retard sur gel et d'immunoprécipitation montrent en effet que la protéine ZID complète fixe faiblement sa séquence cible, tandis que des constructions sans le domaine BTB/POZ fixent cette séquence efficacement, une amélioration de la fixation de 8 fois étant observée (Bardwell et Treisman. 1994). Deux autres protéines GAGA et TTK ne fixent pas leur séquence cible quand elles sont entières mais la fixe lorsqu'elles ne contiennent pas la partie POZ. Cette propriété inhibitrice est transférable à d'autres facteurs de transcription car la fusion du domaine BTB/POZ de ZID avec les domaines de fixation à l'ADN de SP1, OCT1, SRF ou RAR α réduit fortement la fixation sur leurs cibles respectives (Bardwell et Treisman, 1994). L'effet inhibiteur du

domaine BTB/POZ ne semble pas avoir besoin d'interaction spécifique entre domaine BTB/POZ et une région conservée en doigts de zinc. Cette inhibition est également visible *in vivo* puisque, en transfection, il n'est observé avec ZID ni activation ni répression de la transcription. Une chimère entre ZID et un domaine transactivateur VP16 est incapable de transactiver tant que le domaine BTB/POZ est présent. Des expériences d'immunoprécipitation réalisées avec des protéines contenant un "épitope tag", reconnues grâce à un anticorp anti-tag, confirment que le domaine BTB/POZ est bien un domaine d'interaction protéine-protéine, interactions qui pourraient être à l'origine de l'activité d'inhibition de la fixation à l'ADN (Bardwell et Treisman.1994). En effet, ce domaine BTB/POZ en permettant des oligomérisations, empêcherait l'accés des doigts de zinc à leur motif de fixation sur l'ADN. Tous ces résultats semblent suggérer que les protéines BTB/POZ nucléaires requièrent une inactivation préalable de leur domaine BTB/POZ, soit par protéolyse soit par modification post traductionnelle, pour remplir leur fonction biologique.

Ces observations n'éliminent cependant pas le fait que des formes multimériques de protéines BTB/POZ, qui contiennent des doigts de zinc, puissent se fixer sur des régions nucléiques différentes des séquences cible des doigts de zinc seuls.

De plus, ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus dans le cas de certaines protéines BTB/POZ qui fixent l'ADN comme TTK, GAGA et ZF5 (Brown *et al.*, 1991, Read et Manley, 1992; Numoto *et al.*, 1993; Tsukiyama *et al.*, 1994). Dans le cas de clone 18, le domaine BTB/POZ n'inhibe pas en essai de transactivation, l'activité de fixation àl'ADN de Gal4 qui est aussi une protéine à doigts de zinc (Sugawara *et al.*, 1994). De plus l'ADNc complet de la protéine ZF5 fut isolé grâce à sa capacité à se fixer au promoteur de *MYC* (Numoto *et al.*, 1993). Dans le cas de la protéine LAZ3/BCL6 nos résultats montrent la capacité, en retard sur gel, de cette protéine à fixer sa séquence cible. Il ne semble donc pas que l'inhibition à fixer l'ADN des protéines les contenant soit une propriété générale.

3- Comment ces domaines BTBPOZ peuvent-ils assurer ces 2 fonctions?

La capacité de ce domaine à participer à des interactions protéine-protéine pourrait avoir plusieurs conséquences:

- il pourrait imposer une architecture multimérique qui semble géner d'une façon

ou d'une autre les propriétés de fixation à l'ADN dans des expériences *in vitro* (Bardwell et Treisman. 1994).

- il pourrait diriger la protéine dans des sous-structures nucléaires discrètes et, de cette façon, empêcher la transactivation dans des expériences de transfection transitoire. Il semble donc que l'activité inhibitrice de la fixation découlerait de la véritable fonction des domaines BTB/POZ, qui est de réaliser des interactions multimériques. En conséquence, le domaine BTB/POZ ne semble pas être un inhibiteur, mais au contraire, semble nécessaire pour la fonction des protéines. En tenant compte de ces conditions, il apparaît un variant du gène de Drosophile lola qui provient d'un épissage alternatif spécifique des cellules neuronale (Giniger *et al.*, 1994) et qui garde le domaine BTB/POZ mais perd ses doigts de zinc soit un dominant négatif, et agirait de la même façon que la protéine inhibitrice Id dans la famille des facteurs de transcription à HLH (Weintraub. 1993).

Ce domaine BTB/POZ apparaît donc bien comme un domaine d'interaction protéine-protéine qui peut être associé, ou définir, une nouvelle classe de protéines, possédant d'autres motifs bien caractérisés comme des motifs de fixation à l'actine ou des motifs de fixation à l'ADN en doigts de zinc. De par son rôle comme motif d'interaction entre protéines, parmi les protéines associées au cytosquelette et les facteurs de transcription, ce domaine BTB/POZ ressemble beaucoup au domaine "*ankyrin repeat*" (Thompson *et al.*,1991) ou au motif *LIM* (Sanchez-Garcia et Rabbitts. 1994). L'interaction des domaines *ankyrin repeats* de la protéine IKB avec la protéine P65 de NFKB régule l'activité de fixation à l'ADN et des localisation cellulaires, controlés par phosphorylation et protéolyse (Liou et Baltimore, 1993). Quant au domaine *LIM*, il semble intervenir dans des interactions protéine-protéine ainsi que dans la localisation de la protéine, son activation et sa régulation. Il régule la transduction du signal et l'expression des gènes en permettant des associations avec des partenaires protéiques spécifiques (Schmeichel et Beckerle. 1994).

V- Protéines BTB/POZ et état de condensation de la chromatine:

1- Les protéines du groupe trithorax. Effet de décondensation de la chromatine.

Le terme hétérochromatine fut utilisé en premier par Heitz en 1928 pour décrire des régions du chromosome qui restent condensées durant le cycle cellulaire. Ces régions, souvent regroupées au niveau des centromères et télomères des chromosomes, ont certaines propriétés qui les distinguent de l'euchromatine: elles possèdent une densité faible de gènes, portent des séquences de DNA répétitif et se répliquent tardivement durant la phase S du cycle cellulaire (John, 1988). Cette hétérochromatine est virtuellement présente parmi tous les eucaryotes, ses fonctions restant encore controversées. Certains suggèrent qu'elle est essentielle dans le processus comme la recombinaison et le "chromosome pairing", tandis que d'autres suggèrent qu'elle ne possède pas de fonction essentielle mais permet de maintenir certaines localisations chromosomiques à travers une variété de mécanismes génétiques (John, 1988). L'hétérochromatine représente donc une région qui ne se décondense pas lors de l'interphase.

Des réarrangements chromosomiques, qui placent un gène à proximité de cette hétérochromatine, provoquent l'inactivation de ce gène dans certaines cellules et pas dans d'autres, ce qui cause une mosaïque de phénotypes dits "variegated" pour tacheté, ponctué. Une fois inactivé, ce gène le reste au cours des divisions cellulaires. Ce phénomène est appelé PEV pour "Position Effect Variegation" et apparait dans des espèces diverses et variées (Reuter et al., 1990). Chez la souris ou chez l'homme, par exemple, la translocation de régions autosomales sur un chromosome X inactivé provoque la variégation des gènes autosomiques transloqués (Russel. 1963).

Chez la drosophile, des études sur la variégation ont permis de montrer que des protéines BTB/POZ pouvaient être associées de façon causale à la modulation de la condensation de la chromatine. Chez la Drosophile, la PEV fut utilisée dans de nombreuses études pour déterminer les gènes qui influencent la structure de l'hétérochromatine.

Par conséquent, les modifications de la PEV semblent définir des frontières entre l'euchromatine ou "chromatine ouverte" et l'hétérochromatine ou "chromatine fermée", en modifiant directement sa topologie, ou encore, en formant des compartiments



Figure 5. Un exemple de la PEV avec le gène white (w). C'est un gène lié au chromosome X nécéssaire pour la pigmentation de l'oeil de la Drosophile. Des radiations ionisantes causent des cassures chromosomiques (rayures), amenant à la conversion, translocation et transposition. Un allèle white-mottled (wm) (blanc tacheté) est obtenu lorsque le gène est juxtaposé à de l'hétérochromatine (boites noires). Une expression "variegated" bigarrée peut être observée comme de nombreux spots de cellules de type sauvage ou sur un mutant en arrière plan. Un chromosomeY en plus (mâle XYY) cause d'une forte suppression du phénotype, tandis que la perte d'un Y (X0) chez un mâle provoque une augmentation du phénotype.

(Paro1993). Certaines mutations activent la condensation de la chromatine et sont nommées E(var) pour "*enhancer*" de la PEV, d'autres suppriment cet état de condensation de la chromatine et son nommées su(var) pour "*suppressor*" de la PEV (illustration figure : 5 page 50 Hénikoff.1990).

Le facteur GAGA est une protéine BTB/POZ codée par le gène trl (trithorax like), un membre du groupe des gènes trithorax (trx-G) chez la mouche, gènes qui sont nécéssaires pour l'expression de gènes homéotiques (Farkas et al., 1994).

GAGA fut d'abord considéré comme un facteur de transcription classique qui se fixait sur des séquences riches en GA/CT (Biggin et Tjian, 1988), retrouvées au niveau des régions promotrices de certains gènes de Drosophile (Soeller *et al.*, 1993). Etant donné que les mutations de *trl* active, "*enhance*" la PEV celà laisse supposer que le GAGA est également impliqué dans la décondensation de la chromatine à une large échelle. De récentes études suggèrent que GAGA fonctionne en influençant la structure de la chromatine (Granok et al., 1995). De plus, il fut récemment montré que GAGA activait la transcription en altérant localement la structure de la chromatine, en la maintenant dans un état ouvert, permettant ainsi à d'autres facteurs de transcription d'accéder à l'ADN (Raff et al., 1994). Le promoteur du gène hsp70 est régulé positivement par le facteur de transcription GAGA, qui perturbe l'organisation du nucléosome (un répresseur général de l'initiation de la transcription dans les cellules eucaryotes) (Tsukiyama et al., 1994). GAGA est un anti-répresseur qui prévient la fixation non spécifique de l'histone H1 dans des régions critiques des promoteurs cible (Croston et al., 1991). Cependant la capacité du facteur GAGA à décondenser la chromatine reste un effet localisé, spécialement au niveau des régions centromériques (Raff et al., 1994). La fixation permanente de ce facteur au DNA, même sur des chromosomes mitotiques compactés, semble suggérer qu'il représente une marque permanente sur les chromosomes, pour délimiter une frontière entre une région condensée, inactive et une région décondensée transcriptionnellement active (Croston et al., 1991), cette frontière est conservée de façon constante pour un blocage permanent de gènes ou groupes de gènes.

Cette capacité à altérer la structure de la chromatine est également vérifiée pour un autre facteur BTB/POZ, le produit du gène E(var)3-93D (Dorn *et al.*,1993). Les mutants E(var)3-93D ont un effet similaire sur les gènes homéotiques aux gènes du groupe trx-G. La présence de protéines E(var)3-93D sur un grand nombre de sites sur le chromosome polytène, supporte l'hypothèse que ces protéines sont généralement impliquées dans l'établissement ou la maintenance d'une conformation ouverte de la chromatine comme un prérequis pour la transcription (Dorn *et al.*, 1993).

La seule caractéristique commune entre ces 2 protéines de Drosophile GAGA et E(var)3-93D, impliquées dans la décondensation de la chromatine, est la conservation d'un domaine BTB/POZ, permettant des interactions entre différents facteurs protéiques. Pour que ces protéines puissent assurer leur fonction, il est nécessaire qu'une interaction protéique se fasse par l'intermédiaire de ce domaine. Comme GAGA possède une localisation visible, nucléaire ponctuée, il se pourrait que des interactions multimériques

-51-

soient à l'origine de cette fonction de décondensation de la chromatine.

2- Association des protéines BTB/POZ aux propriétés structurales et fonctionnelles des membres du Groupe Polycomb Pc-G.

Un autre groupe de protéines de Drosophile, le groupe Pc-G, possède des propriétés qui peuvent être associées aux propriétés structurales et fonctionnelles de plusieurs protéines BTB/POZ. Ce groupe Pc-G joue un rôle majeur dans les processus de maintenance et de détermination de l'état cellulaire. Dans le développement de la Drosophile, il est nécessaire d'avoir une expression appropriée des gènes homéotiques du complexe Antenapedia (ANT-C) et du complexe Bithorax (BX-C), gènes qui sont requis pour la détermination des segments chez la Drosophile(Lewis. 1978). Durant les phases précoces du développement, les gènes homéotiques sont activés par un complexe de régulateurs transcriptionnels, codés par des gènes de segmentations maternels, qui agissent de façon précoce (Harding et Levine., 1988, Irish et al., 1989). Cette hiérarchie précoce décline après l'établissement d'un modèle de segmentation. Quoiqu'il en soit, les gènes homéotiques ont besoin d'être activés durant le développement pour assurer une identité propre à chaque segment. Le Pc-G représente une partie du mécanisme qui maintient les frontières de l'expression homéotique après leur mise en place correcte dans l'embryogenèse précoce. Le Pc-G est responsable du maintien de l'état réprimé de l'expression de ces gènes homéotiques durant le reste du développement (Paro 1993; Rastelli et al., 1993). Des mutations dans les gènes du Pc-G montrent une distribution normale des gènes homéotiques précoces dans l'embryogenèse (Franke. 1991), indiquant que le processus d'initiation n'est pas perturbé. A des stades plus tardifs de l'embryogenèse lorsque le processus de maintien doit prendre le relai, dans les mutants polycomb- (pc-), des transcrits homéotiques et des protéines s'expriment de façon ectopique (Celniker et al., 1990). Il en résulte la formation d'embryons complètement transformés, le degré de transformation variant selon le gène analysé.

De nombreuses expériences génétiques ont permis de suggérer des similitudes de mécanisme entre les gènes Pc-G et les modificateurs de la PEV chez la drosophile. Réciproquement, certains modificateurs de la PEV induisent un phénotype homéotique ressemblant à une expression ectopique des gènes homéotiques (Reuter . 1990). L'une et l'autre de ces classes d'effecteurs présentent une forte dépendance de la dose de leur produit.

La formation de l'hétérochromatine par les modificateurs de la PEV s'expliquerait par la loi d'action de masse (Locke *et al.*, 1988)). Les auteurs proposent en effet, que l'hétérochromatine soit composée d'unités complexes de protéines répétée, formant de grands complexes protéiques, compacts sur le chromosome.

La relation entre modificateurs de la PEV et PcG fut récemment prouvée par des données d'homologies étendues entre la protéine Pc (Müller. 1995) et une protéine associée à l'hétérochromatine HP1 de Drosophila melanogaster (Paro et Hogness. 1991). Ces 2 protéines présentent des similitudes dans une région N-terminale, définissant le chromo domaine (chromatine organization modifier). HP1 est en fait codée par le gène suppresseur de la variegation (su(var)205) (Eissenberg et al., 1990). Sur le chromosome polytène, HP1 est associée à l'hétérochromatine, localisée au niveau du chromocentromère sur le 4ème chromosome et sur la plupart des régions télomériques (James et al., 1989). Des mutations dans ce gène aboutissant à un épissage incorrect du transcrit conduisent à un dominant suppresseur de la PEV, tandis qu'une duplication de ce locus active le phénotype "variegated" panaché (Eissenberg et al., 1990). Il est couramment supposé que Pc formerait avec d'autres membres du PcG des complexes protéiques multimériques, par l'intermédiaire du chromodomaine, qui pourrait compacter la chromatine selon des conformations ressemblant à l'hétérochromatine et empêcherait par ce moyen l'expression des gènes homéotiques. Dans le cas du gène polycomb, le chromodomaine permet une interaction avec le produit du gène *polyhoméotique (Ph)* (De camiliset al., 1992; Francke et al., 1992; Orlando et Paro., 1993) ainsi que 10 à15 autres protéines (Franckeet al., 1992). D'après une étude récente menée par Mûller en 1995, il semble que la partie C-terminale de pc représente également un élément important dans les interactions protéine-protéine. Il suggère que le chromodomaine puisse reconnaitre des PRE (PcG response elements), c'est à dire des éléments d'ADN en cis, pour pemettre une répression permanente des gènes homéotiques. Cette région C-terminale possède de fortes homologies avec un homologue Pc de souris (Pearce et al., 1992). La protéine Pc est localisée dans le noyau sous forme de spots, "speckled", tâches, par immunufluorescence avec un anticorps anti Pc.

Un autre membre du groupe PcG, "l'Enhancer of zeste" (E(z)), de localisation nucléaire est associé au chromosome polytène avec la protéine " posterior sex comb" Psc. Une mutation dans ce gène induit une décondensation générale du chromosome (Rastell*i et al.*,1993). Tandis qu'une surexpression de *psc* resulte en une condensation du chromosome polytène. Ces modifieurs, qui codent donc pour des composants structuraux de l'hétérochromatine qui forment des complexes multimériques, s'assemblent de façon modulaire le long des segments du chromosome. En accord avec ce modèle, basé sur la loi d'action de masse, un changement dans la concentration de l'un des composants affecte la concentration du complexe et donc étend l'hétérochromatinisation (Locke *et al.*,1988)

La protéine BTB/POZ BAB est exprimée dans le domaine proximo-distal des membres, dans la région centrale du tarse de la patte et au niveau du cylindre basal des antennes chez la Drosophile. Son action est dépendante de la concentration en protéine pour la spécification des segments du tarse. Des mutations de *bab* sont à l'origine de transformations homéotiques qui ressemblent beaucoup à celles des mutants PcG (Godt *et al.*, 1993).

Ces protéines polycomb présentent de fortes ressemblances avec certains membres de la famille BTB/POZ, en effet,

- Les mutations de *bab* et de *Pc* donnent naissance à des phénotypes fortement semblables.

-Tous les deux semblent former des complexes multimériques qui compartimentent et déterminent des frontières sur la chromatine par un état de condensation différent, entre euchromatine et hétérochromatine.

- Des membres BTB/POZ comme des membres du PcG sont très sensibles aux effets de dose, sans doute, parce qu'une participation d'un analogue dans les complexes protéiques multimériques modifie une stoechiométrie cruciale.

- Dans les deux cas, on peut observer une localisation des protéines visible nucléaire et ponctuée, qui dépend du chromodomaine dans le cas des protéines du Pc-G et du domaine BTB/POZ dans le cas des protéines BTB/POZ.



Figure 6:

Rôle des domaines BTB/POZ dans la conversion entre euchromatine et hétérochromatine. (D'après O.Albagli *et al.*, 1995)

VI- Protéines BTB/POZ, protéines Ring finger, protéines du groupe trithorax et association avec la transformation néoplasique.

1- translocations associées aux LAP, t(15;17) et t(11;17) qui fusionnent une protéine Ring finger (PML) ou une protéine BTB/POZ (PLZF) au récepteur de l'acide rétinoïque α .

La LAP est une leucémie myéloïde caractérisée par l'expansion clonale des cellules de progéniteurs hématopoïétiques bloqués au stade de différenciation promyélocytaire.

La translocation t(15;17)(q22;q21) est retrouvée chez presque tous les patients qui présentent une LAP, servant même à diagnostiquer la maladie (Rowlez *et al.*,1977). Le point de cassure sur le chromosome 17 implique le récepteur α de l'acide rétinoïque (RAR α) et sur le chromosome 15 le gène *PML* (Borrow *et al.*, 1990; de Thé *et al.*, 1991;Tong *et al.*, 1992). La translocation fusionne les 2 gènes en position "tête bêche", il en résulte que *PML-RAR* α se retrouve sous le contrôle transcriptionnel du promoteur du gène *PML* (de Thé *et al.*, 1991; Kakizuka *et al.*, 1991; Pandolfi *et al.*, 1991; Alcalay *et al.*, 1992; Kastner *et al.*, 1992). La protéine de fusion contient la majorité de la région amino-terminale de PML, qui inclut la partie Ring et le domaine d'oligomérisation "coiled coil" fusionné aux régions B à F de RAR α qui contient les motifs de fixation à l'ADN et aux hormones. Le produit de fusion réciproque, RAR α -PML, n'est pas systématiquement présent dans les cas de LAP, il est donc peu probable qu'il possède un rôle dans le processus de leucémogenèse (Alcalay *et al.*,1992).

La protéine PML intacte fut d'abord localisée dans des "dots" (Daniel *et a*l., 1993) et, plus récemment, co-localisée avec des "nuclear bodies" NBs (pour corps nucléaires), dans les cellules des patients ne présentant pas de LAP (Koken *et al.*, 1994; Dyck *et al.*, 1994; Weiss *et al.*, 1994). Ces NBs présentent une forme en beignets d'une taille de 0,3 à 0,5µm (Lavau et Dejean, 1994).

Les NBs ont d'abord été définis comme des régions denses aux électrons (de Thé et al., 1960). Ils représentent des organelles ubiquitaires de morphologie très variée, retrouvée de façon prédominante dans des cellules en division. Plusieurs types de NB ont été décrits par des analyses en microscopie électronique. Il n'est pas défini si c'est le reflet d'une différence fonctionnelle véritable, ou si cela reflète simplement une diversité tissus et espèce spécifique. Les termes simples et complexes ont été utilisés pour différencier les NBs sur la base de leur taille et les termes fibrillaires et granuleux pour différencier les NBs sur la base de leur ultrastructure (Brasch et Ochs. 1992). Ces NBs sont constitués de protéines et de RNA. Le cortex, la capsule du NB est composée de protéines et la partie centrale est enrichie en composant ribonucléoprotéiques RNP. Certains NBs sont été assez étudiés, comme le "coiled bodies" dérivé du nucléole qui contient une protéine spécifique: la P80-coilin. D'autres corps moins bien caractérisés furent récemment décrits en utilisant une variété d'auto-anticorps humains, ou encore avec des anticorps monoclonaux qui reconnaissent des antigènes distincts comme Sp 100 (Szostecki *et al.*, 1990)

PML dans les cellules non leucémiques est associée aux NBs avec des protéines qui co-localisent, comme la PBC (pour "Primary Biliary Cirrhosis") (Koken et al., 1994).

Dans les cellules de LAP, des études de microscopie électronique montrent que ces NBs sont fortement modifiés. En effet, la localisation cellulaire de la protéine de fusion PML-RAR α diffère notablement de celle de PML ou de RAR α . En transfection transitoire, le produit de fusion PML-RAR α possède une localisation cytoplasmique et nucléaire (Perez 1993), de type granulaire (Kastner *et al.*, 1992). Dans les cas de

translocation t(15;17) dans les cellules des patients présentant une LAP, PML-RAR α est localisé dans de petites tâches nucléaires, "speckles", qui possédent une taille inférieure à 0,1µm et sont étroitement liées à la chromatine (Lavau et DeJean., 1994) Dans ces cellules leucémiques l'intégrité du NB est donc disloqué par l'hybride PML-RAR α , mais le traitement des cellules exprimant cet hybribe par l'acide rétinoïque (RA) induit une augmentation du transfert nucléaire et une accumulation de la protéine à la périphérie du noyau (Weis *et al.*, 1994). Dans les cellules de LAP, le traitement au RA induit une réorganisation de PML dans des structures nucléaires, le marquage multigranulaire est remplacé par quelques tâches qui ressemblent aux NBs de PML dans des cellules non LAP (Weis *et al.*, 1994). La localisation de PML semble donc pouvoir être restaurée par le RA. Ce traitement à l'acide rétinoïque semble réverser l'effet de la protéine hybride PML-RAR α . En effet, la majorité des patients présentant une LAP entre en rémission morphologique complète transitoire, après un traitement au RA, en réintroduisant la différenciation du clône malin (Castaigne *et al.*, 1990)

Par quels mécanismes PML-RARα participe-t-il à la leucémogenèse?

L'implication de RAR α dans la différenciation suggère que PML-RAR α puisse interférer avec le RAR α de type sauvage. D'autre part, PML-RAR α doit promouvoir l'oncogenèse en interférant également avec la fonction normale de PML. Alternativement, le produit de fusion pourrait avoir acquis de nouvelles propriétés qui lui sont propres, n'ayant aucune liaison avec la physiologie de RAR α ou de PML.

L'interférence de PML-RAR α avec la régulation de la transcription par RA peut intervenir, soit par fixation directe sur le RARE, ou indirecte en séquestrant des protéines cofacteurs. En effet, cet hybride PML-RAR α a la capacité de former des homodimères qui peuvent se fixer sur les récepteurs de l'acide retinoïque RAREs et les inactiver. Il peut également former des hétérodimères avec la protéine PML (Katsner *et al.*, 1992; Dyck *et al.*, 1994), ainsi qu'avec le RXR (une autre famille de récepteur rétinoïque "*9 cis RA receptor*"). Un rôle indirect de PML-RAR α sur la transcription de gènes cibles répondant à l'acide rétinoïque (RA) est fortement suggéré de par ces propriétés d'hétérodimérisation au RXR, qui serait alors délocalisé dans des sous-structures spécifiques des LAP. Cette interaction par séquestration de RXR, supprimée quand les cellules sont traitées au RA, inhibe les gènes cible qui dépendent de la vitamine D3 (Perez *et al.*, 1993). Il a également été montré que PML-RAR α pourrait interférer avec l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription AP1 montrant ainsi un effet opposé au RARα sauvage (Doucas *et al.*, 1993). L'hybride réprime la transcription d'un promoteur régulé par AP1, tandis qu'il est fortement stimulé en présence de RA.

La fonction de PML restait encore bien mystérieuse, les homologies avec des protéines qui se fixent au DNA ou au RNA et la localisation particulière dans des organelles intranucléaires (NB), suggéraient que PML puisse être impliqué dans le "processing" des acides nucléiques. Récemment, il fut montré que PML représente une cible primaire des interférons $\alpha \beta \gamma$ et pourrait jouer un rôle dans les propriétés antivirales de ces cytokines (Chelbi-Alix et al., 1995). De plus, Koken et al. (Koken et al.,1995) proposent une relation entre les NBs et la transformation. Lors des étapes primaires de la transformation, il est observé une activation de PML (effet limitant de la prolifération). Lorsque la tumeur devient plus invasive, l'expression de PML diminue, ce qui pourrait donner un avantage de croissance. Les auteurs suggèrent que cette protéine de la matrice possède des propriétés anti-oncogéniques qui seraient liées aux NBs, ainsi qu'à la transformation. PML-RAR α en induisant, lors des t(15,17), une altération dans la localisation de PML, cruciale pour son activité biologique, contribuerait au processus leucémique (Koken et al., 1995). Dernièrement, Borden et al., (1995), montrent que le RING domaine de PML est nécessaire pour la formation d'un NB, ce domaine serait un élément crucial de l'interaction protéine-protéine (Borden et al., 1995).

D'autres cas de LAP n'impliquent pas la protéine PML.

Dans le cas de la translocation t(11;17) qui fusionne les domaines B à F du RAR α avec un nouveau gène de la famille Krüppel localisé sur le chromosome 11: *PLZF* (Chen *et al.*,1994). Comme la protéine PML, la protéine PLZF présente une localisation nucléaire sous forme de "dots" (Chen *et al.*,1994). La protéine hybride PLZF/RAR α empêche la fonction du récepteur de la vitamine D et du RAR α (Chen *et al.*,1994, Shaknovich *et al.*,1994). Elle fonctionnerait comme un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de l'hétérodimère RAR α /RXR. Cet effet est partiellement supprimé par surexpression de RXR (Shaknovich *et al.*,1994).

Cette propriété commune des protéines BTB/POZ ou des protéines "RING/coiled coil" à interagir avec d'autres protéines dans des structures nucléaires discrètes pourrait expliquer les effets transformants de PML-RAR α et PLZF-RAR α .

Récemment Redner *et al*, ont montré en 1994 qu'une autre translocation, la t(5;17)(q32;q21) dans les LAP, fusionne RAR α avec une protéine du nucléole: la nucléophosmine (NPM). La fusion issue de cette translocation implique les mêmes régions du RAR α que dans les translocations précédemment décrites. Le gène *NPM* codant cette protéine a été également impliqué dans les translocations t(2;5) des lymphomes anaplasiques donnant une protéine de fusion avec une kinase NPM-ALK (Redner *et al.*, 1994).

2- "*Posterior sex comb*" (psc) et son homologue "*suppressor of zeste* " (su(z)2): 2 protéines *RING*, importantes dans la transformation observée chez la Drosophile.

psc est un membre de la famille de Pc-G. Des mutations dans ce gène sont à l'origine de transformations dorso-ventrales chez la Drosophile, ainsi que des excroissances qui apparaissent le long de l'axe du système nerveux central embryonnaire (Brunk *et al.*, 1991). La perte de fonction de ce gène *psc* provoque la mort embryonnaire.

L'interaction zeste-white est un autre phénomène génétique qui, à première vue possède peu de rapport avec la régulation des gènes homéotiques. La fonction du gène zeste est associée avec un effet de transvection (représenté par l'appariement de 2 chromosomes) sur le gène Ubx ainsi que sur d'autres gènes (Kaufman et al., 1973; Gelbart et al., 1982). Le produit du gène zeste se fixe in vitro sur les régions régulatrices de plusieurs gènes comme white, Ubx, decapentaplegic et Antp (Benson et al., 1988). Dans les glandes salivaires, il est associé à plus de 60 sites dont 2 correspondent aux complexes homéotiques majeurs (Pirrotta et al., 1988). Ces rôles dans l'expression des gènes normaux ne sont pas bien définis. Lorsqu'il se fixe à proximité d'un promoteur, il stimule son activité in vitro et in vivo (Laney et al., 1992), il a été proposé, qu'il faciliterait la formation d'une boucle favorisant le contact avec le complexe promoteur. Ses capacités à interagir avec de grands complexes protéiques multimériques est essentielle pour son interaction avec le gène white de drosophile (Chen et al., 1992). Des mutations de certain gènes peuvent supprimer ou favoriser l'activité répressive de zeste sur white. 4 loci "modifieurs" de zeste sont connus: psc, E(z)/pco et su(z)302/Scm, Su(z)2est un locus modifieur de zeste qui peut interagir avec psc et Scm (Adler et al., 1989). psc et Su(z) présentent certaines homologies comme, un motif riche en cystéines le motif "RING finger" trouvé dans d'autres protéines qui étaient considérées comme capables de se fixer à l'ADN, dont la protéine Bmi1 de vertébrés.

L'oncogène Bmil fut retrouvé impliqué dans la formation des lymphomes à cellules B et T (Van Lohuizen *et al.*, 1991; Haupt *et al.*, 1991; Levy *et al.*, 1993). Il a été cloné comme un locus accélérant l'apparition des lymphomes dans des souris transgèniques pour le gène MYC infectées par un rétrovirus sans oncogène. Bmil accélère la lymphomagenèse induite par *MYC* (Van der Lugt *et al.*, 1994).

Une autre protéine de vertébrés ressemble beaucoup à Bmi1, il s'agit de mel18 qui fut isolée de cellules de melanome de souris (Tagawa *et al.*, 1990). Elles possèdent 60% d'identité et 80% d'homologie (Goebl .1991). Bmi1 est exprimé dans une grande variété de tissus normaux, tandis que mel18 s'exprime spécifiquement dans des cellules d'origine neurale et est particulièrement abondante dans les cellules foetales (Tagawa *et al.*,1990). Lorsque *Bmi1* est inactivé par recombinaison homologue les altérations phénotypiques observées dans les organes hémathopoïétiques, au niveau du système nerveux et de l'axe squelettique de souris sont fortement semblables aux phénotypes obtenus après mutation de *psc*.

Les multiples transformations postérieures observées chez la souris au niveau de Bmil hétérozygote et homozygote, ainsi que les homologies de séquences retrouvées avec des membres du Pc-G, montrent que Bmil est probablement impliqué dans la régulation de l'expression des gènes homéotiques, en les rendant silencieux d'une façon qui dépend de la dose. La localisation nucléaire non diffusible de Bmil et l'association physique de *psc* avec des complexes *polyhoméotique/polycomb* (Comme c'est probablement le cas de su(z)2) sont tous des arguments qui semblent indiquer que des protéines du type RING finger peuvent réguler la condensation ou la compartimentalisation de la chromatine à travers des agrégats multiprotéiques chez la Drosophile (dans le cas de psc et su(z)2) (Messner *et al.*, 1992), ou chez les vertébrés (dans le cas de Bmil et par analogie mel18) (Paro.1993).

A l'intérieur de ces complexes le motif RING finger pourrait permettre des interactions avec le DNA (Freemont. 1993; Tagawa *et al.*, 1990), ou plus vraisemblablement des interactions entre facteurs protéiques, étant donné que ce motif est également retrouvé dans des facteurs qui ne sont pas nucléaires (Sadler *et al.*, 1992).

Dans le cas de PML-RARa, nous avons vu que la compartimentalisation de la chromatine, normalement maintenue grâce aux liaisons intimes qui existent entre la matrice nucléaire et les NB, est détruite par cet hybride, ce qui empêche la différenciation.

Un cas plus intrigant est celui du gène LAZ3/BCL6, fréquemment transloqué dans les LNH sans modification de sa séquence codante ni d'altérations importantes dans l'expression de ses ARNm (Otsuki *et al.*, 1995), dont nous discuterons dans la suite de ce travail.

OBJECTIFS

.
En 1989, OFFIT *et al* décrirent une translocation la t(3;22)(q27;q11), retrouvée dans 9 cas de LNH sur 187 étudiés, impliquant le gène des chaines légères des immunoglobulines, Ig λ . Les cellules de ces tumeurs diffuses, présentant toutes des chaines légères Ig λ à leur surface tout comme dans le LB avec la translocation t(8;22)alors que les autres lymphomes expriment généralement des chaines d'Ig κ .

Ce type de translocation impliquant la région 3q27 avait été observé, en 1983, par BERGER et al en 1983, par KODURU et al en 1987.

Enfin, Christian BASTARD *et al.* ont publié en 1992 une étude rétrospective portant sur 319 cas de LNH qui montre que 20 patients présentent, entre autres anomalies, une translocation de la région 3q27 avec l'une ou l'autre des chaines lourdes ou légères des gènes des Ig (Bastard *et al.*,1992). Ce qui suggérait un rôle probable de cette translocation dans la pathogenèse de ces LNH. La caractérisation cytogénétique de cette t(3;14) étant difficile, un certain nombre de cas avaient pu passer inaperçu ou être initialement interprétés comme une délétion en 3q27. D'autre part, les cellules malignes de ces 20 patients présentaient toutes une morphologie et des caractères immunologiques communs.

A la suite du travail de cytogénétique réalisé par Christian BASTARD, nous savions que ce nouveau type de translocation, majeure pour la translocation t(3;14) et mineures ou variantes t(3;22) et t(2;3), rappelait celui observé dans le lymphome de Burkitt qui transpose l'oncogène *MYC* lors de la translocation majeure t(8;14) (85% des cas) et lors de variantes cytogénétiques mineures t(8;22) et t(2;8) (15% des cas). A partir de ces observations, notre travail de DEA, au cours de l'année 1991/1992, a consisté à cloner, en utilisant une sonde spécifique de la région JH, des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines, le point de cassure d'une translocation t(3;14)(q27;q32) identifié dans les cellules malignes d'un patient (LAR) atteint de LNH. Nous avons ainsi montré que la translocation t(3;14) chez ce patient correspond à un réarrangement complexe entre le chromosome 3 en q27 et le chromosome 14 en q32. Les sondes spécifiques de la région 3q27, que nous avons obtenues à partir du clone transloqué, nous ont ensuite permis de mettre en évidence un remaniement moléculaire dans d'autres cas de LNH avec anomalie cytogénétique en 3q27.

Enfin, l'analyse moléculaire de ces autres remaniement nous a révélé qu'ils sont localisés préférentiellement - pour 13 cas de LNH sur les 17 étudiés lors du DEA - dans une même région de moins de 14 kb. Cette région que nous avons nommée "MTC" ("Major translocation cluster") dans les translocations en 3q27 associées aux LNH.

L'ensemble de ces données suggérait donc fortement l'implication d'un nouvel oncogène en 3q27. Dans cette région, les oncogènes *FIM3* (Rubin *et al.*, 1990) et *EVI1* (Mucenski *et al.*,1988) avaient déja été identifiés et caractérisés. *FIM3* est l'homologue humain du site d'intégration rétroviral de souris, impliqué dans les leucémies murine. *EVI1* est aussi exprimé chez la souris et dans les leucémies myélodisplasiques humaines. Ces 2 gènes, candidats potentiels, furent écartés du fait de l'absence de leur expression et de remaniement dans les LNH avec anomalies en 3q27.

Notre travail aura ainsi pour objectifs:

- de cloner ce gène que nous avons nommé *LAZ3* et d'en déterminer sa structure et sa fonction.

- de rechercher la fréquence d'implication de ce gène et de préciser la valeur diagnostic ou pronostic de ses réarrangements.

- de caractériser les mécanismes qui permettent une activation de ce gène dans les LNH.

- de déterminer la séquence cible nucléique de la protéine codée par ce gène.

- de déterminer la localisation sub-cellulaire de sa protéine.

- de caractériser les différents domaines fonctionnels de ce facteur de transcription putatif.

A la suite de ces travaux, nous discuterons d'un point de vue appliqué de l'interêt comme facteur pronostic et diagnostic de ce clonage, mais également d'un point de vue plus fondamental de la fonction biologique potentielle de la protéine codée par ce nouveau gène et nous montrerons pourquoi ce facteur ne fonctionne pas comme un facteur de transcription standard diffusible.

RESULTATS

I- Caractérisation moléculaire des translocations en 3q27 récurrentes dans les LNH : clonage du point de cassure et identification d'un MTC.

Les résultats et les observations décrits dans l'article qui suit *(Genes, Chromosome & Cancer* 8: 149-154 1993), ont été obtenus lors d'études réalisées au cours du DEA et font suite aux données cytogénétiques obtenues par C. Bastard au CRTS de Bois Guillaume. En effet, C.Bastard avait remarqué que la région 3q27 était fréquemment impliquée dans les LNH, mettant en cause un grand nombre de partenaires différents.

La description des translocations t(3;22) (Offit *et al.*, 1989), et plus rarement translocation t(2;3) (Takeuchi *et al.*, 1985) ont amené C. Bastard à une recherche plus systématique d'une translocation en 3q27 avec les gènes des Ig, dans une série de 319 patients porteurs de LNH avec anomalie clonale. Il montra ainsi en 1992 (Bastard *et al.*, 1992) que pour 20 patients, 15 présentaient une translocation télomérique entre le chromosome 3 et le chromosome 14, 2 cas présentaient une t(2;3) et 1 cas une t(3;22). De plus, parmi ces 319 cas, 23 autres réarrangements impliquaient divers partenaires chromosomiques. Enfin 2 patients ne présentant que cette translocation 3q27 comme seule anomalie chromosomique, suggéraient son caractère apparemment primitif. Chez un autre patient atteint d'un Lymphome Folliculaire (LF), la t(2;3) semblait secondaire à la t(14;18) (C. Bastard, communication personnelle).

Afin de cloner le point de cassure chromosomique en 3q27, nous avons selectionné l'ADN d'un patient (LAR) présentant une translocation t(3,14) et 2 bandes réarrangées en "southern blot" avec une sonde JH provenant du locus des Immunoglobulines.

Le clone 3LA5 contenant le point de cassure fut isolé d'une banque d'ADN génomique construite à partir des cellules tumorales de ce patient.

Le réarrangement s'est révélé complexe, puisque cette translocation juxtapose le gène de jonction JH3 à une séquence de la partie variable VH3 inversée, puis après 2,5kb se termine par un segment *switch* μ .

A l'aide d'une sonde, nommée F370, spécifique du chromosome 3q27, nous avons montré que 13 cas sur 17 malades atteints de LNH avec une translocation en 3q27 présentaient un réarrangement sur le chromosome 3 localisé dans un fragment *Bam*HI -*Xba*I de 14Kb. Cette région a été nommé MTC pour "*Major Translocation Cluster*", et par la suite ce MTC fut réduit à un fragment *Eco*RI de 3,3kb. Deux autres groupes devaient obtenir, de façon presque simultanée, des résultats comparables. Il s'agit du groupe de T. Mc Keithan (Baron *et al.*, 1993) et du groupe de R. Dalla-Favera (Ye *et al.*, 1993a).

Dans les trois cas indépendamment décrits par ces équipes, la translocation concerne une région *switch* μ des Ig.

Il est intéressant de noter que les translocations en 3q27, impliquant les chaînes légères des Immunoglobulines, se produisent dans certains cas dans le même "*cluster*" de point de cassure que dans les translocations impliquant les chaînes lourdes (Baron *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1993a; Hebert *et al.*, 1993). En général dans les lymphomes, les translocations variantes impliquent souvent les régions des gènes localisées à l'extrémité opposée à celles impliquées dans les translocations principales. Dans le cas du gène *BCL2* par exemple, la translocation t(14;18) intéresse la partie 3' non codante, la partie 5' de ce gène étant concernée par les translocations t(2;18) et t(18;22). De même dans les translocations impliquant le gène *MYC*, lors des translocations t(8;14), c'est la partie 5' non codante du gène qui est impliquée à l'inverse des translocations variantes t(2;8) et t(8;22) qui impliquent la partie télomérique du gène *MYC*.

Cloning of a Breakpoint Cluster Region at Band 3q27 Involved in Human Non-Hodgkin's Lymphoma

Clotilde Deweindt, Jean-Pierre Kerckaert, Hervé Tilly, Sabine Quief, Van Cong Nguyen, and Christian Bastard

INSERM U124, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Lille; the Centre H. Becquerel, Rouen; the Laboratoire de Cytogénétique et de Génétique Oncologiques, URA 1158 CNRS, Institut G. Roussy, Villejuif; and the Département de Cytogénétique, Centre Régional de Transfusion Sanguine, Bois-Guillaume, France

In a previous cytogenetic analysis, we showed the recurrence of translocations involving band 3q27 and immunoglobulin gene regions in 20 out of 319 patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL). We report here the molecular cloning of the translocation breakpoint from tumor cells of a patient (LAR) with t(3;14)(q27;q32) and the isolation of DNA probes which identify a major translocation cluster region (MTC) at band 3q27. A DNA library from LAR tumor cells was screened with a JH probe and several clones were identified corresponding either to a somatic rearrangement of JGH genes (V4-D2-J6-C μ clonal rearrangement) or to the t(3;14). Analysis of the t(3;14) breakpoint showed that chromosome 3 material was translocated to an inverted 14q32 VH-containing fragment which was itself translocated to the J3 gene. Chromosome 3-assigned probes were used to investigate local DNA rearrangements in a series of NHL with 3q27 translocations. Rearrangements were detected in 13 of 17 patients including 9 of 11 with t(3;14)(q27;q32), 1 of 2 with t(2;3)(p12;q27), 1 of 2 with t(3;22)(q27;q11), and 2 of 2 NHL with translocations not involving an *IG* gene, namely, t(3;4)(q27;p11) and t(3;7)(q27;p12). The finding of this MTC should be useful for diagnostic and prognostic studies and for the identification of a novel oncogene at band 3q27 involved in the development of B cell NHL. *Genes Chrom Cancer* 8:149–154 (1993). © 1993 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

In human B-cell neoplasms, a number of recurring chromosomal translocations involve the IG heavy and light chain genes at bands 14q32, 2p12, and 22q11 (Leder et al., 1983). Molecular studies of these abnormalities have yielded new data on the role in normal and neoplastic cell growth of oncogenes localized at the translocation breakpoints. The most frequent in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) are t(14;18)(q32;q21), associated with follicular lymphoma (Fukuhara et al., 1979), and t(8;14)(q24;q32) and its variants, associated with Burkitt's lymphoma (Manolova et al., 1979; Lenoir et al., 1982).

