

Jean Rommelaere

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

LILLE I

N°

THESE

pour l'obtention du grade de

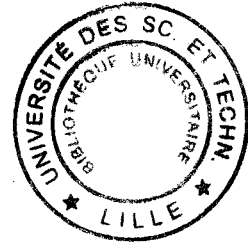
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE I

Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue publiquement

par Laurent DELEU

le 2 juillet 1998



Titre

L'activation de la transcription des gènes du virus minute de la souris (MVMp) participe à la dépendance de ce parvovirus vis-à-vis de la prolifération et de la transformation de la cellule hôte.

Directeur de thèse:

Prof. Jean ROMMELAERE

JURY

Prof. Perrine CAILLET-FAUQUET

, Président Prof. Philippe DELANNOY

Prof. Angel ALONSO

Prof. Bernhard HIRT

Prof. Dominique STEHELIN

SOMMAIRE

| | |
|---|------------|
| RESUME | v |
| SUMMARY | x |
| ABBREVIATIONS | xiv |
| 1 INTRODUCTION | 16 |
| 1.1 Biologie des Parvovirus | 16 |
| 1.1.1 Les Parvovirus au sein de la famille des Parvoviridae | 16 |
| 1.1.2 Pathogénie des Parvovirus | 18 |
| 1.1.3 Le parvovirus MVM | 20 |
| 1.1.3.I Cycle lytique | 21 |
| 1.1.3.I.a De l'entrée du virus à sa décapsidation | 21 |
| 1.1.3.I.b Conversion et expression du génome: des étapes dépendantes de la phase S? | 23 |
| 1.1.3.II Organisation génomique | 24 |
| 1.1.3.II.a Expression des gènes parvoviraux | 24 |
| 1.1.3.II.b Epissage des ARN messagers | 28 |
| 1.1.3.III Les protéines parvovirales | 30 |
| 1.1.3.III.a Les protéines non structurales | 30 |
| 1.1.3.III.b Les protéines structurales et l'assemblage des capsides | 36 |
| 1.1.3.IV La réplication de l'ADN simple brin | 38 |
| 1.1.4 Oncotropisme des Parvovirus | 41 |
| 1.1.4.I Historique | 41 |
| 1.1.4.II Modèle animal | 41 |
| 1.1.4.III Modèle <i>in vitro</i> de l'oncosuppression: l'oncolyse | 42 |
| 1.1.5 Utilisation des Parvovirus en thérapie génique | 45 |
| 1.1.5.I Les AAV comme vecteurs | 45 |
| 1.1.5.II Intérêt des parvovirus autonomes | 45 |
| 1.2 Contrôle du cycle cellulaire | 48 |
| 1.2.1 Activités des complexes cycline / kinase dépendante des cyclines | 48 |
| 1.2.1.I Rôle des cyclines dans le contrôle du cycle cellulaire | 48 |
| 1.2.1.II Activation du complexe cycline/cdk | 52 |
| 1.2.1.III Actions successives des cyclines | 54 |
| 1.2.1.III.a Dégradation des cyclines par le réseau de l'ubiquitine | 58 |
| 1.2.1.III.b Fonctions des cyclines D et E, cyclines de phase G1 | 58 |
| 1.2.1.III.c Cyclines de phases S et G2 | 60 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 1.2.1.IV | Rôle des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CKI) dans le contrôle du cycle cellulaire | 62 |
| 1.2.1.IV.a | Identification des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines | 62 |
| 1.2.1.IV.b | Les CKI des cellules de mammifères | 63 |
| 1.2.1.IV.c | Mode d'action des CKI | 65 |
| 1.2.1.IV.d | Phénotypes des souris dont les gènes des CKI ont été supprimés | 67 |
| 1.2.2 | Expression des gènes de phase S | 71 |
| 1.2.2.I | Les facteurs de transcription E2F/DP | 72 |
| 1.2.2.I.a | Activité du dimère E2F/DP | 72 |
| 1.2.2.I.b | Association avec d'autres facteurs de transcription? | 76 |
| 1.2.2.II | Autres activateurs des gènes de phase S. | 77 |
| 1.3 | La transformation par ras et l'activation transcriptionnelle | 79 |
| 1.3.1 | La protéine Ras et le cycle cellulaire | 79 |
| 1.3.2 | Ras et la transmission des signaux | 79 |
| 1.3.3 | Les protéines de la famille CREB | 85 |
| 1.3.3.I | La famille des protéines à domaine bZIP | 85 |
| 1.3.3.II | Activation des facteurs ATF/CREB | 88 |
| 1.4 | Objectifs du travail de thèse | 93 |
| 2 | RESULTATS | 94 |
| 2.1 | Identification d'éléments de régulation de la transcription en amont du promoteur P4 du virus minute de la souris. | 94 |
| 2.1.1 | Résumé | 94 |
| 2.1.2 | Article 1 | 95 |
| 2.1.3 | Discussion | 100 |
| 2.2 | Des motifs CREs distaux participent à l'activité basale du promoteur P4 et à sa stimulation dans les cellules transformées par ras. | 102 |
| 2.2.1 | Résumé | 102 |
| 2.2.2 | Article 2 | 105 |
| 2.2.3 | Discussion | 115 |
| 2.2.3.I | Nature des protéines activant le promoteur P4 dans les cellules transformées par Ras | 115 |
| 2.2.3.II | Une action coopérative des éléments CRE? | 116 |
| 2.2.3.III | Quel est l'effet du dbAMPc sur les cellules normales? | 116 |
| 2.2.3.IV | L'activation du promoteur P4 via des éléments CRE en réponse à la transformation par ras est-elle un cas particulier? | 117 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 2.3 | <i>Le site proximal de fixation pour des protéines de la famille Ets (EBS) contribue à l'activation du promoteur P4 dans les cellules transformées par l'oncogène ras.</i> | 118 |
| 2.3.1 | Résumé | 118 |
| 2.3.2 | Article 3 | 120 |
| 2.3.3 | Discussion | 129 |
| 2.3.3.I | La boîte GC et l'activation synergique du promoteur P4. | 129 |
| 2.3.3.II | Activation du promoteur P4 en réponse à la transformation cellulaire par l'oncogène <i>ras</i> | 129 |
| 2.4 | <i>L'état de prolifération des cellules hôtes est un élément régulateur de l'activité du promoteur P4</i> | 132 |
| 2.4.1 | Résumé | 132 |
| 2.4.2 | Article 4 | 134 |
| 2.4.3 | Discussion | 145 |
| 2.4.3.I | Activation du promoteur P4 en phase S par les facteurs de transcription E2F/DP | 145 |
| 2.4.3.II | Inhibition du promoteur P4 dans des cellules à confluence | 146 |
| 2.5 | <i>L'activation du promoteur P4 est nécessaire à la réplication du virus en phase S</i> | 148 |
| 2.5.1 | Résumé | 148 |
| 2.5.2 | Article 5 | 150 |
| 2.5.3 | Discussion | 170 |
| 3 | DISCUSSION GÉNÉRALE | 172 |
| 3.1 | <i>Activation du promoteur P4 dans les cellules transformées par l'oncogène ras</i> | 172 |
| 3.2 | <i>Le rôle des éléments CRE dans l'activité du promoteur P4</i> | 176 |
| 3.3 | <i>Activation du promoteur P4 en phase S</i> | 177 |
| 3.4 | <i>Perspectives</i> | 178 |
| | RÉFÉRENCES | 184 |
| | ANNEXE | 200 |

RESUME

L'activation de la transcription des gènes du virus minute de la souris (MVMp) participe à la dépendance de ce *parvovirus* vis-à-vis de la prolifération et de la transformation de la cellule hôte.

Le génome des *Parvovirus* consiste en une molécule d'ADN linéaire monocaténaire d'environ $5,1 \cdot 10^3$ nucléotides. L'ADN est compacté au sein d'une capsidie icosaédrique de 25 nm de diamètre dépourvue d'enveloppe. Du fait de leur capacité codante réduite, ces virus sont contraints à utiliser diverses protéines cellulaires pour leur propagation. La réplication des *Parvovirus* est restreinte à des cellules en prolifération et peut être stimulée par suite de la transformation oncogénique de ces cellules. Le génome du *Parvovirus* minute de la souris (MVMp) se divise en deux unités de transcription, dirigées par les promoteurs P4 et P38 et codant respectivement pour les protéines non-structurales (NS) et de capsides (VP). Les protéines NS sont essentielles au cycle lytique du virus. D'une part leurs activités biochimiques d'hélicase, de liaison spécifique et de coupure simple brin de l'ADN permettent la réplication de l'ADN parvoviral et d'autre part leurs propriétés d'activateur et de répresseur de la transcription sont nécessaires au contrôle de l'expression des gènes viraux et cellulaires. L'ensemble des fonctions de NS1 pourrait participer à l'effet cytotoxique du virus dont ces protéines sont le médiateur. L'expression des messagers codant les protéines NS est un élément clef pour le cycle lytique du parvovirus MVMp. Par exemple le taux de protéines NS dans des fibroblastes de rat transformés par l'oncogène *ras* (FREJ4) conditionne le niveau de sensibilité de ces cellules à l'effet cytotoxique du virus.

L'étude du promoteur P4 et des mécanismes moléculaires contrôlant son activité font l'objet de ce travail de thèse. Des travaux préalablement réalisés dans le laboratoire ont montré que le promoteur P4 est activé d'un facteur environ 5 dans les fibroblastes de rat transformés par *ras* (FREJ4) par rapport aux cellules équivalentes non transformées (FR3T3). Par des expériences d'empreintes sur ADN nous avons identifiés les motifs du promoteur P4 susceptibles de fixer des complexes protéiques. Cette étude a révélé l'existence de 5 éléments, en amont des boîtes GC et TATA du promoteur, participant toutes à l'activité de P4 dans les

cellules FREJ4. La comparaison des empreintes obtenues suivant que les expériences sont réalisées avec des extraits protéiques de cellules FR3T3 ou FREJ4 nous a montré la fixation différentielle de protéines sur certaines de ces séquences d'ADN en fonction de l'état de transformation de la cellule. Nous avons ainsi poursuivi l'étude du promoteur P4 en déterminant la nature des facteurs de transcription se liant aux motifs d'ADN identifiés et leur(s) modification(s) en réponse à l'expression de l'oncogène *ras*.

Les expériences d'empreintes sur ADN ont montré que deux motifs de réponse à l'AMP cyclique (CRE) situés en amont du promoteur sont occupés de façon différente dans les cellules FREJ4 par rapport aux cellules FR3T3. Les motifs CRE sont situés au sein de l'extrémité palindromique du promoteur P4. Ils sont ainsi images l'un de l'autre. Nous avons montré, à l'aide d'expériences de modification de mobilité électrophorétique sur gel de polyacrylamide (EMSA), que les éléments CRE fixent des facteurs de transcription de la famille ATF/CREB avec des affinités similaires. Trois complexes majeurs ont été observés, dans l'ordre respectif de capacité à retarder la migration de la sonde d'ADN: un homodimère des protéines CREB, un hétérodimère ATF1/CREB et enfin un hétérodimère entre le facteur ATF1 et une protéine qui n'a pas pu être identifiée. Dans les cellules transformées ce dernier complexe est majoritaire alors qu'il est minoritaire dans les cellules normales. Les facteurs de transcription de la famille ATF/CREB sont activés par phosphorylation, notamment d'un résidu sérine au sein d'un domaine appelé boîte de phosphorylation. La protéine kinase A (PKA) est susceptible de phosphoryler ce résidu et d'activer les protéines ATF/CREB. L'activité de la PKA est réduite dans les cellules FREJ4 par rapport aux cellules FR3T3. Le traitement d'extraits de cellules FREJ4 par la sous unité catalytique de la PKA modifie la distribution des complexes ATF/CREB, en expérience d'EMSA avec une sonde radioactive couvrant un élément CRE, de telle sorte qu'elle ne soit plus distinguable de celle obtenue avec des extraits de cellules FR3T3 dans les mêmes expériences. L'activation de la PKA dans les cellules FREJ4, après traitement au dibutyril AMPc, réduit l'activité du promoteur P4 à un niveau équivalent de celui mesuré dans les cellules FR3T3. Ces résultats montrent que l'hyper activité du promoteur P4 dans les cellules FREJ4 peut être corrélée à une activité réduite de la PKA dans ces cellules et à une fixation différentielle des facteurs de transcription de la famille ATF/CREB probablement liée à leur état de phosphorylation.

La région proximale du promoteur P4 comporte une boîte TATA, une boîte GC et des motifs de fixations pour des facteurs de transcription des familles Ets (EBS) et E2F. Il a été préalablement montré que la mutation de cette région réduit l'activité du promoteur de 80% par rapport à celle du promoteur sauvage. Nous avons cherché à déterminer les protéines fixées sur ces éléments et responsables de l'activité basale de P4 dans de nombreux types cellulaires. La boîte GC permet la fixation du facteur de transcription Sp1 et de trois isoformes de Sp3. L'expression du facteur Sp1 dans des cellules d'insecte qui sont dépourvues de celui-ci, active le promoteur P4, comme nous avons pu le mesurer à l'aide du gène rapporteur *luciférase* placé sous le contrôle de P4. Les expériences d'EMSA ont également montré que le facteur de transcription Ets se fixe sur le site EBS avec une faible affinité à moins que la sonde utilisée couvre les deux sites EBS et boîte GC. Cette fixation coopérative des facteurs Ets et Sp1 se traduit par l'activation du promoteur P4 de façon synergique par ces facteurs de transcription. Dans les cellules d'insectes l'activité du promoteur P4, lorsque ceux-ci sont co-exprimés, est supérieure à la somme de celles mesurées lorsque les facteurs sont exprimés indépendamment. Enfin nous avons pu montrer que le site EBS participe à l'hyper activité de P4 dans les cellules transformées par *ras*. Lorsque la protéine Ras est exprimée dans des cellules FR3T3, le promoteur P4 est activé d'un facteur 5, par contre si le site EBS est muté cette activation est réduite à un facteur compris entre 2 et 3. L'hyperactivité du promoteur P4 dans les cellules FREJ4 est donc la résultante de son activation via les éléments CRE et EBS dans ces cellules.

Les parvovirus sont dépendants de cellules en prolifération pour leur réplication. Il a été montré que des facteurs cellulaires exprimés transitoirement en début de la phase S sont essentiels au cycle viral. Nous avons émis l'hypothèse de travail suivante: l'activité du promoteur P4 restreinte à la phase S ne permettrait l'expression des protéines virales que lors de cette phase. Ces protéines étant essentielles à la réplication des parvovirus celle-ci ne pourrait se produire que lorsque les protéines virales sont exprimées, c'est à dire en phase S. Cette hypothèse a été avérée en mesurant l'activité du promoteur P4, à l'aide du gène rapporteur *luciférase*, dans des cellules parcourant de façon synchrone les différentes phases du cycle cellulaire. Nous avons ainsi montré que lorsque les cellules entrent en phase S, le promoteur P4 est sur activé. Son activité est faible, mais non nulle, en phases G1 et G2. L'activation du promoteur P4 à la transition entre les phases G1 et S est dépendante du motif

E2F au sein de la région proximale. Les expériences d'EMSA ont montré que cette activation correspond à la fixation de protéines E2F/DP "libres", c'est à dire non liées à des protéines ayant un domaine poche homologue à celui de la protéine du rétinoblastome. L'inactivation est corrélée à la fixation de ces protéines "poches", p130 en G1 et p107 en fin de phase S, à l'hétérodimère de facteurs de transcription E2F/DP.

Lorsque les cellules sont arrêtées en phase G0 par inhibition de contact, nous avons pu mettre en évidence un mécanisme conduisant à la répression du promoteur P4 dont les motifs CRE sont les médiateurs. Une inhibition similaire est observée lorsque l'inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines (CKI) p27 est sur exprimé dans des cellules en croissance. La protéine p27 apparaît stabilisée dans des cellules à confluence. Cette inhibition n'est pas observée lors de la sur expression des CKI p16 et p21. La protéine p27 se distingue ainsi des autres CKI par cette nouvelle fonction. Des promoteurs minimaux, constitués de la boîte TATA et de la région initiatrice de transcription du promoteur P4, ne sont réprimés par la sur expression de la protéine p27, uniquement si au moins deux éléments CRE sont présents en amont de la boîte TATA. Ces résultats suggèrent que la protéine p27 pourrait inhiber une action coopérative des éléments CREs.

L'importance de la régulation de l'activité du promoteur P4 pour le cycle viral a finalement été évaluée à l'aide de virus mutés au niveau des éléments EBS (mEts) et E2F (mE2F). Ceux-ci ont été choisis pour leur participation à l'activité du promoteur P4 en réponse, respectivement, à la transformation par *ras* et au cycle cellulaire. Si le mutant mEts se réplique aussi efficacement que le virus sauvage dans des cellules permissives, le mutant mE2F, au contraire, est incapable de produire des particules virales. L'étude de la réplication et de la transcription de l'ADN viral révèle que l'ADN du virus mE2F n'est pas répliqué bien que les gènes viraux soient exprimés. L'expression des protéines virales NS, sous le contrôle des régions terminales répétées du cytomégalovirus, à un niveau élevé et indépendant de l'état de prolifération des cellules, permet la réplication du mutant et la production de particules virales. Ces virus peuvent infecter des cellules permissives mais sont incapables de s'y répliquer, vraisemblablement du fait d'un taux insuffisant des protéines NS. Ces résultats montrent l'importance de l'activation du promoteur P4 à la transition entre les phases G1 et S qui permet d'expliquer, du moins en partie, la dépendance du virus MVMp vis à vis de la phase S.

L'étude de la régulation du promoteur P4 en fonction de la transformation et du cycle cellulaire nous a permis de mieux comprendre les interactions entre les parvovirus et la cellule hôte, en particulier dans le contexte de l'oncotropisme et de la dépendance vis-à-vis du cycle cellulaire manifestés par ce virus. L'identification dans le promoteur viral précoce d'éléments de réponse à l'oncogène *ras* ouvre la voie au développement de nouveaux vecteurs parvoviraux dont la spécificité d'expression de gènes thérapeutiques dans les cellules tumorales est accrue. La simplicité de l'organisation génomique des parvovirus nous a également permis leur utilisation comme sonde afin d'identifier des mécanismes de contrôle de l'expression génique au cours du cycle cellulaire, en particulier une répression propre aux cellules quiescentes. A ce titre, le parvovirus constitue également un système modèle de choix pour l'identification de facteurs cellulaires impliqués dans le contrôle de la réplication de l'ADN génomique en fonction du cycle cellulaire.

SUMMARY

The activation of Minute Virus of Mice (MVM) gene expression is a component of the dependence of this *parvovirus* on the proliferation and differentiation state of the host cell.

The parvoviral genome consists of a single-stranded linear DNA of around 5100 nucleotides. The DNA is inside of a non-enveloped icosahedral capsid, which diameter is around 25 nm. According to this reduced coding capacity, the virus life cycle depends on several cellular proteins. The virus replication is restricted to cells in a proliferative state and is stimulated in transformed cells. The genome of the parvovirus MVMp is divided into two transcriptional units, that code for the non-structural (NS) and the capsid proteins (VP) and are controlled by the promoters P4 and P38, respectively. The NS proteins are essential for the viral life cycle. Their biochemical activities of helicase, nickase and site specific DNA binding, are required for the DNA replication. Their transcriptional properties allow the activation and/or repression of viral and cellular genes. All together the functions of NS proteins may take part in the cytotoxic effect of the parvovirus MVMp that they mediate. The activation of the promoter P4, directing the transcriptional unit coding for the NS proteins, is a key event for the lytic cycle of the virus. It is noteworthy that the level of NS proteins in *ras*-transformed rat fibroblasts (FREJ4) correlates to the killing effect of MVMp in this cell line.

We have focused our study on the analysis of promoter P4 and of the molecular mechanisms that control his activity. Previous work in the laboratory showed that P4 promoter is hyper activated in *ras*-transformed cells (FREJ4) compared to the non transformed equivalent FR3T3. Footprints experiments realized *in vivo* and *in vitro* lead to the identification of 5 upstream elements that participate to the P4 activity in FREJ4 cells. The comparison of the results obtained with protein extracts prepared from FR3T3 or FREJ4 showed that several motifs interact with cellular proteins differentially according to the transformation state of the cell. We have tried to characterize the transcription factors bound to these motifs and their modification associated to the *ras*-transformation of the cells.

Two upstream P4 CREs proved to be differentially protected in FREJ4 compared to FR3T3 cells, as shown by footprint experiments *in vivo* and *in vitro*. The CREs are mirror of each other due to their localization in the palindromic sequences of the promoter. Electrophoretic mobility gel shift assays showed that the CREs bind three specific protein complexes. The first complex is an homodimer of CREB, the second an heterodimer of ATF1 and CREB and the last one an heterodimer of ATF1 and a yet unknown protein. This complex is more abundant when EMSA are performed with protein extracts of FREJ4 compared to protein extracts of FR3T3 cells. Transcription factors of the ATF/CREB family are activated by phosphorylation, mainly of a residue Serine located within a domain called phosphorylation box. The protein kinase A (PKA) is able to phosphorylate this Serine and therefore to activate the transcription factors of the ATF/CREB family. The PKA activity measured in FREJ4 was reduced compared to FR3T3 cells. In EMSA using a radioactive oligonucleotide covering the CRE sequence, the pattern obtained with extracts of FREJ4 cells treated with the catalytic subunit of the PKA is indistinguishable of this obtained with extracts of FR3T3 cells. Activation of the PKA in FREJ4 cells, after treatment with dibutyryl cAMP, induces a reduction of P4 activity to a level similar to this measured in FR3T3 cells. All together our results show that P4 hyper activity in FREJ4 cells is correlated to a reduced activity of the PKA in these cells and therefore to a differential binding of ATF/CREB proteins to the CREs, probably function of their phosphorylation state.

The proximal region of promoter P4 corresponds to a GC and a TATA box, and binding sites for transcription factors of the Ets (EBS) and E2F families. It was previously shown that mutations in this region reduces the activity of the mutant of 80% compared to the wild type.. We tried to determine the cellular proteins binding to those elements and involved in the promoter basal activity in numerous cell types. The GC box binds the transcription factor Sp1 and three isoforms of Sp3. In insect cells, lacking the Sp1 protein, the cotransfection of an expression vector for Sp1 and a plasmid carrying the *luciferase* gene under the control of P4, show that Sp1 alone can activate the promoter P4. The fixation of Ets on the EBS is dependent on the fixation on Sp1 on the adjacent GC box, as we could see it by EMSA. This is reflected in the synergistic activation of promoter P4 by these transcription factors. In insect cells, promoter P4 activity, when both Sp1 and Ets are expressed, is stronger than the sum of the activities measured when these proteins are independently expressed. We have further

shown that the EBS participates to the P4 hyper activity in *ras*-transformed cells. When Ras is expressed in the rat fibroblasts FR3T3, P4 activity increases of 5 fold, this factor is reduced to 2 fold if the EBS is mutated. P4 promoter hyper activity in transformed cells results from his activation mediated via both CREs and EBS.

The replication of parvoviruses is dependent on the proliferative state of the host cell. It was previously shown that cellular factors, transiently expressed at the S phase onset, are necessary for the viral life cycle. Our work hypothesis is that the P4 activity restricted to the S phase would only permit expression of the NS protein in S phase. NS proteins are essential for the viral replication, that could only occur when they are expressed, which means at the S phase onset. We have measured the activity of P4 promoter in synchronously growing FR3T3 cells, using the *luciferase* reporter gene. We have shown that P4 promoter is in deed activated at the G1/S transition. His activity in the G1 and G2 phases is weak but detectable. P4 promoter activation at the S phase onset depends on the proximal E2F motif. By EMSA we have correlated the activation in S phase to the binding of 'free' E2F/DP on this site. E2F/DP are considered 'free' when they are not associated with pocket proteins homologous to the protein of the Retinoblastom (pRb). Inactivation of the promoter is due to the neutralization of the transcriptional activity of E2F/DP by the pocket proteins p130, in G1, and p107 in late S, G2.

When cells are grown to high density, we have revealed a mechanism leading to the promoter repression mediated by the CREs. A repression similar is observed when the cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) p27 is overexpressed in proliferative FR3T3 cells. p27 is stabilized in confluent cells. No inhibition was observed when other CKIs (p16 and p21) were expressed. Therefore p27 can be distinguished from the other CKI through this new function. Minimal promoter constructs, corresponding to the TATA box and the leader region of promoter P4, are only repressed when they comport at least one repeat of CREs upstream of the TATA box. These results suggest that p27 may prevent a cooperative activation of promoters via the CREs.

The relevance of the control of promoter P4 activity for the viral cycle was assessed in using mutant viruses derivatives, bearing point mutation in the EBS (mEts) or E2F site (mE2F). These sites were respectively selected for their role in the P4 response to the cell

transformation and cycle. The virus mEts replicates as efficiently as the wild type, however the mE2F virus was defective. After analysis of replication and transcription of the viral genome we observed that the viral products are expressed but the DNA can not be replicated. When NS proteins are provided in trans, under the control of the long terminal repeat of the cytomegalovirus, the mE2F virus can replicate and form virus progeny. These viruses can transduce permissive cells but their DNA can not be replicated, presumably due to an insufficient level of NS proteins. Our results show the importance of P4 promoter activation at the S phase onset, which may explain, at least in part, the S phase dependence of the virus MVMp.

The study of P4 promoter regulation in response to cell transformation and cycle, help us to unravel the interactions between the parvovirus and the host cell. Particularly in the context of the viral oncotropism and S phase dependence. The identification of motifs responsive to *ras* on the P4 promoter may lead to the development of new parvoviral vectors, with an increased tumor specific expression of therapeutic genes. The simplicity of the genomic organization of parvoviruses, allowed us to use them as a probe in order to identify cellular controls of gene expression through the cell cycle. Therefore we believe that parvoviruses may serve as a model for the identification of cellular factors involved in the control of genomic DNA replication as a function of the cell cycle.

ABBREVIATIONS

| | |
|--------|--|
| AAV | Adeno-Associated Virus |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| ADV | Aleutian mink Disease parvoVirus |
| AMPc | Adénosine MonoPhosphate cyclique |
| ARN | Acide RiboNucléique |
| ATF | Activating Transcription Factor |
| ATM | Ataxia-Telangiectasia Mutated |
| ATP | Adénosine Tri-Phosphate |
| B19 | Parvovirus humain |
| BCL-1 | B Cell Lymphoma susceptibility gene |
| BRCA1 | BReast CAncer susceptibility gene |
| bZIP | Basic-domain-leucine ZIPper |
| CAK | Cdk-Activating Kinase |
| CamK | Calmoduline Kinase |
| Cap | Protéine de Capside |
| CASP-1 | CASPase 1 |
| CBP | CREB Binding Protein |
| cdc | Cell Division Control |
| CDE | Cell cycle Dependent Element |
| CDF | CDE-CHR binding Factor |
| cdk | Cyclin-Dependent Kinase |
| ADNc | ADN complémentaire à l'ARN messenger |
| CHR | Cell cycle genes Homology Region |
| CIP | CDK-Interacting Protein |
| CK | Caseine Kinase |
| CKI | Cdk Inhibitor |
| CPP32 | Cystéine Protéase p32 |
| CREB | CRE-Binding protein |
| CREM | CRE Modulator protein |
| Da | Dalton |
| dbcAMP | dibutyril cyclic AMP |
| DHFR | DiHydroFolate Reductase |
| EMSA | Electrophoretic Mobility gel Shift Assay |
| ERK | Extracellular signal-Regulated Kinase |
| GAP | GTPase-Activating Protein |
| Grb | Growth factor receptor-bound protein |
| HiNF | Histone Nuclear Factor |
| ICE | Interleukin-1 β Converting Enzyme |
| IL-2 | Interleukin 2 |
| INK | Inhibitor of Cdk |
| Inr | Initiator element |
| ITR | Inverted Terminal Repeat |
| JNK | Jun N-terminal Kinase |
| kb | kilobases |
| KIP | Kinase Interacting Protein |
| MAPK | Mitogen Activated Protein Kinase |

| | |
|--------------|--|
| Mat | Ménage à trois |
| MEK | MAPK/Erk Kinase |
| MEKK | MEK Kinase |
| MVM | Minute Virus of Mice, MVMp souche prototype, MVMi variant lymphotrope |
| NFkb | Nuclear Factor kb |
| NF-Y | Nuclear Factor-Y |
| NPAT | Nuclear Protein mapped to the AT locus |
| NS | Protéine Non-Structurale |
| nt | nucléotide |
| P/CAF | p300/CBP-Associated Factor |
| PAR | Proline and Acid Rich domain |
| PCNA | Proliferating Cell Nuclear Antigen |
| PDH | Perte d'Hétérozygotie |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-Kinase |
| PIF | Parvovirus Initiation Factor |
| PKA | Protein Kinase A |
| PKC | Protein Kinase C |
| PP | Protein Phosphatase |
| pRb | protéine du Rétinoblastome |
| Rep | protéine non-structurale du virus AAV |
| Rsk | Ribosomal S6 kinase |
| SAPK | Stress-Activated Protein Kinase |
| SGT | Small Glutamine-rich Tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein |
| Shc | Src-homology/collagen |
| Sos | Son of sevenless |
| SRE | Serum Responsive Element |
| SV40 | Simian Virus 40 |
| TAC | Transitory Aplasic Crisis |
| TAF | TBP-Associated Factor |
| TBP | TATA-Binding Protein |
| TCF | Ternary Complex Factor |
| TFII | Transcription Factor II |
| TGF- β | Transforming Growth Factor- β |
| TK | Thymidine Kinase |
| USF | Upstream Stimulatory Factor |
| UV | Ultra Violet |
| VP | Protéine Virale de capside |

1 INTRODUCTION

De nombreux *Parvovirus* ont été isolés comme contaminants de tumeurs transplantées ou de préparations de virus oncogènes. Cette association traduit leur opportunisme à l'égard des cellules se multipliant activement et leur permettant de se répliquer. Leur étroite dépendance vis-à-vis de l'état de prolifération et de transformation de la cellule hôte a rapidement attiré l'intérêt des scientifiques. Ces petits virus, par la taille et par le degré d'organisation génomique, ont beaucoup à nous apprendre quant à la biologie des cellules qui les hébergent. Si leur association aux cellules tumorales les a rendus suspects de présenter des propriétés oncogéniques et de pouvoir ainsi agir sur la prolifération de la cellule hôte (Kilham & Olivier, 1959, Toolan *et al.*, 1960), les parvovirus se sont au contraire avérés incapables d'induire la réplication de l'ADN cellulaire et sont contraints de profiter des cellules en prolifération pour répliquer leur propre ADN génomique (Tattersall & Bratton, 1983). Quels sont les caractéristiques génétiques des parvovirus qui les lient à la prolifération cellulaire? La réponse à cette question devrait permettre de mieux connaître et utiliser les propriétés biologiques des parvovirus mais également de comprendre les mécanismes cellulaires qui différencient une cellule quiescente d'une cellule en prolifération, une cellule normale d'une cellule transformée. Afin de participer à l'approche de cette vaste question, nous nous sommes intéressé à l'expression des gènes de la souche prototype du parvovirus minute de la souris (MVMp) en réponse à la prolifération et à la transformation cellulaire.

1.1 Biologie des Parvovirus

1.1.1 Les *Parvovirus* au sein de la famille des *Parvoviridae*

La famille des *Parvoviridae* rassemble les virus à ADN simple brin linéaire, de taille comprise entre 4 à 6 kb, dont la petite capsidie icosaédrique (180-260 angström) n'a pas d'enveloppe (Murphy, 1995). Les séquences palindromiques d'ADN aux deux extrémités du génome, se replient sur elles-mêmes en des structures d'épingles à cheveux qui permettront la réplication de l'ADN parvoviral. La classification officielle, présentée dans le Tableau 1 distingue 2 sous-familles:

Tableau 1: Classification des *Parvoviridae*.

| Famille | Sous-famille | Genre | Espèce type | Hôte |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|-------------|
| <i>Parvoviridae</i> | <i>Parvovirinae</i> | <i>Parvovirus</i> | virus minute de la souris (MVM) | Vertébrés |
| | | <i>Erythrovirus</i> | B19 | Vertébrés |
| | | <i>Dépendovirus</i> | Virus adéno-associé de type 2 | Vertébrés |
| | <i>Densovirinae</i> | <i>Densovirus</i> | Junonia coenia densovirus | Invertébrés |
| | | <i>Iteravirus</i> | Bombyx mori densovirus | Invertébrés |
| | | <i>Contravirus</i> | Aedes aegypti densovirus | Invertébrés |

Tout d'abord les *Densovirinae* qui regroupent les virus infectant les invertébrés. Cette sous-famille ne cesse de croître aussi bien par le nombre que par la diversité des virus qui la composent. Leurs propriétés biologiques, par exemple les stratégies d'expression de leur génome, sont différentes de celle des autres *Parvoviridae* (Tijssen & Bergoin, 1995).

La seconde sous-famille des *Parvovirinae* est divisée en 3 genres.

La réplication des *Dépendovirus* est contrainte à l'infection de la cellule hôte par un virus "aidant", par exemple un adénovirus ou un virus Herpès. Cependant il a été observé que des conditions stressantes exercées sur la cellule, telle l'irradiation par des ultra violets, des traitements par des agents carcinogènes ou d'autres stress génotoxiques, peuvent également induire le cycle viral (Bantel-Schaal, 1993). Contrairement aux autres *Parvovirinae*, en absence de conditions "aidantes", la conversion du génome et l'expression des protéines virales, notamment Rep, permet leur intégration de façon dirigée au sein du génome de la cellule hôte (Linden *et al.*, 1996). Ces virus infectent essentiellement l'homme, sans pathogénie apparente, mais peuvent infecter des animaux de laboratoires ainsi que des cellules, établies en culture, de nombreuses espèces animales. La limitation des infections par les *Dépendovirus* à un nombre restreint d'espèces animales semble être liée au spectre d'hôtes limité des virus "aidants".

Le genre des *Erythrovirus* a été créé afin d'accueillir les *Parvovirinae* se répliquant de façon autonome au sein des cellules érythropoïétiques et exprimant les ARN messagers à partir d'un seul promoteur (Brown *et al.*, 1995). A ce jour seuls deux virus satisfont à ces critères: le parvovirus humain B19, actuellement reconnu au sein de la classification officielle, et le

parvovirus simien. La restriction aux cellules érythrocytaires est sans doute liée à la nature du récepteur; dans le cas du parvovirus B19 il s'agit de l'antigène P de l'érythrocyte (Brown *et al.*, 1993).

Enfin le genre *Parvovirus*, inclut les parvovirus autonomes exprimant leurs ARN messagers à partir de deux unités de transcription distinctes. Si ces virus peuvent se répliquer indépendamment de l'aide offerte par d'autres virus ou par des stress exercés à la cellule hôte, leur réplication est néanmoins dépendante de l'état de prolifération et de différenciation de celle-ci. Ainsi, de nombreuses cellules ne sont pas compétentes pour soutenir le cycle d'un parvovirus donné, souvent du fait de l'absence de récepteur ou de composants intracellulaires. Un grand nombre d'espèces de mammifères peuvent être infectés par des parvovirus qui leur sont souvent – mais pas toujours – spécifiques. Si dans tous les cas les tissus en prolifération sont la principale cible du virus, les organes infectés et les pathogénies associées sont très variables d'un parvovirus à l'autre.

1.1.2 Pathogénie des *Parvovirus*

La caractéristique majeure des *Parvovirus* est qu'ils sont incapables d'induire la prolifération des cellules hôtes, condition pourtant indispensable à l'accomplissement de leur cycle lytique (Tattersall & Bratton, 1983). Etant donné le peu de tissus en prolifération chez l'animal adulte, on comprend facilement que l'embryon ou le jeune animal seront particulièrement sensibles aux infections parvovirales (Jacoby *et al.*, 1996). Toutefois, la lyse des cellules infectées n'est pas la seule cause de la pathogénie des parvovirus. Comme indiqué dans le Tableau 2, les pathogénies sont très variables suivant les différents parvovirus. L'exemple du parvovirus humain B19 permet d'illustrer différentes interactions possibles entre le virus et l'hôte, qui se traduisent par des signes cliniques lors d'une infection parvovirale (Brown & Young, 1997, Young, 1996).

Lors d'une infection aiguë de l'adulte par le parvovirus B19, le virus circulant est rapidement neutralisé par le système immunitaire. Cette neutralisation est la cause de la cinquième maladie, correspondant à un exanthème. Le dépôt des complexes immuns, IgM et IgG liés aux capsides virales, au niveau des articulations peut causer une arthrite rhumatoïde. Ces signes cliniques disparaissent après administration d'agents anti-inflammatoires au patient. Toutefois, malgré la compétence du système immunitaire, la réplication du virus au sein des

Tableau 2: Effets pathogènes de quelques membres de la famille des *Parvovirinae*

| Genre/ Espèces | Hôte naturel | Stade de développement | Effet pathogène chez l'hôte naturel | |
|-----------------------------|--------------|---------------------------|--|--|
| | | | Situation naturelle | Situation expérimentale |
| DEPENDOVIRUS | | | | |
| AAV-2 | Homme | | Pas d'effet apparent | |
| ERYTHROVIRUS | | | | |
| B19 | Homme | Fœtus | Pas d'effet apparent ou hydrops fetalis, avortement, anémie | |
| | | Enfant | Pas d'effet apparent ou aplasie érythroïde, érythème infectieux | |
| | | Adulte | Pas d'effet apparent ou érythème infectieux, myocardite aiguë, thrombocytopénie, amyotrophie neuralgique, arthrite rhumatoïde infection chronique chez des patients immunodéprimés. anémie | |
| PARVOVIRUS AUTONOMES | | | | |
| H-1 | Rat | Fœtus | | Pas d'effet apparent ou mort embryonnaire |
| | | Nouveau-né | Pas d'effet apparent (probablement dû à la protection immunitaire maternelle) | Pas d'effet apparent ou hémorragie et infarctus |
| | | Adulte | Pas d'effet apparent | Pas d'effet apparent |
| MVMp | Souris | Fœtus, nouveau-né | Pas d'effet apparent | Pas d'effet apparent ou retard de croissance |
| | | Adulte | Pas d'effet apparent | Pas d'effet apparent |
| MVC | Chien | Fœtus | Pas d'effet apparent ou résorption de l'embryon, avortement, myocardite fœtale | Pas d'effet apparent, myocardite fœtale ou avortement |
| | | Nouveau né | Pas d'effet apparent ou entérite, bronchite, pneumonie interstitielle | Pas d'effet apparent ou bronchite fatale et pneumonie interstitielle |
| | | Adulte | diarrhée légère | |
| ADV | Vison | Fœtus | Mort embryonnaire | Mort embryonnaire |
| | | Nouveau-né | Pneumonie interstitielle pouvant être létale | Pneumonie interstitielle hautement létale |
| | | Adulte | Pas d'effet apparent ou néphrite interstitielle, glomérulonéphrite | Pas d'effet apparent ou néphrite interstitielle, pneumonie |
| PPV | Porc | Fœtus | Pas d'effet apparent ou mort fœtale, momification de l'embryon, avortement | Mort en début de gestation, effet pathogène en fin de gestation |
| | | Nouveau-né | Pas d'effet apparent ou diarrhée létale, hémorragie intestinale, myocardite | |
| ChPV | Poulet | Adulte | Pas d'effet apparent ou leucopénie légère et transitoire, diarrhée | Pas d'effet apparent ou leucopénie légère et transitoire |
| | | Fœtus | | Hémorragies létales |
| | | Nouveau-né | Retard de croissance, plumage non développé, faiblesse des pattes | Retard de croissance, plumage non développé, faiblesse des pattes |
| | | Adulte | Pas d'effet apparent | Pas d'effet apparent |

Abr: AAV-2: virus Adéno-associé de type 2; parvovirus porcin; ADV: virus de la maladie Aléoutienne du vison; B19: parvovirus humain; ChPV: parvovirus de la volaille; MCV: Virus minute du chien; PPV: parvovirus porcin;

vaisseaux sanguins du cœur, à proximité des fibres musculaires, peut causer une myocardite (Enders *et al.*, 1998). Dans ce cas seule une transplantation cardiaque peut sauver le patient. Suite à l'infection aiguë, le virus B19 peut persister au sein des cellules érythropoïétiques, seules pourvues de récepteur au virus. Les mécanismes moléculaires permettant la persistance du virus, sans dommages pour la cellule hôte, sont encore mal connus. Les autres maladies de l'adulte n'apparaîtront que lors d'une forte stimulation de l'hématopoïèse, c'est à dire dans les cas de la prolifération des cellules infectées. Le virus peut alors se répliquer, lyser la cellule hôte, libérant de nombreux virions infectieux. L'excès soudain de virus ne peut plus être neutralisé par le système immunitaire, la lyse de nombreuses cellules érythropoïétiques cause une anémie chez le patient (TAC, crise d'aplasie transitoire). L'absence de traitement peut mener à une nécrose, fatale, de la moelle osseuse. Une simple transfusion sanguine suffit à la disparition des symptômes, le virus circulant pouvant être progressivement neutralisé par le système immunitaire. Chez les patients immunodéprimés, cette neutralisation n'est pas possible, l'infection, alors chronique, peut provoquer une anémie sévère. Lors d'une grossesse chez une femme infectée, le virus peut être transmis congénitalement au fœtus. Comme nous l'avons déjà précisé, la multiplication active des cellules chez l'embryon le rend particulièrement sensible au parvovirus. Si la transmission a lieu pendant le premier mois de grossesse, la propagation du virus, notamment dans le foie et les sites d'hématopoïèse, provoque l'avortement du fœtus. Si l'infection est plus tardive elle peut conduire à un œdème de l'hydrops, mortel pour le fœtus, à moins d'une transfusion sanguine. Comme chez l'adulte, la réplication du virus au sein des vaisseaux sanguins du cœur peut causer une myocardite (Respondek *et al.*, 1997).

L'exemple du virus B19 montre que la pathologie est souvent liée à la lyse des cellules permissives au virus, lorsque celles-ci prolifèrent. L'embryon et le jeune individu sont de ce fait les cibles privilégiées du virus. La neutralisation du virus par le système immunitaire peut également être cause de manifestations cliniques.

1.1.3 Le parvovirus MVM

Le parvovirus MVM a été l'outil du travail de cette thèse. Initialement isolé d'un stock d'adénovirus murin par Crawford en 1966 (Crawford, 1966), il a été adapté à la culture cellulaire et cloné par Tattersall et Bratton (Tattersall & Bratton, 1983). Ils lui donnèrent le nom de MVMp, pour souche prototype, le différenciant de la souche MVMi, un variant

immunosuppresseur. On considère que le virus MVMp se propage principalement au sein des fibroblastes alors que le virus MVMi se réplique spécifiquement dans les lymphocytes (Antonietti *et al.*, 1988, McMaster *et al.*, 1981). Si le virus MVMp peut pénétrer, et dans certains cas, se répliquer dans des cellules d'espèces variées en culture cellulaire, il lyse préférentiellement les cellules issues de son hôte naturel la souris. Toutefois, comme nous le verrons ultérieurement, la transformation cellulaire élargit le spectre de cellules sensibles à l'action lytique du virus. Ainsi des fibroblastes de rat, ou humains, transformées par l'oncogène *EJ-ras* sont sensibles au parvovirus MVMp.

1.1.3.1 Cycle lytique

1.1.3.1.a De l'entrée du virus à sa décapsidation

Lors de l'infection d'une cellule permissive par le virus MVMp, le virion est tout d'abord adsorbé à la surface cellulaire (Figure 1). Le récepteur n'a pas encore été identifié mais sa sensibilité à la trypsine et à la neuraminidase suggère qu'il est de nature protéique, portant un groupement N-acétyl neuraminique (Cotmore & Tattersall, 1987). Il est vraisemblablement exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. On peut dénombrer environ $1 \text{ à } 5.10^5$ capsides virales adsorbées à la surface de chaque cellule à des multiplicités d'infection élevées, ce nombre reflétant la quantité de récepteurs présents à la surface cellulaire (Spalholz & Tattersall, 1983). L'entrée du virus se produirait principalement par endocytose, comme le suggèrent les données de microscopie électronique, montrant le virus au sein de puits couverts de type phagocytose (Linser *et al.*, 1977, Linser *et al.*, 1979). On peut supposer qu'une grande majorité de virus est alors dégradée. De récents résultats obtenus après infection de cellules par le parvovirus canin CPV montrent qu'après endocytose le virus gagne l'endosome en utilisant le réseau cellulaire de microtubules (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). Des virus directement microinjectés au sein de la cellule ne sont pas infectieux, la maturation du virus au sein de l'endosome est indispensable aux étapes successives du cycle viral. Contrairement à d'autres virus ce ne sont pas les conditions acides rencontrées au sein de l'endosome qui favorisent l'infectivité du parvovirus. La soumission des virions à des conditions acides (pH 5.0) préalablement à leur microinjection dans la cellule, ne suffit pas à les rendre infectieux (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998), par contre il semble que la maturation du virus augmente la proportion d'acides aminés hydrophobes à la surface du virus (Cotmore & Tattersall, 1987).

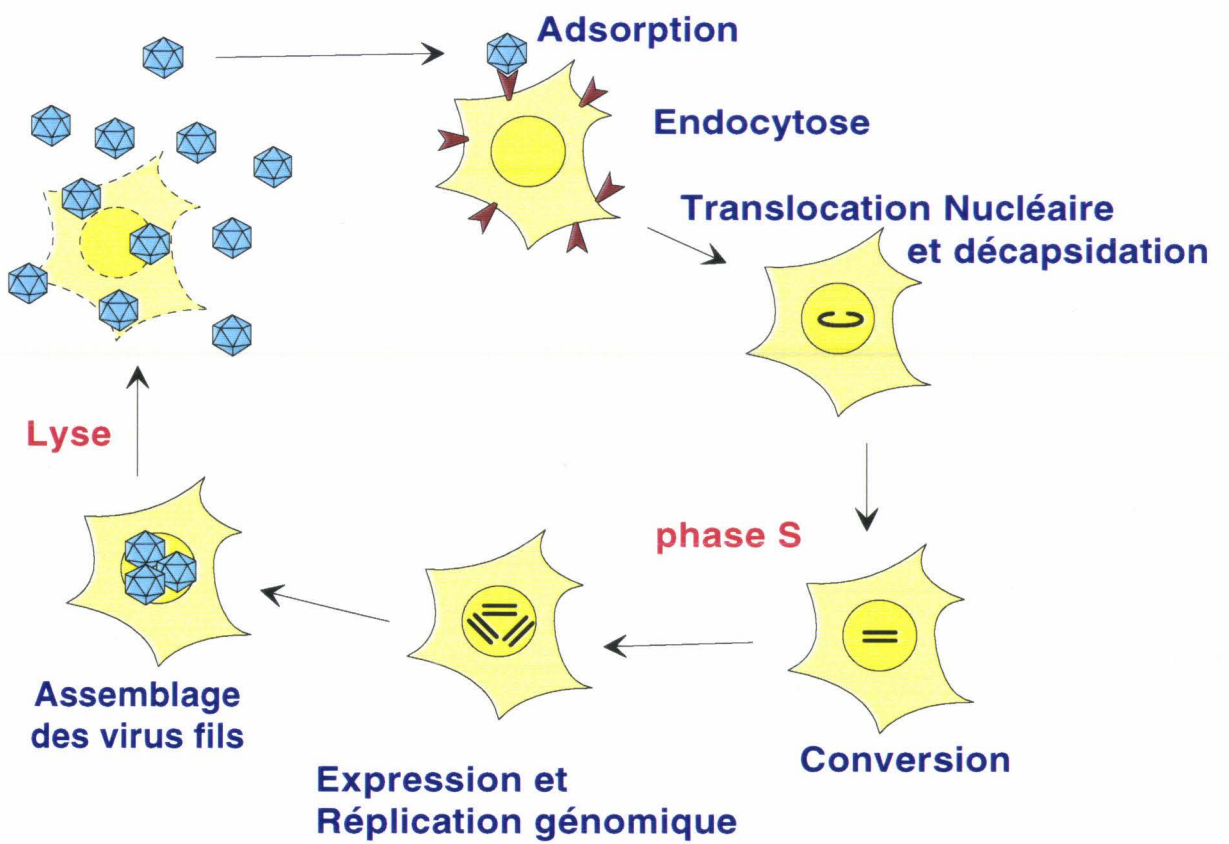


Figure 1: Cycle lytique du parvovirus MVMp.

La décapsidation du virus se produit au sein du noyau. La présence dans la séquence de VP1 d'un motif basique, riche en résidus Proline, homologue au signal de localisation nucléaire de l'antigène T du virus SV40 (Kalderon *et al.*, 1984) ainsi qu'une séquence basique dans celle de VP2, pourraient permettre le transport de la capsidite jusqu'au noyau (Lombardo *et al.*, 1997). On suppose que la conversion du génome en double brin commencerait alors avant même que la décapsidation totale du génome n'ait eu lieu. La structure de la capsidite est donc essentielle à l'efficacité des étapes comprises entre l'adsorption du virus et son expression (Tullis *et al.*, 1992). L'étude de l'infection de cellules EL4, sensibles au variant lymphotropique MVMi, par MVMp montre le rôle de facteurs cellulaires limitant pour cette étape. Previsani *et al.* ont observé que l'ADN de MVMp est converti très lentement après infection des cellules EL4. Dans ces mêmes cellules un facteur cellulaire pourrait déstabiliser les protéines de capsidite du virus MVMi, l'ADN accessible peut être rapidement converti, exprimé et répliqué (Previsani *et al.*, 1997). La construction de virus chimères entre MVMp et MVMi a permis d'identifier une région au sein des protéines de capsidites indispensable à la spécificité de MVMi pour les lymphocytes (Antonietti *et al.*, 1988). D'autre part la séquence nucléotidique de MVMi favoriserait l'épissage des messagers et la production de NS2 dans les cellules EL4 (Colomar *et al.*, 1998).

1.1.3.1.b Conversion et expression du génome: des étapes dépendantes de la phase S?

L'entrée du virus et sa décapsidation dans la cellule se produisent avec la même efficacité quel que soit l'état de prolifération de celle-ci. L'ADN simple brin du parvovirus MVM correspond au brin moins, complémentaire à l'ARNm du génome. Il doit tout d'abord être converti en double brin afin de permettre l'expression des gènes parvoviraux. Des travaux effectués par Tarig Bashir dans le laboratoire suggèrent que la conversion du génome ne se produit que lorsque les cellules hôtes initient la réplication de leur ADN en phase S.

Des cellules de souris synchronisées à la transition G1/S après traitement par un inhibiteur des ADN polymérases, l'aphidicoline, et infectées par le parvovirus MVMp, n'expriment les protéines virales qu'après élimination de la drogue du milieu de culture (Schoborg & Pintel, 1991). Cependant, comme la drogue bloque la conversion du génome parvoviral, on ne peut pas conclure que l'expression du promoteur est limitée à la phase S. La mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans la cellule montre que la réplication de l'ADN génomique s'arrête rapidement avant que ne commence l'essentiel de la réplication du

génomique parvoviral (Cotmore & Tattersall, 1987). Le détail des étapes d'expression et de réplication de l'ADN parvoviral ainsi que de l'encapsidation et de la libération des virions infectieux, constituant le cycle viral complet, est décrit dans les chapitres ultérieurs de l'Introduction.

L'infection d'une cellule permissive par le parvovirus conduit à sa lyse, permettant la libération des virions infectieux. Comme nous l'avons précédemment indiqué, la pathogénie des parvovirus est principalement liée à la destruction des cellules au sein desquelles le virus prolifère. Toutefois, des clones cellulaires permettant la réplication du virus sans être lysés peuvent être isolés (Koering *et al.*, 1996, Salome *et al.*, 1989). Si la lyse de tissus normaux conduit souvent à une pathogénie, celle des tissus tumoraux peut s'avérer profitable à l'animal, les parvovirus agissant alors comme agents "oncosuppresseurs".

1.1.3.II Organisation génomique

Le génome parvoviral se subdivise en deux grandes unités transcriptionnelles, situées respectivement dans les parties droites et gauches du génome (Figure 2). Cette séparation est à la fois physique et fonctionnelle puisqu'elles dirigent l'expression des ARN messagers codant respectivement les protéines non structurales et les protéines de capsid du virus. Malgré la taille réduite du génome, l'utilisation de stratégies d'épissage alternatif, de codons initiateurs internes profitant des différents cadres de lecture, permettent la synthèse de six protéines distinctes (4 protéines non-structurales, 2 protéines de capsid).

1.1.3.II.a Expression des gènes parvoviraux

1.1.3.II.a.i Le promoteur P4

L'unité transcriptionnelle située dans la partie gauche du génome est sous le contrôle du promoteur P4, ainsi nommé de par sa position à la quatrième unité du génome. Il permet l'expression des ARN messagers R1 et R2. Il existe différentes formes du promoteur P4 au cours de la réplication du génome. Lors de la conversion du génome en ADN double brin il est constitué d'une structure en "épingles à cheveux" ou "oreilles de lapin" et de la région dite proximale, puis lors de la copie du génome, il est étendu symétriquement par rapport à la structure en "épingles à cheveux". On peut ainsi définir des parties droite et gauche du promoteur (Figure 3). Cette structure étendue est majoritaire au cours de l'infection. L'activité

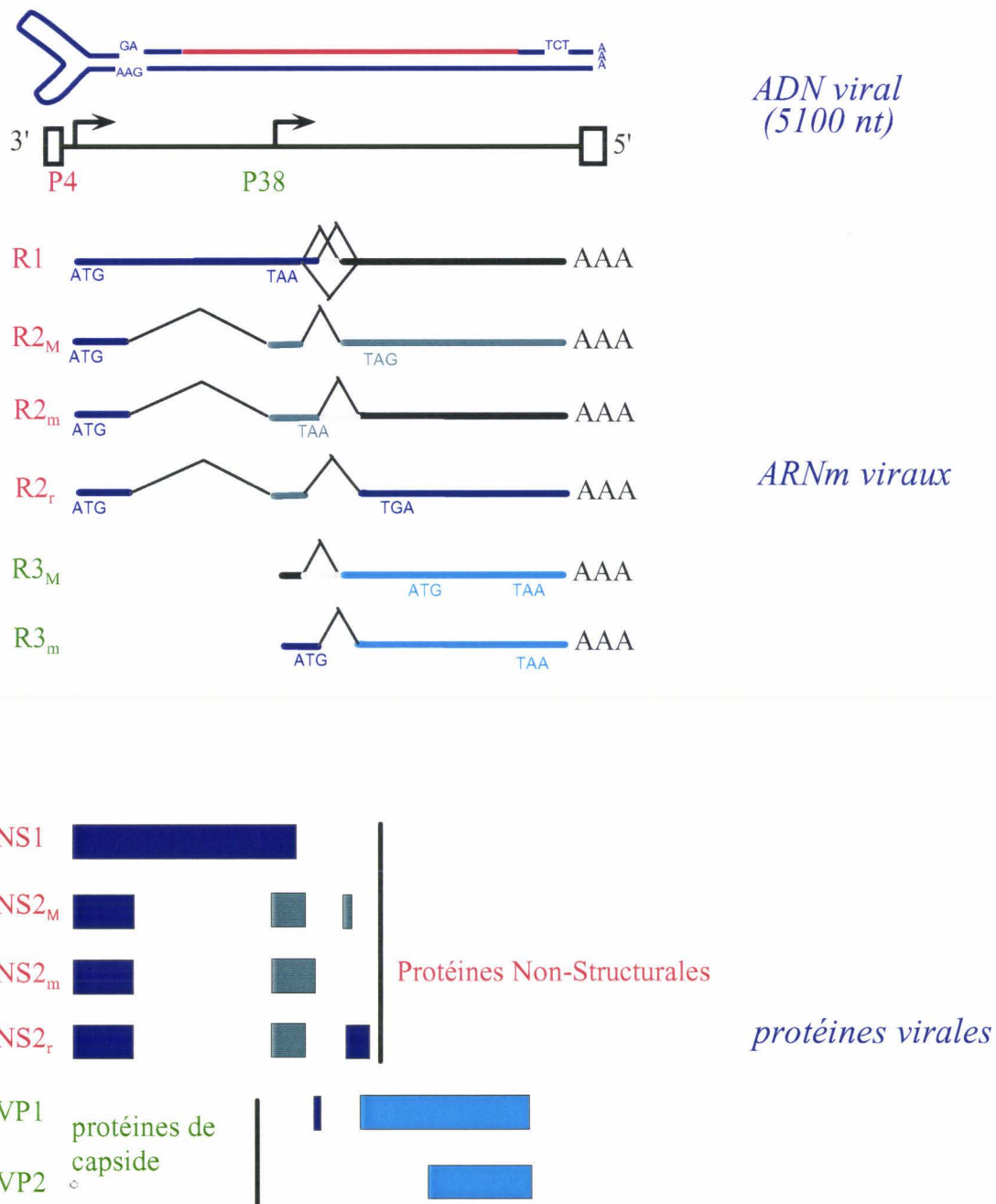


Figure 2: Organisation génomique du parvovirus MVMp.

Les couleurs permettent l'identification des cadres ouverts de lectures 1, 2 et 3 du génome parvoviral.

La position des différents sites accepteurs et donneurs d'épissage (^) permet l'expression d'ARN messagers (ARNm) majoritaires (M), minoritaires (m) et rares (r). Les codons d'initiation (ATG) et d'arrêt (TAA, TAG et TGA) de la traduction utilisés pour la traduction des ARNm viraux sont indiqués (couleur du cadre ouvert de lecture). Les formes ARNm messagers permettant la synthèse d'une même protéine sont superposés.

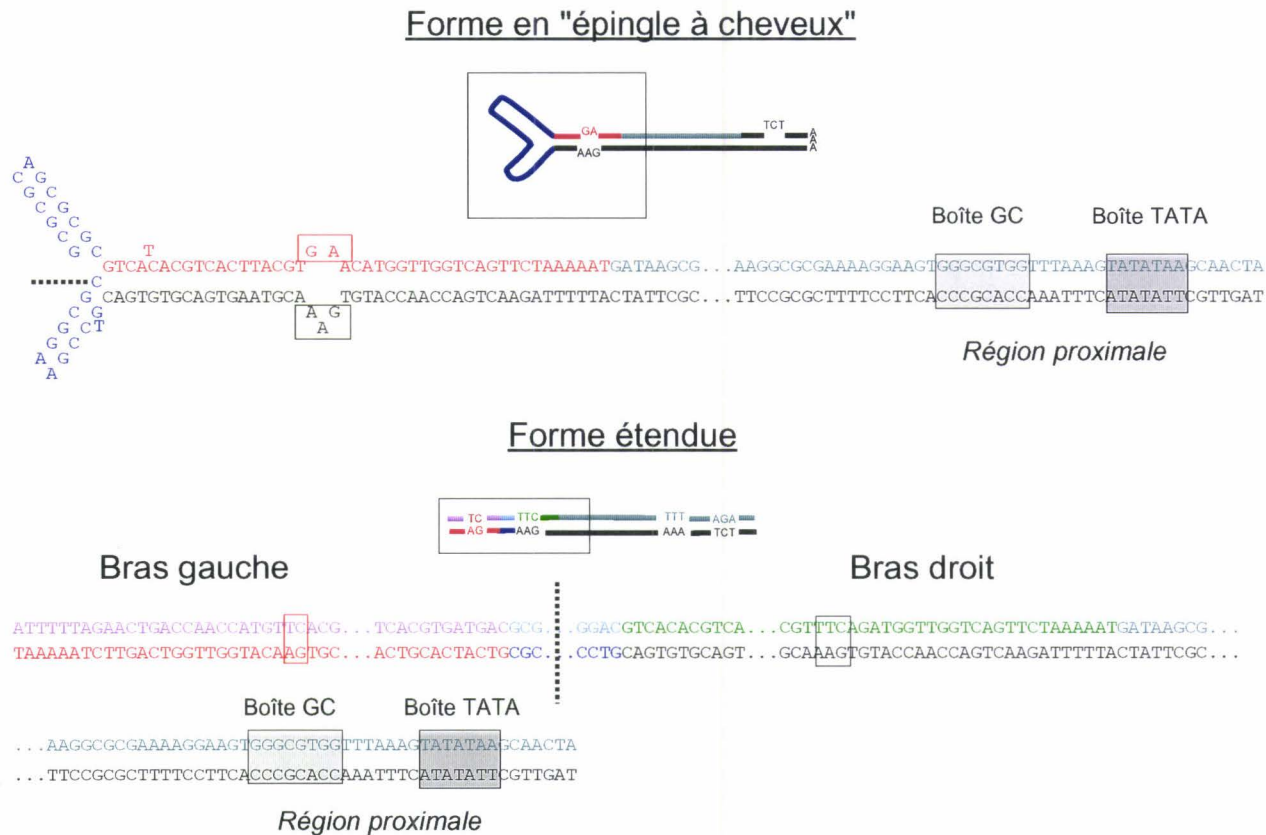


Figure 3: Conformation du promoteur P4 au cours du cycle réplcatif du parvovirus MVMp.

Suite à la conversion de l'ADN parvoviral en une molécule bicaténaire, le promoteur P4 existe sous la forme d'une structure en "épingle à cheveux". L'imperfection de la séquence palindromique se traduit par la formation d'une bulle, les séquences non appariées (GA et AAG) sont encadrées de part et d'autre de la bulle. L'axe de symétrie du palindrome est indiqué par une ligne en pointillés.

Lors de la réplcation de l'ADN viral (détaillée sur la Figure 8), le palindrome est ouvert par rapport à son axe de symétrie et le brin non codant est recopié dans son intégralité. La symétrie de la forme étendue permet de définir un bras droit et un bras gauche du promoteur, images l'un de l'autre à l'exception des régions encadrées qui correspondent à la copie des séquences mésappariées de la bulle.

La région proximale, hors du palindrome, est identique quelque soit la forme du promoteur. Les boîtes GC et TATA, identifiées comme motifs participant à l'activité du promoteur, sont indiquées par des cadres grisés.

Les différentes couleurs permettent d'identifier la position des séquences d'ADN au sein des formes réplcatives de l'ADN viral schématisées.

transcriptionnelle basale élevée du promoteur P4 est due, pour 80 %, à la région proximale qui contient une boîte TATA et une boîte GC (Ahn *et al.*, 1989, Pitluk & Ward, 1991). L'analyse de la séquence en amont révèle l'existence de motifs susceptibles de fixer d'autres facteurs de transcription. La liaison effective des facteurs NF-Y et USF ainsi que leur participation à l'activité basale du promoteur ont récemment été montrées (Gu *et al.*, 1994). Dans ce cas, les sites de fixation se trouvant au sein des séquences en palindrome, leur rôle dans l'activité du promoteur est variable suivant la structure de l'ADN parvoviral. La forme en "épingle à cheveux" ne permet la fixation que du facteur NF-Y, par contre la forme étendue peut fixer, dans sa partie droite, à la fois les facteurs NF-Y et USF, ceci de façon probablement exclusive, et dans sa partie gauche uniquement le facteur NF-Y. Lors de l'infection virale différents paramètres semblent contrôler l'efficacité de transcription. Une séquence "atténuatrice", similaire à celle observée chez les procaryotes, a pu être identifiée 142 nucléotides en aval du promoteur P4. Bien que thermodynamiquement défavorisée, la structure d'atténuation bloque spontanément la progression de l'ARN polymérase II (Ben-Asher & Aloni, 1984). Certains auteurs suggèrent que dans les cellules permissives à l'infection virale, un taux élevé de facteurs TFIIF et TFIIX permettrait de lever le blocage de la transcription. L'infection des cellules permissives par le virus MVM réduit le taux de ces mêmes protéines, ce qui pourrait expliquer la réduction du taux des messagers R1 et R2 à des temps tardifs de l'infection (Krauskopf *et al.*, 1991, Schoborg & Pintel, 1991). D'autre part, les protéines non structurales du virus, notamment NS1 semblent pouvoir moduler l'activité du promoteur P4. Toutefois les auteurs ne peuvent s'accorder sur une action positive (Doerig *et al.*, 1990, Hanson & Rhode, 1991) ou négative (Vanacker & Rommelaere, 1995) de NS1 sur le promoteur P4. Des modifications du taux ou de l'état de phosphorylation de NS1 au cours du cycle viral pourraient peut être expliquer ces résultats contradictoires. Enfin un autre déterminant de l'activité du promoteur semble être l'état de transformation de la cellule hôte. En effet dans des cellules transformées, en particulier par l'oncogène *ras*, l'activité du promoteur est augmentée d'environ cinq fois (Spegelaere *et al.*, 1991). On peut supposer que d'autres facteurs, tels la différenciation ou la prolifération cellulaire, peuvent agir sur l'activité, sans doute via la fixation différentielle de facteurs de transcription en amont du promoteur. Cette étude a fait essentiellement partie du travail de thèse.

1.1.3.II.a.ii Le promoteur P38

Le promoteur P38 dirige la synthèse des ARN messagers R3 codant pour les protéines de capsid du virus. Malgré la présence d'une boîte TATA et d'une boîte GC dans la région proximale, son activité en absence de la protéine NS1 est très faible (Figure 4). Il semble que la structure même de l'ADN impose une activité minimum du promoteur en absence de la protéine NS1 (Lorson & Pintel, 1997). Par contre son activité augmente d'environ 100 à 1000 fois en réponse à NS1 (Doerig *et al.*, 1988, Rhode & Richard, 1987). Le mode d'action de NS1 sur l'activité du promoteur fait encore l'objet de nombreuses discussions. Certains auteurs suggèrent que les boîtes TATA et GC du promoteur P38 sont suffisantes à l'activation (Ahn *et al.*, 1992, Lorson *et al.*, 1998), ceci par interaction directe de la protéine NS1 avec des composants du complexe de l'ARN polymérase ou avec le facteur de transcription Sp1, qui se fixe au niveau de la boîte GC du promoteur P38 (Kradly & Ward, 1995). L'activation maximale du promoteur P38 par NS1 requiert d'autres motifs d'ADN. Des mutants du promoteur ont permis l'identification d'un autre motif de réponse à NS1 (Rhode & Richard, 1987). Cette région de 19 nucléotides, appelée tar pour élément de réponse à la transactivation, est située 116 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. Des mutations ponctuelles au sein de la séquence tar réduisent le niveau d'activation, mais aucune d'entre elles n'abolit totalement l'activation du promoteur par NS1 (Gu & Rhode, 1992). La liaison, en présence d'ATP, de la protéine NS1 à l'élément tar permettrait la transactivation du promoteur P38 (Christensen *et al.*, 1995). D'autres régions en amont et en aval du promoteur pourraient également être nécessaires mais leur rôle précis n'a pas encore été déterminé (Krauskopf *et al.*, 1990, Storgaard *et al.*, 1993). L'activation du promoteur P38 est donc un processus complexe impliquant des modifications de la structure de l'ADN et des interactions entre NS1 et la machinerie de transcription, soit directement, soit par l'intermédiaire de facteurs de transcription tel Sp1. Quels que soient ces processus, l'activation du promoteur P38 et ainsi la synthèse des protéines de capsid est dépendante de la présence de NS1 dans la cellule, et ainsi de l'entrée en phase S des cellules hôtes.