A new recurring translocation involving band 3q27 and immunoglobulin gene regions has recently been cytogenetically characterized by one of us (Bastard et al., 1992) in 20 of 319 NHL with clonal chromosomal abnormalities. A t(3;14) (q27;q32) was the most common, found in 15 patients, with the two variant translocations t(3;22)(q27;q11) and t(2;3)(p12;q27) found in three and two patients, respectively. Although most patients had a complex karyotype, the possibility that 3q27 translocations could be a primary event was strongly suggested by two cases in which it was the sole cytogenetic abnormality.

Here we describe the isolation of DNA clones which identify a major translocation cluster region (MTC) at band 3q27.

© 1993 Wiley-Liss, Inc.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Tumor cells from fresh lymph nodes of NHL patients were obtained for morphologic, immunologic, and cytogenetic studies as described previously (Bastard et al., 1992). Some cells were cryopreserved for various periods before DNA extraction. DNA from patient VAL was prepared from a stable continuous cell line established from bone marrow cells bearing a t(8;14;18)(q24;q32; q21) and a t(3;4)(q27;q11) (unpublished data).

DNA Extraction and Southern Blot Analysis

DNA was isolated by the sarkosyl-proteinase K-phenol/chloroform method. After digestion with restriction endonucleases, DNA fragments were electrophoresed on 0.8% agarose gels, transferred onto nylon N + membranes, and hybridized as recommended by the suppliers (Amersham).

DNA Cloning and Sequencing

DNA from the NHL LAR cells carrying a t(3;14) translocation was partially digested with Sau3A. The 15–20 kb fraction was ligated into the BamH1

Received February 9, 1993; accepted April 16, 1993.

Address reprint requests to Christian Bastard, MD, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 609 Chemin de la Bretèque, BP 58, 76232 Bois-Guillaume Cedex, France.

150 DEWEINDT ET AL. XHE E Е Ε (E) (E) Ē Xh XhB Х Xh E н H н IH н 1 kbλGG1 F372 F370 F381 0.4X-P (S) Xh н^В Х'n_Н Ε ХР XhB Х Х (S) Н Н H λ3LA5 Enh Sw Cµ J₆ <u>4</u>45 BX B Х Х (S) Н н Н λ3LA1 Enh Sw Cµ

FIG. 1. Molecular cloning of the t(3;14) translocation breakpoints from NHL LAR DNA: restriction maps of the rearranged clones λ 3LAS and λ 3LA1 detected with the JH probe, and of the chromosome 3 gemline clone λ GG1, detected with the λ 3LA5-derived F372 probe. Solid and open horizontal bars represent regions of chromosome 14 and

3, respectively, whereas the hatched horizontal bar in λ 3LA5 denotes region of a VH3-containing segment, in an inverted orientation, juxtaposed to a JH3 segment (opposite horizontal arrows). Restriction enzyme sites are indicated as follows: B, BanHI; E, EcoRI; H, HindIII; P, PstI; S, SaII; X, XbaI; Xh, XhoI (cloning sites are in parentheses).

arms of bacteriophage EMBL3. The resulting library was screened with a 2.2 kb Sau3A JH probe derived from germline chromosome 14 DNA (a generous gift from P. Guglielmi). Positive recombinants were subcloned into Bluescript KS II phagemid for DNA sequencing by the dideoxy chain termination method, using the Sequenase sequencing kit (USB) and synthetic oligonucleotide primers deduced from the complementary sequences (Ravetch et al., 1981) of different IH segments. Probes from λ 3LA5 subclones were selected for absence of repetitive sequences. F372 (Fig. 1) was used for the isolation of a chromosome 3 DNA containing clone (λGG1) from an EMBL4normal human DNA library, and for chromosome assignment.

RESULTS AND DISCUSSION

To clone a breakpoint at 3q27, we used the DNA from a case (*LAR*) carrying the t(3;14) (q27;q32) chromosomal translocation and which exhibited one germline and two rearranged *Bam*H1 and *Hin*dIII DNA fragments with a JH probe on Southern blot analysis. An EMBL3 library prepared after partial digestion with *Sau*3A of *LAR* DNA was screened for recombinants with the same JH probe which allowed the isolation of two kinds of clones, schematized in Figure 1 by λ 3LA1 and λ 3LA5.

To distinguish the normally V-D-J rearranged clone from the 14q + derived one, we performed sequence analysis on IH-hybridizing subclones using anti-sense oligonucleotide IH primers (Ravetch et al., 1981). λ 3LA1 showed a V4-D2-J6-C μ functional rearrangement and λ 3LA5 revealed joining of J3 at its 5' end with the 3' end of an inverted sequence of a VH segment (Chen, 1991). Alignment of these sequences shows (Fig. 2) the conserved heptamer nonamer recombination signals of J3 and VH3, separated by 23 base pairs, with the VH3 signal still present at the chromosomal joining site in LAR DNA. These signals and other adjacent intron conserved elements (shown by asterisks in Fig. 2) could have mediated an illegitimate V-J recombination despite the absence of the regular (Tonegawa, 1983) 12-23 base pair structure. The possibility of a cloning artifact was ruled out since i) the same V-J junction was found in two other independent recombinant clones; ii) polymerase chain reaction (PCR) experiments amplified a fragment with the expected size, using the genomic DNA from LAR cells and oligonucleotide PCRprimers flanking the joining site of VH and J3; and iii) the probe 0.4XP, which is 5' to J3 in λ 3LA5 (Fig. 1), detected the same rearranged 5 kb fragment as did the JH probe upon Southern blot hybridization of HindIII digested LAR DNA.

We attempted to identify chromosome 3 se-



FIG. 2. Alignment of the JH-containing sequence from LAR t(3;14) DNA to chromosome 14 genomic germline sequences from JH3 and (inverted) VH3 segments. The black box and the horizontal line indicate the coding region of J3 and VH3, respectively. Open boxes show the

heptamer-nonamer conserved sequences separated by 23 bp. Other conserved elements in the intron sequences 5' to JH3 and 3' to VH3 are marked by asterisks.

quences 5' to J3 in λ 3LA5 subclones by use of a panel of well characterized human-rodent hybrids (Nguyen et al., 1986). This was achieved as shown in Figure 3 with a 2.3 *Bam*H1-*Xho*1A fragment (probe F372, Fig. 1) which detected two *Eco*R1 fragments (9.5 and 3.3 kb) in human control DNA and only in hybrids containing human chromosome 3 material.

Southern blot hybridization of NHL LAR DNA with probe F372 revealed (Fig. 4) additional bands with the expected size (1.8 kb *Hin*dIII and 7.5 kb Xba1), confirming the second rearrangement seen in λ 3LA5.

Using this probe, we cloned the unrearranged counterpart, λ GG1 (Fig. 1) from a normal human DNA library. Restriction map and sequence comparisons between λ 3LA5 and λ GG1 indicated rearrangement in λ 3LA5 at a *Hin*dIII site located 2.5 kb 5' to J3. Therefore, λ 3LA5 was assumed to contain the chromosome 14q + complex rearrangement: Telomere 3q-3q27 :: 14q32 inv (VH):: 14q32 (J3-Cµ)-14 centromere.

Using the chromosome 3-derived probes F370, F372, and F381 (Fig. 1), we screened DNAs from 17 NHL with translocations at band 3q27 for rearrangements. Southern blots of DNAs digested

with Xba1 (Fig. 5) and with EcoR1, HindIII, BamH1, and Xba1 (Fig. 4) revealed rearranged fragments in nine patients, including case LAR, from 11 studied with t(3;14)(g27;g32), and moreover in 1 of 2 NHL with t(3;22)(q27;q11), 1 of 2 with t(2;3), and in 2 of 2 NHL with other 3q27 translocations (not involving an iG locus), namely, t(3;7)(q27;p12) and t(3;4)(q27;p11). This latter case (VAL) also demonstrated two rearranged, 13 and 7 kb, XbaI fragments and neither the 14 kb XbaI (Fig. 5) nor the 3.3 kb EcoRI and 3.7 kb HindIII germline fragments (Fig. 4). Therefore, although the other chromosome 3 in this case appeared normal on cytogenetic analysis, molecular alterations at band 3q27 were present on both chromosomes 3. Thus, only 4 of 17 patients did not exhibit molecular rearrangement with our 3q27 DNA probes. By a detailed analysis of DNA restriction fragments from the 13 rearranged tumors, we mapped the 3q27 translocation breakpoints within a 10 kb BamHI-XbaI fragment as illustrated in Figure 6.

The finding of this MTC associated with the third most common chromosomal abnormality (Bastard et al., 1992) in NHL offers important new prospects. For example, probes F370, F372, and

	ľ									
		_		HY	BRI	DS				
Chr	^	B	<u>с</u>	D	E	F	G	н	1	J
1								•		
' 2				•			•	•		
۲ ۲								•		
4							÷	÷	÷	
5	- I	•							•	
~			÷	÷			ż			
7	ľ		Ĭ	Ī		Ī	Ξ	•		
,			Ţ	Ť		. <u>.</u>				
	<u>-</u>	Ξ	Ξ		•	1	•	•	+	
y	<u>+</u>			+			+	+		
10	±					+		±		
11		+	+	+		+	+	+		
12		+	+			+	+	+		
13	±		+				+	+		1
14	+		+		+	+	+		+	
15	+		+		+		±	+		
16	+		+	+	+	±		+	±	
17										±
18	±	+	+	±			+	+		
19	+	+		+	+		+		+	
20			+	+		+	+		+	
21			+	+	+	+		+		
22			+	+		+				
x		+	+	+	+					
Ŷ			-						+	



FIG. 3. Assignment of probe F372 to chromosome 3. Probe F372 derived from the V-J rearranged λ 3LAS recombinant (Fig. 1) was hybridized to a panel of EcoRIdigested DNAs from 10 well characterized (Nguyen et al., 1986) rodent-human hybrids (listed A to J on the left for BCH-E, BCH-I, BCH-J, BCH-N, C56-F, C34-S, C34-V, C34-X, C34-FU, and C34-G1, respectively). The Southern blot (right) shows two human 9.5 and 3.3 kb specific bands in control human DNA and in hybrids A, G, H, and I, which contain human chromosome 3 material. An intermediate-migrating band observed in all hybrids is specific for rodent DNA (see control DNAs from mouse, hamster, and human I-2 on the right of the blot). Hybridization and washing of the blot were performed under standard high stringency conditions.

F381 can be used as molecular markers for the diagnosis of the translocation at band 3q27. It will be interesting to screen cases of NHL without cy-togenetically visible chromosome 3 alterations, as well as carcinomas with 3q + marker chromosomes (Mitelman et al., 1983; Waghray et al., 1992). This MTC in NHL bearing t(3;14)(q27;q32) also raises the possibility, with the polymerase chain reaction, to detect minimal residual malignant cells, using a unique set of primers for 3q27 and consensus JH DNA sequences, as previously described for follicular lymphomas with t(14;18) (Lee et al., 1987).

Our results strongly suggest that a novel oncogene, located in the vicinity of the 3q27 MTC, may be involved in B-cell tumorigenesis. Recently, two retroviral integration sites described in murine myeloblastic leukemias, Fim 3 (Bordereaux et al., 1987; Nguyen et al., 1989) and Evi-1 (Morishita et al., 1992; Fichelson et al., 1992), were mapped to this region of chromosome 3. Proviral integration in both loci activates the expression of the EVi1 gene. The latter is also expressed in human myeloblastic leukemias with translocations or inversions of the 3q26 region but was not expressed in one case of NHL with t(3;14) (Fichelson et al., 1992). Using a probe located 13 kb telomeric from the LAR breakpoint, we cloned a cDNA encoding a new zinc finger protein, distinct from EVi1, the 5' part of which maps in the 3.3 *Eco*R1 fragment recognized by F381, and which could be deregulated in these translocations. Data concerning this novel transcriptional unit, which is involved in 3q27 translocations and which we term *LAZ3* for lymphoma associated zinc finger protein at chromosome 3 (accession number:Z21943, EMBL Nucleotide Sequence Database), will be published elsewhere.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer and the Ligue Nationale Française contre le Cancer, Comité du Nord.

We are grateful to Dr. David Y. Mason for helpful discussions and critical review of the manuscript. BREAKPOINT CLUSTER REGION AT 3q27 IN LYMPHOMA



FIG. 4. Southern blot analysis of DNA from two cases of NHL (LAR and HAY) bearing t(3;14) and from a case with t(3;4) (VAL), hybridized with probe F372. Abnormal bands are indicated by arrows in DNA from LAR and VAL. The germline fragments, 3.3 kb EcoRI, 3.7 kb HindIII, 10 kb BarnHI, and 14 kb Xbal are absent in DNA from VAL.



FIG. 5. Southern blot analysis of Xbal-digested DNAs from eight different NHL carrying translocations at band 3q27, hybridized with probe F370. Rearranged alleles, in addition to the germline 14 kb bands, are clearly visible in six patients (arrows). The two remaining cases, DUH [t(2;3)] and EDE [t(3;14)], appeared rearranged on careful exam-

ination of this blot (presence of a larger 14 kb band). Case VAL shows two rearranged 13 and 7 kb alleles. A nonspecific 3.5 kb band, present in all lanes, was attributed to a phage contamination of the size marker probe. T, normal human DNA; M, size marker phage DNA. DEWEINDT ET AL.



FIG. 6. The translocation breakpoints in NHL carrying 3q27 chromosomal alterations are clustered within a 10 kb BomHI-Xbal restriction fragment. The location of the respective breakpoint sites, deduced from hybridization analyses with probes F370, F372, and F381 after digestion

154

REFERENCES

- Bastard C, Tilly H, Lenormand B, Bigorgne C, Boulet D, Kunlin A, Monconduit M, Piguet H (1992) Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. Blood 79:2527-2531
- Borderaux D, Fichelson S, Sola B, Tambourin PE, Gisselbrecht S (1987) Frequent involvement of the FIM-3 region in F-MULVinduced mouse myeloblastic leukemia. J Virol 61:4043-4045.
- Chen PP (1991) Structural analyses of human developmentally regulated vh3 genes. Scand J Immunol 31:257-267.
- Fichelson S, Dreyfus S, Berger R, Melle J, Bastard C, Micléa JM, Gisselbrecht S (1992) EVI1 expression in leukemic patients with rearrangements of the 3q25-q28 chromosomal region. Leukemia 6:93-99
- Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D, Golomb HM (1979) Chro-mosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. Cancer Res 39:3119-3128.
- Leder P, Battey J, Lenoir G, Moulding C, Murphy W, Potter H, Stewart T, Taub R (1983) Translocations among antibody genes in human cancer. Science 222:765-771.
- Lee MA, Chang KK, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA (1987) Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. Science 237:175–178. Lenoir GM, Preud'homme JL, Bernheim A, Berger R (1982) Cor-
- relation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. Nature 298:474-476.
- Manolova Y, Manolov G, Keiler J, Levan A, Klein G (1979) Genesis of the 14q + marker in Burkitt's lymphoma. Hereditas 90:5-10.

by Xba1, EcoR1, BomH1, and HindIII, is shown schematically below the restriction map for a normal chromosome 3. Patients are identified by three letters and by their unique patient numbers (UPN) (Bastard et al., 1992).

- Mitelman F, Mark-Vendel E, Mineur A, Giovanella B, Klein G (1983) A 3q + marker chromosome in EBV-carrying nasopharyn-
- geal carcinomas. Int J Cancer 32:641-655. Morishita K, Parganas E, Willman CL, Whittaker MH, Drabkin H, Oval R, Taetle R, Valentine MB, Ihle JN (1992) Activation of EVI1 gene expression in human acute myelogenous leukemias by translocations spanning 300-400 kilobases on chromosome band
- 3q26. Proc Natl Acad Sci USA 89:3937-3941. Nguyen VC, Weil D, Finaz C, Cohen-Haguenauer O, Gross MS, Jegou-Foubert C, de Tand MF, Cochet C, de Grouchy J, Frezal J (1986) Panel of twenty-five independent man-rodent hybrids for human genetic marker mapping. Ann Genet (Paris) 29:20-26. Nguyen VC, Fichelson S, Gross MS, Sola B, Borderaux D, de Tand
- MF, Guilhot S, Gisselbrecht S, Frezal J, Tambourin P (1989) The human homologs of FIM-1, FIM-2/c-Fms and FIM-3, three retroviral integration regions involved in mouse myloblastic leukemias, are respectively located on chromosomes 6p23, 5q33 and 3q27. Hum Genet 81:257-263. Ravetch JV, Siebenlist U, Korsmeyer S, Waldmann T, Leder P (1981) Structure of the human immunoglobulin Á locus: Charac-
- terization of embryonic and rearranged J and D genes. Cell 27: 583-591.
- Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. Nature 302:575-581.
- Waghray M, Parhar RS, Taibah K, Al-Sedairy S (1992) Rearrangements of chromosome arm 3q in poorly differentiated nasopharyngeal carcinoma. Genes Chrom Cancer 4:326-330.

II- Clonage du gène LAZ3.

De nombreux exemples montrent que les translocations chromosomiques conduisent à la dérégulation de proto-oncogènes localisés à proximité des points de cassure. Les données cytogénétiques et les analogies entre les translocations en 3q27 et les translocations impliquant la région 8q24, correspondant à la localisation du protooncogène MYC, ainsi que la caractérisation de ce "cluster" de points de cassures en 3q27, renforçaient l'idée de la présence d'un proto-oncogène localisé à proximité du MTC.

Ceci fut confirmé par le clonage de ce nouveau gène que nous avons nommé LAZ3 pour "Lymphoma Associated Zinc finger gene on chromosome 3", qui parut dans Nature genetics: 5, 66-70 en septembre 1993.

Nous avions remarqué qu'un fragment d'ADN génomique *Eco* RI de 7 kb, spécifique du chromosome 3 et centromérique par rapport au MTC, détectait sur un *northern multi tissu* un transcript de 3,8kb, d'expression ubiquitaire mais prédominante dans le muscle squelettique. Cette sonde nous a permis d'isoler, à partir d'une banque de cDNA de muscle squelettique, 2 clones chevauchants, nommés M47 et M55, ayant un cadre ouvert de lecture pour une protéine de 706 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 79kDa. Par la suite, en criblant une banque d'ADNc 5' stretch réalisée à partir de muscle squelettique (Clontech), nous avons isolé un clone d'ADNc contenant une version quasiment complète du gène *LAZ3*.

La séquence nucléotidique du gène *LAZ3* nous a permis d'identifier 2 régions contenant des motifs fonctionnels identifiés:

- une région carboxy-terminale possédant 6 motifs en doigts de zinc de type C2H2, domaine d'interaction de facteurs de transcription avec l'ADN.

- une région amino-terminale montrant une conservation entre les acides aminés 4 à 118 avec certains facteurs de transcription, identifiés précédemment chez la drosophile ou l'homme, ainsi qu'avec plusieurs protéines de poxvirus de fonction inconnue.

Peu de temps après la publication de ce nouveau gène *LAZ3*, plusieurs équipes identifièrent ce même gène nommé *BCL6* par l'équipe de Dalla-Favera (Ye *et al.*, 1993b) ou encore *BCL5* par une équipe japonnaise (Miki *et al.*, 1994).

LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas

Jean-Pierre Kerckaert, Clotilde Deweindt, Hervé Tilly, Sabine Quief, Gérard Lecocq & Christian Bastard

Reprinted from Nature Genetics, Vol. 5, September 1993 Issue

article

LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas

Jean-Pierre Kerckaert¹, Clotilde Deweindt¹, Hervé Tilly², Sabine Quief¹, Gérard Lecocq¹ & Christian Bastard³

We have shown previously that chromosomal translocations involving chromosome 3q27 and immunoglobulin gene regions are the third most common specific translocations in non-Hodgkin's lymphoma (NHL). We now report the isolation of a gene that is disrupted in two cases by t(3;14) and t(3;4) translocations. The gene (*LAZ3*) encodes a 79 kDa protein containing six zinc-finger motifs and sharing amino-terminal homology with several transcription factors including the *Drosophila tramtrack* and *Broad-complex* genes, both of which are developmental transcription regulators. *LAZ3* is transcribed as a 3.8 kb message predominantly in normal adult skeletal muscle and in several NHL carrying 3q27 chromosomal defects. We suggest that it may act as a transcription regulator and play an important role in lymphomagenesis.

¹Unité 124 INSERM. Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France ²Centre Henri Becauerel, rue d'Amiens, 76038 Rouen, France ³Departement de Cytogénétique, Centre Régional de transfusion sanguine, 609 chemin de la Bretèque, BP 58, 76232 Bois-Guillaume Cedex, France

Correspondence should be adressed to J.P.K. Haematologic malignancies are associated with acquired specific chromosomal alterations which often lead to the oncogenic conversion of master genes¹ or of protooncogenes encoding transcription regulators¹⁻⁴. In B-cell neoplasms a number of recurring chromosomal translocations involve the immunoglobulin heavy and light chains gene regions at bands 14q32, 2p12 and 22q11 (ref. 5). Molecular studies of these abnormalities have yielded new data on the role in normal and neoplastic cell growth of oncogenes localized at the translocation breakpoints. The most frequent in non-Hodgkin's lymphomas (NHL) aret(14;18)(q32;q21), associated with follicular lymphoma⁶ and t(8;14)(q24;q32) and its variants, associated with Burkitt's lymphoma^{7,8}.

A new recurring translocation was recently reported in 43 out of 319 NHL patients, involving chromosome 3q27 and either one of the immunoglobulin genes (20 patients) or another chromosome partner (23 cases)⁹. A t(3;14)(q27;q32) was most common, being found in 15 patients with the two variant translocations, t(3;22)(q27;q11) and t(2;3)(p12;q27), occurring in three and two patients, respectively. Although most patients had a complex karyotype, the possibility that 3q27 translocations could be a primary event was supported by two cases in which it was the sole cytogenetic abnormality⁹. More recently, we characterized the lymphoma-associated 3q27 breakpoint from a case carrying (3;14)(q27;q32) translocation. We cloned molecular probes that detected a major translocation cluster region (MTC) at band 3q27, as 13 of 17 patients with 3q27 chromosomal defects showed DNA rearrangement within a unique 10 kb restriction fragment¹⁰. The finding of this MTC associated with the third most common chromosomal abnormality in NHL strongly suggested that a novel oncogene, located in the vicinity of the 3q27 MTC, might be involved in B-cell tumorigenesis.

Here we describe the isolation of a gene that is disrupted in two cases of NHL by 3q27 translocations. Analyses of the DNA and predicted protein sequences and of the RNA expression indicate that (i) this gene encodes a zinc-finger protein that shares N-terminal homology with developmental transcription regulators in *Drosophila* and (ii) it is predominantly expressed in normal adult skeletal muscle and NHL associated with 3q27 translocations.

Mapping the 3q27 breakpoint

Previous results from Southern blot analysis of the DNA from a case (LAR) carrying the t(3;14)(q27;q32)chromosomal translocation using an immunoglobulinheavy chain (IgH) JH probe had revealed one germline and two rearranged BamHI or HindIII fragments. A DNA library from LAR tumour cells was screened using this probe and several clones were identified corresponding either to a somatic rearrangement of IgH genes or to the t(3;14)¹⁰. Detailed restriction maps and specific probes were obtained for the translocated allele and the unrearranged chromosome 3 region. This allowed identification of DNA rearrangements at the 3q27 MTC in a B-cell line established from patient VAL carrying a t(3;4)(q27;p11) translocation (C.B., unpublished results). We now present (Fig. 1) the molecular cloning and determination of the junction of 3q27 and 14q32 sequences in LAR DNA and of 3q27 and 4p11 sequences in the VAL cell line, showing very closely spaced (nine nucleotides apart) chromosomal breakpoints in these two NHLs.



Fig. 1 Breakpoint region on chromosome 3 q27 in non-Hodgkin's lymphoma. Restriction maps of the sequences created by t(3;14)(q27;q32) and t(3;4)(q27;p11) translocations in patient LAR (a) and B-cell line VAL (b), respectively and of the 3q27 germline configuration (c). The centromeric and telomeric chromosomal orientations (horizontal arrows) and the chromosomal breakpoints (vertical arrows) are indicated. In *LAR* DNA, chromosome 14q32 sequences including the *JgH* enhancer (closed circle) and the *JH* region (black vertical bars) which rearranged¹⁰ at the *J*3 segment with an inverted *VH* region (hatched horizontal bar), are joined to chomosome 3q27 sequences (open horizontal bar). The first three exons of *LAZ3* are indicated (open vertical bars) to show its disruption following the translocation. Restriction sites: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI, H, *Hin*dIII; X, *Xba*I; Xh, *XhoI. d*, The nucleotide sequence of the t(3;14) and t(3;4) junctions are aligned with the corresponding 3q27 germline region, showing that the two breakpoints are separated by only nine nucleotides.

Detection of mRNA transcript

To search for a functional transcriptional unit in the vicinity of the 3q27 breakpoint, we used sub-cloned fragments derived from the germline chromosome 3 spanning this region to probe a multi-tissue northern blot. A 7 kb *Eco*RI fragment, (pEE7.0; Fig. 1) telomeric to the breakpoint, hybridized to a 3.8 kb mRNA transcript. This was expressed predominantly in normal skeletal muscle tissue (Fig. 2*a*), to a much lower level in lung and barely in other tissues. A faint band at 12–13 kb could also be detected in skeletal muscle and lung tracks. To control for mRNA quality and to evaluate the relative levels of the transcripts, the same northern blot was rehybridized with a p53 cDNA probe and then with a β -actin cDNA probe. The results showed that the level of the 3.8 kb skeletal



muscle transcript was much higher than the p53 transcript. The pEE7.0 probe hybridized to the 3.8 kb transcript in total RNA extracted from 4 cases of NHL bearing 3q27 cytogenetic rearrangements (Fig. 2b, c). In the t(3;4) VAL cell line, the transcript was a little larger (4.0 kb) than in the t(3;14) NHL, and no detectable signal could be observed in the REC-1 lymphoblastoid B-cell line which does not carry any cytogenetically visible rearrangement of chromosome 3.

Sequence analysis of LAZ3 muscle cDNA clones

The above results prompted us to screen a muscle cDNA library and thereby to identify overlapping clones including those termed M55 and M47 (Fig. 3*a*). Nucleotide sequence analysis (Fig. 3*b*) indicated a major open reading frame, encoding a putative protein of 706 amino acids with a calculated molecular weight of about 79 kDa. The main structural characteristic of this protein is the presence, at the C-terminal region, of

six C, H, zinc-finger motifs spaced with the conserved H/ C-link¹¹. One of these, (finger no. 5; Fig. 3b) was found to be identical, except for one nucleotide, to that described as ZNF51 by Lichter *et al.*¹² who cloned a number of zincfinger gene loci using a conserved oligonucleotide sequence probe and then mapped their chromosomal localisation. These loci were found to cluster at chromosome terminal regions and fragile sites¹² and the ZNF51 locus was assigned to chromosome 3qter. It is therefore likely to correspond to, or be clustered with, the gene studied here, and we propose that it be named LAZ3 (Lymphoma-associated zinc-finger gene on chromosome 3).

Protein sequence homologies

Comparison of LAZ3 amino acid sequence with those in

Fig. 2 Identification of the LAZ3 transcriptional unit. PolyAmRNA from different human tissues (a), total RNA from NHL blast cells (b) and total RNA and polyA-mRNA from VAL cells (c), were hybridized on northern blots to the chromosome 3 EcoRI 7 kb fragment (pEE7.0; Fig. 1). The multi-tissue northern blot was reprobed with the ubiquitously expressed β-actin - which cross-hybridizes with shorter transcripts of α-actin in heart and muscle tissues - and p53 genes as internal RNA integrity and loading controls. Except for actin probing (3 hour exposure), blots were exposed for 16 h with two intensifying screens at -80 °C. REC (without any cytogenetically visible 3q27 rearrangement) and VAL (carrying t(3;4)(q27;p11)) are lymphoblastoid cell lines established spontaneously from non-Hodgkin's B-cell lymphomas (C. B., unpublished observations); other samples, COR, EDE, FRE, LAR and MAI, are fresh lymphoblastoid cells from NHL all of which carry a t(3;14) translocation. RNA from FRE and LAR was degraded, as revealed by absence of the 28S and 18S ribosomal cohybridizing bands.

the Swissprot bank (vers. 23, august 1992) revealed homology to the tramtrack (ttk) Drosophila zinc-finger transcription factor¹³. The aligned N-teminal, helical domains (LAZ3 residues 12-118 and ttk, 11-115; Fig. 4) displayed 28% identity and 50% homology when taking into account conservative amino-acids. Significant homology was also found within the N-termini of (i) other zinc-finger DNA-binding proteins (Fig. 4), the Nterminal core domain of the Drosophila Broad-complex (Br-c) proteins¹⁴ and the human KUP protein¹⁵ and (ii) several viral proteins of the poxvirus family (not shown) including the vaccinia virus C2L and A55R, the myxovirus M9 and the Shope Fibroma virus T8 and T9. The similarity in their N-terminal domains, between these viral proteins and the cellular zinc-finger proteins ttk, Br-cand KUP was recently reported¹⁶.



b

A S P A D S C I O F T R H A S D V LLNLNRL RDI 30 TTGACTGATGTTGTCATTGTTGTGAGCQCGTGAGCAGTTTAGAGQCCATAAAAACGGTCCTCATGGCCTGCCAGTGGCCTGTTCTATA 60 F T D Q L K C N L S V I N L D P E I N P E G F C I L L D F M TACACATCTCCGCTCAATTGCCGCGCGCAACATCATCGCCGTGTGCGCCACGCCTATGTACCTCCAGATCGACGCACGTGTGGTGGACACT 90 355 T S R L N L <u>R</u>EG N I N A V M A T A M Y L Q M E H V D T 120 TGCCGGAAGTTTATTAAGGCCATTGAAGCAGAGATGGTTTCTGCCATCAAGCCTCCTCGTGAAGAGTTCCTCAACAGCCGGATGCTGATG IKASEAEMVSAIKPP EEFL L M 150 535 P Q D I M A Y R G R E V V E N N L P L R S A P G C E S R A F GCCCCCAGCCTGTACAGTOGCCTGTCCACACOGCCAGCCTCTTATTCCATGTACAGCCACCTCCTCTCCAGCAGCCTCCTTCTCCAGA 625 A P S L Y S G L S T P P A S Y S M Y S H L P.V S S L L F S D GAGGAGTTTCCCGATGTCCCGATGCCCTTCCCCAACGGAGCCGCATCCCATGTGATAGTCCCAGGCCAGCCCTGGG D 210 715 P G 240 805 E Y S R P T L E V S P N V C H S N I Y S P K E T I P E E A R GTGATATOCACTACACTEGEGGCTGAGGGCTCAAACTOCTGGGGCCCCCAGAATOCCCTGTGCGCTGAGAGGCGGG 895 S D M H Y S V A E G L K P A A P S A R N A P Y F P C D K A S ANAGANGANGANGAGACCTOCTOCGANAGAGAGAGACCTCGATTCOACCCCCAATGCACCCCTGAACCGGAAGGGTCTGGTTAGT S 300 V S 330 EERPSSEDEIALHFEPPNAPLN CTACAGAGCCCCCCAGAAATCTIGACTGCCCAACCCCAACAGAGTCCTGCAGCAGCAGCAGGAAGAATGCTGCATCCTCCAGGCTTCTGGG 1075 P Q S P Q K S D C Q P N S P T E S C S S K N A C I L Q A S G TCCCCTCCAGCCAAGAGCCCCCTGACCCCCAAAGCCTGCAACAAGTACAAGTTCATGGTGCTCAACAGCCTCCAATCAGAATGCC 360 1165 A 390 1255 P M E P 420 1345 450 SESHSPLYMHP S 480 SPRS s CAGTOCOCACAGCATGCAGAGATGTGCCTCCACACCGCTGGCCCACGTTCOCTGAGGAGATGGGAGAGACCCAGTCTGAGTACTCAGAT $\begin{array}{c} Q \hspace{0.5mm} S \hspace{0.5mm} P \hspace{0.5mm} Q \hspace{0.5mm} A \hspace{0.5mm} E \hspace{0.5mm} M \hspace{0.5mm} C \hspace{0.5mm} L \hspace{0.5mm} H \hspace{0.5mm} T \hspace{0.5mm} A \hspace{0.5mm} G \hspace{0.5mm} P \hspace{0.5mm} T \hspace{0.5mm} F \hspace{0.5mm} P \hspace{0.5mm} E \hspace{0.5mm} E \hspace{0.5mm} M \hspace{0.5mm} G \hspace{0.5mm} E \hspace{0.5mm} T \hspace{0.5mm} F \hspace{0.5mm} P \hspace{0.5mm} E \hspace$ D 510 1615 T 540 1705 H S D K P Y K C D R C Q A S P R Y K C N L A S H K T V H T G 570 GAGANACCCTATCGTTGCAACATCTGTGGGGGCCAGTTCAACCGGACAGCGAAATCACTCGAGAGAAG E K P Y R C N I C G A Q P N R P A N L K T H T R I H S G E K CCCTACAAAATGGGAAACCTOOGAGGOCAGATTTGTACAGGGGGCCACCTOCGTGCCTATCCACACTOGTGAGAAGOCTAT 600 1885 ¥ 630 1975 660 V O 690 2155 Y S X T D L P P E L P X A C *** 2245 AGATCTACCAAAGGATACTGTACACTTTACAATGTCATCCCATGTGCAGAGCGTTTCATCCCACTAGTGCAAATCATAGCCGG 706 2425 TIGCTICTTCTCCTATGTGTAAGGTGAACCATGTCAGCAAAAAGCAAAATCATTTTATATGTCAAAGCGGGGGGG

Fig. 3 Identification of *LAZ3* zinc-finger encoding gene. *a*, Map of *LAZ3* muscle cDNA. *b*, Nucleotide and predicted amino acid sequences from the *LAZ3* cDNAs. The nucleotide and amino acid sequences are numbered on the left and right, respectively. The splice junctions of the first three exons are indicated by brackets. Two in-frame stop codons preceding the first methionine are underlined. The six zinc-finger motifs are shaded. The nucleotide sequence will appear in the EMBL Nucleotide Sequence Database (accession number Z21943).

Disruption of LAZ3 by 3q27 translocations

Hybridization experiments and comparison of the LAZ3 cDNA with sub-cloned genomic sequences enabled us to determine the splice junctions, position and length of the first three exons, as shown on the germline chromosome 3 DNA and on the cDNA in Figs 1 and 3, respectively. The first putative ATG initiation codon preceded by two inframe stop codons, was found in exon 2, which starts at the M55 cDNA nucleotide position 36 (Fig. 3b). This indicated that the first 35 bp originate from an upstream non-coding exon 1. An anti-sense oligonucleotide corresponding to this 35 bp sequence was used as a hybridization probe to localize and as a primer to sequence, the 3' end and the donor splice site of exon 1 in a 0.5 kb EcoRI-BclI fragment (pEB0.5) centromeric to the 3q27 translocation breakpoint (Fig. 1). Consequently, LAZ3 was disrupted in the first intron and deleted of its first exon and regulatory 5' sequences in the two NHL bearing t(3;14) and t(3;4) translocations studied here.

Discussion

We report that the lymphoma-associated 3q27 chromosomal translocation results in the disruption of LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, in two NHL carrying t(3;14) or t(3;4). The genomic pEE7.0 probe derived from chromosome 3 located about 10 kb telomeric to the 3q27 breakpoint, recognized a 3.8-4 kb mRNA transcript in most tissues but predominantly in adult skeletal muscle and in the four cases of NHL associated with 3q27 translocation that were investigated (Fig. 2b). The same probe was used to isolate several muscle cDNA clones. The nucleotide sequence of these indicated that (i) LAZ3 is composed of at least of nine exons with a very large internal exon 4 (data not shown) and (ii) the first, untranslated, exon is located 1 kb centromeric to the 3q27 breakpoint. Exon mapping and sequencing experiments also reveal that, as the first ATG initiation codon is telomeric to the breakpoint and thus remains on the translocated allele (Fig. 1), LAZ3 should be a full-length, wild-type protein, unless the ATG-containing exon 2 is alternatively spliced. This is consistent with the possibility that the translocated LAZ3 is fused to, and governed by, ectopic promoter and enhancer sequences such as the IgH enhancer in t(3;14) (NHL LAR, Fig. 1). An inappropriate expression of LAZ3 following chromosomal translocation in NHL may well have a direct role in the neoplastic process. This may be relatively frequent and hence more important than rarer events if we consider that 3q27 rearrangements appeared to be involved in 15-20 % of NHL (C. B., unpublished observations)⁹.

The structural features of LAZ3 — the conserved viralcellular N-terminal domain and the C-terminal zinc fingers — make it a potential DNA-binding regulatory protein. The *Drosophila ttk* gene, a DNA-binding zinc-finger protein, is involved in transcriptional control by repressing inappropriate segmentation gene transcription during embryogenesis^{13,17}. Also, the other *Drosophila* N-terminal homologues, the *Br-c* zinc-finger genes, are supposed to act as transactivating factors in the hormone-dependent regulatory cascade which precedes metamorphosis¹⁴. Although the function of the viral and cellular related domains remains to be elucidated, it might involve binding of analogous ligands other than DNA¹⁶.

Most of the transcription factor encoding genes involved in leukaemia and lymphomas¹⁻⁴ belong to HLH-, leucine

KUP	(4-57)	ASHSUVLUQUINHQHEFOFICUCTVALGUVINKAHRAVDAHESNYRKIIHHOT	
BR~C	(12-65)	NNYQSSITSAFENERDEAAVDVTLACEGRSIKAHRAVLSACSPYPRELLKSTP	
TTK	(11-64)	NNHQSNLUSVPDQULAATFTDVTLAVEGOHLKAHRAVLSACSPYPRTLEVSHP	
LAZ-3	(12-65)	TRHASDVLLNINRLSRDILTDVVIVVSREQERAHKTVLMACSCLTVSIFTDOL	
KUP	(58-108)	SECIKIOPTDIOP-DISSIDHIMYTCKOP-KOIVDHSRÜEEGIRFÜHADYKS	
BR-C	(66-116)	CKHPVILLOVNEM-DLHA-LVEBIYHCEVNYHOKSLOSFIKHAEK-LRYSCIT	
TTK	(65-115)	EKHPIJILKOVPXS-DMKS-LLDEMYRCEVSVODERIMAFIKVAES-LRIKGET	
LAZ-3	(66-118)	KCNLSVINLOPEINPEGECILLDEMYTSKINLKEGNIMAVHATATK-LOHEHYV	

Fig. 4 Alignment of the amino-terminal domains of LAZ3 and of the zinc-finger proteins: KUP, a human DNA-binding protein¹⁵; the core N-terminal region of Br-c (broad complex) proteins¹⁴ and ttk (Tramtrack)¹³ transcription regulators from *Drosophila melanogaster*. Positions corresponding to identities (black) and homologies (grey) between LAZ3 and the above proteins were obtained using the CLUSTAL alignment program (PCGENE).

zipper-, LIM- and homeobox-gene classes. The zincfinger family includes a growing number of rearranged genes. PML-RAR α and EVI1 undergo oncogenic conversion by gene fusion or aberrant gene expression, respectively, by chromosomal translocations t(15;17)18,19 and retroviral insertions or abnormalities in the 3q25q26 chromosome band^{20,21}. In a T-cell acute lymphoblastic leukaemia, the t(11;14)(p15;q11) activates multiple transcripts including the TTG1 zinc-finger gene²². More recently, several groups reported the disruption of a human homologue of the Drosophila trithorax(trx) gene by 11q23 translocations in acute leukaemias²³⁻²⁵. In t(11;19) and t(4;11) translocations, this trx-like zinc-finger gene is fused either to a serine/proline-rich encoding gene (ENL) from chromosome 19 (ref. 24) or to the AF4 gene from chromosome 4 (ref. 25), respectively.

Our initial observation of a preferential expression of *LAZ3* in human adult skeletal muscle, and preliminary results on the differential expression of *LAZ3* in developing murine muscle cells (S.A. Leibovitch, J.P.K., C.D. and C.B. unpublished observations), suggest a developmental regulation and a possible role of *LAZ3* in the myogenic regulatory gene hierarchy by controlling (or being under the control of) HLH-members of the *MyoD* gene family²⁶.

Although still hypothetical, both the normal and oncogenic (positive or negative) trans-activating functions of LAZ3 are likely to be important in specific-cell proliferation or differentiation. Appropriate experiments are now in progress to investigate the transcriptional regulation of LAZ3 and possible function(s) of its products in the myogenic determination and differentiation program as well as its presumed oncogenic properties in NHL and other tumours associated with 3q27

Received 15 March; accepted 19 May 1993.

chromosomal defects.

Note added in proof:

Since the submission of this manuscript other workers have published the cloning of the 3q27 breakpoint cluster region^{27,28}. As distinctive from our findings, using a probe from the breakpoint region, both groups have reported the detection in lymphoid cell lines of either a 2.4 kb (ref. 27) or a 11 kb (ref. 28) mRNA which might be transcribed from a candidate proto-oncogene (*BCL6*) not further characterized.

Two other papers have appeared concerning *tramtrack*. In the first Xiong and Montell²⁹ show that *tramtrack* acts as a transcriptional repressor required for cell fate determination in the *Drosophila* eye. In the second, Adams *et al.*³⁰ have characterized two "expressed sequence tags" from human brain cDNA clones which bear homology to the conserved viral-cellular N-terminal domain of *ttk* and *KUP* genes.

Methodology

Cloning of the 3q27 breakpoints. Cloning of the breakpoint cluster region at band 3q27 is described elsewhere¹⁰. Briefly, DNA from the NHL LAR cells carrying a t(3;14) translocation was used to create a DNA library which was screened with an IgH JH probe derived from germline chromosome 14 DNA. Recombinants containing the translocation breakpoint were identified by DNA sequencing. Chromosome 3-assigned probes were obtained and used for cloning of the germline DNA sequence and of the translocated allele from a DNA library made with an established cell-line from patient *VAL* bearing t(3;4) translocation.