1.1.3.II.b Epissage des ARN messagers

Le promoteur P4 contrôle la synthèse de six ARN messagers distincts (Jongeneel *et al.*, 1986, Schoborg & Pintel, 1991). Ceci est dû à l'utilisation intensive par le parvovirus MVM de processus complexes d'épissages, permettant la synthèse de 4 protéines distinctes, NS1 et 3

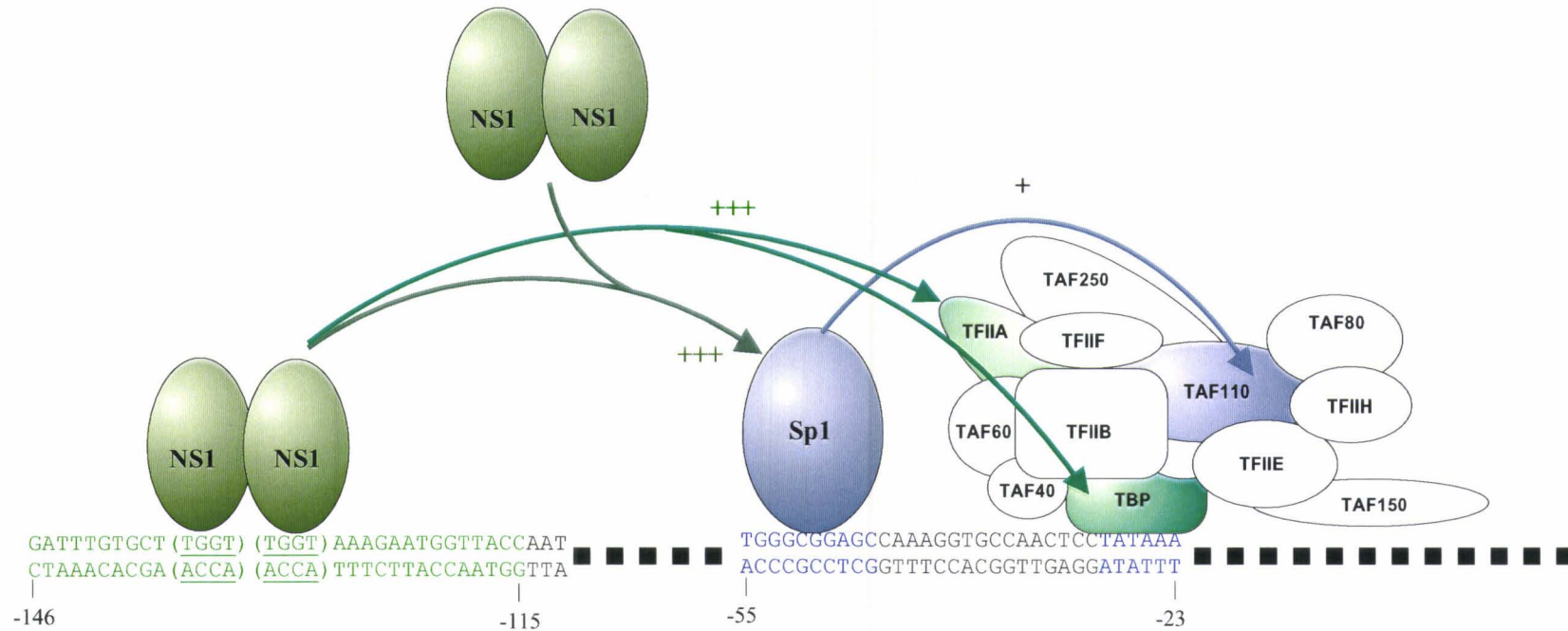


Figure 4: Activation du promoteur P38 par NS1.

La protéine NS1 peut se fixer au niveau d'une séquence (ACCA)₂ au sein de la région tar (de couleur verte). Elle pourrait activer la transcription (flèches vertes) en interagissant directement avec les facteurs de la machinerie de transcription TFIIF et TBP. NS1 se lie au facteur de transcription Sp1, qui participe à l'activité basale du promoteur P38 (flèche bleue). L'interaction entre la protéine NS1, liée ou non à l'ADN, et Sp1 permet d'activer le promoteur P38 (flèches vert sombre)

Les boîtes GC et TATA du promoteur P38 sont indiquées en bleu.

NS1 est représenté schématiquement sous forme d'un homodimère.

formes de NS2, à différents taux, à partir d'un unique promoteur. L'épissage d'un grand intron au sein de R1, dans la région codant NS1, permet l'obtention des ARN messagers R2. Les messagers R1 et R2 peuvent tous deux être épissés au niveau d'une région comprises entre le codon d'arrêt de NS1 et le codon initiateur de VP2 (Figure 5). Cette région de 120 nucléotides contient deux sites donneurs (D1 et D2) et deux sites accepteurs (A1 et A2) d'épissage. Elle est cruciale pour l'expression correcte des protéines NS2. L'épissage des ARN messagers viraux est exclusivement dépendant des protéines cellulaires. Le site D1 placé avant D2 est ainsi principalement utilisé par la machinerie cellulaire, l'utilisation de D2 est cependant possible, même si elle se produit minoritairement, du fait de sa ressemblance au consensus d'épissage reconnu au sein des messagers cellulaires (Haut & Pintel, 1998). D'autre part les séquences introniques déterminent l'efficacité de l'épissage ainsi que l'usage du site accepteur. La région contenant les sites D1, D2, A1 et A2 est indispensable pour l'épissage correcte du messenger R1 en R2. La mutation de cette séquence peut donner naissance à des ARN messagers utilisant le site donneur du grand intron et le site accepteur A1, ne permettant pas l'obtention des protéines NS2 (Haut & Pintel, 1998, Zhao *et al.*, 1994). Le rapport entre les différents messagers est-il modulé par des facteurs viraux ou cellulaires? La réponse à cette question n'a pas encore été clairement établie. Toutefois il semble que l'épissage ne se produit pas avec la même efficacité dans tous les types cellulaires. Comme nous l'avons vu préalablement, l'épissage des ARN messagers du virus MVMi est plus efficace dans les lymphocytes que dans les fibroblastes (Colomar *et al.*, 1998).

1.1.3.III Les protéines parvovirales

1.1.3.III.a Les protéines non structurales

1.1.3.III.a.i Caractéristiques et fonctions de la protéine NS1

NS1 est une phosphoprotéine de 83 kDa, indispensable au cycle viral. Elle est essentiellement transportée dans le noyau grâce à une séquence de localisation nucléaire homologue à celle de l'antigène T de SV40. Ses activités biochimiques de coupure simple brin de l'ADN à une séquence spécifique, d'hélicase et de liaison et hydrolyse de NTPs sont nécessaires à la réplication du génome parvoviral (Figure 6). Ces fonctions semblent nécessiter l'association de NS1 sous forme de dimères ou oligomères (Pujol *et al.*, 1997).

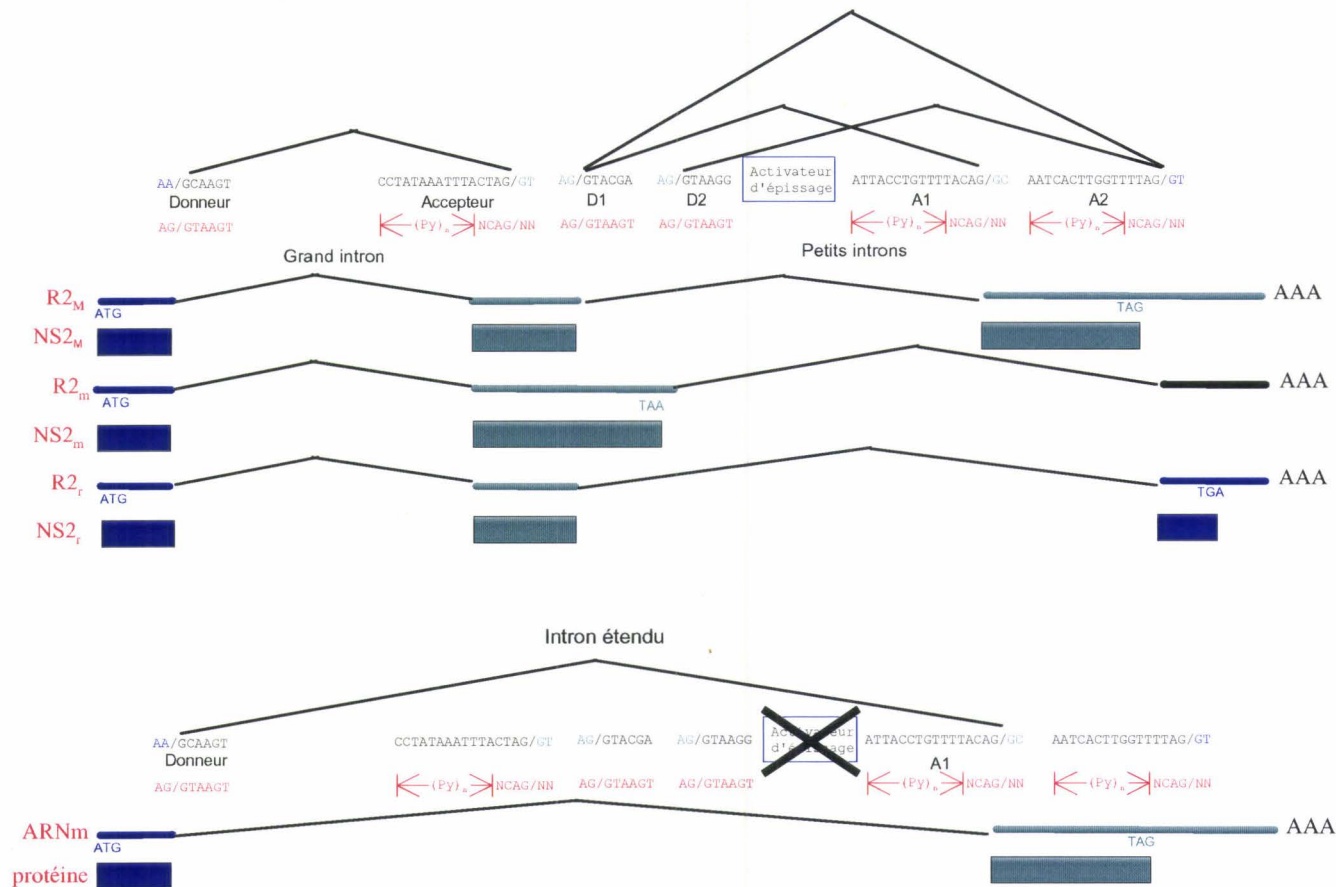


Figure 5: Stratégies d'épissage alternatif pour l'expression des protéines NS2.

Les cadres ouverts de lectures reconnus pour la traduction des ARN messagers (traits de couleur) en protéines sont indiqués suivant les mêmes conventions utilisées pour la Figure 2. Les séquences consensus des sites donneurs (D) et accepteurs (A) d'épissage sont indiquées en rouge sous celles du virus MVM. La séquence activatrice d'épissage est nécessaire à l'utilisation correcte du site accepteur d'épissage du grand intron. Si cette séquence est altérée, comme représenté dans la partie basse de la figure, il n'existe qu'une forme d'ARN messager épissé ne permettant pas l'expression des protéines NS2.

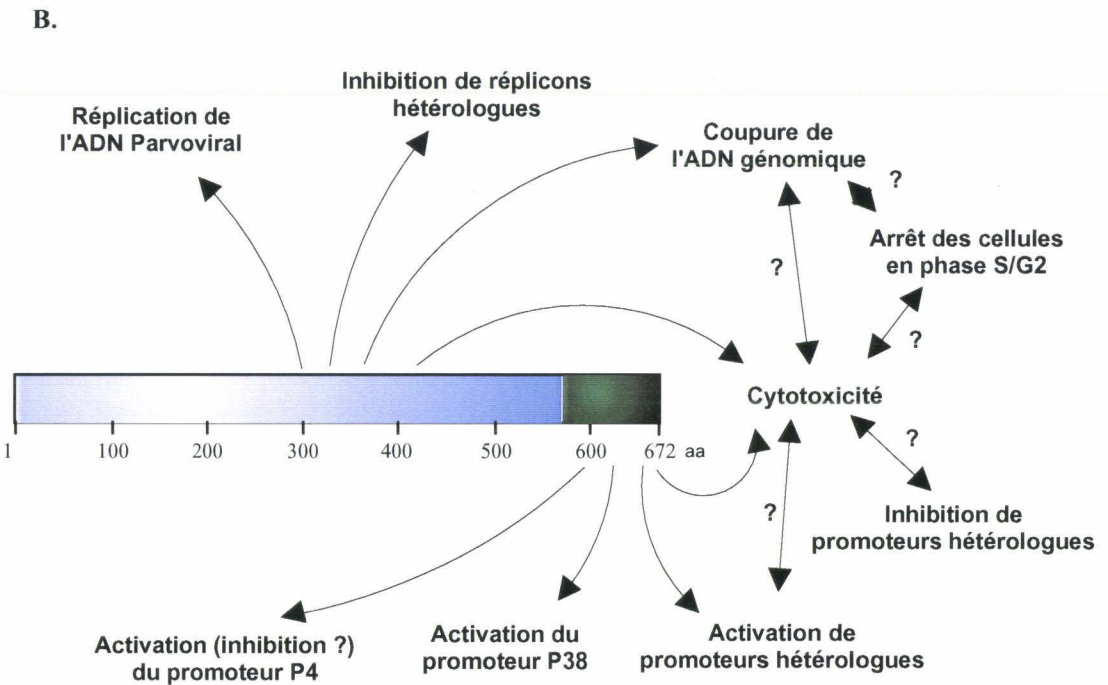
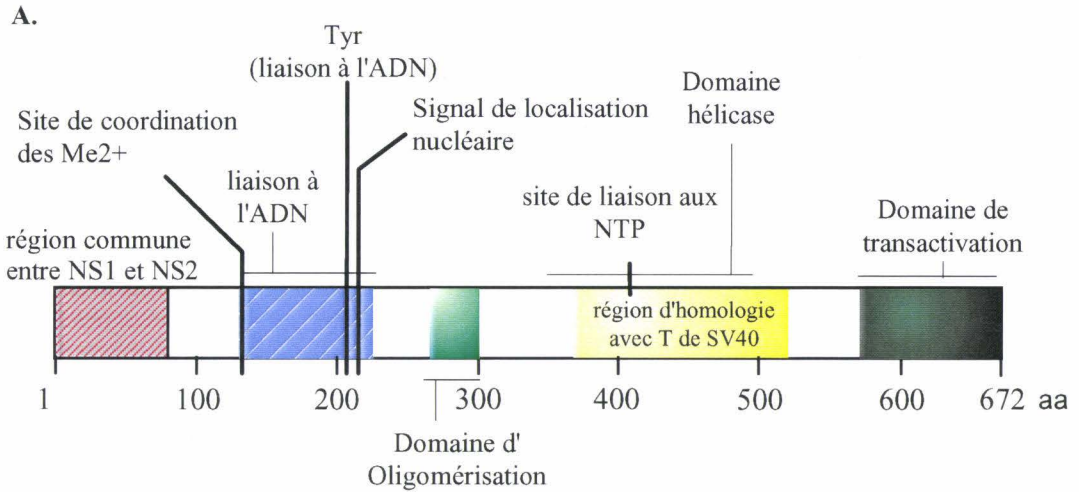


Figure 6: Structure et fonctions de la protéine NS1. (A) Domaines et activités biochimiques. (B) Fonctions et effets de NS1.

Les extrémités N- et C-terminale de la protéine NS1 sont riches en résidus acides. De nombreux facteurs de transcription interagissent avec la machinerie de transcription par l'intermédiaire de tels domaines (Mitchell & Tjian, 1989, Triezenberg, 1995); de même NS1 semble pouvoir se lier aux facteurs TBP et TFIIA (Lorson *et al.*, 1998). Lorsque l'extrémité C-terminale de NS1 est fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN, par exemple celui de la protéine *lexA*, elle permet l'activation transcriptionnelle de promoteurs contenant des sites de fixation pour ce domaine de liaison (Legendre & Rommelaere, 1994). De plus, il a été montré qu'en présence d'ATP, la protéine NS1 peut se fixer à des motifs (ACCA)₂₋₃, présents notamment au niveau des promoteurs P4 et P38 du virus MVM (Cotmore *et al.*, 1995). NS1 pourrait ainsi activer le promoteur P38 en se liant directement à l'ADN au niveau de la région tar du promoteur P38 (Christensen *et al.*, 1995). De même le promoteur P4 pourrait être activé par NS1 comme observé par certains auteurs. Cependant il semble que certains promoteurs sont activés par NS1 sans fixation directe de cette protéine à l'ADN (Gareus *et al.*, 1998, Vanacker *et al.*, 1996). Parallèlement à ses propriétés d'activateur de la transcription, NS1 peut également réprimer de nombreux promoteurs viraux et cellulaires (Vanacker & Rommelaere, 1995). Dans ce cas le mécanisme d'action de NS1 reste inconnu, même si on peut supposer qu'en interagissant avec des facteurs de transcription ubiquistes comme Sp1, NS1 empêcherait ces protéines de se lier à l'ADN et ainsi d'activer de nombreux promoteurs. Le contrôle de NS1 sur l'activité transcriptionnelle de promoteurs semble donc être la résultante de ses propriétés activatrices, lorsqu'elle est liée à l'ADN, et d'une action indirecte, positive ou négative, par interaction avec d'autres facteurs de transcription au niveau du complexe initiateur de transcription.

Une propriété remarquable de NS1 est sa capacité à lyser les cellules permissives au virus (Vanacker & Rommelaere, 1995). Il a été montré que l'expression de NS1 dans des cellules naturellement sensibles à l'action lytique des parvovirus suffit à tuer celles-ci (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990, Mousset *et al.*, 1994). Toute cellule exprimant un taux élevé de protéine NS1 n'est pas sensible à l'action lytique de NS1. Des cellules résistant à un taux donné de protéine NS1 deviennent la cible du produit viral après avoir été transformées par l'expression d'un oncogène activé. Des modifications de NS1 et/ou de signaux cellulaires sont donc nécessaires à la sensibilisation des cellules transformées. L'étude de la lyse préférentielle de fibroblastes de rat transformés par *ras*, par rapport à leur équivalent normal, a permis de montrer que NS1 active l'expression du gène *c-erbA* uniquement dans les cellules

transformées, alors qu'elle réprime faiblement celle-ci dans les cellules normales. L'activation de *c-erbA* pourrait contribuer à l'action lytique de NS1 (Vanacker *et al.*, 1996). Certaines protéines cellulaires semblent être induites ou modifiées par NS1 spécifiquement dans les cellules sensibles à son effet toxique (Anouja *et al.*, 1997).

Comment l'expression de NS1 conduit-elle à la mort des cellules sensibles? Il n'existe pas à ce jour de réponse précise à cette question, néanmoins de nombreuses données sur l'effet de NS1 sur la cellule hôte ont pu être obtenues et permettent d'ébaucher certains mécanismes. Tout d'abord il n'est pas possible de dissocier physiquement les régions de la protéine NS1 responsables de ses activités transcriptionnelles et cytotoxiques (Legendre & Rommelaere, 1992). Ceci est à rapprocher d'une part de l'activation du gène *c-erbA* et d'autre part de l'inactivation de divers promoteurs par NS1. Cependant il ne semble pas que le rôle de NS1 se limite à moduler l'activité de promoteurs cellulaire pour conduire à la mort de la cellule hôte. L'expression de NS1 bloque la prolifération des cellules sensibles qui s'accumulent en phases S et G2 du cycle cellulaire (Op De Beeck *et al.*, 1995). Ce maintien de la phase S pourrait permettre au virus d'échapper aux mécanismes cellulaires qui inactivent la réplication de l'ADN en phase G2 et ainsi de profiter pleinement des polymérases de l'hôte. L'accumulation des cellules en phase S pourrait être la conséquence de coupures introduites par NS1 au sein l'ADN génomique (Op De Beeck & Caillet-Fauquet, 1997). En accord avec cette possibilité, la séquence du génome de l'hôte renferme de sites consensus de coupure de l'ADN simple brin par NS1. De telles lésions empêchent la progression des cellules dans les étapes ultérieures du cycle mitotique (Sanchez *et al.*, 1997). Enfin dans certains systèmes, il a clairement été montré que la protéine NS1 peut induire des signaux conduisant à l'apoptose des cellules hôtes (Moffatt *et al.*, 1998, Rayet *et al.*, 1997). Dans ce cas, les propriétés transcriptionnelles de NS1 pourraient également être requises.

Une nouvelle approche, utilisant le système du double-hybride, a été développée afin de mieux comprendre les liens entre NS1 et la cellule hôte. Cette méthode a permis l'identification d'une protéine cellulaire, baptisée SGT, interagissant avec NS1 dans les cellules normales et transformées. A ce jour rien n'est connu ni sur le rôle de cette protéine, ni sur les conséquences de son interaction avec NS1 (Cziepluch *et al.*, 1998).

Il est vraisemblable que les fonctions de NS1 peuvent être non seulement modulées par la transformation cellulaire mais également au cours du cycle viral lui même. Ces modifications pourraient se produire via l'interaction de NS1 avec d'autres protéines, comme par exemple

SGT, mais également suivant son état de phosphorylation. Il a en effet été montré que NS1 est activée, du moins pour la réplication de l'ADN viral, par des protéines kinases de la famille des protéines kinases C (Dettwiler *et al.*, 1997). Romuald Corbau a pu montrer que l'état de phosphorylation de NS1 varie au cours du cycle infectieux, modifiant sans doute l'activité du produit viral (Corbau *et al.*, 1997).

1.1.3.III.a.ii *NS2, trois protéines pour quelles fonctions ?*

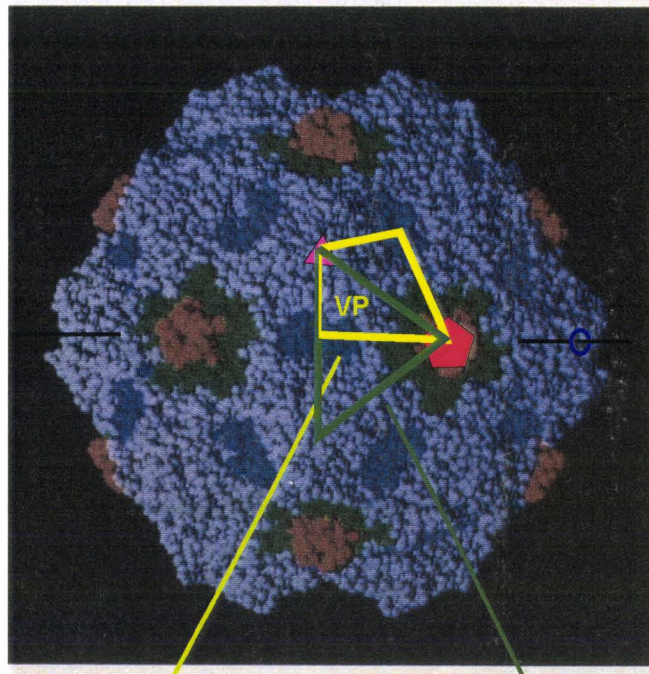
Si de nombreuses études se sont portées sur la protéine NS1, la protéine NS2 fait à ce titre figure de parent pauvre. Ceci est sans doute dû au fait que NS2 est superflue pour le virus lorsque celui-ci infecte des cellules non murines (Cater & Pintel, 1992). Toutefois cette petite protéine de 23 à 28 kDa, issue de l'épissage alternatif du messenger R1, possède de nombreuses fonctions. Il existe trois formes de protéines NS2 du fait de l'épissage alternatif du messenger R2. Ces protéines ont toutes en commun leur extrémité N-terminale, dont les 85 premiers acides aminés sont identiques à NS1, mais se différencient par leur domaine C-terminal (Clemens *et al.*, 1990). La localisation des protéines NS2 semble être principalement cytoplasmique, toutefois on peut en observer une certaine proportion au sein du noyau des cellules infectées. Le rôle respectif des différentes formes n'est pas encore établi, des parvovirus canins ne possédant qu'une des formes de NS2 se répliquent tout aussi efficacement que le virus sauvage (Wang *et al.*, 1998). La mutation des sites d'épissages du grand intron permet l'obtention d'un virus n'exprimant que les protéines NS1 et VP. L'étude de ce virus a permis de mieux comprendre le rôle des protéines NS2, ceci dans les cellules murines où elles sont nécessaires à la réplication virale. Il semble qu'elles interviennent dans l'expression des gènes, dans la traduction des messagers ainsi que dans l'assemblage des capsides virales (Cotmore *et al.*, 1997, Li & Rhode, 1991, Li & Rhode, 1993, Naeger *et al.*, 1993); elles pourraient fonctionner de façon similaire à une protéine chaperone. De plus NS2 augmente l'activité cytotoxique de la protéine NS1 et ceci également dans les cellules non murines (Brandenburger *et al.*, 1990, Legrand *et al.*, 1993). Ces différentes fonctions des protéines NS2 peuvent expliquer qu'elles sont nécessaires à l'effet pathogène du virus MVMi chez la souris (Brownstein *et al.*, 1992). Comment les cellules non murines peuvent-elles subvenir à l'absence des protéines NS2 et de leurs nombreuses fonctions? Ceci est encore mystérieux à ce jour.

De même que pour NS1, la recherche de partenaires cellulaires de NS2 laisse espérer une meilleure compréhension de leurs mécanismes d'action. Il a été montré que NS2 interagit avec certains membres de la famille de protéines 14-3-3 et avec l'homologue de mammifère de la protéine Crm1 (Bodendorf *et al.*, 1997, Brockhaus *et al.*, 1996). Le rôle de ces interactions n'a pas encore été défini. Toutefois comme pour NS1, les méthodes utilisées pour identifier les partenaires putatifs n'excluent pas la possibilité d'artéfacts, il est donc nécessaire d'observer des phénotypes associés à la perte de ses interactions entre protéines afin d'évaluer leur pertinence pour le cycle viral.

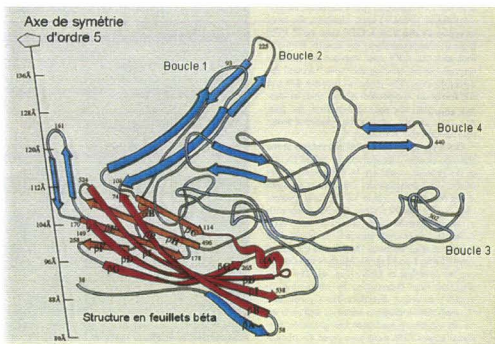
1.1.3.III.b Les protéines structurales et l'assemblage des capsides

Il existe 2 protéines de capsid respectivement appelées VP1 et VP2 dont les tailles respectives sont de 83 à 86 kDa et de 64 à 66 kDa. La protéine VP2 est obtenue à partir d'un codon ATG un aval de l'origine de VP1 dans un cadre de lecture identique. La séquence de VP2 est ainsi entièrement contenue dans celle de VP1. Toutefois seule la protéine VP1 comporte une extrémité N-terminale basique qui pourrait interagir avec l'ADN viral de façon similaire aux histones avec l'ADN génomique cellulaire (Siegl *et al.*, 1985). L'association de 60 de ces protéines, environ 6 molécules de VP1 et 54 de VP2, forme une capsid icosaédrique de densité comprise entre 1,45 et 1,47 g/cm³ (Figure 7). Chacune des 60 sous-unités de la capsid forme 8 brins β anti-parallèles qui définiront la structure rigide icosaédrique sous la surface du virus (Agbandje *et al.*, 1995). Les 2/3 de la séquence des protéines VP1 et VP2 constituent de larges boucles entre ces feuilletts β , qui sont la surface de la capsid. Seule une de ces boucles, riche en résidus glycines, est conservée entre les différents parvovirus, elle permet l'association des protéines autour des axes de symétrie d'ordre cinq du virus. Les autres boucles sont très variables, de telle sorte que la partie exposée est très différente entre les parvovirus. Par exemple la capsid du virus B19 apparaît beaucoup plus "fluide" que celle de CPV. Dans tous les cas il existe une dépression autour de l'axe de symétrie d'ordre 5, de telle sorte que l'axe de symétrie d'ordre 3 est plus exposé au récepteur potentiel ou aux anticorps neutralisants. A des temps très tardifs après infection, lorsque les capsides se sont formées, il semble qu'un processus de maturation permet le clivage de 15 à 20 acides aminés N-terminaux de VP2, générant une molécule de 60 à 62 kDa, appelée VP3 (Tattersall *et al.*, 1977). Ce clivage semble favorisé par la présence d'une molécule d'ADN au sein de la capsid et a pour

A.



B.



C.

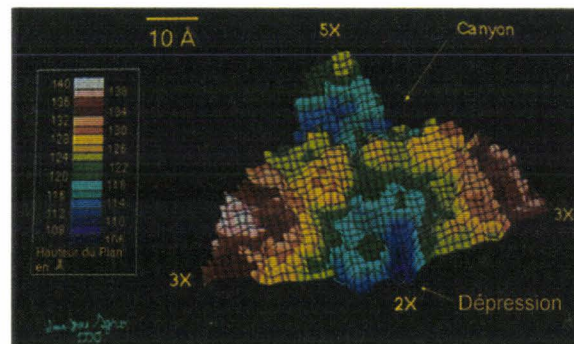


Figure 7: Structure de la capsid du parvovirus CPV.

A. Représentation tri-dimensionnelle de l'association des soixante molécules de VP1, VP2 et VP3 formant la capsid du virus. La position d'une molécule de VP est représentée par un polygone jaune. Les axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2, à proximité de cette molécule sont représentés respectivement de couleur rouge, violette et bleue.

B. Conformation d'une molécule de VP. La structure en feuilletés β se trouve au creux de la capsid et assure sa rigidité. Les boucles 1, 2, 3 et 4 sont exposées à l'extérieur du virus.

C. Représentation de la surface du virus au niveau du triangle vert indiqué en A. Autour de l'axe de symétrie d'ordre 5 se trouve une dépression, alors que l'axe de symétrie d'ordre 3 est situé en hauteur du plan défini par les feuilletés β .

conséquence une augmentation du nombre d'acides aminés hydrophobes à la surface du virus. Les capsides matures ont alors une densité de $1,41 \text{ g/cm}^3$ (Cotmore & Tattersall, 1987).

L'observation en microscopie confocale de cellules infectées par le virus ADV, montre que les protéines VP gagnent rapidement le noyau après synthèse, mais que l'assemblage des capsides autour de l'ADN viral est un processus tardif. Les capsides nouvellement formées sont rapidement exportées du noyau vers le cytoplasme (Oleksiewicz *et al.*, 1996). Les protéines VP2 peuvent, également en l'absence de VP1, s'associer à l'extrémité 3' du génome parvoviral et former des capsides (Willwand & Hirt, 1993). L'association des capsides pourrait se produire autour du brin viral nouvellement synthétisé ou plus vraisemblablement les capsides déjà formées reconnaîtraient l'extrémité 3' du virus et permettraient le déplacement du brin négatif viral au sein de la capside. Certains auteurs suggèrent également que la protéine NS1 liée à l'extrémité du génome pourrait faciliter l'encapsidation, notamment en libérant de l'énergie par hydrolyse d'ATP (Cotmore & Tattersall, 1995). Des travaux actuellement en cours sur l'encapsidation *in vitro* de génomes parvoviraux devraient permettre une meilleure compréhension de ses mécanismes.

1.1.3.IV La réplication de l'ADN simple brin

L'étape initiale de la réplication consiste en la conversion de l'ADN parvoviral en une molécule d'ADN double brin, permettant l'expression des gènes viraux indispensables à la poursuite du cycle. La succession des étapes de la réplication doit permettre la synthèse de nouvelles molécules d'ADN simple brin (correspondant au brin transcrit du virus MVM) qui seront encapsidées, permettant la propagation du virus (Figure 8).

Le développement d'un système de réplication *in vitro* a permis de mieux comprendre les étapes de réplication de l'ADN parvoviral (Baldauf *et al.*, 1997). La conversion du génome par extension du palindrome à l'extrémité 3' (extrémité gauche) peut se produire en absence de NS1 (Figure 8, étape 2). L'ADN polymérase cellulaire permettant l'extension du génome n'a pas été identifiée. Comme nous l'avons déjà précisé, celle-ci est vraisemblablement activée lors de l'entrée des cellules en phase S et pourrait correspondre à l'ADN polymérase δ . L'isolement des formes répliquatives du virus à partir de cellules permissives infectées ou du système de réplication *in vitro* montre que lorsque la polymérase atteint l'extrémité 5' de l'ADN viral

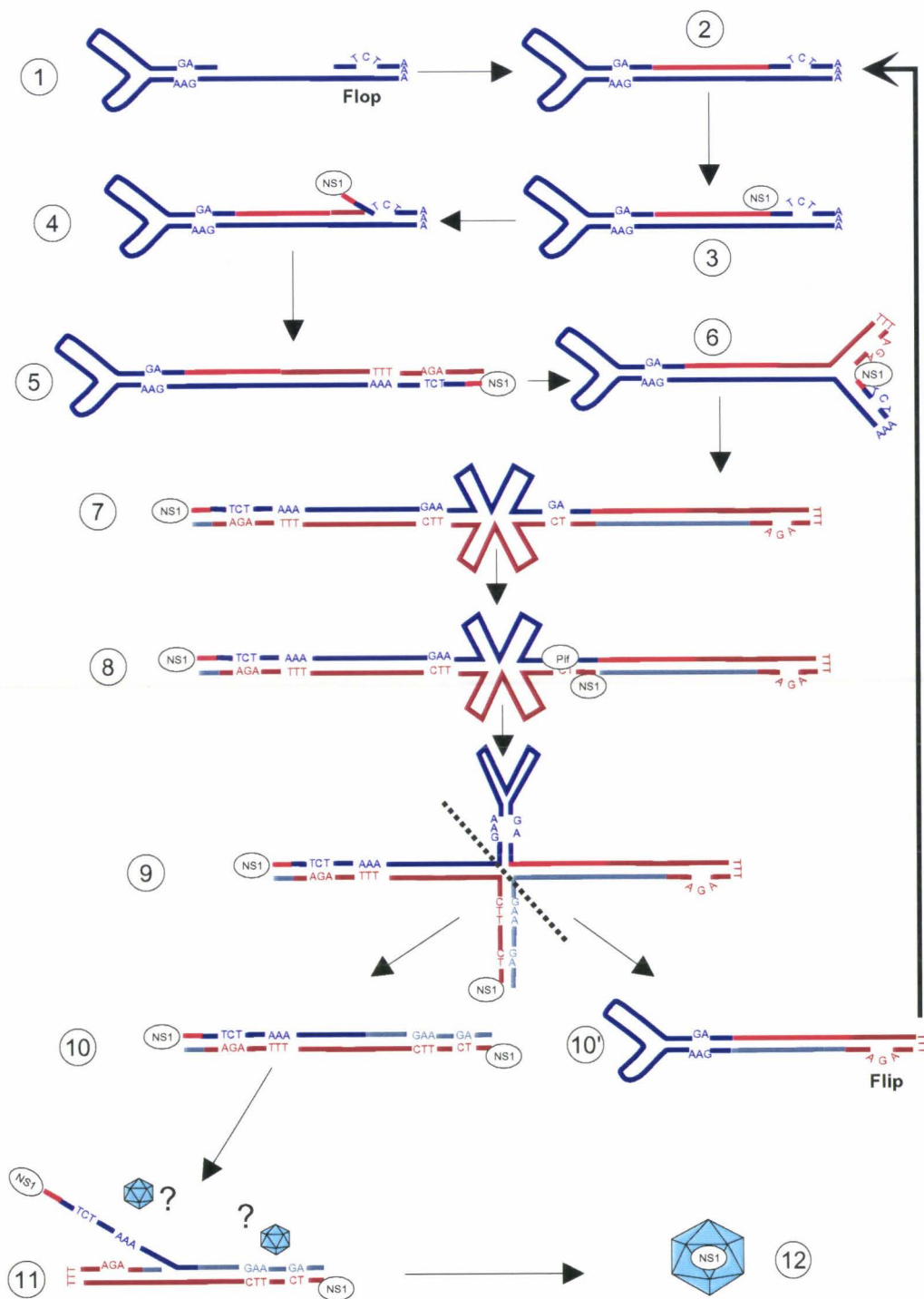


Figure 8: Modèle de la réplication de l'ADN parvoviral.

L'ADN viral, de polarité négative, est de couleur bleue. Le brin complémentaire nouvellement synthétisé est représenté en rouge. Les différentes étapes sont explicitées dans le texte.

(extrémité droite), il y a soudure des deux extrémités du génome formant ainsi une molécule circulaire. La protéine NS1 permet la résolution de cette structure en coupant l'ADN sur un seul des deux brins à l'extrémité droite du génome. NS1 reste liée de façon covalente à l'ADN au niveau de l'extrémité 5' de l'ADN restreint (Figure 8, étapes 3 et 4). Cette coupure permet l'achèvement de la copie du brin (-) (Figure 8, étape 5). La séquence en palindrome à l'extrémité du génome se referme alors en structure en "épingle à cheveux" (Figure 8, étape 6). NS1, peut être en collaboration avec l'ADN polymérase δ , permet la transition thermodynamique entre la forme étendue du génome et son repli en "épingle à cheveux" (Cossons *et al.*, 1996, Willwand *et al.*, 1998). Certains auteurs proposent l'existence d'un œil de réplication à proximité de l'extrémité droite du génome, qui en se déplaçant de part et d'autre de son origine, favoriserait l'ouverture de l'ADN indispensable au repli de l'ADN sur les séquences en palindrome (Brunstein & Astell, 1997). Toutefois il n'a jamais été observé de fragments d'Okasaki liés à la réplication de l'ADN parvoviral; il faudrait supposer que cette réplication se fasse de façon similaire à celle des plasmides bactériens ou de l'ADN mitochondrial, c'est à dire qu'au sein de l'œil de réplication, seul le brin croissant dans la direction 5'→3' est synthétisé (Kollek & Goulian, 1981, Kollek *et al.*, 1982). Il serait toutefois étonnant que la polymérase mitochondriale γ participe à la réplication de l'ADN parvoviral.

Le repli de l'extrémité droite du génome permet la copie de l'intégralité du brin (+) puis du brin (-), formant un dimère de génomes liés par leur extrémité gauche (Figure 8, étape 7). Le lien entre les deux génomes est nommé "pont de dimères". Le palindrome des parvovirus n'est pas entièrement symétrique, il existe en effet une imperfection de séquence. Suite à l'extension du génome, la partie droite du "pont de dimères" contiendra la séquence GA et la partie gauche la séquence GAA. Bien que les parties droites et gauche du "pont de dimères" contiennent un site de coupure de l'ADN par NS1, seul la partie droite sera coupée (Figure 8, étape 8). La résolution de l'ADN viral par NS1 nécessite la présence d'un facteur cellulaire, appelé PIF (facteur d'initiation parvoviral), se fixant au niveau de multimères de séquences ACGT (Christensen *et al.*, 1997, Christensen *et al.*, 1997). La coupure asymétrique est liée à l'asymétrie du palindrome, la distance entre le site de fixation de PIF et le site de restriction par NS1 est en effet différente entre les parties droites et gauche du "pont de dimères", le positionnement correct de NS1, dépendant de PIF, n'étant possible qu'au niveau de la partie droite (Cotmore & Tattersall, 1994). Suite à cette coupure, il y a de nouveau extension de l'ADN permettant une nouvelle copie du palindrome. Une étape de recombinaison homologue

permettrait la séparation des deux unités d'ADN (Cotmore & Tattersall, 1995) (Figure 8, étape 9). La première correspond à un génome circulaire qui pourra servir de matrice pour un prochain cycle de réplication (Figure 8, étape 10'). Ce produit est l'image de la molécule initiale, ce qui permet d'expliquer l'obtention des formes flip et flop du génome parvoviral. L'autre molécule correspond à un génome double brin étendu, de même conformation que l'ADN initial (Figure 8, étape 10). La copie du brin (+) permet le déplacement et l'encapsidation du brin (-) c'est à dire du génome viral (Figure 8, étape 10 et 11).

1.1.4 Oncotropisme des Parvovirus

1.1.4.1 Historique

Quels sont les liens qui lient les parvovirus aux tumeurs chez l'animal ou aux virus oncogènes? A la fin des années soixante, Toolan s'est posé cette question, pensant identifier un nouveau type de virus oncogènes. Elle compara l'impact de l'infection par le parvovirus H-1 sur le développement de tumeurs spontanées au sein des populations de hamsters. Le virus H-1 est un *parvovirus* du rat dont le génome présente une forte homologie avec celui de MVM. A sa grande surprise, les animaux infectés développent moins de tumeurs par rapport aux contrôles non infectés (Toolan, 1967). Ces premiers résultats expérimentaux ont permis d'élaborer les notions d'oncotropisme et d'oncosuppression, c'est à dire la croissance préférentielle des parvovirus dans des tissus tumoraux et leur capacité à interférer avec la prolifération de ceux-ci (Rommelaere & Cornelis, 1991).

1.1.4.2 Modèle animal

La réduction du nombre de tumeurs se développant chez des populations animales infectées, suggère que l'infection latente par les parvovirus protège de l'apparition des tumeurs. Bien que le mécanisme ne soit toujours pas compris il semble en effet que le virus puisse persister au sein de l'animal et se répliquer lors de la prolifération des cellules hôtes, par exemple au cours de la tumorigenèse, et induire la lyse de celles-ci (Gaertner *et al.*, 1996, Guetta *et al.*, 1986, Tattersall & Cotmore, 1986).

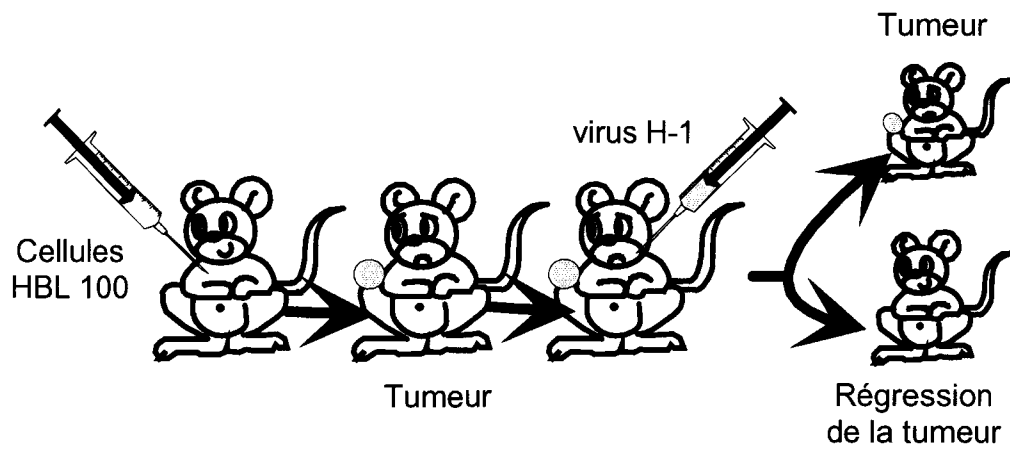
Des cellules tumorales implantées à des souris immuno incompetentes (souris nues) servent de modèle à l'étude des mécanismes de l'oncosuppression par les parvovirus. Après injection de cellules de tumeurs mammaires humaines à des souris nues, des tumeurs solides se

développent localement. L'injection de parvovirus directement au sein de ces tumeurs ou par voie intra veineuse chez l'animal induit une régression de la tumeur. Si les cellules sont préalablement infectées par le parvovirus il n'y a pas de développement de tumeur (Figure 9) (Dupressoir *et al.*, 1989). L'analyse histologique des tumeurs en régression révèle que ces tissus sont essentiellement composés de cellules murines (Faisst *et al.*, 1998). Ces résultats montrent clairement que les parvovirus conduisent à la destruction des cellules tumorales dans ces modèles animaux. Les expériences effectuées avec les souris nues prouvent que l'oncosuppression peut se produire en absence de réponse immunitaire. Celle-ci pourrait cependant accentuer l'effet toxique des parvovirus vis à vis des tumeurs ou au contraire neutraliser le virus (Jacoby *et al.*, 1995).

1.1.4.III Modèle *in vitro* de l'oncosuppression: l'oncolyse

L'investigation du mécanisme d'oncosuppression nécessite un modèle d'étude simple permettant l'analyse des composants moléculaires responsables de la destruction spécifique des cellules tumorales. L'oncosuppression a donc été transposée à la culture cellulaire, pour faciliter son étude. En 1990, Salomé *et al* ont testé l'effet de la transformation oncogénique des cellules FR3T3 sur leur sensibilité au parvovirus MVMP. Des fibroblastes de rat FR3T3 non transformés sont insensibles à l'action lytique du parvovirus MVMP de souris. Par contre des clones dérivés des cellules FR3T3, sélectionnés pour leur phénotype transformé après expression d'oncogènes distincts, sont sensibles à l'action lytique de ce virus (Salome *et al.*, 1990). L'association de la transformation des cellules hôtes à leur sensibilisation à l'infection parvovirale est qualifiée d'oncolyse (Figure 10). Divers clones ont été isolés à partir de cellules FR3T3 transformées par l'oncogène *EJ-ras*, appelés FREJ1 à FREJ4. La protéine non-structurale NS1 est surabondante dans le cellules transformées par rapport aux cellules normales: les cellules transformées exprimant les taux les plus élevés de NS1 sont les plus sensibles à l'action lytique du virus (Van Hille *et al.*, 1989). Toutefois à des niveaux élevés équivalents, NS1 lyse spécifiquement les cellules transformées (Mousset *et al.*, 1994). Comme nous l'avons précisé précédemment, la transformation cellulaire permet à la fois l'augmentation du taux de NS1 mais modifie également son action sur la cellule.

A.



B.

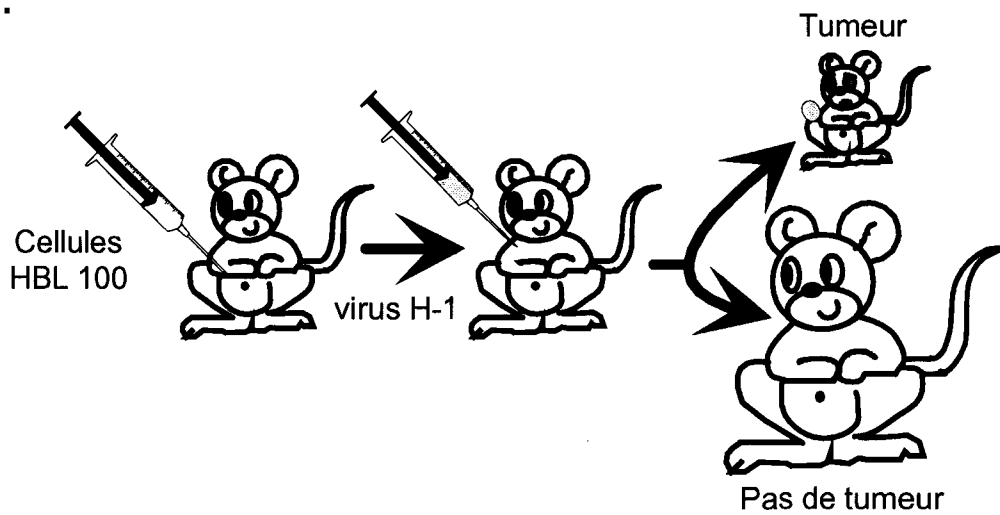


Figure 9: Modèle animal de l'oncosuppression par le parvovirus H-1.

A. Les cellules tumorales injectées à des souris immunodéprimées (souris nues) forment des tumeurs solides. L'injection du parvovirus de rat H-1 à l'animal permet d'observer une régression de la tumeur.

B. Si le virus est injecté avant l'apparition de tumeurs solides, il exerce un effet préventif contre le développement de celles-ci.

Les tailles des souris donnent une mesure de la proportion d'animaux protégés et non protégés.

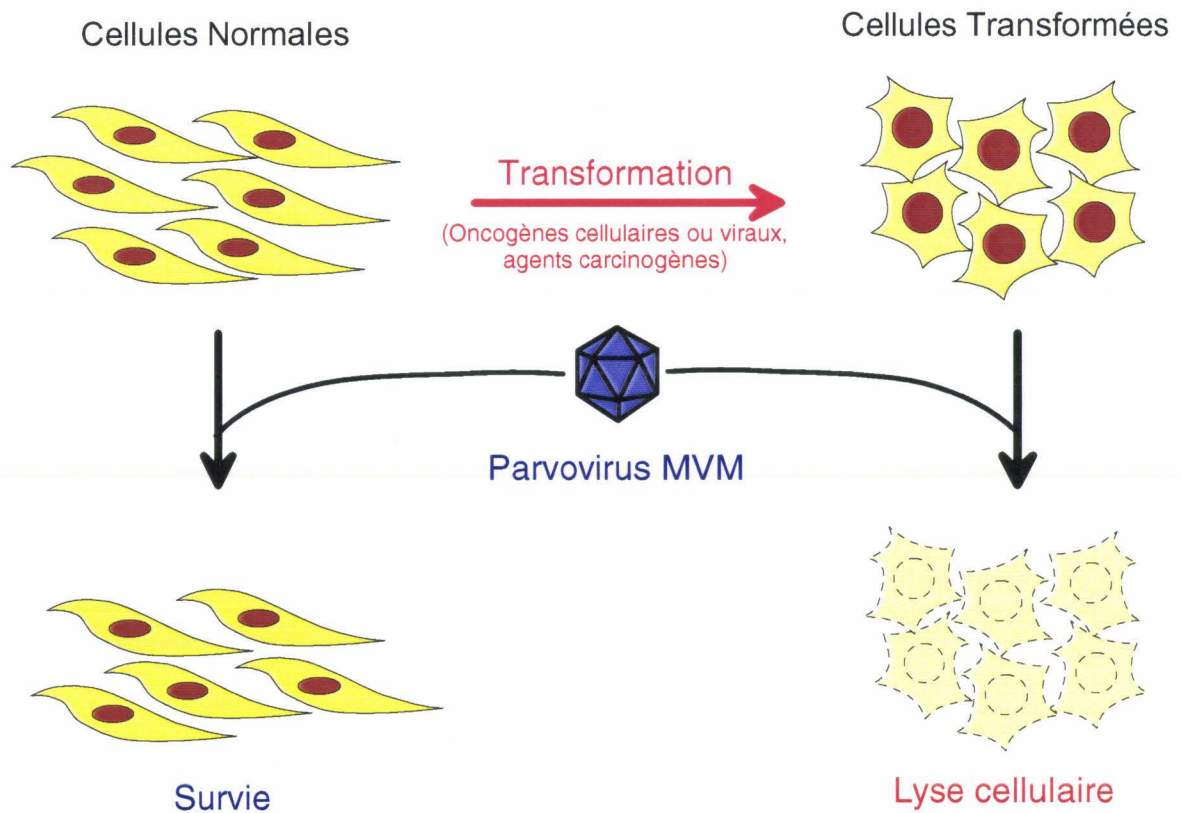


Figure 10: Modèle d'oncolyse par les parvovirus.

Des fibroblastes de rat sont résistants à l'infection par le parvovirus MVMp, par contre lorsqu'ils sont transformés par l'expression d'oncogènes cellulaires ou viraux, ou après traitement par des agents carcinogènes, ils deviennent sensibles à l'action lytique du virus.

1.1.5 Utilisation des Parvovirus en thérapie génique

Les parvovirus ont la particularité d'être faiblement pathogènes. Ils se propagent préférentiellement dans les tissus tumoraux dans des conditions où ils ne sont pas détectés dans les tissus sains. Ces propriétés les désignent comme d'excellents vecteurs pouvant diriger l'expression de gènes thérapeutiques au sein de cellules tumorales, sans causer de dommages aux tissus sains. A ce titre leur utilisation dans la lutte contre le cancer a été envisagée. De premiers vecteurs ont été développés en utilisant les *Dependovirus* ou les parvovirus autonomes H-1 et MVM (Figure 11).

1.1.5.I Les AAV comme vecteurs

Les vecteurs basés sur les virus adéno-associés sont sans aucun doute beaucoup plus développés que ceux utilisant le génome des parvovirus autonomes. Un des intérêt principal des AAV est leur intégration possible dans le génome cellulaire. Celle-ci, contrairement aux rétrovirus, est sélective au sein du chromosome 19 humain (Sokol & Prchal, 1995) et ne semble pas détruire la fonction de gènes particuliers. Toutefois afin de réduire la contamination par le virus sauvage, les virus recombinants ne conservent que les extrémités en palindromes du génome, nécessaires à l'encapsidation et à l'intégration des gènes thérapeutiques. L'intégration en absence des protéines non-structurales rep est alors aléatoire dans le génome et peu efficace. D'autre part les AAV peuvent infecter des cellules quiescentes. De premiers essais prometteurs ont été réalisés chez l'animal, montrant que malgré l'absence des protéines rep les gènes thérapeutiques sont exprimés à long terme (Fisher *et al.*, 1997, Gnatenko *et al.*, 1997, Herzog *et al.*, 1997, Maeda *et al.*, 1997, Monahan *et al.*, 1998, Qing *et al.*, 1998, Rolling *et al.*, 1997, Snyder *et al.*, 1997). De nouveaux vecteurs sont actuellement à l'étude, conservant les protéines rep, ce qui permettrait la réplication et l'intégration spécifique des génomes recombinants.

1.1.5.II Intérêt des parvovirus autonomes

Les parvovirus autonomes ont deux propriétés remarquables dans la lutte contre les cellules tumorales: d'une part l'accroissement de la cytotoxicité de NS-1 dans les cellules transformées par des oncogènes et, d'autre part, la sur activation du promoteur précoce P4, dans ces cellules. Ainsi la transformation cellulaire induit la sur-expression de la protéine NS-1

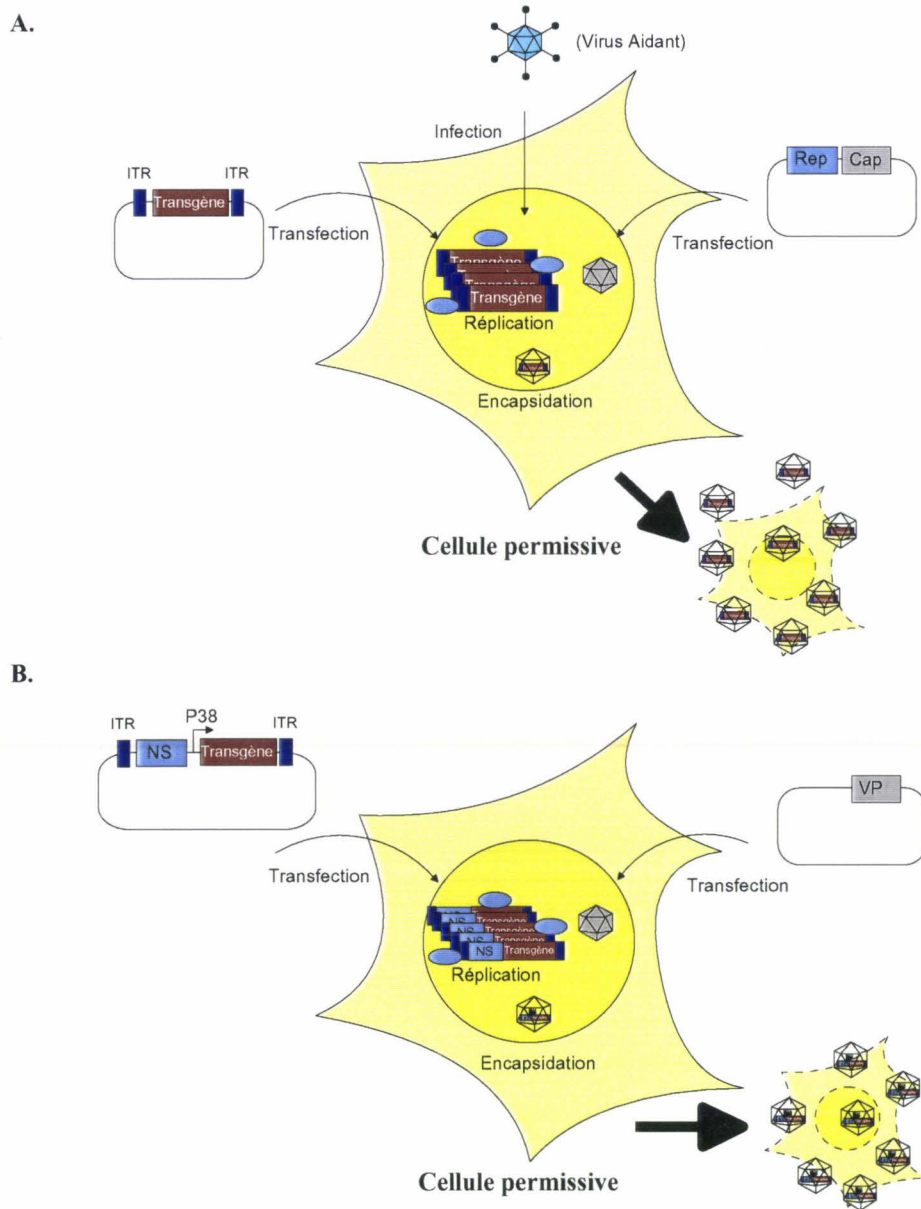


Figure 11: Stratégies de production de parvovirus recombinants.

A. Dans le cas de virus recombinants basés sur les Dépendovirus, seules les extrémités en palindrome (ITR) du virus adéno-associé sont conservées. L'apport des protéines virales, non-structurales (Rep) et de capside (Cap) ainsi que des fonctions d'un virus aidant (adénovirus) sont nécessaires à la production de particules virales.

B. Dans le cas des parvovirus autonomes, les protéines non-structurales (NS) sont conservées. Les gènes des protéines de capside sont remplacés par le gène thérapeutique. L'expression de ce gène est dépendante de l'activation du promoteur P38 par NS.

Dans ce cas, seul l'apport d'un vecteur d'expression des protéines de capside (VP) est requis pour la production de virus recombinants.

et exacerbe ces effets cytotoxiques. De plus un taux élevé de NS-1 aura pour conséquence directe l'induction du promoteur P38, de façon dose dépendante. Un gène thérapeutique placé sous contrôle de ce promoteur tardif s'exprimera préférentiellement dans les cellules transformées. Pour ces raisons, la "cassette" P4-NS1 est conservée dans les vecteurs parvoviraux désignés à la lutte anti-tumorale. Des virus recombinants, permettant l'expression de cytokines sous le contrôle du promoteur P38 ont pu être produits. De tels virus sont obtenus par cotransfection de plasmides bactériens portant d'une part le génome viral au sein duquel les gènes de capsides sont substitués par un gène de cytokine, et d'autre part les gènes des protéines de capsides sous le contrôle d'un promoteur actif de façon constitutive. De premiers essais chez la souris montrent l'efficacité supérieure de ces virus recombinants, par rapport au virus sauvage, pour l'induction de la régression de tumeurs solides développées après injection de cellules tumorales (Russell *et al.*, 1992).

1.2 Contrôle du cycle cellulaire

Le cycle viral des parvovirus est intimement lié à celui de la cellule hôte (Figure 12). Le cycle cellulaire se divise en deux étapes principales, l'interphase, durant laquelle, dans le cas de conditions de croissances favorables, la cellule duplique son information génétique, et la mitose (M), correspondant à la division cellulaire. L'interphase se divise en 3 phases nommées G1, S et G2. La phase S est la phase de réplication de l'ADN, les phases G1 et G2 sont des phases de transitions permettant à la cellule de n'engager la phase suivante que si les conditions externes et internes à la cellule le permettent. C'est durant ces phases que la cellule peut par exemple contrôler la présence de facteurs de croissance dans le milieu extérieur ou encore vérifier l'absence de lésions dans l'ADN génomique avant et après sa réplication.

La compréhension des mécanismes contrôlant la prolifération des cellules est nécessaire à l'identification des facteurs cellulaires restreignant l'expression et la réplication des parvovirus à la phase S du cycle cellulaire.

1.2.1 Activités des complexes cycline / kinase dépendante des cyclines

1.2.1.1 Rôle des cyclines dans le contrôle du cycle cellulaire

En 1982, la découverte des cyclines de l'oursin par Tim Hunt a permis de faire un bond considérable dans la compréhension des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire (Evans *et al.*, 1983). Les synthèses et dégradations successives d'une seule protéine sont les seuls événements nécessaires pour qu'un œuf d'oursin réplique son ADN en cycles successifs. Cette propriété lui donne le nom de "cycline" (Murray & Kirschner, 1989, Murray *et al.*, 1989). Les cyclines sont associées à des protéines appelées cdk pour kinases dépendantes des cyclines (Hunt, 1991). Le complexe cycline/cdk peut phosphoryler des résidus Sérine et Thréonine au sein d'une séquence consensus, alors que pris indépendamment cyclines ou cdk sont totalement inactifs (Morgan, 1996, Norbury & Nurse, 1992). L'action du complexe cycline/cdk paraît simple chez l'oursin, elle devient beaucoup plus complexe chez les eucaryotes supérieurs. Chez les mammifères, il existe au moins 13 cyclines différentes pour 13 partenaires cdk (Figure 13 & Tableau 3) (Pines, 1996), chaque complexe ayant une action différente sur la prolifération cellulaire. Une même cdk peut avoir une activité différente suivant la cycline à laquelle elle se lie (Tableau 3) (Horton & Templeton, 1997). Initialement toute protéine dégradée lors de la

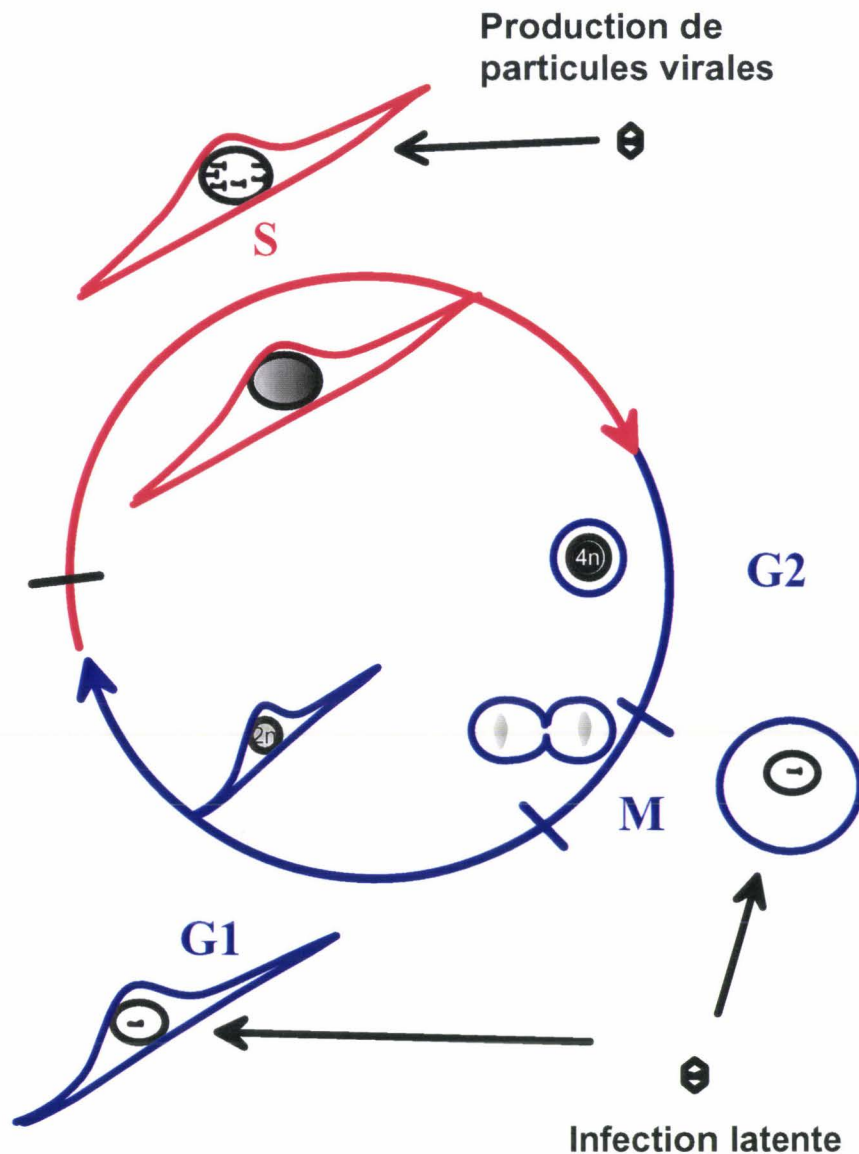


Figure 12: Dépendance du cycle parvoviral vis-à-vis du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire, représenté au centre du cercle, se divise en 4 phases. Les phases G1 et G2 sont des phases de transition, la phase M correspond à la division cellulaire. Pendant la phase S, l'ADN cellulaire est répliqué dans son intégralité, d'une quantité $2n$ à $4n$. Comme schématisé à l'extérieur du cercle, les parvovirus peuvent infecter les cellules indépendamment de leur position dans le cycle cellulaire; cependant l'infection ne sera productive que lorsque la cellule hôte initie la répllication de son génome en phase S, exprimant des facteurs dont la nature est encore inconnue (Tattersall & Bratton, 1983). L'étape de synthèse est symbolisée par un trait noir en début de phase S. La particularité des parvovirus est qu'ils sont incapables d'induire la prolifération d'une cellule quiescente.