Northen blot analysis. A multi-tissue northern blot (2 µg polyAmRNA per lane) was obtained from Clontech. Total RNA from NHL were extracted by the guanidine-isothiocyanate-phenol method. Samples were electrophoresed through denaturing 1% agarose and transferred onto Nylon N+ (Amersham). Hybridization was performed in 50% formamide, 5× SSPE, 5× Denhardt's solution, 0.1 mg ml⁻¹ denatured salmon sperm DNA and 1% SDS at 42 °C for 24 h. Filters were washed in 0.1× SSC and 0.1% SDS at 55 °C for 30 min, and then exposed to Hyperfilm MP (Amersham) at – 80 °C, 18 h. Probes were ³²P-labelled by the random primer method (Multiprime, Amersham).

cDNA cloning and sequencing. Probe pEE7.0 (Fig. 1) which detected the 3.8 kb muscle transcript (Fig. 2*a*), was used to screen a λ gt10 cDNA library (Clontech, catalogue number HL1124a) of human adult skeletal muscle. 6×10^5 clones were plated on *E. coli C600hfl*, replicated on nitrocellulose filters and hybridized according to standard procedures. cDNA inserts from positive clones including M55 and M47 were subcloned into pBluescript KS+ and sequenced on both strands by the dideoxy chain termination method with Sequenase Version 2 (USB) using T3 and T7 universal primers as well as multiple internal oligonucleotide primers derived from the obtained sequence.

article

Acknowledgements

We are grateful to David Y. Mason for helpful discussions and critical review of the manuscript. This work was supported by grants from the Fédération . Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer and the Ligue Nationale Française contre le Cancer, Comité du Nord

- 1. Rabbits, T.H. Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 67, 641–644 (1991). 2. Lewin, B. Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription
- factors. Cell 64, 303-312 (1991).
- Cleary, M.L. Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* 66, 619–622 (1991).
- 4. Nichols, J. & Nimer, D. Transcription factors, translocations, and leukemias. Blood 80, 2953-2963 (1992).
- Leder, P. et al. Translocations among antibody genes in human cancer. Science 222, 765–771 (1983).
- Fukuhara, S., Rowley, J.D., Variakojis, D., & Golomb, H.M. Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res.* 39, 3119-3128 (1979).
- 7. Manolova, Y., Manolov, G., Kieler, J., Levan, A. & Klein, G. Genesis of the 14q+ marker in Burkitt's lymphoma. Hereditas 90, 5-10 (1979)
- Lenoir, G.M., Preud'hormer, J.L., Bernheim, A. & Berger, R. Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Nature* 298, 474–476 (1982).
 Bastard, C. *et al.* Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 79, 2527–2531 (1992).
 Deweindt, C. *et al.* Cloning of a breakpoint cluster region at band 3q27
- involved in human non-Hodgkin's lymphoma. Genes Chrom. Cancer (in the press).
- 11. Evans, R.M. & Hollenberg, S.M. Zinc fingers: gilt by association. Cell 52, 1-3 (1988).
- 12. Lichter, P., Bray, P., Ried, T., Dawid, I.B. & Ward D.C. Clustering of C2-H2 zinc finger motif sequences within telomeric and fragile site regions of human chromosomes. Genomics 13, 999-1007 (1992).
- Harrison, S.D. & Travers, A.A. The tramtrack gene encodes a Drosophila 13. finger protein that interacts with the ftz transcriptional regulatory region and
- DiBello, P.R., Withers, D.A., Bayer, C.A., Fristrom, J.W. & Guild, G.M. The Drosophila Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. Genetics 129, 385–397 (1991).
- Chardin, P., Courtois, G., Mattei, M.G. & Gisselbrecht, S. The KUP gene, located on human chromosome 14, encodes a protein with two distant zinc 15. fingers. Nucl. Acids Res. 19, 1431–1436 (1991). 16. Koonin, E.V., Senkevich, T.G. & Chernos, V.I. A family of DNA virus genes that
- consists of fused portions of unrelated cellular genes. Trends Biochem. 17, 213-214 (1992).

- 17. Read, D. & Manley, J. Alternative transcripts of the Drosophila tramtrack gene de zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities. EMBO J. 11, 1035-1044 (1992).
- Kakizuka, A. et al. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARa with a novel putative transcription factor. Cell 66, 663-674 (1991).
- de Thé, H. et al. The PML-RAR α fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. Cell 66, 675-685 (1991).
- Morishita, K. et al. Retroviral activation of a novel gene encoding a zinc finger 20. protein in IL-3-dependent myeloid leukernia cell lines. Cell 54, 831-840 (1988)
- Fichelson, S. et al. Evi-1 expression in leukemic patients with rea 21. ancements of the 3g25-g28 chromosomal region, Leukernia 6, 93-99 (1992).
- 22. McGuire, E.A. et al. The t(11;14)(p15;q11) in a T-cell acute tymphoblastic leukemia cell line activates multiple transcripts, including Tig-1, a gene encoding a potential zinc finger protein. Molec. cell. Biol. 9, 2124-2132 (1989)
- 23. Djabali, M. et al. A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. Nature Genet. 2, 113-118 (1992). Tkachuk, D.C., Kohler, S. & Cleary, M.L. Involvement of a homolog of
- 24. Drosophila Trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukernias. Cell 71, 691-700 (1992).
- Gu, Y. et al. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemia fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene. Cell 25. 71, 701-708 (1992).
- Olson, E.N. MyoD family: a paradigm for development. Genes Dev. 4, 1454-26. 1461 (1990).
- Ye, B.H., Rao, P.H., Chaganti, R.S.K. & Dalla-Favera, R. Cloning of bc/6, the 27 locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. Cancer Res. 53, 2732-2735 (1993).
- Improved Carcer Res. 35, 2722–2735 (1995). Baron, B.W. et al. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations 1(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. Proc. natn Acad. Sci. U.S.A. 90, 5262–5266 (1993). 28.
- Xiong, W.C. & Montell, C. tramtrack is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the Drosophila eye. Genes Dev. 7, 1085–1096 29. (1993).
- 30. Adams, M.D., Kerlavage, A.R., Fields, C. & Venter C.J. 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. *Nature Genet.* 4, 256–267 (1993).

III- Implication clinique du gène LAZ3.

Malgré les progrès réalisés dans les traitements des Lymphomes Diffus à Grandes Cellules (LDGC), approximativement la moitié des patients atteints décèdent des suites de cette pathologie. Des patients à haut risque peuvent être traités avec succès par une chimiothérapie ou une radiothérapie intensive, ou être greffés (Mc Master *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1993).

L'identification de ce gène LAZ3, comme premier marqueur moléculaire spécifique, revêt donc un grand intérêt pour cette pathologie.

Afin d'étudier le rôle de *LAZ3* dans la pathogenèse des LDGC et de préciser la fréquence et la signification pronostic et diagnostic des réarrangements de ce gène, C. Bastard et Coll. ont tenté de corréler divers résultats tels que : analyse cytogénétique, analyse moléculaire en *southern blot*, histologie, immunophénotype et caractéristiques cliniques. Ce travail, présenté ci-après, a donné lieu à publication dans le volume **85** de *Blood* 1994, 2423-2427.

Les sondes utilisées dans ce travail correspondent aux sondes F370, F372 et F381, qui proviennent de la région MTC en 3q27 du gène LAZ3.

Cette étude fut réalisée sur 217 patients possédant une anomalie en 3q27. Elle révèle que *LAZ3* est impliqué dans tous les types de lymphomes sauf les lymphomes centrocytiques, les lymphomes lymphoblastiques et les lymphomes diffus à petites cellules non clivées. On observe un réarrangement de *LAZ3* dans 37% des LDGC. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lo Coco *et al.* qui présentent un réarrangement de ce gène dans 33% des LDGC (Lo Coco *et al.*, 1994). *LAZ3* est également remanié dans 13% des Lymphomes Folliculaires (LF). Ces résultats se rapprochent de ceux de Otsuki *et al.* qui observent 12,8% des LF de bas grade et 16,7% des lymphomes transformés (une forme évoluée du LF) qui réarrangent en 3q27 (Otsuki *et al.*, 1995). Par contre, ils s'opposent aux résultats de Ye *et al.*, (Ye *et al.*, 1993b) qui n'observent pas d'altération de *BCL6* parmi 28 cas de LF testés, ainsi qu'à ceux de LoCoco *et al.* qui n'observent qu'une altération occasionnelle de *BCL6* parmi les LF.

Contrairement à Offit *et al.*, qui font des réarrangements de *BCL6* un indicateur de pronostic favorable dans les LDGC et soulignent la fréquence élevée des localisations extra ganglionnaires (Offit *et al.*, 1994), il ne semble pas que l'on puisse associer, dans l'étude de Bastard *et al.*, *LAZ3* à un facteur de bon ou de mauvais pronostic pour les LDGC : aucune corrélation ne peut être faite entre les caractéristiques cliniques et les réarrangements de *LAZ3*.

RAPID COMMUNICATION

- ÷

LAZ3 Rearrangements in Non-Hodgkin's Lymphoma: Correlation With Histology, Immunophenotype, Karyotype, and Clinical Outcome in 217 Patients

By Christian Bastard, Clotilde Deweindt, Jean Pierre Kerckaert, Bernard Lenormand, Annick Rossi, Francesco Pezzella, Christophe Fruchart, Christian Duval, Mathieu Monconduit, and Hervé Tilly

We have recently shown that an evolutionary conserved gene LAZ3, encoding a zinc finger protein, is disrupted and overexpressed in some B-cell lymphomas (mainly with a large cell component) that show chromosomal rearrangements involving 3q27. Because the breakpoints involved in these rearrangements are focused in a narrow major translocation cluster (MTC) on chromosome 3, we used genomic probes from this region to study the molecular rearrangements of LAZ3 in a large series of patients (217) with non-Hodgkin's lymphoma (NHL). Southern blot analysis showed LAZ3 rearrangement in 43 patients (19.8%). Rearrangement was found in 11 of the 84 patients (13%) with follicular lymphoma but was most frequent in aggressive lymphoma (diffuse mixed, diffuse large cell, and large cell immunoblastic subtypes), in which 31 of the 114 patients (27%) were affected. The highest proportion of LAZ3 alteration was observed in B-cell aggressive lymphoma (26 of 71

S PECIFIC RECURRING chromosomal aberrations have been reported in most hematologic malignancies. In Bcell neoplasms, several translocations involve the Ig genes at bands 14q32, 2p12, and 22q11.¹ The most frequent defects in non-Hodgkin's lymphoma (NHL) are the (14; 18) translocation, associated mainly with follicular lymphoma²; the (8; 14) translocation and its variants found in Burkitt's lymphoma^{3,4}; and the (11; 14) translocation associated with intermediate or 'mantle zone' lymphoma.⁵ The molecular analysis of these chromosomal defects has shown that they lead to the oncogenic conversion of genes such as BCL-2,⁶⁻⁸ a regulator of apoptotic cell death,⁹ or of proto-oncogenes encoding transcription regulators such as $MYC^{10,11}$ and CCND1/PRAD.¹²⁻¹⁴

We have previously reported that translocations involving chromosome 3q27 and Ig gene regions are the third most common specific group of translocations in NHL, and are associated mainly with diffuse large cell lymphoma (DLCL).15 In this subset of NHL, numerous chromosomal defects are found that affect the same region on chromosome 3 but not the Ig gene locations. We and others have shown that most of these rearrangements involve the same major translocation cluster (MTC) on chromosome 3.16-18 These translocations result in the disruption and deregulation of a gene, LAZ3,¹⁹ also named BCL-6,²⁰ encoding a conserved zinc finger protein that may act as a transcriptional regulator involved in differentiation and development. To confirm the prominent role of the LAZ3 gene in the pathogenesis of NHL, we used genomic probes derived from the 3q27 MTC to study DNAs from a series of 217 patients with this disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients. High molecular weight DNA was obtained from biopsy specimens of 217 adult patients admitted to the Centre Henri Becquerel (Rouen, France) between September 1984 and April 1993 for the diagnosis and treatment of NHL.

cases, 37%). Eleven of the 32 patients with 3q27 chromosomal abnormality had no *LAZ3* rearrangement, suggesting the possibility of *LAZ3* involvement outside the MTC. On the other hand, 18 of the 39 patients with *LAZ3* rearrangement and available cytogenetic results did not have visible chromosomal break at 3q27, suggesting that almost a half of the rearrangements are not detectable by cytogenetic methods. No statistical association could be found between *LAZ3* status and initial features of the disease or clinical outcome in either follicular or aggressive lymphomas. We conclude that *LAZ3* alteration is a relatively frequent event in B-cell lymphoma, especially in those of aggressive histology. It could be used as a genomic marker of the disease, and further studies are needed to clarify clinical implications of these alterations.

© 1994 by The American Society of Hematology.

Tissue samples. Fresh lymph nodes were divided for morphologic, immunologic, and cytogenetic studies as previously described.¹⁵ Cells were cryopreserved for various periods of time before DNA extraction. All histologic material was reviewed by the same pathologist and classified according to the Working Formulation for Clinical Usage.²¹

DNA extraction and Southern blot analysis. DNA was extracted by the sarkosyl-proteinase K-phenol/chloroform method. After digestion with restriction endonucleases, DNA fragments were electrophoresed on 0.8% agarose gels, transferred onto nylon N⁺ membranes, and hybridized according to the recommendations of the suppliers (Amersham). DNAs were digested using at least two of four restriction enzymes (*EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *Xba I*). The genomic probes F370, F372, and F381 (Fig 1) have been previously described.¹⁸

Cytogenetic analysis. Cells $(2 \times 10^6/\text{mL})$ were cultured overnight in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum in the presence of colchicine (0.02 µg/mL). Cells were incubated for 25

From the Department of Cytogenetics, Centre Régional de Transfusion Sanguine et de Génétique Humaine, Bois Guillaume; INSERM U124, Institut de Recherche sur le Cancer, Lille; the Department of Biological Hematology and Cellular Immunology, Hôpital Charles Nicolle, Rouen; the Department of Clinical Hematology, Centre Henri Becquerel, Rouen, France; and the Department of Hematology, John Radcliffe Hospital, Oxford, UK.

Submitted January 25, 1994; accepted February 22, 1994.

Supported in part by grants from la Ligue Nationale Française Contre le Cancer and la Fondation de France.

Address reprint requests to Christian Bastard, MD, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 609 Chemin de la Bretèque, BP 58, 76232 Bois Guillaume Cedex, France.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734 solely to indicate this fact.

© 1994 by The American Society of Hematology.

0006-4971/94/8309-0047\$3.00/0



Fig 1. Partial map of the 3q27 region. Shaded boxes indicate the location of *LAZ3* exons. MTC, major translocation cluster. Genomic probes F370, F372, and F381 are indicated by black boxes. Restriction enzymes symbol are: E, *Eco*RI; B, *Bam*HI; X, *Xba* I; Xh, *Xho* I.

minutes at 37°C in 0.075 mol/L potassium chloride, fixed in methanol-acetic acid (3:1), and spread on clean, dry slides. R-banding was obtained according to Sehested,²² and karyotypes were described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature.²³

Correlation with clinical presentation and outcome. For this retrospective study, we only considered patients who had a tumor sample studied at the time of primary diagnosis. Two patient populations were selected: patients with follicular lymphomas and patients with aggressive lymphomas as defined by the International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factor Project,²⁴ namely diffuse mixed, diffuse large cell, and large cell immunoblastic subtypes. For each population, the association between *LAZ3* rearrangement and clinical features was studied. The clinical features studied were: age, sex, performance status, presence of B symptoms, Ann Arbor stage, bone marrow involvement, number of extranodal sites, presence of a mass greater than 10 cm, LDH level, serum albumin level, and overall survival. For aggressive lymphoma only, association with the International Prognostic Index,²⁴ response to treatment, and disease-free survival were also examined.

Statistical methods. Associations between LAZ3 rearrangement and initial clinical features were analyzed with the two-sided chisquared test. Survival curves were plotted using the method of Kaplan and Meier²⁵ and were compared by the log-rank test.²⁶ Analyses were performed with use of JPSI statistical software (developed by P. Kwiatkowski, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand, France).

RESULTS

LAZ3 rearrangements were detected in 43 of the 217 samples (19.8%). A common HindIII polymorphism was also noted in 15 patients. All histologic subtypes of the Working Formulation were represented in the patient population (Table 1) and the involvement of LAZ3 was observed in all of them, with the exception of lymphocytic, lymphoblastic, and diffuse small noncleaved cell lymphomas.

Eleven of the 84 follicular lymphomas (13%) were found to be rearranged. *LAZ3* alterations appeared to be more frequent in large cell follicular lymphoma (4/10) than in small or mixed cell follicular lymphoma (7/74). However, most of *LAZ3* rearrangements were observed in aggressive lymphoma (diffuse mixed, diffuse large cell, and large cell immunoblastic), affecting 31 of the 114 patients in these subtypes (27%).

Immunophenotype could be determined in 204 tumors, which comprised 163 B-cell and 41 T-cell lymphomas. Of the 163 B-cell lymphomas (including follicular lymphomas), 38 were rearranged (Table 2). Within the subgroup of 71 patients with aggressive B-cell lymphoma, the LAZ3 gene was involved in 26 patients (37%), mainly with diffuse large cell (14/46) and immunoblastic (6/12) lymphomas. Only one patient with T-cell lymphoma was found to have an LAZ3 rearrangement. In this case, the results of morphologic evaluation and immunostaining were confirmed by the absence of Ig gene rearrangement and the presence of a C β rearrangement. The only anaplastic large cell lymphoma of B-cell phenotype included in this study had an LAZ3 rearrangement, whereas four T-anaplastic large cell lymphomas appeared to be unaffected.

Good quality metaphases were obtained in 201 patients, 32 of which had a detectable abnormality of the 3q27 region (16%) (Table 3). LAZ3 rearrangement was found in 14 of the 18 patients with translocations involving 3q27 and Ig genes regions. Among the 14 patients with chromosomal 3q27 defects (12 translocations, 2 deletions) that did not affect Ig gene regions, 7 showed LAZ3 rearrangements, as did 18 patients with no evident cytogenetic involvement of the 3q27 region. Thirteen of these had a complex karyotype, whereas 5 displayed a more simple pattern: 47,xyy; 46,xx, t(2;18)(p12;q21); 46,xx, t(14;18)(q32;q21); 47,xy, +5; 46,xx, t(15;20)(q22;q13)/46,xx,der(9)(p24).

LAZ3 rearrangement was found to be associated, at the cytogenetic level, with other specific abnormalities in 12 of 39 patients. These translocations were a t(14; 18) or a t(2; 18)

Table	1.	Incidence of LAZ3 Rearrangement
		Among 217 Cases of NHL

Histology ymphocytic follicular Small cells Mixed, small and large cells Large cells Diffuse Small cleaved cells Mixed, small and large cells Large cells Immunoblastic Unclassifiable	Cases With LAZ3 Rearrangement/ Total Cases Studied		
Lymphocytic	0/4		
Follicular			
Small cells	3/38		
Mixed, small and large cells	4/36		
Large cells	4/10		
Diffuse			
Small cleaved cells	1/5		
Mixed, small and large cells	5/24		
Large cells	14/51		
Immunoblastic	9/29		
Unclassifiable	3/10		
Lymphoblastic	0/6		
Diffuse small noncleaved cells	0/4		

Table 2. Incidence of LAZ3 Rearrangement Among 163 Cases of B-Cell NHL

Histology	Cases With LAZ3 Rearrangement/Cases Studied
Lymphocytic	0/3
Follicular	
Small cells	3/35
Mixed, small and large cells	4/35
Large cells	4/10
Diffuse	
Small cleaved cells	1/5
Mixed, small and large cells	3/9
Large cells	14/46
Immunoblastic	6/12
Unclassifiable	3/4
Diffuse small noncleaved cells	0/4

in 8 cases, a t(8; 14) or a t(8; 22) in 2 cases, and the association of a t(8; 14) and a t(14; 18) in 2 cases.

The association of *LAZ3* rearrangement with clinical features could be studied in 55 patients with follicular lymphoma and in 83 patients with aggressive lymphoma (Table 4) examined at the time of diagnosis, but no statistical correlations were observed in either subgroup. *LAZ3* rearrangement did not influence survival in patients with follicular lymphoma (Fig 2). The overall survival of patients with aggressive lymphoma and an *LAZ3* rearrangement appeared slightly better than those of patients without rearrangement, but the difference was not significant (P > .55) (Fig 3).

DISCUSSION

Molecular studies of the t(14;18) and of the t(8;14) have greatly improved our understanding of the pathogenesis of follicular and Burkitt's lymphoma. However, very little is known about the genes involved in DLCL, the most frequent subtype of lymphoma.²⁷

We have previously shown that translocations involving

Table 3. Incidence of *LAZ3* Rearrangement in 32 Cases of NHL With Chromosomal Abnormality at Band 3q27

Partial Karyotype	Cases With LAZ3 Rearrangement/Cases Studied
t(3;14)(q27;q32)	12/14
t(3;22)(q27;q11)	1/2
t(2;3)(p12;q27)	1/2
t(2;3)(q22;q27)	0/1
t(3;4)(q27;p11)	1/2
t(3;6)(q27;p21)	1/1
t(3;6)(q27;q15)	0/1
t(3;7)(q27;p12)	1/1
t(3;8)(q27;q24)	1/1
t(3;15)(q27;q21)	1/2
der(3)t(3;?)(q27;?)*	1/3
del(3)(q27)	1/2
All	21/32

* t(3;?) denotes a translocation with unidentified chromosomal material.

	LAZ3 Rearranged	LAZ3 Not Rearranged	<i>P</i> Value
All patients	25	58	
Age			
≤60 yrs	14	34	>.5
>60 yrs	11	24	
Sex			
M	18	35	>.3
F	7	23	
Performance status			
0-1	20	40	>.3
2-4	5	18	
B symptoms			
No	16	29	>.2
Yes	9	29	
Ann Arbor stage			
1-11	13	19	>.05
III-IV	12	39	
Bone marrow involvement			
No	20	40	>.3
Yes	5	18	
Number of extranodal sites			
0-1	21	37	>.1
≥2	4	21	
Largest mass			
<10 cm	14	36	>.5
≥10 cm	11	22	
Serum albumin level*			
≤35 g/L	8	25	>.2
>35 g/L	17	31	
Serum LDH level*			
≤N	8	15	>.3
>N	13	38	
International Index (24)*			
0-1 Risk factor	11	14	>.1
2-3 Risk factors	7	26	
4-5 Risk factors	3	13	

* Some patients had missing data for serum albumin and LDH lev-

the 3q27 region and Ig genes locations were frequently observed in NHL, mainly of large cell type.¹⁵ Breakpoints on chromosome 3 are clustered into an MTC of 4 kb, together with those of several chromosome rearrangements of the same 3q27 region that do not affect Ig genes as partner.¹⁸ We have cloned a gene, *LAZ3*, encoding an evolutionary conserved zinc finger protein, that is disrupted and abnormally overexpressed in patients with 3q27 molecular rearrangements, and postulated that the deregulation of this transcription factor (of unknown function) could be an important event in the pathogenesis of large cell lymphoma.¹⁹ The same breakpoint cluster^{16,17} and the same gene²⁰ have been cloned by others and named *BCL-6*.

To assess the frequency and the significance of LAZ3 rearrangements, we studied a series of 217 patients and found that the 3q27 region was affected in 13% of follicular lymphomas and 27% of DLCL. LAZ3 rearrangements appeared to be nearly restricted to B-cell lymphoma because

2425

 Table 4. Correlations Between Main Clinical Characteristics and

 Presence or Absence of LAZ3 Rearrangement in the 83 Patients

 With Aggressive Lymphoma Studied at the Time of Diagnosis

els.

only 1 of 39 immunologically characterized positive samples was of T-cell phenotype. In the group of aggressive lymphoma of B-cell phenotype, the overall frequency of LAZ3 rearrangements reaches 37%, in accordance with the results reported by Ye et al.²⁰

2426

As suspected from the cytogenetic analysis,¹⁵ LAZ3 rearrangement was found in a proportion of follicular lymphoma cases (13%). These results differs from those of Ye et al,²⁰ who did not observe any *BCL-6* alteration in a series of 28 patients with follicular lymphoma. The fact that *LAZ3* rearrangement could be observed in some patients with follicular lymphoma at the time of diagnosis, and that it did not appear to influence survival, suggests that *LAZ3* is not associated with clinical progression or histologic transformation.

Correlation with cytogenetic data showed that 11 of the 32 patients displaying a chromosomal defect of the 3q27 region had no LAZ3 rearrangement. In these cases, the defect could either affect another gene or, more likely, affect the LAZ3 gene at a breakpoint located outside the MTC. Thus, the reported frequency of LAZ3 involvement could represent an underestimation of the real frequency. On the other hand, 18 of the 39 patients with LAZ3 rearrangement and available cytogenetic results did not exhibit visible chromosomal break of the 3q27 region. This result suggests that almost 50% of LAZ3 rearrangements may be invisible by cytogenetic methods.

We were unable, in this series, to show any correlation between clinical characteristics and LAZ3 rearrangement. Recently, Offit et al²⁸ described an association between *BCL*-6 rearrangement and a subset of DLCL with high proportion of extranodal disease who enjoy a favorable outcome. Our study did not support this association. As both studies were retrospective, inclusion criteria might have been different. Our study included only patients with available cytogenetic data, and this fact probably discarded some patients with only extranodal localization at the time of diagnosis.

In conclusion, this study confirms the importance of alterations of *LAZ3* in NHL, involving a third of the patients with aggressive B-cell lymphoma. Further studies are now required to understand the mechanism of action of this new oncogene, and to define whether or not its alterations have

1

0.8

0.6

0.4

0.2

0

0

AZ3 +

12

-LAZ3

24

²roportion Surviving



36

48

Months

60

72

84



Fig 3. Survival of the 83 patients with aggressive lymphoma according to the presence (n = 25) or the absence of *LAZ3* (n = 58) rearrangement at diagnosis (P = .55).

any prognostic significance in NHL. This genomic marker, allowing the identification and follow-up of a homogeneous group of patients, will probably represent an important new approach to the diagnosis and management of patients with B-cell lymphoma. We are currently developing a polymerase chain reaction assay to assess minimal residual disease in patients with a t(3;14) translocation.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr David Y. Mason for his critical reading of the manuscript.

REFERENCES

I. Leder P, Battey J, Lenoir G, Moulding C, Murphy W, Potter H, Stewart T, Taub R: Translocations among antibody genes in human cancer. Science 222:765, 1983

2. Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D, Golomb HM: Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. Cancer Res 39:3119, 1979

3. Manolova Y, Manolov G, Kieler J, Levan A, Klein G: Genesis of the 14q+ marker in Burkitt's lymphoma. Hereditas 90:5, 1979

4. Lenoir GM, Preud'homme JL, Bernheim A, Berger R: Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. Nature 298:474, 1982

5. Leroux D, Le Marc'Hadour F, Gressin R, Jacob MC, Keddari E, Monteil M, Caillot P, Jalbert P, Sotto JJ: Non-Hodgkin's lymphomas with t(11;14)(q13;q32): A subset of mantel zone/intermediate lymphocytic lymphoma? Br J Haematol 77:346, 1991

6. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM: The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. Science 229:1390, 1985

7. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: Clustering around J_H on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. Cell 41:889, 1985

8. Cleary ML, Sklar J: Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. Proc Natl Acad Sci USA 82:7439, 1985

9. Korsmeyer SJ: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. Blood 80:879, 1992

10. Dalla-Favera R, Bregni M, Erickson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM: Human c-myc oncogene is located on the region of

LAZ3 REARRANGEMENTS IN NHL

chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 79:7824, 1982

11. Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir GM, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P: Translocation of c-*myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmocytoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 79:7837, 1982

12. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Jüpner H, Ruderman J, Kronenberg H, Arnold A: A novel cyclin encoded by a *bcl1*-linked candidate oncogene. Nature 350:512, 1991

13. Williams M, Meeker T, Swerdlow S: Rearrangement at the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: Analysis with multile breakpoint probes. Blood 78:493, 1991

14. Raffeld M, Jaffe ES: Bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. Blood 78:259, 1991

15. Bastard C, Tilly H, Lenormand B, Bigorgne C, Boulet D, Kunlin A, Monconduit M, Piguet H: Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. Blood 79:2527, 1992

16. Baron B, Nucifora G, McCabe N, Espinosa R, Le Beau MM, McKeithan TW: Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci USA 90:5262, 1993

17. Ye BH, Rao PH, Chaganti RSK, Dalla-Favera R: Cloning of *bcl-6*, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. Cancer Res 53:2732, 1993

18. Deweindt C, Kerckaert JP, Tilly H, Quief S, Nguyen VC, Bastard C: Cloning of a breakpoint cluster region at band 3q27 in human non-Hodgkin's lymphoma. Genes Chrom Cancer 8:149, 1993

19. Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bas-

tard C: LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. Nature Genet 5:66, 1993

20. Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RSK, Dalla-Favera R: Alteration of a zinc finger-encoding gene, *BCL-6*, in diffuse large-cell lymphoma. Science 262:747, 1993

21. Non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a working formulation for clinical usage. Cancer 49:2112, 1982

22. Sehested J: A simple method for R banding of human chromosomes showing a pH dependent connection between R and G bands. Hum Genet 21:55, 1974

23. Harnden DE, Klinger HP (eds) ICSN 1985: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Switzerland, Karger, 1985

24. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 329:987, 1993

25. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation for incomplete observations. J Am Stat Assoc 53:457, 1958

26. Mantel N: Evaluation of survival data two new rank order statistics arising in its consideration. Cancer Chemother Rep 50:163, 1966

27. Solal-Céligny P, Brousse N, Reyes F, Gisselbrecht C, Coiffier B: Non-Hodgkin's lymphomas. Paris, France, Frison-Roche, 1992

28. Offit K, Lo Coco F, Louie D, Parsa NZ, Ye BH, Rosenbaum A, Siebert R, Dalla-Favera R, Chaganti RSK: BCL-6 rearrangement defines a clinical and prognostic subset of diffuse large cell lymphoma. Blood 82:133a, 1993 (abstr, suppl 1)

IV-Mécanismes d'activation du gène LAZ3. Formation de transcrits chimériques.

LAZ3 est un gène constitué de 11 exons, les deux premiers exons1A et 1B non codant sont choisis par épissage alternatif. Ceci est en opposition avec les résultats de l'équipe de Dalla-Favera qui identifie 8 exons au gène BCL6 (Ye et al., 1993b) et de l'équipe japonaise (Kawamata et al., 1994a) qui ne décrit que 9 exons. L'organisation génomique du gène LAZ3 que nous avons déduite de la comparaison de séquence génomiques et d'ADNc est représentée dans la figure 7 page 86.

Les points de cassure se localisent tous dans le premier intron de *LAZ3* entre les exons 1A et 1B, séparant ainsi ce gène de l'exon 1A et des séquences 5' régulatrices mais ne modifiant ni le cadre de lecture ni la traduction d'une protéine LAZ3 normale.

Une étude par la technique de RT-PCR : RACE (<u>RNA Amplification cDNA Ends</u>) fut utilisée (J-P Kerckaert et S Quief), afin de détecter les produits ARNm de LAZ3 chez des malades atteint d'un LNH et présentant une translocation t(3;14). Cette étude révéla l'existence d'un ARNm chimérique, joignant les régions JH (J4 ou J5) à l'exon 2 de LAZ3.

Nous avons eu l'occasion d'analyser par *southern blot* un certain nombre de patients atteints de LNH possédant ou ne possédant pas d'anomalie dans la région 3q27. La lignée VAL porteuse d'une translocation t(3;4), présente sur un allèle une déletion au niveau du MTC en 3q27, sur l'autre allèle une translocation au niveau du MTC (figure 2 page XX). L'analyse de cette lignée révèle que l'exon 2 de LAZ3 se trouve fusionné à un ADNc différent. Cet ADNc, cloné par une autre équipe de notre laboratoire, représente en fait les régions 5' régulatrices d'un nouveau gène codant une petite protéine G dénommée *TTF* pour *"Translocation Three Four"*, dont l'expression est spécifique des cellules hématopoïétiques. Ce travail auquel j'ai été associée a été publié dans *Oncogene* 10, 2171-2178 (1995) (voir ci-après).

Une autre lignée lymphoïde a été analysée par la technique RACE: la Karpas 231 (Nacheva *et al.*, 1993). Cette lignée est porteuse de plusieurs translocations, la t(14;18), la t(8;9)(q24;p21) et possède également une translocation t(1;3;11) (q24;q27;q23) montrant un réarrangement en 3q27 dans le MTC. Cette étude révèla également l'existence d'un transcrit de fusion entre l'exon 2 du gène *LAZ3* et le premier exon non codant d'un gène nommé *TOTE* pour "*Translocation One Three Eleven*". Ce gène récemment cloné par une équipe de notre laboratoire (Galiègue-Zouitina *et al.*, soumis), présente une expression spécifique des cellules B.

Α



Figure 7:

A-Représentation de l'organisation génomique du gène LAZ3. Les boites représentent les exons, en grisé est représenté le cadre ouvert de lecture.

B-2 clones chevauchants d'ADNc, M47 et M55, issus de la banque d'ADNc de muscle squelettique (Clontech).

C- Clone d'ADNc complet, P566, issu d'une banque d'ADNc 5' stretch de muscle squelettique (Clontech).

-86-



Figure 8:

Représentation du MTC localisant les points de cassures des différents patients PAI, LAR, GUI et lignées K231 et VAL qui présentent des translocations et délétions au niveau de la région MTC.

	LAZ3 Exon 1A	LAZ3 Exon 2	LAZ3 Exon 3
LAZ3	GATGCAAGAAGTTTCTAGGAAAGGCCGGACACC	AGGTTTTGAGCAAAATTTTGGACTGTGA	AGCAAGGCATTCGTGAAGACAAAATGGCCTCGCCGGC
	JH (J4 or J5)		
t(3;14)	AACCCTGGTCACCGTCTCCTC	AGTTTTGAGCAAAATTTTGGACTGTGA	AGCAAGGCATTCGTGAAGACAAAAATGGCCTCGCCGGC
• • •	TTF		
t(3;4)	ACTGTTCAAGACATTTCTTCGGCATTCTGCAAC	AGTTTTGAGCAAAATTTTGGACTGTGA	AGCAAGGCATTGGTGAAGACAAAATGGCCTCGCCGGC
	ΤΟΤΕ		
t(1;3;11)	CAACATCCIGTCACAGGCCATGCICIGGCAAAA	<u>AGGT</u> TITGAGCAAAATTITIGGACIGIGAA	AGCAAGGCATTCGTGAAGACAAAATGGCCTCGCCGGC



TTF, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphomaassociated LAZ3 gene by t(3;4) chromosomal translocation

Emmanuelle Dallery¹, Sylvie Galiègue-Zouitina¹, Maud Collyn-d'Hooghe¹, Sabine Quief¹, Claude Denis¹, Marie-Paule Hildebrand¹, Danièle Lantoine¹, Clotilde Deweindt¹, Hervé Tilly², Christian Bastard³ and Jean-Pierre Kerckaert¹

¹U. 124 INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex; ²Centre Henri Becquerel, rue d'Amiens, 76038 Rouen; ³Département de Cytogénétique, Centre Régional de Transfusion Sanguine, 609, Chemin de la Bretèque, BP 58, 76232 Bois-Guillaume Cédex, France

We have previously shown that the LAZ3/BCL6 gene encoding a potential transcription factor, is disrupted in B-diffuse large cell non-Hodgkin's lymphomas (NHL) with 3q27 chromosomal abnormalities involving the immunoglobulin (IG) genes. However, LAZ3 rearrangement also occurs in NHL bearing 3q27 translocations without involvement of the IG genes: for example the VAL cell line exhibits t(3;4)(q27;p11). In the present work we have used a RT-PCR method to detect and to sequence the LAZ3 mRNA products from the VAL cell line. We report that the consequence of the t(3;4) is the expression of a chimeric transcript of LAZ3 with a new gene encoding a small G-like protein, termed TTF (Translocation Three Four). Nucleotide sequence analysis of a 1.4 kb cDNA predicts that the TTF gene encodes a protein of 191 amino-acids similar to members of the RAS superfamily including HRAS (27% identical), RAB1A (30% identical) and RHO proteins: the human RAC1, RHOB and CDC42Hs proteins (respectively 43, 44 and 45% identical) and the yeast RHO2 protein (44% identical). Unlike most other small G proteins which are expressed ubiquitously, TTF was transcribed only in hemopoietic cells as a 2.2 kb transcript. TTF may define a new subgroup of RHO-like proteins.

Keywords: LAZ3/BCL6 gene; lymphoma; translocation (3;4); small G protein; LAZ3 fushion gene

Introduction

One effective strategy for identifying potential oncogenes involved in the pathogenesis of human leukemias and lymphomas has been to clone recurring chromosome translocation breakpoints.

In non-Hodgkin's lymphomas (NHL), a number of proto-oncogenes are rearranged via involvement with the immunoglobulin (*IG*) genes at chromosomal regions 14q32, 2p12 and 22q11 (Leder *et al.*, 1983). This is the case in two main NHL subtypes: follicular lymphoma is associated with the t(14;18) (q32;q21) translocation involving the *BCL2* oncogene at 18q21 (Fukuhara *et al.*, 1979; Tsujimoto *et al.*, 1984) and the Burkitt's lymphoma with the t(8;14) (q24;q32) and its variants, involving at 8q24 the *MYC* oncogene

Correspondence: Sylvie Galiegue-Zouitina

(Manolova *et al.*, 1979; Lenoir *et al.*, 1982). Deregulated overexpression of both BCL2 and MYC oncogenes results from their fusion with IG genes.

Recently, we and others have reported that chromosomal translocations involving band 3q27 and the *IG* genes were the third most common specific abnormalities in NHL (Bastard *et al.*, 1992; Deweindt *et al.*, 1993). Molecular studies have shown that these abnormalities were associated in 37% of B-diffuse, large cell lymphomas with the disruption and deregulation of a zinc-finger encoding gene, LAZ3 (Kerckaert *et al.*, 1993) also termed *BCL6* (Ye *et al.*, 1993) or *BCL5* (Miki *et al.*, 1994). We observed that the LAZ3 transcripts were fused with *IG* sequences (results to be published).

LAZ3 rearrangements also occur in several NHL without the involvement of the *IG* genes. In the t(3;4) (q27;p11) translocation observed in the VAL cell line, LAZ3 was shown to be disrupted in the first intron and deleted of its first exon and regulatory 5' sequences (Kerckaert *et al.*, 1993). Here we report that the consequence of the t(3;4) is a fusion of the LAZ3 gene and of its mRNA transcript with a sequence from the *TTF* gene at 4p11. This paper is devoted to the identification of this gene and to the characterization of the predicted encoded protein as a new member of the small G protein family. Sequence and phylogenetic analyses indicated that TTF belongs to the RHO subfamily and suggest that it might have diverged early during evolution.

Results

Cloning of the t(3;4) derivatives in the VAL cell line

The 3q27 breakpoint of the t(3;4) on the chromosome 3 derivative (der3, λ 1V3) was previously cloned in the VAL cell line together with the 3q27 germline region (λ GG1) (Kerckaert *et al.*, 1993). From the λ 1V3 clone (Figure 1), we subcloned a non-repetitive *Eco*RI DNA fragment (p515) of the 4p11 region close to the breakpoint, allowing the isolation of the germline chromosome 4 (λ 4V3), by screening a λ EMBL3 VAL genomic library. Using the 1.3 kb *Xba*I non repetitive DNA fragment as a probe (PL3) we obtained a clone containing the 4p11-3q27 breakpoint junction of the chromosome 4 derivative (der4, λ 4V1).

The nucleotide sequences of the t(3;4) junctions on the chromosomes 3 and 4 derivatives (der 3 and der 4) were aligned with the corresponding 3q27 germline region (Figure 2).

Received 24 October 1994; revised 16 February 1995; accepted 17 February 1995



Figure 1 Breakpoint region on chromosomes 3q27 and 4p11 in the VAL cell line. Restriction maps of the sequences created by the t(3;4)(q27;p11) translocation in VAL cell line ($\lambda 1V3$, 24V1) and of the 3q27 ($\lambda GG1$) and 4p11 ($\lambda 4V3$) germline configurations. The vertical arrows indicate the chromosomal breakpoint. Restriction sites: B, BamHI; E, EcoRI; H, HindIII; X, XbaI; Xh, XhoI

Due to the position of the 3q27 breakpoint which disrupted the LAZ3 gene in its first intron (Kerckaert *et al.*, 1993), the consequence of the translocation could be the transcriptional deregulation of LAZ3 gene by ectopic enhancer sequences from 4p11 and/or by production of a chimeric transcript due to the fusion of LAZ3 to another unknown gene.

Characterization of a LAZ3 fusion transcript

We looked for a LAZ3 chimeric transcript by an anchored RT-PCR approach. The amplification of the 5' end of LAZ3 cDNA was obtained by reverse transcription from VAL mRNA using a primer from exon 3 of LAZ3, followed by ligation of an oligonucleotide anchor and PCR amplification using an anchor primer and a nested LAZ3 primer from exon 2. As shown in Figure 3C, the nucleotide sequence of the PCR products revealed the fusion of a 5' foreign sequence at the acceptor splice site of LAZ3 exon 2. This novel transcriptional unit which fused to LAZ3 was termed TTF for Translocation Three Four. A TTF specific cDNA fragment was derived from this chimeric cDNA by restriction enzyme digestion with HpaII (probe PL1) (Figure 3B). This TTF probe hybridized with the 1.9 kb XhoI-XbaI fragment of the $\lambda 1V3$ clone (Figure 3A), indicating that TTF transcriptional unit was close to the 4p11 breakpoint. On Southern blot analysis, this probe PL1 when hybridized to VAL DNA detected rearranged fragments in HindIII and BamHI digests (Figure 4A). The same fragments cohybridized with the 3q27-specific probe F372 (Deweindt et al., 1993), confirming the joining of LAZ3 sequences with 4p11 sequences. When hybridized to a Northern blot of VAL mRNA, PL1 detected a 2.2 kb TTF transcript and the 3.8 kb transcript which corresponds to the TTF-LAZ3 fusion RNA, exhibiting the same size as the normal LAZ3 transcript (Figure 4B).