Tableau 3. Rôle(s) des cyclines et cdk's dans la progression du cycle cellulaire.

| Protéine | Expression durant le cycle cellulaire | Fonction(s) | Contrôle de l'activité de la protéine | Action possible dans le développement de cancers |
|-------------------------------|--|---|--|--|
| Cycline A | Phase S Entrée en M | Active cdk2 Active cdk1 | Transcription et protéolyse (ubiquitine) | Induction de carcinome hépatocellulaire en cas de surexpression |
| Cycline B1 | Entrée en M | Active cdk1 | Transcription et protéolyse (ubiquitine) | ? |
| Cycline B2 | Entrée en M | Active cdk1 | Transcription et protéolyse (ubiquitine) | ? |
| Cycline C | G1 ? | Active cdk8 | ? | ? |
| Cyclines D1, D2, D3 | G1 | Active cdk4 et cdk6 | Transcription et protéolyse (séquence PEST, ubiquitine) | •cycline D1=proto-oncogène PRAD-1/BCL-1. •Surexpression dans les hépatoblastomes. |
| Cycline E | Entrée en S | Active cdk2 | Protéolyse (séquence PEST, ubiquitine) | Réarrangements et sur-expression dans les carcinomes mammaires |
| Cycline F | G2 et G2/M | Se lie au facteur Skp1, impliqué dans la protéolyse | Transcription ? | ? |
| Cycline G | Transition G2/M | Est activée par p53 en réponse aux dommages à l'ADN | Transcription | Liaison avec p53 |
| Cycline H | Ubiquitaire | Active cdk7 | ? | ? |
| Cycline I | ubiquitaire, surtout en G0 | Maintient l'arrêt en G0 des cellules en différenciation? | Protéolyse (séquence PEST) ? | ? |
| Cycline J | ? | Contrôle le Développement embryonnaire précoce (<i>Drosophila</i>) | Transcription | ? |
| Cdk1 (cdc2) Cdk2 | Entrée en M En G1 (à partir du point de restriction R) et S | Phosphoryle histone H1, Lamines, etc. •Phosphoryle pRb, Thymidine kinase, NPAT. •Est associée à la machinerie de réplication de l'ADN | Activation par les cyclines A et B Activation par les cyclines A et E | ? ? |
| Cdk3 | G1 ou fin G1 (après R) | Se lie à E2F-1 (-2 et -3) et l'active ? | ? | Localisation chromosomique à proximité du site de perte d'hétérozygotie (PDH) (locus BRCA1) |
| Cdk4 | G1 | Phosphoryle pRb | Activation par les cyclines D1, D2, et D3 | Amplification du gène dans les gliomes. Mutation dans de nombreux mélanomes. Induction dans certains carcinomes mammaires. |
| Cdk5 | G0 ? | •Phosphoryle tau et les neurofilaments des neurones. •Réorganisation du cytosquelette associée à l'apoptose ? | Activation par la p35. Taux variable (mRNA constant) | ? |
| Cdk6 | G1 | Phosphoryle pRb | Activation par les cyclines D1, D2 et D3 | Lymphome non-Hodgkinien ? |
| Cdk7 | Ubiquitaire | •Active les cdk (CAK) Phosphoryle TFIIF et p53. •Inhibition en G2 nécessaire à la mitose. | Activation par la cycline H | ? |
| Cdk8 PITSLRE | G1 ? ? | Est associée à l'ARN polymérase II Clivage induit l'apoptose | Activation par la cycline C Clivage par ICE/CASP-1 et CPP32/CASP-3, en une forme active de 50 kDa | ? Localisation au sein d'une région absente dans de nombreux carcinomes. Altération dans les neuroblastomes. |
| PISSLRE | G2 | ? | ? | Localisation à proximité de PDH dans les carcinomes du sein et de la prostate |
| PITALRE PFTAIRE PCTAIRE | G1? ? Cellules post-mitotiques | Phosphoryle pRb Rôle lors de la méiose? Induit la différenciation des neurones | Expression spécifique du tissu. ? Epissage alternatif. | lymphome non-Hodgkinien ? ? ? |

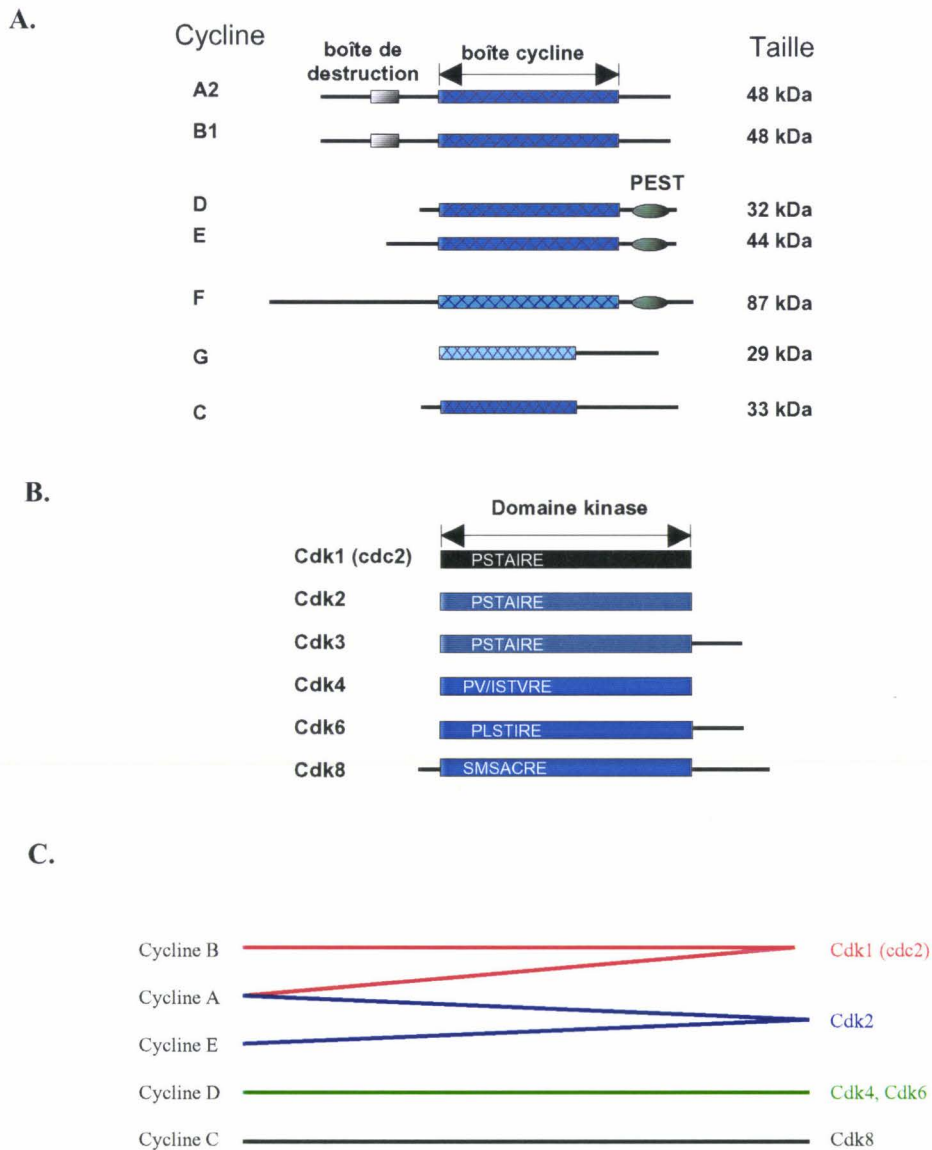


Figure 13: Représentation schématique des cyclines, cdk et leurs associations.

A. Le domaine cycline est représenté par un rectangle hachuré. Si deux cyclines présentent un degré d'homologie élevé au niveau de ce domaine, ils sont représentés de couleur bleue identique. Les boîtes de destruction et PEST permettent la reconnaissance et la protéolyse par le réseau de l'ubiquitine.

B. Le domaine kinase est représenté par un rectangle. Le degré d'homologie par rapport à la cdk1 est représenté par l'intensité de la couleur bleue (noir: 100%, bleu clair: 40%). La séquence d'association à la cycline est indiquée suivant le code d'acides aminés à une lettre (PSTAIRE).

C. Différentes associations possibles entre cyclines et cdk. Les cdk partenaires des cyclines F et G n'ont pas été identifiés.

Seules les cyclines et cdk agissant directement sur le contrôle du cycle cellulaire sont indiquées.

mitose du cycle cellulaire était appelée cycline; le séquençage des ADNc des différentes cyclines, clonés à ce jour, a permis de préciser cette définition. Entre les différentes séquences, un domaine de 100 acides aminés, appelé boîte cycline, indispensable à la liaison avec le partenaire cdk, est conservé (Figure 13A). Toute protéine possédant ce domaine est appelée cycline. Ce domaine participe également à la reconnaissance spécifique du substrat par le complexe cycline/cdk (Horton & Templeton, 1997). De même, les cdk possèdent deux domaines conservés: un domaine kinase et, au sein de ce premier, un domaine PSTAIRE (suivant le code à une lettre des acides aminés) (Figure 13B). La liaison aux cyclines se fait par l'intermédiaire de ce second domaine. Les variations de structure autour de cette séquence permettent la spécificité d'association entre cycline et cdk (Pines, 1996).

1.2.1.II Activation du complexe cycline/cdk

La cristallisation de la cdk2 et du complexe entre la cdk2 et une forme de la cycline A tronquée du côté N-terminal a permis de comprendre comment l'activité kinase de la cdk est conférée par la liaison d'une cycline (Figure 14) (Jeffrey *et al.*, 1995). L'association de la cycline au domaine PSTAIRE modifie la structure globale de la cdk. Ceci a pour conséquence l'ouverture de la "crevasse" catalytique, c'est à dire du domaine de reconnaissance et de phosphorylation du substrat. Parallèlement à cette ouverture de la cdk2, le résidu thréonine 160 est rendu accessible à d'autres protéines activatrices. En effet l'association cycline/cdk n'est pas suffisante, à elle seule, à la formation d'un complexe actif. L'activité dépend également de la phosphorylation du résidu Thréonine 160 (Thréonine 161 pour la cdk1) par une protéine kinase appelée CAK, pour kinase activatrice des cdk (Sclafani, 1996). La CAK est elle même une protéine de type cycline/cdk, résultant de l'association de la cycline H, de la cdk7 ainsi que d'un facteur d'assemblage appelé Mat-1 (Fisher *et al.*, 1995). Quelle protéine active la CAK par phosphorylation du résidu Thréonine précité (localisé en position 170 dans la CAK)? Cet acide aminé n'étant pas auto-phosphorylé par la CAK, il pourrait s'agir d'une autre CAK ou du complexe cyclineA/cdk2 (Fisher *et al.*, 1995). Ceci fit dire à Draetta (Draetta, 1997) „Que la réelle CAK lève le doigt“. Contrairement au cas des autres cdk, la seule phosphorylation des résidus Sérine 170 et Thréonine 176 (Thréonine 170 chez l'homme) suffit à fournir à la CAK du Xénope le tiers de son activité maximale même en absence de cycline H. La phosphorylation de ces résidus augmente également l'affinité de la cycline H pour la cdk7 (Martinez *et al.*, 1997).

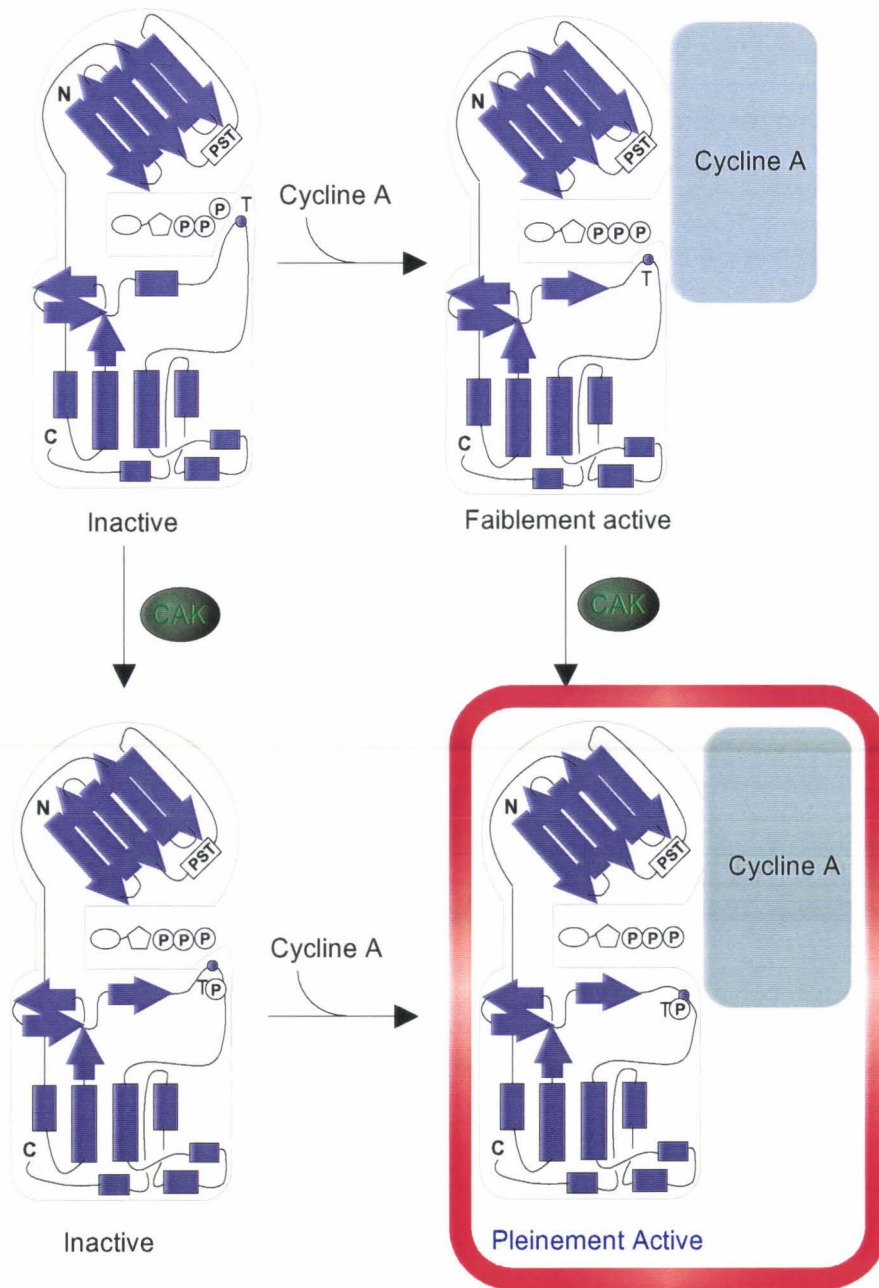


Figure 14: Activation du complexe cyclineA/cdk2.

Le site catalytique de la kinase (où se loge l'ATP) étant masqué, la kinase est initialement inactive. La fixation de la cycline, reconnaissant la séquence PST, permet l'ouverture de ce domaine, mais ne suffit pas à activer pleinement la kinase. La phosphorylation du résidu Thréonine 160 par une protéine activatrice (CAK) est nécessaire à l'accessibilité complète du domaine catalytique. La phosphorylation de la Thréonine 160 ne suffit pas à l'activation la kinase en absence de fixation de la cycline.

Le complexe cycline/cdk, activé par la CAK, est immédiatement inactivé par des protéines kinases (Lew & Kornbluth, 1996). Ceci a été principalement montré pour le complexe cyclineB/cdk1, mais ce mécanisme semble être conservé pour les autres cdk. Dans le cas du complexe cyclineB/cdk1, des protéines kinases appartenant aux familles wee1 et myt1 phosphorylent la cdk1, respectivement au niveau des résidus Tyrosine 15 et Thréonine 14. La phosphorylation de ces acides aminés, situés à proximité de la "crevasse" catalytique, empêche la liaison de l'ATP et inactive le complexe cyclineB/cdk1 (Figure 15). L'activation finale du complexe cyclineB/cdk1 nécessite donc la déphosphorylation des résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15 par la phosphatase cdc25C. L'activation du complexe cyclineB/cdk1 se produit au cours de la phase S sous la forme d'un rétrocontrôle positif (Figure 16). En début de phase G2 les protéines wee1 et cdc25C ne sont pas phosphorylées, sous cette forme la première est active et la seconde inactive. L'action conjuguée de ces protéines inactive le complexe cyclineB/cdk1 par phosphorylation des résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15. L'activation du promoteur du gène de la cycline B et l'accumulation de celle-ci dès la phase S permet une augmentation du nombre de complexes cyclineB/cdk1 partiellement activés par la CAK. Ces complexes phosphorylent, directement ou indirectement, les protéines wee1 et cdc25C, en fin de phase G2, ce qui inactive la première et active la seconde. L'action conjuguée des protéines wee1 et cdc25C conduit dans ce cas à l'activation du complexe cyclineB/cdk1. Cette boucle positive de régulation permet une activation rapide et massive des cdk en fin de phase G2. L'identification d'une phosphatase homologue à cdc25C, la protéine cdc25A, activée en G1 par le complexe cyclinE/cdk2 laisse supposer que le contrôle peut être identique pour d'autres kinases du cycle cellulaire (Hoffmann *et al.*, 1994).

1.2.1.III Actions successives des cyclines

Les différentes cyclines sont exprimées et dégradées à des étapes précises du cycle cellulaire. Si les cdk sont présentes à des taux identiques durant l'intégralité du cycle; à chaque phase correspondent des cyclines différentes (Pines, 1996). Ainsi à l'expression d'une cycline correspond souvent l'apparition d'une activité kinase associée (Figure 17). Il existe quatre familles de cyclines dont le rôle dans la progression du cycle cellulaire est connu à ce jour. En tout début de la phase G1, lorsque celle-ci fait suite à une phase de quiescence des cellules (G0), l'expression des cyclines D est induite en réponse aux agents mitogènes. Le gène de la cycline E est ensuite activé. Comme cette activation est transitoire et la protéine rapidement

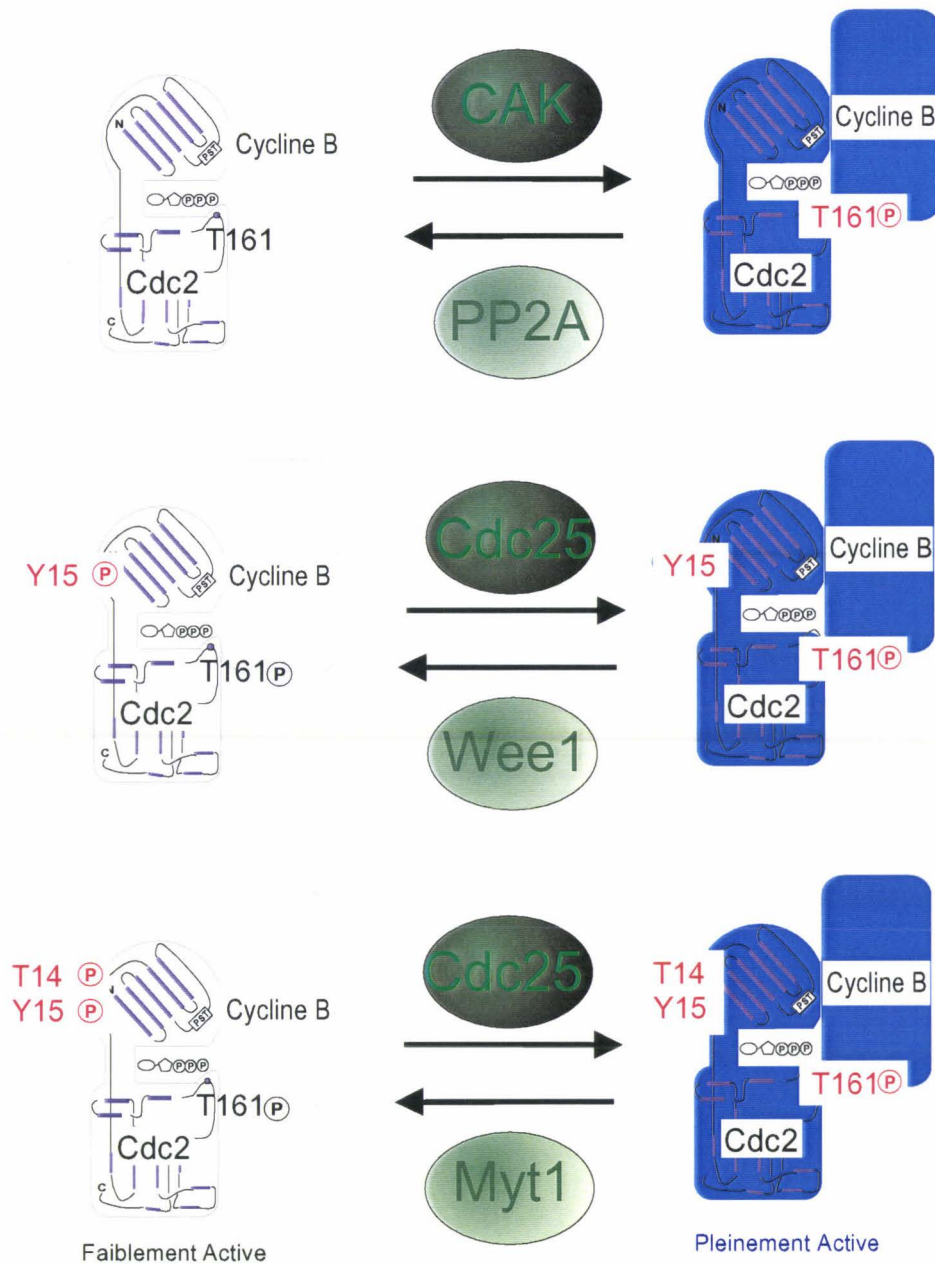


Figure 15: Inactivation et activation du complexe cyclineB1/cdk1 par les kinases wee1 et Myt1, et par la phosphatase Cdc25.

Le complexe cyclineB1/cdk1 peut être inactivé par déphosphorylation du résidu Thréonine 161 nécessaire à l'ouverture du domaine catalytique, induite par la phosphatase PP2A. La phosphorylation des résidus Thréonine 14 et Tyrosine 15, situés à proximité du domaine catalytique, par les kinases wee1 et Myt1, empêche l'accessibilité de la kinase au substrat. La déphosphorylation de ces résidus par la phosphatase Cdc25 permet la réactivation de la kinase.

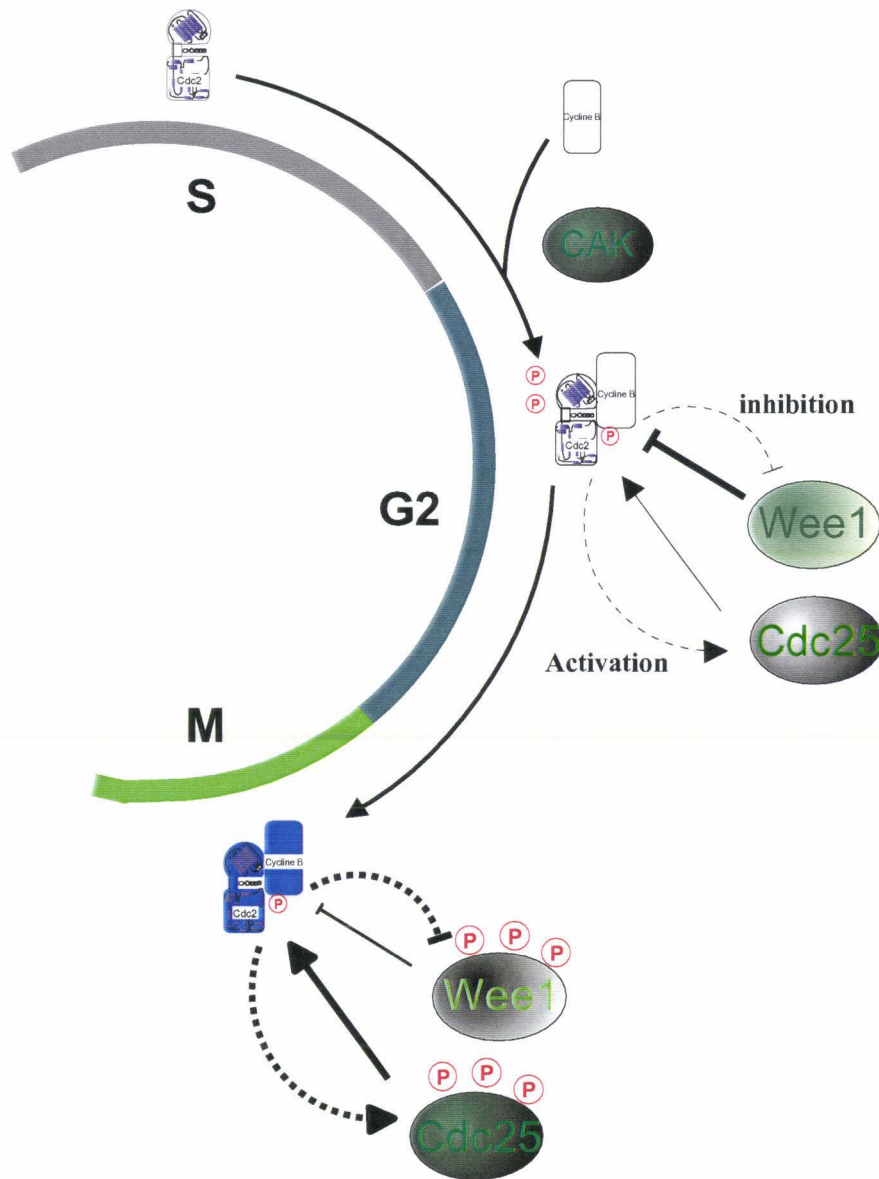


Figure 16: Activation et inactivation du complexe cyclineB1/cdk1 au cours du cycle cellulaire.

L'association de la cycline à la cdk ne suffit pas à l'activation de la kinase. En début de phase G2, la phosphorylation de la Thréonine 161 par la CAK permet l'activation du complexe qui est immédiatement inactivé par la kinase wee1 active. La phosphatase Cdc25, non phosphorylée est alors inactive. En fin de G2, l'augmentation du taux de cycline B1 permet une faible activation du complexe cyclineB1/cdk1 qui phosphoryle, directement ou indirectement, les protéines wee1 et Cdc25. La kinase wee1 est alors inactivée; par contre l'activation de la Cdc25 successive à sa phosphorylation permet l'activation totale du complexe cycline B1/cdk1.

L'épaisseur des flèches indique le degré d'activation ou d'inhibition.

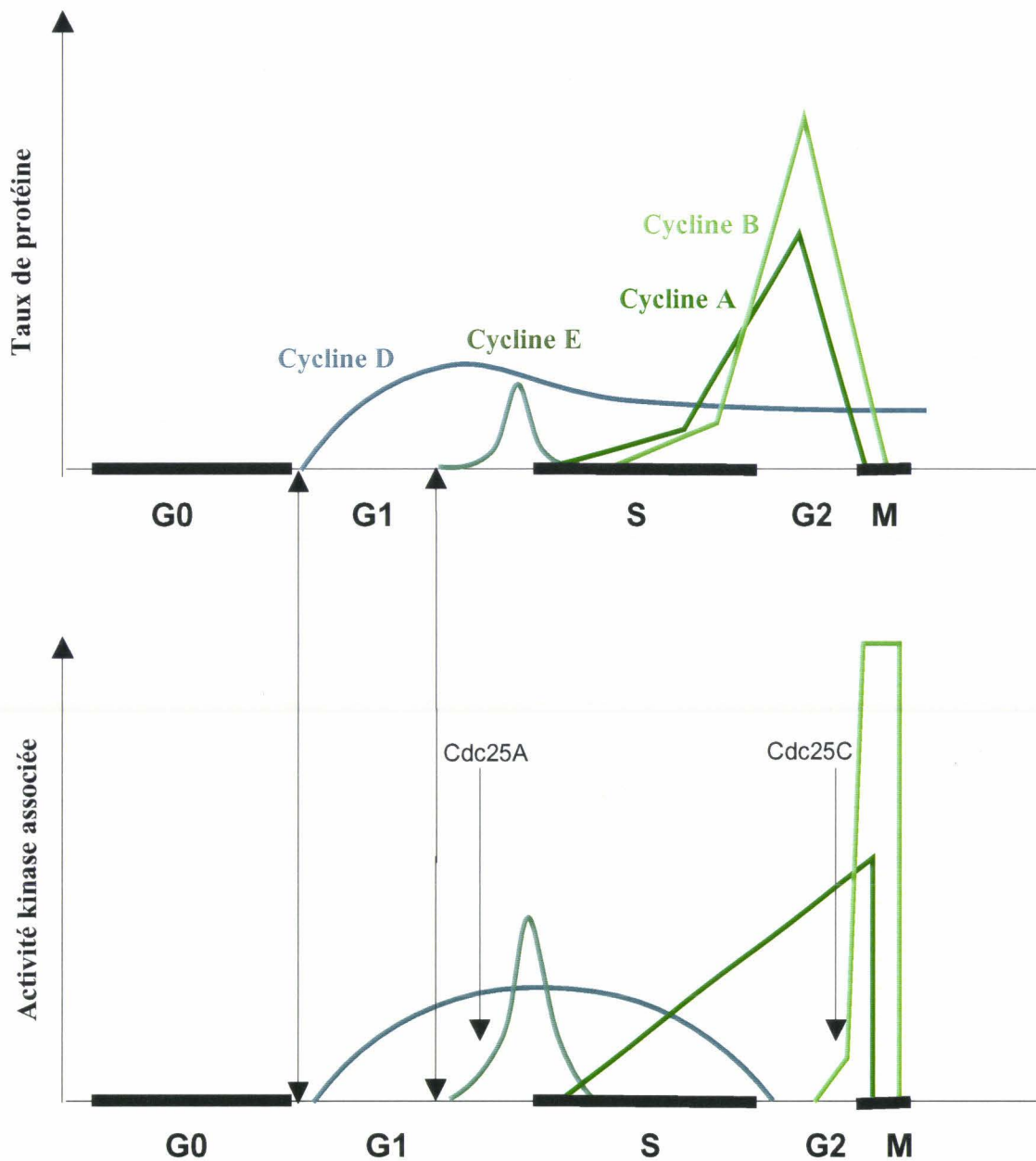


Figure 17: Taux et activités des différentes cyclines au cours du cycle cellulaire.

Dans le panneau supérieur de la Figure sont représentées schématiquement les variations du taux des différentes cyclines après induction du cycle cellulaire par des agents mitogènes. Le panneau inférieur montre la grande similitude entre le taux des différentes cyclines et les activités kinases associées. Les doubles flèches permettent de visualiser la correspondance entre le début de l'expression des cyclines D et E et l'apparition des kinases qui leur sont associées. L'activation des phosphatases Cdc25 A et C est également indiquée.

dégradée, la cycline E est exprimée sous forme d'un pic en milieu de phase G1 (Sherr, 1996). L'entrée des cellules en phase S est marquée par l'apparition de la cycline A, dont le taux augmente constamment jusqu'à atteindre un pic en phase G2. La synthèse de la cycline B est initiée en cours de phase S, la protéine s'accumule progressivement au long de cette phase. Contrairement aux autres cdk, l'activité kinase associée à la cycline B n'est observée qu'en fin de phase G2 et en début de mitose. Ce pic d'activité est lié à la régulation en boucle positive préalablement décrite. Dans tous les cas il semble que les cyclines sont activement dégradées par le réseau de l'ubiquitine, dégradation indispensable à la progression correcte des cellules dans leur cycle (Hershko, 1997, King *et al.*, 1996).

1.2.1.III.a Dégradation des cyclines par le réseau de l'ubiquitine

La dégradation des différentes protéines du cycle cellulaire joue un rôle crucial dans l'enchaînement correct des différentes phases du cycle. Ces protéines sont majoritairement dégradées par le réseau de l'ubiquitine (Figure 18) (Hershko, 1997). L'ubiquitine est un polypeptide de 76 acides aminés. Elle est activée par la formation d'une liaison thiolester entre son domaine C-terminal et un résidu Cystéine de l'enzyme activatrice E1. L'énergie nécessaire à cette réaction est fournie par hydrolyse d'ATP. L'ubiquitine est alors transférée à une enzyme E2 (également nommée UBC, pour enzyme de conjugaison de l'ubiquitine), qui assure son transport. L'enzyme E3 permet la liaison du domaine C-terminal de l'ubiquitine active à un résidu Lysine d'une protéine substrat. Un résidu Lysine de l'ubiquitine est lui même reconnu par l'enzyme E3, aboutissant à la formation d'une chaîne de polyubiquitine. Les protéines "polyubiquitinées" sont reconnues et dégradées en petits peptides par les protéosomes. L'ubiquitine est alors régénérée par action d'isopeptidases.

1.2.1.III.b Fonctions des cyclines D et E, cyclines de phase G1

Il existe 3 types de cyclines D, appelées cycline D1, D2 et D3, qui sont exprimées différemment suivant les lignées cellulaires (Sherr, 1995, Sherr, 1996). Une même cellule peut exprimer une ou plusieurs des cyclines D, souvent les cyclines D1 et D2 simultanément. Elles permettent l'initiation du cycle cellulaire en réponse à la stimulation par des agents mitogènes. La croissance de cellules sur-exprimant le gène de la cycline D1 est ainsi peu dépendante de la présence de facteurs de croissance dans le milieu (Imoto *et al.*, 1997).

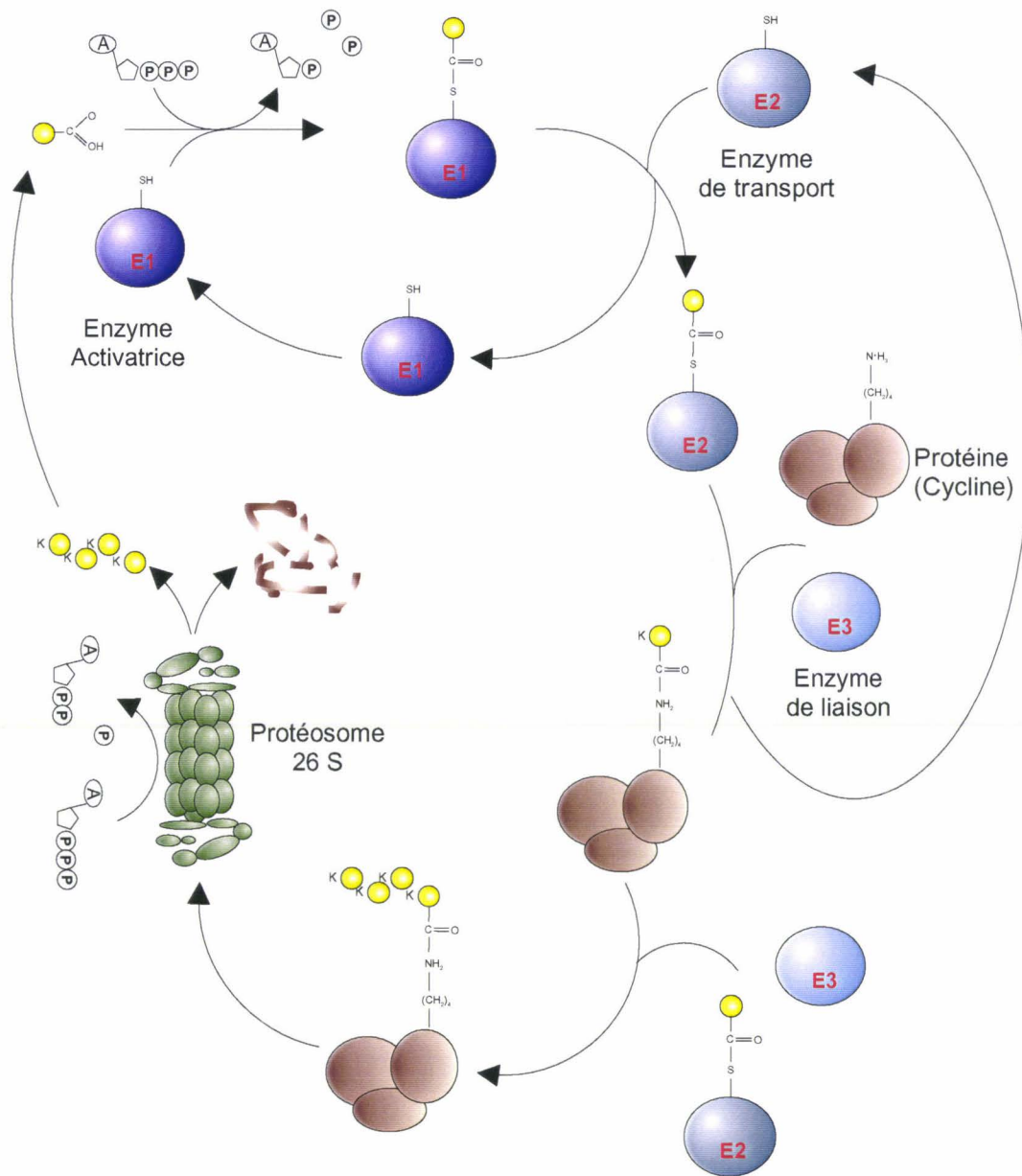


Figure 18: Dégradation des protéines par le réseau de l'ubiquitine.

L'ubiquitine, représentée par un cercle jaune, est activée par l'enzyme E1. Cette activation consomme de l'ATP nécessaire à l'obtention d'une liaison thiolester. Elle est alors transportée à proximité des protéines cibles par une enzyme E2. L'enzyme E3 permet sa liaison de l'ubiquitine par l'extrémité COOH à un résidu Lysine de la protéine cible. L'ubiquitine est alors elle-même cible de l'enzyme E3, ce qui permet la formation d'un polymère d'ubiquitines liées par leur extrémité COOH et un résidu Lysine. Les protéines poly-ubiquitinées sont reconnues et dégradées en peptides par le protéosomes. L'ubiquitine est recyclée par des isopeptidases.

La microinjection simultanée ou séparée des différentes cyclines G1 dans des fibroblastes humains quiescents, suffit à induire leur prolifération (Connell-Crowley *et al.*, 1998). La cible principale des complexes cyclineD/cdk4 et cyclineD/cdk6 semble être la protéine du rétinoblastome pRb (Figure 19). Des cellules ayant perdu les deux allèles du gène *pRB* sont insensibles à la sur-expression des gènes *cyclines D* (Lukas *et al.*, 1995). La protéine pRb, sous sa forme déphosphorylée, lie et inactive le facteur de transcription E2F. Celui-ci est responsable de l'activation de nombreux gènes de phase S. La phosphorylation de pRb par le complexe cyclineD/cdk4 ou cyclineD/cdk6 libère le facteur E2F, ce qui permet l'activation des gènes de phase S (Ewen *et al.*, 1993, Kato *et al.*, 1993, Matsushime *et al.*, 1994). La phosphorylation de pRb correspond au point de restriction du cycle cellulaire, à partir duquel les cellules progressent dans leur cycle indépendamment de facteurs de croissance.

La *cycline E*, induite par la cycline D, semble indispensable à la transition G1/S. En effet, chez la drosophile, la disparition des messagers codant pour la cycline E, après la 16^{ème} mitose, a pour conséquence l'arrêt des cellules en G1 (Knoblich *et al.*, 1994, Sauer *et al.*, 1995). Si le complexe cyclineE/cdk2 peut phosphoryler pRb il ne semble pas que ce soit son rôle majeur dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. La sur-expression de la *cycline E*, dans des cellules pRb *-/-* ou ayant une protéine E2F mutée incapable d'activer les gènes de phase S, permet l'induction de la réplication de l'ADN cellulaire (Leng *et al.*, 1997, Lukas *et al.*, 1997). Le complexe cyclineE/cdk2 pourrait activer des protéines, présentes mais inactives en phase G1, nécessaires à la réplication de l'ADN (Zhao *et al.*, 1998). Cependant il n'a jamais été observé si l'expression de *cycline E*, dans un tel contexte génétique, peut permettre plusieurs cycles réplicatifs successifs sans activation des gènes de phase S par E2F. Après un certain nombre de cycles, ces protéines pourraient ne plus être présentes en quantité suffisante et une réactivation des gènes de phase S serait alors indispensable.

1.2.1.III.c Cyclines de phases S et G2

Le gène de la cycline A est uniquement exprimé en phase S (Pines, 1996). La protéine n'est observée que durant les phases S et G2; elle est activement dégradée lors de la mitose. Selon l'association de la cycline A avec la cdk2 en phase S ou la cdk1 en phase G2, elle permet la phosphorylation de substrats différents (Jackman & Pines, 1997, Reed, 1997). Le complexe cyclineA/cdk2 est directement actif, la cdk2 étant activée par déphosphorylation en milieu de

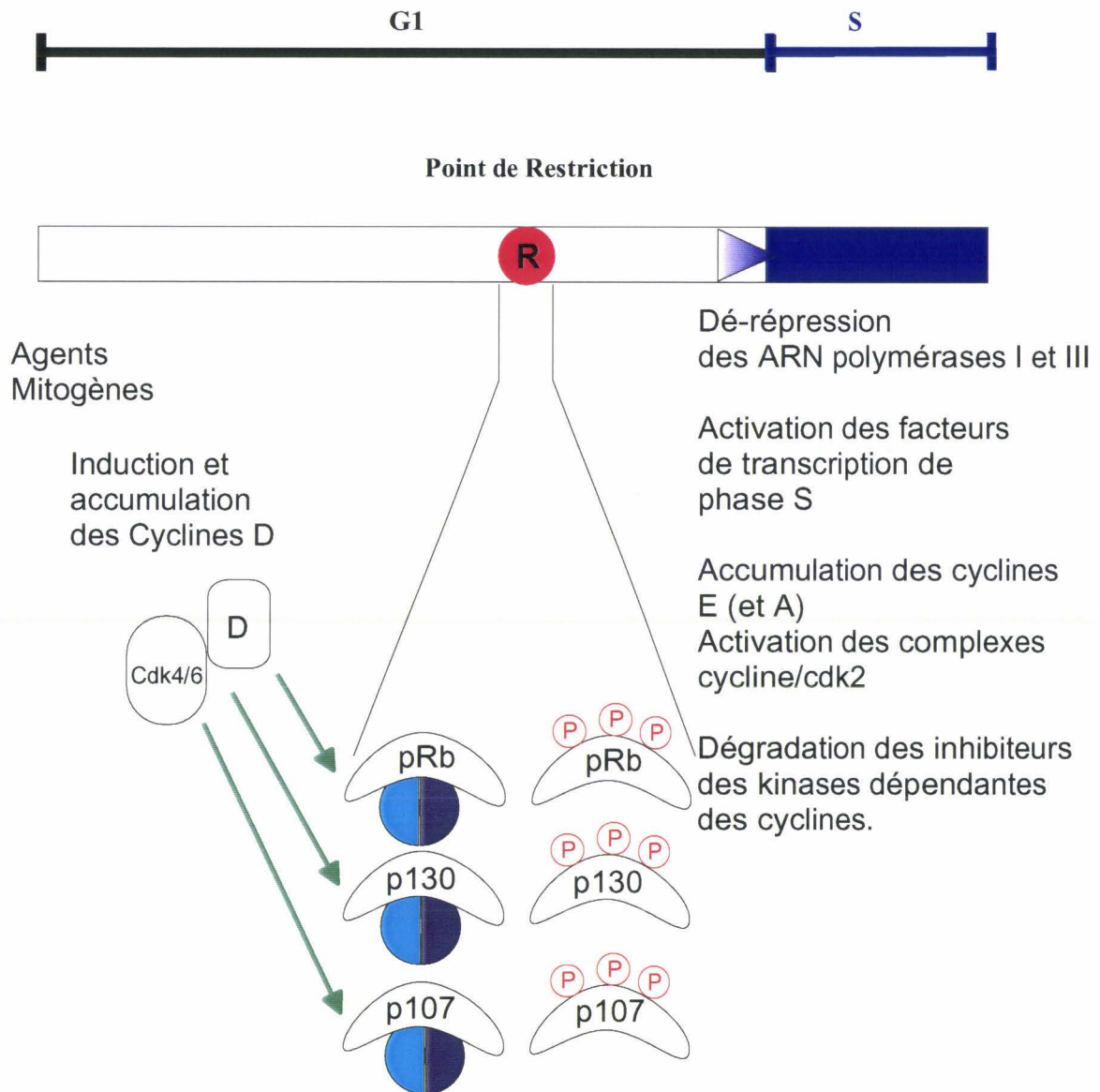


Figure 19: Rôle des cyclines D dans la progression du cycle cellulaire en réponse aux agents mitogènes.

Les *cyclines D* sont transcrites en réponse à la stimulation de la cellule par des agents mitogènes. Les principales cibles de leur activité kinase associée sont les protéines à domaine "poche" (pRb, p107, p130). Celles-ci inactivent l'hétérodimère de facteurs de transcription E2F/DP (représentés sous forme de demi-cercles bleus). La phosphorylation des protéines à domaine "poche" en G1 permet l'activation des événements de phase S et correspond au point de restriction. Passé ce point la réplication de l'ADN ne nécessite plus la stimulation de la cellule par des agents mitogènes.

phase G1. Par contre en début de phase S la cdk1 est inactive, le complexe cyclineA/cdk1 ne sera actif qu'en phase G2.

La cycline A, associée à la cdk2, est indispensable à l'initiation de la réplication de l'ADN génomique. L'expression d'ARN anti-sens de *cycline A* ou la microinjection d'anticorps neutralisants inhibe l'entrée des cellules en phase S (Girard *et al.*, 1991, Pagano *et al.*, 1992). D'autre part la sur-expression de *cycline A* en phase G1 accélère la transition G1/S (Resnitzky *et al.*, 1995). La co-purification de la cycline A avec des facteurs de réplication laisse supposer qu'elle puisse intervenir au sein même du complexe de réplication, mais aucun substrat au sein de ce complexe n'a été identifié à ce jour (Cardoso *et al.*, 1993, Sobczak-Thepot *et al.*, 1993). Toutefois la microinjection du complexe cyclineA/cdk2 dans des fibroblastes humains quiescents n'est pas suffisante pour induire la progression des cellules en phase S (Connell-Crowley *et al.*, 1998). L'activation d'autres protéines, vraisemblablement par le complexe cyclineE/cdk2, est nécessaire à la formation d'un complexe de réplication actif. Il est à noter que dans des cellules de Xénope ou de Drosophile la cycline A n'est pas indispensable à la progression des cellules en phase S. Dans ce cas par contre sa présence empêche l'entrée des cellules en G2 avant que l'ADN génomique n'ait été répliqué (Lehner & O. Farrell, 1990). Chez le Xénope la neutralisation de la cycline A n'empêche pas l'entrée en phase S mais rend possible la mitose avant la réplication totale de l'ADN (Walker & Maller, 1991). Le rôle de la cycline A lors de la phase G2 du cycle cellulaire reste obscur; il semble qu'elle permette essentiellement la phosphorylation de protéines structurales et la réorganisation du cytosquelette préalablement à la division cellulaire. Le complexe cyclineA/cdk1 est activé par la protéine cdc25B, sans rétrocontrôle positif comme décrit pour l'activation du complexe cyclineB1/cdk1 (Gabrielli *et al.*, 1997).

Le complexe cyclineA/cdk2 participe également à l'extinction des gènes de phase S en inactivant les facteurs de transcription de la famille E2F (Beijersbergen & Bernards, 1996).

1.2.1.IV Rôle des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CKI) dans le contrôle du cycle cellulaire

1.2.1.IV.a Identification des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines

Le contrôle de l'activité des complexes cycline/cdk s'effectue à plusieurs niveaux: (i) l'association de la cycline à la cdk, reflétant la régulation de la synthèse et de la dégradation

des cyclines par le réseau de l'ubiquitine (ii) la phosphorylation et la déphosphorylation de la cdk au niveau de résidus Sérine, Thréonine et Tyrosine rendant accessible le domaine catalytique (iii) l'inactivation, temporaire, du complexe par association avec des protéines inhibitrices. Ce dernier contrôle a été initialement mis en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cet organisme a permis l'identification d'une protéine, SIC1, capable d'inactiver les complexes cycline/cdk par association stœchiométrique (Nugroho & Mendenhall, 1994). Aussi bien la sur-expression que la délétion de *sic1* a des effets dramatiques sur le cycle cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*; dans le premier cas les cellules s'allongent sans pouvoir répliquer leur ADN, dans le second cas elles se divisent indépendamment de la réplication du génome (Nasmyth, 1996). Comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ne possède qu'une seule cdk, c'est donc uniquement la synthèse des cyclines qui permettra à la cellule de déterminer sa position exacte dans le cycle cellulaire. La synthèse de la cycline de mitose est initiée dès la fin de la phase G1, lorsqu'elle atteint un niveau suffisant en phase G2, elle permet la mitose, par le biais de la phosphorylation de protéines par le complexe cycline/cdk. L'accumulation de la cycline de mitose exerce ainsi un contrôle temporel des phases du cycle cellulaire (Stern & Nurse, 1996). Le groupe de Paul Nurse a identifié un inhibiteur du complexe cycline de mitose/cdk, appelé p25rum1 (Correa-Bordes & Nurse, 1995). Lorsque ce gène est sur-exprimé dans des souches de *Schizosaccharomyces pombe*, le complexe cycline/cdk nécessaire à la division n'est jamais actif; dans ce cas les cellules répliquent de nouveau leur ADN sans se diviser. Par contre si le gène *p25rum1* est supprimé, la synthèse de la cycline de mitose en fin de phase G1 suffit à induire une division des cellules avant même qu'elles n'aient répliqué leur information génétique. La protéine p25rum1 permet normalement l'inactivation du complexe cycline/cdk jusqu'à la mitose. Ces résultats prouvent l'importance de ce niveau de contrôle par les CKI dans la coordination des phases du cycle cellulaire.

1.2.1.IV.b Les CKI des cellules de mammifères

Des protéines équivalentes, ayant la propriété d'inhiber l'activité des complexes cycline/cdk par interaction stœchiométrique, ont été identifiées chez les mammifères (Martin-Castellanos & Moreno, 1997). Elles sont groupées en 2 familles, suivant la nature des complexes cycline/cdk qu'elles inhibent (Figure 20A).

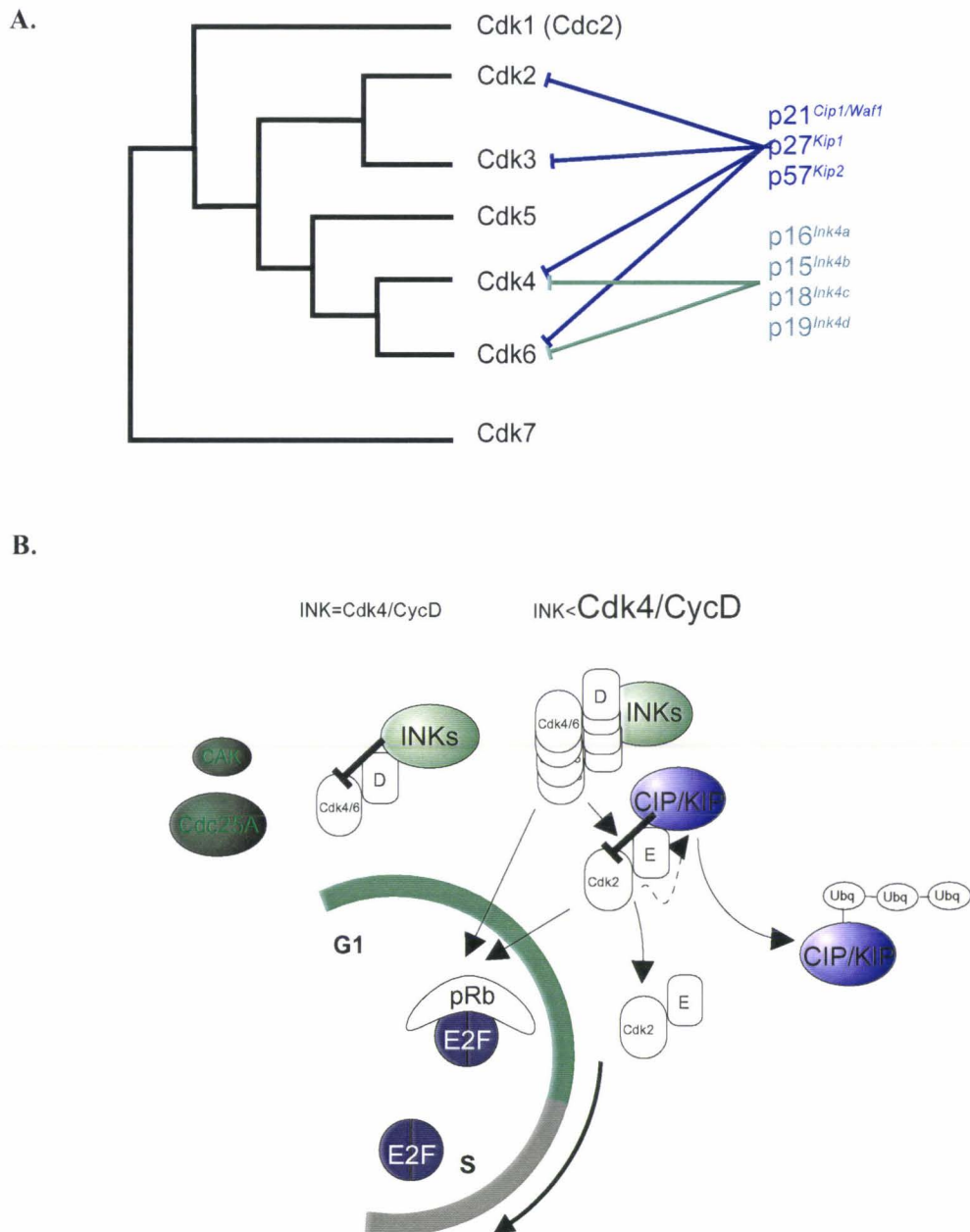


Figure 20: Contrôle de l'entrée en phase S par les CKI.

A. En bleu sont indiqués les membres de la famille CIP/KIP, en vert, de la famille INK. Les lignes indiquent les kinases inactivées par les CKIs respectifs. Les CKIs de la famille INK n'inhibent que les kinases cdk4 et cdk6, de structure très similaire.

B. Les complexes cycline/cdk activés par les protéines CAK et Cdc25/A sont inhibés par association directe avec les CKI. L'augmentation du taux de cycline D, permet de titrer l'inhibiteur INK et active le complexe cyclineD/cdk4,6 qui phosphoryle pRb et libère le facteur de transcription E2F. La *cycline E* est alors exprimée. La phosphorylation de la protéine p27, membre de la famille CIP/KIP, par le complexe cyclineE/cdk2 (flèche en pointillés), permet sa dégradation par le réseau de l'ubiquitine (Ubq).

Les membres de la famille INK4 inhibent spécifiquement les complexes cyclineD/cdk4 ou cdk6. Par contre les protéines appartenant à la famille CIP/KIP inhibent avec des efficacités plus ou moins importante tous les complexes cycline/cdk de phase G1. Elles pourraient également inhiber les complexes cycline/cdk de phase G2 (Font de Mora *et al.*, 1997, Niculescu *et al.*, 1998).

1.2.1.IV.c Mode d'action des CKI

Le domaine N-terminal conservé parmi les protéines CIP/KIP est nécessaire à l'inhibition des cycline/cdk. La cristallisation du complexe entre la région N-terminale de l'inhibiteur p27, la cycline A et la cdk2 permet de comprendre le mécanisme d'inhibition des cycline/cdk par les CKI (Russo *et al.*, 1996). L'extrémité N-terminale de la p27 se lie au domaine cycline qui forme un sillon. La reconnaissance de ce motif explique la capacité de la p27 d'inhiber de nombreux complexes cycline/cdk. L'extrémité C-terminale de la protéine tronquée utilisée lors de la cristallisation se lie au lobe N-terminal de la cdk2, modifiant sa configuration, et masque le domaine catalytique de la cdk2 (Figure 21). Les modifications induites par les CKI sont réversibles. Si la p27 est détachée du complexe cyclineA/cdk2, par exemple par une brève incubation à 100°C, l'activité kinase de la cyclineA/cdk2 est restaurée. Les CKI n'inactivent une cycline/cdk donnée que lorsqu'ils se lient à tous les complexes de cette cycline/cdk. La régulation du taux des CKI détermine si la prolifération cellulaire est bloquée ou non. Il existe ainsi deux moyens par lesquels la cellule peut échapper au blocage exercé par les CKI: soit en réduisant le taux des CKI, jusqu'à ce que celui-ci devienne inférieur à celui des cycline/cdk, soit en augmentant le taux des cycline/cdk de sorte que la quantité de CKI disponible ne suffise plus à bloquer la prolifération des cellules (Massague & Polyak, 1995).

Le taux des ARN messagers codant pour les différentes CKI est constant au cours du cycle cellulaire. Par contre la quantité de protéines décroît durant la phase G1 jusqu'à atteindre un minimum lors de l'entrée en phase S (Polyak *et al.*, 1994). Pour les CKIs p27 et p21, ou seulement p27 selon certains auteurs, la dégradation dépend du réseau de l'ubiquitine (Pagano *et al.*, 1995). La dégradation de la protéine p27 requiert sa phosphorylation préalable par le complexe cyclineE/cdk2 (Vlach *et al.*, 1997). Lorsque la cycline E atteint un taux suffisant en phase G1, la faible proportion de cyclineE/cdk2 libre phosphoryle la protéine p27 qui est rapidement dégradée par le réseau d'ubiquitine. La dégradation de p27 démasque l'activité

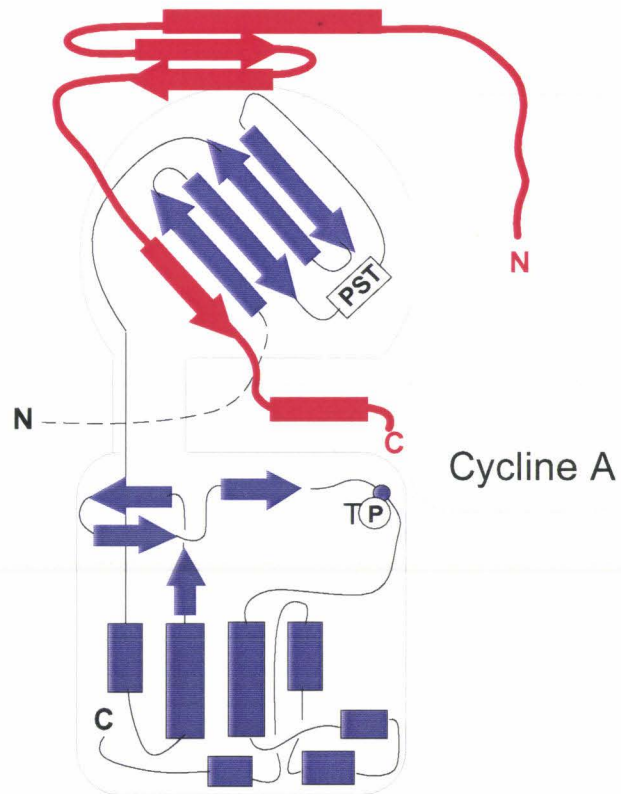


Figure 21: Inactivation du complexe cyclineA/cdk2 par la protéine p27.

La p27 est représentée en couleur rouge. L'extrémité N-terminale de la p27 reconnaît la boîte cycline de la cycline A et s'y associe. L'extrémité C-terminale, du peptide utilisé pour la cristallographie, modifie la structure de l'extrémité N-terminale de la cdk2, et occupe le site catalytique qui devient inaccessible au substrat.

kinase des complexes cycline/cdk. Dans ce cas il existe un couplage entre l'expression de la cycline et la dégradation de l'inhibiteur (Figure 20B).

Un autre mécanisme permettant de modifier le rapport entre les taux de cycline/cdk et de CKI est basé sur l'affinité des CKI vis-à-vis des différents complexes cycline/cdk (Figure 22). L'activation de la protéine kinase MEK1, par exemple en réponse à des agents mitogènes, induit la synthèse de la cycline D1 qui s'associe à la cdk4. La protéine p27 ayant une affinité supérieure pour cette kinase, est déplacée des complexes cyclineE/cdk2 et cyclineA/cdk2 vers le complexe cyclineD1/cdk4, permettant la progression des cellules en phase S (Cheng *et al.*, 1998).

Enfin la compétition entre les différents CKI vis-à-vis des complexes cycline/cdk peut aussi tourner à l'avantage de l'inhibition de l'activité kinase. Dans des cellules en prolifération, la protéine p27 est relativement abondante; elle est principalement associée au complexe cyclineD/cdk4 qu'elle n'inactive pas mais dont elle favorise l'association (LaBaer *et al.*, 1997). Lors de l'induction de la protéine p15 par le TGF- β , le complexe cyclineD/cdk4 est neutralisé par cette CKI au niveau du avant même qu'il n'ait gagné le noyau. La protéine p27 étant exclusivement nucléaire, elle ne peut plus interagir avec le complexe cyclineD/cdk4, déjà neutralisé, et se déplace vers les complexes cyclineE/cdk2 libres, ce qui a pour conséquence un arrêt de la prolifération des cellules (Reynisdottir & Massague, 1997).

1.2.1.IV.d Phénotypes des souris dont les gènes des CKI ont été supprimés

Quelle est la fonction réelle des CKI dans le contrôle du cycle cellulaire? On a tout d'abord pensé que ces inhibiteurs permettaient uniquement l'arrêt de la prolifération cellulaire en réponse à des stimuli négatifs. En effet des signaux anti-prolifératifs tels que l'AMP cyclique, la rapamycine ou le contact entre cellules accroissent le taux de la protéine p27; le TGF- β augmente celui de la protéine p15; et p53 (activé par exemple suite à l'induction de dommage à l'ADN) induit l'accumulation de p21 (Sherr & Roberts, 1995). A l'exception de ce rôle dans la réponse à des stimuli internes ou externes à la cellule, la fonction des CKI au cours de la progression normale du cycle cellulaire est restée inconnue jusqu'à l'obtention de souris dans lesquelles les deux allèles de ces gènes ont été supprimés (Tableau 4) (Elledge *et al.*, 1996).

Les membres de la famille *Ink4a* pourraient exercer un rôle contre la transformation cellulaire, en agissant comme des anti-oncogènes (Hirama & Koeffler, 1995). La majorité

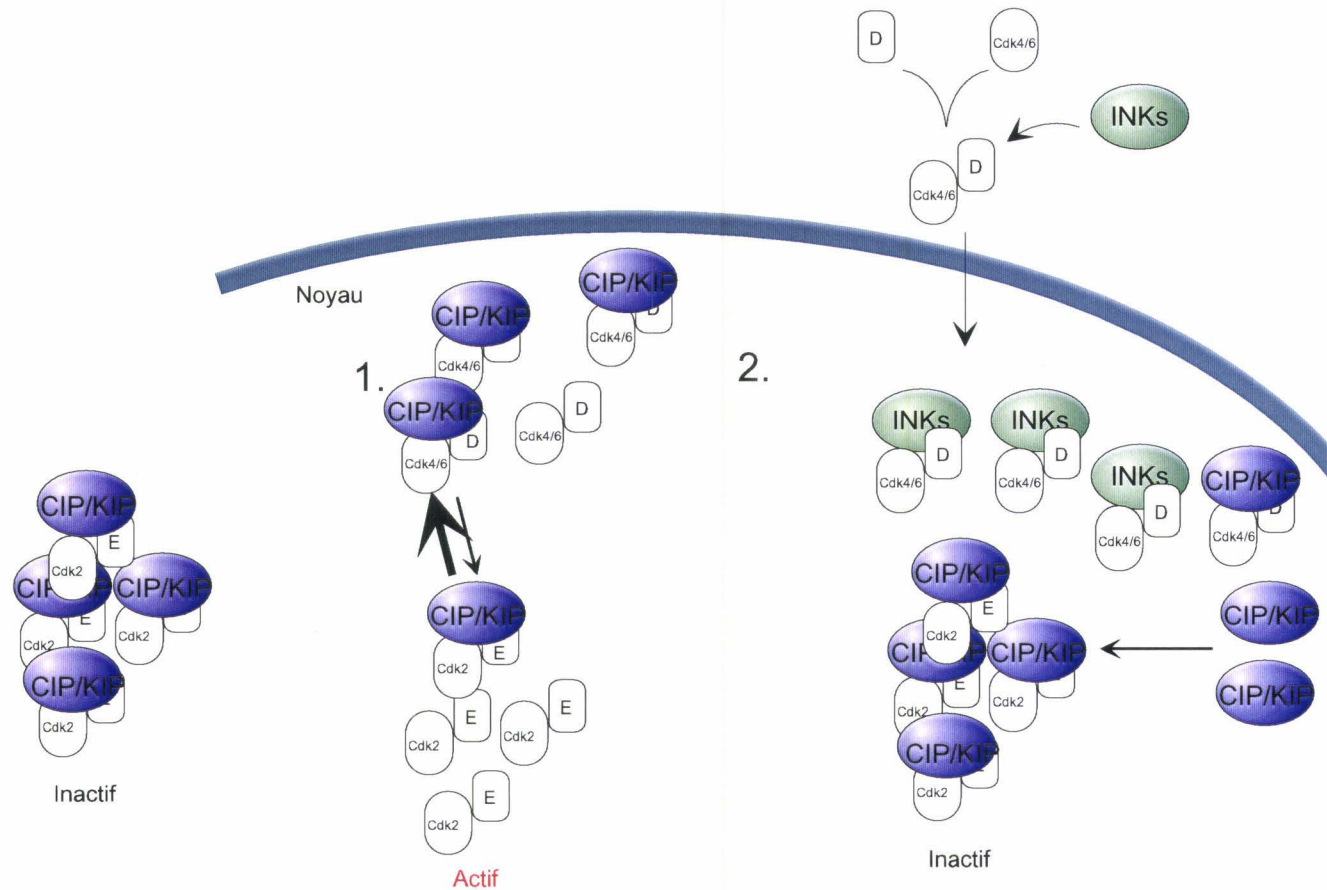


Figure 22: Neutralisation des CKI par les cyclines et réciproquement.

Les protéines CIP/KIP ont une affinité supérieure pour le complexe cyclineD/cdk par rapport au complexe cyclineE/cdk2.

1. L'expression de la *cycline D* permet de déplacer les molécules de CIP/KIP du complexe cyclineE/cdk2 vers le complexe cyclineD/cdk4, libérant ainsi l'activité kinase associée à la cycline E. **2.** Par contre le traitement des cellules par des anti-mitogènes induit la synthèse de l'inhibiteur INK p15, qui s'associe directement au complexe cyclineD/cdk4 dans le cytoplasme. La dégradation des molécules de cycline conduit à l'apparition de molécules de CKI libres dans le noyau; ces dernières ne pouvant pas déplacer les molécules de p15 du complexe cyclineD/cdk4, elles neutralisent les molécules de cyclineE/cdk2 libres dans le noyau.

Tableau 4: Phénotypes des animaux dépourvus de gènes CKI et des cellules dérivées.

| Génotype | Développement | Transformation | Cellules |
|--|---|--|--|
| p21 ^{-/-} | Aucun phénotype. en présence de cisplatine: rapide déficience rénale aiguë, mortalité accrue. | Aucun Phénotype. hépatectomie partielle: prolifération accélérée des hépatocytes. | -Points de contrôle en G1 et G2 déficients (ré-entrée en phase S après traitement au nocodazole). -Pas d'inactivation du promoteur de cdk1 en réponse aux UV. -Pas d'arrêt en phase S après induction de BRCA-1 ou traitement par le Phénylacétate ou irradiation. -Sensibilité accrue aux agents pontants de l'ADN. -Apoptose induite par la surexpression de p53. - Formation rapide de tumeurs invasives après injection de kératinocytes transformés par <i>ras</i> à des souris nues. |
| p21 ^{-/-} , pRb ^{+/-} | Identique aux animaux pRb ^{+/-} | Prédisposition au développement de tumeurs supérieure à celle des animaux pRb ^{+/-} | Acquisition de la croissance en suspension mais maintien de la sensibilité à l'inhibition de contact. |
| p21 ^{-/-} Atm ^{-/-} | | -Délai dans l'apparition des lymphomes du thymus (caractéristique des animaux Atm ^{-/-}) dû à un accroissement du nombre de cellules mourrant par apoptose. -Sensibilité accrue des épithélium aux radiations | |
| p27 ^{-/-} | -Animaux de grande taille, hypercroissance des organes, particulièrement marquée pour la rate et le thymus. -Femelles stériles (problème de différenciation des cellules lutéales). -Mauvaise organisation des cellules de la rétine. | Hyperplasie de l'hypophyse intermédiaire (adénome), comme dans les souris pRb ^{-/+} | -Réponse normale au TGF- β , rapamycine ou à l'inhibition de contact. - Problème de différenciation des oligodendrocytes (pas d'arrêt post-mitotique en présence de concentrations élevées de mitogènes) -Hyper-sensibilité des cellules T à l'IL-2. - ne modifie pas le pouvoir tumorigène de kératinocytes transformés par <i>ras</i> injectés à des souris nues. |
| p57 ^{-/-} | Syndrome de Beckwith-Wiedemann | | |
| | - Muscles abdominaux déficients. - Palais fendu - Défaut de l'ossification endochondriale | - Dysplasie médullaire rénale. - Hyperplasie et cytomégalie du cortex des glandes surrénales. - Hyperprolifération et apoptose des cellules de la lentille. - Prédisposition au cancer. | |
| Ink4a ^{-/-} | Légère expansion proliférative de la rate. | -Prédisposition aux fibrosarcomes et aux lymphomes. -Susceptibilité accrue à l'induction de tumeur par les agents carcinogènes. | -Sensibilité accrue à la transformation par Ha-Ras. -Pas de sénescence. -Temps de doublement réduit. |
| INK4a ^{-/-} , RasG12V (expression spécifique des mélanocytes) | | Apparition spontanée de mélanomes cutanés. | |

(69%) des souris *p16* *-/-* développent des tumeurs et sont hyper sensibles au traitement par des agents carcinogènes. De plus, différents types de cancer humains sont associés à des mutations inactivant ces gènes. Ces résultats ont été récemment remis en cause par une étude plus fine du locus *Ink4*. La suppression du gène *p16* s'accompagne de celle du gène *p19ARF*, exprimé par épissage alternatif. Ce gène ne code pas pour une CKI mais son produit neutralise *mdm2*, lequel inactive normalement *p53* (Pomerantz *et al.*, 1998). Les souris *p19* *-/-*, pour lesquelles le gène *p16* est fonctionnel, ont le même phénotype que celui préalablement décrit pour les souris *p16* *-/-* (Kamijo *et al.*, 1997). En effet dans ce cas la protéine *mdm2* n'est pas inactivée par *p19* et dégrade *p53* ce qui se traduit par l'apparition de tumeurs. Le phénotype des souris *p16* *-/-*, ayant le gène *p19* fonctionnel, doit encore être caractérisé. Les premières observations suggèrent que l'inactivation de la protéine *p16* seule ne suffit pas au développement de tumeurs, la protéine *p53* devant également être inactivée.

Le phénotype des souris dont les deux allèles des gènes *p21*, *p27* ou *p57* ont été supprimés, est différent suivant le CKI inactivé. Bien qu'homologues au niveau de leur domaine N-terminal et capables d'inactiver les mêmes cycline/*cdk*, ces protéines semblent exercer des fonctions spécifiques et ne pas être redondantes. Les souris *p21* *-/-* n'ont pas de phénotype particulier par rapport aux souris sauvages. Les seuls changements liés à l'inactivation de *p21* ont été observés dans des cellules *p21* *-/-* isolées de ces animaux et mises en culture (Deng *et al.*, 1995). Ces observations suggèrent que *p21* participe à l'arrêt de la prolifération des cellules (notamment des kératinocytes) en différenciation (Missero *et al.*, 1996). Les souris *p27* *-/-* sont essentiellement plus grandes que les souris sauvages (Kiyokawa *et al.*, 1996, Nakayama *et al.*, 1996); le nombre de cellules par organe est accru, les cellules étant elles-mêmes plus petites. Le phénotype de ces souris est à rapprocher de l'effet de la sur-expression du gène de la cycline D1 ou de la suppression du gène *pRb*. Dans ce cas, le cycle cellulaire est raccourci, ce qui a pour conséquence une réduction de la taille des cellules (Raff, 1996). Les organes où la protéine *p27* est normalement sur-exprimée sont les plus touchés et manifestent une mauvaise différenciation dans les animaux *p27* *-/-* (Zavitz & Zipursky, 1997). Les souris femelles *p27* *-/-* sont notamment stériles du fait de l'absence de *p27* dans les cellules lutéales. Le phénotype des souris *p27* *+/-* est intermédiaire entre celui des souris *p27* *-/-* et des souris sauvages, en particulier en ce qui concerne la taille des animaux. Cette observation confirme l'importance du rapport entre les taux de CKI et de cycline/*cdk* pour le contrôle du cycle cellulaire. Il est à noter que les cellules *p27* *-/-*, isolées à partir de ces souris, sont

toujours sensibles à l'inhibition de contact et au traitement par le TGF- β . Les mécanismes activés dans ce cas sont inconnus.

Le phénotype le plus drastique concerne les souris dont le gène *p57* est supprimé (Zhang *et al.*, 1997). Il correspond à celui observé dans le syndrome de Beckwith-Wiedemann, à savoir un développement anormal de nombreux organes et une prédisposition à l'apparition de cellules cancéreuses. Par exemple, les cellules du cristallin sont incapables de s'arrêter en phase G1 après la mitose, étape nécessaire à leur différenciation (Zavitz & Zipursky, 1997). Ces cellules meurent par apoptose du fait de leur entrée inappropriée en phase S. Les animaux *p57* *-/-* montrent ainsi une malformation du cristallin.

Le domaine N-terminal est conservé entre les différentes protéines de la famille CIP/KIP. Bien qu'inhibant l'activité des mêmes complexes cycline/cdk, ces protéines ont des rôles distincts lors de l'ontogenèse. La fonction du domaine C-terminal est partiellement connue pour les protéines p21 et p57. Le facteur PCNA, nécessaire à l'activation des ADN polymérases cellulaires, est inactivé lorsqu'il interagit avec le domaine C-terminal des protéines p21 ou p57 (Waga *et al.*, 1994, Watanabe *et al.*, 1998). Des cellules transformées par les oncogènes *myc* et *ras* ne sont normalisées par la protéine p57 que si cette dernière possède des domaines N et C terminaux fonctionnels (Watanabe *et al.*, 1998). Il existe vraisemblablement d'autres fonctions associées à ces domaines; ainsi une boîte Glutamine-Thréonine, domaine putatif d'interaction protéine-protéine, a été identifiée au sein de la région C-terminale des protéines p27 et p57. Une meilleure caractérisation du domaine C-terminal des CKI est nécessaire à la compréhension des rôles respectifs de ces protéines.

De récents travaux montrent également que les protéines p27 et p57 ne contrôlent pas uniquement le cycle cellulaire en arrêtant les cellules, mais qu'elles peuvent également induire ou empêcher l'apoptose selon leur taux d'expression. Ces fonctions sont particulièrement importantes pour le développement des organes (Katayose *et al.*, 1997, Yan *et al.*, 1997).

1.2.2 Expression des gènes de phase S

L'entrée des cellules en phase S nécessite l'expression de nombreux gènes dont les produits permettent la réplication de l'ADN. Entre autres gènes activés lors de la transition G1/S, on peut noter le gène de la dihydrofolate réductase (DHFR), de l'ADN polymérase α , de la sous-unité PCNA de la polymérase δ , et de la thymidine kinase (TK) (La Thangue, 1994). L'activation en phase S du promoteur de bon nombre de ces gènes est liée à la présence d'une

séquence TTTSSCGS. Celle-ci fut initialement identifiée au sein du promoteur E2a de l'adénovirus, elle fixe un dimère de facteurs de transcription, composé d'un membre de la famille des facteurs E2F et un membre de la famille DP (La Thangue, 1996).

1.2.2.1 Les facteurs de transcription E2F/DP

Les protéines E2F peuvent s'associer en homodimères, mais seul l'hétérodimère E2F/DP possède la capacité de se lier à la séquence d'ADN (Helin *et al.*, 1993). A ce jour, 5 protéines de type E2F et 3 de type DP ont été identifiées (Beijersbergen & Bernards, 1996). Les protéines E2F ont toutes en commun un domaine de liaison à l'ADN, un domaine transactivateur, un domaine d'interaction avec les protéines DP et un domaine de liaison aux protéines "poche". Les protéines "poche", pRB, p130 et p107 ont toutes un domaine en "poche" capable de se lier à l'hétérodimère E2F/DP (Beijersbergen & Bernards, 1996). Les dimères E2F-1, -2, -3/DP se lient préférentiellement à la protéine du rétinoblastome pRb, E2F-4, -5/DP aux protéines p107 et p130. Seuls les membres E2F-1, -2 et -3 ont un domaine de liaison à la cycline A (Figure 23).

Les protéines DP ne possèdent pas de région activatrice de la transcription. Elles ont un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au facteur E2F. Elles sont très conservées entre les espèces. La protéine DP-2 isolée chez le Xénope est très similaire à la protéine murine DP-3. La protéine DP-1 peut s'associer à toutes les protéines E2F connues à ce jour, sa seule fonction semble de permettre la liaison des facteurs E2F à l'ADN. Le rôle de DP-3 semble plus complexe; l'épissage alternatif du messenger DP-3 donne naissance à au moins 4 protéines distinctes et varie suivant le tissu et le type cellulaire. L'activité du facteur E2F pourrait être modifiée suivant son association avec DP-1 ou une des formes de DP-3 (Ormondroyd *et al.*, 1995).

1.2.2.1.a Activité du dimère E2F/DP

L'étude des protéines fixées sur le motif E2F, au cours de la progression du cycle cellulaire, a permis de comprendre la régulation de l'activité transcriptionnelle du dimère E2F/DP (Beijersbergen & Bernards, 1996).

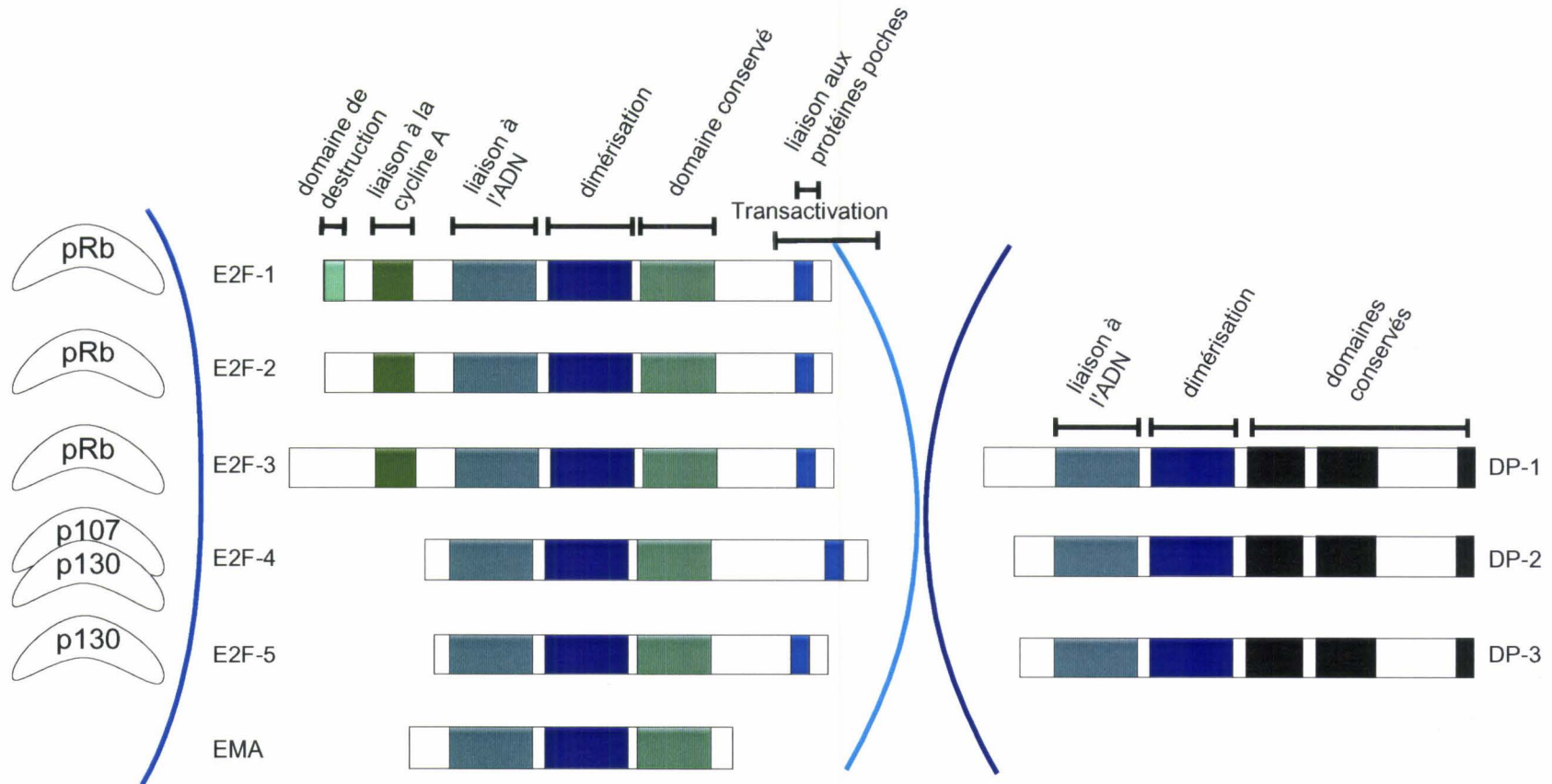


Figure 23: Structure et associations des protéines appartenant aux familles de facteurs de transcription E2F et DP

Les facteurs E2F ont tous en commun un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de dimérisation. Le domaine de liaison aux protéines à domaine "poche" est colocalisé avec le domaine de transactivation. Les protéines à domaine "poche" interagissant avec les différents facteurs sont indiquées sur la gauche du schéma. Le domaine de destruction identifié pour le facteur E2F-1 permet sa dégradation par le réseau de l'ubiquitine. Un tel domaine doit exister pour les autres facteurs mais n'a pas encore été identifié. Le facteur EMA, dépourvu de domaine de transactivation, inhibe de façon constitutive l'activité transcriptionnelle des promoteurs pourvus de sites E2F. Les facteurs DP peuvent se lier indifféremment à toutes les protéines E2F, permettant leur liaison à l'ADN et l'activation transcriptionnelle.

En phase G1, le complexe E2F/DP/protéine "poche" se lie au motif E2F, il est transcriptionnellement inactif et peut même réprimer l'activité des promoteurs de phase S (Weintraub *et al.*, 1995, Weintraub *et al.*, 1992). Il a été montré que la liaison indirecte de la protéine pRb à l'ADN, par contact avec un facteur de transcription (ou avec le seul domaine de liaison à l'ADN de celui-ci) réprime les promoteurs normalement activés par ce facteur de transcription (Adnane *et al.*, 1995, Bremner *et al.*, 1995). Cette inhibition est due à l'interaction de pRb avec des protéines dé-acétylant les histones (Brehm *et al.*, 1998, Luo *et al.*, 1998, Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). La liaison des protéines "poche" aux dimères E2F/DP protège E2F de la dégradation par le réseau de l'ubiquitine (Hateboer *et al.*, 1996). Une autre fonction des protéines "poche" en phase G1, indépendante des facteurs E2F/DP, est de se lier aux kinases cyclineD/cdk4 et cyclineE/cdk2, ce qui modifie leur spécificité vis-à-vis du substrat (Hauser *et al.*, 1997). Les complexes p107/cyclineE/cdk2 et cyclineE/cdk2 phosphorylent aussi efficacement les protéines "poche", mais seul le second complexe peut phosphoryler l'histone H-1. La protéine "poche" pRb, phosphorylée par le complexe cyclineD/cdk4 ou cyclineD/cdk6, n'est plus capable de se lier aux complexes E2F-1, -2, -3/DP, qui peuvent alors activer les gènes de phase S (Beijersbergen & Bernard, 1996). C'est donc principalement la capacité des protéines "poche" à inactiver le complexe E2F/DP qui assure le contrôle transcriptionnel des gènes de phase S. La suppression du gène *pRb* se traduit par une accélération du cycle cellulaire et peut conduire à la transformation des cellules (Weinberg, 1991).

Ce schéma de régulation est applicable à tous les facteurs E2F; cependant le contrôle précis de l'activité transcriptionnelle est différent entre les facteurs E2F-1 à -3 et E2F-4 et -5 (Figure 24). En fin de phase G1, les complexes E2F-4, -5/DP/p130 sont dissociés plus précocement que les complexes E2F-1 à -3/DP/pRb, et ainsi actifs avant même la phase S. D'autre part ces complexes E2F/DP sont également inactivés différemment en cours de phase S. Les protéines de type E2F-1, se lient directement au complexe cyclineA/cdk2, et celui-ci induit le facteur E2F/DP à se dissocier de l'ADN par suite de la phosphorylation de la protéine DP (Xu *et al.*, 1994). La protéine E2F non protégée par pRb est rapidement dégradée par le réseau de l'ubiquitine. Dans le cas des facteurs de type E2F-4, qui n'ont pas de site de liaison à la cycline A, l'inactivation du complexe E2F-4/DP serait la conséquence de la fixation de protéines p107 résiduelles non-phosphorylées sur le complexe E2F-4/DP. L'association de cet ensemble au complexe cyclineA/cdk2 ou cyclineE/cdk2 pourrait permettre la phosphorylation de DP1 (Beijersbergen & Bernard, 1996).

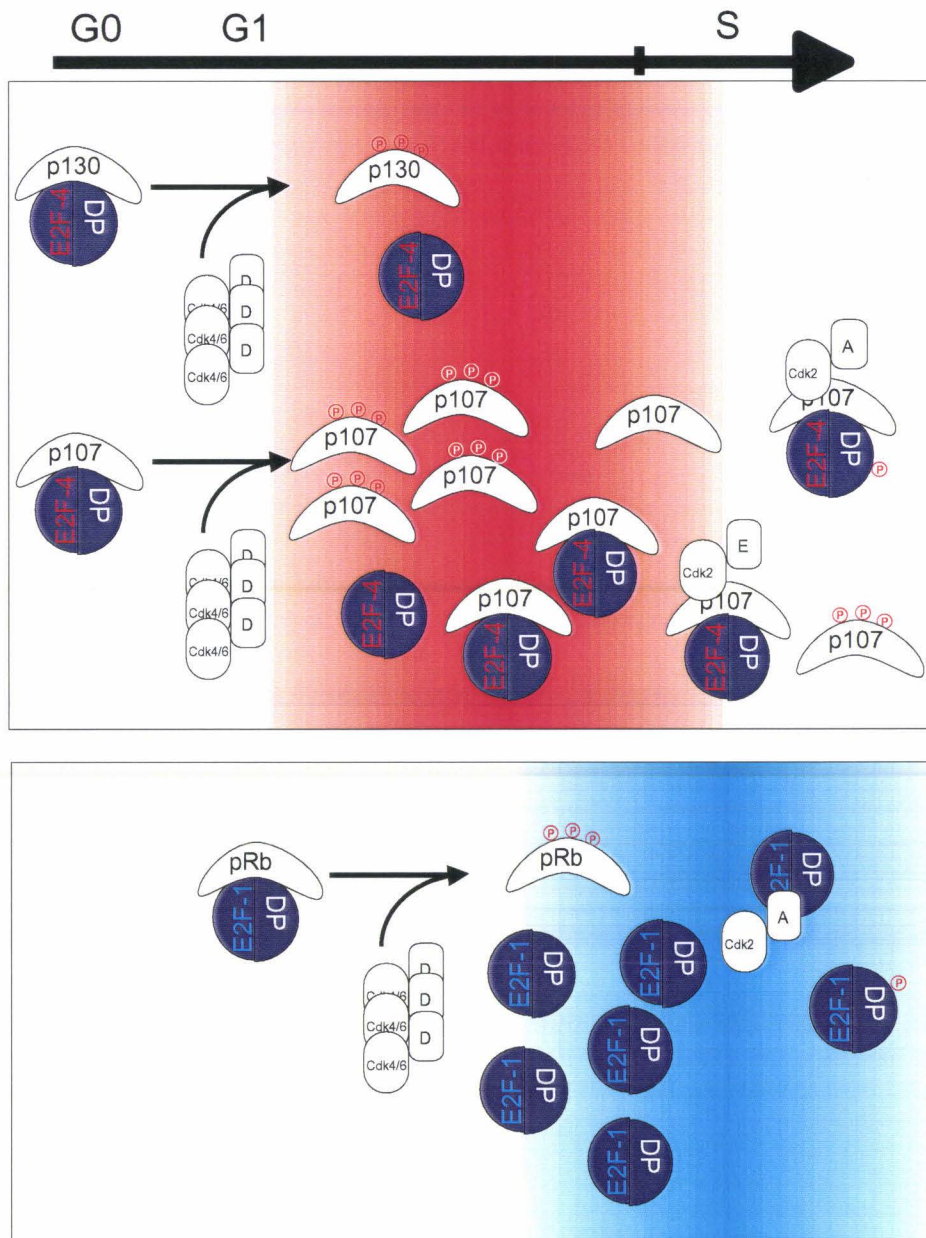


Figure 24: Activation transcriptionnelle par les facteurs E2F-1 et E2F-4.

Les facteurs E2F-1, E2F-2 et E2F-3 contrôlent la transcription différemment des facteurs E2F-4 et E2F-5. Dans la partie supérieure de la figure est schématisée l'action des facteurs E2F-4 et E2F-5; leur activation et inactivation dépendent des protéines à domaine "poche" p130 et p107. Ils sont activés en cours de la phase G1 (zone de couleur rouge) après que les protéines poches aient été phosphorylées. Une fraction des protéines p107 non phosphorylées permet leur inactivation. L'association des complexes cyclineA/cdk2 ou cyclineE/cdk2 à la protéine p107 pourrait permettre la phosphorylation de la protéine DP. Dans le cas des facteurs de type E2F-1, la libération est plus tardive (en fin de la phase G1, zone de couleur bleue), et l'inactivation est liée à l'association directe à la cycline A, permettant la phosphorylation de la protéine DP. Le complexe E2F/DP phosphorylé perd son affinité pour l'ADN.

Ce modèle gagne en complexité à la lumière de récentes observations concernant la répartition spatiale des protéines E2F au cours du cycle. Une séquence de localisation nucléaire a été mise en évidence dans la région N-terminale de E2F-1. E2F-4 est dépourvu de cette séquence, et est vraisemblablement transporté au sein du noyau par la protéine DP (Puri *et al.*, 1998). E2F-4 est exclu du noyau dès le milieu de G1, alors qu'E2F-1 est toujours nucléaire en phases S et G2 (Allen *et al.*, 1997, Muller *et al.*, 1997, Verona *et al.*, 1997). Certains gènes, tels celui de la cycline E, sont activés en G1, de façon dépendante du motif E2F (Botz *et al.*, 1996), ce qui suggère que les protéines E2F pourraient contrôler la transcription de gènes différents durant les phases G1 et S. Les facteurs déterminant si un motif E2F fixe des protéines de type E2F-1 ou E2F-4 n'ont pas été identifiés.

D'autres mécanismes sont sans doute impliqués dans la régulation de l'activité des facteurs E2F/DP. La suppression simultanée des gènes codant les protéines p107 et p130, révèle l'existence d'une protéine encore inconnue capable de former un complexe avec les facteurs de transcription E2F/DP en phase G1 (Hurford *et al.*, 1997). Récemment, une protéine homologue à E2F a été clonée comme partenaire de DP-1. Cette protéine des propriétés inhibitrices intrinsèques même en absence de protéines "poche" (Morkel *et al.*, 1997, Trimarchi *et al.*, 1998).

L'utilisation d'un mutant de E2F, exerçant une action dominante négative, du moins en ce qui concerne les activités transcriptionnelles, confirme le rôle de ce facteur dans l'activation des gènes de phase S (Fan & Bertino, 1997). De façon surprenante ce mutant ne modifie pas dramatiquement la distribution des cellules entre les phases du cycle cellulaire et réduit seulement de peu l'incorporation des nucléotides dans l'ADN génomique. Il convient de remarquer à ce propos que la délétion du gène *E2F* se traduit par un phénotype différent, montrant que E2F a d'autres fonctions dans le cycle cellulaire que le seul contrôle transcriptionnel. Si les souris E2F1 *-/-* sont parfaitement viables, elles manifestent une prolifération aberrante des cellules durant leur vieillissement (Field *et al.*, 1996). Ces résultats laissent supposer que si E2F active la prolifération cellulaire, il pourrait également contrôler l'apoptose des cellules et inhiber la prolifération cellulaire.

1.2.2.1.b Association avec d'autres facteurs de transcription?

Le groupe de Rolf Müller propose un modèle d'activation des gènes au cours du cycle cellulaire faisant intervenir d'autres motifs que le simple motif E2F. Il a identifié un motif CDE,

de séquence d'ADN similaire à un motif E2F mais fixant une protéine non apparentée à E2F et appelée CDF-1 (Liu *et al.*, 1997, Zwicker & Müller, 1997). Les motifs E2F et CDE sont classés en 2 groupes selon qu'ils sont flanqués ou non d'un motif CHR (Figure 25). Les gènes ayant un motif E2F sont activés plus précocement que ceux ayant un motif CDE. Le motif CHR entraîne la répression des promoteurs correspondants en G1 et accroît leur activation en phase S. Cependant d'autres auteurs prétendent que le motif CDE, notamment au sein du promoteur de la cycline A, fixe parfaitement les protéines de la famille E2F, rendant compte de l'activation de ce gène en phase S (Schulze *et al.*, 1995).

1.2.2.II Autres activateurs des gènes de phase S.

Tous les gènes activés lors de la transition G1/S ne contiennent pas un motif E2F ou CDE. La régulation de l'expression des gènes des histones en fonction du cycle cellulaire est indépendante du facteur E2F. L'activation en phase S du promoteur du gène de l'histone H4 dépend d'une séquence d'ADN proximale, sur laquelle se fixent les complexes protéiques HiNF-D (histone nuclear factor D), HiNF-P, HiNF-M et TFIID. Le niveau basal du promoteur en phases G1 et G2 est conféré par la fixation des facteurs HiNF-P et TFIID, l'association à ces facteurs des complexes HiNF-D et HiNF-P rend compte de l'activation observée en phase S. HiNF-D contient des protéines du cycle cellulaire, telles la cycline A, cdk1 et une protéine de type pRb (van den Ent *et al.*, 1994, van Wijnen *et al.*, 1994). La protéine HiNF-M est le facteur 2 de régulation de l'interféron (IRF-2) (Vaughan *et al.*, 1998).

Il a également été rapporté qu'une boîte GC, pouvant fixer des protéines de la famille Sp1, ou un élément de réponse à l'AMPc (CRE), reconnu par les facteurs de transcription ATF/CREB, pourraient fonctionner seuls ou par l'intermédiaire d'un site E2F adjacent pour permettre l'activation de promoteurs au cours du cycle cellulaire (Desdouets *et al.*, 1995, Karlseder *et al.*, 1996, Lin *et al.*, 1996). Leur rôle ne fait cependant pas l'unanimité des auteurs des différentes publications concernant la régulation de ces promoteurs.

La cycline H et la cdk7 sont des composants du complexe transcriptionnel de l'ARN polymérase II (Roy *et al.*, 1994, Serizawa *et al.*, 1994, Serizawa *et al.*, 1995, Shiekhattar *et al.*, 1995), à ce jour il n'a pas été montré que leur présence au sein de ce complexe modifie la transcription des gènes en fonction du cycle cellulaire.

| Gène | Phase(s) d' inhibition ; activation du promoteur | | Motifs de régulation du promoteur (vis-à-vis du cycle cellulaire) | |
|-------------------------|--|------|---|-------|
| | | | E2F | |
| <i>Myc</i> Murin | | G1 | CTTGGCGG | |
| <i>Cycline E</i> Humain | | G1 | TCTCCCGC | |
| <i>Cycline E</i> Humain | | G1 | TTTGCCGC | |
| <i>TK</i> Murin | | G1/S | GTTCGCGG | |
| | | | E2F | CHR |
| <i>E2F-1</i> Humain | G1 | G1/S | TTTCGCGG | AGGA |
| <i>E2F-1</i> Murin | G1 | G1/S | TTTCGCGG | AGGA |
| <i>MybL2</i> Murin | G1 | G1/S | CTTGGCGG | AGGA |
| | | | CDE | CHR |
| <i>Cycline A</i> Humain | G1 | S | CGCGG | TTGAA |
| <i>Cycline A</i> Murin | G1 | S | CGCGG | TTGAA |
| <i>Cdc2</i> Humain | G1 | S | CGCGG | TTGAA |
| <i>Cdc2</i> Rat | G1 | S | CGCGG | TTGAA |
| <i>Cdc25C</i> Humain | G1,S | S/G2 | GGCGG | TTGAA |

Figure 25: Activation et répressions de promoteur par les sites E2F, CDE et CHR.

Séquence des motifs E2F, CDE et CHR au sein de divers promoteurs réprimés (couleur bleue) et/ou activés (couleur rouge) lors de différentes phases du cycle cellulaire. La séquence CHR pourrait permettre l'inhibition de ces promoteurs en G1 et une activation supérieure en phase S. L'élément CDE fixerait un facteur, non apparenté à E2F, qui activerait les gènes tardifs.

1.3 La transformation par ras et l'activation transcriptionnelle

1.3.1 La protéine Ras et le cycle cellulaire

La protéine Ras contrôle la progression des cellules en G1 en réponse à des agents mitogènes. Lorsque le proto-oncogène est activé, la protéine mutée active la progression du cycle cellulaire indépendamment des facteurs de croissance. Le cycle viral des parvovirus est intimement lié au cycle et à la transformation cellulaire par Ras (Salome *et al.*, 1990, Tattersall & Bratton, 1983). Durant ces dernières années de nombreuses études ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'action de la protéine Ras, notamment sur la prolifération cellulaire. La microinjection de Ras activé suffit à induire la prolifération de cellules quiescentes, de même celle d'anticorps neutralisant la fonction de Ras bloque la progression des cellules en phase G1 (Downward, 1997). Ces anticorps n'ont aucune action sur des cellules en phase S ou G2. La quantification de la forme active de Ras montre qu'elle exerce un rôle bipartite en phase G1. Tout d'abord Ras est activé en réponse aux facteurs de croissance, principalement par les récepteurs de nature Tyrosine kinase activant Ras par un réseau de protéines bien caractérisées Shc, Grb2 et Sos (McCormick, 1993, Taylor & Shalloway, 1996). En milieu de G1 un nouveau pic d'activité de Ras est nécessaire au passage du point de restriction. (Downward, 1997). Les réseaux de signalisation activés par Ras en milieu de G1 sont totalement inconnus et différent de ceux activés en début de G1 (Figure 26).

1.3.2 Ras et la transmission des signaux

Ras est une petite protéine de 21 kDa appartenant à la famille des GTPases. Elle fonctionne tel un interrupteur entre une forme active liée au GTP et une forme inactive liée au GDP. Ras active un grand nombre de voies de signalisation cellulaire pouvant mener à la prolifération ou à la différenciation des cellules (Figure 27). Ces voies sont divisées en deux familles suivant qu'elles activent ou non la protéine Raf-1 (Joneson & Bar-Sagi, 1997).

Chez tous les organismes eucaryotes des réseaux de kinases, activées en réponse à des signaux extracellulaires (Erk) ou par des agents mitogènes (MAPK), permettent la transmission à la cellule de signaux extérieurs. Ces réseaux respectent la même organisation, les MAPK et Erk sont activées par une MAPK/Erk kinase (MEK) elle même activée par une MEK kinase (MEKK). Raf-1 est une MEKK activant la cascade de kinases MEK1, 2 et Erk-1,

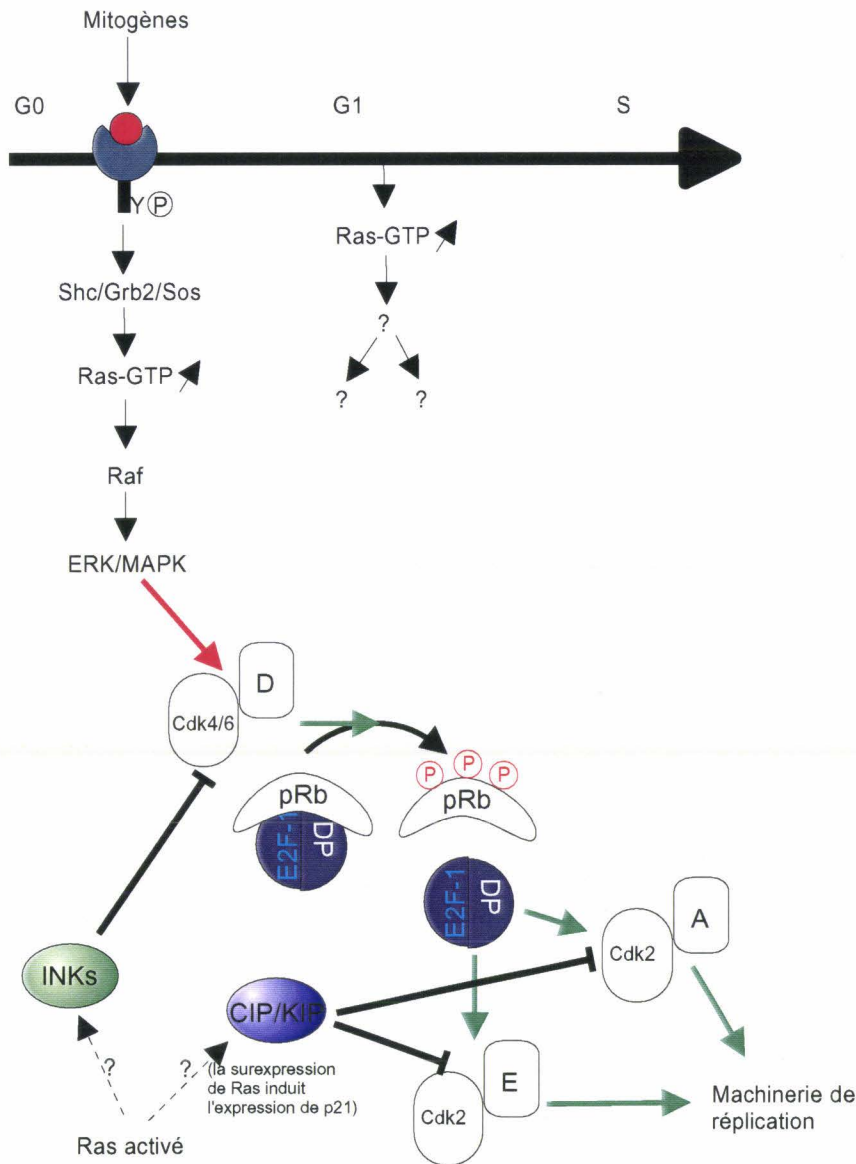


Figure 26: Rôle de Ras dans la progression du cycle cellulaire.

En réponse aux mitogènes, des récepteurs de type Tyrosine kinase sont activés. Ce signal est transmis à la protéine Ras par la voie Shc/Grb2/Sos et favorise la présence de Ras sous forme liée au GTP. L'activation consécutive de la voie des MAP kinases permet l'expression de la cycline D1 qui à son tour permet la phosphorylation de la protéine pRb. Le facteur de transcription E2F/DP libéré permet l'expression de la *cycline E* et des gènes de phase S (entre autre de la *cycline A*) permettant l'activation de la machinerie de réplication. Toutefois cette activation est dépendante du maintien de la stimulation par les agents mitogènes jusqu'au milieu de G1 permettant un second pic d'activation de Ras. Les cibles de Ras en milieu de G1, de nature inconnue, sont indépendantes des voies MAPK. Dans le cas de la transformation cellulaire, Ras pourrait également permettre la dégradation des CKIs par le réseau de l'ubiquitine.

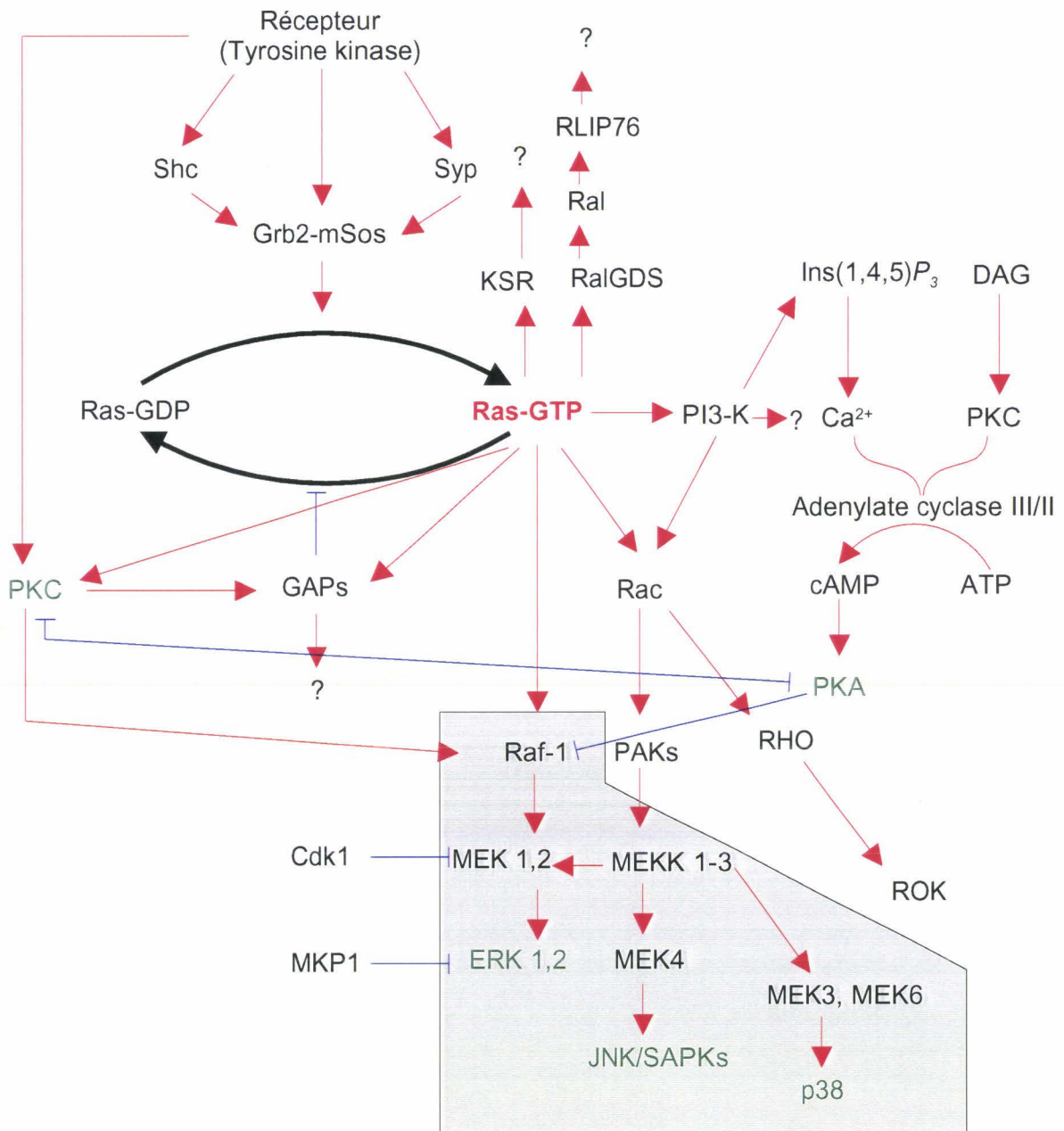


Figure 27: Différents effecteurs de la protéine Ras.

Les activations sont représentées par des flèches de couleur rouge, les inhibitions par des traits de couleur bleue.

Ras agit comme un interrupteur entre une forme active, liée au GTP, et une forme inactive liée au GDP. Les récepteurs de type tyrosine kinases ainsi que le facteur d'échange GAP permettent le maintien de la forme active. Dans le polygone gris sont indiquées les voies des MAPK, la protéine Raf-1 étant une protéine de type MEKK.

La PKA en phosphorylant les protéines PKC et Raf empêche leur activation par Ras-GTP.

Les différentes voies dont les effecteurs sont inconnus se terminent par le signe ?

-2 (voie Erk). Ras peut également activer, par l'intermédiaire de Rac et des MEKK1-3, deux autres voies de MAPK: la voie de phosphorylation du facteur de transcription c-Jun et des kinases activée par le stress (JNK/SAPk) et la voie de la kinase p38. Si Raf-1 n'active que la voie Erk, les autres MEKK, également activées par d'autres protéines que Ras, peuvent activer indifféremment les trois voies. La réponse à un signal donné est souvent fonction du niveau d'activation respectif de ces voies. Ces réseaux de kinases permettent principalement l'activation transcriptionnelle de gènes précoces en G1 (Treisman, 1996). La prolifération des cellules en réponse à des agents mitogènes dépend de l'activation du promoteur de la *cycline D1* par la voie des MAPK (Lavoie *et al.*, 1996, Liu *et al.*, 1995) (Figure 26). Toutefois dans des cellules BALBc/3T3, si une faible activation de Raf-1 permet l'expression de la *cycline D1* et la prolifération des cellules, la sur-expression de Raf-1 active également le promoteur du gène de l'inhibiteur des kinases p21 et arrête les cellules en phase G0 du cycle (Sewing *et al.*, 1997). Cet effet résulte vraisemblablement de niveaux d'activation différents des différentes voies de MAPK. L'induction des CKI pourrait répondre à la sur-activation de Ras à un moment inopportun du cycle cellulaire.

L'activation de Ras, en milieu de la phase G1, nécessaire au passage du point de restriction, n'active pas les voies MAPK. Ces protéines ne peuvent plus être activées, sans doute du fait de phosphatases qui sont exprimées au début de G1 et neutralisent ce réseau d'activation. Les voies de Ras indépendantes de Raf-1 sont nombreuses (Figure 27). Ras active la famille des GTPases de type Rho, par l'intermédiaire de la protéine Rac. Ces protéines sont nécessaires à la réorganisation du cytosquelette de la cellule en relation avec la prolifération. Ras se lie également directement aux protéines RalGDS, KSR et à la sous unité catalytique p110 de la kinase PI3 pour les activer. L'activation de cette dernière pourrait être l'événement initial permettant l'activation de Rac; en effet les phosphoinositides générés par la kinase PI3 activent Rac. La PKC- ζ est également activée par Ras, il n'est cependant pas certain qu'elle le soit par contact direct avec Ras, mais plutôt par une autre voie dépendante de Ras.

Comme on peut le voir la liste des protéines effectrices de Ras est très longue et leurs fonctions ne sont pas encore toutes éclaircies. Ces protéines ne possèdent pas un domaine conservé d'interaction avec Ras; toutefois il semble qu'il puisse exister une compétition entre les différents effecteurs pour leur association avec Ras. Toutes les voies ne sont donc pas activées simultanément par la forme Ras-GTP.

Ras et les voies activées par Ras sont sous le contrôle d'autres protéines régulatrices. Si les protéines GAP maintiennent l'activité de Ras en empêchant l'hydrolyse du GTP, de nombreuses protéines bloquent à divers niveaux les voies de signalisation de Ras (Figure 27). Par exemple cdk1 ou MKP1 peuvent bloquer la voie Ras en aval de Raf-1. L'inhibiteur principal est une kinase activée par l'AMPc, la protéine kinase A (PKA). La phosphorylation de Raf-1 ou la PKC- ζ par la PKA empêche leur activation par Ras. Comme on peut l'observer sur la Figure 27, la PKA est activée par Ras par l'intermédiaire de la PI3 kinase et peut ainsi agir sous forme d'un rétro contrôle négatif. La PKC peut agir sur la PKA en bloquant la translocation de sa sous-unité nucléaire. Lorsque la PKC est active, la PKA est exclusivement cytoplasmique, et ne peut plus activer ses cibles nucléaires, dont le facteur de transcription CREB. Le facteur CREB est une cible majeure des de signalisation de Ras, comme indiqué ci-dessous.

Les MAPK peuvent activer des promoteurs cibles en réponse à Ras par la phosphorylation de facteurs de transcription (Figure 28). Raf-1 active les kinases Erk-1 et Erk-2 pouvant phosphoryler les protéines Fos, Ets et TCF (également activée par les voies JNK/SAPK et p38); ceci a pour conséquence la stabilisation de la liaison à l'ADN de la première et l'activation transcriptionnelle des secondes. La protéine p90Rsk, cible des kinases Erk-1 et Erk-2, phosphoryle le facteur SRF et accroît son affinité pour l'ADN. Les promoteurs pourvus d'un élément SRE, tels le promoteur de *c-fos*, fixent le dimère SRF/TCF et sont directement activés en réponse à Ras/Raf-1. Le dimère Fos/Jun est également activé par les MAPK. Comme nous l'avons vu, Fos est activé de façon directe par Erk-1, -2, ainsi que par l'intermédiaire de la protéine p90Rsk. Jun est phosphorylé par la voie JNK/SAPK. Les protéines Jun et Fos phosphorylées peuvent coopérer avec le facteur Ets pour activer des gènes cibles (Basuyaux *et al.*, 1997, Wasylyk *et al.*, 1990). Ets permet également l'activation de gènes en coopérant avec des protéines fixées sur des éléments CRE (Wakiya *et al.*, 1996). Les protéines de la famille ATF/CREB, qui reconnaissent la séquence CRE, sont des cibles des voies MAPK. Les protéines ATF-2 et ATF-3, sont activées par les voies JNK/SAPK et p38, et peuvent former un hétérodimère avec Jun. La phosphorylation du facteur CREB sur le résidu Serine 133, par une protéine de type p90, appelée Rsk2 (Xing *et al.*, 1996), permet sa liaison au cofacteur CBP (Shikama *et al.*, 1997), et active la transcription des promoteurs pourvus d'un motif CRE. Rsk2 est activée par la protéine kinase MEK-1, c'est à dire par la voie Raf-1. Par ailleurs il a été montré que l'activation de la protéine p90Rsk, dans des cellules Jurkat T

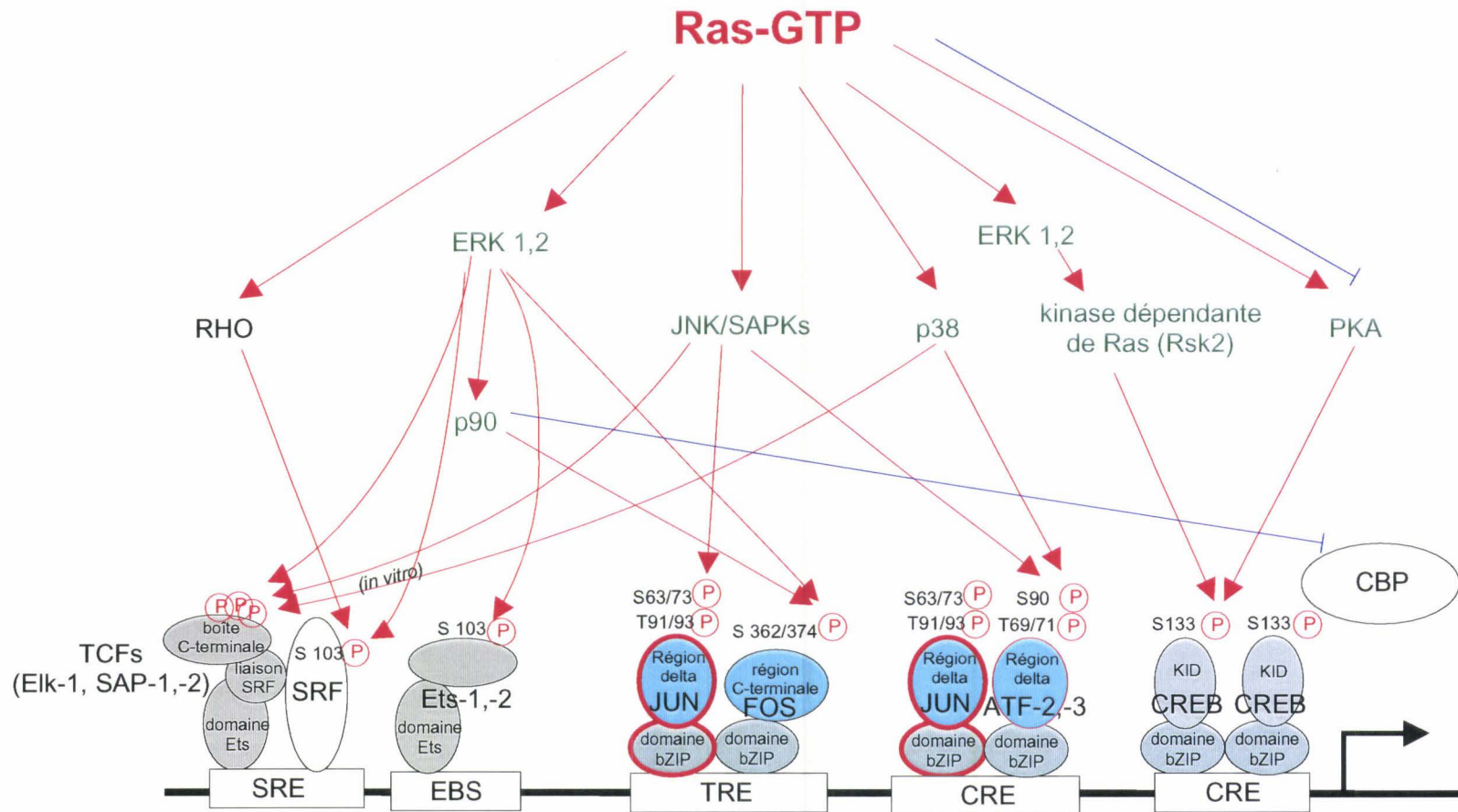


Figure 28: Contrôle de l'activité de promoteurs cellulaires par Ras.

Les différents facteurs de transcriptions activés par Ras-GTP, essentiellement par les voies des MAPK, sont représentés au niveau de leur site consensus sur un promoteur schématisé. Les domaines et résidus phosphorylés sont indiqués par le symbole (P). La phosphorylation de TCF par p38 n'a été observée qu'*in vitro*. La phosphorylation de CREB au niveau du domaine activé par les kinases (KID), permet la liaison au cofacteur CBP, activateur de transcription. p90 abolit l'effet de CBP par un mécanisme de nature inconnu.

Ras active la PKA par l'intermédiaire de la IP3 kinase (Figure 27) mais l'activation de la PKC empêche la translocation des sous-unités nucléaires de la PKA nécessaires à la phosphorylation de CREB.

(lymphocytes T humains), réprime la transcription de promoteurs contenant des motifs CRE en interagissant avec CBP (Nakajima *et al.*, 1996). On peut supposer que ces mécanismes permettent une activation différentielle de gènes cibles suivant le niveau d'activation de Ras/Raf-1 comme nous l'avons décrit pour les gènes *p21* et *cycline D*. Par exemple l'activation de Rsk1 est supérieure à celle de Rsk2 dans des cellules traitées par le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) (Zhao *et al.*, 1996).

1.3.3 Les protéines de la famille CREB

1.3.3.1 La famille des protéines à domaine bZIP

Les facteurs de transcription de la famille CREB permettent l'activation ou l'inhibition de gènes en réponse à Ras-GTP. Les gènes activés par le facteur CREB peuvent participer à la transformation des cellules par l'oncogène *ras*. Des cellules de mélanomes humains, qui expriment un mutant dominant-négatif inhibant l'activité transcriptionnelle de CREB, sont incapables de former des tumeurs solides lorsque qu'elles sont injectées à des souris immunodéprimées (Xie *et al.*, 1997).

Comme de nombreux autres facteurs de transcription ils possèdent deux domaines principaux, l'un pour la liaison à l'ADN, l'autre pour l'activation transcriptionnelle (Harrison, 1991). Leur domaine de liaison à l'ADN riche en acides aminés basiques jouxte une structure en "fermeture éclair", formée par la répétition de 5 résidus Leucine espacés de 6 acides aminés, préférentiellement basiques (Figure 29). Cette "fermeture éclair" caractérise les facteurs de transcription de type bZip. Elle permet l'association en dimères des différents membres de la famille, condition indispensable à leur liaison à l'ADN (Pathak & Sigler, 1992). Il existe un nombre important de facteurs de transcription de type bZip. La famille se divise en sous-familles d'après le motif d'ADN reconnu et le degré d'homologie au sein du domaine bZip (Figure 30). Les principales sous-familles chez les mammifères sont CREB, CRE-BP1, Jun, Fos, ATF-4, NFE-2, Maf, PAR et C/EBP (Hurst, 1995). La famille CREB regroupe les facteurs se fixant sur une séquence d'ADN TGACGTMW, initialement caractérisée comme conférant une activation de promoteurs en réponse à l'AMPc d'où leur désignation CRE (Montminy, 1997). Cette séquence correspond également à celle fixant les protéines ATF, activées en réponse à la protéine E1a de l'adénovirus (Lee *et al.*, 1989). Les membres de la famille ATF/CREB, isolés en tant que protéines capables de se fixer sur le motif CRE, sont

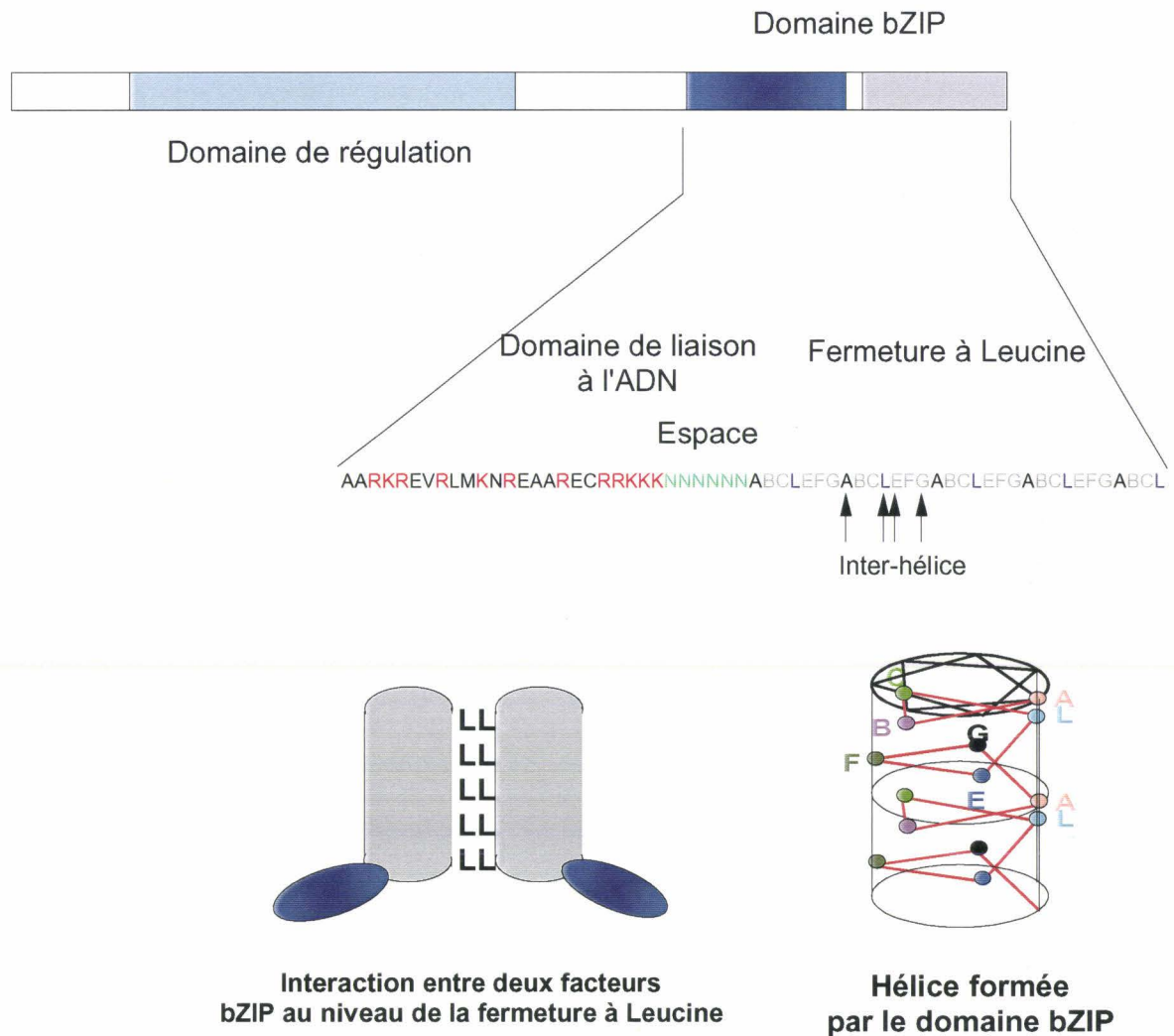
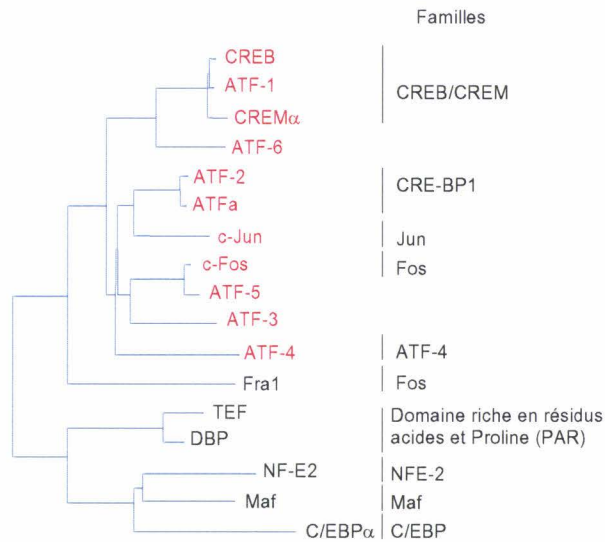


Figure 29: Structure des protéines de la famille bZIP

Représentation schématique des protéines de la famille ATF/CREB. Le domaine bZIP se divise en une région de liaison à l'ADN, riche en acides aminés basiques (en couleur rouge) jouxtant le domaine d'interaction protéine-protéine. L'espace entre les deux domaines est de nature variable. La conformation en hélice du domaine d'interaction est représentée schématiquement. Les résidus Leucine sont alignés sur un axe, permettant le contact entre deux membres de la famille bZIP. Les résidus A, E et G sont à proximité de l'axe des résidus Leucine et participent à la spécificité de l'interaction protéine-protéine.

A.



B.

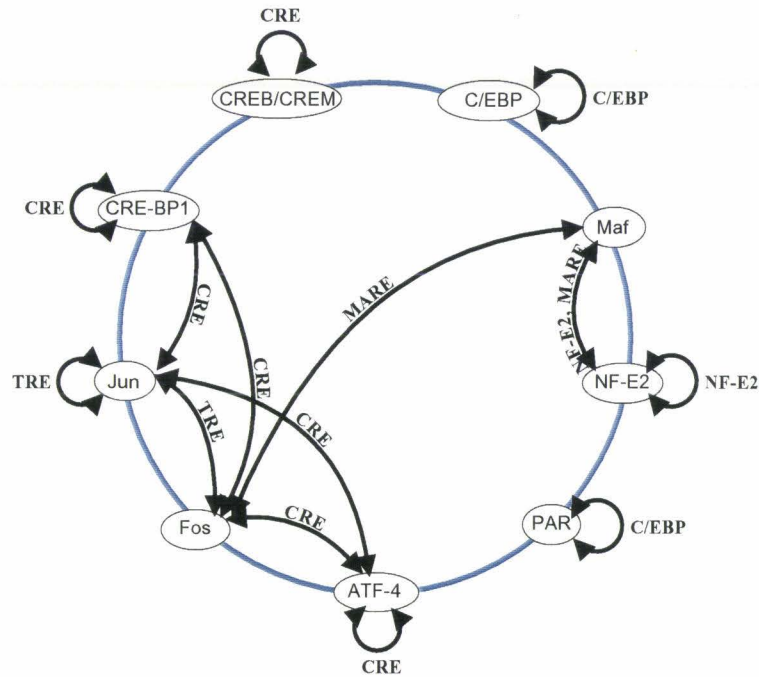


Figure 30: Familles des facteurs bZIP de mammifères.

A. Arbre phylogénétique construit d'après le degré d'homologie entre les séquences, en acides aminés, des domaines bZIP des principaux facteurs de transcription à fermeture à Leucine (bZIP). Les protéines ATF/CREB sont indiquées en rouge.

B. Les flèches indiquent les homodimères et hétérodimères observés entre les protéines bZIP. Les hétérodimères existant au sein d'une famille ne sont pas représentés. Les motifs d'ADN reconnus préférentiellement par les dimères sont indiqués en caractère gras sur les flèches.

classés en sous-familles d'après leur degré d'homologie au niveau du domaine bZIP. La nature des acides aminés de l'hélice de résidus Leucine détermine l'association entre les facteurs ATF/CREB (Foulkes & Sassone-Corsi, 1996). Ceux-ci s'associent principalement en homodimères mais peuvent former des hétérodimères avec certains membres spécifiques de la famille. Par exemple ATF-1 peut former un dimère avec CREB-1 et non avec ATF-4. La formation de dimères avec d'autres facteurs bZIP est également possible, par exemple ATF-4 s'associe à Jun. Ce complexe se fixe préférentiellement sur le motif CRE et non sur le site de fixation du dimère Jun/Fos, de séquence pourtant très voisine (TGACTCA) (Hai & Curran, 1991).

L'expression des gènes codant pour les protéines de la famille CREB se caractérise par l'utilisation intensive d'épissages alternatifs, de sites de polyadénylation alternatifs et de codons d'initiation internes; de ce fait il peut exister une dizaine de formes d'un même facteur, les unes pouvant activer la transcription via un élément CRE alors que les autres la répriment (Figure 31B) (Foulkes & Sassone-Corsi, 1996). Ainsi l'expression, la modification et la dimérisation des membres de la famille ATF/CREB permet une réponse adaptée aux différents messages transmis à la cellule.

1.3.3.II Activation des facteurs ATF/CREB

L'activité des facteurs de transcription CREB dépend de deux régions fonctionnellement distinctes: le domaine activé par les kinases (boîte P) et les séquences riches en résidus Glutamine (Q) (Figure 31A).