Figure 2 Alignment of the 3q27 genomic germline sequence to the der 3 and der 4 breakpoints from VAL t(3;4) DNA. The arrow indicates the position of the breakpoint

TTF encodes a novel RAS-related protein

The full-length TTF coding sequence was obtained by screening a B-cell lymphoma (Karpas 422) cDNA library with PL1. One clone containing a 1.4 kb insert was sequenced, revealing a deduced 191 amino-acid reading frame (Figure 5). As observed on Figure 6, portions of this sequence showed striking amino-acid homology with the RAS superfamily, including the RAS proteins (HRAS, 27% identical), the RAB proteins (RAB1A, 30% identical) and the RHO proteins: human RAC1, RHOB and CDC42Hs (43, 44 and 45% identical) and yeast RHO2 (44% identical). The highest degree of identity was found with the RHO-like CDC42Hs protein (45% identical), the human homolog of the yeast 'cell-division cycle' CDC42 protein (also termed G25B). The predicted amino-acid sequence of TTF contained many of the residues that have been shown to be essential for GTP/ GDP binding to the p21Ras protein, including Lys17,



Figure 3 Characterization of the TTF-LAZ3 fusion product. (A) genomic restriction map of the λ IV3 clone containing the t(3;4) breakpoint region, showing one exon of TTF (black box) which is spliced to the second exon of LAZ3. White boxes represent LAZ3 exons 2 and 3. The black and white arrows indicate the transcriptional directions of TTF and LAZ3, respectively. (B) schematic representation of the fusion transcript of LAZ3 and TTF. M25 and M40 were the primers used in the RT-PCR experiments, leading to a fusion cDNA product containing only the second exon of LAZ3, spliced to the TTF exon. Black and white frames indicate TTF and LAZ3 exons, respectively. The black segment figures the PL1 probe which was derived from the TTF sequence by HpaII (Hp) restriction enzyme digestion. (C) alignment of the LAZ3 first three exons (1A, 2, 3) sequence to the fusion cDNA RT-PCR product (TTF-LAZ3), showing a perfect splice junction between the TTF exon and LAZ3 exon 2. The brackets indicate the donor and acceptor splice junction sites. The LAZ3 translational initiation codon is underlined



Figure 4 Molecular characterization of the *TTF* transcriptional unit. (A) Southern blot analysis of the DNA from two cases of NHL with (VAL) or without (HAY) the t(3;4)(q27;p11) translocation, hybridized with the probe PL1 from *TTF* (Figure 3). The restriction enzymes used were EcoRI (E), *Hind*III (H), *Bam*HI (B) and *XbaI* (X). The abnormal bands detected with the PL1 probe in *Bam*HI and *Hind*III digests were indicated by arrows. (B) Northern blot analysis with the *TTF* probe PL1 on VAL and CEM cell lines

Phe29 and Thr36, respectively corresponding to Lys16, Phe28 and Thr35 in p21Ras. This TTF sequence also contained the four conserved domains involved in guanine nucleotide binding and hydrolysis, correspond-

1	etgeeecacacacactaaccecacetggggggggac	
40	TCCCTGCCAGCCCAACTGTTGTATTTTCAGTTCTTCCAGTGTGAATCAGTTAATATTCTC	
100	GGGAACGAGGGAGAGGTTGATCCTATGAGGAAATCAACCACAGTGAAAAGGCTTGGGCCG	
160	CTTTTGTTTTCGCCTCCTTTTGTTGAACAAATTfGATFfCCGGAGTCAGTCATTTTACTG	
220	TCAAGACATTTCTTCGGCATTCTGCAACAGTTTCCAACATGGCTAGATCCATCAGAAACT	
280	GAAGCCGTGGAGAACGCTCTCGGGGGCCTTTCCCACTTCTTGGAGTAGAAGCCGACAGAGA	
340	GCTGTTTGGAAACTTCTCCTTCACACCAGTTGAAGACTAGGCTTTGGAGGTTTTCAAA	
400	GCAGACGGTGCTTGGATGGGCAGGGAGAAGTAACATTCTGCAAATCGCCGTCAGAGGTCC	
460	TGAGGACACAGACCTACCTGGCTTGCATTCCCCTTGCTGAATGGCGTGTGCTGCAGCTGC	
520	CCACTGAGGGGCTCTTTTCCCTGGGATTCTGGACTTCAGAGTAGGACAGCAGGCTGGGAAG	
580	ATGCTGACTTCCATCAAGTGCGTGTTGGTGGGCGACTCTGCTGTGGGGAAAACCTCTCTG	
	M L S S I K C V L V G D S A V G K T S L	20
640	TTGGTGCGCTTCACCTCCGAGACCTTCCCGGAGGCCTACAAGCCCACAGTGTACGAGAAC	
	L V R F T S E T F P E A Y K P T V Y E N	40
700	ACAGGGGTGGACGTCTTCATGGATGGCATCCAGATCAGCCTGGGCCTCTGGGACACAGCC	
	T G V D V F M D G I Q I S L G L W D T A	60
760	OSCAATGACCCCTTCAGAAGCATCCGGCCCCTGTCCTACCAGCAGGCAG	
	G N Ð A F R S Í R P L S Y Q Q A D V V L	80
620	ATGTGCTACTCTGTGGCCAACCATAACTCATTCCTGAACAAGAACAAGTGGATTGGT	
	M C Y S V A N H N S F L N L K N K W I G	100
880	GAAATTAGGAGCAACTTGCCCTGTACCCCTGTGCTGGTGGCCACCCAGACTGACCAG	
	EIRSNLPCTPVLVVATQTDQ	120
940	CGGGAGATGGGGCCCCACAGGGCCTCCTGCGTCAATGCCATGGAAGGGAAGAAACTGGCC	
	REMGPHRASCVNAMEGKKLA	140
1000	CAGGATGTCAGAGCCAAGGGCTACCTGGGAGTGCTCAGCCCTTAGCAATCGGGGAGTACAG	
	Q D V R A K G Y L E C 3 A L S N R G ¥ Q	160
1060	CAGGTGTTTGAGTGCGCCGTCCGAACTGCCGTCAACEAGGCCAGGAGACGAAACAGAAGG	
	Q V F E C A V R T A V N Q A R R R N R R	180
1120	AGGETETTETECATEAATGAGTGCAAGATETTETAAACCEEAAGAGAETTEACACAACAC	
	RLFSINECKIF***	191
1180	TTATGTATGCACCCCAAAGACTAATGGGGAGAGGGGGGGG	
1240	GTGTTTTCTCTGGGTACACCCCAAGCAGCGTCTCCGTTTTGGATACAGTTATTGATGAGG	
1300	CTTGGCCACTGGATGTTTTCACTAACTACACTCTACAAGTGAACTCCTTGCCCAGGCCAG	
1360	TTAGAAAATCCCTTGGGGAACTGTGATGAATATTCCATCTTTGATTAAAAAAGTGAAATA	
1420	GTCTCCATAAAAAAAAAAAAAAAAA	

Figure 5 Nucleotide and predicted amino-acid sequences from the TTF cDNA. The nucleotide and amino-acid sequences are numbered on the left and right, respectively. The splice junction of the two first exons are indicated by brackets. The nucleotide sequence will appear in the EMBL Nucleotide Sequence Database (accession number Z35225)

ing to residues 10-16, 57-62, 116-120, 147-152 of p21Ras sequence and the C-terminal sequence Cxxx-COOH required for membrane attachment (segments 1, 2, 3, 4 and 5 on Figure 6).

2173



Figure 6 Alignment of the protein sequence of TTF with members of the RAS superfamily: the human members HRAS, RABIA, RHOB, RAC1, G25B (also termed CDC42Hs), and the yeast RHO2 member. Positions corresponding to identities (black) and homologies (grey) between TTF and the above proteins were obtained using the CLUSTAL alignment program (PC/Gene IntelliGenetics Inc). The black segments numbered from 1 to 5 indicate conserved domains in the p21 Ras. The black arrowheads (between positions 123 and 129 in TTF) delimite the RHO-specific insertion, which is generally twelve (only five in TTF) residues in length, in the RHO subfamily. The single black arrowhead between positions 103 and 104 in TTF figures the RHO-specific deletion. The black stars indicate the residues identical for all RHO proteins

The protein alignment presented on Figure 6 also indicates that the TTF sequence contains many RHOspecific residues or sequences (Chardin, 1993), such as: (i) the 'RHO insertion' sequence (black arrows on Figure 6), which generally consists of twelve residues for all the RHO members except for the yeast RHO2 (nine residues) and TTF (five residues) proteins; (ii) the deletion of one residue, which is observed in all RHO members (between position 103 and 104 in TTF), (iii) some RHO-specific amino acids, such as Thr18 and 25, Val37, Asn40 (which is the site of ADP-ribosylation by the C3 botulinum toxine (Chardin et al., 1989), characteristic of the RHO proteins), Arg121, Ala145 and Cys151; (iv) some RHO-specific sequences such as: Arg-Pro-Leu-Ser-Tyr (residues 69 to 73 in TTF) and Asp-Val (residues 77-78 in TTF).

The presence of all these RHO hallmarks in the TTF sequence suggested that TTF might be a new RHO-like member. For this reason, we made another comparative general proteic alignment (not shown), including members of the six different RAS-like subfamilies (RAS, RAB, TC4, ARF, GEM/RAD and RHO) and the TTF protein, which unambiguously branched the new sequence within the RHO subfamily. Therefore, we investigated more precisely the relationships between TTF and the other RHO members, by comparison of the TTF sequence with a set of 24 sequences of the RHO subfamily, including six human (RHOA-H, RHOB-H, RAC1-H, G25B-H, RHOG-H, RTC0-H), one hamster (RHOG-CR), two drosophila (RAC1-DRO and CC42-DRO), five yeast (RHO1-Y, RHO2-Y, CRL1-CA, CC42-SP), four slime mold (RACB-SM, RACC-SM, RACD-SM RAC1-SM), two bacteria (RAC1-CEL, CC42-CEL) RHO members. In

order to simplify the final evolutional tree, the different Rac2, the murine RHO and the human RHOC sequences were not included in this comparison. Also, to avoid topological abnormalities, we excluded from the comparison the N-terminal (corresponding to residues 1 to 4 in HRas) and C-terminal (from residue 165 in HRas) parts of the proteins, as recommended by Valencia et al. (1991) and Chardin (1993). Sequence alignments (not shown) and phylogenetic tree (Figure 7) were obtained by using the TREEALIGN programm (Hein, 1989). In agreement with Vincent et al. (1992), the phylogenetic tree confirms that the RHO subfamily consists of two exclusive groups. The first group includes: (i) the subgroup of the RAC proteins (RAC1-H, RAC1-DRO, RAC1-SM, RAC1-CEL, RACB-SM), and the RACC- and RACD-SM members which appeared to have diverged earlier during evolution; (ii) the subgroup of 'cell-division-cycle' CDC42 proteins (CC42-DRO, G25B-H, CC42-CEL, CC42-SP) with the RTC0-H protein; (iii) the RHOG proteins (RHOG-CR and RHOG-H). The second group contains: (i) one subgroup, with the yeast RHO1, the human RHOA and RHOB genes; (ii) another subgroup including the CRL1-CA, yeast RHO4 and RHO2 and TTF proteins. Among these, RHO2 and TTF appeared to derive from a common but rather distant ancestor, suggesting that TTF belongs to a new subgroup in the RHO subfamily.

Tissue-specific expression of the TTF gene

Expression of the *TTF* gene was determined by Northern blot analysis of different hemopoietic and non-hemopoietic cell lines. Two *TTF* mRNA tran-



Figure 7 Phylogenetic analysis of TTF and RHO protein sequences. Twenty-four RHO sequences from different species were aligned with TTF by using the TREEALIGN software. The alignment was realized from the first conserved Lys residue (position 6 in TTF, 5 in HRas) to the Val residue 171 in TTF (see Figure 6) and this sequence alignment was used to elaborate an evolutionary tree by using the TREEALIGN program (Hein, 1989). The abbreviations used are: SM, Slime Mold (Dictyoselium Discoideum); H, Human; DRO, Drosophila; CEL, Bacteria (C-Elegans); SP, Schizosaccharomyces Pombe; Y, Yeast (Saccharomyces Cerevisiae); CA, Candida Albicans; CR, Hamster

scripts were detected in hemopoietic cells: a minor 5 kb transcript and a major 2.2 kb transcript (Figure 8). No transcript was detected in non-hemopoietic cells including a variety of epithelial cell lines (Figure 8) and other tissues (heart, brain, placenta, lung, liver, muscle, kidney, pancreas) (multi-tissue Northern blot, not shown).

Discussion

We have demonstrated that the consequence of the t(3;4) translocation in the VAL cell line is the fusion of a small G protein encoding gene, *TTF*, to the lymphoma associated *LAZ3/BCL6* gene.

The LAZ3/BCL6 gene encodes a potential transcription factor, sharing N-terminal homologies with the Drosophila transcription factor and containing six zinc-finger motifs (Kerckaert *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1993; Miki *et al.*, 1994). The 3q27 chromosomal breakpoint in t(3;4) was localized in the first intron of LAZ3, 2 kb downstream to the first untranslated exon (Kerckaert *et al.*, 1993).

The LAZ3 chimeric transcript contained at the 5' end a *TTF* sequence spliced to LAZ3 exon 2 with normal donor and acceptor splice sites. Such a fusion of the LAZ3 gene was also observed in the t(3;14) (q27;q32) translocation, with the immunoglobulin *JH* genes alternatively spliced to the LAZ3 exon 2 (unpublished data).



Figure 8 Tissue specific expression of the *TTF* gene. Expression of the *TTF* gene was analysed in hemopoietic and non hemopoietic cells (see Materials and methods). Polyadenylated RNA samples (5μ g) were hybridized with the 1.4 kb *TTF* cDNA-used as a probe. Actin expression was tested in the same samples to evaluate both quantity and quality of RNA samples

In the VAL cell line, we have failed to detect a reciprocal LAZ3-TTF fusion transcript from the derivative chromosome 4, using a RT-PCR method (data not shown). Such a transcript might contain the coding part of the TTF gene and might be under the control of the LAZ3 5' regulatory sequences.

TTF, the fusion gene partner of LAZ3 in t(3;4) is a

2175

new member of the RAS gene superfamily (Figure 6). Proteins that belong to the RAS superfamily can be divided into six major subfamilies on the basis of amino-acid sequences: (a) the RAS/RAL, RAP proteins (Ellis et al., 1981; Lowe et al., 1987; Pizon et al., 1988; Chardin and Tavitian, 1989) which have been shown to participate in cell proliferation and differentiation; (b) the products of the RAB or YPT subfamily (Touchot et al., 1987) responsible for the vesicular transport (Bacon et al., 1989; Van der Sluijs et al., 1991); (c) the RHO gene products (Madaule and Axel, 1985; Polakis et al., 1989) shown to participate to scaffolding of actin microfilaments (Chardin et al., 1989; Paterson et al., 1990; Ridley and Hall, 1992) and cell polarity and cytoskeleton integrity, for two members of the RHO family, CDC42 (Kikuchi et al., 1988) and RhoG (Vincent et al., 1992); (d) TC4 (Drivas et al., 1990); (e) ARF (for ADP ribosylation factor), shown to be a regulator of the membrane traffic and organelle structure (Donaldson and Klausner, 1994); (f) RAD and GEM (Reynet and Kahn, 1993; Maguire et al., 1994), whose functions are unknown.

In this work we observed that the TTF predicted protein sequence contained all the crucial residues and the four conserved domains that are involved in the guanine-nucleotide binding and hydrolysis function of the RAS proteins (segments 1, 2, 3, 4, Figure 6), but with some distinctive features. First, in the domain involved in the GTPase activity (segment 1) TTF exhibits a Ser-Ala motif at positions 13-14 corresponding to the positions 12-13 in Ras, which are essential and correspond to Gly-Gly in most of the proteins of the RAS subfamily. In the Ras protein p21, replacement of Gly 12 by another amino-acid, except Pro, leads to a transforming potential (Seeburg et al., 1984). In the adjacent position (Gly 13) the replacement by Asp but not by Ser is transforming in the p21Ras (Fasano et al., 1984). However there is variation in these positions among other members of the RAS superfamily (Valencia et al., 1991). Thus, Gly-Gly in RAS and RAL, RAP proteins becomes Gly-Gly, Thr-Gly or no Gly in RAB proteins, with a Ser residue in position 12 (as the Ser 13 in TTF), for 10 among 14 members of the RAB subfamily. In the Rab5A protein, a Ser-Ala motif is observed in positions 12-13 (as 13-14 in TTF), but the Ala 14 found in TTF is also found in all the RHO proteins (Chardin, 1993; see Figure 6). In spite of these deviations from RAS, some RAB proteins such as Rab3 (Ser-Ser) have a GTPase activity comparable to or even higher than p21 Ras (Zahraoui et al., 1989). Another RAS-like protein isolated from plants exhibits a Ser residue in position 12 and in this case the authors also showed that the guanine nucleotide binding was not inhibited (Terryn et al., 1993). Another particularity of the TTF protein sequence in this region is the presence of a Thr residue at position 41 (40 in p21 Ras) instead of Tyr or Phe in the RAS, RHO, RAB subfamilies. As we obtained our TTF cDNA from a B-cell lymphoma we checked the possibility of a mutation at codons 13 and 41 in TTF by sequencing the germline genomic counterpart, but an identical sequence was obtained. The second highly conserved domain (segment 2, Figure 6, DTAGQE in Ras) contains two essential residues for all G proteins: Asp58 and Gly61 (respectively 57 and 60 in Ras). Again in this region there is a particularity in the TTF sequence: the presence of one Asn and one Asp

residues at positions 62 and 63 in TTF instead of Gln and Glu, for almost the entire RAS superfamily (Chardin, 1993). The third domain (segment 3, Figure 6, NKxDL in Ras) presents some variations in the RAS/RAL, RAP, RAB/YPT, RHO families. The first two and fourth crucial residues Thr, Gln, Asp observed in TTF are in agreement with these variations (Valencia et al., 1991), but at the fifth position the Gln residue observed in TTF has not been reported in other small G proteins. Moreover, in this region (LVGNKxDL) there is one insertion of a Val residue in TTF.

These small variations in these three domains between TTF and the other members of the RAS superfamily, lead us to suggest that the nucleotide binding site in TTF may have unusual properties. In that regard, it will be essential to check the guanine nucleotide binding and intrinsic GTPase activities of TTF.

There is a crucial interaction in p21 Ras between two highly conserved residues, Asp119 (120 in TTF) from the third domain and Ser145 (146 in TTF) from the fourth ExSA motif (segment 4), which is perfectly conserved in TTF as in all members of the RAS superfamily.

The predicted TTF protein sequence also contains the CxxxC-terminal consensus geranylgeranylation motif, needed to the membrane anchorage of the G proteins.

Together these data strongly suggest that the function of the TTF protein is related to that of the small G proteins.

In this work we have shown that TTF contains most of the RHO-specific motifs, especially the RHO insertion (residues 124-128). Phylogenetic analysis obtained using an alignment of 24 RHO proteins has ranked TTF in a new RHO subgroup and has ascribed a common ancestor to the TTF and yeast RHO2 proteins (Figure 7). Both proteins share a shortened RHO insertion, 5 and 9 residues respectively, instead of 12 in all the other RHO proteins (Chardin, 1993).

Unlike most other RAS proteins which are expressed ubiquitously (Barbacid, 1987; Bos, 1988; Olofsson et al., 1988) TTF is expressed only in hemopoietic cells (Figure 8), like the Rac2 protein (Reibel et al., 1991). This Rac2 protein was shown to regulate the NADPHoxidase in neutrophils (Knaus et al., 1992). It was also shown that its expression was restricted to the lymphoid lineage and was strongly stimulated during T-cell activation (Reibel et al., 1991). Nevertheless, the TTF protein is distant from the Rac2 protein in the phylogenetic tree (Figure 7).

A detailed study of TTF expression in normal hemopoietic cells, together with the determination of the nature and regulation of the TTF promoter is needed, in addition to a study of the subcellular localization of the protein, in normal and pathologic cells.

Materials and methods

Cell lines and patient sample

Hemopoietic cell lines The VAL cell line is a stable B cell line established from bone marrow cells by C Bastard (unpublished). The karyotype is: 49, XX, dup(2) (p11;p15),

t(3;4) (q27;p11), t(8;14;18) (q24;q32;q21), +8, +ider(8)t(8;14;18)(q24;q32;q21), +der(12)t(1;12)(q24;q24).

This and the other cell lines, T cell lines (JURKAT 193, JURKAT CD3, CEM), B cell lines (RAJI, K422, PR1) were maintained in RPM1 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum.

Epithelial cell lines MDA, T47D, VHB1, BT20 (breast carcinoma), A549 (lung carcinoma) were maintained in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% calf serum.

The Karpas 422 cell line was kindly provided by Dr A Karpas, Cambridge. The PR1 cell line was previously established by one of us (CB). The other cell lines were from ATCC.

Patient sample HAY: tumor cells from fresh lymph nodes of a patient with B-cell NHL bearing a t(3;14)(q27;q32) were obtained as described previously (Deweindt *et al.*, 1993).

DNA cloning

A VAL genomic DNA library was made in the λ EMBL3 vector: about 300 μ g of genomic DNA from VAL cells was partially digested by *Sau*3A, fractionated by size on a sucrose gradient and fragments between 15 and 20 kb were ligated into λ EMBL3. A Karpas 422 complementary DNA library was made in the λ gt10 vector. In both cases the recombinants were packaged with the *Gigapack II plus* kit (Stratagene), plated and screened at the time of primary plating with the different probes.

Plaque hybridizations were carried out on nitrocellulose replicas for 24 h under stringent conditions (50% formamide/ $5 \times$ SSPE-5 × Denhardt's-1% SDS buffer, 42°C) and washing was performed in 2×SSC at 22°C followed by 0.1×SSC, 0.1% SDS at 22°C and then at 55°C.

DNA sequencing

The genomic and complementary DNA fragments of interest were subcloned into Bluescript KSII phagemid for DNA sequencing by the dideoxy chain termination method, using the *sequenase sequencing* kit (USB). Data base searches and sequence analyses were worked out by using CITI2 facilities.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed by using CITI2 facilities, with the TREEALIGN program for protein sequence alignment, distance computation, and construction of phylogenetic trees (Hein, 1989). We align the TTF sequence with 24 RHO sequences from different species (Bacteria, Slime Mold, Yeast, Drosophila and Human), 22 of them being present in the Swissprot bank (version 28),

References

- Bacon RA, et al. (1989). J. Cell. Biol., 109, 1015-1022.
- Barbacid M. (1987). Annu. Rev. Biochem., 56, 779-828.
- Bastard C, et al. (1992). Blood, **79**, 2527–2531.
- Bos JL. (1988). Mutant. Res., 195, 255-262.
- Chardin P. (1993). Handbook of Experimental Pharmacology, Springer Verlag: Berlin/Heidelberg; Dickey BF and Birnbaumer L (ed). Vol 108, pp. 159-176.
- Chardin P and Tavitian. (1989). Nucleic Acids Res., 17, 4380-4386.
- Chardin P, et al. (1989). EMBO J., 8, 1087-1092.
- Chirgwin J, Przybyla A, McDonald R and Rutter W. (1979). Biochem., 18, 5294-5299.
- Deweindt C, et al. (1993). Genes Chrom. Cancer, 8, 149-154.

and two of them (drosophila RAC1 and CDC42) recently published by Luo et al. (1994).

RT-PCR analysis

We used a RT-PCR method (5' ampliFINDER RACE Kit, PROMEGA) to detect the presence of LAZ3 mRNA products from the VAL cell line. The amplification of the 5' end of LAZ3 cDNA was obtained by reverse transcription using the primer M40 (Figure 3) from exon 3: 5'-TGGATACAGCTGTCAGCCGGCG-3', followed by the ligation of the ampliFINDER anchor and PCR using the anchor primer and a nested primer, M25 (Figure 3) from exon 2: 5'-ATGCCTTGCTTCACAGTC-3'. Amplification products with various sizes were obtained all containing at the 5' end a foreign sequence spliced to LAZ3 exon 2.

DNA and RNA analysis

Southern blot analysis Preparation of high molecular weight DNA, restriction enzyme analysis and electrophoresis were performed according to standard procedures. Fifteen μg of high molecular weight DNA were digested with the different enzymes, fractionated by agarose gel electrophoresis, denatured and transferred onto nitro-nylon membrane hybond C (Amersham). All the restriction enzymes were purchased from Boehringer, Mannheim.

Northern blot analysis Total cellular RNA was extracted from cell lines using guanidinium isothiocyanate and centrifugation through cesium chloride (Chirgwin *et al.*, 1979). Polyadenylated RNA was purified by oligo (dT) cellulose chromatography (Pharmacia). Equal amounts of RNA ($25 \mu g$) or mRNA ($5 \mu g$) were size fractionated on a denaturing formaldehyde 1% agarose gel and blotted onto nitro-nylon membrane.

After Southern or Northern blotting the filters were hybridized for 16 h at 42°C in stringent conditions (50% formamide, 42°C). The washing was performed in $2 \times SSC$ at 22°C followed by $0.1 \times SSC$, 0.1% SDS at 22°C and then at 65°C, or followed by $2 \times SSC$, 0.1% SDS at 65°C for Southern or Northern blots, respectively.

Acknowledgements

We thank Dr Pierre Chardin for fruitful discussion and advice. We are grateful to Dr Martin Dyer for critical review of the manuscript. We thank Gérard Lecocq for computer sequence data management. The secretarial and photographic work of Marie-Claire Duvieuxbourg is gratefully acknowledged. This work was supported by a grant from the Comité du Nord de la Ligue Nationale Française Contre le Cancer and the Fondation de France.

- Donaldson JG and Klausner RD. (1994). Current Opinion in Cell Biology, 6, 527-532.
- Drivas GT, et al. (1990). Mol. Cell. Biol., 10, 1793-1798.
- Ellis RW, et al. (1981). Nature, 292, 506-511.
- Fasano O, et al. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 4008-4012.
- Fukuhara S, Rowley JD, Variakojis D and Golomb HM. (1979). Cancer Res., **39**, 3119-3128.
- Hein J. (1989). Methods in Enzymology, 183, 626-645.
- Kerckaert JP, et al. (1993). Nature Genet., 5, 66-70.
- Kikuchi A, et al. (1988). J. Biol. Chem., 263, 2897-2904.
- Knaus UG, et al. (1992). J. Biol. Chem., 267, 23575-23582.
- Leder P, et al. (1983). Science, 222, 765-771.

- Lenoir GM, Preud'homme JL, Bernheim A and Berger R. (1982). Nature, 298, 474-476.
 - Lowe DG, et al. (1987). Cell, 48, 131-146.
 - Luo L, Liao YJ, Jan LY and Jan YN. (1994). Genes and Development, 8, 1787-1802.
 - Madaule P and Axel R. (1985). Cell, 41, 31-40.
 - Maguire J, et al. (1994). Science, 265, 241-244.
 - Manolova Y, et al. (1979). Hereditas, 90, 5-10.
 - Miki T, et al. (1994). Blood, 83, 26-32.
 - Olofsson B, et al. (1988). Oncogene, 3, 231-234.
- Paterson H, et al. (1990). J. Cell. Biol., 111, 1001-1007.
- Pizon VP, et al. (1988). Oncogene, 3, 201-204.
- Polakis PG, et al. (1989). J. Biol. Chem., 28, 16383-16389.
 Reibel L, et al. (1991). Biochem. Biophys. Res. Comm., 175, 451-458.
- Reynet C and Kahn CR. (1993). Science, 262, 1441-1444.

- Ridley AJ and Hall A. (1992). Cell, 70, 389-399.
- Seeburg PH, et al. (1984). Nature, 312, 71-77.
- Terryn N, Van Montagu M and Inzé D. (1993). Plant. Mol. Biol., 22, 143-152.
- Touchot N, Chardin P and Tavitian A. (1987). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8210-8214.
- Tsujimoto Y, et al. (1984). Science, 226, 1097-1099.
- Valencia A, Chardin P, Wittinghofer A and Sander C. (1991). Biochemistry, 30, 4637-4648.
- Van der Sluijs P, et al. (1991). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6313-6317.
- Vincent S, Jeanteur P and Fort P. (1992). Mol. Cell. Biol., 12, 3138-3148.
- Ye BH, et al. (1993). Science, 262, 747-750.
- Zahraoui A, Touchot N, Chardin P and Tavitian A. (1989). J. Biol. Chem., 264, 12394-12401.
V- Détermination de la séquence cible nucléique de la protéine LAZ3.

Les résultats qui suivent sont publiés dans Genes Chromosome and Cancer, 13 : 221-224 (1995). Ils concernent un travail réalisé par l'équipe de T. Mc Keithan, auquel nous avons été associés. En parallèle, nous avons, au laboratoire, réalisé des travaux similaires.

Dans les deux cas, c'est la technique de *CASTing* (*Cyclic Amplification and* <u>Selection of Targets</u>) (Pollock et Treisman., 1990; Wright et al., 1991) qui fut utilisée. Cette méthode permet de caractériser des séquences nucléiques spécifiques en utilisant une faible quantité de protéine. La protéine utilisée est souvent une protéine de fusion avec la gluthatione-S-transférase (GST). Cette protéine est incubée avec un "pool" d'oligonucléotides de séquence aléatoire et soumise à plusieurs cycles d'immunoprécipitation, amplification par PCR et éventuellement d'un retard sur gel.

La protéine que nous avons produite pour cette étude contient les 435 acides aminés C-terminaux de LAZ3/BCL6 en fusion avec la GST. L'oligonucléotide utilisé comporte une partie centrale de 26 paires de bases aléatoires, encadrée par 2 séquences contenant des sites de clonage et servant d'amorces de PCR.

Dans nos conditions, le consensus établi après plusieurs cycles d'immunoprécipitation, PCR et retard sur gel, restait très vague. Par contre, l'équipe américaine utilisa une protéine de fusion plus petite qui ne contient que les 289 derniers acides aminés C-terminaux de LAZ3/BCL6, avec un oligonucléotide de 16 bp aléatoires. Dans ce cas, une séquence consensus 5'TTTNNNGNN<u>ATNCTT</u>3' a pu être obtenue. Ce consensus chevauche (bases soulignées) la séquence récemment décrite par Kawamata *et al.*; 5' (<u>T/A) NCTT</u>TCNAGG(A/G)AT 3' comme la séquence de reconnaissance de la protéine BCL6 (Kawamata *et al.*, 1994b). En additionnant ces deux résultats, nous obtenons un consensus total de 24 bases. Chaque doigt de zinc ne reconnaissant que 3 paires de bases (Pavletich *et al* 1991), le véritable consensus ne devrait contenir que 18 bases. Il semblait donc qu'une autre partie de la protéine puisse contribuer à la fixation. BRIEF COMMUNICATION

BCL6 Encodes a Sequence-Specific DNA-Binding Protein

Beverly W. Baron, Regan R. Stanger, Ellen Hume, Annamma Sadhu, Rosemarie Mick, Jean-Pierre Kerckaert, Clotilde Deweindt, Christian Bastard, Giuseppina Nucifora, Nancy Zeleznik-Le, and Timothy W. McKeithan

Departments of Pathology (B.W.B., R.R.S., E.H., A.S., T.W.M.), Medicine, Section of Hematology/Oncology (R.M., G.N., N.Z.-L.), and Radiation-Oncology (T.W.M), and Committee on Clinical Pharmacology and Cancer Research Center (R.M.), University of Chicago, Chicago, Illinois; U124 INSERM LILLE, LIIIe (J.-P.K., C.D.), and Centre Regional de Transfusion Sanguine, Bois-Guillaume (C.B.), France

Chromosomal rearrangements of *BCL6* are commonly associated with diffuse large-cell lymphomas. We set out to determine the DNA-binding site of a glutathione-S-transferase fusion protein containing the *BCL6* zinc finger region by employing cyclic amplification and selection of targets (CASTing). From oligonucleotides containing 16 central random bases, sequences binding to the protein on glutathione-coated beads were repeatedly selected and amplified by polymerase chain reaction (PCR). The binding sites were cloned and sequenced. A consensus, TTTNNNGNNATNCTTT, was obtained. Protein binding studies of double-stranded oligomers containing point mutations within the 3' CTTT confirmed the binding specificity of this part of the consensus. In addition, evidence indicated that some of the base pairs held constant in the oligonucleotides used for CASTing also contributed to binding. *Genes Chromosom Cancer* 13:221–224 (1995). © 1995 Wiley-Liss, Inc.

Chromosomal rearrangements of BCL6, a recently identified gene on chromosome 3, band q27 (Baron et al., 1993; Kerckaert et al., 1993; Ye et al., 1993a), are detectable in one-fifth to one-third of diffuse large-cell B-cell lymphomas (Bastard et al., 1994; Offit et al., 1994). This gene (previously termed LAZ3) encodes a 79 kDa protein that contains 6 Cys2-His2 zinc fingers in its C-terminal portion and shares amino-terminal homology with a number of transcriptional regulators, including the Drosophila tramtrack and Broad-complex genes (Kerckaert et al., 1993), but its function remains uncertain. We set out to determine whether the zinc finger region can bind DNA and the nature of the consensus binding site with the use of the cyclic amplification and selection of targets (CASTing) technique (Wright et al., 1991) and a glutathione-S-transferase fusion protein bound to glutathione-coated beads.

A fragment of the *BCL6* gene, beginning at position 1335 to the end of the published sequence (Kerckaert et al., 1993), was subcloned into the *Ncol* site of the pGEX-KG vector (Smith and Johnson, 1988). The resulting construct encoded the C-terminal 289 amino acids of *BCL6* and included the entire zinc finger region. The fusion protein was expressed in bacteria containing the construct by induction with 0.4 mM isopropyl β -Dthiogalactopyranoside for 4 hr. The protein was solubilized (Grieco et al., 1992), then bound to beads cross-linked to glutathione (Sigma, St. Louis, MO) at 4°C over a 3 hr period. The protein was efficiently expressed, but only a small fraction could be solubilized. Of the solubilized protein, the majority was incapable of binding to glutathione beads and thus appeared to be improperly folded. After protein binding, the beads were washed several times with phosphate-buffered saline prior to subsequent reactions.

Multiple rounds of CASTing (Wright et al., 1991) were performed with the use of doublestranded 60-mers containing 16 random base pairs flanked on each side by a sequence containing a BamHI or HindIII restriction site. The forward sequence was 5'-CAGTGCTCTAGAGGATCCGT-GAC-3', and the sequence that followed the 16 random base pairs was 5'-CGAAGCTTATCGA-TCCGAGCG-3'. The oligonucleotides were made double-stranded by extension with Taq DNA polymerase in a mixture containing a primer complementary to the second sequence described above. This DNA was bound to protein on glutathionecoated beads at 4°C in 25 mM Hepes, 50 mM potassium chloride (KCl), 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 10 mM magnesium chloride (MgCl₂), 0.5% NP-40, 5% glycerol, 1 mM dithiothreitol (DTT), and 0.01 ng/µl polydeoxyinosinic-deoxycytidylic acid (polydI-dC) sodium. Then multiple rounds of selection and amplification were performed by polymerase chain reaction (PCR). For each subsequent round of selection, 10 µl of the DNA from the prior cycle was added to the protein-beads complex in the presence of the

÷ .

Received December 19, 1994; accepted March 9, 1995.

Address reprint requests to Beverly W. Baron, Blood Bank, MC0007, University of Chicago, 5841 S. Maryland Avenue, Chicago, IL 60637, U.S.A.

binding buffer. PCR was performed for 10 cycles (94°C 1 min, 52°C 2 min, 72°C 2 min; Twin Block™ System, Ericomp, Inc., San Diego, CA). DNA probes were prepared by PCR in a reaction similar to that above (4 cycles; DNA thermal cycler, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT), with addition of 0.25 µCi α-32P-dCTP (3,000 Ci/mmol). For electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), the DNA was bound to the protein for 30 min at room temperature in a 25 µl reaction mix containing 9 ng sonicated placental DNA, 25 µg bovine serum albumin (BSA), and buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glycerol). The reaction mix was electrophoresed on a gel containing 4.8%/0.13% acrylamide/bisacrylamide and Tris-glycine EDTA (TGE: 0.03 M Tris base, 0.2 M glycine, 1.2 mM EDTA) in TGE buffer (0.025 M Tris base, 0.19 M glycine, 1 mM EDTA).

For binding assays, the protein was bound to the glutathione-linked beads as described, and then isolated by 3 elutions at 4°C using a buffer containing 50 mM Tris, pH 8, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 15 mM glutathione. The protein (approximately 0.5 μ g) was bound to the DNA probes (15,000 cpm) at 4°C over a 2.5-4 hr period in a total volume of 25 μ l containing 100 ng polydI-dC and 25 μ g BSA in zinc buffer (20 mM Hepes buffer, 5 mM MgCl₂, 70 mM KCl, 0.05% NP-40, 0.5 mM DTT, 100 μ M ZnCl₂) and electrophoresed on a polyacrylamide gel as described over a 2.5-3 hr period.

A band was visualized on EMSA by the 8th round of CASTing. After the 12th round of selection, a band corresponding in position to the "gel shift" was excised, and the DNA was electroeluted and amplified by PCR. Multiple controls revealed that DNA binding was specific for BCL6 and that BCL6 did not bind nonspecifically to random DNA. The DNA was separated on an 8% polyacrylamide gel. The bands at 60 bp were excised and electroeluted, and the DNA was again amplified by PCR. After EMSA again confirmed binding with BCL6, the DNA was subcloned into the *Bam*HI and *Hind*III sites of pBluescript II KS– (Stratagene, La Jolla, CA).

The nucleotide sequences of the clones were determined using the dideoxy-chain termination method (Sanger et al., 1977). Sequencing of 25 clones isolated after the 13th selection step revealed a consensus, TTTNNNGNNATNCTTT (Fig. 1). Probabilities were estimated based on the binomial distribution with significance set at P < 0.05 for each position indicated— $P \leq 0.007$ for

1	c t	t	c	g	A	Т	G	G	A	A	A	т	A	с	т	т	т	с	т	A	g	t
3	аc	To	Т	A	С	т	A	G	Α	A	A	С	A	C	т	Т	Т	c	q	a	a	q
4	qa	1 0	A	A	G	А	т	т	А	С	Α	G	С	Α	т	т	т	с	ġ	а	а	ġ
5	a c	l c	Т	c	т	Α	G	G	т	Т	т	т	G	С	т	А	т	с	g	а	а	g
6	аc	A	A	A	С	G	т	G	т	G	G	С	Α	А	т	т	т	¢	g	а	а	g
7	аc	1	G	G	т	т	А	С	С	А	т	А	т	С	т	т	т	с	g	а	а	g
8	ас	A	Т	Т	¢	С	т	А	A	т	т	т	А	С	т	т	Т	с	g	а	а	g
9	a c	1 I	' T	A	т	С	G	G	G	A	т	А	т	т	С	т	т	с	g	а	a	g
10	аc	11	A	G	С	С	А	G	G	А	G	А	т	¢	С	С	т	с	g	а	a	g
11	ас	9	Т	N	с	С	¢	А	G	т	A	А	т	т	С	т	т	c	g	а	а	g
13	ас	10	c c	A	G	т	Α	A	т	т	G	т	т	с	т	Т	т	C	g	а	a	g
14	ас		Т	C	G	A	Т	G	A	A	т	G	A	Α	Т	A	Т	с	g	a	а	g
15	ас	N	A	T	С	С	Α	G	G	A	N	т	N	A	Ţ	A	T	c	g	а	а	g
16	ас	11	G	T	Т	Т	A	A	G	A	A	T	G	Т	C	T	T	с	g	а	a	g
17	nc	N	G	A	G	С	G	G	С	C	N	N	G	Т	A	T	T	C	g	а	а	g
18	n c	T	T	Т	С	Α	С	Т	Т	С	Т	Т	G	ç	T	T	T	с	g	а	а	g
19	ас	C	c	c	т	A	G	A	Т	Т	A	c	A	C	T	T	Т	c	g	а	a	g
20	аc	P	T	T	Т	Т	Т	Т	ç	T	A	Т	G	C	T	T	T	l c	g	а	а	g
21	аc	11	A	G	A	Т	Т	A	С	A	c	A	C	T	ç	č	T	С	g	а	а	g
22	a c	11	' T	' T	G	Т	N	G	N	A	A	T	G	T	T	T	T	c	g	а	а	g
23	ас	11	A	. T	G	ç	Т	Т	T	Т	G	A	Т	G	T	T	T	c	g	а	a	g
24	аç	10	A	. T	c	Т	A	G	G	A	A	G	A	ç	T	c	Т	c	g	а	a	g
25	аc	1	<u> </u>	Т	A	<u>A</u>	G	A	A	т	N	T	N	C	T	-T	T	l c	g	a	a	g
	G	1	3	з	6	1	5	10	6	1	4	3	6	1	0	0	0					
	A	3	7	6	2	6	7	7	5	8	8	6	6	4	1	3	0					
	т	9	9	9	6	8	7	4	6	8	6	9	6	6	16	16	22					
	с	7	2	3	8	7	2	0	4	3	1	3	2	11	5	3	0					
$ \text{Consensus } \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{T}{\xrightarrow{A}} \times \times \times \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \times \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{T}{\xrightarrow{N}} \times \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \times \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{C}{\xrightarrow{T}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{C}{\xrightarrow{T}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{C}{\xrightarrow{T}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{T}} \overset{T}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{C}{\xrightarrow{T}} \overset{T}{\xrightarrow{T}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{T}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \times \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\xrightarrow{N}} \overset{N}{\overset{N}} \overset{N} \overset{N} \overset{N} \overset{N}} \overset{N} \overset{N} \overset{N}} \overset{N} \mathsf{N$																						

Figure 1. Sequences of all the clones are indicated, except for clones 2 and 12, which did not contain the 3' T. Constant flanking sequences are in lowercase. Only clone 1 contained the consensus in the opposite orientation relative to the constant flanking sequences. Each nucleotide was assumed to have equal probability (0.25) at each position in the sequence. Clones 1, 2, and 12 were not included in the statistical analysis. The probability of the observed frequency of a particular nucleotide from 22 clones was calculated based on the binomial distribution. Statistical significance was set at P < 0.05 for each position indicated ($P \le 0.007$ for each nucleotide within the 3' CTTT). P values for TTT-NNNGNNATNCTTT were, respectively (5' to 3'): T (P < 0.03); T,T (each P < 0.015); A (P < 0.05); T (P < 0.04); C (P = 0.007); T,T (each P = 0.00003); T (P < 0.00001).

each nucleotide within the 3' CTTT; 9 of 25 clones exactly matched this sequence. In all except one clone (clone 1), the consensus sequence occurred in the same orientation and position. A possible explanation for this result is that base pairs within the 3' constant position of the oligonucleotides contributed to binding.

The validity of the consensus was tested with the construction of 7 different 60-mers. The first 60-mer included 16 central pairs identical to those of clone 19 (Fig. 1) flanked by the constant sequences at the end of the oligonucleotides originally used for CASTing. Each of the other 6 oligomers contained a single point mutation in the CTTT portion of the consensus (Fig. 2) or in the CG bases immediately 3' in the flanking constant region. The oligomers were each annealed with a 21-mer complementary to their 3' end, made double-stranded by extension with Klenow polymerase, bound to the purified zinc finger BCL6 fusion protein, and analyzed by EMSA. The oligomer with the consensus (oligo-1) showed strong binding, and the radioactive probe was largely dis-

÷.,



Figure 2. Oligomers constructed for protein binding studies. Oligomer 1 consists of the 5' primer used for CASTing (first 23 base pairs), followed by the sequences of the 19th clone listed in Figure 1 (next

placed from BCL6 by a 300-fold excess of the same cold oligomer (Fig. 3), supporting the notion that the binding of oligo-1 was specific. Oligos 2, 3, 4, and -5 each contained a point mutation in the internal consensus (Fig. 2), and they did not bind as strongly to BCL6 as did oligo-1, which contained the entire consensus (Fig. 3). Oligonucleotides were also synthesized to test the possibility that the constant bases C and G immediately 3' of the central consensus contributed to binding affinity. Oligos 6 and 7 each contained a point mutation in the primer sequences; oligo 6 did not bind as well to BCL6 as did oligo 1, but the mutation in the primer region (G to T) of oligo 7 produced binding equal to that of oligo 1 (Fig. 3), suggesting that this nucleotide is not essential for binding. A 300-fold excess of cold oligo 1 displaced the binding of each of the 32 P-labeled mutated oligomers (Fig. 3, + lanes), but a 300-fold excess of the cold mutated oligomers 2, 3, 4, 5, and 6 did not displace the binding of oligo-1 (Fig. 4). However, a 300-fold excess of cold oligo 7 displaced the binding of radioactively labeled oligo 1 (Fig. 4).

BCL6 belongs to the Kruppel-like subfamily of zinc finger proteins (Kerckaert et al., 1993; Ye et al., 1993b). Because of its homologies with zinc finger-transcription factors, it has been suggested that BCL6 may be a DNA-binding transcription factor that regulates organ development and tissue differentiation (Kerckaert et al., 1993; Ye et al., 1993b). We have shown that the zinc finger region of BCL6 is a sequence-specific DNA-binding protein and have identified a consensus binding site. Since in all except one clone the consensus sequence occurred in the same orientation adjacent to the 3' constant base pairs, it is likely that this constant part contributed to binding. This was confirmed for the cytosine immediately adjacent to the 3' end of the consensus. The validity of a portion of the consensus sequence was tested with the use of oligomers containing point mutations. The weaker binding of the oligomers that contained a point mutation in the 3' consensus sequence CTTTC, as well as their inability to displace the

16 bases), and ending with the 3' primer used for CASTing (last 21 base pairs). Each of the other 60-mers has a point mutation in the consensus or in the 2 bases adjacent to the 3' side of the consensus.



Figure 3. Competition for BCL6 binding with consensus binding-site DNA. Radioactively labeled double-stranded 60-mers bound to BCL6 protein (alternate lanes); numbers correspond to consensus oligo I (lane 1) or to the oligomers with the point mutations (oligos 2–7; (lanes 2–7), as described in Figure 2. Adjacent lanes (+) show competition for BCL6 DNA binding when the radioactive double-stranded oligomer in the adjacent preceding lane (-) is mixed with 300-fold excess of nonradioactive double-stranded oligo I.

oligomer containing this consensus, confirms the importance of these bases in binding BCL6.

In this study, we performed more than the usual number of rounds of PCR. Since we did not know whether the protein would bind DNA, or the nature of the DNA binding, CASTing was performed under low stringency conditions that would be likely not to interfere with even weak binding; e.g., only a very low level of competitor (0.01 ng/µl of polydI-dC) was added to the reaction mix. This is likely to have decreased the selection efficiency of each step and therefore necessitated a larger than usual number of selection steps. A band on gel shift was visible by the 8th round of PCR amplification, but we elected to perform additional rounds of selection. The validity of the DNA-binding site can be supported with the following data: DNA binding was specific for BCL6; BCL6 did not bind to random DNA; each nucleotide in the consensus was statistically significant (P < 0.05); and the results of the competitive binding studies, as depicted in Figures 3 and 4, were also consistent.



Figure 4. Competition for BCL6 binding: the consensus sequence vs. mutant oligomers. BCL6 binding when radioactively labeled doublestranded consensus oligo-1 (lane 1) is mixed with 300-fold excess of itself or of each cold double-stranded mutant oligomer (oligos-2-7; lanes 2-7; see Fig. 2), as indicated. The EMSA shows that the mutant double-stranded oligomers do not displace the consensus oligomer, except for oligo-7, which had a mutation in the constant region used for CASTing.

From our observations it seems likely that many DNA residues contribute to BCL6 binding and that a mutation in any single base may weaken binding but not eliminate it. During preparation of this manuscript, a publication appeared by Kawamata et al. (1994) presenting a BCL6 recognition sequence, (T/A)NCTTTCNAGG(A/G)AT, which partially overlaps and confirms ours but extends more 3'. These 3' sequences, when combined with our more 5' consensus, total 24 base pairs. There is evidence that in tandem arrays of zinc fingers, each finger typically interacts with 3 base pairs (Pavletich and Pabo, 1991); therefore, one might predict that the 6 zinc fingers of BCL6 could bind 18 base pairs. The recognition sequence we describe (24 base pairs total) suggests that other parts of the protein might contribute to binding as has been described, e.g., for the zinc finger proteins erb A (Chen et al., 1993) and MIG1 (Lundin et al., 1994). Data base searches for matches with the central part of the consensus have revealed a number of genes that contain one or more partial copies in the promoter region, including those of several viruses (most notably human immunodeficiency virus). The central part of the consensus overlaps with certain NF-kB sites and with binding sites for the interferon regulatory

factors (IRF-1, IRF-2) found in a number of alpha interferon genes. However, much more work is required to clarify the significance of these correlations.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the American Cancer Society, Illinois Division, 94-03 (B.W.B.), and the National Institutes of Health, 1-R-29-CA63365-01 (B.W.B.), and CA 53356 (T.W.M.). G.N. is a Special Fellow, N.Z.-L. is a Fellow, and T.W.M. is a Scholar of the Leukemia Society of America. We thank Ms. Debra Kirk for skillful secretarial assistance.

REFERENCES

- Baron BW, Nucifora G, McCabe N, Espinosa R III, Le Beau MM, McKeithan TW (1993) Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14) (q27;q32) and t(3;22) (q27;q11) in B-cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci USA 90:5262-5266.
- Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezella F, Fruchart C, Duval C, Monconduit M, Tilly H (1994) *LAZ3* rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: Correlation with histology, immunophenotype, karyotype and clinical outcome in 217 patients. Blood 83(9):2423-2427.
- Chen H, Smit-McBride Z, Lewis S, Sharif M, Privalsky ML (1993) Nuclear hormone receptors involved in neoplasia: erb A exhibits a novel DNA sequence specificity determined by amino acids outside of the zinc-finger domain. Mol Cell Biol 13:2366-2376.
- Grieco F, Hay JM, Hull R (1992) An improved procedure for the purification of protein fused with glutathione-S-transferase. Biotechniques 13(6):856-857.
- Kawamata N, Miki T, Ohashi K, Suzuki K, Fukuda T, Hirosawa S, Aoki N (1994) Recognition DNA sequence of a novel putative transcription factor, BCL6. Biochem Biophys Res Commun 204: 366-374.
- Kerckaert J-P, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocg G, Bastard C (1993) LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. Nat Genet 5:66-70.
- Lundin M, Nehlin JO, Ronne H (1994) Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. Mol Cell Biol 14:1979–1985.
- Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A, Ladanyi M, Jhanwar S, Dallas-Favera R, Chaganti RSK (1994) Rearrangement of the *bcl-6* gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. N Engl J Med 331(2):74-80.
- Pavletich NP, Pabo CO (1991) Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 A. Science 252:809-817.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467.
- Smith DB, Johnson KS (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-Stransferase. Gene 67:31-40.
- Wright EW, Binder M, Funk W (1991) Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site. Mol Cell Biol 11(8):4104-4110.
- Ye BH, Rao PH, Chaganti RSK, Dalla-Favera **R** (1993a) Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome uranslocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. Cancer Res 53:2732-2735.
- band 3q27 in B-cell lymphoma. Cancer Res 53:2732-2735.
 Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RSK, Dalla-Favera R (1993b) Alterations of a zinc finger-encoding gene, *BCL6*, in diffuse large-cell lymphoma. Science 262:747-750.

VI- LAZ3 : une protéine qui ne fonctionne pas comme un facteur de transcription classique diffusible ?

Les résultats que nous présentons ici sont sous presse dans Oncogene (Dhordain et al., janvier 1996)

Concernant l'expression physiopathologique de *LAZ3*, les seules données sont relatives aux variations du taux d'ARNm dans différentes lignées (Otsuki *et al.*, 1995). Afin d'étudier la protéine LAZ3, deux anticorps polyclonaux de lapin ont été générés. Ces anticorps sont dirigés contre deux portions de la protéine extérieures aux domaines BTB/POZ et à la région contenant les doigts de zinc. Ils reconnaissent un doublet de 79 KDa dans des lignées cellulaires de cellules B, possédant ou ne possédant pas d'anomalie en 3q27, en accord avec le mécanisme de la translocation qui n'affecte pas le cadre de lecture.

Afin de déterminer la localisation sub-cellulaire de la protéine LAZ3, nous avons construit un certain nombre de vecteurs d'expression qui contiennent des délétions plus ou moins importantes du domaine BTB/POZ de LAZ3 et des chimères entre LAZ3 et d'autres domaines fonctionnels.

Les expériences d'immunofluorescence (réalisées par Philippe Dhordain) sur des cellules COS et NIH3T3, transfectées de façon transitoire, montrent que la protéine LAZ3 présente une localisation nucléaire de type ponctuée, spécifique avec les deux types d'anticorps. Cette localisation apparaît être directement reliée à l'activité de la protéine LAZ3. Nous montrons que cette localisation nucléaire ponctuée est dépendante du domaine BTB/POZ, en transfection transitoire. Ces résultats indiquent que la protéine LAZ3 possède la capacité à former des agrégats nucléaires de grande taille et suggèrent que cette protéine puisse normalement interagir spécifiquement avec l'ADN à travers ces sous-structures nucléaires.

Des résultats récents ont montré que la protéine LAZ3/BCL6 endogène présente également une localisation nucléaire ponctuée (Cattoretti et al., 1995).

THE BTB/POZ DOMAIN TARGETS THE LAZ3/BCL6 ONCOPROTEIN TO NUCLEAR DOTS AND MEDIATES HOMODIMERISATION *IN VIVO*.

I

Philippe DHORDAIN¹, Olivier ALBAGLI¹, Stéphane ANSIEAU², Marcel H. M. KOKEN³, Clotilde DEWEINDT¹, Sabine QUIEF¹, Danièle LANTOINE¹, Achim LEUTZ², Jean-Pierre KERCKAERT¹ and Dominique LEPRINCE¹*

 ¹U 124 INSERM, IRCL, 1 Place de Verdun - 59045 LILLE Cédex - FRANCE
 ²Max Delbrück Centrum für Molekulare Medezin, R. Rössle st 10 - 13122 Berlin - GERMANY
 ³U 43 CNRS Centre Hayem, Hopital St LOUIS- 1 Avenue Claude Vellefaux- 75475 Paris-FRANCE

Key words : LAZ3/BCL6, lymphoma, BTB/POZ domain, Krüppel-like Zinc finger, nuclear dots, Two-hybrid system.

Running title : Function of the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain

*Corresponding author Phone : 20 52 97 00 Fax: 20 52 70 83

ABSTRACT

The LAZ3/BCL6 gene was identified by its disruption in 3q27 translocations associated with diffuse large cell lymphomas. It is predicted to be a transcription factor as it contains six *Krüppel*-like Zinc finger motifs and a N-terminal BTB/POZ domain, a protein/protein interaction interface that is widely conserved in Metazoans. Using two antisera raised against non overlapping regions of the predicted ORF, we demonstrate that the LAZ3/BCL6 protein appears as a close ca. 79 kDa doublet in B lymphoid cell lines with either a rearranged or a non rearranged LAZ3/BCL6 locus. By immunofluorescence experiments on transiently transfected COS-1 or NIH 3T3 cells, we show that the LAZ3/BCL6 proper folding and/or activities as it is impaired in a hormone reversible-fashion through fusion of LAZ3/BCL6 to the ligand-binding domain of the oestrogen receptor. Moreover, deletion of its BTB/POZ domain leads to the disappearance of the nuclear dots although the protein remains nuclear. In addition, by using the yeast two-hybrid system, we show that the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain homomerises *in vivo*. Thus, the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain has the capability to self-interact and target the protein to discrete nuclear substructures.

The chromosomal translocations 3g27 are frequently associated with B-cell non Hodgkin's lymphomas, of predominantly diffuse large cell type (Bastard et al., 1994). We and others have previously shown that most of these rearrangements involved the same major translocation cluster (MTC) on chromosome 3 disrupting a gene called LAZ3 (Kerckaert et al., 1993) or BCL6 (Ye et al., 1993; Miki et al., 1994). As a consequence of these rearrangements, only regulatory regions of LAZ3/BCL6 are affected. LAZ3/BCL6 is predicted to encode a 79kDa protein containing two identified functional domains. Its C-terminal region presents 6 C₂H₂ Zinc finger motifs, each separated by a conserved stretch of six amino acids (the His-Cys link) which assigned LAZ3/BCL6 to the Krüppel-like subfamily of Zinc finger proteins. A consensus-binding sequence has been recently defined for the LAZ3/BCL6 protein (Kawamata et al., 1994; Baron et al., 1995). Its Nterminal region contains the recently recognised BTB/POZ domain. The BTB (for Broad-Complex, tramtrack, bric à brac) (Godt et al., 1993) or POZ (for Poxvirus, Zinc finger) (Bardwell and Treisman, 1994) domain is a ca. 120 amino acids conserved and hydrophobic domain, present generally at the N-terminal end in ca. 35 metazoan and viral proteins (for a recent review see Albagli et al., 1995). A first class comprises proteins interacting with DNA whose large majority contains C₂H₂ type Zinc finger motifs. For most of them, consensus DNA-binding sequences have been defined (Numoto et al., 1993; Bardwell and Treisman, 1994; Kawamata et al., 1994; Sugawara et al., 1994; Von Kalm et al., 1994). It includes notably the other putative oncogene PLZF which is fused to RAR in a variant translocation associated with acute promyelocytic leukaemia (Chen et al., 1994), and several Drosophila genes. At least two of them, GAGA and E(var)3-93D, appear to be involved in chromatin-mediated transcriptional regulation (Brown and Wu, 1993; Dorn et al., 1993; Farkas et al., 1994; Godt et al., 1993; Tsukiama et al., 1994; Zollman et al., 1994). The second class includes several proteins sharing the so-called « Gly-Gly repeats » that bind filamentous actin (Schmid et al., 1994; Way et al., 1995). It is examplified by the kelch protein which participates in the assembling of the ring canal, a macromolecular structure that bridges the cytoplasm of oocytes and nurse-cells in Drosophila egg-chambers (Cooley and Theurkauf, 1994). Finally, a third class comprises proteins without any obvious conserved motif besides the BTB/POZ domain (Bardwell et Treisman, 1994; Albagli et al., 1995). It includes the germ cell less protein which binds to the nuclear pore complex in germ cell precursors (pole cell) (Jongens et al., 1994). Despite these apparent unrelated functions, it appears

4

that a common theme for the BTB/POZ domain containing proteins is the participation in large macromolecular complexes that either bundle actin such as in the inner rim of the ring canal or participate in the regulation of high order structure of chromatin. In fact, the BTB/POZ domain should contribute to these properties since it performs homotypic as well as heterotypic interactions *in vitro* (Bardwell and Treisman, 1994; Cooley and Theurkauf, 1994; Chen et al., 1995).

To date, LAZ3/BCL6 expression has been studied mostly at the DNA and RNA levels. To address its role and biological functions, we first wanted to generate specific antisera able to detect the LAZ3/BCL6 proteins in vivo. Computer-assisted prediction of antigenic determinants identified outside of the conserved BTB/POZ and Zinc fingers domains two regions of the protein, residues 283-400 and 428-519 respectively (Fig. 1). We, thus, expressed separately in bacteria these two portions of LAZ3/BCL6 as fusion proteins with the first 98 residues of MS2 phage polymerase (Ghysdael et al., 1986) and injected rabbits with gel-purified polypeptides. Rabbit reticulocyte lysates programmed with the LAZ3/BCL6 cDNA cloned into the pcDNA3 expression vector (Invitrogen) revealed a major band of ca. 79 kDa in good agreement with the calculated molecular weight of its 706 amino acids open reading frame (data not shown). The two anti-LAZ3/BCL6 sera were first tested in immunoprecipitation analyses of LAZ3/BCL6 programmed reticulocyte lysates. SDS-PAGE analyses of the obtained immunoprecipitates revealed the 79 kDa band only with both immune LAZ3/BCL6 antisera and not with the corresponding preimmune sera (data not shown). These antisera will be referred throughout this paper as anti-LAZ A (directed against residues 283-400) and anti-LAZ B (directed against residues 428-519).

To detect the LAZ3/BCL6 proteins *in vivo*, we first used a non-rearranged B lymphoid cell line, Karpas422 (Kobayashi et al., 1993) which has been shown to express high levels of LAZ3/BCL6 mRNAs (unpublished results of our lab). The anti-LAZ A and B antibodies detected the same 79kDa proteins migrating as a close doublet (Fig. 2A, lane 2 and Fig. 2B, lane 6) which are not recognised by the corresponding preimmune sera (Fig. 2A, lane 1 and Fig. 2B, lane 5). The reaction of these antibodies is abolished in the presence of an excess of the MS2-LAZ3/BCL6 fusion protein used to immunise the rabbits (Fig. 2A, lane 3 and Fig. 2B, lane 7). Conversely, the reactivity of the serum was not affected in presence of the MS2 bacterial protein, indicating that the 79kDa proteins were immunoprecipitated through specific determinants of the LAZ3/BCL6 portion of the immunogen (Fig. 2A, lane 4 and Fig. 2B, lane 8). The same 79 kDa proteins were immunoprecipitated by the same antibodies in two other B lymphoid cell lines which

carry a 3q27 translocation, Karpas231 (Nacheva et al., 1993) and VAL (Kerckaert et al., 1993)(Fig. 2A, lanes 5 to 8 and Fig. 2B, lanes 1 to 4). This observation confirms that the LAZ3/BCL6 protein is not grossly qualitatively altered by the translocation on line with the fact that only regulatory regions appear to be modified upon the translocation events (Kerckaert et al., 1993; Ye et al., 1993; Miki et al., 1994). As the LAZ3/BCL6 expression level measured by Northern analyses appears relatively unaffected by the translocation (Otsuki et al., 1995), the mechanism of its oncogenic activation remains elusive. A plausible explanation could be its expression at an inappropriate time during cell cycle and/or B-cell ontogenesis, due to disruption of its promoter. In conclusion, LAZ3/BCL6 appears as a close 79 kDa doublet in immunoprecipitation experiments, in agreement with the predicted size of the ORF. Since the next methionine is residue 50 and since we failed to detect any alternatively spliced mRNA affecting the ORF by RT-PCR experiments (S.Q. unpublished results), we suggest that the observed doublet arises as the result of post-translational modifications of the LAZ3/BCL6 protein.

5

In order to define the subcellular localisation of the LAZ3/BCL6 protein, we performed immunofluorescence experiments on transfected COS-1 and NIH 3T3 cells. In both transfected cell lines, the LAZ3/BCL6 product is localised in discrete nuclear dots which are generally superimposed to a granular nuclear background (Fig. 3, A and B and data not shown), regardless of the fixation method used. Furthermore, a chimera between LAZ3/BCL6 and GFP (a bacterial Green Fluorescent Protein) (Chalfie et al., 1994) displays a similar punctuated nuclear fluorescence upon UV irradiation of living transfected COS-1 cells (data not shown). Noteworthy, the LAZ3/BCL6 containing nuclear dots are also visible in transmission microscopy (Fig. 3, E and F arrows). This signal is clearly specific since : i) these structures are detected with two distinct anti LAZ3/BCL6 antisera raised against non overlapping regions of the protein (anti-LAZ A and B antibodies) (Fig. 3, A and B); ii) untransfected adjacent cells are negative; iii) the signal disappears with pre-incubation of both antisera with an excess of the corresponding MS2-LAZ3/BCL6 peptide used to immunise the rabbit (Fig. 3, C and D). Moreover, an epitope-tagged LAZ3/BCL6, recognised by the anti-tag mouse monoclonal antibody gives a similar pattern (Fig. 3, G). Finally, this punctuated nuclear localisation is a characteristic of the LAZ3/BCL6 protein, since the product of the ck-erg gene, a « classical » transcription factor belonging to the ETS family (Dhordain et al., 1995) displays an homogenous diffuse nuclear localisation in the same immunofluorescence conditions (Fig. 3, H). Thus, the localisation in nuclear dots appears a distinctive property of the LAZ3/BCL6 gene product. Indeed, while this manuscript was under review, the endogenous LAZ3/BCL6 protein has been identified as a nuclear protein (Onizuka et al., 1995) displaying a punctuated nuclear localisation (Catterotti et al., 1995) in agreement with our results in transiently transfected cells.

Fusion of a wide range of proteins to the ligand-binding domain of human oestrogen receptor (huER) (Kumar et al., 1986) inhibits their intrinsic activity in a hormonereversible fashion (for review see Picard, 1994). To establish that the nuclear punctuated localisation of the LAZ3/BCL6 is related to the protein intrinsic activity rather than to some experimental artefacts, we created a LAZ3/BCL6-ER chimera (LAZER) by adding the ligand binding domain of the human ER to the full length LAZ3/BCL6 protein (Fig. 1) and studied its subcellular localisation in transfected COS-1 and NIH 3T3 cells with either pTL or pcDNA3 expressing vector (Fig. 4 and data not shown). While untreated cells exhibit either a perinuclear or an heterogeneous cytoplasmic labelling (Fig. 4, A and C), we observe again nuclear dots upon oestrogen (E₂) treatment using both anti-LAZ A and B antibodies (Fig. 4, B large arrow, and data not shown). This pattern is not the reflect of an E2-mediated induction of the endogenous LAZ3/BCL6 protein since : i) non-tranfected cells remain negative upon E2 treatment (Fig. 4, B small arrow); ii) the same pattern is revealed by a mouse anti-HuER monoclonal antibody (Fig. 4, D). We, thus, conclude that the localisation of the LAZ3/BCL6 product in nuclear dots relies on some inherent functions of the protein, possibly its interacting properties since for example the MYC-ER hybrid protein interacts with MAX only in the presence of E_2 (Philipp et al., 1994).

Both in NIH 3T3 and COS-1 transfected cell lines, the number of nuclear dots per nucleus generally ranges from 5 to up to 40, with a mean value of 20 (Fig. 3). Although most, if not all, transfected cells present nuclear dots, we have yet found some diversity with respect to their abundance and morphology, this is especially true in COS-1 cells, as previously described for the PML protein (Kastner et al., 1992; Daniel et al., 1993). The origin of the alteration of the pattern remains to be established but suggest that limiting cellular factor(s) and/or signal(s) could be required for the nuclear punctuated localisation of LAZ3/BCL6. Taken together, these data indicate that the LAZ3/BCL6 protein has the capability to form nuclear dots. This could either result from the *de novo* creation of aggregates, or perhaps from the feeding, and hence swelling, of pre-existing nuclear sub-structures. Interestingly, both PML and the SP100 proteins belong to a common discrete nuclear Body) (Koken et al., 1994) and overexpression of any of these two components also leads to the swelling of the NB/POD (Koken et al., 1994).

To test the relationship between the LAZ3/BCL6 containing nuclear dots and the previously described POD/NB substructure, we performed confocal microscopy

immunofluorescence analyses, on COS-1 cells transfected with a LAZ3/BCL6 expression vector, using both anti-PML (detecting the endogenous PML proteins) and anti-LAZ A (detecting the exogenously expressed LAZ3/BCL6 proteins) (Fig. 5). In this context, none of the nuclear dots observed contain both proteins as their respective immunofluorescence patterns are completely distinct in the composite picture shown in Fig. 5. We thus conclude that LAZ3/BCL6 and PML belong to different nuclear substructures.

Since endogenously expressed LAZ3/BCL6 proteins also display a punctuated nuclear localisation (Catterotti et al., 1995), in keeping with our results, transiently transfected cells are a valuable system to further study the determinants of this localisation. We, thus, decided to address the role of several domains -and in particular the BTB/POZ domain-in the punctuated nuclear localisation of LAZ3/BCL6. We developed BTB/POZ deleted versions of the protein (Fig. 1), and performed immunofluorescence on COS-1 cell lines transfected with these mutants (Fig. 6). In contrast to the full length LAZ3/BCL6 (Fig. 6 A), the ΔBTB/POZ (132-706) protein failed to exhibit punctuated nuclear localisation upon transfection in COS-1 cells (Fig. 6, B) but displayed rather a granular nuclear localisation. A further N-terminal deletion (Δ 1-271) gave an even more homogenous and almost completely diffuse nuclear distribution (Fig. 6, C). Similar results were obtained in NIH 3T3 transfected cells (data not shown). Moreover, when we performed immunofluorescence experiments using anti-Gal4 monoclonal antibodies (Hwang et al., 1993) on COS-1 cells transfected with a vector expressing a chimera between the Gal-4 DNAbinding domain (1-147) and the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain (Fig.1), we observed that this fusion protein displays a nuclear punctuated localisation (Fig. 7A). In the same context, the nuclear localisation of the isolated Gal4 DNA binding domain is diffuse (Fig 7B). However, although nuclear, the localisation of the Gal4-BTB/POZ protein presents some diversity from one cell to another (data not shown) as already described for both exogenous and endogenous full length LAZ3/BCL6 protein (data not shown; Catterotti et al., 1995). We conclude that the BTB/POZ domain of the LAZ3/BCL6 protein is dispensable for the targeting of the protein to the nucleus but required for its localisation in nuclear dots. Furthermore, it can to some extent impose a discrete nuclear localisation to an heterologous protein.

The BTB/POZ domain of several proteins such as ZID, *ttk* (Bardwell and Treisman, 1994) and *bab* (Chen et al., 1995) has been shown to mediate homodimerization *in vitro*. In order to test the ability of the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain to dimerize *in vivo*, we used the yeast two hybrid system (Fields and Song, 1988) and tested both full length and several deleted versions of LAZ3/BCL6 protein fused to either the Gal4-DNA binding or transcriptional

activation domains (Fig. 8). In this context, N-terminal parts of the LAZ3/BCL6 protein containing the BTB/POZ, namely BTB/POZ 1 and BTB/POZ 2 (Fig. 8A) interact with themself and with full length LAZ3/BCL6 protein, inducing the expression of the β -galactosidase reporter gene and thus the blue coloration of the colonies in a X-gal filter assay and an elevated β -gal activity in a quantitative test using ONPG (Miller 1972), but failed to interact with the Δ BTB/POZ mutant (Fig. 8B). These results demonstrate that the BTB/POZ domain of the LAZ3/BCL6 mediates homotypic protein-protein interactions *in vivo*.

In conclusion, our results show that the BTB/POZ domain mediates dimerization *in vivo* and is essential for the nuclear punctuated localization of the LAZ3/BCL6 protein. Taken together, these results strongly suggest that the punctuated nuclear localisation of the LAZ3/BCL6 protein requires homotypic, BTB/POZ dependant protein-protein interactions. Moreover, we have shown that the LAZ3/BCL6-containing nuclear substructures are distinct from the PML-containing NB/POD. The nature of the LAZ3/BCL6 partners in such substructures as well as their biological role are currently addressed by the screening of cDNAs libraries using the two-hybrid system, this strategy coul help to define a function for the LAZ3/BCL6 containing dots.

Several other BTB/POZ proteins and noteworthy, the endogenous GAGA and bab Drosophila proteins were also found to form discrete nuclear substructures (Bardwell and Treisman, 1994; Godt et al., 1993; Raff et al., 1994). This indicates that the ability to aggregate in nuclear dots is likely to be a common and biologically relevant property of some, if not most, nuclear BTB/POZ proteins. To study the LAZ3/BCL6 containing sub-structures and to examine their shape throughout cell cycle or upon exogenous stimuli, we are currently trying to produce monoclonal antibodies against LAZ3/BCL6 protein (in collaboration with Dr. C. Bastard) as well as stably transfected cell lines which could be analysed by immune-electron microscopy.

A growing number of nuclear functions have been recently assigned to discrete specialised sub-structure, revealing that it is a highly ordered organite. What could be the function of such LAZ3/BCL6 containing nuclear substructures? Two *Drosophila* BTB/POZ proteins *GAGA* and E(var)3-93D are implicated in chromatin-mediated transcriptional regulation by steering the chromatin structure toward a less condensed state (Henikoff, 1990; Dorn et al., 1993; Farkas et al., 1994). Moreover, LAZ3/BCL6 contains a well-defined DNA-binding motif and binds *in vitro* to a consensus sequence (Kawamata et al., 1995; Baron et al., 1995). All these data suggest, although do not prove, that LAZ3/BCL6, as other BTB/POZ proteins may be associated with chromatin and may participate to chromatin modelling through specific interaction with DNA. This would provide an alternative explanation for the oncogenicity of LAZ3/BCL6 taking

into account the puzzling findings that it is not strongly quantitatively and qualitatively altered upon the translocation events (Kerckaert et al., 1993; Ye et al., 1993; Otsuki et al., 1995; this work). Indeed, chromatin condensation regulators display a striking sensitivity to very modest dosage modification (Henikoff, 1990). We thus propose that subtle changes in LAZ3/BCL6 expression could contribute to neoplastic transformation.

We thank Drs. H. de THE and J.L. COUDERC for helpful advices and discussions; Drs M. CHALFIE and P. MARTIN for the bacterial GFP clone; Dr. C. ROSE and C. MULLER for help with the fluorescence experiments and M.C. DUVIEUXBOURG for photographic work. This work is supported by funds from INSERM; Association pour la recherche contre le Cancer (ARC); Ligue Nationale contre le Cancer, Comité du Nord and Fondation pour la Recherche Médicale/Mécenat BNP.

REFERENCES

Albagli et al. (1995) Cell Growth and Differ., in press

Bardwell, V.J. and Treisman, R. (1994). Genes & Dev., 8, 1664-1677

Baron, B.W. et al. (1995) Gene Chrom. Cancer, 13, 221-224

Bastard, C. et al. (1994). Blood, 83, 2423-2427

Brown, J.L. and Wu, C. (1993). Development, 117, 45-5812

Cattoretti et al. (1994) Blood, 86, 45-53

Chalfie et al. (1994) Science, 263, 802-805

Chen, Z. et al. (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 91, 1178-1182

Chen, W., Zollman, S., Couderc, J.L. and Laski, F.A. (1995). Mol. Cell Biol., 15, 3424-3429

Cooley, L. and Theurkauf, W.E. (1994). Science, 266, 590-596

Daniel, M. et al. (1993). Blood, 82, 1858-1867

Dhordain et al. (1995). Mechanisms of Dev., 50, 17-28

Dorn, R., Krauss, V., Reuter, G. and Saumweber, H. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90, 11376-11 Dyck, J. et al. (1994) Cell, 76, 333-343

Farkas, G. et al. (1994) Nature, 371, 806-808

Ghysdael et al. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83, 1714-1718

Godt, D., Couderc, J.L., Cramton, S.E. and Laski, F.A. (1993) Development, 119, 799-812

Green, S., Isseman, I. and Sheer, E. (1988) Nuc. Acids Res., 16, 369

Henikoff, S. (1990) Trends Genet., 6, 422-426

Hwang et al. (1993) EMBO J., 12,2337-2348

Jongens, T.A. et al. (1994) Genes and Dev., 8, 2123-2136

Kastner et al. (1992) EMBO J., 11, 629-642

Kawamata, N. et al. (1994) Bioch. Bioph. Res. Com., 204, 366-374

Kerckaert, J.P. et al.(1993) Nature Genet., 5, 66-70

Kobayashi, H. et al. (1993). Blood, 81, 3027-3033.

Koken, M.H.M. et al. (1994). EMBO J., 13, 1073-1083.

Kumar, V., Green, S., Staub, A. and Chambon, P. (1986) EMBO J., 5, 2231-2236

Miki, T., Kawanata, N., Hirosawa, S. and Aoki, N.(1994) Blood, 83, 26-32

Miller, J., H. (1972) Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY)

Nacheva, E. et al. (1993) Blood, 82, 231-240

Numoto, M. et al. (1993) Nucleic Acids Res., 21, 3767-3775

Onizuka et al. (1995) Blood, 86, 28-37

Otsuki, T. et al. (1995) Blood, 85, 2877-2884

Picard, D. (1994) Curr. Opin. Biotechn., 5, 511-515

Philip, A. et al. (1994) Mol. Cell. Biol., 14, 4032-4043

Raff, J.W., Kellum, R. and Alberts, B. (1994) EMBO J., 13, 5977-5983

Schmid, M.F.et al.(1994) J. Biol. Chem., 124, 341-350

Sugawara, M., Scholl, T., Ponath, P.D. and Strominger, J.L. (1994) Mol. Cell. Biol., 14, 8438-8450

Tsukiama, T., Becker, P.B. and Wu, C. (1994) Nature, 367, 525-532

von Kalm, L.et al. (1994) EMBO J., 13, 3505-3516

Way, M. et al.(1995) J. Cell Biol., 128, 51-60

Ye, B.H. et al. (1993) Science, 262, 747-750

Zollman, S. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 91, 10717-10721

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Schematic drawing of the LAZ3/BCL6 mutants and chimeras.

The portions of the LAZ3/BCL6 protein cloned in expression vectors alone or in frame with other functional domains are shown. The BTB/POZ domain as well as the 6 Zinc finger motifs are indicated. Numbering refers to the LAZ3/BCL6 residues present in the construction.

T : epitope tag recognised by the M2 monoclonal antibody (Kodak, New Haven, CT); ER : hormone binding domain of the human oestrogen receptor; Gal-4 : DNA-binding of the yeast GAL-4 activator (1-147). The portions of the LAZ3/BCL6 protein used as immunogens to obtain the rabbit anti LAZ A and anti LAZ B sera are also indicated.

Figure 2: Identification of the LAZ3/BCL6 proteins in non-rearranged and rearranged lymphoid cell lines.

Approximately 2x 10⁷ cells were metabolically labelled with 250µCi of L-³⁵S Cysteine-Methionine, lysed in RIPA buffer and equal amounts of radioactivity of each lysate were immunoprecipitated using the above indicated sera. Immunoprecipitates were resolved by SDS/PAGE followed by fluorography. Sizes of molecular weight markers (in kDa) are shown on the left.

Panel A: The non-rearranged Karpas422 (lanes 1 to 4) and rearranged VAL (lanes 5 to 8) were immunoprecipitated by pre-immune serum (PI, lanes 1 and 5); by immune serum from the same rabbit (anti LAZ A, lanes 2 and 6); by immune serum prealably adsorbed with an excess of the purified MS2-LAZ A polypeptide used as immunogen (ads LAZ, lanes 3 and 7) and by immune serum adsorbed with an excess of the bacterial MS2 polypeptide (ads MS2, lanes 4 and 8). The LAZ3/BCL6 specific bands are indicated by an arrow-head. Note that a ca. 180 kDa is specifically immunoprecipitated by the anti LAZ A antiserum in Karpas422 and in VAL cells (lanes 2, 4, 6 and 8). The nature of this protein which is not detected by the anti LAZ B serum is unknown. However, as the samples are boiled for 10 min. in reducing Laemmli buffer before loading on the gel, it is unlikely that this protein corresponds to a LAZ3/BCL6 dimer.

Panel B: A similar experiment was performed with the anti LAZ B serum and the rearranged Karpas231 (lanes 1 to 4) and non-rearranged Karpas422 (lanes 5 to 8) cell lines. Nomenclature is as in panel A.

Figure 3 : Sub-cellular localisation of the LAZ3/BCL6 protein.

PcDNA3LAZ3/BCL6 transfected COS-1 cells were fixed 72 hours after transfection and tested for LAZ3/BCL6 localisation in immunofluorescence experiments using : A : anti LAZ A anti-serum and B : anti LAZ B anti-serum. Both antisera reveal the same nuclear punctuated localisation of the LAZ3/BCL6 protein. C : preincubation of anti LAZ A antiserum with an excess of MS2-LAZ A peptide used as immunogen leads to disappearance of the signal. D : the same result is obtained by preincubation of anti LAZ B antiserum with an excess of the MS2-LAZ B peptide.

The LAZ3/BCL6 positive dots are visible in transmission microscopy. E : COS-1 cells transfected with pTL1 LAZ3/BCL6. pTL is a derivative of the pSG5 expression vector (Green et al., 1988) carrying a longer polylinker (kindly provided by T. Lufkin). Arrow : nuclear LAZ3/BCL6 positive dot. F : same picture than in E in transmission microscopy. Arrow : same dot than in E. Note the absence of signal in adjacent untransfected cells in both fluorescence and transmission microscopy. G : COS-1 cells transfected with pcDNA3 LAZ3/BCL6-tag present the same punctuated pattern using M2 anti tag monoclonal antibody (Kodak). H : In the same experimental conditions, COS-1 cells transfected with the pSG5-ck-erg show a diffuse nuclear localisation of the CK-ERG protein using the 204 anti erg antiserum (Dhordain et al., 1995).

Figure 4 : The punctuated nuclear localisation of a LAZ3/BCL6 ER chimera is dependent on the presence of the oestrogen.

A : COS-1 cells transfected with pcDNA3 LAZER (see text) showing an heterogeneous cytoplasmic localisation of the LAZER protein using anti LAZ A antiserum. **B** : COS-1 cells transfected with pcDNA3 LAZER and treated with β -oestradiol (Sigma), at a final concentration of 10⁻⁶ M, 24 hours after transfection. This treatment leads to the localisation of the LAZER protein in nuclear dots (arrow), untransfected cells remains negative upon treatment (small arrow). **C** : COS-1 cells transfected with pcDNA3 LAZER showing the same pattern than in **A**, using anti-HuER mouse monoclonal antibody (Euromedex). **D** : COS-1 cells transfected with the same vector, treated with hormone, and tested in immunofluorescence experiments using anti-HuER mouse monoclonal antibody (Euromedex). In this panel, higher magnification was used than in panels **A**, **B** or **C**, to show that LAZER positive nuclear « coated spheres » are morphologically identical to those observed with the LAZ3/BCL6 protein.

Figure 5 : The LAZ3/BCL6 protein does not co-localize with PML.

Cos-1 cells transfected with the pcDNA3 LAZ3/BCL6 expressing vector were fixed and analysed by indirect immunofluorescence using the C7 monoclonal antibody which detects the endogenous PML proteins and the anti LAZ-A rabbit polyclonal antiserum. An overlay of single confocal images obtained for each of these antibodies shows a clear distinct pattern for PML (red staining) and LAZ3/BCL6 (green staining).

Figure 6 : Localisation of the full length LAZ3/BCL6 protein and of the $\Delta BTB/POZ$ and Δ (1-271) mutants.

Full length and deleted versions of the LAZ3/BCL6 protein expression vector were transfected in COS-1 cells and immunofluorescence were carried out 72 hours later using anti LAZ A antiserum (LAZ3/BCL6, Δ BTB/POZ) and the anti LAZ B antiserum (Δ (1-271)).

A : COS-1 cells transfected with pcDNA3 LAZ3/BCL6 which present punctuated nuclear localisation of LAZ3/BCL6 protein associated with positive nuclear granular background. B : COS-1 cells transfected with pcDNA3 Δ BTB/POZ display a heterogeneous nuclear localisation. C : COS-1 cells transfected with pSG5 Δ (1-271) exhibit a homogeneous nuclear localisation. Note that this latter mutant presents an even more diffuse nuclear localisation than the Δ BTB/POZ.

Figure 7 : Localisation of the Gal4-BTB/POZ chimera.

A : COS-1 cells transfected with a vector expressing Gal4-BTB/POZ chimera were fixed and analysed by immunofluorescence using the 2GV3 and 3GV2 anti Gal-4 monoclonal antibodies (Hwang et al., 1993) show a punctuated nuclear localisation. B : COS-1 cells transfected with the Gal4 DNA-binding domain (1-147) expressing vector and analysed with the same antibodies display a diffuse pattern. C : Mock-transfected COS-1 cells were analysed as in A and B.

Figure 8 : BTB/POZ domain mediates interactions in vivo.

A : schematic representation of the LAZ3/BCL6 containing chimeras used in the two hybrid system. BTB/POZ domain and Zinc Fingers of the LAZ3/BCL6 are shown. Gal4 DBD : Gal4 DNA Binding Domain, Gal4 TAD : Gal4 TransActivation Domain. **B** : Summary of results of transfections in yeast cells of the different vectors expressing the proteins described in **A**.

Fig 1



-119-



Dhordaum et al., Figure 2



















Figure 5 Dhordain et al.















-125-

· · · · • Q⁻



B

DNA binding hybrid (in pGBT9)	Trans-activation hybrid (in pGAD424)	Color of colonies ^a	Bgal activity ^b			
GalDBD GalDBD GalDBD GalDBD GalDBD GalDBD-BTB/POZ 1 GalDBD-BTB/POZ 1 GalDBD-BTB/POZ 1	GalTAD GalTAD-BTB/POZ 1 GalTAD-BTB/POZ 2 GalTAD-ΔBTB/POZ 2 GalTAD-LAZ3/BCL6 GalTAD GalTAD-BTB/POZ 1 GalTAD-BTB/POZ 2	white white white white white blue blue	$\begin{array}{c} 0.33 \pm 0.31 \\ 0.041 \pm 0.071 \\ 0.082 \pm 0.0009 \\ 1.15 \pm 0.21 \\ 1.75 \pm 0.46 \\ 0.039 \pm 0.06 \\ 23.81 \pm 1.675 \\ 17.91 \pm 4.31 \end{array}$			
GalDBD-BTB/POZ 1 GalDBD-BTB/POZ 1 GalDBD-BTB/POZ 2 GalDBD-BTB/POZ 2 GalDBD-BTB/POZ 2 GalDBD-BTB/POZ 2 GalDBD-BTB/POZ 2	GalTAD-ΔBTB/POZ GalTAD-LAZ3/BCL6 GalTAD GalTAD-BTB/POZ 1 GalTAD-BTB/POZ 2 GalTAD-ΔBTB/POZ GalTAD-LAZ3/BCL6	white blue white blue blue white blue	1.17 ± 0.48 32.07 ± 1.62 0.057 ± 0.032 36.19 ± 7.72 56.81 ± 1.92 3.14 ± 0.47 35.44 ± 7.4			

^a The number of colonies per plate was in the range of 50-250.