L'activation des facteur de transcription CREB requiert la phosphorylation de la boîte P. Tout d'abord au niveau de résidus Sérine et Thréonine par des caséine kinases (CK), ce qui stabilise la structure de la protéine. Mais l'activité des facteurs CREB est principalement fonction de l'état de phosphorylation du résidu Sérine central. Ainsi nous nous référerons à cet acide aminé lorsque nous parlerons de CREB phosphorylé ou déphosphorylé. Les kinases qui phosphorylent cette Sérine diffèrent suivant les membres de la famille CREB. Le résidu Sérine 117 de la protéine CREM peut être phosphorylé, *in vitro*, par les protéines kinases PKA, PKC, CamK et cdk1 (de Groot *et al.*, 1993); par contre seules les PKA, PKC et Rsk2 phosphorylent la Sérine 133 de CREB (Foulkes & Sassone-Corsi, 1996). Ce résidu est également reconnu par des phosphatases. *In vivo* CREB peut être déphosphorylé par les phosphatases PP1 et PP2A (Alberts *et al.*, 1994, Nichols *et al.*, 1992). Le taux de phosphorylation et l'activité de CREB

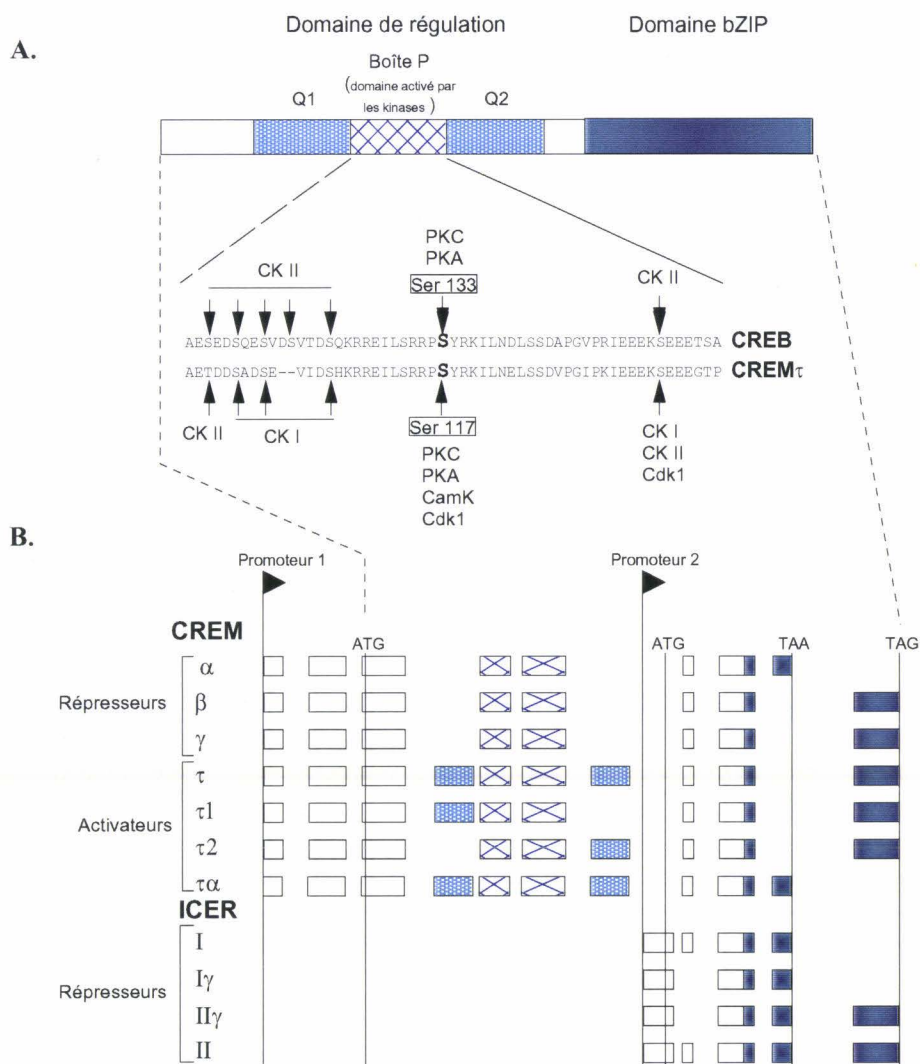


Figure 31: Modulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription ATF/CREB

A. Le domaine de régulation est divisé en une région riche en résidus Glutamine (Q1 et/ou Q2), interagissant avec la machinerie de transcription et une boîte P, également appelée domaine activé par les kinases. L'activité des facteurs ATF/CREB dépend de l'état de phosphorylation de la boîte P, principalement d'un résidu Sérine central. La séquence, en acides aminés, de la boîte P ainsi que les sites de phosphorylation sont indiqués pour les protéines CREB et CREM τ . CK: caséine kinase; PKA: protéine kinase A; PKC: protéine kinase C; CamK: kinase dépendante de la calmoduline; cdk1: kinase dépendante des cyclines 1.

B. Carte d'expression du gène *CREM/ICER* montrant l'utilisation de sites alternatifs d'initiation de la transcription (promoteurs 1 et 2) et d'épissage des ARNm précurseurs. Les différents codons utilisés pour l'initiation (ATG) et la terminaison (TAA et TAG) de la traduction sont également indiqués. Les différents rectangles représentent les exons, le code des couleurs respecte celui utilisé pour les domaines fonctionnels décrits dans le panneau A.

sont proportionnels à l'intensité du stimulus. Par exemple la quantité intracellulaire d'AMPC détermine le degré de phosphorylation de CREB et permet une réponse proportionnée (Montminy, 1997). Dans ce cas, l'AMPC active également les phosphatases PP1 et PP2A et limite temporellement l'activation des promoteurs contenant des motifs CRE.

Quel est l'effet de la phosphorylation de CREB sur l'activité transcriptionnelle de ce facteur? Tout d'abord, selon certains auteurs, la phosphorylation pourrait augmenter l'affinité de CREB pour l'ADN (de Groot *et al.*, 1993, Kobayashi *et al.*, 1997, Yamamoto *et al.*, 1988), mais ce n'est vraisemblablement pas la conséquence majeure de la modification de la protéine. La forme phosphorylée de CREB interagit spécifiquement avec une protéine de 265 kDa (CBP) (Goldman *et al.*, 1997). La microinjection d'anticorps dirigés contre CBP suffit à bloquer l'induction de promoteurs via les séquences CRE (Arias *et al.*, 1994). CBP peut interagir directement avec les facteurs TFIIB (Kwok *et al.*, 1994) et TFIID (Bisotto *et al.*, 1996) et pourrait même être un composant direct du complexe de l'holoenzyme ARN polymérase II (Kee *et al.*, 1996). CBP est associée à l'acétyl-transférase PCAF (Shikama *et al.*, 1997). Lorsque les histones ne sont pas acétylées, la transcription est inhibée du fait du degré élevé de compaction de l'ADN (Figure 32); CBP permet l'accessibilité de la chromatine à l'ARN polymérase II et active la transcription (Wolffe & Pruss, 1996). La protéine p90Rsk inactive les promoteurs ayant une séquence CRE en interagissant directement avec le facteur CBP, l'effet exact de cette interaction est à ce jour inconnu (Nakajima *et al.*, 1996).

Le domaine Q est unique ou divisé en deux parties flanquant la boîte P. Les résidus glutamine permettent une interaction directe avec le complexe de transcription, principalement avec le facteur TAF250 (Brindle *et al.*, 1993, Courey & Tjian, 1988, Wang *et al.*, 1997) dont l'activité acétyl transférase rend la chromatine accessible à l'ARN polymérase II. Ce domaine est indispensable à l'activation de la transcription par les facteurs CREB. L'épissage alternatif de l'ARN messager du facteur CREM permet la synthèse de 7 isoformes (Figure 31B). Les formes ne possédant aucun des domaines Q1 ou Q2, inhibent la transcription par l'intermédiaire des motifs CRE, et cela en dépit de la phosphorylation de la boîte P (Foulkes & Sassone-Corsi, 1996). En outre la présence d'un second promoteur suivi d'un codon ATG en aval de la séquence codant pour le domaine Q2 de CREM permet la synthèse du facteur ICER ne contenant que le domaine de liaison à l'ADN de CREM; ce facteur inhibe également les gènes CRE (Molina *et al.*, 1993). L'inhibition est sans doute due à la dé-acétylation des histones par

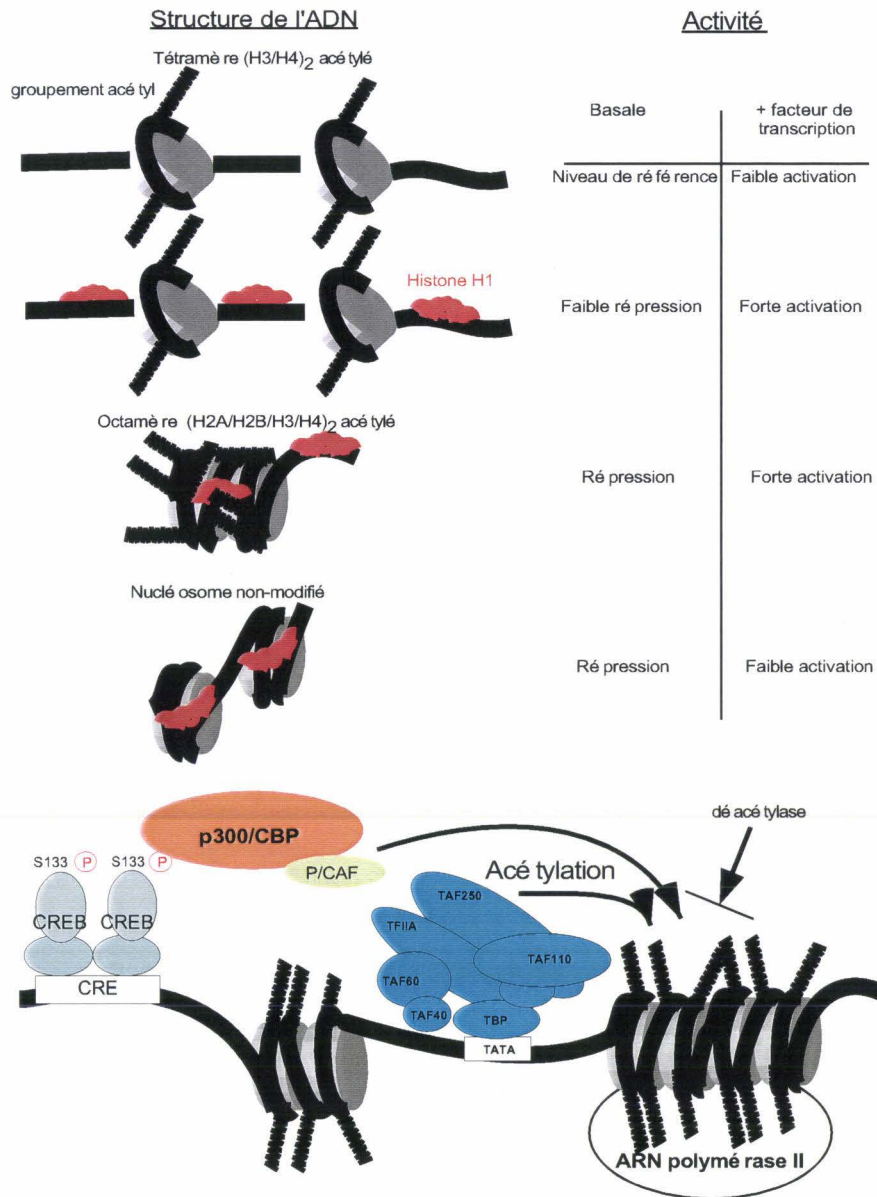


Figure 32: Influence du degré de compaction et d'acétylation de l'ADN sur l'efficacité de transcription.

L'ADN est représenté par un ruban noir, les histones par des cylindres gris. Les activités transcriptionnelles sont comparées par rapport à celle d'un promoteur, dont la séquence d'ADN est la plus accessible (ADN + histones H3/H4 acétylées), en absence de facteurs de transcription (activité basale).

Le facteur de transcription CREB, phosphorylé au niveau du résidu Sérine 133, interagit avec le cofacteur CBP associé à l'acétyl-transférase P/CAF. L'action conjuguée de cette protéine et du facteur TAF250 (acétyl-transférase au sein du complexe d'initiation indiqué en bleu) permet de rendre l'ADN accessible à l'ARN polymérase de type II. En absence de ces facteurs l'ADN est maintenu inaccessible par des déacétylases.

les dé-acétylases cellulaires et à la compétition avec les activateurs pour la liaison aux motifs CRE.

De récents travaux suggèrent que le facteur de transcription CREB peut intervenir dans la régulation de promoteurs au cours du cycle cellulaire. Ces études concernent essentiellement le promoteur de la *cycline A* (Desdouets *et al.*, 1995). Il a été montré que les éléments CRE répriment l'activité du promoteur de la *cycline A* en phase G0, après traitement des cellules au TGF- β (Yoshizumi *et al.*, 1997). Cette inhibition est indépendante des protéines kinases activées par l'AMPc, mais est levée après traitement des cellules par un inhibiteur de la PP2A, suggérant qu'elle correspond à une déphosphorylation des facteurs ATF/CREB. Comme nous l'avons déjà indiqué la régulation du promoteur de la *cycline A* fait l'objet de nombreuses controverses, certains auteurs suggèrent que l'élément CRE n'est requis que pour l'activité basale du promoteur (Wang *et al.*, 1997). Le rôle des éléments CRE dans le contrôle des gènes au cours du cycle cellulaire doit donc encore être clarifié.

1.4 Objectifs du travail de thèse

Le cycle lytique des parvovirus est intimement lié à l'état de transformation et de prolifération de la cellule hôte. Par la multitude de ses fonctions, aussi bien pour l'expression, la réplication du génome parvoviral que pour la lyse de la cellule hôte, la protéine NS1 est indispensable au cycle de vie des parvovirus. Le taux des protéine NS1 est plus important dans les fibroblastes de rat transformés par *ras* (FREJ4), sensibles à l'action lytique du virus, que dans les cellules normales (FR3T3), résistantes à l'infection virale. La sensibilité des cellules transformées à l'action lytique des parvovirus est proportionnelle à la quantité intracellulaire de NS1, reflet de l'activité du promoteur P4. Nous nous sommes concentrés sur le contrôle du promoteur P4. Tout d'abord entre les cellules normales et transformées. De précédents travaux ont montré que le promoteur P4 est environ 5 fois plus actifs dans les cellules FREJ4 comparées aux cellules FR3T3. Nous avons recherché les motifs d'ADN médiateurs de la réponse du promoteur à la transformation cellulaire. Ces travaux correspondent aux trois premières publications. Le premier article consiste en l'identification des motifs participant à l'activité du promoteur P4 dans les cellules transformées. Ce travail a notamment permis l'identification de deux motifs d'ADN qui, *in vitro*, interagissent de façon différentielle avec des protéines provenant d'extraits de cellules FR3T3 et FREJ4. L'étude détaillée de ces deux éléments, CRE et région proximale du promoteur, correspond respectivement aux publications 2 et 3.

Nous avons également émis l'hypothèse de travail selon laquelle un des éléments limitants pour la réplication des parvovirus en phase G1 pourrait être le taux de NS1. Cette hypothèse a été vérifiée par l'étude de l'activité du promoteur P4 au cours du cycle cellulaire, laquelle s'est avérée dépendre des motifs E2F et CRE. Ce travail fait l'objet de la quatrième publication. L'activation du promoteur P4 en phase S est-elle nécessaire à la réplication virale? Afin de répondre à cette question nous avons caractérisé le cycle viral de parvovirus MVM dont le promoteur P4 a été privé du motif E2F. Les résultats sont décrits dans la cinquième publication.

2 RESULTATS

2.1 Identification d'éléments de régulation de la transcription en amont du promoteur P4 du virus minute de la souris.

2.1.1 Résumé

Ce premier article identifie les sites du promoteur P4 participant à son activité dans les cellules transformées. Le groupe de David Ward (Ahn *et al.*, 1989) a montré l'importance de la région proximale dans l'activation du promoteur. Les boîtes TATA et GC sont essentielles à l'activité du promoteur, laquelle est réduite de 80% en leur absence. Nous avons cherché à déterminer le rôle des séquence en amont sur l'activité du promoteur P4.

Cette étude est principalement basée sur des expériences d'empreintes sur ADN réalisées *in vivo* et *in vitro*. *In vivo* la matrice d'ADN analysée correspond aux formes réplicatives de l'ADN viral dans des cellules infectées. Seule la partie droite du palindrome a pu être étudiée, sans doute du fait de la structure secondaire en "épingle à cheveux" des séquences palindromiques. Afin d'obtenir des informations sur la partie gauche des palindromes, les expériences d'empreintes sur ADN ont également été réalisées *in vitro* en utilisant des extraits cellulaires et, comme sonde, le génome parvoviral cloné au sein d'un plasmide bactérien.

Nous avons ensuite vérifié que les séquences résistant à l'action de la DNase peuvent fixer des complexes protéiques en présence d'extraits de cellules FREJ4. Cette association DNA-protéine a été mesurée par le biais de la modification de la mobilité électrophorétique de l'ADN en gel de polyacrylamide (EMSA).

Enfin, des mutants du promoteur P4 ont été obtenus en remplaçant les motifs capables de se lier à des protéines, par une séquence AGATCT. Ces promoteurs P4 mutés ont ensuite été clonés en amont du gène rapporteur de la Luciférase. Les plasmides recombinant obtenus ont été transfectés dans des cellules FREJ4 afin de déterminer la participation relative des différents motifs à l'activité du promoteur P4 sauvage.

L'ensemble de ces expériences a permis d'identifier 5 motifs d'ADN en amont des boîtes GC et TATA fixant tous plusieurs complexes protéiques et participant à l'activité du promoteur P4 dans les cellules FREJ4. Ces motifs sont étudiés, chacun en particulier, dans les chapitres suivants.

2.1.2 Article 1

Mapping of Upstream Regulatory Elements in the P4 Promoter of Parvovirus Minute Virus of Mice

STEFFEN FAISST,*†¹ MANOUSSOS PERROS,*†² LAURENT DELEU,† NATHALIE SPRUYT,* AND JEAN ROMMELAERE*†

*Institut Pasteur de Lille, Molecular Oncology Unit, CNRS URA 1160, 1 Rue Calmette, BP 245, 59019 Lille Cédex, France; and †Deutsches Krebsforschungszentrum, Applied Tumor Virology Program, Abt. 0610 and INSERM U375, Postfach 101949, 69009 Heidelberg, Federal Republic of Germany

Received September 24, 1993; accepted March 3, 1994

The early promoter (P4) of the autonomous parvovirus minute virus of mice (prototype strain) directs the expression of the transcription unit coding for the nonstructural proteins NS1 and NS2. Although proximal promoter elements (GC and TATA boxes) are essential for P4 activity *in vivo*, additional upstream sequences appear to be required for optimal transcription. Therefore, associations of proteins with the upstream regulatory region of promoter P4 were studied in the rat fibroblast cell line FREJ4 by gel retardation and *in vitro* as well as *in vivo* footprinting assays. This led to the identification of at least four distinct upstream elements that interacted with cellular proteins. The functionality of these elements was supported by the reduced level of gene expression driven by corresponding linker-substitutive mutants of promoter P4. © 1994 Academic Press, Inc.

One of the levels at which eukaryotic gene expression is controlled concerns the initiation of transcription and involves multiple *cis*-acting DNA elements. At least a fraction of these regulatory DNA elements are typically found within a 50- to 200-nt-long region that is located upstream from the transcription start site. In addition, promoters comprise proximal motifs, each recognized by specific factors that have a direct or indirect influence on the eventual assembly and positioning of the transcription (pre)initiation complex.

The parvovirus minute virus of mice (MVMP, prototype strain) P4 promoter and upstream left-hand terminal sequences direct transcription initiation at nt 204. Proximal elements (GC and TATA boxes) have been shown to play a major role in the *in vivo* activity of promoter P4 in mouse A9 cells. Yet, efficient transcription appears to require additional upstream sequences that presumably interact with *trans*-regulating proteins (1).

In order to confirm the involvement of the upstream regulatory region of the viral genome in protein-DNA complex formation, gel retardation assays were performed with nuclear extracts from the rat fibroblast cell line FREJ4 (2, 3). To this end, nuclei from about 5×10^8 FREJ4 cells were extracted with 12% glycerol, 250 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 5 mM

HEPES (pH 7.9). The extract was precipitated with 0.33 g ammonium sulfate per milliliter and resuspended in dialysis buffer (20% glycerol, 60 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 20 mM HEPES, pH 7.9). All buffers contained a mixture of proteinase and phosphatase inhibitors. Protein samples were tested for their interactions with double-stranded oligonucleotides (designated I, II, III, IV, and V) that covered the promoter P4 region, as indicated in Fig. 1. About 1 ng of 5' end-labeled DNA probe was incubated in 10% glycerol, 10 mM HEPES, pH 7.9, 100 mM KCl, 4 mM spermidine, 2 μ g poly(dI-dC), 0.1 mM EDTA, 0.25 mM DTT, with up to 4 μ g of nuclear extract, for 15 min on ice. Following incubation, samples were loaded on a 6% polyacrylamide native gel and analyzed for protein-induced shifts of DNA electrophoretic mobility. As illustrated in Fig. 2, oligonucleotides spanning the whole MVMP early regulatory region were found to form multiple specific protein-DNA complexes, providing an *in vitro* argument for the presence of a number of protein recognition sites scattered over this region.

Ultraviolet *in vivo* footprinting experiments were performed in a second step to record protein contacts within the MVMP early regulatory region in FREJ4 cells. Since a high portion of input viral genomes (single-stranded DNA of minus polarity) is apparently not processed (4), the analysis was restricted to plus-strands that are part of the double-stranded replicative forms synthesized in infected cells.

The method of UV *in vivo* footprinting is based on the modified reactivity of DNA bases to UV light in function of their mobility. DNA stretches that interact with proteins

¹To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Deutsches Krebsforschungszentrum, Angewandte Tumorstudiologie, Abt. 0610, Postfach 101949, 69009 Heidelberg, Federal Republic of Germany.

²The first and second authors have contributed equally to the work.

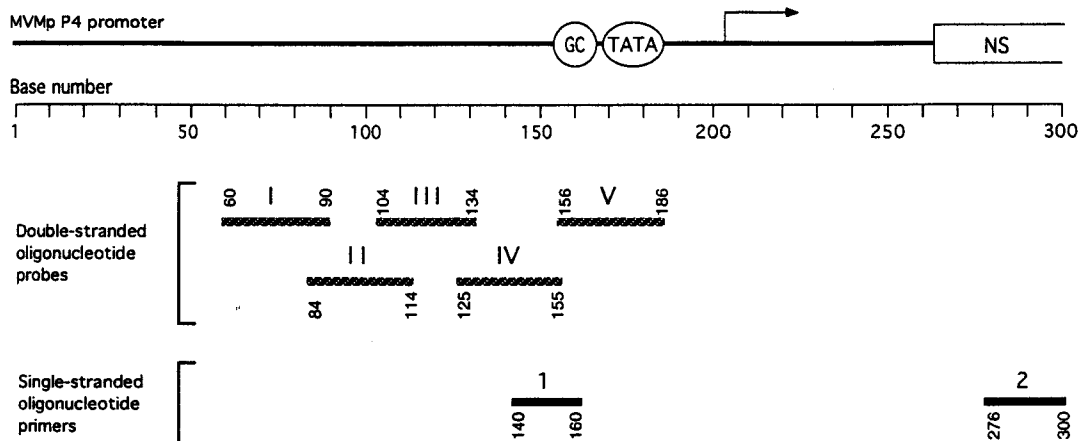


Fig. 1. Delineation of the oligodeoxynucleotides used in this study. The upper scheme depicts the left-hand (3') end of MVMP DNA, which contains the P4 promoter with its proximal GC and TATA boxes, the transcription initiation site (arrow) as well as sequences encoding the N-terminal portion of the nonstructural (NS) proteins. Base numbering on the line below is according to Astell *et al.* (20). The oligodeoxynucleotides used in this study are positioned at the bottom. Double-stranded oligonucleotides labeled I to V were used as probes for gel retardation experiments; single-stranded oligonucleotides 1 and 2 served as primers for *in vivo* footprinting experiments as indicated in the main text.

may be sterically stabilized and protected against or distorted and prone to UV-induced damage (5, 6). Hence, protein-DNA interactions may be revealed by this procedure as stretches of photoprotected or photosensitive elements. MVMP-infected cultures were harvested at 20 hr postinfection. Total DNA was isolated by phenol-chloroform extraction, digested with RNase A, ethanol-precipitated, and redissolved in 1 mM EDTA. Ultraviolet irradiation (254 nm, 1800 J/m²) was performed either immediately before cell harvest (*in vivo* irradiation) or after DNA extraction and RNase digestion (*in vitro* irradiation). Primer extension reactions were carried out with the irradiated DNA as template (7), using the oligonucleotides

5'-CACTTCCTTTTCGCGCCTTGG-3' (primer 1) and 5'-TTGC₂CCCAAACCTTCATCAGAGTA-3' (primer 2) that hybridize to the MVMP plus strand at nt 140-160 and 276-300, respectively (Fig. 1). Sixteen cycles of reactions were performed with 5 U of *Thermus aquaticus* DNA polymerase, 10⁶ cpm of oligonucleotide primer, and 20 μg of irradiated test DNA in 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 65 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2.5 mM MgCl₂, 0.3 mM MnCl₂, and 10 mM mercaptoethanol (total volume, 100 μl). Sequencing reactions were carried out in the same way, except that DNA was treated *in vitro* with dimethyl sulfate. The bacterial polymerase terminates synthesis 1 nt before UV- or dimethyl sulfate-damaged DNA bases (6). Primer extension products were analyzed by electrophoresis on 7 M urea-8% polyacrylamide sequencing gels and quantified by densitometric scanning of autoradiograms, using an image analyzer.

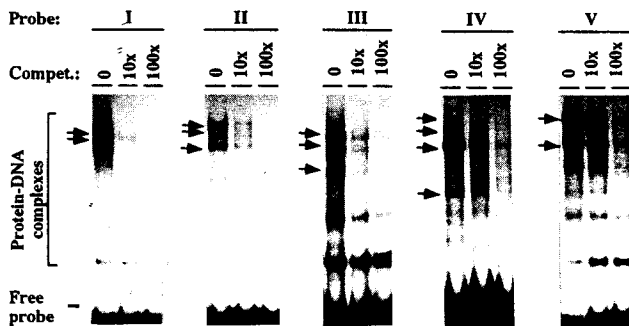


Fig. 2. *In vitro* association of cellular proteins with the early regulatory region of MVMP. Gel retardation assays were carried out with a set of oligonucleotides denoted I to V, using nuclear extracts from FREJ4 cells. These oligonucleotides spanned the whole MVMP P4 promoter between nt 60 and 186, as shown in Figs. 1 and 4. Binding reactions were competed by a 10- or 100-fold molar excess of the respective homologous oligonucleotide, as indicated on top of lanes, in order to show the specificity of the retarded complexes. These complexes were not completed by a 100-fold molar excess of nonhomologous oligonucleotides, including the respective overlapping oligonucleotides (data not shown). Major complexes that proved to be specific are indicated by arrows.

As shown in Figs. 3 and 4, four stretches with altered photosensitivity — labeled A to D — were found in the upstream regulatory region of promoter P4 between nucleotides 60 and 154. Each of these elements may represent a hallmark of the specific polypeptide(s) associated with DNA. It should be stated that an influence of viral proteins on the UV footprints detected *in vivo* cannot be ruled out, although uninfected cell extracts interfered with DNaseI digestion of these elements (see below). Furthermore, no difference in the pattern of retardation of oligonucleotides spanning the whole P4 region could be detected by *in vitro* mobility shift assays between extracts from mock-treated and MVMP-infected cells (data not shown). It is noteworthy that these interactions were measured over the whole population of viral DNA and may thus not necessarily concern all genomes and/or all elements of a given molecule. This may explain, at least in part, why the changes in photosensitivity were

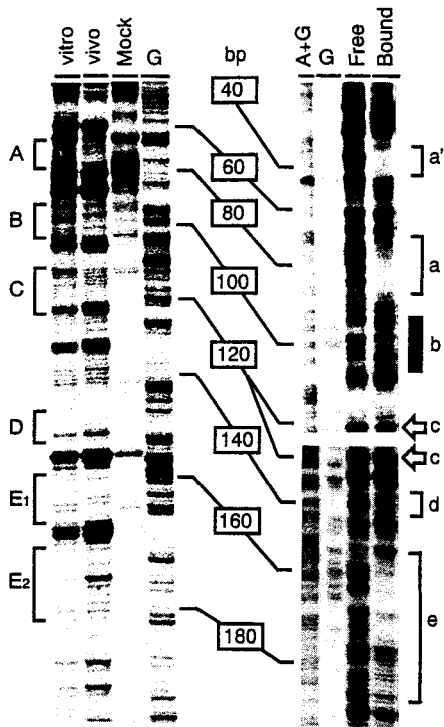


Fig. 3. UV *in vivo* and DNaseI *in vitro* footprinting analysis of the MVMP P4 promoter. (Left) Detection of UV *in vivo* footprints on the plus-strand of MVMP DNA by primer extension, using primer 1 (see text and Fig. 1). Ultraviolet irradiation was given either prior to (*vivo*) or after (*vitro*) DNA extraction from MVMP-infected cells. Mock: primer extension using unirradiated MVMP DNA template from infected cells. Brackets indicate the location of the footprints, as analyzed by densitometric scanning (see Fig. 4). Lane G is a sequence ladder. (Right) Detection of *in vitro* footprints on the plus-strand of MVMP DNA by DNaseI digestion. The lane marked "Free" is the control reaction without protein extract. The lane marked "Bound" refers to DNaseI digestions in the presence of 100 μ g of nuclear extract. Lanes G and A + G are sequence ladders. Regions revealing interference of cellular proteins with DNaseI digestion are indicated by brackets or arrows (protection) and a filled box (hypersensitivity), respectively.

relatively small, yet quite reproducible in up to six independent experiments.

The association of proteins with the P4 upstream regulatory region was further confirmed *in vitro* by measuring the ability of nuclear extracts to interfere with DNaseI digestion of the four above-mentioned motifs. About 10 ng of 3' end-labeled *Bam*HI-*Nco*I fragment of pMM984, an infectious full-length molecular clone of MVMP (8), was incubated with up to 100 μ g of nuclear extract, for 1 hr on ice, in 50 μ l of binding buffer [6.5 mM spermidine, 0.1 mg/ml poly(dI-dC), 1 mM sodium phosphate, pH 7.2, 0.1 mM EDTA in 50% (vol/vol) dialysis buffer]. Following incubation, 50 μ l of 2 mM CaCl₂ and 10 mM MgCl₂ were added, and the probe was digested with various concentrations of DNaseI, ranging from 0.2 to 2 ng per microliter for 30 min at room temperature. The reaction mixture was supplemented with 100 μ l of 50 mM EDTA, 0.5 μ g/ μ l proteinase K, incubated for 30 min at 37° and for 5

min at 90°, phenol-chloroform extracted, ethanol-precipitated, and loaded on a 7 M urea-8% polyacrylamide sequencing gel.

This analysis led to the detection of three DNaseI footprints upstream from promoter P4 (designated a, b, and d in Figs. 3 and 4). Incidentally, footprint a is located in the stem of the left-hand terminal palindromic sequence (nt 1-115) of the MVMP genome (4). This palindrome is present in the extended duplex configuration in at least a fraction of the viral replicative forms (4). Consistently, another DNaseI-resistant element, denoted footprint a', was detected in an upstream position that is symmetrical to that of footprint a (Fig. 3). This region could not be studied by the UV *in vivo* footprinting method since the GC-rich sequence located between nt 45 and 59, thought to be in Z-DNA conformation (9), was found to arrest primer elongation by the *Taq* polymerase, precluding the analysis of nt 1 to 60. In contrast with the clearcut footprints a', a, and d, element b was marked by hypersensitive sites, and element c was only revealed by one mildly protected nucleotide (Fig. 3).

As illustrated in Fig. 4, the UV footprints A-D and the corresponding DNaseI footprints a-d showed partial to complete overlap, defining together four upstream regions that are hereunder designated Aa, Bb, Cc, and Dd. These regions were each uniquely included as a whole in the respective oligonucleotides I to IV that displayed characteristic retardation patterns.

The functionality of these regions was tested by analyzing the expression of a reporter gene programmed by mutants of the MVMP P4 promoter. To this end, the nt 1-260 left-hand fragment of MVMP DNA, containing P4 and downstream leader sequences, was cloned in front of the firefly luciferase gene into the pBluescript SK-vector (Fig. 5). The *Bg*/II recognition motif (AGATCT) was then substituted by site-directed mutagenesis for a sequence of equivalent length within either of the regions shown above to interact with cellular proteins. The same substitution was made in the GC box, an acknowledged transcriptional control element of promoter P4 (1), and in a sequence (nt 126-131) that was not included in the footprints, as positive and negative controls, respectively. The preparation and characterization of these constructs will be described in detail elsewhere. A total of 1 \times 10⁵ FREJ4 cells per well were seeded in six-well plates and cotransfected with 0.1 μ g of the respective P4 construct and 0.1 μ g of a plasmid expressing the human growth hormone (hGH) gene under control of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter (pTKhGH; Nichols Institute) as a standard. Transfection was achieved with the LipofectAMINE reagent (Gibco BRL) as indicated by the manufacturer. Luciferase activities were determined 36 hr post-transfection for equal amounts of total proteins from cell lysates and adjusted for transfection efficiencies with the help of the cotransfected standard plasmid.

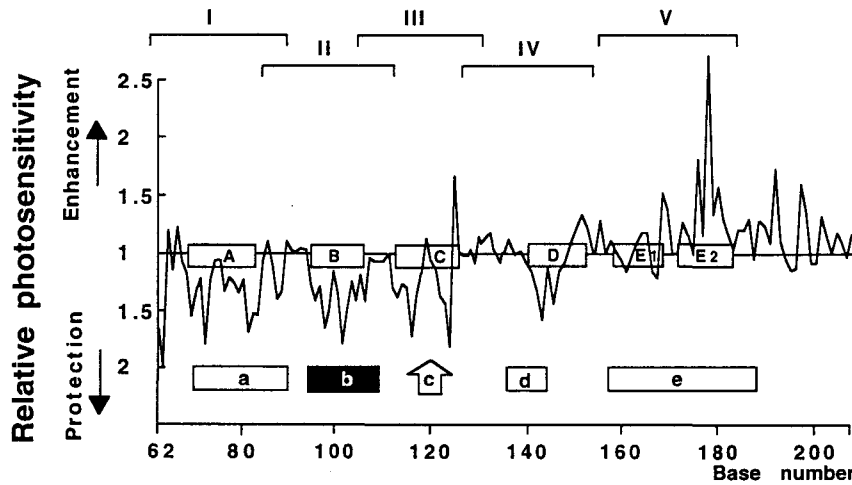


Fig. 4. Localization of MVMp P4 promoter regions interacting with cellular proteins. Brackets labeled I to V give the position of the oligonucleotides used for gel retardation assays (see Figs. 1 and 2). The curve shows the UV protection and sensitization of DNA bases *in vivo*, as revealed by *vivo/vitro* photoreactivity ratios lower and greater than 1.0, respectively. Photoreactivity was determined by densitometric scanning of autoradiographs (see Fig. 3, left). Average values from four independent experiments are given. The deduced UV *in vivo* footprints are indicated by boxes with capital letters. E1 and E2 correspond to the GC and TATA boxes, respectively. P4 regions spanning nt 60–120 and nt 120–217 were visualized by primer extension with primers 1 and 2, respectively (see Fig. 1). *In vitro* footprints, as determined by DNaseI digestion (see Fig. 3, right) are shown by open boxes and arrow (protection) or a filled box (sensitization) with lowercase letters. Base numbering is according to Astell *et al.* (20).

Results from three independent experiments, using different plasmid preparations, are summarized in Fig. 5. Mutant P4mut19Luc, which substitutes a sequence localized outside the footprints, sustained about the same expression as the wild type did. All other mutants tested, which destroy either the GC box or the a', Aa, Cc, or Dd region defined above, showed a two- to fivefold reduction of luciferase activity compared with the wild type. Mutations within the Bb region were recently reported to suppress to a similar extent P4-directed reporter gene expression (14 and Gu *et al.*, in preparation). Altogether,

these data support that the four upstream elements, identified on the basis of their interactions with one or more distinct cellular proteins, cooperate with the proximal TATA box to control the activity of promoter P4.

The above-mentioned upstream elements were compared with DNA sequences that are known to interact with transcription factors (10). With the exception of the footprint C region (AATGATAAGCGG, nt 113 to 124), which displays no obvious homology to previously described motifs, the other identified sequences show a striking similarity to defined regulatory elements. (i) Foot-

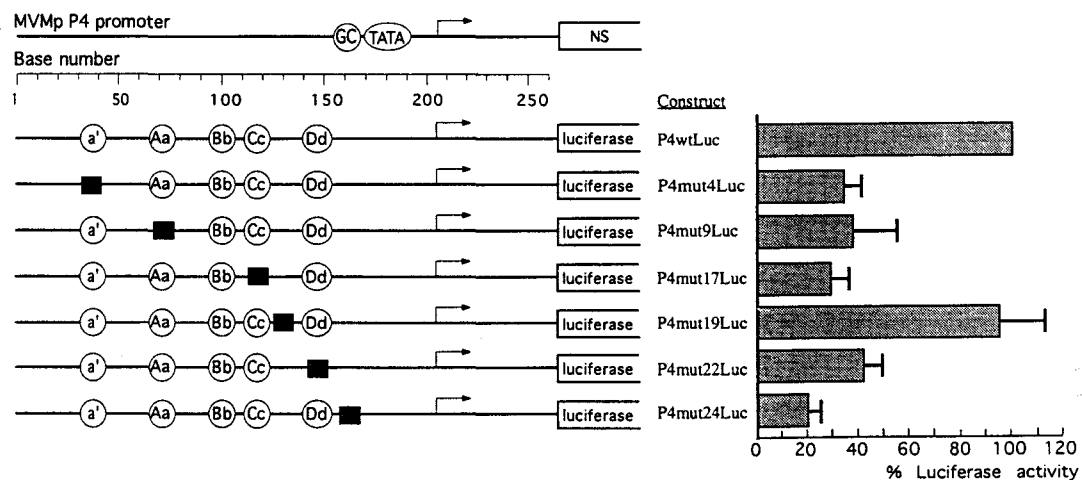


Fig. 5. Effect of mutations within protein-binding regions of the MVMp P4 promoter on its ability to drive gene expression. (Left) The positions of protein-binding sites (a', Aa, Bb, Cc, Dd) and *Bg/II*-linker substitutes (filled boxes) in the left-hand terminal portion of MVM DNA (cf. legend to Fig. 1). The linker sequence (AGATCT) was substituted for nt 36–41 (P4mut4Luc), nt 66–77 (P4mut9Luc), nt 114–119 (P4mut17Luc), nt 126–131 (P4mut19Luc), nt 144–149 (P4mut22Luc), and nt 156–161 (P4mut24Luc). (Right) The luciferase activities achieved by these P4 mutants in FREJ4 cells are given as percentages of the expression driven by the wild-type promoter. Average values and standard deviations are from three independent experiments, each performed in triplicate.

print Aa and its mirror image a' are both located over a tandem repeat of a motif (a': TGACGTgaTGACGC, nt 34 to 47; Aa: TGACGTgTGACGT, nt 81 to 69) closely related to the consensus sequence (TGACG^{C/T}/_A^{C/G}/_A) for the binding of transcription factors of the ATF/CREB family (10). Interestingly, a similar arrangement of putative ATF/CREB binding sites is found in the unique P6 promoter of the human parvovirus B19 (11). (ii) Footprint Bb overlaps two sequences, one of which (CACATG, nt 91 to 96) is related to the responsive element of helix-loop-helix proteins (CANNTG), while the other (ACATGGTTGGTC-AGTTCTA, nt 92 to 110) represents a 17/19 match for the consensus Y box sequence (10). It is noteworthy that the helix-loop-helix transcription factor MLTF has been found to interact with the P5 promoter of the helper-dependent parvovirus adeno-associated virus type 2 (12). (iii) Footprint Dd encompasses a motif (GCGCGAAAA, nt 145 to 153) that has been shown to interact with the E2F transcription factor (10). Although the involvement of these *trans*-acting factors in the regulation of the P4 promoter remains speculative, preliminary evidence of the association of the MVMp P4 promoter with at least one member of the ATF/CREB family (13) and with the helix-loop-helix transcription factor MLTF (14) was recently presented. It should also be stated that the elements identified in this work may also play a major role in the replication of the MVM genome, given the importance of the terminal regions for the formation and resolution of viral DNA replicative forms (15), and the sharing of at least some factors by the transcription and replication machineries.

The TATA box of promoter P4 and its adjacent Sp1-like element (GC box) were recently shown to be essential for the activity of this promoter in permissive human and mouse cells (1, 16). Consistently, this region proved to be protected from DNaseI digestion when incubated with nuclear extracts (Figs. 3 and 4, footprint e) and gave rise to specific complexes in gel retardation assays (Fig. 2, oligonucleotide V). However, only a weak photoprotection was detected at the GC box under *in vivo* conditions (Fig. 4, E1), which may be ascribed to the influence of the neighboring TATA box. Indeed, the TATA box and adjacent sequences down to the transcription initiation site were found to be strikingly photosensitized (Fig. 4, E2). The photosensitization of these sequences may be envisaged as a consequence of a distortion of proximal

P4 sequences and a subsequent increase in the mobility of the concerned DNA bases (see above). A parallel can be drawn between this feature and the reported melting of promoters upon activation of RNA polymerase II-driven transcription (17, 18) and may reflect the formation of (pre)initiation complexes (19).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Commission of European Communities and by the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Fondation de France, Association pour la Recherche sur le Cancer and Ligue contre le Cancer. S.F. and M.P. are fellows of the Deutsche Forschungsgemeinschaft-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and of the Association pour la Recherche sur le Cancer, respectively.

REFERENCES

1. AHN, J. K., GAVIN, B. J., KUMAR, G., and WARD, D. C., *J. Virol.* **63**, 5425-5439 (1989).
2. VAN HILLE, B., DUPONCHEL, N., SALOMÉ, N., SPRUYT, N., COTMORE, S. F., TATTERSALL, P., CORNELIS, J. J., and ROMMELAERE, J., *Virology* **171**, 89-97 (1989).
3. SALOMÉ, N., VAN HILLE, B., DUPONCHEL, N., MENEGUZZI, G., CUZIN, F., ROMMELAERE, J., and CORNELIS, J. J., *Oncogene* **5**, 123-130 (1990).
4. COTMORE, S. F., and TATTERSALL, P., *Adv. Virus Res.* **33**, 91-174 (1987).
5. BECKER, M. M., LESSER, D., KURPIEWSKI, M., BARANGER, A., and JEN-JACOBSON, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6247-6251 (1988).
6. BECKER, M. M., WANG, Z., GROSSMANN, G., and BECHERER, K. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 5315-5319 (1989).
7. SALUZ, H.-P., and JOST, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2602-2606 (1989).
8. MERCHLINSKY, M. J., TATTERSALL, P. J., LEARY, J. J., COTMORE, S. F., GARDINER, E. M., and WARD, D. C., *J. Virol.* **47**, 227-232 (1983).
9. BODNAR, J. W., *Virus Genes* **2**, 167-182 (1988).
10. FAISST, S., and MEYER, S., *Nucleic Acids Res.* **20**, 3-26 (1992).
11. LIU, J. M., GREEN, S. W., YU-SHU, H., McDONAGH, K. T., YOUNG, N. S., and SHIMADA, T., *Virology* **185**, 39-47 (1991).
12. CHANG, L.-S., SHI, Y., and SHENK, T., *J. Virol.* **63**, 3479-3488 (1989).
13. PERROS, M., FAISST, S., SPRUYT, N., and ROMMELAERE, J., *J. Cell. Biochem. Suppl.* **17A**, B674.
14. CORNELIS, J. J., PLAZA, S., DINSART, C., and ROMMELAERE, J., *J. Cell. Biochem. Suppl.* **17A**, B129.
15. COTMORE, S. F., NUESCH, J. P. F., and TATTERSALL, P., *J. Virol.* **67**, 1579-1589 (1993).
16. PITLUK, Z. W., and WARD, D. C., *J. Virol.* **65**, 6661-6670 (1991).
17. VOS, J. C., SASKER, M., and STUNNENBERG, H. G., *Cell* **65**, 105-113 (1991).
18. ZHANG, L., and GRALLA, J. D., *Genes Dev.* **3**, 1814-1822 (1989).
19. SELLECK, S. B., and MAJORS, J., *Nature* **325**, 173-177 (1987).
20. ASTELL, C. R., THOMSON, M., MERCHLINSKY, M., and WARD, D. C., *Nucleic Acids Res.* **11**, 999-1018 (1983).



2.1.3 Discussion

Nous avons identifié les régions de P4 pouvant fixer des complexes protéiques et participant à l'activité du promoteur. Bien que les empreintes observées soient relativement faibles, toutes les séquences identifiées s'avèrent capables de lier plusieurs complexes protéiques dans les expériences d'EMSA et leur mutation réduit l'activité du promoteur sauvage. Dans les expériences d'empreintes, *in vivo*, les cellules ont été exposées aux rayons UV 20 heures après infection. A ce stade de l'infection, les cellules infectées contiennent principalement des intermédiaires réplicatifs en double brin mais également de nombreux génomes encapsidés en simple brin. Ces derniers ne sont pas détectés puisque seules les interactions protéiques avec le brin positif du génome ont été révélées. L'ADN viral est une population mixte de génomes transcrits et répliqués. Il est fort probable que l'ADN ne soit pas simultanément substrat pour la transcription et la réplication puisque la fixation des facteurs correspondants sur une même séquence d'ADN est souvent exclusive. Ceci pourrait contribuer à diminuer l'intensité des empreintes observées dans les expériences *in vivo*. A ce titre on peut s'étonner de l'absence d'empreintes *in vivo* dans la région du promoteur reconnue et coupée par la protéine NS1. En effet, *in vitro* NS1, protège très efficacement une large région d'ADN comprise entre les nucléotide 80 et 130 (Cotmore *et al.*, 1995). Il se peut qu'étant donnée l'efficacité de coupure de l'ADN par NS1, l'extension d'amorce, impliquée dans la méthode d'empreintes utilisée, soit stoppée au niveau du site de clivage par NS1. Dans ce cas il aurait été nécessaire, pour révéler la fixation de NS1 sur P4, d'étudier les interactions protéiques avec le brin négatif à partir d'amorces situées en amont du promoteur. Il est également possible que NS1 ne se lie à l'ADN que de façon très transitoire puis se déplace, ce qui est caractéristique de nombreuses hélicases (Jürg Nüesch, communication personnelle).

Toutes les régions de P4 identifiées par le biais de leurs interactions protéiques, participent à l'activité transcriptionnelle du promoteur dans les cellules FREJ4. Par contre, l'introduction de mutations dans une région dépourvue d'empreintes n'a aucun effet sur le niveau d'activité du promoteur. En déterminant l'importance relative des différents motifs quant au niveau d'activation du promoteur P4 dans les cellules FREJ4, nous avons pu confirmer les résultats obtenus dans le laboratoire de David Ward, montrant que la mutation de la boîte GC réduit l'activité de P4 à 20% de celle du promoteur sauvage. Par ailleurs, toutes les autres mutations étudiées réduisent l'activité du promoteur au niveau de 30 à 40 % du sauvage. Il est vraisemblable qu'il existe une coopération entre les différents facteurs de transcription et que

l'activité du promoteur ne correspond pas à la simple somme des activités conférées par chacun d'entre eux indépendamment. Comme nous le verrons dans la troisième publication, ceci se confirme pour les facteurs Ets et Sp1, qui se lient tous deux au promoteur P4 et activent la transcription de façon synergique. Ces résultats montrent clairement que le promoteur P4 ne se réduit pas aux uniques boîtes TATA et GC, et que la région en amont du promoteur joue un rôle important dans la régulation de son activité.

Cette publication se limite à l'étude du promoteur P4 dans le système cellulaire FREJ4. Comme nous l'avons déjà précisé, l'activité de ce promoteur est environ cinq fois supérieure dans les fibroblastes de rat transformés par *ras* (FREJ4), en comparaison de leurs équivalents normaux (Spegelaere *et al.*, 1991). Les mêmes expériences que celles présentées dans la publication ont été réalisées avec les cellules FR3T3, ceci afin d'identifier les régions de P4 interagissant de façon différentielle avec des protéines de cellules FR3T3 et FREJ4. Ces travaux ont montré que la sensibilisation observée au niveau de la boîte TATA est beaucoup plus importante dans les cellules FREJ4, ce qui est en accord avec l'accroissement des taux d'initiation de la transcription dans les cellules transformées (Spegelaere *et al.*, 1991). D'autres motifs font également l'objet d'empreintes différentielles entre cellules normales et transformées, comme nous le verrons ci-dessous.

2.2 Des motifs CREs distaux participent à l'activité basale du promoteur P4 et à sa stimulation dans les cellules transformées par ras.

2.2.1 Résumé

Les éléments a et a' ont été décrits dans la première publication comme des sites de fixation de protéines cellulaires participant à l'activité du promoteur P4. Leur séquence contient un motif TGACG^C/_T/^C/_A/^G/_A. Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction, ce motif d'ADN correspond à un site consensus pour la fixation des facteurs de transcription ATF/CREB. Ces protéines sont cibles de réseaux de régulation activés dans les cellules transformées par l'oncogène *ras*. La comparaison des empreintes à la DNase entre cellules normales et transformées montre une protection accrue de cette région dans les cellules FREJ4. Nous avons comparé, par des expériences d'EMSA, les protéines fixées aux éléments CRE suivant que les extraits protéiques totaux sont préparés à partir de cellules FR3T3 ou FREJ4. Trois complexes majeurs spécifiques, aussi bien de la sonde CREa que de la sonde CREa', ont été observés. Ces complexes, nommés A, B et C, se forment avec la même affinité pour l'une ou l'autre des séquences, et l'addition d'oligonucléotides non radioactifs, contenant la séquence CRE du promoteur de la somatostatine, empêche leur formation. Ces résultats ainsi que le poids moléculaire des protéines se liant à la sonde CREa, confirment l'hypothèse du rôle de protéines de la famille ATF/CREB dans le contrôle de l'activité du promoteur P4 via les éléments CRE.

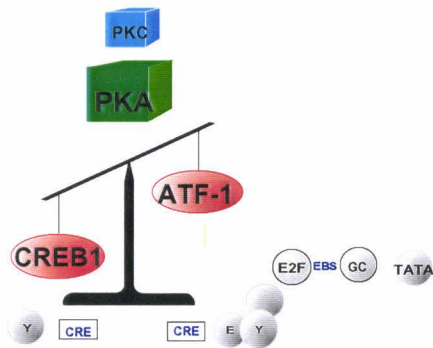
La proportion relative des complexes A, B et C diffère suivant que les expériences d'EMSA sont réalisées avec des extraits protéiques de cellules normales ou transformées. Les extraits protéiques de cellules FR3T3 forment majoritairement le complexe A par rapport au complexe C. La situation inverse est observée avec des extraits provenant de cellules FREJ4. La phosphorylation des facteurs de transcription ATF/CREB pourrait modifier leur affinité pour l'ADN. La PKA joue un rôle prépondérant dans cette régulation. Nous avons observé une activité réduite de la PKA dans les cellules transformées par l'oncogène *ras*. Si les extraits cellulaires, utilisés pour les expériences d'EMSA, sont préparés à partir de cellules FREJ4 traitées au dbAMPc, un activateur de la PKA, le complexe A est alors prépondérant, comme observé lors de l'utilisation d'extraits de cellules FR3T3. Ces résultats ont été confirmés en

traitant *in vitro* les extraits protéiques de cellules FREJ4 à la PKA, et les extraits de cellules FR3T3 à la phosphatase alcaline. Dans ce second cas la distribution des complexes est similaire à celles observée avec des extraits de cellules FREJ4.

Nous nous sommes concentré sur le rôle des éléments CRE dans l'activation du promoteur P4 en réponse à la transformation cellulaire. La mutation des éléments CRE affecte l'activité du promoteur P4 à un degré moindre dans les cellules FR3T3 par rapport aux cellules FREJ4, montrant une participation plus importante des éléments CRE à l'activité du promoteur P4 dans les cellules transformées. Si les modifications observées par les expériences d'EMSA sont à mettre en corrélation avec cette participation différentielle des éléments CRE, l'activation de la PKA dans les cellules FREJ4 devrait réduire l'activité du promoteur P4, jusqu'à un niveau similaire à celui observé dans les cellules FR3T3. En effet, le traitement des cellules FR3T3 et FREJ4 par des activateurs de la PKA a pour conséquence une activité moindre du promoteur P4, alors que des activateurs de la PKC, inhibant la sous-unité nucléaire de la PKA, accroissent l'activité du promoteur P4.

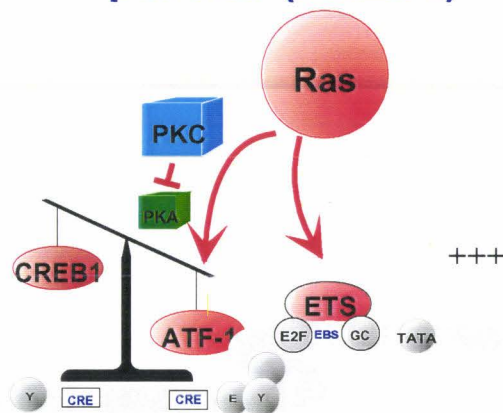
Nos résultats suggèrent que la transformation des fibroblastes de rat par l'oncogène *ras*, en réduisant l'activité de la PKA, modifie l'état de phosphorylation des protéines de la famille ATF/CREB. Cette modification conduit à l'occupation préférentielle des éléments CRE du promoteur P4 par des facteurs possédant une efficacité transcriptionnelle supérieure à celle des facteurs phosphorylés associés à ces éléments dans les cellules normales (Figure 33).

Cellules normales (FR3T3)



promoteur P4

Cellules transformées par *ras* (FREJ4)



promoteur P4

Figure 33: Modèle de l'activation du promoteur P4 par l'oncogène *ras*.

Dans les cellules de rat normales (FR3T3), l'activité de la protéine kinase A (PKA) élevée se traduit par la fixation préférentielle du facteur de transcription CREB sur les éléments CRE du promoteur P4. Les protéines de la famille Ets sont inactives (en absence de sérum) et laissent leur motif de liaison (EBS) inoccupé.

La transformation des cellules FR3T3 par l'oncogène *ras* (cellules FREJ4), active la protéine kinase C (PKC), ce qui inhibe la translocation de la sous-unité nucléaire de la PKA. L'absence de phosphorylation des facteurs ATF/CREB par la PKA se traduit par la fixation préférentielle du facteur ATF-1 (et d'un facteur non identifié) sur les éléments CRE. Les protéines de la famille Ets sont activées par les voies MAPK et l'un de ces facteurs de transcription (également non identifié) se fixe sur le site EBS du promoteur P4. La fixation conjointe de ces protéines, sur les éléments EBS et CRE, permet l'hyperactivité du promoteur P4 dans les cellules FREJ4.

Upstream CREs Participate in the Basal Activity of Minute Virus of Mice Promoter P4 and in Its Stimulation in *ras*-Transformed Cells

MANOUSSOS PERROS,^{1,2†} LAURENT DELEU,² JEAN-MARC VANACKER,² ZOULIKA KHERROUCHE,¹ NATHALIE SPRUYT,¹ STEFFEN FAISST,² AND JEAN ROMMELAERE^{2*}

Molecular Oncology Unit, Centre National de la Recherche Scientifique URA1160, Institut Pasteur de Lille, F-59019 Lille Cedex, France,¹ and Tumor Virology Unit and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U375, Deutsches Krebsforschungszentrum, D-69009 Heidelberg, Germany²

Received 17 March 1995/Accepted 26 May 1995

The activity of the P4 promoter of the parvovirus minute virus of mice (prototype strain MVMp) is stimulated in *ras*-transformed FREJ4 cells compared with the parental FR3T3 line. This activation may participate in the oncolytic effect of parvoviruses, given that P4 drives a transcriptional unit encoding cytotoxic nonstructural proteins. Our results suggest that the higher transcriptional activity of promoter P4 in FREJ4 cells is mediated at least in part by upstream CRE elements. Accordingly, mutations in the CRE motifs impair P4 function more strongly in the FREJ4 derivative than in its FR3T3 parent. Further evidence that these elements contribute to hyperactivity of the P4 promoter in the *ras* transformant is the fact that they form distinct complexes with proteins from FREJ4 and FR3T3 cell extracts. This difference can be abolished by treating the FREJ4 cell extracts with cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) or treating original cultures with a PKA activator. These findings can be linked with two previously reported features of *ras*-transformed cells: the activation of a PKA-inhibited protein kinase cascade and the reduction of PKA-induced protein phosphorylation. In keeping with these facts, P4-directed gene expression can be up- or downmodulated in vivo by exposing cells to known inhibitors or activators of PKA, respectively.

Parvoviruses are small, nonenveloped lytic viruses that can infect a variety of animals from insects to humans (40). These viruses have a single-stranded DNA genome comprising about 5×10^3 nucleotides, bracketed by terminal palindromic regions that are essential for DNA replication (2, 10). Like other parvoviruses, minute virus of mice (prototype strain MVMp) depends extensively on host cell functions under developmental and proliferative control to accomplish its infectious cycle (40). Accordingly, transcription from the viral early and late promoters (called P4 and P38 and located at map units 4 and 38, respectively) is catalyzed by the host RNA polymerase II (9) and regulated by various cellular transcription factors (1, 15, 19, 21, 34). Stable transformation of various cells correlates with enhanced parvoviral transcription (8, 39). In particular, the P4 promoter appears to be activated in *ras*-transformed derivatives (FREJ) of rat FR3T3 fibroblasts (39). Promoter P4 directs transcription of viral messengers encoding nonstructural (NS) proteins that are cytotoxic (7). Hence, characterization of the parvovirus DNA elements involved in *ras* transformation-associated stimulation of P4-directed expression may provide an insight into the mechanism of parvoviral oncolysis (36). Furthermore, besides being of interest per se, the P4 promoter may serve as an indicator of some of the cellular disturbances that link Ras to the establishment of the transformed state.

Unlike nuclear oncoproteins, which can exert their transforming properties by directly regulating gene expression, Ras

is associated with the plasma membrane (29) and requires chains of intercommunicating proteins to transfer its signal to the nucleus (30). Over the past few years, considerable progress has been made in the elucidation of one of these signal transduction pathways, involving the *c-raf-1* proto-oncogene and the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade (14). However, Ras appears to activate more than one signal transduction pathway, depending on the biological system and experimental conditions. Some of the biological and molecular changes associated with *ras* transformation are reportedly mediated by an increase in the level of plasma membrane-bound protein kinase C (PKC) (18, 27).

These observations raise the question of which transcription factor(s) converts the signals delivered by the cytoplasmic effectors of Ras (mainly serine/threonine kinases) into changes in gene expression. Members of the Fos and Jun transcription factor family, which participate in the formation of the AP-1 complex, are prime candidates for such mediators. Indeed, these proteins can integrate signals from both PKC and MAP kinases that regulate them at transcriptional as well as post-translational levels (24). In addition, DNA motifs recognized by other proteins may be involved in Ras-induced activation of various promoters (17, 25, 28, 33, 35). Among these, CRE (cyclic AMP [cAMP]-responsive elements) and CRE-like sequences are suspected of mediating some of the transcriptional effects of Ras (17, 25, 26). CREs interact with a number of transcription factors designated by the generic name ATF/CREB. Like Jun and Fos, ATF/CREB factors belong to the group of bZIP proteins, which possess a basic DNA-binding motif (b) and a leucine zipper (ZIP), allowing their polyvalent dimerization. These factors can homo- or heterodimerize on DNA, forming ternary complexes with distinct sequence recognition specificities and *trans* activation properties (22). The

* Corresponding author. Mailing address: Tumor Virology Unit, Abt. 0610, Deutsches Krebsforschungszentrum, P. 101949, D-69009 Heidelberg, Germany. Phone: 49 6221 424961. Fax: 49 6221 424962.

† Present address: Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, CT 06520-8114.

effects of members of this family on target promoters can be modulated by various signals. In particular, phosphorylation of CREB by cAMP-dependent protein kinase (PKA) appears to enhance its transcriptional function and possibly its dimerization and/or DNA binding (24, 32, 43, 44). Interestingly, reduced PKA activity has been reported in thyroid cell nuclei when oncogenic Ras is expressed. Since Ras does not seem to regulate adenylate cyclase in higher eukaryotes, the oncoprotein is assumed to exert this effect by activating PKC, which in turn inhibits nuclear translocation of the PKA catalytic subunits (18). The cross-talk of these various pathways is worth stressing. In particular, PKA appears to inhibit the Raf-1 kinase cascade (6), implying that PKA can also affect cellular protein phosphorylation in an indirect way.

In this study, we have used the FR3T3 rat fibroblast cell line and its FREJ4 derivative, transformed by activated c-Ha-ras (42), to identify ras transformation-responsive regulatory elements in the P4 promoter. Our results suggest that the previously noted upstream CRE motifs within P4 (4, 10, 15) are involved in enhancing the rate of transcription initiation from this promoter in FREJ4 cells compared with FR3T3 cells. The factors with which these elements interact are different in normal and transformed cells, a finding in keeping with the reduced capacity of the ras transformant to carry out PKA-induced protein phosphorylation. Accordingly, the activity of promoter P4 can be respectively up- or downregulated by known inhibitors or activators of PKA.

MATERIALS AND METHODS

Cells and virus. The established line of Fisher rat fibroblasts FR3T3 and its c-Ha-ras-transformed derivative FREJ4 (37, 42) were grown in Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium supplemented with 10% aseptic calf serum and 1% sodium pyruvate. MVMP was propagated in A9 cells and purified by isopycnic CsCl centrifugation as previously described (42). MVMP titers were determined by plaque assays on A9 indicator cells. Exponentially growing cells were infected at a multiplicity of 2 PFU per cell.

Plasmids and transfections. Plasmid pP4uc was obtained by cloning the *ScaI*-*NcoI* fragment of plasmid pP4CAT (39), containing P4 and downstream leader sequences, in front of the firefly luciferase gene (1.1-kb *HindIII*-*EcoRI* restriction fragment from pLucΔSS [20]) in the pBSK⁻ vector (Stratagene). CRE-defective derivatives were obtained by site-directed mutagenesis, by substituting the *Bgl*III recognition motif (AGATCT) for a sequence of equivalent length within the CREa (nucleotides [nt] 36 to 41) and/or CREa' (nt 68 to 81) region. The E box-defective mutant was obtained and characterized by Gu et al. (21). To clone the CRE sequence of P4 upstream from the minimal thymidine kinase (TK) promoter, a P4-derived 13-mer oligonucleotide comprising CREa (ACGT CACACGTCA) or an equivalent CRE mutant (ACGTTGCGCATCA), flanked by *Bam*HI and *Bgl*II 5' overhangs, was phosphorylated and ligated in the presence of *Bam*HI and *Bgl*II to ensure multimerization in the head-to-tail orientation. Trimers were isolated by 5% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and inserted into the *Bam*HI site of plasmid pBLCAT5 (5).

Transfection was achieved with the LipofectAMINE reagent (Gibco BRL), as indicated by the manufacturer. Cultures (5×10^5 cells) were cotransfected with 1 μ g of reporter construct and, as a standard, 0.5 μ g of plasmid pTKhGH (Nichols Institute), which expresses the human growth hormone gene under control of the herpes simplex virus TK promoter. In transient-expression assays, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) and luciferase (Luc) activities were measured at 48 h posttransfection on samples containing equal amounts of total proteins from whole-cell extracts. The results were adjusted as described previously (39), according to the transfection efficiency estimated with the help of the cotransfected plasmid standard. Stable transformants were obtained by cotransfection of 0.1 μ g of plasmid pSV2neo (38) or pSV2neo EJ (37) and a 10-fold molar excess of either pP4uc or a derived mutant, followed by selection in medium containing G418 (500 μ g/ml) for 14 days.

Nuclear protein extraction. Extractions were performed by the method of Dignam et al. (12), with the following modifications. About 5×10^8 FR3T3 or FREJ4 cells were collected in ice-cold phosphate-buffered saline and washed twice. The pellet was resuspended in buffer A (0.3 M sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.5 mM EGTA [ethylene glycol tetraacetic acid], 2 mM EDTA, 15 mM HEPES [*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid, pH 7.5]), and Nonidet P-40 was added to a final concentration of 0.3%. After lysis, the reaction was stopped by adding an equal volume of buffer A and centrifuging through a cushion of solution B (30% sucrose, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 15 mM HEPES [pH 7.5]). The nuclear pellet was resus-

ended in 12% glycerol-250 mM NaCl-1.5 mM MgCl₂-1 mM EDTA-0.1 mM EGTA-5 mM HEPES (pH 7.9) and incubated for 30 min at 4°C. After centrifugation (150,000 \times g, 30 min, 4°C), the supernatant was precipitated with ammonium sulfate (0.33 g/ml), unless intended for use in *in vitro* kinase assays (see below), and centrifuged (85,000 \times g, 20 min, 4°C). The pellet was resuspended in dialysis buffer (20% glycerol, 60 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 0.125 mM EGTA, 20 mM HEPES [pH 7.9]) and dialyzed overnight. Extracts were stored at -80°C. All buffers contained a mixture of protease and phosphatase inhibitors except for extracts treated with PKA or acid phosphatase.

In vitro DNase I and in vivo UV footprinting experiments. For DNase I footprinting, the *Bam*HI-*NcoI* fragment of pMM984, an infectious full-length molecular clone of MVMP (31), was 3' end labeled to a high specific activity on the plus strand, using the Klenow enzyme, and purified by 5% polyacrylamide native gel electrophoresis. About 10 ng of labeled probe was incubated with 100 μ g of nuclear extract for 1 h on ice in 50 μ l of binding buffer [6.5 mM spermidine, 0.1 mg of poly(dI-dC) per ml, 1 mM sodium phosphate (pH 7.2), 0.1 mM EDTA in 50% (vol/vol) dialysis buffer]. After incubation, 50 μ l of 2 mM CaCl₂-10 mM MgCl₂ was added, and the probe was digested with various concentrations of DNase I, ranging from 0.2 to 2 μ g/ml, for 30 min at room temperature. The reaction mixture was supplemented with 100 μ l of 50 mM EDTA and 0.5 mg of proteinase K per ml, incubated for 30 min at 37°C and for 5 min at 90°C, phenol-chloroform extracted, ethanol precipitated, and loaded on a 7 M urea-8% polyacrylamide sequencing gel. *In vivo* footprinting experiments were performed as previously described (39). Briefly, total DNA from cells harvested 20 h after MVMP infection was isolated by phenol extraction, digested with RNase A, ethanol precipitated, and redissolved in 1 mM EDTA. UV irradiation (254 nm, 1,800 J/m²) took place either immediately before cell harvest (*in vivo*) or after DNA purification (*in vitro*). Primer extension reactions were carried out with *Thermus aquaticus* DNA polymerase in order to detect UV-damaged DNA bases.

Gel retardation assays. Double-stranded oligonucleotides a' (nt 23 to 53) and a (nt 58 to 88) were 5' end labeled to a high specific activity by using T4 polynucleotide kinase. About 1 ng of probe (with or without unlabeled competitor at the indicated molar excesses) was incubated for 15 min on ice with 4 μ g of nuclear extract in 15 μ l of binding buffer (as for DNase I footprinting). In some experiments, extracts were incubated for 5 min with either sweet potato acid phosphatase (Sigma; 1 U per reaction) or the catalytic subunit of PKA (Sigma; 2 U per reaction) and 1 mM ATP prior to addition of the radiolabeled probe. Fivefold-higher amounts of acid phosphatase and PKA were used to treat extracts that had previously been phosphorylated or dephosphorylated, respectively, *in vitro*. Following incubation, samples were loaded onto a 6% polyacrylamide native gel.

Protein analysis by UV cross-linking. DNA probes were prepared by 3'-end annealing of a complementary 10-mer primer that was extended with Klenow enzyme in the presence of 5 mM 5-bromodeoxyuridine triphosphate and 50 μ Ci (3,000 Ci/mmol) each of α -³²P-labeled dATP, dCTP, and dGTP. After purification by 20% native PAGE, probes were incubated with nuclear proteins and processed for gel retardation assays as described above, except that the reactions were scaled up fivefold. After irradiation for 10 min at 302 nm in the wet gel, retarded complexes were excised, individually eluted in 10 mM Tris-1 mM EDTA-500 mM NaCl, ethanol precipitated, and analyzed by SDS-PAGE.

In vitro cAMP-dependent protein kinase assay. To measure nuclear PKA activity, nuclear extract (30 μ g of protein, 20 μ l) was added to 60 μ l of phosphorylation solution (10 mM MgCl₂, 10 mM Tris [pH 7.9], 20 μ M Kemptide [Sigma], 1 μ M [γ -³²P]ATP [0.5 μ Ci/mol]). Reactions were carried out for 15 min at 30°C and stopped by addition of 10 μ l of ice-cold 10% trichloroacetic acid. Samples were spotted on P81 paper (Whatman), dried, and washed five times with 75 mM H₂PO₄ to remove unincorporated nucleotides, and radioactivity was quantified with an Instant Imager (Hewlett Packard).

RESULTS

Upstream region of MVMP P4 promoter contains potential CRE regulatory elements. After infection of competent cells with MVMP, single-stranded viral DNA converts to duplex replicative forms believed to serve as transcription templates. Sequence analysis of the P4 promoter revealed a CRE-like motif (ACACGTCA) about 100 bp upstream from the functional TATA box. This motif is framed and designated CREa in Fig. 1A (bottom sequence). Because of its location within the terminal palindrome of the MVMP genome (Fig. 1A, hairpin configuration), CREa is duplicated as CREa' upon conversion of the parental minus strand into a full-length replicative form (Fig. 1A, extended configuration). CREa' is a mirror image of CREa but for a minor sequence difference (TGACGTGAT) reflecting the imperfection of the original palindrome.

In UV footprinting experiments with the permissive FREJ4

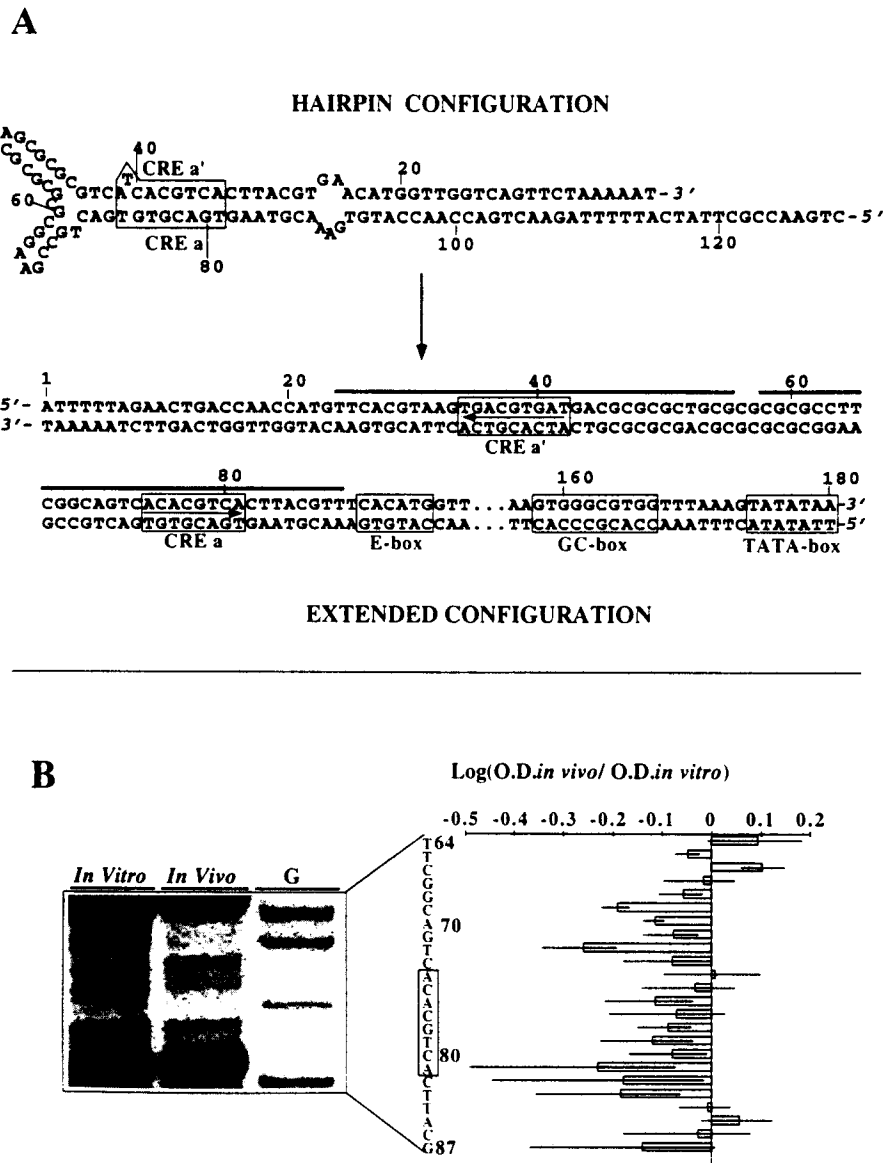


FIG. 1. Location of the CRE motifs in promoter P4. (A) Representation of the hairpin and extended configurations of the P4 promoter. Boxes indicate the CREs and the functional GC and TATA boxes. CREa and CREa' face each other in the hairpin, and arrows show the polarity of the duplicated elements in the extended configuration. Horizontal bars delimit the oligonucleotides, a and a', used in subsequent in vitro experiments. (B) In vivo UV footprinting analysis of the CREa region. The CRE motif is framed. In vivo and in vitro indicate that viral DNA from infected FREJ4 cells was irradiated prior to or after extraction, respectively. Lane G, Maxam and Gilbert G ladder. Bars on the right-hand side show the extent of photoprotection ($\log < 0$) or photosensitization ($\log > 0$) of the corresponding nucleotides. O.D., optical density. Average values from at least three experiments are given, with standard deviation bars. Nucleotides are numbered according to Astell et al. (3).

cell line, the CRE sequences of promoter P4 were tested for their ability to associate with proteins in vivo (Fig. 1B). Since a high proportion of input viral genomes (single-stranded DNA of minus polarity) are known not to be processed, we restricted our analysis to plus strands, which constitute part of the double-stranded replicative forms synthesized in infected cells. UV in vivo footprinting is based on the fact that the reactivity of DNA bases exposed to UV light depends on their mobility. DNA stretches that interact with proteins may be sterically stabilized and protected against UV-induced lesions or, on the contrary, distorted by and sensitized to them. Damaged nucleotides are revealed by their ability to arrest primer elongation by *Taq* polymerase. The region from nt 45 to 59, believed to be in a Z-DNA configuration (4), was found to block the *Taq* polymerase, precluding the analysis of nt 1 to 60 and detection

of CREa'. Nt 66 to 83, encompassing the CREa consensus, were protected in vivo from UV-induced damage, suggesting their involvement in protein-DNA interactions. It is noteworthy that the interactions were measured over the whole population of viral DNA and might not necessarily concern all genomes. This could explain, at least in part, why the changes in photosensitivity were relatively small yet quite reproducible in up to four independent experiments.

To confirm the recognition of parvoviral CREs by cellular proteins, competitive gel retardation assays were performed with radiolabeled oligonucleotides corresponding to the in vivo protected region and its upstream mirror image. Oligonucleotides a' and a, encompassing elements CREa' and CREa, respectively (see Fig. 1A), generated specific complexes upon incubation with nuclear extracts from FREJ4 cells (Fig. 2A).

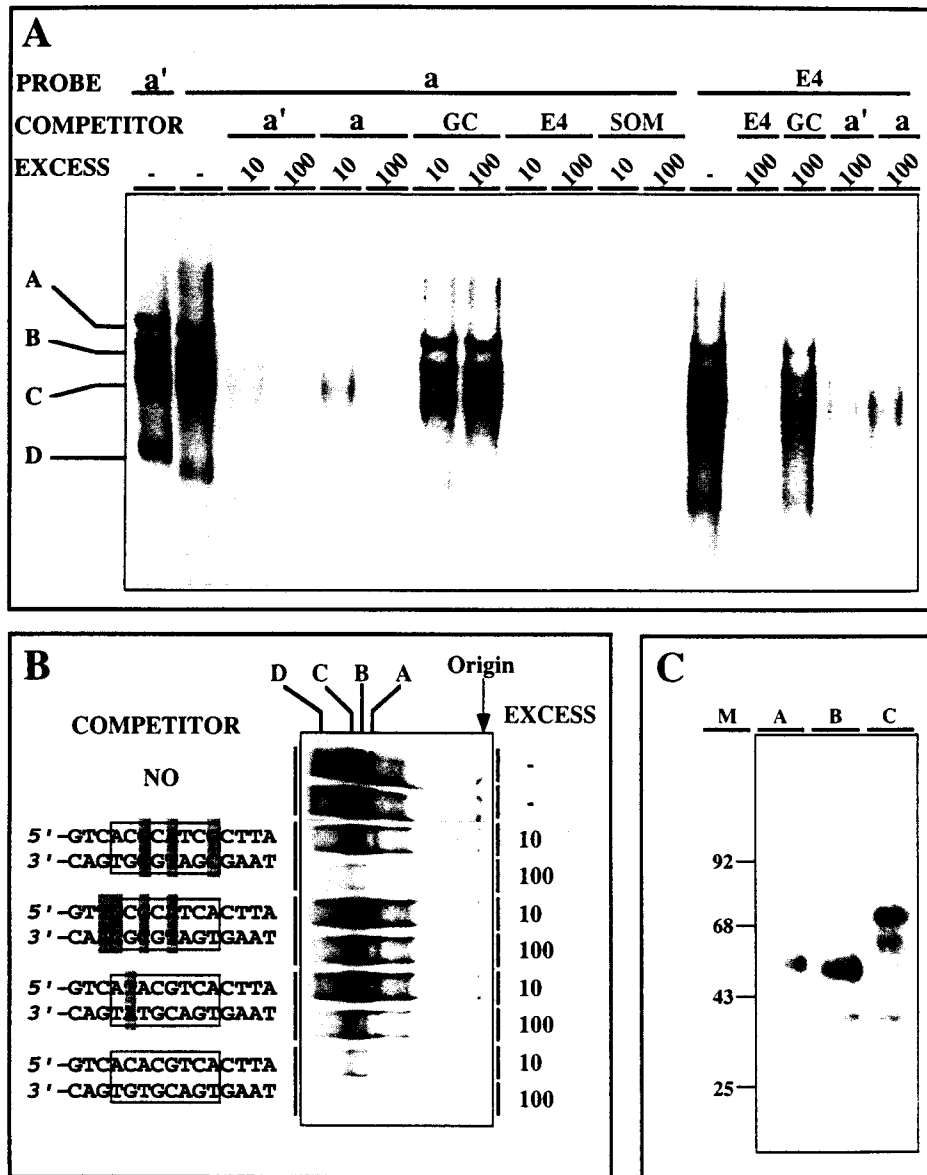


FIG. 2. Analysis of P4 CRE sequences and interacting proteins. (A and B) Competitive gel retardation assays. ³²P-labeled oligonucleotide probes were incubated with nuclear extracts from FREJ4 cells in the presence of the indicated excesses of unlabeled competitor and subjected to native PAGE. (A) The following oligonucleotides were used as probe and/or competitor: a and a' (CRE regions of P4; see Fig. 1), GC (GC box of P4), and E4 and SOM (CREs from the adenovirus E4 and somatostatin promoters, respectively). (B) Oligonucleotide a was used as a probe, while competitors consisted of the same oligonucleotide (bottom two lanes) or derivatives harboring substitutions (shaded areas) in the CREa (open box) region. (C) UV cross-linking analysis. Bromodeoxyuridine-substituted oligonucleotide a, labeled on the positive strand, was incubated with FREJ4 cell extracts in the presence of a 10-fold molar excess of GC competitor. The binding reaction products were separated by native PAGE and irradiated in the gel. Retarded complexes A, B, and C (see panel A) were individually eluted and analyzed by SDS-PAGE. Lanes are labeled accordingly. M, molecular mass standards (in kilodaltons).

Despite the minor sequence difference between the two sites, due to a "mismatch" in the stem of the terminal palindrome, the retardation patterns of the two probes were indistinguishable from both qualitative and quantitative points of view. Furthermore, unlabeled a and a' oligonucleotides added to the binding reaction mix were equally efficient in inhibiting nucleoprotein complex formation on either probe, suggesting that CREa and its mirror image CREa' interact with identical cellular factors. As shown in Fig. 2A, three of the major complexes detected (A, B, and C) proved to be specific, since competition with a 100-fold excess of an unrelated sequence of identical length (the GC box region of promoter P4) did not

affect their formation. A fourth complex (D) may be of no relevance, as its relative abundance varied from one nuclear extract batch to another and its formation was efficiently prevented by the unrelated competing sequence.

The identification of promoter P4 CREs with protein-binding motifs was confirmed in gel retardation assays with homologous oligonucleotide competitors with base substitutions at positions described as essential to complex formation on the consensus ATF/CREB motif (43). As illustrated in Fig. 2B, such mutations significantly reduced or even abolished the ability of the respective oligonucleotides to compete for protein binding.

TABLE 1. Activation of minimal TK promoter-driven gene expression by the MVMp CREa element^a

| Insert | CAT activity (% acetylation) | Activation factor ^b ± SD |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| DR4 | 1.4 | 1 |
| CREa | 66.1 | 47 ± 14 |
| CREa ⁻ | 11.2 | 8 ± 2.5 |
| SRE | >90 ^c | >64 ^c |

^a Cells were transfected with pBLCAT5 derivatives containing the indicated inserts in triplicate upstream from the minimal TK promoter (see Materials and Methods). CREa⁻ corresponds to the second mutant from the top in Fig. 2B. CAT activities were measured 48 h after transfection and are expressed as the percentage of chloramphenicol acetylated (average values from four independent experiments).

^b Activation factors are defined as the ratio of CAT expression from each construct relative to that from DR4-TK-CAT.

^c CAT activities were beyond the saturation threshold of the enzyme reaction.

The possibility that MVMp CRE sequences constitute regulatory motifs was further assessed at the functional level. To this end, three head-to-tail copies of either the wild-type or base-substituted CREa oligonucleotide were cloned upstream from a truncated heterologous TK promoter directing the expression of the *cat* reporter gene. To measure the basal activity of the minimal TK promoter, a similar construction was made with the ErbA (thyroid hormone receptor)-responsive DR4 element, which has no regulatory properties in FREJ4 cells in the absence of exogenous ErbA (41). Although it had a weaker transcriptional activator than the consensus serum-responsive element (SRE) used as a standard, the CREa-containing repeat enhanced TK promoter-driven gene expression by about 50-fold compared with expression with unstimulated DR4 (Table 1). This upmodulation was much reduced by mutations in CREa, like protein binding in competition experiments (Fig. 2B, second mutant from the top), suggesting that the P4 CRE sequences are functional under the conditions tested.

CRE elements of promoter P4 interact with ATF/CREB family transcription factors. In an attempt to identify the proteins that recognize the CREs of promoter P4, genuine CRE sequences were used in competitive gel retardation assays. As shown in Fig. 2A, a 10-fold excess of unlabeled oligonucleotide bearing the consensus CRE sequence from the somatostatin (SOM) or the adenovirus E4 promoter competed with CREa for formation of all three specific complexes. The constituent proteins of these complexes may thus belong to the ATF/CREB family of transcription factors. When used as a probe, the E4 (Fig. 2A) and SOM (data not shown) oligonucleotides formed complexes which comigrated with the retarded parvoviral CRE bands. An excess of unlabeled a or a' oligonucleotide prevented the formation of these complexes, albeit less efficiently than the homologous competitor. Together, these observations suggest that the CREs of promoter P4 are recognized by the same proteins and with the same stoichiometry (a single protein dimer at a time) as bona fide CREs.

In order to determine whether the retarded complexes could be distinguished from each other by their protein constituents, nuclear extracts were incubated with radiolabeled oligonucleotide a or a' in the presence of an excess of unlabeled heterologous competitor, fractionated by native PAGE prior to UV cross-linking in the gel matrix. Individual retarded complexes were eluted and analyzed by SDS-PAGE. Identical results were obtained with either strand of both probes, confirming that CREa and CREa' form similar complexes and showing, moreover, that the constituent polypeptides are in contact with both strands of the target motif, in agreement with current

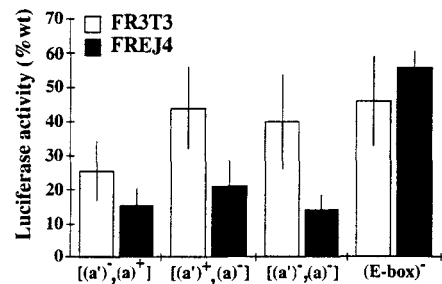


FIG. 3. Effects of mutations in the CREa and CREa' regions on P4-driven gene expression. Either or both of the CREa [(a)'] and CREa' [(a)'] motifs were replaced by an unrelated sequence of the same size [(a)'] or [(a)'], respectively, and the resulting modified P4 promoters were placed upstream from the luciferase-encoding reporter gene. A construct bearing point mutations in the neighboring E box was used as a control (21). Activities were measured 48 h after transfection of FR3T3 and FREJ4 cells with the different constructs and are represented as percentages of the activity of the wild-type promoter in the respective cell line. Average values from at least eight independent experiments are shown with standard deviation bars.

models of bZIP protein interactions with DNA. The results obtained with probe a are illustrated in Fig. 2C. Complexes A, B, and C were characterized by distinct patterns of associated proteins. Although some role of protein modification cannot be ruled out, the high-molecular-weight variations detected and the capacity of ATF/CREB factors for heterodimerization argue that the CRE motif is involved in alternative complexes that differ from each other in one or more polypeptide species. The molecular mass diversity of the specifically interacting proteins (36 to 74 kDa) may be related to the known heterogeneity of the ATF/CREB family (22), although the great number of transcription factors within this size range precludes any conclusion regarding the identity of the polypeptides involved.

CREs contribute to the activation of promoter P4 in *ras*-transformed cells. Given the suspected involvement of CRE motifs in the upmodulation of some promoters by Ras (17), we investigated the possible regulatory role of these elements in the previously reported enhancement of the transcriptional activity of the P4 promoter in FREJ4 cells compared with FR3T3 cells (39). Substitution mutations were introduced into the CREa and/or the CREa' site of a complete P4 promoter directing expression of the luciferase reporter gene. Normal FR3T3 and *ras*-transformed FREJ4 cells were transfected with the resulting constructs, together with a plasmid containing the human growth hormone gene under control of the herpesvirus TK promoter. The latter was used as a standard for evaluating the efficiency of transfection. Normalized luciferase activities of the P4 mutants are presented in Fig. 3 as percentages of the level achieved by the wild-type construct in the same cell line. Substitutions in either or both of the CRE elements suppressed P4 activity in both types of cells, suggesting that these motifs participate in promoter regulation. It is noteworthy that the inhibitory effect on P4 functioning of the substitutions in the CRE sites is stronger in *ras*-transformed than in normal cells. Since luciferase activities were at least 100-fold above the background, this cannot be a mere artifact due to the initially lower strength of the P4 promoter in FR3T3 cells. Furthermore, the neighboring E box located at nt 95 to 105 (21) contributes to a similar extent to P4 activity in FREJ4 and FR3T3 cells. Together, these observations point to specific elements, the CRE sequences, as *cis* mediators of promoter P4 stimulation in *ras*-transformed cells.

To test this view, we examined whether *ras* transformation is

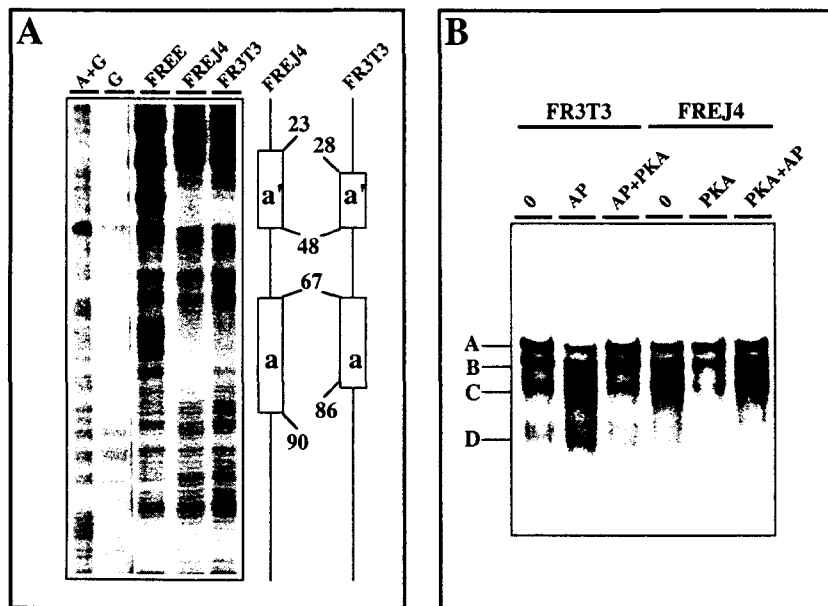


FIG. 4. Comparison of FREJ4 and FR3T3 cells for protein interactions with the CREs. (A) DNase I footprinting analysis of the upstream region of promoter P4. The fragment of MVMp duplex DNA carrying nt 1 to 260 was ³²P labeled at the 3' end of the positive strand and incubated or not with extracts from FREJ4 or FR3T3 cells. Unreacted (lane Free) and reacted (lanes FREJ4 and FR3T3) probes were partially digested with DNase I and loaded onto a sequencing gel. Maxam and Gilbert G and A+G ladders were used to locate the protected zones, which are indicated by boxes on the right. Nucleotide numbers are according to Astell et al. (3). (B) Gel retardation assay of oligonucleotide a probe incubated with extracts from normal (FR3T3) or transformed (FREJ4) cells. Binding reaction mixes were fractionated by native PAGE either directly (lanes 0) or after treatment with acid phosphatase (AP) and/or PKA. Retarded complexes A to D are marked.

associated with changes in the interactions of P4 CRE elements with cellular factors. Nuclear extracts from FR3T3 and FREJ4 cells were first compared for their ability to protect the P4 promoter region encompassing the CREa and CREa' repeats against DNase I digestion. As shown in Fig. 4A, both extracts protected two main segments, referred to as a and a' and corresponding to the *in vivo* photoprotected zone CREa and its mirror image CREa', respectively. However, the footprint sizes and digestion patterns obtained with the two cell types were found to differ. In particular, the FREJ4 a and a' footprints were symmetrically extended towards the 5' and 3' ends, respectively compared with the FR3T3 footprints. It therefore appeared that *ras* transformation might be associated with a change in the nature of the protein(s) interacting with the CREs of promoter P4. This was confirmed by comparing FREJ4 and FR3T3 extracts for their ability to alter the electrophoretic mobility of oligonucleotides a (Fig. 4B) and a' (data not shown). Although the mobility shifts induced by FR3T3 proteins were qualitatively indistinguishable from those described above for FREJ4 cells, *ras* transformation was found to correlate with a reproducible difference in the relative abundance of the retarded complexes: while complex C predominated over A and B in the presence of FREJ4 extracts, the contrary was true in the FR3T3 system.

CRE motifs of promoter P4 respond to PKA. It has previously been shown that Ras reduces the intranuclear level of cAMP-dependent protein kinase (PKA), a major regulator of ATF/CREB family transcription factors (18). Accordingly, *in vitro* treatment of FREJ4 nuclear extracts with the purified catalytic subunit of PKA prior to incubation with the radiolabeled probe was found to stimulate the formation of complexes A and B over that of C, reproducing the retardation pattern obtained with FR3T3 cell extracts (Fig. 4B). The effect was reversed by supplementing the *in vitro*-phosphorylated extracts with acid phosphatase. Conversely, *in vitro* treatment of

FR3T3 nuclear extracts with acid phosphatase increased the relative abundance of complex C up to the level seen with FREJ4 cell extracts, while subsequent incubation with PKA restored the initial retardation pattern. These results suggest that Ras favors C-type occupancy of the CRE motif by limiting PKA-induced phosphorylation of proteins belonging to this complex and/or by stimulating a PKA-sensitive process promoting its formation. This hypothesis was tested *in vivo* by treating FREJ4 cells with dibutyryl cAMP (dbcAMP), a membrane-soluble activator of PKA, prior to nuclear extract preparation. In agreement with the *in vitro* data, the cAMP analog reduced the proportion of C versus A and B complexes to the value observed with FR3T3 cell extracts (Fig. 5A). This change paralleled the capacity of dbcAMP to raise the intranuclear PKA activity of FREJ4 cells to the FR3T3 level, as determined by measuring the ability of the same nuclear extracts to phosphorylate *in vitro* a synthetic peptide (Kemptide) containing a consensus target sequence for the PKA catalytic subunit (Fig. 5A).

The increased P4 promoter activity in FREJ4 cells compared with FR3T3 cells and its greater dependence on CREs suggest that the Ras-associated shift in the occupancy of these motifs (favoring complex C over A and B) may enhance P4 strength. Since the formation of complex C is antagonized by addition (*in vitro*) or activation (*in vivo*) of PKA, we decided to test this hypothesis by determining (i) whether PKA modulators regulate P4 activity and (ii) whether this effect is mediated *in cis* by the CRE motifs. To this end, cells were stably transfected with the luciferase reporter gene under the control of either the wild-type P4 promoter or mutated derivatives carrying substitutions within the CRE sequences. In agreement with our working hypothesis, treatment of stable transfectants with the PKA activator dbcAMP was found to depress P4-driven gene expression (Fig. 5B and C). Mutations in either or both of the CREa and CREa' sites decreased P4 responsiveness to the

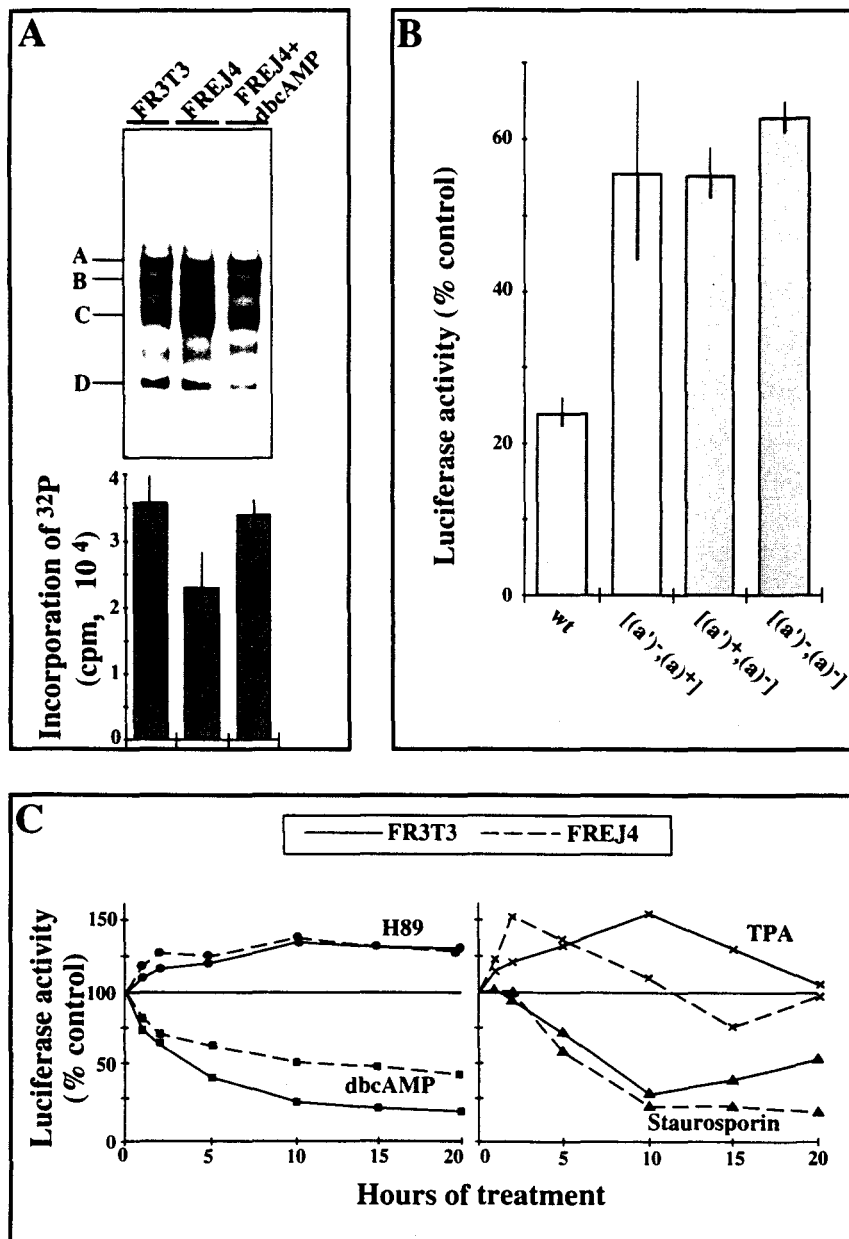


FIG. 5. Influence of modulators of PKA and PKC activities on protein-DNA interactions and functioning of promoter P4. (A) FREJ4 cultures were incubated for 24 h with dbcAMP and compared with untreated FREJ4 and FR3T3 cells for the ability of nuclear extracts to retard the migration of radiolabeled oligonucleotide a. PKA activities of the same extracts were measured by in vitro phosphorylation of a synthetic substrate in the presence of [γ -³²P] ATP and are expressed as incorporated radioactivities in the bottom histogram (average values from 10 experiments with standard deviation bars). (B) FR3T3 clones were selected for integration of the luciferase reporter gene driven either by the wild-type P4 promoter (wt) or by substitution mutants altered in the outer [(a')⁻, (a)⁺], inner [(a')⁺, (a)⁻], or both [(a')⁻, (a)⁻] CRE motifs. Luciferase activities were measured after a 12-h incubation in the presence of dbcAMP and are represented as percentages of the values obtained from the same clone in the absence of the drug. (C) Stably transformed clones of FR3T3 (----) and FREJ4 (—) cells expressing the luciferase gene under the control of the wild-type P4 promoter were treated with PKA (left-hand graph) or PKC (right-hand graph) inducers and inhibitors. Luciferase activities were measured at various incubation times and are expressed as percentages of the values obtained for the same but untreated clone. ●, H89 (5 μ M); ■, dbcAMP (1 mM); ×, tetradecanoyl phorbol acetate (100 ng/ml); ▲, staurosporin (1 μ M).

inhibitory effect of dbcAMP (Fig. 5B), suggesting that these elements cooperate in PKA-sensitive activation of the promoter. It should be mentioned that the double CRE mutant of P4 still exhibited residual suppression in the presence of the cAMP analog. This might be due to additional responsive elements in the promoter or to the indirect effects of the treatment. Furthermore, P4 activity was reduced by forskolin, another PKA activator (data not shown), and stimulated by H-89, a specific PKA inhibitor (Fig. 5C). Interestingly, the

inhibitory effect of dbcAMP on P4-driven gene expression was less pronounced in FREJ4 than in FR3T3 cells, suggesting that the lower nuclear PKA activity of the *ras* transformant is not due to a limitation of the cAMP supply. As reported for other systems (18), Ras is more likely to inhibit the nuclear translocation of the PKA catalytic subunit due to the activation of PKC. Accordingly, we observed a reduction of P4 activity after treatment with the specific PKC inhibitors staurosporin (Fig. 5C) and H-7 (data not shown) and stimulation of this activity

by tetradecanoyl phorbol acetate (TPA), a PKC activator (Fig. 5C). The TPA effect, one should note, was transient and faded earlier in FREJ4 than FR3T3 cells, a finding attributable to the known feedback regulation of the enzyme and to PKC activation in *ras*-transformed cells.

It should also be stated that the effects of PKA and the various PK modulators, reported above for the FREJ4 line, could be fully reproduced with an uncloned population of *ras*-transformed cells (data not shown). This multiclonal culture was selected for neomycin resistance after transfection of FR3T3 cells with pSV2neoEJ and exhibited both phenotypic transformation and EJ *ras* expression. Therefore, the distinct responses of the P4 CRE motifs, as seen in FREJ4 cells, do not appear to be specific for this clone but are rather general features of *ras*-transformed FR3T3 cells.

DISCUSSION

Interaction of members of the ATF/CREB family of transcription factors with parvoviral CREs. Ahn et al. (1) have previously reported that the activity of promoter P4 depends to a large extent on proximal GC and TATA boxes but is also modulated by upstream regulatory sequences. A recent report by Gu and collaborators (21) demonstrates the importance of the upstream Y box for the full activity of P4. In the present work, two CRE motifs, CREa and CREa', were identified in the upstream region of P4. CREa and CREa' are located within a terminal palindromic sequence and, but for a minor difference corresponding to mismatches in this structure, are inverted complementary copies of each other.

CREa and CREa' could not be distinguished from consensus CREs in competitive mobility shift assays, suggesting that they may recognize similar proteins, with a stoichiometry of one polypeptide dimer per motif. Indeed, protein binding to CREa or CREa' could be impaired by mutating these sequences at sites shown to be essential to consensus CRE recognition, as shown by gel retardation assays. Furthermore, preliminary experiments with *in vitro*-translated factors (11) or specific antibodies (33b) support the involvement of members of the ATF/CREB family—in particular, ATF1, ATF2, and CREB1—in complex formation with the CRE motif of promoter P4. The CREa and CREa' motifs took part in three specific protein complexes distinguishable by their electrophoretic mobility and their polypeptide constituents. Yet the great diversity, modifications, and cross-reactivity of the proteins binding to CREs have precluded us so far from establishing the definite identity of these constituents.

Contribution of CREs to activation of promoter P4 in *ras*-transformed cells. The activity of the parvoviral P4 promoter is stimulated upon *ras* transformation of the host cell (39). P4 directs the expression of the parvoviral transcription unit encoding the cytotoxic NS proteins (7). Since transformation of many cells exacerbates the parvoviral cytopathic effect (36), knowledge of P4 regulation is interesting not only as regards *ras* transformation but also as a potential clue to one of the mechanisms by which parvoviruses distinguish transformed from normal cells. Various factors seem to mediate the effect of Ras on transcription in different systems (17, 35). Among the possible candidates, CRE-recognizing proteins were found to participate in the Ras-induced activation of some promoters. For instance, dedifferentiation of thyroid cells in the presence of Ras is associated with a reduced affinity of nuclear proteins for CRE motifs, and the stimulatory effect of Ras on the β -polymerase promoter or on the long terminal repeat of intracisternal A particles requires an intact CRE (17, 18, 25).

However, the factors that mediate this regulation in *trans* have not yet been characterized.

The data presented in this report suggest that the parvoviral CRE sites are involved in the activity of promoter P4. Substitution of an unrelated sequence for either of these sites significantly reduced P4-driven gene expression in both normal FR3T3 and *ras*-transformed FREJ4 cells. It is worth noting that specific CRE recognition is also required for the activation of the MVMp left-hand origin of replication by the parvovirus NS-1 product (11). The present results indicate that the CRE motifs contribute to P4 activity in the absence of NS-1 and are associated with proteins irrespective of whether cells are infected (*in vivo* footprints) or not (*in vitro* footprints). Nevertheless, the putative cross-talk of CRE-binding and NS-1 factors, as inferred from above-mentioned replication initiation data, deserves to be considered within the context of the previously reported modulation of promoter P4 by NS-1 (13, 23).

Variations inherent in the functional assays (efficiency of transfection, modulation of the TK promoter used as a standard, stability of the reporter gene products) preclude any direct comparison of P4 activities between transformed and parental cell lines, yet the effect of the CREa and CREa' mutations was up to 2.5 times more severe in the Ras transformant, suggesting that the CRE motifs contribute to stimulating P4 in this cell line. Ras-responsive elements are often reported to be bipartite, consisting of an AP-1 or CRE motif and a nearby Ets-binding site (35). It is worth noting in this respect that evidence of the involvement of Ets in P4 promoter regulation has recently been obtained (16a). Furthermore, the CRE motif of P4 is present in two copies, which both appear to contribute to the Ras responsiveness and dbcAMP sensitivity of the parvoviral promoter.

That the CRE sequences contribute to the responsiveness of promoter P4 to Ras in our model system is supported by the fact that *ras* transformation was accompanied by an increased propensity of these sequences to associate *in vitro* with proteins in the form of complex C rather than A or B. Treatment of FREJ4 cultures with dbcAMP, furthermore, both reversed this effect and caused CRE-dependent inhibition of P4 promoter activity. Together, these observations raise the intriguing possibility that the shift of the CRE motif occupancy towards complex C may be relevant to P4 activation in FREJ4 cells.

PKA sensitivity of P4 promoter activation mediated by CREs. By means of PKA catalytic subunits (*in vitro*) or PKA activators (*in vivo*), we were able to reverse two effects of *ras* transformation on promoter P4: the proportion of DNA-protein complexes A and B versus C was increased, and the promoter strength was reduced. Both of these changes were mediated by the CRE motifs. A straightforward interpretation of these observations would be that PKA modifies a factor(s) interacting with P4 CRE elements and is inhibited by Ras. This scenario is supported by the ability of PKA to phosphorylate CREB (32) and by the reduction of PKA activity in the presence of Ras (18). Yet the known cross-talk of PKA with other Ras signalling pathways converging on transcription factors (6) raises the possibility that other effectors besides PKA may control the Ras-induced change in protein association with the CREa/a' motifs. The significant yet moderate decrease in PKA activity detected in FREJ4 versus FR3T3 cells may thus not be the only clue to the preferential formation of complex C in the *ras* transformant. P4 activity was reduced in normal FR3T3 cells by site-directed mutagenesis of the CRE motifs, arguing for the occupancy of these sites by an activating complex. This is consistent with the fact that FR3T3 cell extracts fulfilled high PKA conditions, and PKA was reported to activate the tran-

scriptional function of CREB (18). It should be stated, however, that normal cell extracts gave rise to two major complexes (A and B) with P4 CRE sequences. Therefore, the overall positive transcriptional effect mediated by CREa/a' does not rule out that a repressor (such as CREM [16]) takes part in one of the complexes. By favoring the formation of complex C over A and B, Ras may thus stimulate promoter P4 as a result of the substitution of an activating factor for a less efficient or even inhibitory one.

The reduced nuclear PKA activity in FREJ4 cells may be due to stimulation of PKC. Previous reports indicate that PKC is both activated by Ras transformation (29) and responsible for the inhibition of the nuclear translocation of PKA catalytic subunits (18). Furthermore, the inhibitory effect of the cAMP analog dbcAMP on the P4 promoter was stronger in FR3T3 than FREJ4 cells, suggesting that downregulation of PKA in the transformed line is not due to limitation of cAMP. Thus, PKC is a likely intermediate between Ras and PKA on the pathway leading to P4 promoter modulation. In keeping with this view is the ability of activators or inhibitors of PKC to stimulate or repress P4-driven gene expression, respectively. Furthermore, the level of diacylglycerol, a potent activator of PKC, is about two times higher in *ras*-transformed than in parental cells (33a).

In conclusion, we have revealed duplicated CRE DNA motifs that contribute to the basal activity of promoter P4 and to its stimulation in *ras*-transformed cells. These elements are recognized by proteins which belong to the ATF/CREB family of transcription factors and which bind to the CREs in the form of distinct complexes. The relative abundance of these complexes appears to be controlled by protein kinases, in particular PKA, and varies concomitantly with the activation of the promoter in *ras*-transformed cells. Since cells transformed by a variety of agents are sensitized to parvoviral infection (36), it would be interesting to determine whether the regulatory pathway identified in this work is Ras specific or whether it can be triggered by other oncoproteins.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to H. Hurst (ICRF, London) for fruitful discussions.

This work was supported by grants from the Association pour la Recherche contre le Cancer and the Commission of the European Communities. L.D. is a fellow of the Ministère de l'Education Nationale.

REFERENCES

- Ahn, J. K., B. J. Gavin, G. Kumar, and D. C. Ward. 1989. Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants. *J. Virol.* **63**:5425-5439.
- Astell, C. R., and M. C. Blundell. 1989. Sequence of the right-hand terminal palindrome of the human B19 parvovirus genome has the potential to form a "stem plus arms" structure. *Nucleic Acids Res.* **17**:3034-3039.
- Astell, C. R., M. Thomson, M. Merchlinsky, and D. C. Ward. 1983. The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* **11**:999-1018.
- Bodnar, J. W. 1989. Sequence organization in regulatory regions of DNA of minute virus of mice. *Virus Genes* **2**:167-182.
- Boshart, M., M. Klüppel, A. Schmidt, G. Schütz, and B. Luckow. 1992. Reporter constructs with low background activity utilizing the *cat* gene. *Gene* **110**:129-130.
- Burgering, B. M. T., and J. L. Bos. 1995. Regulation of Ras-mediated signalling: more than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* **20**:18-22.
- Caillet, F. P., M. Perros, A. Brandenburger, P. Spegelaere, and J. Rommelaere. 1990. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J.* **9**:2989-2995.
- Cornelis, J. J., Y. Q. Chen, N. Spruyt, N. Duponchel, S. F. Cotmore, P. Tattersall, and J. Rommelaere. 1990. Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription. *J. Virol.* **64**:2537-2544.
- Cotmore, S. F. 1990. Gene expression in the autonomous parvoviruses. p. 141-154. *In* P. Tijssen (ed.), *Handbook of parvoviruses*, vol. I. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Cotmore, S. F., J. P. F. Nuesch, and P. Tattersall. 1993. Asymmetric resolution of a parvovirus palindrome in vitro. *J. Virol.* **67**:1579-1589.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1994. An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J.* **13**:4145-4152.
- Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, and R. G. Roeder. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**:1475-1489.
- Doerig, C., B. Hirt, J.-P. Antonietti, and P. Beard. 1990. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J. Virol.* **64**:387-396.
- Egan, S. E., and R. A. Weinberg. 1993. The pathway to signal achievement. *Nature (London)* **365**:781-783.
- Faisst, S., M. Perros, L. Deleu, N. Spruyt, and J. Rommelaere. 1994. Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice. *Virology* **202**:466-470.
- Foulkes, N. S., E. Borrelli, and P. Sassone-Corsi. 1991. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* **64**:739-749.
- Fuks, F., S. Faisst, and J. Rommelaere. Unpublished data.
- Galien, R., G. Mercier, M. Garcette, and R. Emanoil-Ravier. 1991. RAS oncogene activates the intracisternal A particle long terminal repeat promoter through a c-AMP response element. *Oncogene* **6**:849-855.
- Gallo, A., E. Benusiglio, I. M. Bonapace, A. Feliciello, S. Cassano, C. Garbi, A. M. Musti, M. E. Gottesman, and E. V. Avvedimento. 1992. v-ras and protein kinase C dedifferentiate thyroid cells by down-regulating nuclear cAMP-dependent protein kinase A. *Genes Dev.* **6**:1621-1630.
- Gavin, B. J., and D. C. Ward. 1990. Positive and negative regulation of the minute virus of mice P38 promoter. *J. Virol.* **64**:2057-2063.
- Gouilleux, F., B. Sola, B. Couette, and H. Richard-Foy. 1991. Cooperation between structural elements in hormone-regulated transcription from the mouse mammary tumor virus promoter. *Nucleic Acids Res.* **19**:1563-1569.
- Gu, Z., S. Plaza, M. Perros, C. Cziepluch, J. Rommelaere, and J. J. Cornelis. 1994. NF- κ B controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interaction with an unusual binding site. *J. Virol.* **69**:239-246.
- Habener, J. F. 1990. Cyclic AMP response element binding proteins: a cornucopia of transcription factors. *Mol. Endocrinol.* **8**:1087-1094.
- Hanson, N. D., and S. L. Rhode III. 1991. Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J. Virol.* **65**:4325-4333.
- Karin, M., and T. Smeal. 1992. Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem. Sci.* **17**:418-422.
- Kedar, P. S., D. R. Lowy, S. G. Widen, and S. H. Wilson. 1990. Transfected human β -polymerase promoter contains a *ras*-responsive element. *Mol. Cell. Biol.* **10**:3852-3856.
- Kedar, P. S., S. G. Widen, E. W. Englander, A. J. J. Fornace, and S. H. Wilson. 1991. The ATF/CREB transcription factor-binding site in the polymerase β promoter mediates the positive effect of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine on transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3729-3733.
- Lacal, J. C., T. P. Fleming, B. S. Warren, P. M. Blumberg, and S. A. Aaronson. 1987. Involvement of functional protein kinase C in the mitogenic response to the H-*ras* oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **7**:4146-4149.
- Langer, S. J., D. M. Bortner, M. F. Roussel, C. J. Sherr, and M. C. Ostrowski. 1992. Mitogenic signaling by colony-stimulating factor 1 and *ras* is suppressed by the *ets*-2 DNA-binding domain and restored by *myc* overexpression. *Mol. Cell. Biol.* **12**:5355-5362.
- Lowy, D. R., and B. M. Willumsen. 1993. Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:851-891.
- Marshall, C. J. 1991. How does p21^{ras} transform cells? *Trends Genet.* **7**:91-95.
- Merchinsky, M. J., P. J. Tattersall, J. J. Leary, S. F. Cotmore, E. M. Gardiner, and D. C. Ward. 1983. Construction of an infectious molecular clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **47**:227-232.
- Nichols, M., F. Weih, W. Schmid, C. DeVack, E. Kowenz-Leutz, B. Luckow, M. Boshart, and G. Schütz. 1992. Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *EMBO J.* **11**:3337-3346.
- Owen, R. D., and M. C. Ostrowski. 1990. Transcriptional activation of a conserved element by *ras* requires a nuclear factor distinct from c-fos or c-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:3866-3870.
- Perros, M., Z. Kherrouche, and J. Rommelaere. Unpublished data.
- Perros, M., and J. Rommelaere. Unpublished data.
- Pitluk, Z. W., and D. C. Ward. 1991. Unusual Sp1-GC box interaction in a parvovirus promoter. *J. Virol.* **65**:6661-6670.
- Reddy, M. A., S. J. Langer, M. S. Colman, and M. C. Ostrowski. 1992. An enhancer element responsive to *ras* and *fms* signaling pathways is composed of two distinct nuclear factor binding sites. *Mol. Endocrinol.* **6**:1051-1060.
- Rommelaere, J., and P. Tattersall. 1990. Oncosuppression by parvoviruses.

- p. 41-57. In P. Tijssen (ed.), Handbook of parvoviruses, vol. II. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
37. Salome, N., B. van Hille, N. Duponchel, G. Meneguzzi, F. Cuzin, J. Rommelaere, and J. J. Cornelis. 1990. Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes. *Oncogene* 5:123-130.
38. Southern, P. J., and P. Berg. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341.
39. Spegelaere, P., B. van Hille, N. Spruyt, S. Faisst, J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1991. Initiation of transcription from minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing the c-Ha-ras oncogene. *J. Virol.* 65:4919-4928.
40. Tattersall, P., and E. M. Gardiner. 1990. Autonomous parvovirus-host-cell interactions. p. 111-121. In P. Tijssen (ed.), Handbook of parvoviruses, vol. I. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
41. Vanacker, J.-M., V. Laudet, G. Adelmant, D. Stéhelin, and J. Rommelaere. 1993. Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *J. Virol.* 67:7668-7672.
42. Van Hille, B., N. Duponchel, N. Salome, N. Spruyt, S. F. Cotmore, P. Tattersall, J. J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1989. Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras-transformed rat cells to minute virus of mice. *Virology* 171:89-97.
43. Weih, F., F. Stewart, M. Boshart, D. Nitsch, and G. Schütz. 1990. *In vivo* monitoring of a cAMP-stimulated DNA-binding activity. *Genes Dev.* 4:1437-1449.
44. Yamamoto, K. K., G. A. Gonzalez, W. H. I. Biggs, and M. R. Montminy. 1988. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature (London)* 334:494-498.

2.2.3 Discussion

Les éléments CRE du promoteur P4 participent à sa réponse à la transformation des cellules par l'oncogène *ras*. Cette effet dépend de la modification de l'état de phosphorylation de protéines se liant de façon directe ou indirecte avec les éléments CRE. Des protéines de la famille des facteurs de transcription ATF/CREB, phosphorylées de façon différente entre les cellules normales et transformées, pourraient expliquer l'hyper-activation du promoteur P4 dans les cellules transformées. Toutefois, il reste à démontrer que la modulation de P4 est le résultat direct de changements observés par EMSA dans les complexes CRE-protéines ATF/CREB, plutôt que dans d'autres complexes impliquant les motifs CRE et non révélés par la méthode utilisée. Si cette publication permet une meilleure connaissance de la fonction des différents motifs d'ADN décrits dans le premier article, elle pose également de nombreuses questions quant à la régulation de l'activité de promoteurs en réponse à la transformation cellulaire par l'oncogène *ras*.

2.2.3.1 Nature des protéines activant le promoteur P4 dans les cellules transformées par Ras

Les sites CRE peuvent fixer trois complexes protéiques distincts. Nous avons poursuivi l'analyse biochimique de ces protéines afin de déterminer si le complexe A contient des facteurs ATF/CREB dont l'activation transcriptionnelle est moins efficace comparée à celle de ceux présents dans le complexe C. Des anticorps dirigés contre différents membres de la famille ATF/CREB ont été ajoutés aux extraits protéiques préalablement aux expériences EMSA. Ils ont permis de montrer que le complexe A est un homodimère de la protéine CREB-1, et que B est un hétérodimère entre ATF-1 et CREB-1. A ce jour la nature précise du complexe C est toujours inconnue; nous avons pu montrer qu'il contient au moins le facteur ATF-1, mais il n'est pas exclu qu'un autre membre de la famille ATF/CREB participe à ce complexe. La séparation des protéines formant le complexe C, par électrophorèse sur gel SDS-PAGE, montre qu'il contient une protéine de taille équivalente à ATF-1 (36 kDa), également observée dans le complexe B, ainsi qu'une protéine de plus haut poids moléculaire (entre 68 et 72 kDa). Ce poids moléculaire est similaire à celui de ATF-2; toutefois des dimères entre les facteurs ATF-1 et ATF-2 n'ont jamais été décrits. Cette seconde protéine doit donc encore être caractérisée.

2.2.3.II Une action coopérative des éléments CRE?

Du fait de la séquence palindrome de la partie distale promoteur P4, il existe deux copies de l'élément CRE. Le promoteur P4 a été muté au sein de chacun de ces éléments, séparément (a^-a^+ ou a^+a^-) ou simultanément (a^-a^-). Quel que soit le mutant utilisé, on observe une réduction équivalente de l'activité du promoteur P4. Ceci suggère que la présence d'un élément CRE seul ne suffit pas à la sur-activation du promoteur P4 dans les cellules FREJ4. De ce fait on peut supposer que les résultats d'interactions protéines-DNA obtenus avec les sondes CRE n'expliquent pas à eux seuls les différences d'activité observées entre cellules normales et transformées. Il doit exister une coopération entre les deux sites CRE, faisant peut-être intervenir les protéines des complexes A ou C. Ce niveau de régulation n'est pas révélé par nos études biochimiques.

2.2.3.III Quel est l'effet du dbAMPC sur les cellules normales?

La différence de distribution observée entre les bandes A, B et C suivant que les extraits sont préparés à partir de cellules FR3T3 ou FREJ4, disparaît après traitement des cellules FREJ4 par le dbAMPC. Par contre l'activation de la PKA dans les cellules FR3T3 n'a aucun effet sur la distribution des complexes. Toutefois l'ajout du dbAMPC, dans le milieu de culture, réduit l'activité du promoteur P4 aussi bien dans les cellules FREJ4 que dans les cellules FR3T3. L'effet de l'analogue de l'AMPC est même plus prononcé sur les cellules FR3T3 que sur les cellules FREJ4. Il est essentiellement dépendant de l'intégrité des éléments CRE puisque dans les cellules FR3T3 le double mutant est inhibé d'un facteur 1.6, contre un facteur 5 pour le promoteur sauvage. Le rôle d'autres motifs n'est pas surprenant étant donné le large spectre d'action du dbAMPC. Comment peut-on expliquer cette inhibition dans les cellules FR3T3 alors qu'aucune modification des facteurs ATF/CREB n'est observée par les expériences d'EMSA?

Dans ce contexte, il convient de souligner que la répression du promoteur P4 induite par les activateurs de la PKA via les éléments CRE est surprenante par sa cinétique. En effet, l'action de la PKA sur les protéines ATF/CREB est très rapide, alors que l'inhibition maximale du promoteur P4 n'est observée que 10 heures après le début du traitement. Ceci est très différent de la régulation transcriptionnelle par la PKA habituellement décrite (Montminy, 1997). Il est généralement admis que l'effet de la PKA sur la transcription via les éléments CRE se déroule en trois phases: tout d'abord une période de forte activation, dans les 20

premières minutes; puis 4 à 6h après le début du traitement, une phase d'atténuation qui correspond à la déphosphorylation des facteurs ATF/CREB par des phosphatases activées par la PKA; enfin si les cellules sont maintenues en présence d'AMPc, une période réfractaire empêchant toute nouvelle activation des protéines ATF/CREB par la PKA. De ce fait même si l'activité réduite de la PKA dans les cellules FREJ4 s'accompagne d'une activité accrue du promoteur P4 les cellules transformées, nous ne pouvons pas exclure que l'AMPc a une action supplémentaire sur l'activité du promoteur P4, faisant intervenir les sites CRE en dimères. Ainsi des cofacteurs se liant aux membres de la famille ATF/CREB pourraient être eux mêmes cibles de l'action du dbAMPc.

2.2.3.IV L'activation du promoteur P4 via des éléments CRE en réponse à la transformation par *ras* est-elle un cas particulier?

Nous avons clairement identifié les éléments CRE comme responsables, du moins en partie, de l'hyper-activité du promoteur P4 dans les cellules transformées par rapport aux cellules normales. Ces résultats sont originaux puisqu'ils montrent que l'oncogène *ras* peut activer un promoteur via des éléments CRE, c'est à dire par l'intermédiaire de membres de la famille ATF/CREB et sans l'intervention de facteurs de transcription de type Jun ou Fos. Depuis il a été montré que la protéine kinase Rsk2 phosphoryle CREB, est activée par Ras et stimule la transcription de gène par l'intermédiaire de motifs CRE. La PKA peut bloquer l'activation de la voie Raf-1 par Ras et ainsi l'activation de Rsk2 (Kolch *et al.*, 1996, Mischak *et al.*, 1996). Certes l'intensité du complexe A varie faiblement entre les cellules FR3T3 et FREJ4; il est cependant vraisemblable que la phosphorylation de CREB n'augmente pas son affinité pour l'ADN mais active ses fonctions de facteur de transcription. Il serait ainsi intéressant de tester la corrélation éventuelle entre l'activation de P4 par Ras et le niveau de phosphorylation de CREB dans les cellules normales et transformées. Si cette interprétation était correcte, les résultats obtenus en activant la PKA dans les cellules FREJ4 pourraient s'expliquer par l'inhibition de Rsk2, agissant sur la fonction activatrice de CREB.

2.3 Le site proximal de fixation pour des protéines de la famille Ets (EBS) contribue à l'activation du promoteur P4 dans les cellules transformées par l'oncogène ras.

2.3.1 Résumé

Nous avons poursuivi l'étude systématique des sites impliqués dans l'activation du promoteur P4 en réponse à la transformation cellulaire par l'oncogène *ras*. Cette troisième publication concerne la région proximale du promoteur P4, c'est à dire la boîte GC et une séquence adjacente, consensus pour la fixation de facteurs de transcription de la famille Ets.

L'importance de la boîte GC dans la régulation de l'activité du promoteur P4 a déjà été montrée par d'autres laboratoires, notamment celui de David Ward, et nous avons confirmé ces résultats à l'aide du système cellulaire FREJ4. Nous avons caractérisé la nature des facteurs de transcription se fixant sur la boîte GC du promoteur P4. Par des expériences d'EMSA et de reconstitution de complexes protéines-ADN *in vitro*, et par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les facteurs de transcription de la famille Sp1, nous avons montré que la boîte GC du promoteur P4 peut s'associer à la protéine Sp1 et aux trois isoformes de Sp3. Les protéines Sp1 et Sp3 sont des protéines à doigts de zinc, interagissant avec l'ADN sous forme de monomères. L'activation du promoteur P4 par Sp1 a pu être confirmée en utilisant des cellules d'insectes. Celles-ci sont notamment dépourvues des facteurs de transcription Sp1 et Ets. Dans ces cellules, la cotransfection du plasmide P4-Luc, permettant de mesurer l'activité du promoteur P4, et d'un vecteur d'expression de la protéine Sp1, conduit à l'activation du promoteur sauvage et non d'un mutant qui en dérive et dont la boîte GC a été altérée. L'expression de la protéine Sp3 dans les cellules d'insectes n'a aucun effet sur l'activité du promoteur P4. Ceci est toutefois en accord avec d'autres études montrant que la protéine Sp3 est dépourvue d'activité transcriptionnelle dans les cellules d'insectes. Nous n'avons donc pas pu déterminer l'effet de la fixation du facteur Sp3 sur l'activité du promoteur P4.

Par des essais fonctionnels, nous avons pu montrer que le site putatif de fixation de facteurs de transcription de type Ets, est nécessaire à l'activité maximale du promoteur P4 dans les cellules FREJ4. Des expériences d'EMSA ont été réalisées au moyen d'un oligonucléotide marqué au ³²P, dont la séquence couvre à la fois les sites GC et EBS, et indiquent que la fixation des protéines Sp favorise celle de protéines de la famille Ets au niveau de la séquence

EBS. En absence de facteurs Sp1, la fixation de Ets sur le site EBS se produit avec une très faible affinité. Cette fixation coopérative se reflète dans l'activation de type synergique du promoteur P4 par les facteurs Sp1 et Ets dans des cellules d'insectes. En effet l'activation du promoteur P4 par suite de la co-expression des facteurs Ets et Sp1 est supérieure à la somme des activations obtenues lorsque ces protéines sont exprimées indépendamment.

Enfin, comme dans le cas des éléments CRE, l'introduction de mutations dans le site EBS entraîne une diminution de l'activité du promoteur P4 de façon plus prononcée dans les cellules FREJ4 que dans les cellules FR3T3. Les cellules normales FR3T3 ont été cotransfectées par un vecteur d'expression de l'oncogène *ras* et le plasmide P4-Luc. Le sérum pouvant activer les protéines de type Ets de façon identique à Ras, ces expériences ont été réalisées en absence de sérum. L'expression de l'oncogène *ras* active le promoteur P4, et la mutation du site EBS réduit de moitié cette activation. Le motif EBS est donc en partie responsable de l'hyper-activation du promoteur P4 dans les cellules transformées par *ras*.

ras Oncogene-Dependent Activation of the P4 Promoter of Minute Virus of Mice through a Proximal P4 Element Interacting with the Ets Family of Transcription Factors

FRANÇOIS FUKS, LAURENT DELEU, CHRISTIANE DINSART,
 JEAN ROMMELAERE,* AND STEFFEN FAISST

Applied Tumor Virology Unit, Abteilung 0610 and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 375, Deutsches Krebsforschungszentrum, 69009 Heidelberg, Germany

Received 24 July 1995/Accepted 20 November 1995

The P4 promoter of parvovirus minute virus of mice (MVMp) directs transcription of the genes coding for nonstructural proteins. The activity of promoter P4 is regulated by several *cis*-acting DNA elements. Among these, a promoter-proximal GC box was shown to be essential for P4 activity (J. K. Ahn, B. J. Gavin, G. Kumar, and D. C. Ward, *J. Virol.* 63:5425-5439, 1989). In this study, a motif homologous to an Ets transcription factor-binding site (EBS), located immediately upstream from the GC box, was found to be required for the full activity of promoter P4 in the *ras*-transformed rat fibroblast cell line FREJ4. In normal parental FR3T3 cells, the transcriptional function of P4 EBS was insignificant but could be restored by transient cell transfection with the c-Ha-*ras* oncogene. P4 EBS may thus contribute to the stimulation of promoter P4 in *ras*-transformed cells. Electrophoretic mobility shift assays using crude extracts from FREJ4 cells revealed the binding of a member(s) of the Ets family of transcription factors to the P4 EBS, as well as the interaction of two members of the Sp1 family, Sp1 and Sp3, with the adjacent GC box. When produced in *Drosophila melanogaster* SL2 cells, Ets-1 and Sp1 proteins acted synergistically to transactivate promoter P4 through their respective cognate sites.

Autonomous parvoviruses are small, nuclear replicating DNA viruses which infect a variety of vertebrates, including humans. Because of their low genetic complexity, parvoviruses depend extensively on host cell factors for all steps of their life cycles (for a review, see reference 15). The availability of these factors depends largely on the proliferative activity and the differentiation state of the host cell. These requirements are likely to account for the specificity of parvovirus infections, both *in vivo* and in cell cultures (2, 25, 55). The genome of the prototype strain of minute virus of mice (MVMp), an autonomous parvovirus that can productively infect cells of rodent and primate origin, consists of a linear, single-stranded DNA of 5,149 nucleotides (nt) containing two overlapping transcription units. The left-hand promoter, P4, directs the synthesis of a transcript whose spliced derivatives encode the nonstructural proteins NS-1 and NS-2. The internal promoter, P38, regulates the production of the viral capsid proteins VP1 and VP2 encoded by alternatively spliced mRNAs (14, 15, 38, 48).

The above-mentioned dependence of the outcome of parvovirus infections on the physiological state of host cells is exemplified by the oncotropism of these agents and may underlie their ability to prevent the appearance or cause the regression of a variety of tumors (for a review, see reference 50). In addition, oncogenic transformation of a number of host cells (fibroblasts and epithelial cells of human or rodent origin) is accompanied by an increase in their sensitivity to the killing effect of MVMp (12, 51, 57), raising the possibility that the antitumor activity of this agent *in vivo* (28) involves an oncolytic component. In this respect, it is worth mentioning that NS-1 not only is involved in parvovirus DNA replication and gene expression (16, 20, 23, 52, 56) but also has been shown to

be cytotoxic (9, 10, 39). It was suggested that parvoviral oncolysis may result, at least in part, from the greater accumulation of NS-1 in transformed than in normal cells (51, 57). Previous reports have shown that this increase in NS-1 production is controlled, in particular, at the level of initiation of transcription. Indeed, the activity of promoter P4 was found to be up-modulated in the c-Ha-*ras*-transformed rat fibroblast line FREJ4 (54). Hence, the regulation of this promoter constitutes a key issue for the understanding of parvovirus-host cell interactions and may provide insights into the mechanism(s) by which neoplastic transformation exacerbates the parvoviral lytic effect.

The regulation of transcription initiation in eukaryotic cells is governed by a combination of proteins that bind to *cis*-acting DNA elements. At least a fraction of these elements is typically found within a 50- to 200-nt-long region located upstream from the transcription start site (43), as was shown for the P4 promoter (1, 22). Various regulatory motifs, in particular proximal GC and TATA boxes (1, 49), upstream E and Y boxes (27), and cyclic AMP (cAMP) response elements (47), have been reported to contribute to P4 promoter activity. The present study aimed at analyzing another putative P4 promoter element that is located immediately upstream from the GC box and consists of the sequence 5'-AAGGAAG-3'. This element is highly homologous to the core consensus motif (C/A)GG A(A/T) that constitutes an Ets transcription factor-binding site (EBS). The generic name Ets designates a large family of regulatory proteins, of which about 30 members have been identified. This family is characterized by the conservation of a specific DNA-binding domain that comprises 85 amino acids and is made of the juxtaposition of two regions with α -helix and basic properties, respectively (59). Although the DNA sequences flanking the core EBS consensus exert an influence on the type of Ets factor that is able to interact, target selectivity of the various Ets members does not appear to be determined in a simple way by their DNA recognition capacity (44,

* Corresponding author. Mailing address: Applied Tumor Virology, Abt. 0610 and INSERM U 375, Deutsches Krebsforschungszentrum, Postfach 101949, 69009 Heidelberg, Germany. Phone: (49) 6221 42 4960. Fax: (49) 6221 42 4962.

58). There is growing evidence that another level of binding selectivity is achieved by protein-protein interactions between Ets and adjacently bound transcription factors (for a review, see reference 34). It is also worth noting that EBS motifs were shown to mediate promoter activation by several nonnuclear oncoproteins, including c-Ha-Ras, v-Src, and v-Mos, that have been shown to enhance Ets DNA-binding activities (11, 45, 60).

Results presented in this report indicate that the above-mentioned EBS motif of MVMp contributes to the activation of promoter P4 in *ras*-transformed FREJ4 rat cells. The functionality of this sequence correlates with its ability to interact with proteins of the Ets family of transcription factors. In cotransfection experiments using *Drosophila melanogaster* SL2 cells, promoter P4 was found to be transactivated in a synergistic way by the prototype member of this family, Ets-1, and the Sp1 factor that binds to a GC box flanking the EBS motif. EBS appears to play little role in P4 activity in normal rat fibroblasts unless cells are transfected with the *ras* oncogene, implicating Ets proteins as effectors of the modulation of promoter P4 by some oncoproteins.