^b The Bgalactosidase activity is expressed as units defined by Miller (1972). The expriment was repeated three times for each point.

VII- L'oncogène LAZ3 code un répresseur transcriptionnel, son domaine BTB/ POZ représentant un domaine autonome de répression.

(Résultats sous presse dans Cell Grouth and Differenciation (Deweindt C. et al., Deccembre 1995)

Des expériences de retard sur gel démontrent que la protéine LAZ3 entière se fixe sur sa séquence consensus et que le domaine BTB/POZ diminue cette activité. En effet, une version de la protéine déletée de son domaine BTB/POZ se fixe avec une meilleure affinité à la sonde.

Nous montrons, dans des expériences de transfections transitoires réalisées dans plusieurs types cellulaires, que le facteur LAZ3 présente un effet represseur d'une part en tant que protéine entière sur ses séquences cibles, d'autre part comme chimère entre LAZ3 et le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 sur la séquence cible du motif de fixation à l'ADN de GAL4. Cette fonction de répression est fortement dépendante de la présence du domaine BTB/POZ, domaine qui apparait également suffisant pour diriger une répression de la transcription. Une région centrale de LAZ3 riche en résidus proline présente également un effet répresseur, qui semble dépendre de la présence du domaine BTB/POZ de la protéine entière.

L'oncogène *LAZ3* présente donc des propriétées de répresseur transcriptionnel et la région BTB/POZ peut agir comme un domaine autonome de répression responsable de la majeure partie de l'activité répressive obtenue avec la protéine LAZ3.

THE LAZ3/BCL6 ONCOGENE ENCODES A SEQUENCE-SPECIFIC TRANSCRIPTIONAL INHIBITOR : A NOVEL FUNCTION FOR THE BTB/POZ DOMAIN AS AN AUTONOMOUS REPRESSING DOMAIN

Clotilde DEWEINDT¹, Olivier ALBAGLI¹, Florence BERNARDIN, Philippe DHORDAIN, Sabine QUIEF, Danièle LANTOINE, Jean Pierre KERCKAERT and Dominique LEPRINCE²

U124 INSERM, INSTITUT DE RECHERCHES SUR LE CANCER DE LILLE, Place de VERDUN, 59045 LILLE Cedex, FRANCE

Key words : Lymphoma, LAZ3/BCL6 oncogene, BTB/POZ domain, Transcriptional repression, GAL4 chimeras

Running title : LAZ3/BCL6 is a transcriptional repressor.

Phone : 20 52 97 00 Fax : 20 52 70 83

ABSTRACT

Rearrangements and mutations of the LAZ3/BCL6 gene are the most frequent events associated with diffuse large-cell lymphoma (DLCL), a particular class of non-Hodgkin lymphomas. This gene encodes a putative regulatory protein with 6 C-terminal Krüppel-like zinc fingers and a N-terminal hydrophobic region, the so-called BTB/POZ domain, which mediates homo- as well as heterotypic interactions in other related proteins. Recently, a consensus binding-sequence has been defined using the isolated LAZ3/BCL6 zinc finger region produced in bacteria. To understand the normal and oncogenic functions of LAZ3/BCL6, we examined its properties as a transcription factor. We thus demonstrated that its full-length product binds to the same consensus-sequence, though the BTB/POZ domain decreases this activity, at least in vitro. In transient transfection experiments, the LAZ3/BCL6 protein exerts a repressive effect, both as a wild type protein on its own target sequence, or as a GAL-4 fusion protein. Furthermore, our results indicate that the BTB/POZ plays a prominent role in the mediation of this activity. Indeed, on the LAZ3/BCL6 cognate sequence, deletion of the BTB/POZ domain diminishes the repressive function. Conversely, as a GAL-4 chimera, the isolated LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain appears nearly as efficient as the entire protein at inducing transcriptional repression. Taken together, these findings demonstrate that the LAZ3/BCL6 is a sequence-specific transcriptional repressor and point to a novel function for the BTB/POZ region, at least in LAZ3/BCL6, as an autonomous transcriptional inhibitory domain.

Introduction

Krüppel-like zinc finger proteins defines one of the major evolutionarily conserved group of transcriptional regulators playing essential functions in the control of cell growth, differentiation and transformation (1). Recently, a novel gene encoding a *Krüppel*-like protein, LAZ3/BCL6, was discovered by virtue of its frequent and specific association with two common B cells non Hodgkin lymphomas, the follicular lymphoma (FL) and, at an even greater extent, the diffuse large-cell lymphoma (DLCL) (2-6). Indeed, when both the rearrangements and the ponctual mutations are taken into account, more than 80 % of the DLCL cases display structural alterations of the LAZ3/BCL6 gene (6).

3

Besides its six C-terminal Krüppel-like zinc fingers, the LAZ3/BCL6 protein harbors at its N-terminus another evolutionarily conserved motif of about 130 residues, the so-called highly hydrophobic BTB/POZ domain (7). This motif is present in functionally heterogenous metazoan and viral proteins, including nuclear regulatory proteins, most of them also contain Krüppel-like zinc fingers (8, 9), actin-binding proteins (10), a nuclear pore-associated protein in Drosophila germ cell precursors (pole cells) (11), and several predicted proteins of unknown functions in C. Elegans and poxviruses (7, 8). An intriguing aspect of certain Drosophila nuclear BTB/POZ proteins, namely the GAGA factor and the E(var)3-93Dproducts, is their possible involvment in chromatin modelling and chromatin-mediated transcriptional regulation (12-14). Recently, it was demonstrated that this domain mediates in vitro homomeric interactions, as well as specific heteromeric interactions with related domains (8, 10, 15), thus accounting, at least partly, for the frequent participation of nuclear as well as other BTB/POZ proteins in multimeric complexes (8, 10, 15). Noteworthy, by its putative oncogenic function and the concommitant presence of both a BTB/POZ domain and of Krüppel-like zinc fingers, the LAZ3/BCL6 protein is reminiscent of the PLZF gene product which is fused to the retinoic acid receptor α in a variant translocation t(11; 17) associated with acute promyelocytic leukemia (16).

Some initial observations suggested that LAZ3/BCL6 could play a role in skeletal muscle differentiation (2). More recent findings have demonstrated a specific regulation of LAZ3/BCL6 during B-cell development and pointed for its possible implication in germinal-center development and/or function (17). Thus, a deregulated LAZ3/BCL6 expression could contribute to leukemogenesis since DLCL derives from germinal-center B-cells.

Despite these provocative statistical and biological evidences, the mechanisms underlying the LAZ3/BCL6 oncogenic function in DLCL remain largely elusive. Indeed, the LAZ3/BCL6 gene does not appear to undergo major quantitative changes in its expression level upon the rearangements (18) nor modifications of its product as the mutations are, so far, clustered in non-coding regions (6, 18).

To better understand the role of the LAZ3/BCL6 gene in normal and malignant development, we have examined its properties in transcriptional control. We demonstrate here that it encodes a sequence-specific transcriptional repressor. In addition, our results indicate that this repressive function depends on the presence of the BTB/POZ domain. Finally, our findings show that the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain is indeed sufficient to mediate a transcriptional repression. Thus, this study brings to light the regulatory properties of the LAZ3/BCL6 oncogene and indicates that the BTB/POZ motif may represent a new class of autonomous transcriptional inhibitory domain.

Results

The full-length LAZ3/BCL6 protein displays sequence-specific DNA-binding activity. We and others recently demonstrated that a 14 pb consensus-sequence centered around a CTTTC is specifically recognized by the LAZ3/BCL6 zinc finger domain (19, 20). Three similar probes, termed "AA", "TA" and "TG", exhibiting comparable affinities have been defined by Kawamata and coworkers (20). However, besides one experiment that used crude nuclear extracts from Burkitt's cell lines (20), these results were obtained with bacteriallyexpressed hybrid proteins deleted of various parts of the LAZ3/BCL6 protein amino-terminus (19, 20). In order to address the binding properties of the full-length LAZ3/BCL6 gene product, we performed EMSA experiments using the complete open reading frame of LAZ3/BCL6 expressed in rabbit reticulocyte lysates (Fig. 1). We thus demonstrated that the full-length LAZ3/BCL6 protein binds to the TG probe in vitro (Fig. 1, lane 4) This binding is specific as : i) reticulocyte lysates programmed with the corresponding empty expression vector (pTL1) do not give this retarded signal (Fig.1, lane 2); ii) the signal is extinguished by a 100 fold excess of cold probe (Fig.1, lane 5). These results establish that the full-length LAZ3/BCL6 product specifically recognizes in vitro the consensus-sequence previously defined with bacterially-expressed truncated proteins.

5

The LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain reduces the specific DNA-binding activity of the intact protein. The BTB/POZ domain of several zinc-finger proteins has been shown to inhibit their specific DNA-binding activity *in vitro* (8). This property seems to be transferable to other regulatory proteins bearing unrelated DNA-binding motifs (8). However, the LAZ3/BCL6 protein, as the other BTB/POZ protein ZF5 (21), is able to bind to its cognate sequence as a full-length protein (Fig. 1). To directly examine the effect of the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain on the DNA-binding activity, we compared the DNA-binding properties of the full-length protein with those of a BTB/POZ-deleted version using similar amounts of proteins expressed in reticulocyte lysates. We thus observed that a greater amount of the TG probe was retarded with the BTB/POZ deleted mutant (Fig. 1, compare lane 4 and lane 6). In addition, a retarded complex remains detectable in the presence of a 100 fold excess of cold competitor, only with the Δ BTB/POZ derivative (Fig. 1, lanes 4 to 7). Finally, while the BTB/POZ domain-deleted version gave a well-resolved complex, the full-length protein displayed a more heterogeneous pattern. This is evocative, as already reported for the
BTB/POZ protein ZID (8), of weak-affinity complexes that were partially lost upon electrophoresis. We conclude that the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain only weakens, but does not totally abrogate, the specific DNA-binding of this protein to the TG probe, at least *in vitro*.

The LAZ3/BCL6 target sequence mediates transcriptional inhibition. The above described results indicate that the TG sequence could be a suitable target to study LAZ3/BCL6-mediated transcriptional regulation *in vivo*. We thus constructed a reporter plasmid bearing three copies of the TG sequence upstream of the minimal herpes virus thymidine kinase promoter (TGx3-tk-CAT, see Fig. 3A and Material and Methods). The results of all transient transfections were normalized to the luciferase activity using a cotransfected pSVluc vector as an internal control for transfection efficiency.

When this reporter is transfected in mouse C2 cells, the results we obtained indicate that the trimeric TG sequence decreases the transcriptional activity of the minimal tk promoter (3 to 5 fold, compare with the native pBLCAT vector, Fig. 3A, 3B and 3C). This suggests that endogenous protein(s) recognizing the LAZ3/BCL6 target sequence is (are) able to repress transcription. The same endogenous repression was observed in NIH3T3 cells (data not shown). Since low levels of LAZ3/BCL6 message are detectable in both C2 and NIH3T3 cells (Fig. 2), it is possible that one of these endogenous proteins is the LAZ3/BCL6 gene product itself (see below).

The LAZ3/BCL6 protein is a sequence-specific transcriptional repressor. To examine the role of the LAZ3/BCL6 protein in transcriptional regulation, we transfected the TG3x-tk-CAT reporter plasmid together with an expression plasmid encoding the full-length LAZ3/BCL6 protein (Fig. 3A). This vector further increases the transcriptional repression from 2 to 3 fold in the C2 cells (Fig. 3B and 3C). Similar results were obtained in NIH3T3 cells (data not shown). Increasing the amount of transfected expression vector to 2 μ g (versus 0.5 μ g) does not further strengthen the inhibition (data not shown). Since this effect is strictly dependent on the presence of the LAZ3/BCL6 target sequence (Fig. 3D), we infer from these experiments that the LAZ3/BCL6 oncoprotein is a sequence-specific transcriptional repressor, at least on the TG sequence.

The BTB/POZ domain is important for the LAZ3/BCL6-mediated transcriptional repression. Two mechanisms could account for the observed repressing activity : it may result from a «passive» competition with endogenous activators or from an « active » repression (22-

24). To clarify the underlying mechanisms, we have studied the effects of amino-terminal truncated mutants (Fig. 3A).

Deletion of the BTB/POZ domain (Δ BTB/POZ) gives raise to a protein that is inefficient at strengthening the basal repression in the C2 cells, as its transfection results in a transcriptional activity very similar to the one obtained with the empty expression vector (Fig. 3A, 3B and 3C). Since this derivative is stably produced in COS-1 cells (Fig. 3E), this result indicates that the repression does not rely on a «passive» mechanism as it reduced by the deletion of the BTB/POZ domain which is dispensable (and even inhibitory) for DNA-binding *in vitro* (Fig. 1). Interestingly, further amino-terminal deletion (Δ 1-271 mutant) (Fig. 3A) increases the transcriptional activity of the TG3x-tk-CAT reporter above the level obtained with the cotransfection of the empty vector (Fig. 3B and 3C). This derivative is also stably produced in COS-1 cells (Fig. 3E). For each derivative, similar results were obtained in NIH3T3 cells (data not shown).

Two explanations can account for these results. The first one postulates that the binding of the transfected proteins does not interfere with that of the endogenous repressors (hence distinct from LAZ3/BCL6). In this case, the BTB/POZ domain is strictly required for the LAZ3/BCL6-mediated transcriptional repression. Indeed, the similar transcriptional activity elicited by the empty vector and the Δ BTB/POZ mutant indicates that this mutant is totally inefficient and purely « neutral », whereas the further amino-terminal deletion (Δ 1-271 mutant) reveals a weak cryptic transactivation function. However, this hypothesis appears unlikely because the transfection of the isolated zinc finger domain (Δ 1-514), presumably devoid of transcriptional transactivation properties, gave a CAT activity even higher than the Δ 1-271 derivative (data not shown).

Alternatively, it is likely that the exogenous proteins compete with the endogenous repressors (e. g. LAZ3/BCL6 itself) for the binding to the TG sequence. In this case, assuming that the level of the high-affinity exogenous Δ BTB/POZ mutant is sufficient to occupy most of the transfected sites, a purely « neutral » version would have given a transcriptional activity close to that of the parental pBLCAT reporter. Accordingly, the Δ BTB/POZ mutant keeps some repressing activity as its transfection fairly replaces a low level of a strong endogenous (full-length protein) repressor by a large level of a weak repressor, suggestive of an important, but not exclusive, role for the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain in the mediation of repression (Fig. 3B and 3C). Hence, this residual activity would be partially lost in the Δ 1-271 mutant

7

(and almost totally in the $\Delta 1$ -514 derivative), which thereby behaves as an efficient dominantnegative version that somewhat reverts the endogenous repression (Fig. 3B and 3C).

Whatever the interactions between the endogenous and exogenous repressors, these results demonstrate that the the LAZ3/BCL6 protein mediates an « active » repression and indicate that its BTB/POZ domain is important, or even critical, for this activity.

The LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain displays an autonomous and transferable repressing activity. The substantial endogenous constitutive repression and the possible competition between the exogenous and the endogenous repressive proteins obscure the interpretation of the experiments and probably reduces the efficiency of the exogenous full-length proteins. Most of the examined cell lines express the LAZ3/BCL6 message³. Moreover, cells devoid of the LAZ3/BCL6 protein could also be devoid of putative essential cofactors. Using the yeast GAL4 (1-147) as an heterologous DNA binding domain allowed us to circumvent these problems and to analyze the role of different domains of the LAZ3/BCL6 protein. In addition, to avoid any competition between the transfected reporter and the endogenous LAZ3/BCL6 binding-sites, we also deleted the LAZ3/BCL6 zinc finger region and thus created the GAL4-LAZ Δ Zn (1-500) (Fig. 4A).

In agreement with the results we obtained using the TG3x-tk-CAT as a reporter, the GAL4-LAZ Δ Zn chimera is a potent transcriptional repressor, by mediating an about 15 fold reduction of the activity of the 5xGAL4-tk-CAT reporter in C2 cells (Fig. 4B and 4C). Similar results were obtained in NIH3T3, though the effect appears slightly weaker (data not shown). Note that the repressive effect is much stronger compared to that observed on the TG3x-tk-CAT reporter.

Deletion analysis using the TG3x-tk-CAT reporter reveals an important role for the BTB/POZ domain in transcriptional repression. To examine more directly its function, we also created a GAL4-BTB/POZ construct. This chimera also mediates a strong (10 fold) transcriptional inhibition of the activity of the 5xGAL4-tk-CAT reporter (Fig. 4B and 4C). Similar results were obtained in NIH3T3 cells (data not shown). As a further control, we demonstrate that elimination of the GAL4 target sequences largely abrogates the repression for each chimera (Fig. 4D). These results indicate that the BTB/POZ domain is, or contains, an autonomous and transferable repressing domain provided it is tethered to the tk promoter.

The GAL4 chimeras are stably produced in COS-1 cells as judged by immunoprecipitation experiments (Fig. 4E). Taken together, our results indicate that the LAZ3/BCL6 gene product acts as a transcriptional repressor both as wild-type protein or in

the context of a GAL4 chimera and strongly suggest that its BTB/POZ domain plays a direct role in the mediation of this effect.

Discussion

Function of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. This study provides the first compelling evidences indicating that the LAZ3/BCL6 encodes a sequence specific transcriptional repressor. Indeed, its product specifically binds to the consensus-sequence previously defined using truncated proteins (20). Moreover, it decreases the transcriptional activity when bound to its cognate sequence or as a GAL4 chimera using an appropriate reporter. In each case, the effects are dependent on the target sequences, arguing against non specific or indirect "squelching" mechanisms. Finally, our results strongly argue in favor of an important (Fig 3) and direct (Fig 4) role of its BTB/POZ domain in this repressive function. It will be interesting to corroborate these results using, as targets, the naturally occuring putative LAZ3/BCL6 binding sites identified in three genes by an extensive survey of regulatory regions (20).

The completion of differentiation requires both gene induction and shutt-off. Hence, not too surprisingly, several transcriptional regulators displaying (not necessarily exclusively) repressive activities are involved in malignant transformation such as RB, WT1 and *bmi* (25-29). While the tumor-suppressors RB or WT1 are recessive oncogenes whose inactivation may lead to overexpression of growth-inducing genes (25-27), *bmi*, in contrast, appears as a "dominant" oncogene which normally contributes to « freeze » a specific pattern of developmental regulators (28). Since the consequences of LAZ3/BCL6 structural alterations on its expression are not clear to date (18), it is difficult to draw a link between its repressive function and its oncogenic properties. Perhaps, an abnormal inhibition of differentiation- and/or apoptosis-associated genes in LAZ3/BCL6-linked lymphomas fits better with the observation that LAZ3/BCL6 is expressed in germinal-center and extinguished upon B-cell terminal differentiation (17).

The BTB/POZ domain is multifunctional. By a deletion analysis, we demonstrate here that the LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain is important for the repressive function of the protein. Our results strongly suggest this requirement reflects a direct involvment of the BTB/POZ domain in transcriptional inhibition instead of a need for the DNA-binding activity since : 1) *in vitro*, it rather decreases the specific DNA-binding activity (Fig. 1); 2) it acts as a strong autonomous inhibitory domain in the context of a GAL4 chimera (Fig. 4). Whether it is the only repressive domain of the LAZ3/BCL6 protein is yet challenged by the differential behavior between the Δ BTB/POZ and Δ 1-271 mutants (Fig. 3) and the slightly (but consistently) greater efficiency of the GAL4-LAZ Δ Zn(1-500) versus GAL4-BTB/POZ (Fig.

10

4). We are currently trying to examine the regulatory properties of other parts of the LAZ3/BCL6 protein.

11

Strikingly, most of the other nuclear BTB/POZ proteins examined also display repressive functions, such as the *Drosophila ttk* proteins (30), the vertebrate ZF5 protein (31), the B isoform of the γ FBP regulator of the γ F-crystallin gene (31), or the PLZF gene product at least in the context of a GAL4 chimera (32). Interestingly, in the latter case, the first 100 residues of the BTB/POZ region also autonomously inhibit the transcription (32). Moreover, as a GAL4 chimera, the BTB/POZ domain of the *Drosophila bab* protein also represses the transcription, albeit at a lesser extent (4 to 5 fold) compared to its LAZ3/BCL6 counterpart⁴. Taken together, these data suggest that this highly conserved region contains a new class of repressing motif.

Krüppel-like proteins and transcriptional repression. Several other *Krüppel-*like proteins are also involved in transcriptional repression, for instance WT-1 (25, 26), the *Blimp* factor which steers B-cells toward terminal differentiation (33) or *Krüppel* itself (34).

For a large subset of *Krüppel*-like proteins, another evolutionarily conserved domain, termed the KRAB-A box (*Krüppel*-associated box A) also appears to act as a potent autonomous repressive domain (35-37). Interestingly, it shares some structural similarities with the BTB/POZ region since both domains contain numerous conserved hydrophobic residus and might form amphipatic α -helices thought to mediate protein/protein interactions (8, 15, 35-37).

Another interesting functional aspect of certain *Krüppel*-like proteins is that they appear to be versatile regulators (38, 39). For instance, while the monomeric form of *Krüppel* acts as a repressor, the dimeric one turns out to be a transcriptional activator (34, 38). Distinct interactions with two factors of the basal transcription machinery may underly this conversion (34, 38). Moreover, it should be stressed that our transient transfection assays with overexpressed effector are unlikely to reveal all the regulatory properties of the LAZ/BCL6 protein. Thus, it remains possible that, in certain cellular and/or promoter contexts, the LAZ3/BCL6 could behaves rather as a transcriptional activator. Interestingly, it was recently proposed that the related PLZF factor could also display ambivalent regulatory functions (32).

How LAZ3/BCL6 might regulate transcription ? Though the nuclear BTB/POZ proteins are probable transcriptional regulators, it is currently unclear whether they act as classical "diffusible" transcription factors or by chromatin modelling (12-14, 40). Given the genetical and/or biochemical properties of the *Drosophila* BTB/POZ proteins, GAGA and

E(var)3-93D, one may speculate that LAZ3/BCL6 could act on chromatin-mediated transcriptional regulation (12-14, 40). However, we report here that it "classically" represses transcription in transient transfections assays. Since little information is available concerning the status of the transfected reporter DNA in transient transfection assays (14), other experiments (e.g. using natural « resident » LAZ3/BCL6 target genes) are needed to clarify this important question for LAZ3/BCL6 but also for other nuclear regulatory BTB/POZ proteins.

Materials and Methods

Cell culture. COS-1 cells (SV40-transformed monkey kidney cells) and mouse C2 myoblasts (41) were maintained in Dulbecco modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. Mouse NIH3T3 fibroblasts were maintained in the same medium supplemented with 10% newborn calf serum. All these cell cultures were routinely maintained at 37° C in a H₂O-saturated 5% CO₂ atmosphere.

Plasmids constructions.

Reporter plasmids

TGx3-tk-CAT

To construct the TGx3-tk-CAT reporter plasmid, we used the recently determined LAZ3/BCL6-binding site 5'TGCTTTCTAGGGAT3' termed the « TG » sequence (20). PCR amplification was performed using as a target a single strand oligonucleotide (Eurogentec) containing 3 copies of this LAZ3/BCL6 consensus binding-site (bold letters):

5'AAGCTTGCTTTCTAGGGATTTTGCTTTCTAGGGATTTTGCTTTCTAGGGATG

GATCC3' and the two following oligonucleotides: primer 1 5'TCACGATGCG<u>AAGCTTGC3'</u> which contains a suitable *Hind*III restriction site (underlined) and primer 2 5'ACGGTGCAGT<u>GGATCCAT3'</u> which contains a suitable *Bam*HI restriction site (underlined). The PCR products of correct size were gel-purified then cloned into PCRII vector (In vitrogen), and verified by sequence analysis before cloning upstream of a viral tk minimum promoter into the *Hind*III-*Bam*HI digested pBLCAT2 reporter plasmid (42).

5xGAL4-tk-CAT

The 5xGAL4-tk-CAT reporter plasmid has been previously described (43).

Effector plasmids

Full-length LAZ3/BCL6 (1-706)

A complete LAZ3/BCL6 cDNA clone was isolated from a 5' RACE human skeletal muscle cDNA library inserted into the plasmid vector pcDNAI (Clontech). A *XhoI* fragment containing all the coding sequence flanked by some 5' and 3' untranslated sequences was then subcloned into the SV40-based expression vector pTL1 (a kind gift of T. Lufkin and B. Wasylyk).

13

△ BTB/POZ (132-706)

The BTB/POZ domain corresponds to about the first 130 amino acids of LAZ3/BCL6. Translation of the Δ BTB/POZ deletion mutant is initiated on the natural methionine codon corresponding to the residue 132. It was constructed by PCR using the two following oligonucleotides: primer 3: 5'GGGAATT<u>CCACCATGGTTTCTGCCATC3'</u> which contains the coding sequence for residues 132 to 136 flanked by an optimized Kozak's consensus sequence (underlined), and primer 4: 5'GTACTCACCAGGGACTGGCCT3' which corresponds to the sequence encoding the residues 236-242 and includes a unique *PfI*MI restriction site. After cloning into the pCRII vector and verification by sequence analysis, a suitable subclone was digested by *Kpn*I and *PfI*MI and used to replace the corresponding fullength fragment in the pTL1 LAZ3/BCL6 clone.

∆1-271

The coding region of the LAZ3/BCL6 corresponding to amino-acids 271-706 was isolated as a partial cDNA clone (M47 in ref. (2)) and the resulting *EcoRI* fragment was cloned in the correct orientation in the pTL1 vector.

Construction of the GAL4 (1-147) fusion proteins. The GAL4 chimeras were constructed by cloning various PCR products in frame of the DNA-binding domain (1-147) of the yeast GAL4 regulator using the pSG424 vector (44). All the PCR products were cloned into the *BamHI/SacI* pSG424 digested vector and verified by sequence analysis using internal LAZ3 primers. For all the PCR amplifications, we used as a template the LAZ3 cDNA isolated from a 5' RACE human skeletal muscle cDNA library inserted into the plasmid vector pcDNAI (Invitrogen).

GAL4-BTB/POZ

The PCR amplification generating the BTB/POZ fragment was carried out with the two following oligonucleotides: primer 5: 5'CATG<u>GATCCC</u>GCAAGGCATTGGTGAAGAC3' localized just upstream the first methionine and including a unique *Bam*HI restriction site (underlined) and primer 6: 5'<u>CTCGAGCTCAGTGGCAGGTTGTTC3'</u> which contains the

sequence encoding the residues 165 to 170 followed by a termination stop codon and a unique SacI restriction site (underlined).

$GAL4-LAZ \Delta Zn(1-500)$

The PCR amplification generating the $\Delta Zn(1-500)$ insert was realized using primer 5 and primer 7: 5'CAA<u>GAGCTC</u>CTCAGGGAACGTGG3' which corresponds to the coding sequence for residues 496 to 500 followed by a termination stop codon and a unique *Sac*I restriction site (underlined).

Immunoprecipitation analyses. 3µg of the expression vector (pSG424 or pTL1) encoding the various constructs were transfected in COS-1 cells at 50 to 70% of confluency in 100 mm dishes using the lipofectamine reagent (BRL) following the instructions of the manufacturer. After 48h, the cells were cysteine- and methionine-starved for 45 min and incubated with 200µCi of (³⁵S) methionine/cysteine trans-label reagent (ICN) for 2h. Cells were next lysed in 1ml of RIPA buffer (Tris-HCL 10mM pH 7.4, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Triton X100 1%, Sodium Desoxycholate 0.5%, Aprotinin 0.5%, SDS 0.1%). 20x10⁶ c.p.m of each radiolabelled lysates were immunoprecipitated by a 3 hours incubation at 4°C using either protein G Sepharose (Pharmacia) plus a mix of two anti-GAL4 monoclonal antibodies ((45) generously provided by Drs P.Chambon and Y. Lutz) or protein A agarose (Boerhinger) plus a polyclonal anti-LAZ3/BCL6 antibody. Proteins were then analyzed on a polyacrylamide gel followed by fluorography.

Chloramphenicol acetyl transferase (CAT) assays. 0.5µg of the expression vectors (either empty or encoding the various constructs) were cotransfected with 2 µg of the appropriate reporter vector (5xGAL4-tk-CAT or TGx3-tk-CAT) in C2 and NIH3T3 cells. The cells were transfected at about 30 to 50% of confluency in 60 mm dishes using the lipofectamine reagent (GIBCO-BRL) and harvested 48h later in the Promega Lysis Buffer. Luciferase and CAT activities were determined as previously described (43). All the transfections were carried out at least five times in C2 cells and at least two times in NIH3T3 cells using two or more plasmid preparations (Qiagen) and normalized to the luciferase activity of a cotransfected pSVluc

15

vector $(0.5\mu g)$ to correct for variation in transfection efficiency. The rates of the acetylation were determined using a phosphorimager (Molecular Dynamics). Standard variations were routinely below than 20%.

Gel mobility-shift assays. The binding reaction was set up in a total volume of 20µl with 1µl of 100pg double-stranded end labelled "TG-probe" (20), 1µl of poly (dIdC) (3mg/ml), 1-3µl of reticulocyte lysate (Promega TNT) to have equivalent amounts of polypeptides in each reaction, and 5-15 µl of SB Buffer (50mM NaCl, 20mM Hepes (pH 7.9), 5mM MgCl₂, 0,1mM EDTA, 20% glycerol, 1mM DTT) containing 5µM ZnCl₂. The reaction mixture was incubated on ice for 90 min and then protein-DNA complexes were resolved by a 5% polyacrylamide/TBE0.5X gel electrophored for 90 min at 150 V in a TBE0.2X buffer at room temperature. The gel was then dried under vacuum at 80°C and autoradiographied. For competition experiments, incubations were performed with a 100 fold excess of unlabelled oligonucleotide.

Northern-blot analysis. Total RNA of about 10^7 C2 and NIH3T3 cells was harvested. 20 µg of total RNA were run on a denaturing formaldehyde agarose gel and subjected to Northernblot analysis as previously described (46). A complete LAZ3/BCL6 cDNA (2) was used as a probe and labelled with the « redi-prime » labelling kit (Amersham), following the instructions of the manufacturer.

References

1. Klug, A. and Schwabe, J.W.R. Zinc fingers, FASEB J., 9: 597-604, 1995.

2. Kerckaert, J.P., Deweindt, C., Tilly, H., Quief, S., Lecoq, G. and Bastard, C. LAZ3, a novel zinc finger encoding gene, is disrupted by reccuring translocations in human lymphomas. Nature Genet., 5: 66-70, 1993.

3. Ye, B.H., Lista, F., Lo Coco, F., Knowles, D.M. Offit, K., Chaganti, R.S.K. and Dalla-Favera, R. Alterations of a zinc-finger encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma Science, 262: 747-750, 1993.

4. Baron, B., Nucifora, G., McNabe, N., Espinosa, R., LeBeau, M.M. and McKeithan, T.W. Identification of a gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3; 14)(q27; q32) and t((3; 22) (q27; q11) in B-cell lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5262-5266, 1994.

5. Miki, T., Kawamata, N., Hirosawa, S., Aoki, N. Gene involved in the 3q27 translocation associated with B-cell lymphoma, BCL5, encodes a Krüppel-like zinc finger protein. Blood, 83: 26-32, 1994.

6. Migliaza, A., Ye, B.H., Martinotti, S., Fusco, C., Offit, K., Chaganti, R.S.K. and Dalla-Favera, R. Mutations of the 5' non-coding region of BCL-6 in non-Hogkin lymphoma. Blood, 84, supp. 1: 41a, 1994.

7. Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq and Leprince, D. The.BTB/POZ domain : a new protein/protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins Cell Growth & Differentiation, 6, 1193-1198, 1995.

8. Bardwell, V. and Treisman, R. The POZ domain : a conserved protein-protein interaction motif. Genes & Dev., 8: 1664-1677, 1994.

9. Zollman, S., Godt, D., Privé, G.G., Couderc, J.L. and Laski, F. The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 10717-10721, 1994.

10. Cooley, L. and Theurkauf, W.E. Cytoskeletal functions during *Drosophila* oogenesis. Science, 266: 590-596, 1994.

11. Jongens, T.A., Ackerman, L.D., Swedlow, J.R., Jan, L.Y. and Yan, Y.N. Germ cell-less encodes a cell-specific nuclear pore associated protein and function early in the germ-cellspecification pathway of *Drosophila*. Genes & Dev., 8: 2123-2136, 1994.

12. Dorn, R., Kraus, V., Reuter, G. and Saumweber, H. The enhancer of position-effect variegation of *Drosophila*, *E(var)3-93D*, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcriptional regulators. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *90*: 11376-11380, 1994.

13. Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H. and Karch, F. The *trithorax-like* encodes the Drosophila GAGA factor, Nature, *371*: 806-808, 1994.

14. Granok, H., Leibovitch, C.D., Shaffer, C.D. and Elgin, S.C.R. Ga-ga over GAGA factor Current Biology, 5: 238-241, 1995.

15. Chen, W., Zollman, S., Couderc, J.L. and Laski, F.A.. The BTB domain of *bric à brac* mediates dimerization *in vitro*. Mol. Cell. Biol., 6: 3424-3429, 1994.

16. Chen, Z., Guidez, F., Rousselot, P., Agadir, A. Chen, S.J., Wang, Z.Y., Degos, L., Zelent, A., Waxman, S. and Chomienne, C.PLZF-RAR α fusion proteins generated from the variant t(11; 17) (q23; q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild type retinoic acid receptors. Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 1178-1182, 1994.

17. Cattoretti, G., Chang, C-C., Cechova, C., Zhang, J., Ye, B.H., Falini, B., Loula, D.C., Offit, K., Chaganti, RSK. et Dalla-Favera., R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. Blood, 86: 45-53, 1995.

18. Otsuki, T., Yano, T., Clark, H.M., Bastard, C., Kerckaert, J.P., Jaffe, E.S. and Raffeld, M. Analysis of LAZ3/BCL6 status in B-cell non-Hodgkin' s lymphomas : results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. Blood, 85: 2877-2884, 1994.

19. Baron, B.W., Stanger, R.R., Hume, E., Sadhu, A., Mick, R., Kerckaert, J.P., Deweindt, C., Bastard, C., Nucifora, G., Zeleznick-Le, N. and McKeithan, C.W. BCL6 encodes a sequence-specific DNA-binding protein. Gene Chrom. Cancer, in press.

20. Kawamata, N., Miki, T., Ohasi, K., Suzuki, K., Fukuda, T., Hirosawa, S. and Aoki, N. Recognition DNA sequence of a novel putative transcription factor, BCL6. Bioch. Biophys. Res. Com., 204: 366-374, 1994.

21. Numoto, M., Niwa, O., Kaplan, K.K., Wong, K.K, Merell, K., Kamiya, K., Yanagihara, K. and Calame, K. Transcriptional repressor ZF5 identifies a new conserved domain in zinc finger proteins, Nucleic Acids Res. 21: 3767-3775, 1993.

22. Jaynes, J.B. and O' Farell, P.H. Active repression of transcription by the *Engrailed* homeodomain protein. EMBO J. 10: 1427-1433, 1991.

23. Cowell, I.G. Repression versus activation in the control of gene transcription. Trends Biochem. Sci.: 19: 38-42, 1994.

24. Han, K. and Manley, J.L. Transcriptional repression by the *Drosophila even-skipped* protein : definition of a minimal repression domain. Genes & Dev., 7: 491-503, 1993.

25. Madden, S.L., Cook, D.M., Morris, J.F., Gashler, A., Sukathme, V.P.and Rausher, F.J. Transcriptional repression by the WT1 Wilms tumor gene product. Science, 253, 1550-1553, 1991.

26. Madden, S.L., Cook, D.M. and Rauscher, F.J. A structure-function analysis of transcriptional repression mediated by the WT1, Wilm's tumor supressor protein. Oncogene, 8: 1713-1720, 1993.

27. Robbins, P.D., Horowitz, J.M. and Mulligan, R.C. Negative regulation of human *c-fos* expression by the retinoblastoma gene product. Nature, *346*: 668-671, 1990.

28. Alkema, M.J., van der Lugt, N.M.T., Bobeldijk, R.C., Berns, A. and van Lohuizen, M. Transformation of axial skeleton due to overexpression of *bmi*-1 in transgenic mice. Nature, 374: 724-727, 1995.

29. Bunker, C.A. and Kingston, R.E. Transcriptional repression by *Drosophila* and mammalian *Polycomb group* proteins in transfected mamalian cells. Mol. Cell. Biol. 14: 1721-1732, 1994.

30. Brown, J.L. and Wu, C. Repression of *Drosophila* pair-rule segmentation genes by the ectopic expression of tramtrack. Development, 117: 45-58, 1993.

31. Liu, Q., Shalaby, F., Puri, M.C., Tang, S., Breitman, M.L. Novel zinc-finger proteins that interact with the mouse γ F-crystallin promoter and are expressed in the sclerotome during early somitogenesis. Dev. Biol., *165*: 165-177, 1994.

32. Li, J.Y., English, M.A., Bisht, S., Waxman, S. and Licht, J.D. DNA-binding and transcriptional regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. Blood, 84, supp. 1: 41a, 1994.

33. Turner, C.A., Mack, D.H. et Davis, M.M. Blimp-1, a novel zinc-finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. Cell, 77, 297-306, 1994.

34. Sauer, F., Fondell, J.D., Ohkuma, Y., Roeder, R.G. and Jäckle, H. Control of transcription by Krüppel through interactions with TFIIB and TFIIEβ. Nature, *375*: 162-164, 1995.

35. Pengue, G., Calabro, V., Cannada Bartoli, P., Pagliuca, A. and Lania, L. Repression of transcriptional activity at a distance by the evolutionarily conserved KRAB domain present in a subfamily of zinc finger protein. Nuc. Acids Res. 22: 2908-2914, 1994.

21

36. Margolin, J., Friedman, J.R., Meyer, W.K.H., Vissing, H., Thiesen, H.J. and Rausher, F.J. *Krüppel*-associated boxes are potent transcriptional repression domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 4509-4513, 1994.

37. Wtzgall, R., O'Leary, E., Leaf, A., Onaldi, D. and Bonventre, J.V. The Krüppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc-finger proteins mediates transcriptional repression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91: 4514-4518, 1994.

38. Roberts, S.G.E. and Green, M.R. Dichotomous regulators. Nature, 375, 105-106, 1995.

39. Lmee, T.C., Zhang, Y. and Schwartz, R.J. Bifunctional transcription properties of YY1 in regulating muscle actin and *c-myc* gene expression during myogenesis. Oncogene, 9: 1047-1052, 1994.

40. Orlando, V. and Paro, R. Chromatin multiprotein complexes involved in the maintenance of transcription patterns. Current Opinion in Genetics and Development, 5: 174-179, 1995.

41. Yaffé, D. and Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. Nature, 270: 725-727.

42. Shi, Y.E., Seto, L.S., Chang, and Shenk, T. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-*krüppel* related protein and relief of repression by adenovirus E1A protein. Cell, 67: 377-388, 1991.

43. Albagli, O., Soudant, N., Ferreira, E., Dhordain, P., Dewitte, F., Bègue, A., Flourens, A., Stéhelin, D. and Leprince, D. A model for the evolution of *ets-1/ets-2* transcription factors based on structural and functional homologies. Oncogene, 9: 3259-3271, 1994.

44. Sadowski, I. and Ptashne, M. A vector for expressing GAL(1-147) fusions in mammalian cells. Nuc. Acids Research, 17: 7539, 1989.

45. White, J., Brou, C., Wu, J., Lutz, Y., Moncollin, V. and Chambon, P. The acidic transcriptional activator GAL-VP16 acts on preformed template-committed complexes. EMBO J., 11: 2229-2240, 1992.

46. Mestdagh, N., Collyn d'Hooghe, M., Lantoine, D. et Hénichart, J.P. Expression of a tumor supressor gene and of various protooncogenes in human and murine adriamycin-resistant and sensitive cell lines. Int. J. Oncology, 6: 1255-1260, 1995.

Legends to figures.

Figure 1. The full-length LAZ3/BCL6 specifically binds to the TG sequence in vitro. Shown is gel-shift analysis of pTL1 encoding proteins produced in rabbit reticulocyte lysates using the TG sequence as a probe for each assay (20).

lane 1 : probe alone; lane 2 : empty expression vector, pTL1 (Control, Co); lane 3: empty expression vector plus a 100 fold molar excess of cold competitor; lane 4 : full-length LAZ3/BCL6 protein; lane 5: full-length LAZ3/BCL6 protein plus a 100 fold molar excess of cold competitor; lane 6 : LAZ3/BCL6 Δ BTB/POZ protein ; lane 7: LAZ3/BCL6 Δ BTB/POZ protein plus a 100 fold molar excess of cold competitor. Arrows indicate the specific bindings.

Figure 2. Both C2 and NIH3T3 cells express the LAZ3/BCL6 mRNA. Northern blot analysis was performed on 20 μ g of total RNAs isolated from C2 and NIH3T3 cells and probed with a radiolabeled LAZ3/BCL6 cDNA (2). The ribosomal RNAs were used as size markers.

Figure 3. The LAZ3/BCL6 gene encodes a transcriptional repressor. A) Shematic drawing of the various expression and reporter constructs used for the transient transfection experiments. Three copies of the LAZ3/BCL6 binding sites (TG sequence (20)) were cloned upstream of the tk minimal promoter in the pBLCAT vector (42), referred to as «tk-CAT » reporter. B) C2 cells were transiently transfected using the lipofectamine reagent. CAT activities of the resulting experiments were corrected to the luciferase activities of a cotransfected pSVluc vector. A typical autoradiogram is presented. « - » referred to as the empty expression vector (pTL1). The percentages of acetylation were calculated using a phosphorimager analysis. C) The average of at least five experiments in C2 cells were plotted. 1: pBLCAT plus pTL1; 2: TG3x-tk-CAT plus pTL1; 3: TG3x-tk-CAT plus LAZ3/BCL6; 4: TG3x-tk-CAT plus Δ BTB/POZ; 5: TG3x-tk-CAT plus Δ 1-271. The results of the transient transfections were highly reproducible, giving routinely a standard variation bellow than 20 %.

D) The LAZ3/BCL6-mediated repression strictly requires the presence of its binding-sites in C2 cells as it is totally inefficient on the parental pBLCAT vector (referred to as tk-CAT). « - » referred to as the empty expression vector (pTL1). E) Lysates of COS-1 cells transfected with 3 μ g of each expression vector were subjected to an immunoprecipitation analysis, demonstrating that each construct produces a stable protein at the expected size *in vivo*. « - » referred to as mock-transfected COS-1 cells. Arrows indicate the bands at the expected sizes. Note that in these cells, a small amount of endogenous LAZ3/BCL6 protein is also detected.