MATERIALS AND METHODS

Cells and recombinant plasmids. Parental Fisher rat fibroblasts (cell line FR3T3) and the c-Ha-*ras*-transformed derivative cell line FREJ4 (51, 57) were grown in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% donor calf serum and 1% sodium pyruvate at 37°C. Mouse A9 cells were grown in Eagle's minimum essential medium supplemented with 5% fetal calf serum and 1% sodium pyruvate at 37°C. *D. melanogaster* SL2 cells (53) were a gift from R. Paro and maintained in Schneider medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1% glutamine at 25°C.

Plasmid P4wtLuc, which contains the firefly luciferase gene under control of the P4 promoter of MVMp, was constructed as previously described (22). The *Bgl*II recognition motif (AGATCT) was then substituted by site-directed mutagenesis for a sequence of equivalent length within either the EBS (nt 153 to 158; P4mut23Luc), the GC box (nt 159 to 164; P4mut24Luc), a motif interacting with an as yet unidentified factor(s) (nt 114 to 119; P4mut17Luc) (22), or a P4 region that does not appear to be involved in specific protein interactions (nt 126 to 131; P4mut19Luc) (22). Another derivative of P4wtLuc, P4mEBSLuc, was constructed by site-directed mutagenesis, introducing a G-to-T substitution at nt 154 in the EBS. Recombinant constructs were verified by DNA sequence analysis using the dideoxy-chain termination method.

The *D. melanogaster* expression plasmids, under the control of the *Drosophila* actin 5C promoter, were generous gifts of R. Tjian (pPac-Sp1) (17), G. Suske (pPac-Sp3) (31), and J. Ghysdael (pPac-Ets-1) (26). The control plasmid pBLCAT5, expressing the chloramphenicol acetyltransferase gene under control of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter, was kindly provided by G. Schütz (8).

Transfection and transient expression assays. Transfection of 10⁵ (FR3T3, FREJ4, and A9) or 10⁶ (SL2) cells was performed with the LipofectAMINE reagent (Gibco BRL) as recommended by the manufacturer. Each set of transfections was performed in triplicate and repeated at least four times with different plasmid preparations.

FREJ4 and A9 cells were cotransfected with 0.1 µg of reporter plasmid (P4wtLuc or mutated derivatives) and 0.1 µg of a standard plasmid expressing human growth hormone under the control of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter (pTKhGH; Nichols Institute). At 36 h posttransfection, luciferase activities were measured as described previously (18) and normalized for human growth hormone expression as determined by means of a growth hormone detection kit (Nichols Institute). FR3T3 cells were cotransfected with 0.5 µg of reporter plasmid (P4wtLuc or mutated derivatives), various amounts of a c-Ha-*ras* expression plasmid (pSVneoEJ) (57), and, as a standard, 1 µg of a chloramphenicol acetyltransferase expression plasmid under control of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter (pBLCAT5) (8). Total DNA was kept constant by the addition of pSVneo vector. At 24 h posttransfection, cells were washed and further incubated for 24 h in medium containing 0.5% donor calf serum. Subsequently, luciferase activities were determined and adjusted for transfection efficiencies with the help of the cotransfected standard plasmid.

Drosophila SL2 cells were cotransfected with 1 µg of reporter plasmid (P4wtLuc or mutated derivatives) and various amounts of plasmids pPac-Sp1, pPac-Sp3, and/or pPac-Ets-1. Total DNA was kept constant by addition of the nonrecombinant vector pPac-0. At 48 h posttransfection, luciferase activities were determined and normalized for the total amounts of proteins measured by the Bradford method (Bio-Rad).

Cell extract preparation and EMSA. Extracts were prepared from FREJ4 cells

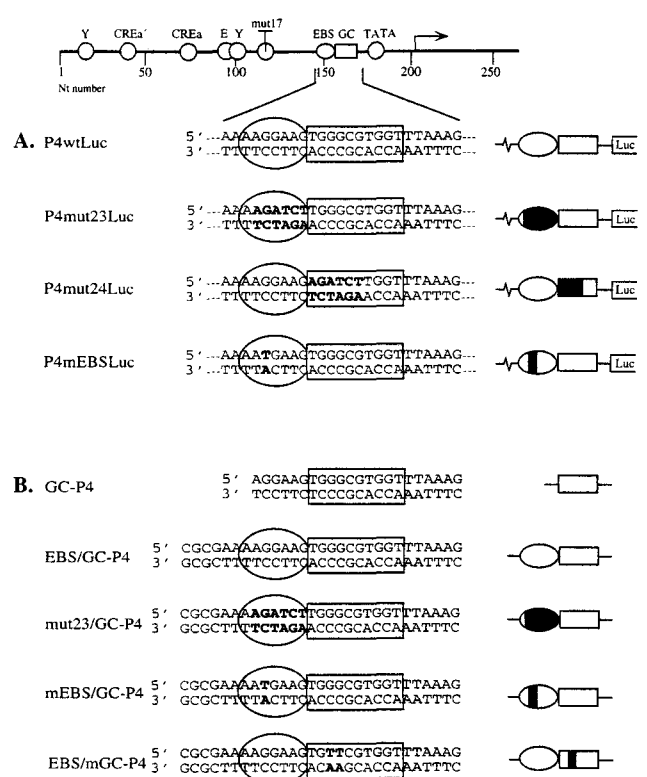


FIG. 1. Nucleotide sequence and schematic representation of P4 promoter constructs and P4-related oligonucleotides used in this study. The upper line depicts the MVMp P4 promoter and transcription start site (arrow). Open circles represent cell protein-binding sites (22), some of which are identified as indicated: TATA box (TATA) (1), Y boxes (Y) (27), E box (E) (27), and cAMP response elements (CREa and CREa') (47). mut17 indicates a site which is mutated in the P4mut17Luc construct (see Fig. 6B) and interacts with as yet unidentified proteins. Base numbering is according to Astell et al. (4). The sequence elements analyzed in this study are framed by a rectangle (GC box) (1) and an oval (EBS) and are aligned beneath the line diagram of the promoter. Boldface type (sequences) and filled areas (right-hand schemes) indicate mutations that were introduced in corresponding elements. (A) P4 promoter constructs driving expression of the luciferase (Luc) reporter gene. (B) P4 promoter-related synthetic oligonucleotides used in EMSAs.

as described previously (6). Briefly, cells were harvested from culture dishes, rinsed with phosphate-buffered saline, and resuspended in 1.5 volumes of lysis buffer (20 mM *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid [HEPES; pH 7.9], 0.4 M NaCl, 25% glycerol, 1 mM EDTA, 2.5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The lysate was kept on ice for 20 min and subsequently frozen at -70°C. After thawing on ice, the suspension was vigorously vortexed and centrifuged for 10 min at 15,000 rpm in an Eppendorf centrifuge. The supernatant was frozen in liquid nitrogen and used as the crude cell extract for electrophoretic mobility shift assays (EMSAs).

EMSA binding reactions were carried out for 10 min at room temperature in a final volume of 10 µl containing 250 pmol of ³²P-end-labeled probe (synthetic double-stranded oligonucleotides), 0.5 µg of salmon sperm DNA, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol, and either 3 to 6 µg of crude cell extract or 0.1 footprint unit of affinity-purified human Sp1 protein (Promega Corp.) in the presence of 5 µg of bovine serum albumin. For competition studies, unlabeled double-stranded oligonucleotides were included in the reaction mixture before addition of the probe. The MVMp-specific oligonucleotides (corresponding to upstream regions of promoter P4) and mutated derivatives are depicted in Fig. 1B. Sequences of oligonucleotides bearing consensus EBS, GC box, and NF-κB-binding sites (EBSc, GCc, and NFBSc) and point-mutated versions thereof (mEBSc and mGCc) were as follows: 5'-CTTCGAGCAGGAAGTTCGA-3' (EBSc), 5'-CTTCGAGCATG AAGTTCGA-3' (mEBSc), 5'-ATTCGATCGGGCCGGGGCGA-3' (GCc), 5'-ATTCGATCGTTTCGGGGCGA-3' (mGCc), and 5'-ACAAGGGACTTTC GCTGGGGACTTTCAG-3' (NFBSc). Consensus binding sites are underlined, and mutations are shown in boldface. Protein-DNA complexes were resolved by 4.5% native polyacrylamide gel electrophoresis at 4°C in 0.3× TBE (11 mM Tris-HCl, 41 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA [pH 8.3]) for 90 min at 280 V. Gels were fixed, dried, and exposed for autoradiography at -70°C with an intensifying

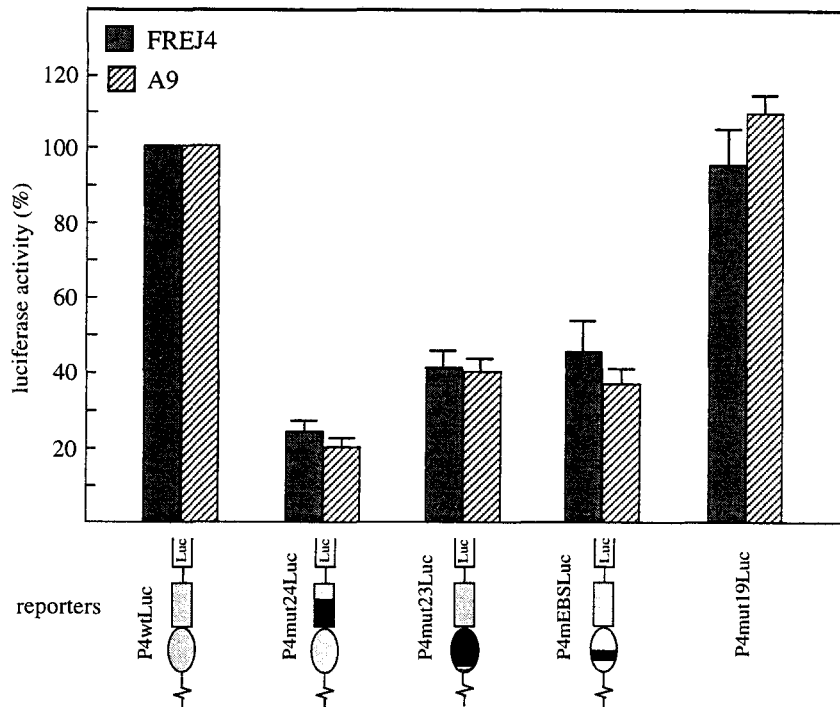


FIG. 2. Effects of mutations within the GC box or the EBS on P4 promoter-driven gene expression. FREJ4 and A9 cells were transfected with plasmids expressing the reporter luciferase gene from the whole wild-type P4 promoter (P4wtLuc) or from derivatives carrying mutations in the GC box, the EBS motif (see Fig. 1A for the corresponding sequences), or a region that is not involved in DNA-protein interactions (P4mut19Luc). Normalized luciferase activities achieved by the mutants are given as percentages of the expression driven by the wild-type promoter. Average values from at least four independent experiments, each performed in triplicate, are shown with standard deviation bars. Luciferase activities were at least 15 times higher than background.

screen. For supershift assays, 1 μ l of polyclonal antiserum, monoclonal antibody, or control nonimmune serum was added to the binding reaction mixture, and incubation was continued for 50 min on ice before loading of the gel. The monoclonal antibody directed against Sp1 (IC6) was a generous gift of S. P. Jackson. The rabbit polyclonal anti-Sp3 antiserum (31) was kindly provided by G. Suske.

RESULTS

A putative EBS contributes to the activity of the MVMp P4 promoter in FREJ4 cells. The MVMp P4 promoter and upstream left-hand terminal sequences direct transcription initiation at nt 204. Proximal elements (GC and TATA boxes) proved to play a major role in P4 activity in human, mouse, and rat cells, yet efficient transcription appears to require additional upstream sequences that were shown to interact with cellular proteins (1, 22, 27, 47). As illustrated in Fig. 1A, a putative regulatory motif (EBS) is found immediately upstream from the GC box, on the basis of the high homology of its sequence (AAGGAAG, nt 152 to 158) with the DNA binding site of the Ets family of transcription factors (40, 59). The functionality of this motif was tested by measuring the effect of EBS mutation on the expression of a reporter gene programmed by the MVMp P4 promoter in transient transfection assays performed with *ras*-transformed FREJ4 cells. P4wtLuc, a plasmid containing the luciferase reporter gene under control of the complete P4 promoter, was used to this end.

As a first approach, the *Bgl*II recognition motif (AGATCT; Fig. 1A) was substituted for a sequence of equivalent length within the putative EBS motif of promoter P4 (P4mut23Luc). For comparison, a similar substitution was introduced in the neighboring GC box (P4mut24Luc) or, as a negative control, within a P4 region which does not appear to be involved in specific interactions with polypeptides (P4mut19Luc) (22).

Normalized luciferase activities achieved by these constructs are presented in Fig. 2. P4mut19Luc and P4wtLuc sustained similar levels of expression of the luciferase reporter gene, indicating that the *Bgl*II recognition motif had no intrinsic effect on P4 promoter activity. In contrast, the disruption of the GC box (P4mut24Luc) led to a four- to fivefold decrease of P4 promoter activity, in agreement with previous results (1, 22). Similarly, replacement of most of the EBS motif by the unrelated *Bgl*II site (P4mut23Luc) reduced P4-driven luciferase gene expression to 40%, suggesting that the EBS element contributed to P4 promoter activity in FREJ4 cells. This was ascertained by using another P4 promoter construct that carries a single point mutation (nt 154, G to T) within the EBS (P4mEBSLuc; Fig. 1A). An equivalent mutation was previously shown to inactivate a genuine EBS (42). Like the mut23 substitution, the point mutation from P4mEBSLuc resulted in a twofold reduction of luciferase gene expression (Fig. 2), confirming the importance of the EBS region for the full activity of promoter P4 in FREJ4 cells. Similar results were obtained with murine A9 cells (Fig. 2), indicating that the EBS motif is also involved in P4 activation in permissive cells from the natural host of MVMp.

The MVMp GC box interacts with Sp1 and Sp3 proteins. The GC box of the MVMp P4 promoter has high sequence homology to the consensus binding site for the Sp1 family of transcription factors (30, 35, 36) and has been found to constitute a high-affinity binding site for Sp1-like proteins (1, 49). To identify the Sp1 family members that interact with the GC box of promoter P4 in FREJ4 cells, EMSAs were performed (Fig. 3). Upon incubation of oligonucleotide GC-P4 (Fig. 1B) with whole extracts from FREJ4 cells, four retarded complexes (referred to as C2, C3, C5, and C6) were detected (Fig. 3, lane

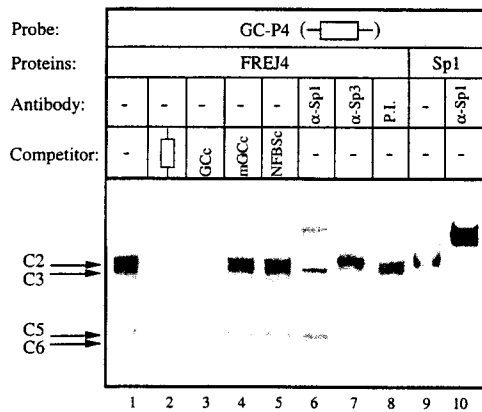


FIG. 3. Association of FREJ4 cell proteins with the GC box of promoter P4. Whole extracts from FREJ4 cells were incubated with ³²P-end-labeled oligonucleotide GC-P4 (see Fig. 1B) in the absence (lane 1) or presence of either a 100-fold molar excess of unlabeled competitors (lanes 2 to 5) or antibodies (lanes 6 to 8). Affinity-purified human Sp1 protein was incubated with the GC-P4 probe in the absence (lane 9) or presence (lane 10) of antibodies. Oligonucleotide competitors consisted of GC-P4 itself (lane 2), intact (lane 3) or mutated (lane 4) consensus GC box, and consensus NF-κB-binding sites (lane 5). Immunoshift assays were performed with monoclonal antibodies directed against Sp1 (lanes 6 and 10), anti-Sp3 polyclonal antibodies (lane 7), or preimmune serum (P.I.; lane 8). The binding reaction products were submitted to native polyacrylamide gel electrophoresis under conditions allowing specific DNA-protein complexes (arrows) to be resolved and the free probe to run out of the gel. Retarded complexes were revealed by autoradiography.

1). These complexes proved to be specific, since their formation could be inhibited by the homologous oligonucleotide (Fig. 3, lane 2) but not by a heterologous oligonucleotide that harbors a consensus NF-κB-binding motif (Fig. 3, lane 5). In addition, a heterologous oligonucleotide containing a bona fide GC box interfered with the formation of all four complexes (Fig. 3, lane 3), while a point-mutated derivative known to be unable to bind Sp1 (33) failed to compete (Fig. 3, lane 4). Furthermore, when the bona fide GC box oligonucleotide was used as a probe, we detected four DNA-protein complexes which were similar in electrophoretic mobility and binding specificity to those formed with the GC-P4 probe (data not shown). Taken together, these observations confirmed that the

GC-rich proximal element of promoter P4 was recognized by the same proteins as a bona fide GC box.

To identify these proteins, immunoshift assays were performed with antibodies directed against different members of the Sp1 family. As illustrated in Fig. 3 (lane 6), a monoclonal antibody directed against Sp1 (IC6) specifically enhanced retardation of complex C2, indicating the involvement of Sp1 in this complex. In agreement with a previous report (49), purified human Sp1 protein was found to associate with the GC-P4 probe, giving rise to a complex that comigrated with C2 (Fig. 3, lane 9) and was supershifted by the monoclonal anti-Sp1 antibody IC6 (Fig. 3, lane 10). Together, these observations implicated Sp1 as the sole protein constituent of the C2 complex. In contrast, addition of another antiserum that was shown to specifically suppress the formation of Sp3-DNA complexes without causing the appearance of supershifted bands (31) inhibited the formation of C3, C5, and C6 but not C2 complexes (Fig. 3, lane 7). A preimmune serum failed to affect any of these DNA-protein associations (Fig. 3, lane 8).

Sp3 is thought to exist in three different isoforms (31), which would explain the involvement of this protein in three distinct complexes. EMSAs performed with purified Sp3 proteins showed similar retardation patterns consisting of three retarded species (36), suggesting that Sp3 was the only protein component of complexes C3, C5, and C6. Together, these data indicate that Sp1 family members, in particular Sp1 and Sp3, can bind in a mutually exclusive way to the GC box of the MVMP P4 promoter.

The EBS motif of the MVMP P4 promoter is recognized by members of the Ets family of transcription factors. The putative EBS motif AAGGAAG, which has been shown to contribute to P4 activity (see above), was analyzed in order to identify the interacting protein(s). To this end, the oligonucleotide EBS/GC-P4, which included both the putative EBS motif and the GC box (Fig. 1B), was subjected to gel retardation analysis. As shown in Fig. 4A, incubation of EBS/GC-P4 with FREJ4 whole cell extracts led to the formation of five retarded complexes designated C1, C2, C3, C5, and C6 (Fig. 4A, lane 1). All five complexes proved to be specific, as demonstrated by competition experiments using homologous (Fig. 4A, lane 2) and heterologous (NFBSc; Fig. 4A, lane 9) oligonucleotides.

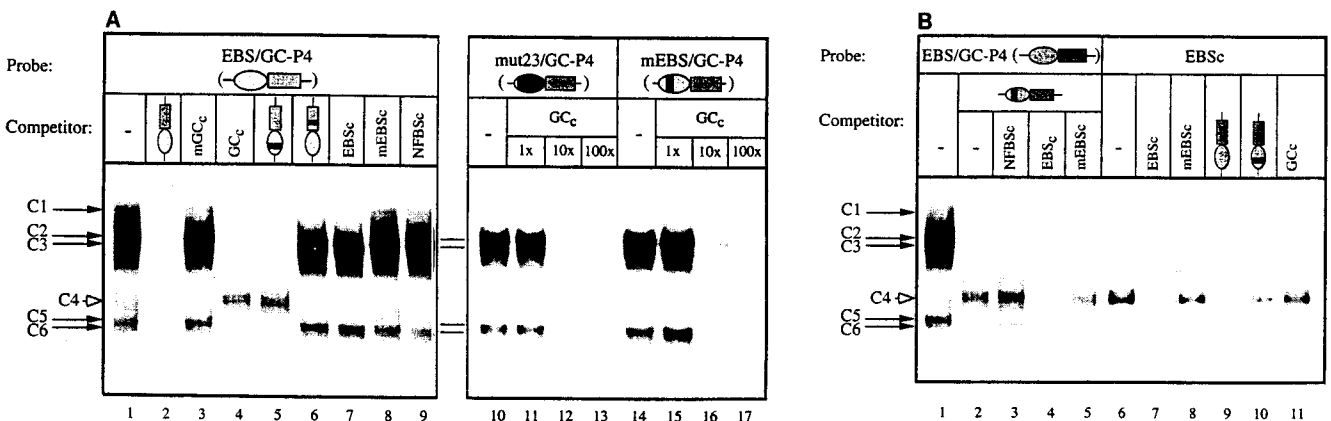


FIG. 4. Interaction of cellular proteins with the EBS-GC region of promoter P4. Whole FREJ4 cell extracts were incubated with ³²P-end-labeled oligonucleotide EBS/GC-P4, mut23/GC-P4, mEBS/GC-P4 (see Fig. 1B), or EBSc (consensus EBS binding site), as indicated, in the absence or presence of unlabeled competitors. The molar excess of unlabeled competitor oligonucleotides was 100-fold except where otherwise stated. Competing oligonucleotides either derived from P4 (EBS/GC-P4 and corresponding EBS or GC mutants schematized according to Fig. 1B) or consisted of the following consensus motifs: intact (GCc) and mutated (mGCc) GC box, intact (EBSc) and mutated (mEBSc) EBS, and NF-κB-binding site (NFBSc). Specific DNA-protein complexes (arrows) were fractionated by EMSA and revealed by autoradiography. The free probe ran out of the gel.

Complexes C2, C3, C5, and C6 were equivalent to the Sp1/3-containing complexes formed with the GC-P4 probe, as shown by competition analysis and immunoshift assays. The formation of these complexes was inhibited by consensus (Fig. 4A, lane 4) and P4 (Fig. 4A, lane 5) GC boxes but not by mutated derivatives thereof (Fig. 4A, lanes 3 and 6). C2, C3, C5, and C6 were also insensitive to the Ets protein-binding competitor (Fig. 4A, lane 7).

In contrast, the more slowly migrating complex C1 was abolished by oligonucleotides harboring either an intact GC box (Fig. 4A, lanes 4 and 5) or an intact EBS (Fig. 4A, lanes 6 and 7), irrespective of whether consensus or P4-derived competitors were used. Mutations known to suppress the recognition of consensus GC box and EBS by Sp1-like and Ets proteins, respectively, were found to impair the abilities of these elements to act as competitors and inhibit the formation of complex C1 (Fig. 4A, lanes 3 and 8). Furthermore, complex C1 did not form when the mutated mut23/GC-P4 (Fig. 4A, lane 10), mEBS/GC-P4 (Fig. 4A, lane 14), and EBS/mGC-P4 (data not shown) oligonucleotides were used as probes. Together, these data strongly suggest that C1 results from the concomitant interaction of the EBS/GC-P4 oligonucleotide with at least two types of proteins which can be trapped by one or the other consensus motif and may thus belong to the Sp1 and Ets families of transcription factors.

The Sp1 constituents of the presumably ternary C1 complex await further identification, since immunoshift experiments using the above-mentioned antibodies failed to show a displacement of C1, possibly because of epitope masking or confusion caused by the comigration of C1 with other complexes supershifted in the presence of anti-Sp1 antibodies (Fig. 3).

It is worth noting that the formation of an additional complex, C4, was observed with the EBS/GC-P4 probe when the binding reaction took place in the presence of competition oligonucleotides that specifically interacted with GC box-binding proteins (Fig. 4A, lanes 4 and 5). Complex C4 could be abolished by the EBSc oligonucleotide containing a consensus EBS but neither by the mEBSc derivative bearing a point mutation, previously shown to impair Ets protein binding (42), nor by the NFBSc oligonucleotide (Fig. 4B, lanes 1 to 5). Furthermore, incubation of radiolabeled EBSc oligonucleotide with FREJ4 whole cell extracts led to the formation of a complex which comigrated with complex C4 and could be abolished by consensus and P4 EBSs but not by mutated derivatives or the consensus GC box (Fig. 4B, lanes 6 to 11). These data indicate that complex C4 is specific and is likely to result from the association of the P4 EBS with an Ets-related protein(s). In keeping with this possibility, complex C4 (and the presumably ternary complex C1) did not form when the mut23/GC-P4 and mEBS/GC-P4 oligonucleotides were used as probes in EMSAs, while the Sp1/3-containing complexes C2, C3, C5, and C6 were not affected by the EBS mutation (Fig. 4A, lanes 10 to 17). The nature of the Ets protein constituent(s) of C1 and C4 is unknown, since these complexes could not be supershifted or suppressed by a panel of antibodies directed against specific members of the Ets family.

It is noteworthy that C4 could be detected only under conditions such that appropriate competitors removed Sp1-like proteins from the EBS/GC-P4 probe (Fig. 4A, lanes 4 and 5; Fig. 4B, lanes 2 to 5). Also, the consensus Ets recognition element EBSc was more efficient than the EBS/mGC-P4 oligonucleotide in competing with radiolabeled EBSc probe for Ets protein binding (data not shown). These observations, together with the above-mentioned occurrence of the C1 ternary complex, lead to the conclusion that the affinity of Ets proteins for the EBS element of promoter P4 is low but may be in-

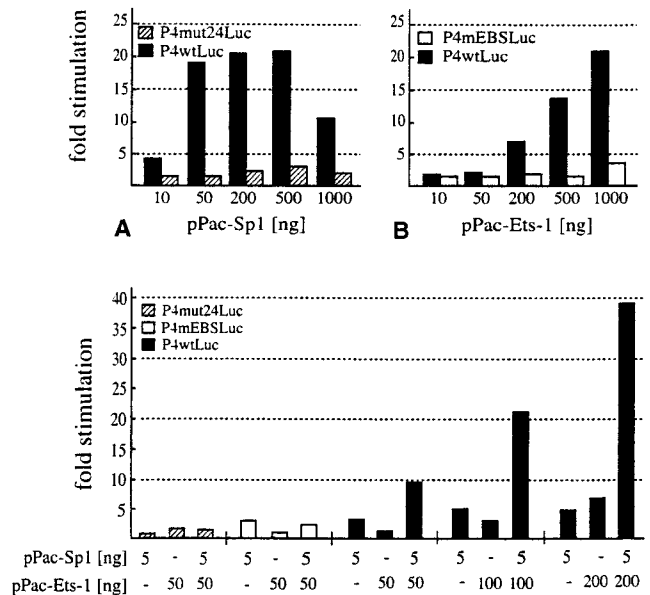


FIG. 5. Effects of Sp1 and Ets-1 transcription factors on promoter P4 activity. *D. melanogaster* SL2 cells were transfected with the luciferase reporter gene driven by wild-type (P4wtLuc), GC box mutant (P4mut24Luc), or EBS mutant (P4mEBSLuc) promoter P4, together with increasing amounts (nanograms per plate) of either Sp1-producing pPac-Sp1 (A) or Ets-1-producing pPac-Ets-1 (B) or both expression plasmids (C). Results are presented as Sp1- and/or Ets-1-induced stimulation of promoter P4 and were calculated as the ratios of luciferase activities in cells transfected with pPac-Sp1 and/or pPac-Ets-1 to luciferase activities in cells transfected with the same amount of empty pPac-0 vector. Luciferase activities were at least 10 times higher than background.

creased as a result of the adjacent binding of Sp1-like factors. As apparent from competitive EMSAs, oligonucleotides mut23/GC-P4 and mEBS/GC-P4 could bind Sp1 and Sp3 and were indistinguishable with regard to their affinities for these factors (Fig. 4A, lanes 10 to 17). Furthermore, corresponding mutations impaired the activity of promoter P4 in permissive cells to similar extents (Fig. 2). Therefore, either of these mutants was suitable for the assessment of the specific role of EBS in P4 modulation.

Sp1 and Ets-1 synergistically transactivate promoter P4 in insect cells. Given the evidence of in vitro interaction of Sp1, Sp3, and Ets-related proteins with proximal P4 promoter elements, the respective roles of these factors in P4-driven gene expression were analyzed. To address this question, *Drosophila* SL2 cells, which lack endogenous Sp1-like and Ets-1 activities (17, 19, 31), were cotransfected with P4 promoter constructs and expression vectors encoding Sp1, Sp3, or the prototype member of the Ets family, Ets-1 (29). As illustrated in Fig. 5A, reporter gene expression from the wild-type P4 promoter construct (P4wtLuc) was increased by Sp1 in a dose-dependent manner. This effect was mediated by the P4 GC box, since little stimulation was observed with the P4mut24 derivative that lacked this element. Similarly, Ets-1 production resulted in the dose-dependent activation of the wild-type P4 promoter (P4wtLuc) but not of a derivative (P4mEBS) mutated in the EBS motif (Fig. 5B). The Sp3-producing plasmid had no significant effect on P4 promoter-driven luciferase expression (data not shown), a finding that is consistent with the recently reported transcription-regulating inactivity of Sp3 in SL2 cells (31). It should be stated, however, that Sp3 can act as a transcription regulator of gene expression in mammalian cells (41).

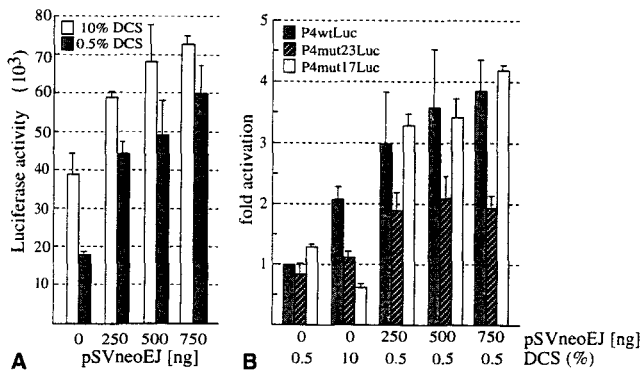


FIG. 6. Effect of Ha-*ras* on promoter P4-driven gene expression. FR3T3 cells were cotransfected with the reporter luciferase gene driven by wild-type (P4wtLuc) (A and B) or mutant (P4mut23Luc and P4mut17Luc) (B) promoter P4 and increasing amounts of *ras* expression plasmid (pSVneoEJ). pBLCAT5 was included as an internal control to correct for variations in transfection efficiencies. The total amount of transfected DNA was kept constant by the addition of *ras*-free vector (pSVneo). Luciferase activities were measured 48 h posttransfection in cells cultivated in the presence of 10 or 0.5% donor calf serum (DCS). In panel B, luciferase gene expression is expressed relative to the level achieved by cells transfected with P4wtLuc in the absence of pSVneoEJ and presence of 0.5% DCS, set as 1.0. Average values from four independent experiments, each performed in triplicate, are given with standard deviation bars.

Given that Sp1- and Ets-like proteins are capable of simultaneously binding to the EBS/GC-P4 probe and that Sp1 and Ets-1 both function as transcriptional activators of the MVMp P4 promoter in SL2 cells, experiments were performed to gain further insight into the functional interplay between these factors. As depicted in Fig. 5C, the concomitant production of Sp1 and Ets-1 resulted in reporter gene expression levels that were five to eight times higher than those achieved by each factor alone. This indicates that Sp1 and Ets-1 can cooperate in the activation of P4-driven transcription (5, 32). The GC box and EBS motif were both required for this effect, since mutations in the associated elements (mut 24 and mEBS, respectively) prevented promoter P4 from being synergistically activated by Ets-1 and Sp1 (Fig. 5C).

The EBS contributes to *ras*-mediated activation of promoter P4. The transcriptional activity of promoter P4 is greater in the *ras*-transformed FREJ4 cell line than in the parental FR3T3 cells (54). Since EBS motifs are involved in the *ras*-mediated up-modulation of other promoters (11, 60, 61), the role of the P4 EBS in the activation of promoter P4 by c-Ha-*ras* was investigated. To this end, it was first determined whether promoter P4 could be stimulated by *ras* in transient cotransfection assays using nontransformed FR3T3 cells. As illustrated in Fig. 6A, the *ras* oncogene enhanced the expression of a cotransfected luciferase gene placed under the control of wild-type promoter P4 (P4wtLuc) to a significant but small (about 1.5-fold) extent when cells were maintained in 10% donor calf serum. It has been reported that some of the actions of oncogenic *ras*, mediated in particular by the Ets family of transcription factors, are masked under these culture conditions as a result of the overlapping effect of serum factors (60). Indeed, by reducing the serum concentration from 10 to 0.5%, a lower basal activity and a greater (three- to fourfold) *ras*-dependent induction of promoter P4 were achieved (Fig. 6). Therefore, the latter culture conditions were used to assess the contribution of the P4 EBS motif to the responsiveness of promoter P4 to the *ras* oncogene.

The substitution of an unrelated sequence for the EBS motif (mut23) specifically prevented Ets from binding (Fig. 4A, lanes 10 to 13) and was tested for its effect on the modulation of

promoter P4. As shown in Fig. 6B, the activity of the corresponding P4 mutant (P4mut23Luc) was not significantly impaired in *ras* oncogene-free FR3T3 cells, in agreement with the reported little Ets activity present under these conditions (60). Cell cotransfection with increasing amounts of the *ras* oncogene led to the dose-dependent stimulation of wild-type promoter P4 up to fourfold. At the highest *ras* concentration tested, this stimulation was reduced by half as a result of the substitution mutation within the EBS (P4mut23Luc), indicating that part of the *ras*-dependent activation of promoter P4 was mediated by the EBS. This result is consistent with the above-mentioned functional role of the EBS in the activity of the parvoviral promoter in *ras*-transformed FREJ4 cells (Fig. 2). The specificity of this effect was tested by measuring the influence of oncogenic *ras* on the expression of another P4 promoter construct, P4mut17Luc, in which the *Bgl*II site was substituted for nt 114 to 119 in a P4 region previously shown to interact with an as yet unidentified protein(s) (22). While impairing P4 functioning in cells grown with 10% serum, the mut17 substitution had little effect on either constitutive or *ras*-induced P4 activity under low-serum conditions (Fig. 6B). This contrasts with the reduced *ras* responsiveness of the EBS mutant P4mut23, implicating the EBS as a specific *cis* determinant of P4 up-regulation by *ras*. It should be stated, however, that the residual stimulation of the P4 EBS mutant (P4mut23Luc) by *ras* (Fig. 6B) argues for the presence of an additional *ras*-responsive element(s) besides the EBS in the P4 promoter.

DISCUSSION

The activity of the P4 promoter of MVMp is regulated by a number of DNA elements located upstream from the transcription start site (1, 22, 27, 47). In particular, a proximal GC box that constitutes a high-affinity binding site for Sp1-like proteins proved to be essential for P4 promoter activity (1, 49). In the present work, an EBS was identified immediately upstream from this GC box. Though of little functional importance in untransformed FR3T3 cells, the EBS was found to contribute to P4 activation by the *ras* oncogene.

Interaction of members of the Ets and Sp1 families of transcription factors with a proximal element of promoter P4. An oligonucleotide encompassing the EBS-GC box region of P4 took part in distinct DNA-protein complexes when incubated with FREJ4 cell extracts. All of these complexes but one appeared to comprise a single polypeptide component belonging to the Sp1 family of transcription factors, in particular Sp1 or Sp3. In contrast, the most retarded complex contained an additional protein(s) besides the Sp1-like component. This other protein was identified as a member of the Ets family on the basis of its ability to bind to both consensus and P4-derived EBS elements in a sequence-specific way. The association of the P4 EBS with its Ets cognate appeared to be strengthened by concomitant interaction of the adjacent GC box with Sp1/3, since the binding of Ets alone could not be detected unless Sp1-like factors were trapped by competitor oligonucleotides. This observation is in agreement with the reported properties of the Ets family of transcription factors. To date, this family comprises about 30 related proteins characterized by the conservation of the so-called ets DNA-binding domain. Ets proteins bind as monomers to DNA sequences containing the core motif (C/A)GGA(AT) (21, 40). Sequences flanking this purine-rich core determine the relative affinities of different Ets proteins for target DNA. In addition, transcription factors associating with other promoter regions are thought to assist distinct Ets members in binding to EBS through protein-pro-

tein interactions (for a review, see reference 34). This may explain why in the presence of Sp1-like factors, the association of the EBS-GC box region of P4 with Ets could be detected only in the form of a ternary complex involving both families of proteins.

Cooperation of the EBS and GC box in promoter P4 activity. In agreement with previous reports (1, 22, 49), disruption of the GC box of promoter P4 led to a reduction of transcriptional activity, arguing for the involvement of Sp1-like factors in P4 up-regulation. This possibility was confirmed by showing that exogenous Sp1 supplied to Sp1-free *D. melanogaster* SL2 cells increased their capacity for sustaining P4-driven gene expression. As stated above, the P4 GC box was found to form alternative complexes in vitro with Sp1 and Sp3, two members of a family of proteins characterized by a glutamine-rich activation domain and a DNA-binding region containing three zinc fingers (30, 36). The functional role of Sp3 in P4 activity could not be assessed in the same way as for Sp1, given the lack of intrinsic transcription-regulating potential of Sp3 in *D. melanogaster* SL2 cells (31). It should be stated, however, that Sp3 can play a regulatory role in mammalian cells, possibly in combination with other transcription factors or coactivators that are absent from insect cells (31, 41). Therefore, the possibility that Sp3 contributes to the dynamics of the system by competing with Sp1 for the GC box-mediated control of basal P4 activity needs to be considered. It is noteworthy that within the context of the human immunodeficiency virus type 1 promoter, Sp3 acts as a transcription inhibitor counteracting the activating effect of Sp1 (41).

The complexity of the regulatory network involving the proximal region of promoter P4 was further documented by showing that mutations introduced in the EBS motif and known to impair Ets protein binding (42) also reduced P4 activity in FREJ4 cells. In addition, Ets-1, the prototype member of the Ets family, was able to transactivate promoter P4 in an EBS-dependent way when expressed in *D. melanogaster* SL2 cells. These observations argue for the functional role of the EBS element and its cognate protein(s) in the up-modulation of P4 activity.

It is noteworthy that the EBS motif is immediately adjacent to the GC box in the proximal region of promoter P4, raising the question of whether Ets and Sp1-like factors may take part in some form of cross talk at the P4 level. Indeed, it has been reported that Sp1 activity can be modulated by factors which recognize DNA elements flanking or overlapping a GC box (24, 46). Moreover, as stated above, the specificity of Ets protein binding appears to be determined in part by transcription factors that interact with neighboring promoter regions (34). The possible interplay of Ets-1 and Sp1 within the context of P4 promoter regulation was tested by cotransfection experiments using *D. melanogaster* SL2 cells that lack endogenous Sp1 and Ets-1 activity (17, 19). When supplied together, Sp1 and Ets-1-producing plasmids induced a 40-fold enhancement of P4-driven gene expression under conditions in which the stimulation achieved by each plasmid alone was only of the order of five- to eightfold. Therefore, in this cell system, Sp1 and Ets-1 appeared to cooperate in the activation of promoter P4. This feature is reminiscent of the recently reported synergistic effect of Ets-1 and Sp1 on transactivation of the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) virus long terminal repeat (LTR) and parathyroid hormone-related protein gene P2 promoter (19, 26). Interestingly, these promoters share with P4 a region that consists of similarly organized Ets-1 and Sp1 recognition sites. Binding of Sp1 and Ets-1 polypeptides to the corresponding region of the HTLV-1 LTR was found to be cooperative (26), in agreement with the above-mentioned in-

volvement of Ets proteins in interactions with nearby transcription factors. It should be stated that Sp1 is able to cooperate not only with Ets-1 but also with other members of this family. In particular, Ets-2 and Fli-1 were shown to act in cooperation with Sp1 in HTLV-1 LTR transactivation (26).

EBS-dependent activation of promoter P4 by the ras oncogene. Promoter P4 has been shown to be up-modulated in *ras*-transformed FREJ4 fibroblasts compared with parental FR3T3 cells (54). This promoter activation is likely to contribute to the overproduction of cytotoxic NS-1 proteins as observed in *ras* (57) and other (51) transformants. Indeed, fluorescence-activated cell sorter analysis of NS protein concentration in MVMp-infected cells showed that for equal multiplicities of infection, the proportions of NS-expressing cells were similar, but the NS content per cell was about threefold higher in FREJ4 cells than in FR3T3 cells (unpublished data). Hence, the understanding of the differential regulation of promoter P4 in transformed and normal cells may provide insights into the mechanism(s) by which neoplastic transformation exacerbates the parvoviral lytic effect.

Ets proteins are known to mediate the transcriptional activation of a variety of viral and cellular promoters by growth modulators. In particular, Ets DNA-binding activity was found to be gradually induced in response to serum in the FR3T3 cell line used in the present study (60). It is noteworthy that this serum dependence is removed in *ras*-transformed FR3T3 derivatives which show constitutive Ets DNA-binding activity (60). These observations are consistent with results of the present report, showing that (i) EBS mutations reduced the activity of promoter P4 in FR3T3 cells kept in the presence of 10% donor calf serum while having little influence on P4-driven gene expression under low-serum conditions, and (ii) *ras* was able to stimulate promoter P4 in transiently transfected FR3T3 cells, through a process that was at least partly mediated in *cis* by the EBS motif.

A number of neoplastic transformation-sensitive promoters were found to contain two (or more) distinct enhancer motifs that are recognized by transcription factors with oncogene-inducible activity. Typically, these factors are members of the Ets, Jun/Fos (AP1), or CREB/ATF family of transcriptional activators (for reviews, see references 3, 7, and 59). The combination of multiple control elements of that kind may allow the expression of corresponding genes to be modulated by various signal transduction pathways. Similarly, P4 appears to harbor some other oncogene-responsive element(s) besides EBS, since *ras*-mediated activation of the parvoviral promoter was reduced but not abolished by mutations disrupting the EBS element. It is worth noting in this respect that the recently identified CREB/ATF-binding sites of P4 were also found to act in a *ras*-dependent way (47) and may thus cooperate with EBS in full induction of the promoter by oncoproteins.

Cotransfection experiments of the type performed in this study do not allow NS-1 to be produced in time and concentration conditions mimicking an authentic parvovirus infection. The influence of NS-1, if any, on EBS-mediated P4 activation therefore remains to be assessed by another approach. It would be interesting in this respect to construct recombinant parvoviruses which harbor EBS mutations in promoter P4 and compare them with wild-type particles for their fate after infection of normal and transformed cells. This long-term study should help to correlate the roles of Ets and the P4 EBS in parvoviral oncotropism under physiologically relevant conditions.

In conclusion, the proximal region of promoter P4 appears to be a target for several transcription factors belonging in particular to the Sp1 and Ets families of DNA-binding proteins. These factors interfere both positively and negatively

with each other, bringing a great versatility to the control of P4 activity. Furthermore, some Ets proteins constitute effectors of growth factor and nonnuclear oncoprotein signaling pathways (for reviews, see references 3, 7, and 59) and contribute in this respect to the exquisite responsiveness of promoter P4 to the physiological state of host cells.

The comparison of autonomous parvovirus genomic sequences reveals a high conservation of the proximal P4 promoter region of MVMP, MVMI, H-1, LuIII, and the recently described mouse 1 virus. It is therefore likely that the complex regulation mediated by the GC box and EBS motif represents a general mechanism by which both basal and oncogene-induced gene expression is controlled in the rodent group of autonomous parvoviruses.

ACKNOWLEDGMENTS

We are greatly indebted to J. Ghysdael (Institut Curie, Orsay, France), S. P. Jackson (CRCI, Cambridge, England), R. Paro (ZMBH, Heidelberg, Germany), G. Schütz (DKFZ, Heidelberg, Germany), G. Suske (Klinikum der Universität, Marburg, Germany), and R. Tjian (HHMI, Berkeley, Calif.) for generously providing biological materials and to R. Bosselut, J. J. Cornelis, A. Gégonne, J. Ghysdael, and G. Suske for helpful discussions.

F.F. and L.D. are recipients of fellowships from the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, Belgium, and Ministère de l'Education Nationale, France, respectively. This work was supported by the Commission of the European Communities.

REFERENCES

- Ahn, J. K., B. J. Gavin, G. Kumar, and D. C. Ward. 1989. Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants. *J. Virol.* **63**:5425-5429.
- Antonietti, J. P., R. Sahli, P. Beard, and B. Hirt. 1988. Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of minute virus of mice. *J. Virol.* **62**:552-557.
- Aoyama, A., and R. Klemenz. 1993. Oncogene-mediated effects on cellular gene expression. *Crit. Rev. Oncog.* **4**:53-94.
- Astell, C. R., E. M. Gardiner, and P. Tattersall. 1986. DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(j), and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.* **57**:656-669.
- Berenbaum, M. C. 1989. What is synergy? *Pharmacol. Rev.* **1989**:93-141.
- Boeuf, H., B. Reimund, P. Jansen-Dürr, and C. Kedinger. 1990. Differential activation of the E2F transcription factor by the adenovirus Ela and EIV products in F9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1782-1786.
- Bortner, D. M., S. J. Langer, and M. C. Ostrowski. 1993. Non-nuclear oncogenes and the regulation of gene expression in transformed cells. *Crit. Rev. Oncog.* **4**:137-160.
- Boshart, M., M. Klüppel, A. Schmidt, G. Schütz, and B. Luckow. 1992. Reporter constructs with low background activity utilizing the cat gene. *Gene* **110**:129-130.
- Brandenburger, A., D. Legendre, B. Avalosse, and J. Rommelaere. 1990. NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMP. *Virology* **174**:576-584.
- Caillet-Fauquet, P., M. Perros, A. Brandenburger, P. Spegelaere, and J. Rommelaere. 1990. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J.* **9**:2989-2995.
- Coffer, P., M. de-Jonge, A. Mettouchi, B. Binetruy, J. Ghysdael, and W. Kruijer. 1994. JunB promoter regulation: Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene* **9**:911-21.
- Cornelis, J. J., N. Spruyt, P. Spegelaere, E. Guetta, T. Darawshi, S. F. Cotmore, J. Tal, and J. Rommelaere. 1988. Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J. Virol.* **62**:3438-3444.
- Cotmore, S. F., J. Christensen, J. P. Nüesch, and P. Tattersall. 1995. The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]₂₋₃. *J. Virol.* **69**:1652-1660.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1986. Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **58**:724-732.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**:91-174.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1994. An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J.* **13**:4145-4152.
- Courey, A. J., and R. Tjian. 1988. Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**:887-898.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, M. De Luca, D. R. Helinski, and S. Subramani. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**:725-737.
- Dittmer, J., A. Gégonne, S. D. Gitlin, J. Ghysdael, and J. N. Brady. 1994. Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**:21428-21434.
- Doerig, C., B. Hirt, J. P. Antonietti, and P. Beard. 1990. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J. Virol.* **64**:387-396.
- Faisst, S., and S. Meyer. 1992. Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **20**:3-26.
- Faisst, S., M. Perros, L. Deleu, N. Spruyt, and J. Rommelaere. 1994. Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice. *Virology* **202**:466-470.
- Faisst, S. R., S. Faisst, C. Grangette, J. R. Schlehofer, and J. Rommelaere. 1993. NFκB upstream regulatory sequences of the HIV-1 LTR are involved in the inhibition of HIV-1 promoter activity by the NS proteins of autonomous parvoviruses H-1 and MVMP. *Virology* **197**:770-773.
- Fischer, K. D., A. Haese, and J. Nowock. 1993. Cooperation of GATA-1 and Sp1 can result in synergistic transcriptional activation or interference. *J. Biol. Chem.* **268**:23915-23923.
- Gardiner, E. M., and P. Tattersall. 1988. Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J. Virol.* **62**:1713-1722.
- Gégonne, A., R. Bosselut, R.-A. Bailly, and J. Ghysdael. 1993. Synergistic activation of the HTLV-1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets-1 and Sp1. *EMBO J.* **12**:1169-1178.
- Gu, Z., S. Plaza, P. Perros, C. Cziepluch, J. Rommelaere, and J. J. Cornelis. 1995. NF-κB controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interaction with an unusual binding site. *J. Virol.* **69**:239-246.
- Guetta, E., Y. Graziani, and J. Tal. 1986. Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *JNCI* **76**:1177-1180.
- Gutman, A., and B. Wasyluk. 1991. Nuclear targets for transcription regulation by oncogenes. *Trends Genet.* **7**:49-54.
- Hagen, G., S. Müller, M. Beato, and G. Suske. 1992. Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: a family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* **20**:5519-5525.
- Hagen, G., S. Müller, M. Beato, and G. Suske. 1994. Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J.* **13**:3843-3851.
- Herschlag, D., and F. B. Johnson. 1993. Synergism in transcriptional activation: a kinetic view. *Genes Dev.* **7**:173-179.
- Jackson, S. P., J. J. MacDonald, M. S. Lees, and R. Tjian. 1990. GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* **63**:155-165.
- Janknecht, R., and A. Nordheim. 1993. Gene regulation by Ets proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1155**:346-356.
- Kadonaga, J. T., A. J. Courey, J. Ladika, and R. Tjian. 1988. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* **242**:1566-1570.
- Kingsley, C., and A. Winoto. 1992. Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **12**:4251-4261.
- Krady, J. K., and D. C. Ward. 1995. Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **15**:524-533.
- Labieniec, P. L., and D. Pintel. 1986. The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins. *J. Virol.* **57**:1163-1167.
- Legendre, D., and J. Rommelaere. 1992. Terminal regions of the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter *trans* inhibition. *J. Virol.* **66**:5705-5713.
- Macleod, K., D. LePrince, and D. Stéhelin. 1992. The Ets gene family. *Trends Biochem. Sci.* **17**:251-256.
- Majello, B., P. De Luca, G. Hagen, G. Suske, and L. Laria. 1994. Different members of the Sp1 family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res.* **22**:4914-4921.
- Martin, M. E., X. Y. Yang, and W. R. Folk. 1992. Expression of a 91-kilodalton PEA3-binding protein is down-regulated during differentiation of F9 embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2213-2221.
- Mitchell, P. J., and R. Tjian. 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**:371-378.
- Nye, J. A., J. M. Petersen, C. V. Gunther, M. D. Jansen, and B. J. Graves. 1992. Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev.* **6**:975-990.
- Pankov, R., A. Umezawa, R. Maki, C. J. Der, C. A. Hauser, and R. G. Oshima. 1994. Oncogene activation of human keratin 18 transcription via the Ras signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:873-877.
- Perkins, N. D., N. L. Edwards, C. S. Duckett, A. B. Agranoff, R. M. Schmid, and G. J. Nabel. 1993. A cooperative interaction between NFκB and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO J.* **12**:3551-3558.
- Perros, M., L. Deleu, J. M. Vanacker, Z. Kherrouche, N. Spruyt, S. Faisst,

- and J. Rommelaere. 1995. Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and in its stimulation in *ras*-transformed cells. *J. Virol.* **69**:5506-5515.
48. Pintel, D., D. Dadachanji, C. R. Astell, and D. C. Ward. 1983. The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acids Res.* **11**:1019-1038.
49. Pitluk, Z. W., and D. C. Ward. 1991. Unusual Sp1-GC box interaction in a parvovirus promoter. *J. Virol.* **65**:6661-6670.
50. Rommelaere, J., and P. Tattersall. 1990. Oncosuppression by parvoviruses, p. 41-57. In P. Tijssen (ed.), *Handbook of parvoviruses*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
51. Salomé, N., B. van Hille, N. Duponchel, G. Meneguzzi, F. Cuzin, J. Rommelaere, and J. J. Cornelis. 1990. Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMP is restricted to specific oncogenes. *Oncogene* **5**:123-130.
52. Salvino, R., M. Skiadopoulos, E. A. Faust, P. Tam, R. O. Shade, and C. R. Astell. 1991. Two spatially distinct genetic elements constitute a bipartite DNA replication origin in the minute virus of mice genome. *J. Virol.* **65**:1352-1363.
53. Schneider, I. 1972. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **27**:353-365.
54. Spegelaere, P., B. van Hille, N. Spruyt, S. Faisst, J. J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1991. Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-*ras* oncogene. *J. Virol.* **65**:4919-4928.
55. Studdert, M. J. 1990. Tissue tropism of parvoviruses, p. 3-27. In P. Tijssen (ed.), *Handbook of parvoviruses*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
56. Vanacker, J. M., V. Laudet, G. Adelmant, D. Stéhelin, and J. Rommelaere. 1993. Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *J. Virol.* **67**:7668-7672.
57. van Hille, B., N. Duponchel, N. Salomé, N. Spruyt, S. F. Cotmore, P. Tattersall, J. J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1989. Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-*ras*-transformed rat cells to minute virus of mice. *Virology* **171**:89-97.
58. Wang, C. Y., B. Petryniak, I. C. Ho, C. B. Thompson, and J. M. Leiden. 1992. Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities. *J. Exp. Med.* **175**:1391-1399.
59. Wasylyk, B., S. L. Hahn, and A. Giovane. 1993. The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* **211**:7-18.
60. Wasylyk, C., P. Flores, A. Gutman, and B. Wasylyk. 1989. PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes. *EMBO J.* **8**:3371-3378.
61. Wasylyk, C., A. Gutman, R. Nicholson, and B. Wasylyk. 1991. The c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncogenes. *EMBO J.* **10**:1127-1134.

2.3.3 Discussion

2.3.3.I La boîte GC et l'activation synergique du promoteur P4.

La région proximale du promoteur P4, contenant les boîtes GC et TATA, est primordiale pour atteindre un niveau d'activité maximum. Nous avons montré que les facteurs Sp1 et Sp3 participent à cette activation. L'expression de Sp1 dans des cellules d'insectes suffit à activer le promoteur P4. En ce qui concerne Sp3, le système utilisé ne permet pas d'évaluer la participation de ce facteur à l'activité du promoteur P4. Sp3 participe à l'activité d'autres promoteurs (Bigger *et al.*, 1997), cependant certains auteurs suggèrent que Sp3 pourrait être constamment inactif et entrer en compétition avec Sp1 pour la liaison à la boîte GC, devenant dans certains cas un inhibiteur de la transcription (Wu *et al.*, 1998).

Les études biochimiques, ainsi que l'activation synergique du promoteur P4 par Ets-1 et Sp1, montrent que la fixation de Sp1 augmente la capacité de Ets à se lier à la région EBS. Ceci permettrait à Ets et Sp1 d'interagir avec des membres distincts du complexe d'initiation de la transcription, et d'ainsi accroître de façon synergique la probabilité d'assemblage d'un complexe transcriptionnel actif au niveau de la boîte TATA (Figure 34). Il a récemment été montré que d'autres motifs peuvent activer des promoteurs en coopération avec une boîte GC. Parmi ceux-ci figurent les sites de reconnaissance de l'ADN par la famille ATF/CREB (Kobayashi & Kawakami, 1997, Roesler *et al.*, 1995). Une activation synergique du promoteur P4 pourrait donc se produire via les sites GC et EBS, et également GC et CRE. Ceci expliquerait que des mutations dans la boîte GC ont un effet drastique sur l'activité du promoteur P4, la réduisant à 20% de sa valeur normale.

2.3.3.II Activation du promoteur P4 en réponse à la transformation cellulaire par l'oncogène *ras*

Nous avons préalablement montré que les éléments CRE du promoteur P4 contribuent à son activation en réponse à la transformation cellulaire par *ras*. L'élément EBS participe également à cette activation, en particulier lorsque les cellules sont cultivées en présence de faibles concentrations de sérum (Figure 33). En outre l'élément EBS permet une activation précoce du promoteur P4 en réponse aux facteurs de croissance. Il est ainsi le premier élément de corrélation entre l'activité du promoteur parvoviral et la prolifération cellulaire.

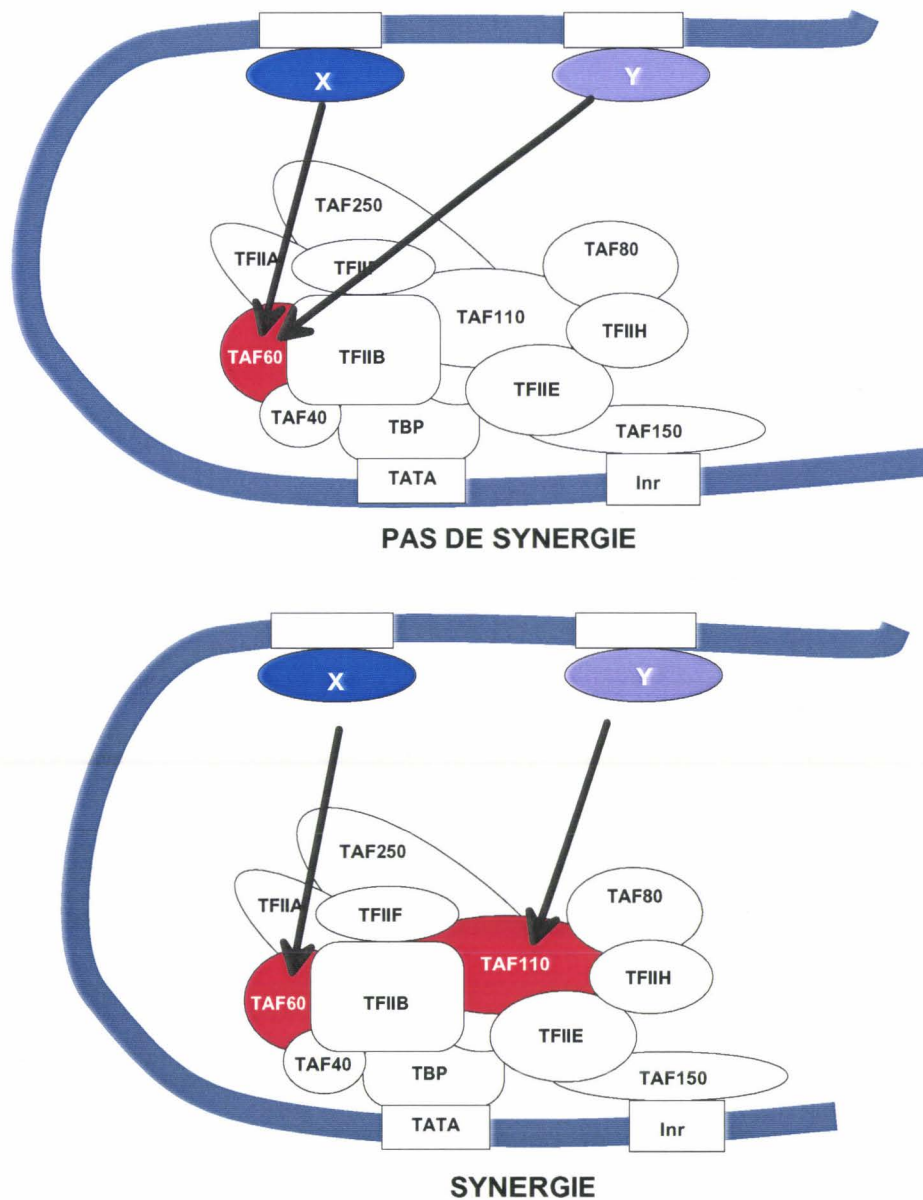


Figure 34: Interprétation théorique de l'activation synergique de promoteurs par des facteurs de transcription.

Le complexe initiateur de la transcription est formé d'une protéine se liant à la boîte TATA (TBP) de facteurs associés à TBP (TAF) et de facteurs de transcription de type II (TFII). Ce complexe est préformé au sein du noyau et sa liaison à la boîte TATA est nécessaire au positionnement et à l'activation de l'ARN polymérase de type II. Les facteurs de transcriptions (représentés par les éllipses X et Y) en contactant les TAFs recrutent le complexe d'initiation au niveau du promoteur. Plus le nombre de TAFs contactés est important, plus le complexe initiateur est amené efficacement au niveau du promoteur. Si deux facteurs de transcription interagissent avec deux TAF distinctes ils activent la transcription de façon synergique.

Les trois premières publications, ainsi que celle de Gu *et al* (Gu *et al.*, 1994), présentent une caractérisation des régions impliquées en cis dans l'activité du promoteur P4. Seules deux régions n'ont pas encore été étudiées. Des études biochimiques, non publiées, ont montré que la première, dénommée Cc, peut fixer au moins cinq protéines (ou complexes protéiques) distincts dont le facteur YY-1. Cette région ne semble pas participer à la réponse du promoteur à la transformation des cellules par l'oncogène *ras*, puisque l'effet de la mutation est tout autant prononcé dans les cellules FR3T3 et FREJ4. La séquence nucléotidique de la seconde région, adjacente au site EBS, ressemble au site de fixation du facteur de transcription E2F. Elle est étudiée dans la quatrième publication.

2.4 L'état de prolifération des cellules hôtes est un élément régulateur de l'activité du promoteur P4

2.4.1 Résumé

Le cycle parvoviral est intimement lié à l'entrée de la cellule hôte en phase S du cycle mitotique. Ceci pourrait s'expliquer par la dépendance de l'amplification du génome parvoviral vis-à-vis de facteurs cellulaires de réplication uniquement disponibles durant la phase S. Une autre explication pourrait être un taux limitant de la protéine virale NS1 en phase G1. En effet cette protéine est absolument nécessaire à la réalisation des différentes étapes de la réplication des parvovirus. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'expression des protéines parvovirales pourrait dépendre du cycle cellulaire, et plus particulièrement de la phase S. Les outils moléculaires déjà décrits lors des premières publications, c'est à dire les promoteurs P4 sauvage et mutés dirigeant l'expression du gène rapporteur de la Luciférase, ont été utilisés pour étudier l'activité de ce promoteur au cours du cycle cellulaire.

Nous avons pu montrer un accroissement de l'activité du promoteur P4 lors de la transition G1/S. Cette induction dépend essentiellement de la fonctionnalité du motif E2F, dans des cellules préalablement synchronisées en phase G0 par privation de sérum. L'étude biochimique des complexes ADN-protéines montre que des polypeptides se lient à la séquence consensus E2F au cours des phases successives du cycle cellulaire. En G1, lorsque le site E2F est inactif (c'est à dire que la mutation introduite dans ce site n'affecte pas l'activité du promoteur P4), nous avons mis en évidence la fixation à ce niveau d'un complexe protéique comprenant les protéines p130-E2F-DP. L'activation du promoteur à la transition entre les phases G1/S a pu être mise en corrélation avec la fixation de divers complexes E2F-DP dits "libres" (à savoir non associée à une protéine "poche"). La diminution progressive de l'activité du promoteur P4 qui s'amorce en phase S coïncide avec la formation d'un complexe cyclineA/cdk2/p107/E2F/DP, décrit comme inactif du fait de la présence de la protéine "poche". En fin de phase S et en phase G2, nous n'observons plus de complexes liés à la sonde E2F. L'activité du promoteur est alors identique à celle mesurée en phase G1.

Ces travaux nous ont également conduits à faire une observation intéressante concernant les éléments CRE du promoteur P4. Lorsque les cellules sont arrêtées en phase G0/G1 en les maintenant confluentes, une forte inhibition du promoteur se produit par l'intermédiaire des éléments. Cette répression disparaît progressivement lorsque les cellules

réintègrent le cycle de façon synchrone. Lorsque ces cellules atteignent la phase S, les éléments CRE récupèrent une fonction activatrice. Ainsi les cellules confluentes se distinguent des cellules se trouvant dans un autre état par rapport au cycle, par le fait que les éléments CRE sont les médiateurs d'une inhibition plutôt que d'une activation du promoteur P4. L'arrêt des cellules par inhibition de contact est due, du moins en partie, à l'accumulation de la protéine p27. D'autre part, comme nous l'avons montré dans la seconde publication le traitement des cellules FR3T3 et FREJ4 au dbAMPc a pour conséquence une inhibition de l'activité du promoteur P4 via les éléments CRE. Or, l'AMPc peut également stabiliser la protéine p27 (Kato *et al.*, 1994). Nous avons dès lors testé l'effet de la sur-expression de la protéine p27 sur l'activité du promoteur P4 dans les cellules FR3T3. Non seulement le promoteur P4, mais également d'autres promoteurs, contenant au moins deux éléments CRE, sont réprimés en réponse à la sur-expression de la protéine p27. Les autres inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines que nous avons testés se sont révélés sans effet sur l'activité transcriptionnelle du promoteur P4 et de promoteurs minimaux contenant des éléments CRE en monomère, dimère ou trimère. Cette inhibition est donc spécifique de la protéine p27.

Opposite Transcriptional Effects of Cyclic AMP-Responsive Elements in Confluent or p27^{KIP}-Overexpressing Cells versus Serum-Starved or Growing Cells

LAURENT DELEU,¹ FRANÇOIS FUKS,¹ DIMITRY SPITKOVSKY,² RITA HÖRLEIN,¹
 STEFFEN FAISST,¹ AND JEAN ROMMELAERE^{1*}

*Applied Tumor Virology, Abteilung 0610 and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 375,¹
 and Abteilung 0625,² Deutsches Krebsforschungszentrum, 69120 Heidelberg, Germany*

Received 1 May 1997/Returned for modification 7 June 1997/Accepted 17 October 1997

The minute virus of mice, an autonomous parvovirus, requires entry of host cells into the S phase of the cell cycle for its DNA to be amplified and its genes expressed. This work focuses on the P4 promoter of this parvovirus, which directs expression of the transcription unit encoding the parvoviral nonstructural polypeptides. These notably include protein NS1, necessary for the S-phase-dependent burst of parvoviral DNA amplification and gene expression. The activity of the P4 promoter is shown to be regulated in a cell cycle-dependent manner. At the G₁/S-phase transition, the promoter is activated via a *cis*-acting DNA element which interacts with phase-specific complexes containing the cellular transcription factor E2F. It is inhibited, on the other hand, in cells arrested in G₁ due to contact inhibition. This inhibitory effect is not observed in serum-starved cells. It is mediated in *cis* by cyclic AMP response elements (CREs). Unlike serum-starved cells, confluent cells accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27, suggesting that the switch from CRE-mediated activation to CRE-mediated repression involves the p27 protein. Accordingly, plasmid-driven overexpression of p27 causes down-modulation of promoter P4 in growing cells, depending on the presence of at least two functional CREs. No such effect is observed with two other cyclin-dependent kinase inhibitors, p16 and p21. Given the importance of P4-driven synthesis of protein NS1 in parvoviral DNA amplification and gene expression, the stringent S-phase dependency of promoter P4 is likely a major determinant of the absolute requirement of the minute virus of mice for host cell proliferation.