Figure 4. The LAZ3/BCL6 BTB/POZ domain is a strong transferable repression domain. A) Shematic drawing of the GAL4 (1-147) fusion proteins used for the transient transfection experiments. All the constructs were cloned in frame into the pSG424 expression vector encoding the DNA-binding domain (1-147) of the yeast GAL4 activator (44). The reporter used was constructed by inserting five copies of the GAL4 binding-sites upstream of the tk promoter in the pBLCAT vector (5xGAL4-tk-CAT (43)). B) C2 cells were transiently transfected using the lipofectamine reagent. CAT activities of the resulting experiments were corrected to the luciferase activities of a cotransfected pSVluc vector. A typical autoradiogram is presented. The percentages of acetylation were calculated using a phosphorimager analysis. C) The average of at least five experiments using the 5xGAL4-tk-CAT as a reporter in C2 cells were plotted. 1: pSG424; 2: GAL4-BTB/POZ; 3: GAL4-LAZAZn(1-500). The results of the transient transfections were highly reproducible, giving routinely a standard variation bellow than 20 %. D) The repression mediated by the GAL4-BTB/POZ and GAL4-LAZ Δ Zn(1-500) requires the presence of the GAL4 binding-sites in C2 cells as the fusion-proteins display little activity on the parental pBLCAT vector (referred to as tk-CAT). E) Lysates of COS-1 cells transfected with 3 µg of each expression vector were subjected to an immunoprecipitation analysis, demonstrating that each construct produces a stable protein at the expected size in vivo. Arrows indicate the bands at the expected sizes.

Acknowledgements

We are indebted to Drs P. Chambon, Y. Lutz, T. Lufkin and B. Wasylyk for the generous gift of various reagents used in this study. The precious help of M.C. Duvieuxbourg for the photographies was also greatly appreciated. This work is supported by funds from INSERM; Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC); Ligue Nationale contre le Cancer; Comité du Nord; Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (IRCL) and Fondation pour la Recherche Médicale/MécénatBNP.

-152-



- ¹C. Deweindt and O. Albagli should be considered as equal first authors.
- ² To whom correspondance should be addressed.
- ³ M. Collyn d' Hooghe and D. Lantoine, unpublished observations.
- ⁴ O. Albagli, J.L. Couderc and D. Leprince, unpublished observations.

Deweindt et al. Egure 2 (Reinsed)



Deweindt et al. Figure 3



,

Α

Dewendhetal

Figure 3





Deweindt et al. Figure 3



D

-159-



Deweindheld

Figurey

-161-



В

¢



Deweindt et al. Figure 4

Deweineltet al

Figure 4



D

Deweindtet al

Figure 4





DISCUSSION

Nos travaux de thèse constituent la suite de notre travail de DEA, durant lequel nous avions caractérisé au niveau de la partie q27 du chromosome 3, une région de cassure fréquente, que nous avons nommée : **MTC** pour "*Major Translocation Cluster*". Les sites de translocations déterminés chez 9 des 12 patients alors étudiés, puis 13 sur 17, se regroupaient dans un fragment *Bam* H1-*Xba* I de 14 Kb. Actuellement, tous les groupes qui travaillent sur le même"*cluster*" de points de cassure s'accordent à penser que la majorité des translocations interviennent dans un fragment *Eco* R1 de 3,3 Kb. Il est cependant probable qu'il existe d'autres régions de points de cassure car certains patients, qui possèdent une anomalie dans la région 3q27, ne réarrangent pas dans ce MTC.

Initialement, l'équipe américaine de Mc Keithan (Baron *et al.*, 1993) avait identifié un transcrit de 11 Kb comme étant associé au gène impliqué dans les cas de LNH possédant une translocation en 3q27, puis l'équipe de Dalla-Favera (Ye *et al.*, 1993a) qui associa un transcrit de 2,4 Kb à ce gène. Finalement, une sonde PEE7.0 dérivée du chromosome 3, localisée à environ 10 Kb du MTC en 3q27, nous permit la détection d'un transcrit de 3,8 Kb d'expression ubiquitaire mais préférentielle dans le muscle squelettique.

Cette sonde nous permit le clonage du gène réellement associé à la translocation en 3q27: *LAZ3*. Ce gène fût ensuite également cloné par l'équipe de Dalla-Favera, puis plus récemment par une équipe japonaise (Miki *et al.*, 1994). Il fut nommé par ces autres équipes *BCL5*(Miki *et al.*, 1994) et *BCL6* (Ye *et al.*, 1993b).

I-LAZ3 facteur de bon ou de mauvais pronostic?

Nous avons (Bastard *et al.*, 1994), ainsi que d'autres, montré que les réarrangements de ce gène *LAZ3* représentent l'anomalie la plus fréquente associée aux Lymphomes Diffus à grandes Cellules (LDGC). Des études préalables sur *MYC* et sur *BCL2* avaient montré que ces deux gènes étaient réarrangés dans 5 à 20% et 20% respectivement parmi les LDGC (Chaganti et al., 1989). En comparaison de ces réarrangements qui associent plus communément *MYC* au Lymphome de Burkitt (LB) et *BCL2* au Lymphome Folliculaire (LF), les réarrangements de *LAZ3* sont dépistés dans 37% des LDGC (Bastard *et al.*, 1994), c'est donc l'anomalie spécifique récurrente majeure retrouvée parmi les LDGC.

A la suite d'une étude portant sur 217 patients, il semble que les réarrangements de *LAZ3* soient restreints aux lymphomes à cellules de type B puisque un seul des 39 patients immunologiquement caractérisés qui réarrangent *LAZ3*, présente un phénotype de type T.

Dans le groupe des lymphomes agressifs de type B, la fréquence totale des réarrangements de *LAZ3* est de 37%, ce qui est en accord avec les résultats publiés par Ye et al, (Ye *et al.*, 1993b). Dans le groupe des LF, C. Bastard *et al*, montrent que *LAZ3* présente des réarrangements dans 13% des LF, à la différence des résultats de Ye *et al.* qui n'observent pas d'altérations de *BCL6* parmi les 28 LF testés et de ceux de Lo Coco *et al.* qui, n'observent qu'un seul cas de LF avec un réarrangement de BCL6 (Lo Coco *et al.*, 1994).

La corrélation avec la cytogénétique révèle que 11 des 32 patients, présentant une anomalie en 3q27, ne présentent pas de réarrangements de *LAZ3*. Ceci nous permet de supposer soit l'existence d'un autre gène affecté, ou plus probablement une autre région de cassure, extérieure au MTC, non identifiée. Ceci nous indique aussi une sousestimation probable de la fréquence des réarrangements de *LAZ3* observés. Réciproquement, sur les 39 patients qui présentent un réarrangement de *LAZ3* détectable en "*southern blot*", 18 ne présentent pas d'anomalie cytogénétique visible de la région 3q27. Ces résultats montrent l'importance des détections moléculaires des réarrangements 3q27.

En considérant le fait que les réarrangements de LAZ3 peuvent être observés chez des patients qui présentent un LF au diagnostic et que cela ne semble pas affecter leur survie, il semble que LAZ3 ne puisse pas être associé à la progression clinique ou à la transformation histologique. Il ne semble donc pas possible de corréler les caractéristiques cliniques aux réarrangements de LAZ3 (Bastard et al., 1994). Ces résultats sont en contradiction avec ceux de l'équipe américaine de Dalla-Favera (Offit et al., 1994), qui observe que certains des marqueurs cliniques de pronostic favorable sont retrouvés parmi des patients qui présentent un LDGC avec un réarrangement de LAZ3. Les auteurs décrivent une association entre les réarrangements de BCL6 et un sous-type de LDGC avec une forte proportion de pathologies extranodulaires présentant une évolution favorable. Ils corrèlent donc les réarrangements du gène BCL6 avec un devenir clinique favorable parmi les LDGC (Offit et al., 1994). Plus récemment, sur un panel de 40 patients qui présentent un LNH associé au SIDA, Gaidano et al, montrent que 20% des patients présentent un réarrangement de BCL6 (Gaidano et al., 1995). En conclusion, jusqu'à présent nos études ne permettent pas de corréler les réarrangements de LAZ3 avec un pronostic favorable, mais, l'identification de ce gène comme premier marqueur spécifique des LDGC peut représenter un élément important dans le diagnostic et la surveillance de patients à hauts risques.

II- Mécanismes aboutissant à une dérégulation du gène LAZ3.

La dérégulation du gène *LAZ3* peut être comparée aux cas deLymphomes de Burkitt (LB), dans lesquels la partie 5' non codante du gène *MYC* est tronquée à la suite d'une translocation t(8;14) (Haydlay *et al.*, 1984). Or la surexpression du gène *MYC* dans les LB doit être expliquée par l'influence d'un "*enhancer*" des Ig retrouvé en cis, ou par des altérations structurales dans les régions 5' régulatrices de ce gène (Battey *et al.*, 1983; Dalla-Favera *et al.*, 1983).

- Les réarrangements du gène LAZ3 sont complexes.

Les trois translocations analysées, par les groupes de Chicago et New York, impliquaient la région switch μ des Ig. L'équipe japonaise a cloné la région 3q27 à partir d'un gène λ d'Ig et a aussi analysé trois cas de t(3;14,) tous porteurs d'un point de cassure dans la région JH.

Le malade LAR, qui nous a permis le clonage du point de cassure d'une translocation t(3;14) présente une translocation complexe. En fait, nous avons mis en évidence plusieurs jonctions dans le clone représentant le point de cassure sur le der 3.

1- Entre les segments J3 et une séquence inversée du même locus dans la partie variable VH3.

2- Entre cette jonction VH3-J3 et une séquence du chromosome 3q27.

Initialement, nous pensions que le clone contenant le point de cassure du patient LAR représentait le der 14, du fait de l'orientation des séquences JH. Après le clonage d'autres points de cassure dont une translocation t(3;22) impliquant les chaînes légères λ des Ig, nous nous sommes aperçus que nous ne pouvions expliquer la translocation t(3;14) qu'en considérant que ce clone représentait le der 3 avec la partie correspondante au chromosome 3, localisée en position centromérique et la portion 14q32 télomérique par rapport au point de cassure. Ceci nous permet donc d'orienter *LAZ3/BCL6* dans le sens 5'-3' : Télomère-Centromère : Tel-5'-LAZ3-3'-Cen.
- Mécanismes impliqués dans les réarrangements en 3q27.

Les mécanismes de recombinaison somatique des gènes des Ig font intervenir des réarrangements sites spécifiques au niveau des signaux héptamères-nonamères (Desiderio et al., 1984). En principe, selon la règle "12-23 mers" et pour respecter l'appariemment des signaux, un segment V ne peut se recombiner qu'avec un segment D et un segment D qu'avec un segment J. Le réarrangement illégitime V-J dans le cas LAR n'a pu s'effectuer que par inversion de V qui respecte ainsi, quasi parfaitement, l'appariement des séquences heptamères-nonamères de VH3 inv et J3. Cependant, comme on retrouve ces éléments heptamères-nonamères dans la séquence, il semble que la recombinase n'ait pas délété ces séquences lors de la jonction. D'autres cas d'inversion ont déja été décrits comme en 14q11 (Park *et al.*, 1992).

Cependant, il existe des cas de translocation qui n'impliquent pas les gènes des Ig, comme la translocation t(1,3,11) et la translocation t(3,4). D'autres séquences telles que les séquences "*chi-like*", dont le consensus est retrouvé à proximité des points de cassures sont probablement impliquées dans le mécanisme de la translocation (Kenter et Birshtein. 1981; Smith. 1983) et dans les délétions.

- Dérégulation du gène LAZ3.

Les résultats obtenus par la technique de *RACE* montrent l'existence de plusieurs transcrits de fusion et que la protéine issue de la translocation est entière de type sauvage et non fusionnée à d'autres domaines.

Il s'agit : 1) de transcrits de fusion entre les régions JH des gènes des Ig et le second exon non codant de LAZ3.

2) fusion entre les régions 5' du gène *TTF*, représentant un gène qui code une nouvelle petite protéine G de la super-famille RAS, d'expression spécifique des cellules hématopoïétiques, avec l'exon 2 de *LAZ3*.

3) dans le cas de la translocation t(1,3,11), d'une fusion entre le second exon du gène *LAZ3* et les régions 5' d'un gène nommé *TOTE* (Galiègue-Zouitina *et al.*, soumis) dont l'expression est spécifique des cellules B.

Récemment, l'équipe de Dalla- Favera (Miggliazza *et al.*, 1994), par une étude en PCR-SSCP, montre que de la région 5' non codante comprenant le MTC de *LAZ3* présente de fréquentes mutations : en considérant réarrangements et mutations, plus de 80% des LDGC et 40% des LF sont affectés. Les auteurs proposent que les mutations de la région

5' non codante de *LAZ3* participe à la génèse des lymphomes. Nous possédons un cas, VAL, qui présente un allèle transloqué et l'autre allèle délété de 2,4 Kb, au niveau du premier intron de LAZ3, dans la région MTC. Un autre cas, GUI, présente trois petites délétions de 22, 25, et 101 paire de bases dans la région MTC, l'autre allèle étant absent. Il est donc envisageable que ces délétions jouent un rôle essentiel dans la dérégulation de LAZ3.

Plusieurs mécanismes paraissent donc susceptibles de déréguler le gène LAZ3.

- Soit par perte du premier exon 1A.

- Soit par délétion des séquences régulatrices situées en 5' de ce gène et dans le MTC et utilisation des séquences promotrices du locus des Ig.

- Soit encore par fusion avec des séquences régulatrices d'autres gènes que ceux des Ig, correspondant à des promoteurs hétérologues.

Récemment Otsuki *et al.* ont étudié les réarrangements, l'expression et les mutations des régions codantes du gène *LAZ3* (Otsuki *et al.*, 1995). Ils ont identifié 2 polymorphismes: l'un au niveau ducodon 415 (T ou C), l'autre en 3' du codon de terminaison (G ou A) qui ne change pas les acides aminés, mais ils n'observent pas de différence entre les allèles réarrangés et les allèles non réarrangés. Finalement, Otsuki *et al* considèrent que l'altération de l'activité biologique de LAZ3 à travers des mutations, au niveau des régions codantes de ce gène, ne représente pas un mécanisme responsable de son activité oncogénique.

Une étude par immunoprécipitation (Dhordain *et al.*, 1995), utilisant deux anticorps polyclonaux, montre que la taille de la protéine LAZ3 est normale dans les deux lignées VAL et Karpas 231. La protéine ne doit pas être altérée car le point de cassure est situé en dehors du cadre ouvert de lecture. Otsuki et al., en 1995 ont réalisé une étude sur d'autres lignées et obtiennent le même résultat.

Cependant, il est important de noter que le taux de protéine LAZ3, observé en immunoprécipitation, est similaire entre les lignées cellulaires réarrangées et non réarrangées pour LAZ3. Ceci suggère que le réarrangement dans cette région 3q27 n'induit pas une dérégulation forte de son expression. Bien que les résultats obtenus par immunoprécipitation ne soient pas entièrement quantitatifs, ces données sont cependant en accord avec les observations préalables effectuées sur le taux d'ARNm (Otsuki *et al.*, 1995). Des expériences actuellement en cours et réalisées en collaboration étudient par *western blot* le taux de protéine dans ces différentes lignées. On est donc amené à penser que des variations faibles d'expression de LAZ3, non détectées ni en *northern* ni en immunoprécipitation, pourraient jouer un rôle dans la lymphomagenèse.

III- LAZ3, un facteur de transcription diffusible "classique" et/ou un facteur modulant l'architecture et la condensation de la chromatine?

- Localisation sub-cellulaire de la protéine LAZ3, dépendante du domaine BTB/POZ.

Des études en immunofluorescence ont été réalisées afin de déterminer la localisation sub-cellulaire de la protéine LAZ3. Les résultats obtenus sur des cellules transfectées avec le facteur LAZ3 montrent la capacité potentielle de cette protéine à former des structures nucléaires discrètes, structures de forme et de taille variables. Cette localisation nucléaire ponctuée est dépendante du domaine BTB/POZ. En effet, on observe aussi bien des petits points que des structures en anneau de plus grande taille. Il semble donc que LAZ3 possède la capacité à former des agrégats nucléaires discrets, qui pourrait être directement reliée à l'activité de cette protéine.

D'autres protéines présentent en transfection transitoire, dans des cellules COS-1 ou HeLa, une localisation nucléaire ponctuée qui présente de fortes ressemblances avec celle observée avec la protéine LAZ3. Il s'agit en particulier de deux protéines de type RING finger : PML et ICP0 (une protéine virale précoce de HSV qui permet une augmentation de l'expression des gènes viraux) (Gelman etSilverstein. 1987; Kastner *et al.*, 1992; Daniel *et al.*, 1993; Dyck *et al.*, 1994; Koken *et al.*, 1994). La localisation nucléaire ponctuée de la protéine PML, qui présente également une localisation parfois cytoplasmique, fut confirmée par des expériences permettant la détection de la protéine endogène (Daniel *et al.*, 1993; Maul *et al.*, 1993; Dyck *et al.*, 1994; Koken *et al.*, 1994; Koken *et al.*, 1994; Lavau et Dejean. 1994; Weis *et al.*, 1994).

La protéine PML co-localise, dans des sous-structures nucléaires, avec une protéine dénommée Sp100 dont la fonction est inconnue, dans ce qui fut appelé POD (pour PML Oncogenic Domain) ou encore NB (pour Nuclear Bodies) corps nucléaires. Comme dans le cas de la protéine LAZ3, ces structures "gonflent" avec l'expression forcée de protéine exogène (Koken *et al.*, 1994).

PML présente également une co-localisation avec ICPO dans ce qui est appelé des

ND10 (pour Nuclear Domain) (Maul *et al.*, 1994). Ces ND10 pourraient correspondre à des sites spécifiques de transcription, impliqués dans la régulation de la transcription (Xie *et al.*, 1993)

On peut donc penser que les sous-structures nucléaires observées avec la protéine LAZ3 pré-existent dans la cellule et que dans les cellules où cette protéine est surexprimée par transfection, elles augmentent en taille et deviennent détectables.

- La localisation sub-cellulaire de la protéine LAZ3 est-elle le reflet de la fonction biologique de ce facteur ?

On observe de plus en plus de fonctions nucléaires qui sont associées à des sousstructures nucléaires spécialisées et discrètes.

L'une de ces fonctions essentielles, associées à des agrégats protéiques, concerne la capacité de certains complexes protéiques à réaliser des "frontières" entre chromatine "ouverte" (euchromatine) et chromatine "fermée" (hétérochromatine). Les protéines de Drosophile du groupe *polycomb* (PcG) sont capables d'induire une "hétérochromatinisation" locale, rendant ainsi silencieux un certain nombre de régulateurs du développement, spécifiques des gènes homéotiques (Paro, 1993).

Des études d'immunoprécipitation ont montré que les protéines polycomb (Pc) et polyhoméotiques (Ph), deux membres du PcG, étaient les constituants d'un complexe multimérique soluble. Ils possèdent tous les deux la même distribution spatiale et la même localisation sur le chromosome polytène. Francke *et al.* proposent en 1992, que ces complexes multimériques interviennent pour réprimer de façon stable des gènes comme les régulateurs homéotiques (Francke *et al.*,1992). Ces facteurs possèdent le même domaine protéique nommé chromobox ou chromodomaine qui, comme le domaine BTB/POZ, est essentiel à la localisation nucléaire ponctuée du facteur Pc (Messner *et al.*, 1992). Un certain nombre de données suggèrent également que certaines protéines BTB/POZ pourraient induire une condensation locale de la chromatine, comme cela est fortement suggéré par les ressemblances entre PcG et des mutations du gène *bab* (qui code une protéine BTB/POZ de drosophile).

Parmi les facteurs qui présentent une localisation nucléaire sous forme d'agrégats, on trouve donc, d'une part des membres du groupe PcG, qui sont responsables d'une "hétérochromatinisation", condensation locale de la chromatine liée à la non expression des régulateurs homéotiques et, d'autre part des facteurs protéiques BTB/POZ de drosophile, comme GAGA et E(var)3-93D qui, quant à eux, sont liés à une décondensation locale de la chromatine. Ces facteurs sont donc responsables de l'effet inverse des membres précèdemment décrit du PcG. Il créent une décondensation de la chromatine, des mutations des gènes qui codent ces facteurs conduisent à l'activation de la **PEV** (*Position Effect Variegation*) (Henikoff. 1990; Dorn *et al.*, 1993; Farkas *et al.*, 1994)

GAGA est une protéine à doigts de zinc, membre du groupe *trithorax* (Trx-G), qui, à l'inverse des membres du groupe PcG, sont nécessaires à l'expression des gènes homéotiques des deux complexes *Bithorax* (Bx-C) *et Antenapedia* (Ant-C). GAGA, codé par le membre trithorax-like (tr-l) du Trx-G, est impliqué dans le modelage de la chromatine en maintenant des régions "ouvertes" accessibles aux facteurs de transcriptions diffusibles classiques (Granok *et al.*, 1995).

Cette propriété peut également être étendue à un autre facteur protéique du type BTB/POZ récemment cloné : le produit du gène E(var)3-93D. La distribution chromosomique de E(var)3-93D confirme son association avec certaines des régions les moins condensées (Dorn *et al.*, 1993).

En réalité, ces deux seules protéines, qui jusqu'à ce jour ont pu être impliquées dans la décondensation de la chromatine, ont pour seul point commun, un domaine BTB/POZ. Ce qui suggère que ce domaine puisse être requis pour l'activité de ces deux protéines sur la chromatine, probablement en permettant la formation d'agrégats protéiques qui agissent à une grande distance (Albagli *et al.*, 1995).

En conséquence, il semble que les protéines BTB/POZ, qui possèdent la capacité à former des sous-structures nucléaires, telles que LAZ3, ne sont pas forcément des facteurs de transcriptions "classiques" diffusibles, mais apparaissent plutôt comme des modulateurs de la condensation de la chromatine. Grâce à la formation de complexes macromoléculaires, ils contrôleraient l'architecture de la chromatine en modulant sa condensation-décondensation, et participeraient donc à l'activation ou l'inactivation de gènes cibles, à travers des interactions spécifiques avec l'ADN.

- LAZ3 : un répresseur transcriptionnel, une fonction dépendante du domaine BTB/POZ ?

Le fait que plusieurs protéines BTB/POZ agissent comme des régulateurs de la condensation de la chromatine permet d'expliquer un certain nombre de données incomprises. Comme par exemple, dans le cas de la protéine ZID (Bardwell et Treisman. 1994), le fait que la fusion de cette protéine au transactivateur fort VP16, ZID-VP16, fasse perdre l'activité transactivatrice de VP16, en transfection transitoire. Comme pour son effet inhibiteur sur le domaine de fixation à l'ADN de la protéine ZID, ce domaine BTB/ POZ supprimerait la diffusion libre de cette protéine ainsi que de ces partenaires, ce qui s'opposerait à ses activités en transfection transitoire. C'est probablement ce qui se passe au niveau de l'inhibition RAR/RXR par PML/RAR α et peut-être aussi dans le cas de PLZF/RAR α .

Nous avons examiné les propriétés du facteur LAZ3 en tant que facteur de transcription. Outre son domaine BTB/POZ, la protéine LAZ3 possède en effet plusieurs caractéristiques de facteur de transcription, notamment un domaine à 6 doigts de zinc de type *Krüppel* dans sa partie carboxy-terminale.

Afin de mieux caractériser les propriétés de fixation à l'ADN de cette protéine, nous avons recherché, en collaboration avec l'équipe de Mc Keithan, une séquence cible nucléotidique. Il fut montré, à la suite de cette étude, que le motif des doigts de zinc de LAZ3 reconnaissait une séquence spécifique de fixation à l'ADN (Baron *et al.*, 1995; Kawamata *et al.*, 1994b). Cette séquence nous donne assez peu de renseignements sur les cibles de LAZ3. On retrouve cependant ce consensus parmi plusieurs génomes viraux et dans les régions 5' régulatrices du gène de la *glucokinase*, au niveau du gène qui code une protéine inhibitrice, la leukoprotéase sécrétrice, ainsi que dans les régions introniques du gène de la *dystrophine* (Kawamata *et al.*, 1994b).

En outre, nous avons testé les capacités de la protéine LAZ3 à fixer sa cible nucléique. Les résultats que nous avons obtenus avec la protéine LAZ3 sont beaucoup moins tranchés que ceux publiés avec la protéine BTB/POZ ZID mais n'en sont malgré tout pas trop éloignés. En effet, en retard sur gel avec l'oligonucléotide cible nucléique de LAZ3, il semble que la protéine LAZ3 entière conserve sa capacité à fixer l'ADN même si cette fixation semble plus faible que la protéine LAZ3 délétée de son domaine N-terminal BTB/POZ. De plus, une construction, qui contient le domaine BTB/POZ du facteur LAZ3 en fusion avec la séquence codante pour le transactivateur VP16, ne semble pas perdre ses capacités transactivatrices en transfection transitoire. Même si l'effet visualisé est légèrement réduit, il reste malgré tout significatif, contrairement à ce qui est observé dans le cas du facteur ZID (Bardwell et Treisman. 1994).

D'autres protéines nucléaires possédant un domaine de type BTB/POZ présentent des fonctions similaires. Certaines semblent plutôt fonctionner comme des facteurs de

transcription classiques. Elles ont d'ailleurs été clonées grâce à leurs propriétés à se fixer à l'ADN et elles possédent des propriétés trans-activatrices ou trans-répressives.

Le facteur clone 18, (Sugawara *et al.*, 1994) par exemple, code une protéine contenant des doigts de zinc de type C2H2 dans sa partie carboxy-terminale et possède une région amino-terminale de type BTB/POZ. Il fut cloné à partir d'une banque d'ADNc de cellules B humaines, grâce à ses propriétés de fixation aux éléments régulateurs du gène DPA du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH de classe II). Clone 18 semble fonctionner de façon classique et possède un domaine activateur, localisé entre le domaine BTB/POZ et les doigts de zinc. Chez les vertébrés, le répresseur transcriptionnel ZF5 (Numoto *et al.*, 1993) fut également cloné grâce à sa capacité à fixer l'ADN et son activité fonctionnelle sur les régions régulatrices du gène *MYC*. Un autre exemple est représenté par le gène γ FBPde souris qui code une protéines codées par ce gène γ FBP-B possède des fonctions trans-répressives sur les cellules du cristallin (Liu *et al.*, 1994).

Nous avons donc testé les capacités de la protéine LAZ3/BCL6 à réguler en trans sa séquence cible. Nous montrons en transfection transitoire que la protéine LAZ3/ BCL6 est un répresseur transcriptionnel actif, d'une part, en tant que protéine de type sauvage sur ces propres séquences, d'autre part, comme chimère GAL4. Il semble que le domaine BTB/POZ possède un rôle essentiel pour cet effet en constituant un domaine inhibiteur autonome et transférable.

Tous ces arguments semblent montrer que le facteur LAZ3 pourrait également posséder des fonctions de facteur de transcription plus "classique" qui dirigerait une activité trans-répressive.

- Le facteur LAZ3 : un modulateur de l'architecture de la chromatine et un trans-régulateur. Ambivalence liée aux effets multifonctionnels du domaine BTB/ POZ ?

Il semble de plus en plus que, non seulement ces deux propriétés ne soient pas mutuellement exclusives, mais qu'il existe plutôt une interdépendance entre elles.

Plusieurs protéines de type BTB/POZ possèdent ces deux types d'effets, transrégulateur local et modulateur distal. Il semble que ces propriétés soient liées par des mécanismes chevauchants qui tendent vers une seule et même fonction.

Cette ambivalence observée est très nette pour le régulateur de drosophile zeste. La protéine zeste présente la capacité à s'auto-agréger en complexes multimériques, composés parfois de plusieurs centaines de monomères et réalise également ces deux types d'effets. A faible portée, elle stimule le promoteur *Ubx*; à plus grande distance elle exerce un effet de transvection (capacité de certains éléments régulateurs sur un chromosome à affecter l'expression du gène homologue sur l'autre chromosome de la même paire). Cette activité repose sur un contrôle en cis et en trans de l'interaction physique et fonctionnelle. Des études réalisées, sur des mutants de cette protéine zeste, démontrent clairement que l'effet de transvection est altéré lorsque la capacité de cette protéine à s'auto-aggréger est diminuée, sauf dans le cas où on surexprime le mutant . Aucune altération n'est observée sur son effet à faible portée. L'effet à large portée de transvection serait une généralisation de l'action locale sur un promoteur. En fait, ces deux effets seraient simplement dûs à une différence dans la taille de l'agrégat protéique (Bickel et Pirrota. 1990).

Comme nous l'avons vu précédemment décrit, cette ambivalence est également observée dans le cas du facteur GAGA. Ce facteur permet la stimulation du promoteur *Krüppel* en agissant contre la répression dirigée par l'histone H1, et il crée des régions sans nucléosomes en se fixant au promoteur *hsp 70*. Dans ce cas, les effets à faible portée peuvent s'exercer en modulant les interactions entre histone H1 et l'ADN, localement ou à grande distance.

Cette ambivalence fonctionnelle est également observée dans le cas de facteurs comme TTK ou BR-C. En effet, la protéine TTK se fixe directement et réprime les régions régulatrices du gène *eve* et *ftz*. Elle montre également une répression significative des gènes pair-rule : *even skipped*; *odd skipped*; *hairy* et *runt* (Brown et Wu. 1993), activité conventionnelle à faible portée. La protéine de 69 kDa de drosophile TTK interagit également avec le facteur GAGA (Bardwell et Treisman. 1994) et montre un effet inhibiteur pleiotrope sur plusieurs gènes de segmentation "*pair-rule*" (Brown et Wu. 1993), indiquant que certaines protéines BTB/POZ peuvent également induire une condensation de la chromatine.

Les trois produits du gène BR-C semblent également agir comme des facteurs de transcription classiques, dans leur façon de réguler le gène de métamorphose Sgs-4 glue et la transcription de Pig-1, à travers leur fixation sur des séquences promotrices

chevauchantes (Von Kalm *et al.*, 1994). En réalité, l'isoforme Z3 de BR-C ressemble très fortement à l'isoforme de 69 kDa de TTK, qui régit les interactions entre les régions régulatrices et qui est nécessaire à l'activation complète de plusieurs gènes de réponse à l'ecdysone (Von Kalm *et al.*, 1994). De par leurs fonctions pléiotropes de modulateur de la réponse à l'hormone, il semble que les produits de BR-C augmentent l'accessibilité de la chromatine au ligand du récepteur de l'ecdysone ou à d'autres facteurs de transcription intervenant dans la métamorphose comme les protéines E74 ou E75(Von Kalm *et al.*, 1994; Fletcher et Thummel. 1995; Fletcher *et al.*,1995).

C'est probablement la capacité des protéines BTB/POZ à réaliser des interactions entre protéines, en formant de larges complexes multiprotéiques, qui est utilisée dans les interactions proximales ou distales (Albagli *et al.*, 1995).

Les protéines BTB/POZ nucléaires sont probablement des régulateurs transcriptionnels dont l'action, en tant que facteur de transcription diffusible classique ou en tant que facteur intervenant dans la modulation de la chromatine, reste cependant obscure.

D'après sa localisation nucléaire ponctuée non diffusible, qui dépend du domaine BTB/POZ, nous avons d'abord proposé que LAZ3 pourrait agir sur la chromatine en tant que médiateur du contrôle transcriptionnel. Après nos études en transfection transitoire, nous montrons que ce facteur réprime la transcription de façon classique, effet dirigé en grande partie par le domaine BTB/POZ. Comme le facteur GAGA, LAZ3 pourrait réguler (trans-réprimer) à faible distance, ou réguler à grande distance, en fonction de son degré de polymérisation. Cette modulation serait dépendante du domaine BTB/POZ de LAZ3, des partenaires avec lesquels il interagit ou encore plus simplement, de sa concentration. En effet la concentration semble être un facteur essentiel , ceci a été démontré dans le cas du facteur BTB/POZ de drosophile BAB (Godt *et al.*, 1993).

Bien entendu le clonage et la caractérisation d'autres partenaires du facteur LAZ3, partenaires co-localisant avec la protéine LAZ3 dans ces agrégats nucléaires, permettront probablement de mieux comprendre comment ces interactions sont régulées et comment fonctionne ce facteur.

IV-LAZ3 et la transformation cellulaire.

De nombreuses protéines Ring finger et des protéines BTB/POZ peuvent être impliquées dans la transformation cellulaire, probablement par la capacité à moduler la condensation de la chromatine.

Comme nous l'avons précédemment décrit, certains programmes de détermination

et de différenciation, sont réalisés grâce à une régulation des gènes régulateurs du développement. Cette régulation s'opère à travers des "ouvertures" et "fermetures" de grandes régions génomiques permettant soit une activation soit une répression de ces gènes. L'incapacité de ces protéines Ring finger ou BTB/POZ à exercer leur fonction d'ouverture et fermeture pourrait conduire à la transformation maligne. Les hybrides PML-RARα en dissociant les NBs ou PODs, altèrent la fonction de ces structures: l'altération de la compartimentalisation de la chromatine, normalement maintenue par des liaisons entre matrice nucléaire et NBs, empêcherait la différenciation et conduirait à la Leucémie Aigüe Promyélocytaire (LAP). L'homologue du régulateur TTK,ou encore les gènes AML1 ou HOX, sont également impliqués dans des pathologies. Parmi les pathologies hématopoïétiques, le gène HRX ou ALL1, l'homologue humain du gène trithorax, présente également des altérations récurrentes.

LAZ3 représente un gène fréquemment transloqué parmi les LNH, qui code donc une protéine de type BTB/POZ. Comme les modulateurs de la condensation de la chromatine sont généralement très sensibles à de très faibles variations de dosage (Henikoff. 1990), il devient possible d'expliquer qu'un faible changement dans l'expression de LAZ3 puisse alors contribuer à la transformation néoplasique, en déplaçant un équilibre protéique étroitement controlé. Ceci rend compatible le fait que l'expression de LAZ3 n'est pas quantitativement et qualitativement altérée par les translocations en 3q27 (résultats non publiés; Otsuki *et al.*, 1995).

En conclusion, les résultats obtenus montrent que LAZ3 présente une localisation nucléaire ponctuée, dépendante du domaine BTB/POZ. Ce domaine BTB/POZ est également requis pour la formation d'interactions homotypiques *in vitro* et *in vivo*. Le facteur LAZ3 possède une fonction trans-répressive, le domaine BTB/POZ représentant un domaine de répression autonome.

Malgré toutes les indications en faveur d'un rôle régulateur transcriptionnel de LAZ3/BCL6, un grand nombre de questions reste posées .

Tout d'abord en ce qui concerne les cofacteurs de LAZ3/BCL6, quelles sont les protéines qui co-localisent avec ces "corps nucléaires" ?

La fonction biologique de LAZ3/BCL6 reste bien mystérieuse. LAZ3/BCL6 est exprimé de façon prépondérante dans les muscles squelettiques de souris, LAZ3/BCL6 joue t-il un rôle dans l'induction de la myogenèse et/ou l'arrêt concommitant de la prolifération myoblastique?

Quels sont les gènes cibles de ce facteur ?

Il persiste le paradoxe de l'implication de LAZ3/BCL6 dans les lymphomes. En effet ce gène n'est ni surexprimé ni muté de façon évidente dans les cellules transloquées.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams M.D., Soares M.B., Kerlavage A.R., Fields C., Venter J.C. (1993): Rapid cDNA sequencing (expresed sequenced tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature Genet.* 4: 373-380
- AlbagliO., DhordainP., Deweindt C., Lecocq G., LeprinceD. (1995): The BTB/POZ domain/a new protein-protein interaction motif common to DNA-and actin-binding proteins. *CellGrowth and Differentiation*. 6: 1193-1198.
- Alcalay M., Zangrilli D., Fagioli M., Pandolfi P.P., Mencarelli A., Lo Coco F., Biondi A., Grignani F., Pelicci P.G. (1992): Expression pattern of the RARa-PML fusion gene in acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 4840-4844
- Adler P.N., Charlton J., Brunk B.P. (1989): Genetic interactions of the suppressor 2 of zeste region genes. Dev. Genet. 10: 249-260
- Alkema M.J., van der Lugt N.M.T., Bodeldijk R.C., Berns A., van Lohuizen M. (1995): Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice. *Nature* 374: 724-727
- Ayer D.E., Kretzner L., Eisenman R.N. (1993): Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72: 211-222
- Baeuerle P.A., Baltimore D. (1988): A specific inhibitor of the NFkB transcription factor. Science 242:540-546
- Baeurle P.A., Baltimore D. (1989): A 65 kD subunit of active NFκB is required for inhibition of NFκB by IkB. Genes & Dev 3: 1689-1698
- Bakhshi A., Jensen J.P., Goldman P., Wright J.J., McBride O.W., Epstein A.L., Korsmeyer S.J.(1985): Cloning of the chromosomal breakpoint oft(14,18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptionnal unit on 18. *Cell* 41: 899-906
- Barbacid M. (1987): Ras genes. Annu. Rev. Biochem. 56:779-827
- Bardwell V.J., Treisman R. (1994): The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. Genes & Dev. 8: 1664-1677
- Baron B., Nucifora G., McCabe N., Espinosa R., Le Beau M.M., McKeithan T.W. (1993) : Identification of a gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5262-5266
- Baron B.W., Stanger R.R., Hume E., Sadhu A., Mick R., Kerckaert J.P., Deweindt C., Bastard C., Nucifora G., Zeleznik-Le N., McKeithan T.W. (1995): BCL6 encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Genes Chrom. Cancer*. (sous presse)
- Bartram C.R., de Klein A., Hagemeijer A., van Agthoven T., Geurts van Kessel Ad., Bootsma D., Grosveld G., Ferguson-Smith M.A., Davies T., Stone M., Heisterkamp N., Stephenson J.R., Groffen J. (1983) : Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306: 277-280

- Bastard C., Deweindt C., Kerckaert J.P., Lenormand B., Rossi A., Pezzela F., Fruchart C., Duval C., Monconduit M., Tilly H. (1994): LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with Histology, Immunophenotype, Karyotype, and Clinical Outcome in 217 patients. *Blood 83*: 2423-2427
- Bastard C., Deweindt C., Quief S., Dallery E., Galiègue-Zouitina S., Collyn d'Hooghe M., Tilly H., Kerckaert J.P. (1994): Mechanisms of LAZ3/BCL6 deregulation in non-Hodgkin's Lymphoma (NHL). *Blood* 84 suppl 1: 440a
- Bastard C., Tilly H., Lenormand B., Bigorgne C., Boulet D., Kunlin A., Monconduit M., Piguet H. (1992) : Translocations involving band 3q27 and immunoglobulin gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 79 : 2527-2531
- Battey J., Moulding C., Taub R., Murphy W., Stewart T., Potter H., Lenoir G., Leder P. (1983): The human c-myc oncogene : structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. *Cell* 34 : 779-787
- Benson M., Pirrotta V. (1988): The Drosophila zeste protein binds cooperatively to sites in many gene regulatory regions : implications for transvection and gene regulation. *EMBOJ.* 12: 3907-3915
- Benyajati C., Ewel A., McKeon J., Chovac M., Juan E. (1992): Characterization and purification of Adh distal promoter factor 2, Adf-2, a cell-specific and promoter-specific repressor in Drosophila. *Nucleic Acids Res.* 20: 4481-4489
- Berger R., Bernherm A., Valensi F., Flandrin G. (1983): 22q- and 8q- in a non-Burkitt lymphoma. Cancer Genet. Cytogenet. 8: 91-94
- Bickel S., Pirrotta V. (1990): Self-association of the Drosophila zeste protein is responsible for transvection effects. *EMBOJ*. 9: 2959-2967
- Biggin M.D., Tjian R. (1988) : Transcription factors that activate the ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. Cell 53 : 699-711
- Bissonnette R.P., Exheverri F., Mahboubi A., Green R.D. (1992): apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359: 552-554
- Blackwood E.M., Eisenman R.N. (1991): Max: a helix -loop-helix zipper protein that forms a sequence specific DNA binding complex with Myc. *Science* 251: 1211-1217
- Borden K.L.B., Boddy M.N., Lally J., O'Reilly N.J., Martin S., Howe K., Solomon E., Freemont P.S. (1995): The solution structure of the ring finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *EMBO J.* 14: 1532-1541
- Borrow J., Goddard A.D., Sheer D., Solomon E. (1990): Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. Science 249: 1577-1580
- Brasch K., Ochs R.L. (1992): Nuclear bodies (NBs): a newly "rediscovered" organelle. Experimental Cell Research. 202: 211-223

Brito-Babapulle V., Pittman S., Melo J.V., Pomfret M., Catovsky D. (1987): Cytogenetic studies

on prolymphocytic leukaemia. B-cell prolymphocytic leukaemia. Hematol Pathol 1:27

- Brown J.L., Sonoda H., Ueda H., Scott M.P., Wu C. (1991): Repression of the Drosophila fushi tarazu (ftz) segmentation gene *EMBO J.* 10:665-674
- Brown J.L., Wu C. (1993): Repression of Drosophila pair-rule segmentation genes by ectopic expression of tramtrack. *Development*. 117: 45-58
- Brunk B.P., Martin E.C., Adler P.N. (1991): Drosophila genes Posterior sex combs and Supressor two of zeste encode proteins with homology to the murine bmi-1 oncogene. *Nature* 353:351-355
- Cattoretti G., Chang C.C., Cechova K., Zhang J., Ye B.H., Falini B., Louie D.C., Offit K., Chaganti R.S.K., Dalla-Favera R. (1995): BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86: 45-53
- Castaigne S., Chomienne C., Daniel M., Ballerini P., Berger R., Fenaux P., Degos L. (1990): Alltrans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. Clinical result. *Blood* 76: 1704-1709
- Celniker S.E., Sharma S., Keelan D.J., Lewis E. (1990): The molecular genetics of the bithorax complex of Drosophila: Cis-regulation in the abdominal-B domain. *EMBOJ.* 9: 4277-4286
- Chaganti R.S.K., Doucette L.A., Offit K., Filippa D.A., Allen G.J., Condon M.R., Jhanwar S.C., Clarkson B.D., Lieberman P.H. (1989): Incidence, molecular detection, and histological and clinical correlations. *Cancer Cells* 7:33
- Chang-Yeh A., Mold D.E., Huang R.C.C. (1991): Identification of a novel murine IAP- promoted placenta-expressed gene. *Nucleic Acid. Res.* 19: 3667-3672
- Chardin P., Courtois G., Mattei M.G., Gisselbrecht S. (1991): The KUP gene, located on human chromosome 14, encodes a protein with two distant zinc fingers. *Nuc. Acids Res.* 19: 1431-1436
- Chen J.D., Chan C.S., Pirrotta V. (1992): Conserved DNA binding and self-association domains of the Drosophila zeste protein. *Mol. Cell. Biol.* 12: 598-608
- Chen W., Zollman S., Couderc J.L., Laski F.A. (1994): The BTB domain of bric à brac mediates dimerization in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 6:3424-3429
- Chen Z., Guidez F., Rousselot P., Agadir A., Chen S.J., Wang Z.Y., Degos L., Zelznt A., Waxman S., Chomienne C. (1994) : PLZF-RARα fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 1178-1182
- Cleary M.L., Smith S.D., Sklar J. (1986) Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrib bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. Cell 47:19-28

- Cooley L., Theurkauf W.E. (1994): Cytoskeletal functions during Drosophila oogenesis. Science 266: 590-596
- Cotter F.E., Price C., Meerabux J., Zucca E., Young B.D. (1991): Direct sequence analysis of 14q+ and 18q-chromosome jonctions at the MBR and MCR revealing clustering within the MBR in follicular lymphoma. Ann. Oncol 2:93
- Crawford A.W., Pino J.D., Beckerle M.C. (1994): Biochemical and molecular characterization of the chiken cysteine-rich protein, a developmentally regulated LIM-domain protein that is associated with the actin cytoskeleton. J. Cell. Biol. 124: 117-127
- Croston G.E., Kerrigan L.A., Lira L.M., Marshak D.R., Kadonaga J.T. (1991): Sequence-specific antirepression of Histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science* 251: 643-649
- Dalla-Favera R., Bregni M., Erickson J., Patterson D., Galla R.C., Croce C.M. (1982): Human cmyc oncogene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7824-7827
- Dalla-Favera R., Martinotti S., Gallo R.C., Erikson J., Croce C.M. (1983): Translocation and rearrangements of the c-myc oncogene locus: in human undifferentiated B-cell lymphomas. *Science* 219: 963-967
- Dallery E., Galiègue-Zouitina S., Collyn-d'Hooghe M., Quief S., Denis C., Hildebrand M.P., Lantoine D., Deweindt C., Tilly H., Bastard C., Kerckaert J.P. (1995): TTF, a gene encoding a novel small G protein, fuses to the lymphoma - associated LAZ3 gene by t(3;4) chromosomal translocation. Oncogene 10: 2171-2178
- Daniel M.T., Koken M., Romagné O., Barbey S., Bazarbachi A., Stadler M., Guillemin M.C., Degos L., Chomienne C., de Thé H. (1993): PML protein expression in hematopoietic and acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 82: 1858-1867
- De camillis M., Cheng N., Pierre D., Brock H.W. (1992): The Polyhomeotic gene of Drosophila encodes a chromatin protein that shares polytene chromosome-binding sites with Polycomb. *Genes & Dev.* 6: 223-232
- de Thé G., Riviere M., Bernhard W. (1960): Examen au microscope électronique de la tumeur VX2 du lapin domestique dérivée du papillome de Shope. Bull. Cancer 47: 550-584
- de Thé H., Chomienne C., Lanotte M., Degos L., Dejean A. (1990): The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor a to a novel transcribed locus. *Nature* 347: 558-561
- de Thé H., Lavau C., Marchio A., Chomienne C., Degos L., Dejean A. (1991): The PML-RARa fusion generated by the t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia encodes a functinally altered RAR. Cell 66: 675-684
- Dear T.N., Sanchez-Garcia I., Rabbitts TH. (1993): The HOX11 gene encodes a DNA-binding nuclear transcription factor belonging to a distinct family of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4431-4435

- Desiderio S.V., Yancopoulos G.D., Paskind M., Thomas E., Boss M.A., Landau N., Alt F.W., Baltimore D. (1984): Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B-cells. *Nature* 31: 752-755
- Deweindt C., Kerckaert J.P., Tilly H., Quief S., Nguyen V.C., Bastard C., (1993): Cloning of a breakpoint cluster region at band 3q27 in human non-Hodgkin's lymphoma. *Genes chrom Cancer* 8:149-154
- Deweindt C., Albagli O., Bernardin F., Dhordain P., Quief S., Lantoine D., Kerckaert J.P., Leprince D. (1995): The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptionnal inhibitor : anovel function for the BTB/POZ domain as a autonomous repressing domain. *Cell Growth and Differentiation*. (sous presse, décembre 1995).
- Dhordain P., Albagli O., Ansieu S., Koken M.H., Deweindt C., Quief S., Lantoine D., Leuctz A., Kerckaert J.P., Leprince D. (1995): The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein to nuclear dots and mediates homomerisation *in vivo*. Oncogene (sous presse, janvier 1996).
- Dibello P.R., Withers A., Bayer C.A., Fristrom J.W., Guild G.M. (1991): The drosophila Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. Genetics 129: 385-397
- Djabali M., Selleri L., Parry P., Bower M., Young B., Evans G. (1992): A trithorax-like gene is interrupted by chromosomal 11q23 translocations in acute leukemias. *Nature genetics* 2: 113-118
- Dorn R., Krauss V., Reuter G., Saumweber H. (1993): The enhancer of position-effect variegation of Drosophila, E(var)3-93D, codes for a chromatin protein containing a conserved domain common to several transcription regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11376-11380
- Doucas V., Brockes J., Yaniv M., de Thé H., Dejean A. (1993): The PML-retinoic acid receptora from an inhibitor to a retinoic acid-dependent activator of transcription factor AP-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 9345-9349
- Drexler H.G., MacLeod R.A.F., Borkhardt A., Janssen J.W.G. (1995): Recurrent chromosomal translocations and fusion genes in leukemia-lymphoma cell lines. *Leukemia* 9: 480-500
- Dubé I., Kamel-Reid S., Yuan C.C., Lu W., Corpus G., Raimondi S.C., Crist W.M., Carroll A.J., Minowada J., Baker J.B. (1991): A novel human homeobox gene lies at the chromosome 10 breakpoint in lymphoid neoplasias with chromosomal translocationt(10;14). *Blood* 78: 2996-3003
- Dyck J., Maul G., Miller W., Chen J., Kakizuka A., Evans R. (1994): A novel macromolecular structure is a target of the promyelocytic-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76: 333-343
- Eissenberg J.C., James T.C., Foster-Hartnett D.M., Hartnett T., Ngan V., Elgin S. (1990): Mutation on a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of positioneffect variegation in Drosophila melanogaster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9923-9927

English M.A., Bisht S., Waxman S., Licht J.D. (1994) DNA binding and transcription regulation by

the promyelocytic leukemia zinc finger protein. Blood 84: Supp 1, 152

- Farkas G., Gausz J., Galloni M., Reuter G., Gyurkovics H., Karch F. (1994): The trithorax-like encodes the drosophila GAGA factor. *Nature* 371: 806-808
- Fisher R.I., Gaynor E.R., Dahlerg S. (1993): Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. N. Engl. J. Med. 328: 1002-1006
- Fletcher J.C., Burtis K.C., Hogness D.S., Thummel C.S. (995): The Drosophila E74 gene is requierd for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development.* 121: 1455-1465
- Fletcher J.C., Thummel C.S. (1995): The Drosophila E74 gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development.* 121 1411-1421
- Francke A. (1991): "The Polycomb protein : genetic and molecular analysis of interactions with others Polycomb-group genes in Drosophila melanogaster". PhD thesis. University of Heidelberg, Germany.
- Franke A., De camillisM., Zink D., Cheng N., Brock H.W., Paro R. (1992): Polycomb and Polyhomeotic are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of Drosophila melanogaster. *EMBO J.* 11: 2941-2950
- Freemont P.S. (1993): The RING finger A novel protein sequence motif related to the zinc finger. Annals of the New York Academy of Science. 684 174-192
- Freyd G., Kim S.K., Horvtiz H.R. (1990): Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of Caenorhabditis elegans cell lineage gene lin-11. *Nature* 344: 876-879
- Gaidano G., Lo Coco F., Ye B.H., Shibata D., Levine A.M., Knowles D.M., Dalla-Favera R. (1994): Rearrangements of the BCL-6 gene in acquired immunodefisciency syndromeassociated non-hodgkin's lymphoma: association with diffuse large-cell subtype. *Blood* 84: 397-402
- Gelbart W.M., Wu C.T. (1982): Interactions of zeste mutations with loci exhibiting transvection effects in Drosophila Melanogaster. *Genetics* 102: 179-189
- Gelman I., Silverstein S. (1987): Herpes simplex virus immediate-early promoters are responsive to virus and cell trans-acting factors. *Journal of Virology* 61: 2286-2296
- Giniger E., Tietje K., Jan L.Y, Jan Y.N. (1994): lola encodes a putative transcription factor required for axon growth and guidance in Drosophila. *Development*. 120: 1385-1398
- Godt D., Couderc J.L., Cramton S.E., Laski F.A. (1993): Pattern formation in the limbs of Drosophila: bric à brac is expressed in both a gradient and wave-like pattern and is required for specification and proper segmentation of the tarsus. Development. 119: 799-812

Goebel S.J., Johnson G.P., Perkus M.E., Davis S.W., Winslow J.P., Paoletti E. (1990): The

complete DNA sequence of vaccinia virus. Virology 179: 247-266

- Goebl G. (1991): The bmi-1 and mel-18 gene products define a new family of DNA-binding proteins involved in cell proliferation and tumorigenesis. *Cell* 66: 623
- Golub T.R., Barker G.F., Lovett M., Gilliland DG. (1994): Fusion of PDGF receptorb to a novel etslike gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell* 77: 307-316
- Granok H., Leibovitch B.A., Shaffer C.D., Elgin S.C.R. (1995): Ga-ga over GAGA factor recent results suggest that the drosophila transcriptional activator known as GAGA factor functions by influencing chromatin structure. *Current Biology* 5:238-241
- Gu Y., Nakamura T., Alder H., Prasad R., Canaani O., Cimino G., Croce C.M., Canaani E. (1992): The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to drosophila trithorax, to the AF-4 gene. *Cel* 171:701-708
- Harding K., Levine M. (1988): Gap genes define the limits of Antennapedia and bithorax gene expression during early development in Drosophila. *EMBOJ.* 7: 205-214.
- Harrison S.D., Travers A.A. (1990): The tramtrack gene encodes a drosophila finger protein that interacts with the fiz transcriptional regulatory region and shows a novel embryonic expression pattern. *EMBO J.* 9: 207-216
- Haupt Y., Alexander G., Barri S.P., Klinken S.P., Adams J.M. (1991): Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in Em-myc transgenic mice. *Cell* 65: 753-763
- Hay B., Ackerman L., Bardel S., Jan L.Y., Jan Y.N. (1988): Identification of a component of Drosophila polar granules. *Development*. 103:625-640
- Hay B., Jan L.Y., Jan Y.N. (1990): Localization of vasa, a component of Drosophila polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development*. 109: 425-433
- Hayday A.C., Gillies S.D., Saito H., Wood C., Wiman K., Hayward W.S., Tonegawa S. (1984) : Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavychain locus. *Nature* 307 : 334-340
- Hebert J., Romana S.P., Hillion J., Kerckaert J.P., Bastard C., Berger R. (1993): Translocation t(3;22)(q27;q11) in non-Hodgkin's malignant lymphoma. Chromosome pairing and molecular studies. *Leukemia* 7: 1971-1974
- Heitz, 1928 (Jahrb wiss bot 69 762 818) Henikoff S. (1990): Position-effect variegation after 60 years. TIG 6: 422-426

Henikoff S. (1990): Position-effect variegation after 60 years. TIG 6:422-426

Horsman D.E., Mcneil B.K., Anderson M., Shenkier T., Gascoyne R.D. (1995) : Frequent association oft(3;14) or variant with other lymphoma-specific translocations. *British Journal*

of Haematology 89 : 569-575

- Hsu H.L., Cheng J.T., Chen Q., Baer R. (1991): Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3037-3042
- Hunger S.P., Ohyashiki K., Toyama K., Cleary M.L. (1992): Hlf, a novel hepatic b ZIP protein, shows altered DNA-binding properties following fusion to E2A in t(17;19) acute lymphoblastic leukemia. *Genes&Dev* 6:1608-1620
- Inaba T., Roberts W.M., Shapiro L.H., Jolly K.W., Raimondi S.C., Smith S.D., Look A.T. (1992): Fusion of the leucine zipper gene HLF to E2A gene in human acute B-lineage leukemia. *Science* 257:531-534
- Inoue J.I., Takahara T., Akizawa T., Okio Hino. (1993): Bcl-3, a member of the IkB proteins, has distinct specificity towards the rel family of proteins. *Oncogene* 8: 2067-2073
- Irish V.F., Martinez-Arias A., Akam M. (1989): Spatial regulation of Antennapedia and Ultrabithorax homeotic genes during Drosophila early development. *EMBOJ*. 8: 1527-1537
- James T.C., Eissenberg J.C., Craig C., Dietrich V., Hobson A., Elgin S.C.R. (1989): Distribution patterns of HP1, a heterochromatin-associated non histone chromosomal protein of Drosophila. *Eur. J. Cell Biol.* 50: 170-180
- John. (1988): The Biology of heterochromatin. Cambridge University press, Cambridge UK: 1-147
- Jongens T.A., Hay B., Jan L.Y., Jan Y.N. (1992): The germ cell-less gene product: a posteriorly localized component necessary for germ cell development in Drosophila. *Cell* 70: 569-584
- Juliusson G., Gahrton G. (1990): Chromosome aberrations in B-cell chronic lympnocytic leukaemia. Cancer Genet Cytogenet 45: 143
- Kakizuka A., Miller W., Umesono K., Warrell R., Frankel S., Murty V., Dmitrovsky E., Evans R. (1991): Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARa with a novel putative transcription factor. PML. Cell 66: 663-674
- Kamps M.P., Murre C., Sun X., Baltimore D. (1990): A new homeobox gene contributes the DNA binding domain of the t(1;19) translocation protein in pre-B ALL. *Cell* 60: 547-555
- Karrlson O., Thor S., Norberg T., Ohisson H., Edlund T. (1990): Insulin gene enhancer binding protein isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo and a Cys-His domain. *Nature* 344: 879-882
- Kastner P., Perez A., Lutz Y., Rochette-Egly C., Gaub M.P., Lanotte M., Berger R., Chambon P. (1992): Structure, localization and transcriptional properties of two clases of retinoic acid receptor a fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBOJ*. 11: 629-642
- Kataoka T., Miyata T., Honjo T. (1981): Repetitive sequences in class-switch recombinaison regions of immunoglobulin heavy chain genes. Cell 23:357-368

- Kaufman T.C., Tasaka S.E., Suzuki D.T. (1973): The interaction of two complex loci, zeste and bithorax in Drosophila Melanogaster. *Genetics* 75: 299-321
- Kawamata N., Miki T., Fukuda T., Hirosawa S., Aoki N. (1994a): The organization of the BCL6 gene. Leukemia 8: 1327-1330
- Kawamata N., Miki T., Ohashi K., Suzuki K., Fukuda T., Hirosawa S., Aoki N. (1994b) : Recognition DNA sequence of a novel putative transcription factor, BCL6. *Bioch. Biophys. Res. Com.* 204 : 366-374
- Kenter A.L., Birshtein B.K. (1981): Chi, a promoter of generalized recombination in l phage, is present in immunoglobulin genes. *Nature* 293:402-404
- Kerckaert J.P., Deweindt C., Tilly H., Quief S., Lecocq G., Bastard C. (1993): LAZ3, a novel zincfinger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nature Genet* 5:66-70
- Kerrigan L.A., Croston G.E., Lira L.M., Kadonaga J.T. (1991): Sequence-specific tanscriptional antirepression of the Drosophila Krüppel gene by the GAGA factor. J. Biol. Chem. 266: 574-582
- Klein G., Klein E. (1985): Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature* 315: 190-195
- Knöchel W., Pöting M., Köster M., El Baradi T., Nietfeld W., Bouwmeester T., Pieler T. (1989): Evolutionary conserved modules associated with zinc fingers in xenopus laevis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6097-6100
- KoL.J., Engel J.D. (1993): DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4011-4022
- Koduru P.R.K., Filippa D.A., Richardson M.E., Jhanwar S.C., Chaganti S.A., Koziner B., Clarkson B.D., Lieberman P.H., Chaganti R.S.K. (1987) Cytogenetic and histologic correlations in malignant lymphoma. *Blood* 69:97-102
- Koken M.H.M., Linares-Cruz G., Quignon F., Viron A., Chelbi-Alix M.K., Sobczak-Thépot J., Juhlin L., Degos L., Calvo F., de Thé H. (1995): The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* 10: 1315-1324
- Koken M.H.M., Puvio-Dutilleul., Guillemin M.C., Viron A., Linares-Cruz G., Stuurman N., de Jong L., Szostecki C., Calvo F., Chomienne C., Degos L., Puvion E., de Thé H. (1994): The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO*. J. 13: 1073-1083
- Koonin E.V., Senkevich T.G., Cherenos V.I. (1992): a family of DNA virus genes that consists of fused portions of unrelated cellular genes. TIBS. 17: 213-214
- Kosa J.L., Michelsen J.W., Olsen J.I., Davis D.R., Beckerle M.C., Winge D.R. (1994): Common metal coordination in LIM domain proteins. *Biochemistry* 33: 468-477

- Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W., Reed J.C. (1993): Investigations of the subcellular distribution of the BCL-2 oncoprotein: residence in the nuclear enveloppe, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53: 4701-4714
- Kraulis P.J., Raine A.R.C., Gadhavi P.L., Lave E.D. (1992): Structure of the DNA-binding domain of zinc GAL4. *Nature* 356: 448-450
- Krowczynska A., Rudders R.A., Kronntiris T.G. (1990): The human minisatellite consensus at breapoints of oncogene translocations. *Nucleic acids Research* 18: 1121-1127
- Laâbi Y., Gras M.P., Carbonnel F., Brouet J.C., Berger R., Larsen C.J., Tsapis A. (1992): A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *Embo J* 11:3897-3904
- Lambrechts A.C., De Ruiter P.E., Dorssers L.C.J., Van't Veer M.B. (1992): Detection of residual desease in translocation (14;18) positive non-Hodgkin's lymphoma, using the polymerase chain reaction: a comparison with conventional staging methods. *Leukemia* 6:29-34
- Laney J., Biggin M.D. (1992): Zeste, a nonessential gene, potently activates Ultrabithorax transcription in the Drosophila embryo. *Genes & Dev.* 6: 1531-1541
- Larsson S.H., Charlieu J.P., Miyagawa K., Engelkamp D., Rassoulzadegan M., Ross A., Cuzin F., van Heyningen V., Hastie N.D. (1995) : Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81: 391-401
- Lavau C., Dejean A. (1994): Thet(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 8: suppl.2, S9-S15
- Leder P., Battey J., Lenoir G., Moulding C., Murphy W., Potter H., Stewart T., Taub R. (1983): Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* 222: 765-771
- Lee H., Kraus K.W., Wolfner M.F., Lis J.T. (1992): DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of hsp70. *Genes & Dev.* 6: 284-295.
- Leroux D., Le Marc'haadour F., Gressin R., Jacob M.C., Keddari E., Monteil M., Caillot P., Jalbert P., Sotto J.J. (1991): Non-Hodgkin'lymphomas with t(11;14)(q13;q32): a subset of mantle zone/intermediatelymphocyticlymphoma. *Br J Haematol* 77: 346
- Levy L.S., Lobell-Rich P.A., Overbaugh J. (1993) : flvi-2, a target of retroviral insertional mutagenesis in feline thymic lymphosarcomas, encodes bmi-1. Oncogene 8:1833-1838

Lewis E.B. (1978): A gene complex controlling segmentation in Drosophila. Nature 276: 565-570

- Li J.Y., English M.A., Bisht S., Waxman S., Licht J.D. (1994): DNA binding and transcription regulation by the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Blood* 84 Suppl 1:41
- Liou H., Nolan S., Ghosh S., Fujita T., Baltimore D. (1992): The nfkB p50 precursors, p105, contains an internal IkB-like inhibitor tha preferentially inhibits p50. *Embo J* 11:3003-3009

Liou H.C., Baltimore D. (1993): Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa

B inhibitor system. Curr. Opin. Cell Biol. 5: 477-487

- Liu Q., Shalaby F., Puri M.C., Tang S., Breitman M.L. (1994): Novel zinc finger proteins that interact with the mouse gF-crystallin promoter and are expressed in the sclerotome during early somitogenesis. *Developmental Biol*. 165: 165-177
- Liu Y., Grander D., Söderhäll S., Juliusson G., Gahrton G., Einhorn S. (1992): Retinoblastoma gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chrom Cancer* 4: 250-256
- Lo Coco F., Ye B.H., Lista F., Corradini P., Offit K., Knowles D., Chaganti R.S.K., Dalla-Favera R. (1994): Rearrangements of the bcl6 gene in diffuse large cell non-hodgkin's lymphoma. Blood 83: 1757-1759
- Locke J., Kotarski M.A., Tartof K.D. (1988) : Dosage-dependent modifiers of position effect variegation in *Drosophila* and a mass action model that explains their effect. *Genetics* 120 : 181-198
- Lovering R., Hanson I.M., Borden C.L.B., Martin S., O'Reilly N.J., Evans G.I., Rahman D., Pappin D.J.C., Trowsdale J., Freemont P.S. (1993): Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2112-2116
- LuM., Gong Z., Weifang S., Ho A.D. (1991): The tcl-3 proto-oncogene altered by chromosomal translocation in T-cell leukemia codes for a homeobox protein. *Embo J*. 10: 2905-2910
- Lu Q., Wallrath L.L., Granok H., Elgin S.C. (1993): (CT)n(GA)n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the drosophila hsp26 gene. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2802-2814
- Mashal R., Shtalrid M., Talpaz M., Kantarjian H., Smith L., Beran M., cork A., Trujillo J., Gutterman J., Deisseroth A. (1990): Rearrangement and expression of P53 in the chronic phase and blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 75:180-189
- Massung R.F., Jayarama V., Moyer R.W. (1993): DNA sequence analysis of conserved and unique regions of swinepox virus: identification of genetic elements supporting phenotypic observations including a novel G protein coupled receptor homologue. *Virology* 197: 511-528
- Maul G G., Everett R.D. (1994): The nuclear location of PML, a cellular member of the C3HC4 zincbinding domain protein family, is rearranged during herpes simplex virus infection by the C3HC4 viral protein ICPO. *Journal of General Virilogy* 75: 1223-1233
- McMaster M.L., Greer J.P., Wolff S.N., et al. (1991): Results of treatment with high intensity, brief duration chemotherapy in poor prognosis non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* 68:233-241
- Medeiros L.J., van Krieken J.H.J.M., Jaffe E.S., Raffeld M. (1990): Association of bcl-1 rearrangements with lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation. *Blood* 76: 2086-2090
- Meeker T.C., Sellers W., Harvey R., Withers D., Carye K., Xiao H., Block A.M., Dadey B., Han T. (1991): Cloning of the t(11;14)(q13;q32) translocation breakpoints from two human leukemia cell lines. *Leukemia* 5: 733

- Merika M., Orkin S.H. (1993): DAN binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 13: 3999-4010
- Messner S., Francke A., Paro R. (1992): Analysis of the functional role of the polycomb chromo domain in Drosophila melanogaster. *Genes & Dev.* 6: 1241-1254
- Michaely P., Bennett. (1992): The ANK repeat : a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends Cell Biol* 2: 127-129
- Michelsen J.W., Sewell A.K., Louis H.A., Olsen J.I., Davis D.R., Winge D.R., Beckerle M.C. (1994): Mutational analysis of the metal sites in a LIM domain. J. Biol. Chem. 269: 11108-11113
- Migliazza A., Ye B.H., Martinotti S., Fusco C., Offit K., Chaganti R.S.K., Dalla-Favera R.(1994) : Mutations of the 5' non-coding region of the BCL-6 in non-hoggkin lymphoma. *Blood* 84 suppl 1: 41a
- Miki T., Kawamata N., Hirosawa S., Aoki N. (1994): Gene involved in the 3q27 translocation associated with B-cell lymphoma, BCL5, encodes a Krüppel-like zinc finger protein. *Blood* 83: 26-32
- Miller J., McLachlan A., Klug A. (1985): Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. *EMBO J.* 4: 1609-1614
- Mitelman F. (1988): Catalog of chromosome Aberrations in Cancer, New York Alan R. Liss, Ed. 3rd pp. 1146.
- Mokotura T., Bloom T., Kim H.G., Jüppner H., Rudreman J.V., Kronenberg H.M., Arnold A. (1991): A novel cyclin encoded by a bcl-1 linked candidate oncogene. *Nature* 350: 512-515
- Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B., Dittmer K.G., Shapiro D.N., Saltman D.L., Look A.T. (1994): Fusion of kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-hodgkin's lymphoma. *Science* 263:1281-1283
- Mucenski M.L., Taylor B.A., Copeland N.G., Jenkins N.A. (1988): Chromosomal location of Evi-1 common site of ecotropic viral integration in AKXD murine Myeloïd tumors. *Oncogene*. Res. 2:219-233
- Müller J. (1995): Transcriptional silencing by the polycomb protein in Drosophila embryos. *EMBO* J. 14: 1209-1220
- Nourse J., Mellentin J.D., Galili N., Wilkinson J., Stanbridge E., Smith S.D., Cleary M.L. (1990): Chromosomal translocation t(1;19) results in synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potential chimeric transcription factor. *Cell* 60: 535-545
- Nowell P.C., Hungerfold D.A. (1960): A minute chromosome in human granulocytic leukemia. J. Natl. *Cancer Inst.* 25: 85-109

Numoto M., Niwa O., Kaplan K.K., Wong K., Kamiya K., Yanagihara K., Calame K. (1993):

Transcriptional repressor ZF5 identifies a new conserved domain in zinc finger proteins. *Nuc.* Acids Res. 21: 3667-3775

- Offit K., Jhanwar S., Ebrahim S.A., Filippa D., Clarkson B.D., Chaganti R.S.K. (1989) : t(3;22)(q27;q11): a novel translocation associated with diffuse non-Hodgkin's lymphoma. Blood 74 : 1876-1879
- Offit K., M.D., M.P.H., Lo Coco F., et al. (1994): Rearrangement of the bcl6 gene as a pronostic marker in diffuse large-cell lymphoma. N. Engl. J. Med. 331: 74-80
- Offit K., Wong G., Filippa D.A., Tao Y., and Chaganti R.S.K. (1991): Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood* 77: 1508-1515
- Ohki M. (1993) Sem Cancer Biol: Molecular basis of the t(8;21) translocation in acute myeloid *leukemia*. 4: 369-376
- Ohno H., Takimoto G., Mc Keitan T.W. (1990): the candidate proto-oncogene bcl-3 is related to gene implicated in cell lineage determination and cell cycle control. *Cell* 60: 991-997
- Orlando V., Paro R. (1993): Mapping Polycomb-Repressed domains in the Bithorax complex using in vivo formaldehyde cross-linked chromatin. *Cell* 75: 1187-1198
- Otsuki T., Yano T., Clarck H.M., Bastard C., Kerckaert J.P., Jaffe E.S., Raffeld M. (1995): Analysis of LAZ3 (BCL6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood* 85: 2877-2884.
- Pandolfli P., Grignani F., Alcalay M., Mencarelli A., Biondi A., Lo Coco F., Grignani F., Pelicci P.G. (1991): Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RARa cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. Oncogene 6: 1285-1292
- Park J.K., Le Beau M.M., Shows T.B., Rowley J.D., Diaz M.O. (1992) : A complex genetic rearrangement in a t(10;14)(q24;q11) associated with T-cell lymphomblastic leukemia *Gene.* Chrom. & Cancer 4 : 32-40
- Paro R.(1993) : Mechanisms of heritable gene repression during development of Drosophila. Current Opin. Cell. Biology 5: 999-1005
- Paro R., Hogness D.S. (1991): The polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:263-267
- Pavletich N.P., Pabo C.O. (1991): Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1.A. *Science* 252: 809-817
- Pearce J.J.H., Singh P.B., Gaunt S.J. (1992): The mouse has a polycomb-like chromobox gene. Development 114: 921-929

Peluci P.G, Knowell D.M., Magrath I. (1986): Chromosomal breakpoint and structural alterations

of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitts lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 244: 66-70

- Pepinsky R.B., Tizard R., Mattaliano R.J., Sinclair L.K., Miller G.T., Browning J.L., Chow E.P., Burne C., Huang K.S., Pratt D., Wachter L., Hession C., Frey A.Z., Wallner B.P. (1988): Five distinct calcium and phospholipid binding proteins share homology with lipocortin I. *JBiol. Chem.* 263: 10799-10811
- Perez A., Katsner P., Sethi S., Lutz Y., Reibel C., Chambon P. (1993): PML-RAR homodimers: distinct DNA binding properties and heteromeric interactions with RXR. *EMBO.J.* 12: 3171-3182.
- Pirrotta V., Bickel S., Mariani C. (1988): Developmental expression of the Drosophila zeste gene and localization of zeste protein on polytene chromosome. *Genes & Dev.* 2: 1839-1850
- Pollock R., Treisman R. (1990): A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificites. *Nucleic Acids Res.* 18: 6197-6204
- Prendergast G.C., Lawe D., Ziff E. (1991): Association of Myn, the murine homolog of Max, with Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and Ras cotransformation. *Cell* 65: 395-407

Rabbitts T.H. (1994): Chromosomal translocations in human cancer. Nature 372:143-149

Rabbitts T.H., Boehm T. (1990) : LIM domains. Nature 346: 418

Rabbitts T.H., Boehm T. (1991): Adv. Immu 50: 119-149

- Raff J.W., Kellum R., Alberts B. (1994): The Drosophila GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle. *EMBOJ*. 13 5977-5983
- Rastelli L., Chan C.S., Pirotta V. (1993): Related chromosome binding sites for zeste, suppressors of zeste polycomb group proteins in Drosophila and their dependence on enhancer of zeste function. *EMBOJ*. 12: 1513-1522
- Read D., Manley J. (1992): Alternatively spliced transcripts of the drosophila tramtrack gene zinc finger proteins with distinct DNA binding specificities. *EMBO J.* 11: 1035-1044
- Read D., Nishigaki T., Manley J.L. (1990): The Drosophila even-skipped promoter is transcribed in a stage-specific manner in vitro and contains multiple, overlapping factor-binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4334-4344
- Redner R.L., Rush E.A., Faas S., Rudert W.A., Corey S.J. (1994): Thet(5;17) translocation in acute promyelocytic leukemia generates a nucleophosmin-RARa fusion transsript. *Blood* Suppl 1: 375a
- Reed J.C. (1994): BCL-2 and the regulation of programmed ceel death. J. Cell. Biol. 124:1&21-6

Reuter G., Dependence of position-effect variegation in Drosophila on dose of a gene encoding an

unusual zinc-finger protein. (1990) Nature 344:219-223

- Rimokh R., Berger F., Cornillrt P., Wahbi K., Rouault J.P., Ffrench M., Bryon P.A., Gadoux M., Gentilhomme O., Germain D., Magaud J.P. (1990): Break in the BCL-1 locus is closely associated with intermediate lymphocytic lymphoma subtype. *Genes Chrom. Cancer* 2: 223-226
- Robertson M. (1984): Message of myc in context. Nature 309:585-587
- Robinson D.N., Cant K., Cooley L. (1994): Morphogenesis of Drosophila ovarian ring canals. Development 120: 2015-2025
- Rosati M., Marino M., Franzè A., Tramontano A., Grimaldi G. (1991): Members of a zinc finger protein gene family sharing a conserved N-terminal module. *Nucleic Acids Res.* 19: 5661-5667
- Rosenberg C.L., Wong E., Petty E.M., Bale A.E., Tsujimoto Y., Harris N.L., Arnold A. (1991): Prad1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 9638-9642
- Rowley J., Golomb H.M., Dougherty C. (1977): 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia. *Lancet i*: 549-550
- Rubin C.M., Larson R.A., Anastasi J., Winter J.N., Thangavelu M., Vardiman J.W., Rowley J.D., Le Beau M.M. (1990): A recurring chromosomal abnormality in the rapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Blood* 76: 2594-2598
- RussellL.B., (1963): Mammalian X-cromosome action : inactivation in spread and region of origin. Science 140: 976-978
- Sadler I., Crawford A.W., Michelsen J.W., Beckerle M.C. (1992): Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. J. Cell. Biol. 119: 1573-1587
- Sanchez-Garcia I., Rabbitts T.H. (1993):LIM domain proteins in leukemia and development. Sem Cancer Biol 4: 349-358
- Sanchez-Garcia I., Rabbitts T.H. (1994): The LIM domain: a new structural motif found in zincfinger-like proteins. TIG 10: 315-320
- Sauer F., Jäckle H., (1993): Dimerization and the control of transcription by krüppel. *Nature* 364: 454-457
- Schmeichel K.L., Beckerle M.C. (1994): The LIM domain is a modular protein-binding interface. Cell 79: 211-219

Schmizu A., Honjo T.(1984): Immunoglobulin class switching. Cell 36:801-803

Schwabe J. W.R., Rhodes D. (1991): Beyond zinc fingers: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends biochem. sci.* 16: 291-296

- Senkevich T.G., Muravnik G.L., Pozdnyakov S.G., chizhikov V.E., ryazankina O.I., shchelkunov S.N., Koonin E.V., Chernos V.I. (1993): Nucleotide sequence of Xho I O fragment of ectromelia virus DNA reveals significant differences from vaccinia virus. *Virus Res.* 30: 73-88
- Seto M., Yamamoto K., Lida S., Akao Y., Utsumi R., Kubonishi I., Miyoshi I., Ohtsuki T., Ywata Y., Namba M., Motokura T., Arnold A., Takashashi T., Ueda R. (1992): Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy witht(11;14)(q13;q32) translocation. Oncogene 7: 1401-1406
- Shaknovich R., English M.A., Melnick A., LIJ.Y., Weiland S., Tarcsafalvi A., Waxman S., Licht J.D. (1994): The chimeric PLZF-RAR α fusion protein oft(11;17) APL is an aberrant RAR that interferes with wild type RAR α function. *Blood* 84 suppl 1: 441
- Shtivelman E., Lifshitz B., Gale R.P., Canaani E. (1985): Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 315: 550-554
- Smith G.R. (1983): Chi hotspots of generalized recombination. Cell 34: 709-710.
- Soeller W.C., Euk Oh C., Kornberg T.B. (1993): Isolation of cDNAs encoding the Drosophila GAGA transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7961-7970
- Sugawara M., Scholl T., Ponath P.D., Strominger J.L. (1994): A factor that regulates the Class II Major Histocompatibility complex gene DPA is a member of a subfamily of zinc finger proteins that includes a drosophila developmental control protein. *Mol. Cell. Biol.* 14: 8438-8450

Sulton J. et al. (1992): The C. elegans genome sequencing project: a beginning. Nature 356: 37-41

- Szostecki C., Guldner H.H., Netter H.J., Will H. (1990): Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients from patients with primary biliary cirrhosis. J. Immunol. 145:4338-4347
- Tagawa M., Sakamoto T., Shigemoto K., Matsubaru H., Tamura Y., Ito T., Nakamura I., Okitsu A., Imai K., Taniguchi M. (1990): Expression of a novel DNA-binding protein with zinc finger structure in various tumor cells. J. Biol. Chem. 265: 20021-20026
- Takeuchi J., Ochi H., Han T., Ozer H., Henderson E.S., Sandberg A.A. (1985): Clonal chromosome abnormalities in prison-acquired lymphoproliferative syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet*. 15: 7-16
- TartofK.D., Bremer M. (1990): Mechanisms for the construction and developmental control of heterochromatin formation and imprinted chromosome domains. *Development* (Suppl): 35-45
- Taub R., Kirsch C., Morton C., Lenoir G., Swan D., Tronick S., Saaronson S., Leder P. (1982): Translocations of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* 79: 7837-7841
- Taub R., Moudling C., Battey J., Murphy W., Wasicek T., Lenoir G.M., Leder P. (1984): Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in the Burkitt lymphoma cells. *Cell* 36:

- Taylor M.E., Conary J.T., Lennartz M.R., Stahl P.D., Drickamer K. (1990): Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains. *J.Biol. Chem.* 265 : 12156-12162
- Thompson C.C., Brown T.A., Mc Knight S.L. (1991): Convergence of Ets- and Notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science* 253: 762-768
- Thummel C. (1989): The drosophila E74 promoter contains essential sequences downstreamfrom the start site of transcription. *Genes & Dev.* 3: 782-792
- Tilney L.G. (1975): Actin filaments in the acrosomal reaction of Limulus sperm motion generated by alternations in the packing of the filaments. J. Cell. Biol. 64: 289-310
- Tkachuk D., Kohler S., Cleary M.L. (1992): Involvement of a homolog of drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71: 691-700
- Tonegawa S.(1983): Somatic generation of antibody diversity. Nature 302:575-581
- Tong J.H., Dong S., Geng J.P., Huang W., Wang Z.J., Sun G.L., Chen S.J., Chen Z., Larsen C.J., Berger R. (1992): Molecular rearrangements of the MYL gene in acute promyelocytic leukemia (APL, M3) define a breakpoint cluster region as well as some molecular variants. Oncogene. 7: 311-316
- Topol J., Dearolf C.R., Prakash K., Parker C.S. (1991) : Synthetic oligonucleotides recreate Drosophila fushi tarazu zebra-stripe expression. *Genes & Dev.* 5 : 855-867
- Tsujimoto Y. (1989): Stres-resistance conferred by high level of bcl-2 a protein in human B lymphoblastoid cell. Oncogene 4:1331-1336
- Tsujimoto Y., Jaffe E., Cossman J., Gorham J., Nowell P.C., Croce C.M. (1985): Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11,14) chromosome translocation. *Nature* 315:340-343
- Tsukiyama T., Becker P.B., Wu C. (1994): ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. *Nature* 367: 525-532
- Upton C., Macen J.L., Wishart D.S., McFadden G. (1990): Myxoma virus and malignant rabbit fibroma virus encode a serpin-like protein important for virus virulence. Virology 179: 618-631
- Van Den Berghe H. (1989): Chromosomes in plasma-cell malignancies. Eur J Haematol Suppl. 51 : 47-51
- Van Den Berghe H., Vermaelen K., Louwagie A., Criel A., Mecucci C., Vaerman J.P. (1984): High incidence of chromosome abnormalities in IgG3 myeloma. Cancer Genet Cytogenet 11:381
- van der Lugt N.M.T., Domen J., Linders K., van Roon M., Robanus-Maandag E., te Riele H., van der Valk M., Deschamps J., Sofroniew M., van Lohuizen M., Berns A. (1994): Posterior

transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto-oncogene. Genes & Dev. 8:757-769

- van Lohuizen M., Verbeek S., Scheijen B., Wientjens E., van der Gulden H., Berns A. (1991): Identification of cooperating oncogenes in Em-myc transgenic mice by provirus tagging. *Cell* 65: 737-752
- VandenbergheE., De Wolf-Peeters C., Van Den Oord J., Wlodarska I., Delabie J., Stul M., Thomas J., Michaux J.L., Mecucci C., Cassiman J.J., Van Den Berghe H. (1991): Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. JPathol 163: 13
- Vaux D., Cory S., Adams J. (1988): Bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335: 440-442
- Von Kalm L., Crossgrove K., Von Seggern D., M Guild G., Beckendorf S.K. (1994): The Broad -Complex directly controls a tissue-specific response to the steroid ecdysone at the onset of drosophila metamorphosis. *EMBO J.* 13: 3505-3516
- Wadman I., Li J., O.Bash R., Forster A., Osada H., Rabbitts T.H., Baer R. (1994): Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO* J 13: 4831-4839
- Warren A.J., Colledge W.H., Cariton M.B.L., Evans M.J., Smith A.J.H., Rabbitts T.H. (1994): The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* 78: 45-57
- Way M., Sanders M., Garcia C., Sakai J., Matsudaira P. (1995): Sequence and domain organization of Scruin, an actin-cross-linking protein in the acrossmal process of Limulus sperm. J.Cell. Biol. 128: 51-60
- Weintraub H. (1993): The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. Cell 75: 1241-1244
- Weis K., Rambaud S., Lavau C., Jansen J., Carvalho T., Carmo-Foseca M., Lamond A., Dejean A. (1994): Retinoic acid regulates aberration nuclear localization of PML-RARa in acute promyelocytic leukemia cells. Cell 76: 345-356
- Weiss L.M., Warnke R.A., Sklar J., Cleary M.L. (1987): Molecular analysis of the t(14;18) chromosome translocation in malignant lymphoma N. Engl. J. Med. 317:1185
- Whyatt D.J., deBoer E., Grosveld F. (1993): The two zinc finger-like domains of GATA-1 have different DNA binding specificities. *EMBOJ*. 12: 4993-5005
- Williams M.E., Meeker T.C., Swerdlow S.H. (1991): Rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus in centrocytic lymphoma: Analysis with multiple breakpoint probes. *Blood* 78: 493-498
- Williams M.E., Westermann C.D., Swerdlow S.H. (1990): Frequent rearrangement of the chromosome 11 bcl-1 locus lymphomas. *Blood* 76: 1387-1391
- Wilson R., et al. (1994): 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of C. elegans. *Nature* 368: 32-38

- Wisdom R., Verma I.M. (1993): Proto-oncogene FosB: the amino terminus encodes a regulatory function required for transformation. *Mol. Cell. Biol.* 13: 2635-2643
- Withers D.A., Harvey R.C., Faust J.B., Melnyk O., Carey K., Meeker T.C. (1991): Characterization of a candidate bcl-1 gene. *Mol Cell Biol* 11: 4846-4853
- Wright D.B., Binder M., Funk W. (1991): Cyclic amplification and selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4104-4110
- Wulczyn F.G., Naumann M., Scheidereit C. (1992): Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NFkB. *Nature* 358: 597-599
- Xie K., Lambie E.J., Snyder M. (1993): Nuclear dot antigen may specify transcriptional domains in the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6170-6179
- Xiong W-C., Montell C. (1993) : tramtrack is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the drosophila eye. Genes & Dev. 7: 1085-1096
- Xue F., Cooley L. (1993): Kelch encodes a component of intercellular Bridges in Drosophila egg chambers. Cell 72: 681-693
- Ye B.H., Lista F., Lo Coco F., Knowles D.M., Offit K., Chaganti R.S.K., Dalla-Favera R., (1993b): Alterations of a Zinc Finger-Encoding Gene, BCL6, in Diffuse Large-Cell Lymphoma Science 262:747-750.
- YeB.H., Rao P.H., Chaganti R.S.K., Dalla-Favera R. (1993a): Cloning of bcl6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res.* 53: 2732-2735
- YueL., Spradling A. (1992): hu-li tai shao, a gene required for ring canal formation during Drosophila oogenesis, encodes a homolog of adducin. Genes & Dev. 6: 2443-2454
- Zervos A.S., Gyuris J., Brent R. (1993): Mxi-1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72: 223-232
- Zollman S., Godt D., Privé G.G., Couderc J.L., Laski F.A. (1994): The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10717-10721