Cell cycle progression is coupled to the phase-dependent transcription of certain genes required for phase-specific metabolic activities. The varying transcription rate of such genes can be ascribed to various transcription factors whose activity is differentially regulated throughout the cell cycle. The best studied of these is E2F. In G₁ and late S/G₂, E2F is down-regulated by the so-called pocket proteins (pRB, p107, and p130). At these points in the cycle, the pocket proteins are in a hypophosphorylated state and can interact directly with E2F (reviewed recently in reference 26). As a result, E2F fails to induce and can even repress transcription of its target genes (4). Yet at the G₁/S-phase transition, E2F exerts a strong activating effect. At this time, phosphorylation of pocket proteins by cyclin-cyclin-dependent kinase (cdk) complexes dissociates the complexes (34). cdk inhibitors (CKIs) such as p27^{KIP1}, p16, and p21 suppress E2F-mediated promoter activation (44, 48, 62). Other factors, notably members of the ATF/cyclic AMP response element (CRE)-binding protein (CREB) and Sp1 transcription-factor families, which interact, respectively, with CREs and GC boxes, may also contribute to cell-cycle-dependent gene transcription. Activation of the adenovirus E2 promoter by G₁ cyclins is mediated by both CRE- and GC-box-binding proteins (46). Furthermore, recent data suggest that a CRE motif is involved in S-phase activation (13) and G₁-phase repression (60) of cyclin A gene expression. Results conflicting with this finding were obtained by other

authors (44), however, and so the involvement of other factors besides E2F in cell cycle-dependent transcription remains to be unraveled.

In this study, we used the minute virus of mice (prototype strain, MVMp), an autonomous parvovirus, as a model for investigating cell cycle regulation of promoter function. This choice was based on the low genetic complexity of parvoviruses and on the fact that their life cycle is highly dependent on host cell factors, notably ones transiently expressed during the S phase of the cell cycle (42, 49, 54). Unlike other DNA viruses, parvoviruses fail to induce resting cells to enter the S phase (54). Consequently, their multiplication is delayed until the host cells enter on their own a round of genomic DNA replication. MVMp virions contain a linear, single-stranded DNA genome of about 5 kb, comprising two overlapping transcription units. The focus of this study is P4, the early promoter of MVMp. P4 directs expression of the parvoviral nonstructural (NS) proteins, the major one being NS1, a multifunctional DNA-binding protein required for replication of the parvoviral DNA. NS1 also transactivates the second parvoviral promoter (P38), thereby controlling the viral capsid genes (9, 27). The activity of the P4 promoter is modulated in *cis* via motifs known to bind a variety of cellular transcription factors (Fig. 1), including CREs, a GC box, and a putative E2F-binding site (16). Since the burst of parvoviral gene expression occurs as host cells enter the S phase (11), we have investigated whether the activity of promoter P4 is differentially regulated in the course of the cell cycle.

The results presented here show that the P4 promoter of MVMp is indeed activated at the G₁/S-phase transition, principally via the proximal E2F-binding site. Our *in vitro* data suggest that at this stage, the E2F-binding motif binds the

* Corresponding author. Mailing address: Applied Tumor Virology, Abteilung 0610 and INSERM U 375, Deutsches Krebsforschungszentrum, Postfach 10 19 49, 69009 Heidelberg, Germany. Phone: 49 6221 42 4960. Fax: 49 6221 42 4962. E-mail: j.commelaere@dkfz-heidelberg.de.

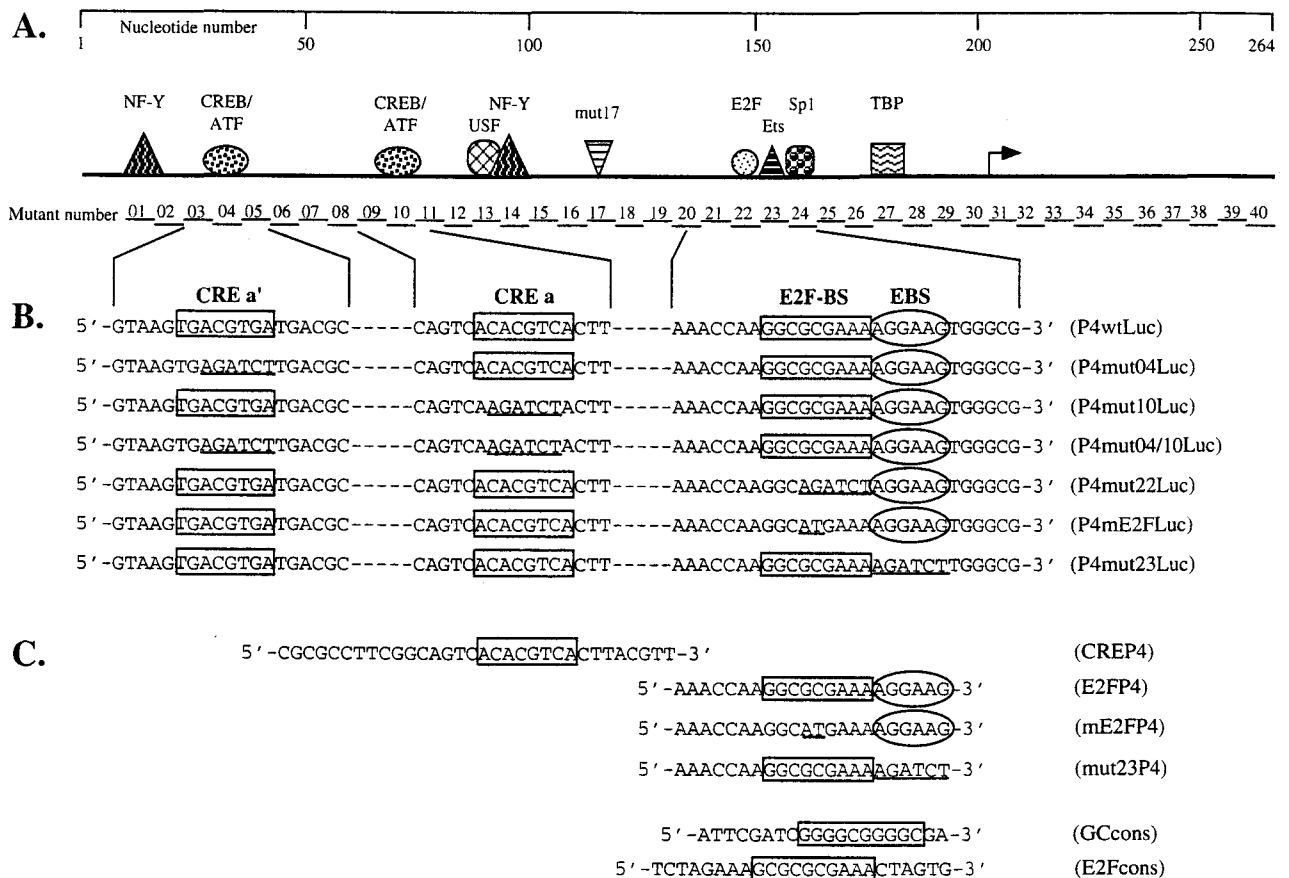


FIG. 1. Schematic representation of the MVMP P4 promoter, of the mutants derived from it, and of the oligonucleotides used in this study. (A) The upper panel depicts the P4 promoter from nt 1 to the translation initiation site at nt 261 (numbering according to Astell et al. [2]). The arrow indicates the transcription initiation site. Symbols represent transcription factors shown to interact with specific P4 promoter sequence elements: TBP, TATA-box-binding protein (1, 16); Sp1, GC-box-binding proteins (1, 17); Ets, Ets family of transcription factors (17); E2F, E2F-binding-site-specific protein complexes (reference 16 and this study); mut17, as yet unidentified proteins binding to and activating promoter P4 via the DNA element mutated in P4mut17 (15); NF-Y, Y-box-binding protein (18); USF, E-box-binding protein (19); CREB/ATF, CRE-binding proteins (36). The 40 contiguous *Bgl*II substitutions introduced in mutants P4mut01 to P4mut40, respectively, are located along the promoter. (B and C) The sequence elements analyzed in this study are framed and aligned beneath the line diagram of the promoter. Underlined sequences indicate mutations introduced in the various elements. (B) P4 promoter constructs driving expression of the luciferase reporter gene. (C) Oligonucleotides used as probes or competitors in electrophoretic mobility assays.

so-called free form of E2F. We have further uncovered a novel pathway of transcriptional up- and down-regulation, mediated by CREs previously shown to constitute binding sites for ATF/CREB family transcription factors (36): when present in at least two copies, the P4 CREs mediate promoter activation in growing and serum-starved cells but promoter repression in contact-inhibited cells. The switch from activation to repression can be triggered by overexpression of CKI p27^{KIP1}, a known mediator of contact inhibition-induced G₁ arrest, while CKIs p16 and p21 have no detectable effect. The new regulatory system thus clearly differs from the above-mentioned E2F-pocket protein system.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and cell synchronization. The established lines of Fisher rat fibroblasts (FR3T3) and Swiss mouse embryo fibroblasts (NIH 3T3) were grown at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% aseptic donor calf serum (DCS) and 1% sodium pyruvate. The established A9 cell line was grown in minimum essential medium supplemented with 5% aseptic fetal calf serum.

Cells were synchronized in phase G₀/G₁ by culturing them for 72 h in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 0.5% DCS (serum starvation) or by keeping them for 72 h at high density (contact inhibition). Synchronization in phase G₂ was obtained by incubating the cells in 2 mM thymidine for

12 h, after which the thymidine was removed and the cells were treated with nocodazole (50 ng/ml) for 14 h.

Plasmids. Plasmid P4wtLuc expressing the firefly luciferase gene under the control of the MVMP P4 promoter was obtained as follows. First the *Hind*III-*Eco*RI fragment of plasmid pLucDSS (18), containing the luciferase gene and its genuine polyadenylation signal, was cloned into the pBSK⁻ vector (Stratagene). This yielded plasmid pBSK-Luc. The 38-bp *Hind*III-*Xba*I fragment of pBSK-Luc was then replaced with an oligonucleotide of identical sequence except that the bases surrounding the ATG codon were modified to create a *Nco*I restriction site (CCATGG). Subsequently, the *Sca*I-*Nco*I fragment of plasmid pP4Cat (52), containing promoter P4 and downstream leader sequences up to the ATG codon, was inserted in front of the firefly luciferase gene, thus generating plasmid P4wtLuc.

Linker-scanning mutants of promoter P4 were obtained by site-directed mutagenesis. To this end, the palindromic P4 promoter was excised from plasmid P4wtLuc and cut in two, yielding one fragment containing the left arm of the palindrome from nucleotide (nt) +1 (downstream from the P4wtLuc plasmid *Xba*I site) of the MVM genome to the *Afl*III site (nt 75) and a second fragment containing the right arm of the palindrome from the *Afl*III site to the *Xba*I site at the very beginning of the luciferase gene. This separation avoided competition between mutation-bearing oligonucleotides and the complementary sequence of the palindrome during the annealing step of mutagenesis. After 3'-recessed end filling by means of the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I, P4 fragments were cloned into the blunted *Sal*I site of the pAlter vector (Promega), allowing site-directed mutagenesis with the Altered Sites System (Promega) according to the manufacturer's recommendations. For this purpose, we used 46-mer oligonucleotides in which the *Bgl*II recognition motif (AGATCT) was substituted for a P4 promoter sequence of equivalent length. Subsequently,

the mutated left and right P4 fragments were substituted for the equivalent wild-type *Scal-AflIII* and *AflIII-NcoI* fragments of plasmid P4wtLuc, respectively, thus generating a linker-scanning series of full-length mutated P4 promoters. The resulting plasmids were named P4mut_xLuc (Fig. 1A), *x* varying from 1 to 40 in contiguous mutants spanning the whole promoter from left to right.

The luciferase gene was placed under the thymidine kinase (*tk*) promoter of herpes simplex virus type 1 (HSV-1). This was done by replacing in plasmid pBLCat4 (28) the *Aval-EcoRI* fragment containing the chloramphenicol acetyltransferase (*cat*) gene with the *NcoI-EcoRI* fragment of pLucDSS (18), containing the luciferase gene. This yielded plasmid HSVtkLuc.

Deletion of the *BamHI-BglII* fragment from P4mut26Luc yielded the minimal promoter construct TATALuc, retaining only the TATA box and downstream region of promoter P4 (including the transcription start site and leader sequence). Synthetic oligonucleotides flanked by *BamHI* and *BglII* restriction sites and containing either a P4 promoter-derived CRE motif, a consensus GC box, or a mutated P4 promoter-derived CRE motif were phosphorylated and self-ligated. Monomers, dimers, and trimers of each oligonucleotide were isolated on a 5% polyacrylamide gel and substituted for the upstream P4 region between the *BamHI* and *BglII* sites of P4mut26Luc. The minimal reporter constructs obtained in this way were named CRE_xLuc, GC_xLuc, CREm_xLuc, where *x* varies from 1 to 3.

DNA transfection and reporter protein analysis. Growing cells were transfected by calcium phosphate coprecipitation (7). Serum-starved and contact-inhibited cells were transfected with the help of the DOTAP reagent (Boehringer Mannheim) in the presence of 0.5% DCS, as recommended by the manufacturer. In some experiments, the Polybrene-dimethyl sulfoxide (30%) shock method (6, 22) was used to transfect serum-starved cells. Cultures (5×10^5 cells per 60-mm-diameter petri dish) were cotransfected with 1 μ g of reporter construct and 1 μ g of plasmid pBLCat4 used as a standard. In some assays, the DNA inoculum also included a p27^{KIP1}-expressing effector plasmid (40) or the corresponding empty vector (pX) as a control. The total amount of inoculated DNA was adjusted to 6 μ g per transfection by addition of salmon sperm DNA. In transient expression assays, CAT or luciferase activity was measured 48 h posttransfection in samples containing equal amounts of total protein from whole-cell extracts. CAT activities were determined according to the phase extraction protocol (45). Luciferase activities were measured with a Berthold luminometer (3). Only luciferase activity readings at least threefold above background were considered significant.

To generate stable transfectants, cells were cotransfected with 0.1 μ g of plasmid pSV2Neo (51) and a 10-fold molar excess of the plasmid of interest. Pools of stable transfectants were selected for their resistance to G418 (500 μ g/ml) over a 14-day period.

Flow cytometry. Cells were harvested by trypsinization, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and fixed for 5 min at room temperature in paraformaldehyde (2%) and lysolecithin (20 μ g/ml). The cells were then washed twice in PBS and fixed in 80% methanol; 10^5 cells were transferred to an Eppendorf tube, washed in PBS, and resuspended in 500 μ l of PBS containing RNase A (0.1 mg/ml). After incubation for 30 min at 37°C, propidium iodide was added (500 μ l of a 50- μ g/ml solution). Analysis by flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting [FACS]) was performed with a Becton Dickinson FACSort. Cell cycle profiles were determined by using the CellFIT cell cycle analysis software package (Becton Dickinson).

For determining the cell cycle distribution of transfected cells, vector pXNS1404-405 (57) expressing an inactive parvoviral NS1 protein was used along with the effector plasmid (1:1 molar ratio) to cotransfect the cells. These were harvested, fixed, and incubated with the NS1-specific rabbit antiserum Sp8 (16). NS1-positive cells were detected with the help of fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G. After propidium iodide staining, 10^5 events were acquired on the FACSsort, and cell cycle distribution of fluorescein isothiocyanate-positive cells was analyzed as described above.

Cell protein extraction and gel retardation assays. Extractions were performed as described by Kumar and Chambon (23), with previously described modifications (5). Briefly, FR3T3 cells were harvested with a rubber policeman, collected in ice-cold PBS, and washed twice. The pellet was resuspended in 1.5 volumes of lysis buffer (20 mM HEPES [pH 7.9], 0.4 M NaCl, 25% glycerol, 1 mM EDTA, 2.5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After incubation on ice for 20 min, the lysate was frozen at -70°C, thawed on ice, and vigorously vortexed. After centrifugation (18,000 \times g, 10 min, 4°C), the supernatant was recovered, frozen in liquid nitrogen, and used as whole-cell protein extract in gel retardation assays.

The DNA oligonucleotides used as probes or unlabeled competitors are depicted in Fig. 1. Double-stranded oligonucleotide probes were end labeled to a high specific activity by using the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I. About 250 pmol of labeled probe was incubated in the absence or presence of a 100-fold molar excess of unlabeled competitor oligonucleotide for 10 min at room temperature with 0.5 μ g salmon sperm DNA, 2 mM MgCl₂, 10% glycerol, and whole-cell extract (3 to 6 μ g of protein) in a final volume of 10 μ l. For supershift assays, the extracts were first incubated for 1 h on ice with antibodies (1 μ l) prior to addition of oligonucleotide. Antibodies were purchased from Dianova (cdk2) and from Santa Cruz (p130 and p107) or were a generous gift from M. Pagano (cyclin A). Following incubation, the samples were loaded onto

a 4.5% nondenaturing polyacrylamide gel. Electrophoresis was performed in 0.3 \times Tris-borate-EDTA for 90 min at 4°C.

Protein analysis by Western blotting. Total protein was extracted from 10^5 cells as described above and fractionated by electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel containing 1% sodium dodecyl sulfate. Proteins were transferred onto a Hybond ECL membrane (Amersham) in a Trans-Blot semidry electrophoretic transfer cell (Bio-Rad) (200 mA for 1 h) according to the manufacturer's instructions. The membranes were incubated for 1 h in blocking buffer (5% powdered milk, 1% sodium caseinate) and then for 1 h with antibodies diluted in blocking buffer. Monoclonal antibodies specifically recognizing CKI p27 (Transduction Laboratories) were used at 1:1,000 dilution, and polyclonal antisera raised against either cyclin A (generous gift from M. Pagano), rat CREB in its nonphosphorylated or phosphorylated (both from Upstate Biotechnology Inc.) state, human CKI p16 (Pharmingen), or human CKI p21 (Transduction Laboratories) were used at 1:2,500 dilution. Membranes were washed three times for 5 min each in PBS containing 0.1% Tween 20 and then further incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G (1:1,000 dilution in blocking buffer; Dianova). All incubations were performed at room temperature. Immunocomplexes were detected with ECL reagent (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

MVMp P4 promoter activity is host cell cycle dependent.

The focus of this study was the regulation of the MVMp P4 promoter. Since a burst of viral gene expression is observed in the S phase (54), the question was: is the activity of the early MVM P4 promoter subject to cell cycle-dependent regulation? To monitor P4 activity through the different phases of the host cell cycle, we stably transfected FR3T3 rat fibroblasts with a P4-driven firefly luciferase gene (P4wtLuc [Fig. 1]). To avoid positional effects, we used pools of stably transfected cells throughout the study.

FR3T3 cells were chosen for the ease with which they are synchronized following serum starvation or contact inhibition. Both modes of synchronization were used to obtain cell populations arrested in G₀/G₁, allowing analysis of events occurring at the G₁/S-phase transition upon release from growth arrest.

After serum starvation for 72 h in medium containing 0.5% DCS, stable FR3T3 transfectants were released from growth arrest by increasing the DCS concentration to 20%. Every 4 h postrelease, we analyzed the cells' cell cycle distribution and measured their luciferase activity. Up to 90% of the cells in serum-starved populations were found to be arrested in G₀. Some 20 h after release, 50% of the cells were found to have left G₁ and entered the S phase (Fig. 2C). Some P4 promoter activity was detected during the first 15 h after serum addition, while the cells were still mostly in G₁ (Fig. 2A), but this activity increased about 10-fold as the cells entered the S phase (Fig. 2A and B). The same experiment was performed on a control pool of FR3T3 cells stably transfected with a reporter gene driven by the cell cycle-independent HSV-1 minimal *tk* promoter. These cells showed little change in luciferase activity as the cells transitioned from the G₁ phase of the cell cycle to the S phase (Fig. 2A and B).

Due to contact inhibition, FR3T3 cells stably transfected with the wild-type P4 promoter construct became arrested in G₁ when grown at high density (Fig. 3C). After subculturing, the cells were analyzed every 4 h to determine their cell cycle distribution and luciferase activity. Under these conditions, the cells synchronously entered a new cell cycle (Fig. 3C) and showed an approximately 16-fold increase in promoter P4 activity at the G₁/S transition (Fig. 3A and B). Stably transfected control cells containing the reporter gene under the control of the HSV-1 minimal *tk* promoter again displayed little induction of promoter activity.

Around 25 h after release from either type of growth arrest, a decrease in P4 promoter activity was detected, correlating

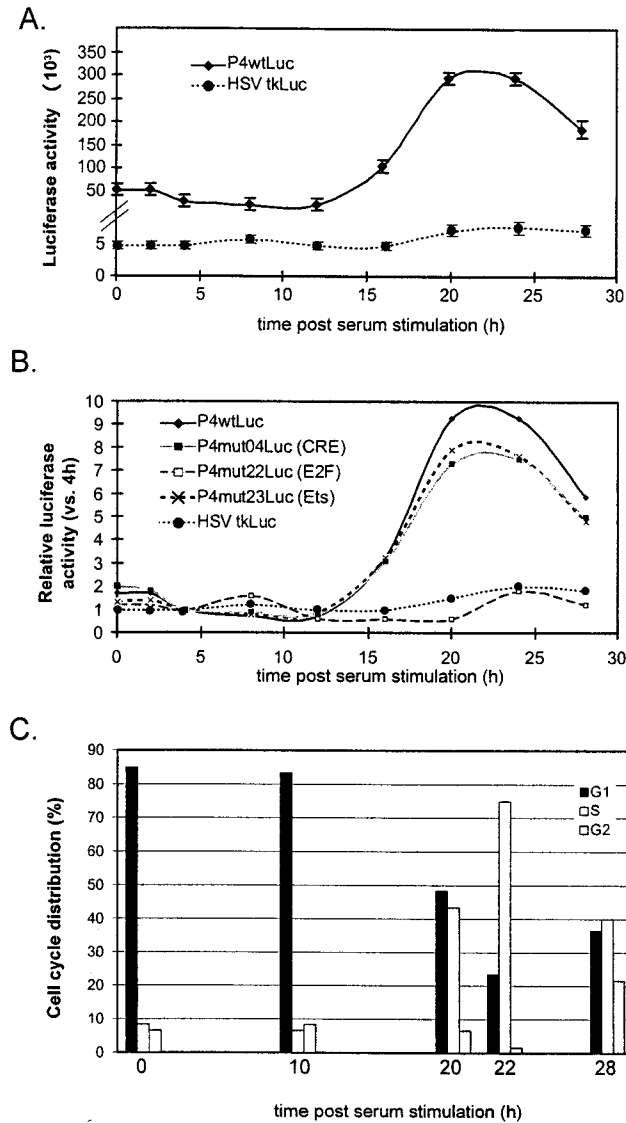


FIG. 2. Cell cycle-dependent activity of promoter P4 in cells synchronized by serum starvation. Pools of FR3T3 cells stably transfected with reporter construct P4wtLuc, P4mutLuc, or HSVtkLuc were synchronized by serum starvation. After release from the block, luciferase activities were measured at 4-h intervals. (A) Absolute luciferase activities achieved by P4wtLuc and HSVtkLuc are given in arbitrary light units, after correction for the number of cells and the background of the luminometer. Averages of six independent experiments are shown with standard deviation bars. (B) Relative luciferase activities achieved by P4wtLuc, derived mutants (P4mut04/22/23-Luc), or HSVtkLuc. Each activity level is expressed as the ratio of the value measured for the construct concerned at the indicated time to the value measured 4 h postrelease. (C) Cell cycle distribution of stably transfected FR3T3 cultures at different times (0, 10, 20, 22, and 28 h) after release from serum starvation, as determined by FACS analysis.

with the appearance of cells in G₂ (Fig. 2 and 3). Since the cells became desynchronized later after release, it was necessary to confirm that P4 is indeed down-regulated during G₂. To this end, G₂-arrested cells were obtained by adding nocodazole, a drug that disturbs microtubule polymerization without affecting transcriptional processes (8). G₂-blocked cells exhibited the same luciferase activity as cells released from nocodazole-imposed arrest and allowed to enter G₁ (data not shown). We conclude that promoter P4 activity is differentially regulated in the course of the cell cycle, being higher in the S phase than in phases G₁ and G₂. These same cell cycle-specific variations in

P4 promoter activity were demonstrated in P4wtLuc-transfected NIH 3T3 and A9 mouse cells synchronized by serum starvation (data not shown).

A cis-acting E2F-like binding site mediates S-phase activation of promoter P4. The P4 promoter can interact with a variety of cellular transcription factors (1, 16, 17, 19, 36) (Fig. 1). To see whether S-phase P4 activation involves known transcription factor-binding sites or perhaps other, as yet unidentified sequences, we constructed a series of *Bgl*II linker-scanning P4 mutants, each driving the luciferase reporter gene. In each mutant construct, the *Bgl*II recognition motif (AGATCT) was substituted for a P4 promoter sequence of equal length.

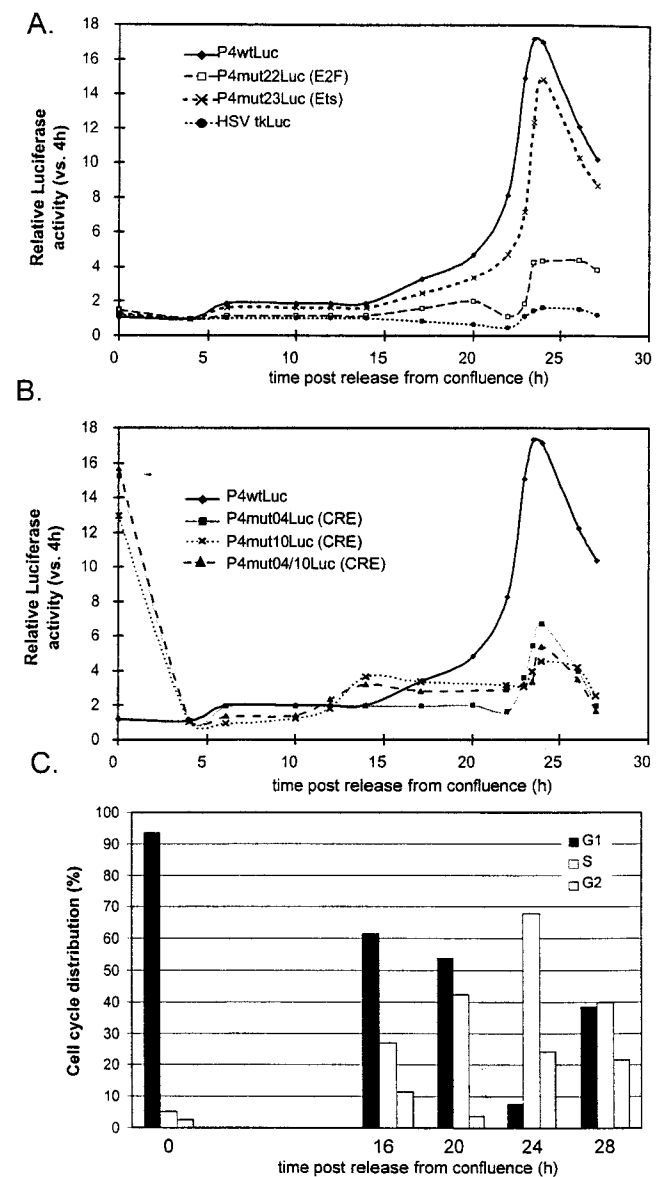


FIG. 3. Cell cycle-dependent activity of promoter P4 in cells synchronized by contact inhibition. Pools of FR3T3 cells stably transfected with a reporter construct (P4wtLuc, a derived mutant [P4mutxLuc], or HSVtkLuc) were synchronized by contact inhibition. After release from the block, luciferase activities were measured at 4-h or shorter intervals. (A and B) Relative luciferase activities for a given construct are expressed as ratios of the values measured at the indicated time versus 4 h postrelease. (C) Cell cycle distribution of stably transfected FR3T3 cultures at different times (0, 16, 20, 24, and 28 h) after release from confluence, as determined by FACS analysis.

The whole P4 promoter and immediate downstream region were scanned with consecutive substitutions spanning nt 19 to 25 in mutant 1 (P4mut01Luc) up to nt 255 to 260 in mutant 40 (P4mut40Luc) (Fig. 1). We then generated pools of FR3T3 cells stably transfected with the different mutant P4 reporter constructs. In these cells, luciferase activity was assayed at 4-h intervals after release from serum starvation or contact inhibition.

As shown in Fig. 2B, all of the P4 mutants (illustrated for P4mut04Luc and P4mut23Luc) but one (P4mut22Luc) retained the ability of the wild-type promoter to be activated during the S phase following release from serum starvation. In P4mut22Luc, which exhibited similar luciferase activities during G₁ and S, the Bg/III recognition motif has replaced a sequence resembling an E2F-binding site (59). To further test the involvement of this putative E2F-binding element in increasing P4 promoter activity during the S phase, we used another P4 promoter construct (P4mE2FLuc [Fig. 1]) carrying point mutations previously shown to inactivate genuine E2F-binding sites (35). This mutant also exhibited comparable activities in G₁ and S (data not shown), indicating that the E2F-like element is indeed important in cell cycle-dependent regulation of the P4 promoter and is probably a functional E2F-binding site.

Further confirmation of the involvement of this site came from experiments conducted in cells released from contact inhibition, where the above-mentioned P4mut22 derivative again exhibited little activation in the S phase compared to the wild-type promoter (Fig. 3A). Interestingly, two other sites besides the E2F-like element were found to impair S-phase P4 induction after release from contact inhibition. These additional sites correspond to substitutions mut04 and mut10 (Fig. 3B), which affect known CRE motifs (36). Each of these mutations taken independently has the same effect on the cell cycle regulation of the P4 promoter as both mutations combined (Fig. 3B). The different behaviors in G₁ of contact inhibition- and serum starvation-synchronized cells may reflect the fact, discussed below, that the CREs of promoter P4 exert opposite effects in contact-inhibited and serum-starved cells.

Experiments with stably transfected FR3T3 cells, like those just described, are suitable for determining changes in the activity of a given P4 promoter construct during the cell cycle, but for lack of an internal standard, they are unsuitable for comparing different promoter derivatives to determine their strengths. It is not possible, in such experiments, to determine whether the S-phase increase in P4 promoter activity mediated by the E2F-like site is due to stimulation of transcription in the S phase, inhibition in G₁, or both. To address this question, we used a standardized transient transfection protocol to compare wild-type and mutant P4 promoter constructs in G₁- and S-phase cells. Serum-starved FR3T3 cells were cotransfected with a wild-type or mutant reporter construct (all constructs were used in equal amounts) plus pBL4Cat, used as an internal standard to determine transfection efficiency. The cells were then released into the mitotic cycle. Luciferase activities were determined 4 and 20 h postrelease and adjusted for differences in transfection efficiency. As shown in Fig. 4 (P4mut22Luc panel), mutant P4 constructs with an altered E2F-like site behaved like wild-type constructs in arrested cells and during the G₁ phase following release but displayed less reporter gene expression than the wild type during the S phase. This was true in both starvation-synchronized and contact inhibition-synchronized cells and indicates that the E2F-like motif acts specifically in the S phase to activate promoter P4. As a control, a P4 promoter construct mutated in the Ets-binding site (P4mut23Luc) was analyzed in the same way. As illustrated in

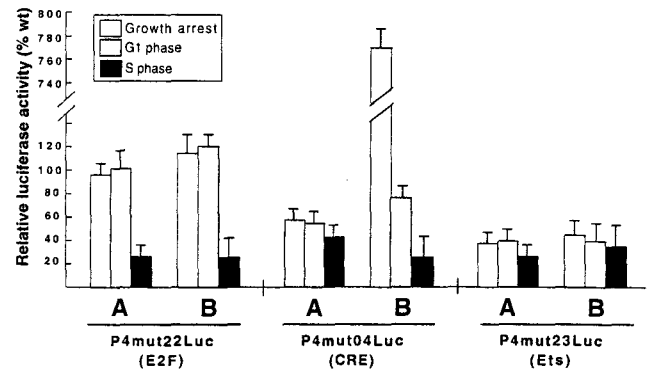


FIG. 4. Comparison of wild-type and mutant forms of promoter P4; activities during different phases of the cell cycle. FR3T3 cultures were growth arrested by serum starvation (A) or contact inhibition (B), transfected with equal amounts of wild-type or mutant (mut04, mut22, or mut23) P4 promoter-driven luciferase gene constructs, and released into the cell cycle. Transient expression assays were carried out by measuring luciferase activities prior to release from the block (growth arrest) and at different intervals thereafter (corresponding to the G₁ and S phases [Fig. 2C and 3C]). Levels of mutant-P4-driven luciferase gene expression are shown as percentages of the values determined for the wild-type promoter at the same time points.

Fig. 4 (P4mut23Luc panel), the mut23 substitution impaired P4 functioning to similar extents in G₁- and S-phase cells, confirming that the Ets element is involved in overall P4 promoter activation (17), independently of the point in the mitotic cycle (see above).

The P4 E2F-like motif interacts with different E2F-containing protein complexes in the course of the cell cycle. The E2F-like element of P4 lies in the proximal region of the promoter, immediately upstream from the Ets- and Sp1-binding sites (1, 17). Recently, *in vivo* and *in vitro* footprinting experiments have demonstrated its interaction with cell proteins (16). To identify these proteins, we performed gel retardation assays with crude extracts of asynchronous FR3T3 cells, using a radiolabeled oligonucleotide probe (E2FP4 [Fig. 1C]) matching a region of the P4 promoter encompassing the E2F-like and Ets motifs. As illustrated in Fig. 5A, two major and several minor protein-DNA complexes were detected (lane 7). These complexes all proved specific, since their formation was inhibited by the homologous competitor oligonucleotide but not by heterologous competitors (data not shown). The protein constituent of the lower major complex has been shown to belong to the Ets family of transcription factors (17). Formation of this complex was specifically suppressed by the mE2F competitor (Fig. 5A, lane 6) containing an Ets-binding motif but no functional E2F recognition site (17) (Fig. 1C). We therefore included the mE2F competitor in all further assays so as to detect only E2F-specific DNA-protein complexes.

E2F is the generic name of DNA-binding heterodimers composed of a member of the E2F family and a member of the related DP family (25). In the course of the cell cycle, the transcriptional activity of E2F is differentially regulated through interactions with other proteins, in particular the product of the retinoblastoma tumor suppressor gene (pRB) and related proteins (p107 and p130), referred to as pocket proteins, as well as cyclins and cdk's (24). To check that the E2F motif of promoter P4 is also the target of mitotic cycle-dependent E2F complexes, we performed gel retardation assays with the E2FP4 probe and crude extracts of synchronized FR3T3 cells harvested at different times after release from serum starvation (Fig. 5A, lanes 1 to 5). The specificity of the complexes observed under these conditions was ascertained in

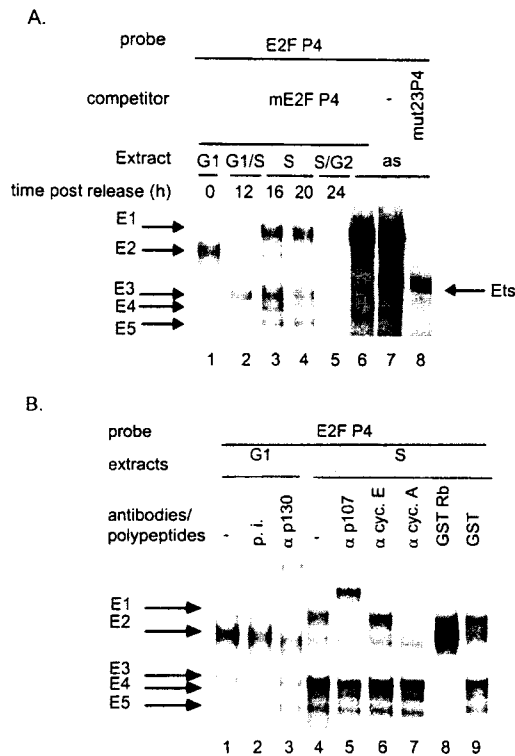


FIG. 5. Association of FR3T3 cell proteins with the P4 promoter E2F-binding site. Whole FR3T3 cell extracts were incubated with ³²P-end-labeled oligonucleotide E2FP4 containing the E2F-like motif of promoter P4 (Fig. 1). Specific DNA-protein complexes (arrows) were separated by electrophoresis and revealed by autoradiography. The free probe ran out of the gel. (A) Extracts were prepared from FR3T3 cultures at various intervals after release from confluence (corresponding to the indicated phases of the cell cycle) and supplemented with a 100-fold molar excess of unlabeled mE2FP4 competitor oligonucleotide. Asynchronous cell extracts (as) supplemented (or not) with a 100-fold molar excess of unlabeled mE2FP4 or mut23P4 competitor oligonucleotides were included for comparison. The mE2FP4 competitor prevents formation of the Ets-specific complex, whereas mut23P4 competes for formation of E2F-specific complexes. (B) Supershift assays were conducted, in the presence of a 100-fold molar excess of unlabeled mE2FP4 oligonucleotide, using either antibodies (α) directed against proteins known to interact with E2F (p130, p107, and cyclins [cyc.] A and E) or recombinant proteins purified from *E. coli* (GST and GST-Rb fusion polypeptide). p.i., preimmune serum.

competition experiments with homologous and heterologous oligonucleotides (data not shown). We also performed immunoshift assays to identify the protein constituents of the resolved complexes (Fig. 5B). Extracts of serum-starved cells arrested in G₀ and sustaining basal P4 activity gave rise to one major E2F-specific complex called E2 (Fig. 5A, lane 1). The E2 band was specifically supershifted upon addition of polyclonal antibodies reacting with pocket protein p130 (Fig. 5B, lane 3) and thus appears to correspond with a multiprotein complex containing at least this polypeptide in addition to E2F. P4 promoter activation at the G₁/S transition was accompanied by the disappearance of the G₁-specific E2 complex and the appearance of three more rapidly migrating complexes named E3, E4, and E5 (Fig. 5A, lane 2). These complexes were supershifted upon addition of bacterially expressed glutathione S-transferase (GST)-Rb fusion polypeptide to the extract (Fig. 5B, lane 8). GST alone had no effect (lane 9). GST-Rb carries the pocket region of the pRB protein (21) which specifically interacts with so-called free E2F (the E2F-DP heterodimer). Furthermore, E3-E5 complexes migrate, with respect to E1 and E2, as do the free E2F complexes of a well-characterized

E2F-binding site with respect to the corresponding pocket protein-E2F complexes (44). We thus attributed formation of complexes E3, E4, and E5 to binding of free E2F. Later in the S phase, we detected the slowly migrating complex E1 in addition to the three just mentioned (Fig. 5A, lanes 3 and 4). E1 appears to be a multiprotein complex comprising E2F, cyclin A (Fig. 5B, lane 7), p107 (Fig. 5B, lane 5), and cdk2 (data not shown). All complexes faded when the cells moved into the G₂ phase, i.e., when promoter P4 reverted to basal activity (Fig. 5A, lane 5). Hence, S-phase activation of P4 correlates with changes in the complex binding to the E2F site, from a G₁-specific E2F-p130 complex to S-specific free E2F forms accompanied later by an E2F-cyclin A-p107-cdk2 complex.

CREs mediate P4 promoter repression in contact-inhibited cells. As illustrated in Fig. 3B, all three mutants affected in one or both CRE motifs of promoter P4 showed hyperactivity in stable transfectants arrested in mid-G₁ by contact inhibition. After dilution, this effect disappeared as the cells reentered the G₁ phase of the mitotic cycle. Whether one CRE, the other, or both were mutated, the G₁ effect was the same. To determine whether the CRE elements mediate promoter P4 repression in confluent cells, activation in growing cells, or both, we again performed transient transfection assays as described above for analysis of the E2F-like binding site, this time comparing the wild-type construct with ones carrying a mutated CRE. Since all three CRE mutants displayed similar regulation through the cell cycle, we limited our study to the P4mut04Luc construct.

As shown in Fig. 4B (P4mut04Luc panel), the CRE acted in *cis* both as a silencing element in contact-inhibited cells and as an activating element in growing cells released from confluence. CRE-mediated activation was also observed in growing cells released from serum starvation. In the latter case, the CRE contributed similarly to P4 activity during G₁ and S (Fig. 4A, P4mut04Luc panel). This means that it has little to do with S-phase P4 induction (cf. Fig. 2B). Interestingly, the CRE appeared to play a different role in serum-starved cells than in contact-inhibited cells: in the former, CRE-mediated activation rather than repression was observed (Fig. 4A, P4mut04Luc panel). P4 silencing through the CREs thus appears unrelated to cell growth arrest per se but rather specific to contact inhibition. This was further ascertained by transiently transfecting asynchronous FR3T3 cell cultures with constructs driven by wild-type and CRE-mutant P4 promoters and measuring promoter activity at different cell densities during subsequent growth. In agreement with the activating role of CREB/ATF transcription factors in proliferating cells (see above and reference 36), the CRE mutant was two to three times weaker than the wild-type promoter in subconfluent cultures. As the cells reached confluence, the activity of the wild-type promoter progressively decreased, the CRE mutant being less affected and becoming up to 15 times more potent than the wild-type P4 (data not shown). Release from contact inhibition caused the CRE to switch from an inhibitory to an activating element (Fig. 4B, P4mut04Luc panel). This may explain why S-associated induction of promoter P4 is stronger in cells synchronized by contact inhibition than in cells synchronized by serum starvation (cf. Fig. 2B and 3B).

Due to their location within the left-hand terminal palindromic sequence of the parvoviral genome, the two CREs are mirror images of each other (36). Both interact with the same proteins of the ATF/CREB transcription factor family, forming three specific protein-DNA complexes (labeled A, B, and C in Fig. 6A) which can be visualized in gel retardation assays (36). The protein constituents of these three complexes have been analyzed by immunoshift assays and *in vitro* reconstitu-

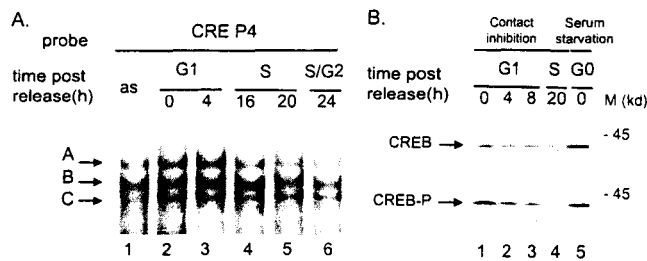


FIG. 6. FR3T3 cell proteins interacting with the P4 promoter CRE motif. (A) Extracts from asynchronous FR3T3 cultures (as) or from FR3T3 cells harvested at different time points after release from contact inhibition were incubated with ³²P-end-labeled oligonucleotide CREP4 (Fig. 1). Specific DNA-protein complexes (arrows; see reference 36) were fractionated by electrophoretic mobility shift assays and revealed by autoradiography. The free probe ran out of the gel. (B) Extracts from FR3T3 cells released from contact inhibition (lanes 1 to 4) or blocked by serum starvation (lanes 5) were analyzed by Western blotting for their content of CREB1. Upper panel, total CREB1; lower panel, CREB1 phosphorylated on serine residue 133. The antibody specifically recognizing phosphorylated CREB1 did not react with CREBs when the extracts were pre-treated with phage lambda phosphatase (data not shown). M, apparent molecular mass of proteins standards.

tion experiments using ATF/CREB proteins purified from recombinant baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* SF9 cells. Complexes A and B result from binding of CREB1 homodimers and CREB1/ATF1 heterodimers, respectively, while C is a still elusive complex comprising ATF1 (36a). To detect possible cell cycle-dependent changes in protein-CRE interactions, we performed gel retardation assays with an oligonucleotide probe (CREP4 [Fig. 1C]) bearing the CRE element of the P4 promoter, using FR3T3 whole-cell extracts prepared at different times after release from contact inhibition. Complexes A, B, and C were detected irrespective of the phase in which the cells were harvested (Fig. 6A, lanes 2 to 6). However, it is worth noting that the relative abundance of complex A was lower when the CREP4 oligonucleotide was incubated with S- and G₂-specific extracts compared with G₁ extracts. DNA binding of transcription factor CREB1 (responsible for the formation of complex A) requires phosphorylation of a serine at position 133 (12). Western blotting analysis of the above-mentioned cell extracts was performed to detect possible cell cycle variations in CREB1 production and/or phosphorylation. The total amount of CREB1 was found to decrease when cells reentered the mitotic cycle after contact inhibition (Fig. 6B, upper panel, lanes 1 to 4). Phosphorylated CREB1 was likewise down-regulated (Fig. 6B, lower panel, lanes 1 to 4), so that the ratio of phosphorylated to total CREB1 remained unchanged. Furthermore, serum-starved cells were similar to contact-inhibited cells with regard to their content in both total and phosphorylated CREB1 (Fig. 6B, lanes 5). We conclude that the CRE-mediated promoter P4 inhibition specific to contact-inhibited cells cannot be explained by the observed variation of CREB1 steady-state levels and does not correlate with a significant change in CREB1 phosphorylation.

CKI p27^{KIP1} accumulates in FR3T3 cells grown to a high density and converts CRE motifs from activating to inhibitory elements. It is worth noting at this point that serum-starved and contact-inhibited cells are not arrested in exactly the same state. Growth arrest induced by serum starvation (best described as a G₀ state) is accompanied by down-regulation of genes encoding proteins required for cell cycle progression (such as cyclins [61]) and by stabilization of the CKIs p16 and p21 (61). In contrast, growth suppression at high cell density is mainly due to failure of another CKI, p27, to be degraded (39). Similar stabilization of p27 has been found to correlate with

cell growth arrest in mid-G₁ following lovastatin treatment (20). Interestingly, we observed CRE-dependent inhibition of P4 promoter activity by lovastatin in the above-mentioned stable transfectants harboring the luciferase-encoding plasmid (data not shown). Furthermore, p27 was found to accumulate in confluent but not in serum-starved FR3T3 cells and to be quickly degraded upon cell release from contact inhibition, before the induction of cyclin A production that marks the S phase (Fig. 7A). These observations suggest that CRE-mediated inhibition of the P4 promoter in contact-inhibited cells could involve CKI p27.

To test this possibility directly, we cotransfected asynchronous FR3T3 cells with a CKI (p16, p21, or p27)-encoding plasmid and a construct bearing a reporter gene driven by wild-type or mutant promoter P4. As shown in Fig. 7B, plasmid-driven overexpression of all tested CKIs could be detected by Western blotting and led to cell cycle arrest in G₁. Furthermore, overexpression of CKI p27 resulted in P4 promoter inhibition (Fig. 7C, column 7). This inhibitory effect of p27 required the presence of two functional CRE motifs (Fig. 7C, columns 8 and 9) but did not depend on an intact proximal GC box, as shown by the behavior of the mut24 derivative, in which this box is replaced by a *Bgl*II site (Fig. 1A). This derivative proved as sensitive to p27 overexpression as the wild-type promoter (Fig. 7C, column 10). In contrast, overexpression of CKIs p21 and p16 had little or no effect on the activity of the P4 promoter, whether wild type or mutated (Fig. 7C, columns 1 to 6). The slight repression observed when p21 was overexpressed proved to be CRE independent (Fig. 7C, columns 5 and 6). The CRE motifs thus appear as specific targets for p27-induced inhibition of the P4 promoter. In cells grown to confluence, plasmid-driven p27 synthesis resulted only in limited (yet significant and CRE-mediated) suppression of promoter activity (Fig. 7C, columns 11 to 14). This result is in keeping with the high level of p27 naturally accumulated by contact-inhibited cells (see above).

To confirm the ability of the P4 CREs to mediate p27-induced promoter silencing, one to three copies of the CRE motif were cloned in front of a minimal promoter consisting of the P4 TATA box and downstream sequences. Constructs containing at least two copies of the CRE proved sensitive to plasmid-driven p27 overexpression (Fig. 7D, columns 5 and 6), while a construct comprising only one CRE did not respond (Fig. 7D, column 4). Minimal promoters supplemented with one to three repeats of the same length but containing a GC box (Fig. 7D, columns 1 to 3) or a mutated (*Bgl*II substitution) CRE (Fig. 7D, columns 7 to 9) likewise failed to respond to p27. When present in at least two copies, the P4 CREs are thus both necessary and sufficient to mediate the repressive effect of p27, even outside the context of the full P4 promoter.

DISCUSSION

We have shown here that regulation of the P4 promoter of parvovirus MVMp is host cell cycle dependent. Analysis of a series of linker-scanning mutants of promoter P4 has enabled us to distinguish two components of this regulation: activation at the G₁/S transition and repression specific to growth arrest at high density (contact inhibition). We have further identified *cis*-acting elements within the promoter that mediate these two processes. A binding site for the E2F transcription factor is the major determinant of S-associated P4 activation, while two CREs mediate promoter silencing in contact-inhibited cells.

The E2F-binding site is required for P4 promoter activation when host cells enter the S phase. Promoter P4 drives the transcription unit encoding the parvoviral NS proteins, partic-

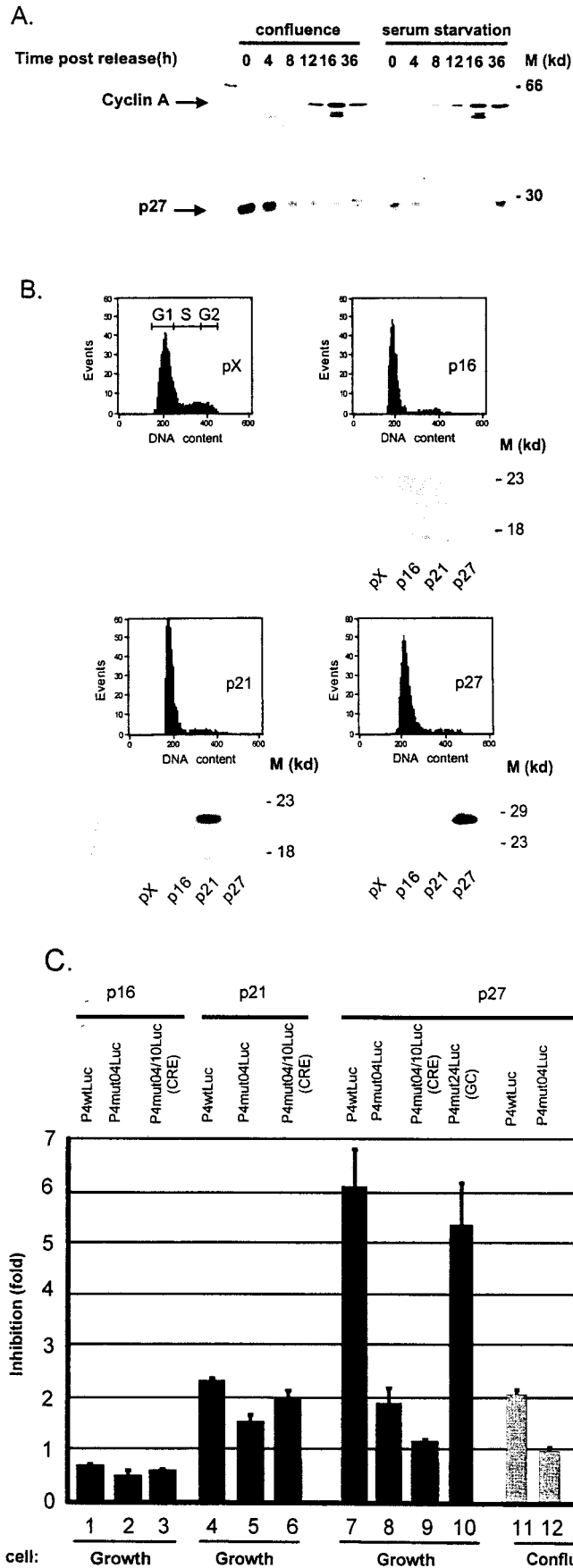


FIG. 7. Influence of p27 overexpression on whole and minimal P4 promoter construct activities. (A) Whole protein extracts were prepared from FR3T3 cells at increasing times after release from confluence or serum starvation (see Fig. 2C and 3C for cell cycle progression). Proteins were fractionated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. The upper and lower parts of the blot were incubated with antibodies directed against cyclin A and CKI p27, respectively. Immunocomplexes were revealed with the ECL detection system. M, apparent molecular masses of protein standards. (B) FACS analysis of FR3T3 cultures cotransfected with either of the CKI-expressing plasmid (p16, p21, or p27) or with the corresponding empty vector (pX). CKI overexpression was verified by Western blot analysis shown below the FACS profiles. (C) Growing or confluent FR3T3 cell cultures were cotransfected with each of the indicated P4Luc reporter plasmids (Fig. 1B) and either p16, p21, or p27 CKI-expressing vector. Transient expression assays were carried out at 48 h posttransfection and are presented as ratios of luciferase activities achieved in the presence of empty versus CKI-expressing vector (i.e., as factors of CKI-induced promoter repression). (D) Growing FR3T3 cell cultures were cotransfected with each of the indicated minimal promoter constructs (see Materials and Methods) and p27-expressing vector. Transient expression assays were carried out at 48 h posttransfection and are presented as ratios of luciferase activities achieved in the presence of empty versus p27-expressing vector (i.e., as factors of p27-induced promoter repression).

ularly the major product NS1, essential to amplification and expression of viral DNA (10). Hence E2F-mediated S-phase induction of NS gene expression may contribute, along with the S-phase specificity of host factors directly involved in the viral life cycle, to the well-known dependence of parvovirus replication upon host cell proliferation (11). The present results indicate that destruction of the E2F motif leads to an 80% reduction of promoter P4 activity in the S phase, without affecting the basal expression measured in G₁. Furthermore, data to be presented elsewhere substantiate the importance of the E2F-binding site for the parvoviral life cycle, showing that S-phase induction of promoter P4 is necessary for the burst of parvoviral DNA replication and gene expression, and that mutations in E2F that abolish S-phase activation of P4 inactivate the virus unless the NS proteins are provided in *trans* (11a). Thus, S-phase activation of promoter P4 provides a clue to the S phase dependence of parvovirus multiplication.

The generic name E2F designates heterodimeric transcription factors composed of two polypeptides, an E2F and a DP family member. Currently, five distinct E2F and three DP proteins have been characterized (25, 26, 33). The transcriptional activity of E2F-DP dimers, often referred to as free E2F, is regulated according to the point in the cell cycle by formation of higher-order complexes. In particular, interaction with members of the pocket protein family (pRB, p130, and p107) prevents E2F from activating responsive promoters. It can even lead to repression of some promoters (50). Binding of pocket proteins to E2F heterodimers (and hence the activity of the E2F transcription factor) is regulated by pocket protein phosphorylation, apparently catalyzed mainly by cell cycle-regulated cdk's (14, 53). E2F proteins interact with cyclins and cdk's either directly or through pocket proteins. After phosphorylation by cyclin-cdk complexes at the G₁/S transition, pocket proteins can no longer bind to E2F proteins. This leads to the formation of transcriptionally active free E2F, known to transactivate target promoters at the G₁/S transition (34). Accordingly, variations in P4 promoter activity throughout the cell cycle correlate with binding of different complexes to the E2F-binding site. During the G₁ phase, the site is occupied by an E2F-p130 protein complex. In agreement with the ability of p130 to prevent E2F from activating transcription (56), only basal P4 activity is detected in G₁. Yet contrary to some other promoters (55), P4 does not appear to be a target of p130-mediated repression. P4 activation at the G₁/S transition is accompanied by replacement of the E2F-p130 complex by free E2F at the E2F-binding site, in keeping with the view that free dimers are the transcription-enhancing forms of E2F (4). Transient P4 hyperactivity during the S phase coincides with maintenance of free E2F at this site and the appearance of an additional higher-order complex containing p107, cyclin A, and cdk2. This complex is thought to be involved in the later inhibition of E2F-mediated transactivation (4). All of these complexes fade in late S and G₂, when the P4 promoter reverts to its basal activity. Proteins p130 and p107 interact specifically with certain members of the E2F family, in particular E2F4 and E2F5 (4). Since these pocket proteins are present in some of the complexes formed with the P4 E2F-binding site, E2F4 and E2F5 are candidate constituents of these complexes.

We have further shown that CREs present within the P4 sequence mediate promoter down-regulation in contact-inhibited FR3T3 cells. This silencing effect is restricted to G₁ arrest at high cell density. Interestingly, this repression was observed only in the presence of two functional CRE motifs. When contact-inhibited cells are diluted and allowed to reenter the mitotic cycle, the CREs switch to mediating promoter activation. In most situations, in fact, these CREs appear to mediate

up-regulation of the P4 promoter, notably in cells arrested in G₀/G₁ by serum starvation or released from this block into the mitotic cycle and allowed to progress through the various phases. Contact inhibition thus represents a special situation in which the CRE-mediated effect on P4 promoter activity is negative rather than positive. Two regulatory pathways with opposite transcriptional effects thus appear to converge on the CREs of the P4 promoter, whose response clearly distinguishes contact inhibition from serum starvation.

Cell cycle progression is regulated by the sequential activation of different cyclins and cdk's (37, 38). Inhibitors of specific cyclin-cdk complexes (the CKIs) play key roles in this regulatory network (15, 31). Serum starvation causes cycle arrest in the G₀/G₁ phase, mainly as a result of reduced expression of a variety of proteins including the D, E, and A cyclins (58). Release from serum starvation allows cyclin reexpression and subsequent cell cycle progression (41). In contrast, contact inhibition causes induction of various CKIs, notably p27^{KIP1}, leading to cell cycle arrest in mid-G₁ through inhibition of G₁ cyclin-cdk complexes (31, 39). Release from contact inhibition is accompanied by degradation of p27^{KIP1}, allowing reentry into the cell cycle. Hence, serum starvation and confluence cause growth arrest via different mechanisms. This may explain the opposite regulatory effects of CREs on the P4 promoter in these two situations. In keeping with this view, we have confirmed, first, that contact-inhibited FR3T3 cells have a much higher steady-state level of p27^{KIP1} than serum-starved or growing cultures. We have further shown more directly that plasmid-driven overexpression of p27^{KIP1} has an inhibitory effect on P4 promoter activity. This effect was striking in growing cultures but limited in contact-inhibited cells, which argues in favor of the view that it occurs naturally in the latter.

On the basis of sequence similarities, CKIs fall into one of two families. Proteins p16, p15, p18, and p19 belong to the INK4 family and specifically inhibit cyclin-cdk4 and cyclin-cdk6 complexes. Proteins p21, p27, and p57 belong to the CIP/KIP family and interfere with the activity of most cyclin-cdk complexes (47). The CIP/KIP inhibitors p21 and p27 carry out similar tasks in cell cycle control, inactivating the same cyclin-cdk complexes. They share a common N-terminal residue sequence believed to interact with the target complexes (30). They differ from the INK4 family CKIs in that they do not appear to require the retinoblastoma gene product pRB to inhibit cell-cycle progression (30). Experiments with p21 and p27 knockout mice suggest functional compensation between these CKIs in controlling cell proliferation during development (32). On the other hand, the activities of p21 and p27 do not overlap entirely, because their C-terminal sequences differ. Protein p21, but not p27, interacts with the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and inhibits PCNA-dependent DNA replication (29). The present data point to an additional functional difference between p21 and p27, i.e., the ability of the latter but not the former to convert CRE-binding transcriptional activators into repressors. Like promoter inhibition in confluent cells, this p27-mediated conversion was observed only when at least two CRE motifs were present.

In conclusion, the present work has uncovered two distinct cell cycle-related regulatory pathways affecting parvoviral gene expression. The first involves the E2F factor; it was known from other systems but is of special interest in parvovirus research because it imposes an early limitation on transcription, rendering progression of the viral life cycle dependent on entry of host cells into the S phase. The second is mediated by *cis*-acting CREs and appears specific to growth arrest by contact inhibition. It involves CRE-mediated promoter repression brought about by the CKI p27^{KIP1}. This new function of p27

distinguishes it from p21, another member of the CIP/KIP kinase inhibitor family with which it shares several activities. The molecular mechanism by which p27^{KIP1} interferes with the activity of CREBs remains to be unraveled. The P4 CREs have recently been shown, in rat fibroblasts, to interact with transcription factors of the ATF/CREB family (36), factors known to be regulated by various kinases (36, 43). No correlation was observed between CRE-mediated repression and the phosphorylation state of CREB1. Given the multitude of proteins interacting with CREs and the cooperative action of the two CREs in p27-mediated repression, it could be interesting to identify new polypeptides binding to such CRE motif repeats. A worthy focus of future research might thus be the influence of kinase inhibitor p27 on the function of CRE-protein complexes and the phosphorylation of the protein constituents.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Jan J. Cornelis and Piddler Jansen-Dürr for fruitful discussions.

This work was supported by the Commission of the European Communities. L.D. and F.F. are fellows of the Commission of the European Communities and of the Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, Belgium, respectively.

REFERENCES

- Ahn, J. K., B. J. Gavin, G. Kumar, and D. C. Ward. 1989. Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants. *J. Virol.* **63**:5425-5439.
- Astell, C. R., M. Thomson, M. Merchlinsky, and D. C. Ward. 1983. The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res.* **11**:999-1018.
- Ausubel, I., and M. Frederick. 1987. Introduction of DNA into mammalian cells, p. 9.7.12-9.7.18. *In* F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*, vol. 1. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Beijersbergen, R. L., and R. Bernards. 1996. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1287**:103-120.
- Boeuf, H., B. Reimund, P. Jansen Durr, and C. Keding. 1990. Differential activation of the E2F transcription factor by the adenovirus E1a and EIV products in F9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1782-1786.
- Chaney, W. G., D. R. Howard, J. W. Pollard, S. Sallustio, and P. Stanley. 1986. High-frequency transfection of CHO cells using polybrene. *Somatic Cell Mol. Genet.* **12**:237-244.
- Chen, C., and H. Okayama. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**:2745-2752.
- Chou, C. F., and M. B. Omary. 1994. Mitotic arrest with anti-microtubule agents or okadaic acid is associated with increased glycoprotein terminal GlcNAc's. *J. Cell Sci.* **107**:1833-1843.
- Christensen, J., S. F. Cotmore, and P. Tattersall. 1995. Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J. Virol.* **69**:5422-5430.
- Cotmore, S. F., J. Christensen, J. P. F. Nüsch, and P. Tattersall. 1995. The NS1 polypeptide of murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]_{2,3}. *J. Virol.* **69**:1652-1660.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**:91-174.
- Deleu, L., et al. Unpublished data.
- Della Fazio, M. A., G. Servillo, and P. Sassone-Corsi. 1997. Cyclic AMP signalling and cellular proliferation: regulation of CREB and CREM. *FEBS Lett.* **410**:22-24.
- Desdouets, C., G. Matesic, C. A. Molina, N. S. Foulkes, P. Sassone-Corsi, C. Brechot, and J. Sobczak Thepot. 1995. Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol. Cell. Biol.* **15**:3301-3309.
- Dynlacht, B. D., O. Flores, J. A. Lees, and E. Harlow. 1994. Differential regulation of E2F trans-activation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev.* **8**:1772-1786.
- Elledge, S. J., J. Winston, and J. W. Harper. 1996. A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* **6**:388-392.
- Faisst, S., M. Perros, L. Deleu, N. Spruyt, and J. Rommelaere. 1994. Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice. *Virology* **202**:466-470.
- Fuks, F., L. Deleu, C. Dinsart, J. Rommelaere, and S. Faisst. 1996. *ras* oncogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of mice through a proximal P4 element interacting with the Ets family of transcription factors. *J. Virol.* **70**:1331-1339.
- Gouilleux, F., B. Sola, B. Couette, and H. R. Foy. 1991. Cooperation between structural elements in hormone-regulated transcription from the mouse mammary tumor virus promoter. *Nucleic Acids Res.* **19**:1563-1569.
- Gu, Z., S. Plaza, M. Perros, C. Cziepluch, J. Rommelaere, and J. J. Cornelis. 1994. NF-Y controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interactions with an unusual binding site. *J. Virol.* **69**:239-246.
- Hengst, L., and S. I. Reed. 1996. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* **271**:1861-1864.
- Hiebert, S. W., S. P. Chellappan, J. M. Horowitz, and J. R. Nevins. 1992. The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* **6**:177-185.
- Kawai, S., and M. Nishizawa. 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1172-1174.
- Kumar, V., and P. Chambon. 1988. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55**:145-156.
- La Thangue, N. B. 1994. DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:443-450.
- La Thangue, N. B. 1994. DRF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. *Trends Biochem. Sci.* **19**:108-114.
- La Thangue, N. B. 1996. E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:54-59.
- Lorson, C., L. R. Burger, M. Mouw, and D. J. Pintel. 1996. Efficient trans-activation of the minute virus of mice P38 promoter requires upstream binding of NS1. *J. Virol.* **70**:834-842.
- Luckow, B., and G. Schuetz. 1987. CAT constructs with multiple unique restriction sites for functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* **15**:8451-8462.
- Luo, Y., J. Hurwitz, and J. Massague. 1995. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* **375**:159-161.
- Martin-Castellanos, C., and S. Moreno. 1997. Recent advances on cyclins, CDKs and CDK inhibitors. *Trends Cell Biol.* **7**:95-98.
- Massague, J., and K. Polyak. 1995. Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**:91-96.
- Missero, C., F. Di Cunto, H. Kiyokawa, A. Koff, and G. P. Dotto. 1996. The absence of p21^{Cip1/WAF1} alters keratinocyte growth and differentiation and promotes *ras*-tumor progression. *Genes Dev.* **10**:3065-3075.
- Mudryj, M., S. W. Hiebert, and J. R. Nevins. 1990. A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J.* **9**:2179-2184.
- Neuman, E., E. K. Flemington, W. R. Sellers, and W. G. Kaelin. 1994. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol. Cell. Biol.* **14**:6607-6615.
- Pagano, M., M. Durst, S. Joswig, G. Draetta, and P. Jansen-Dürr. 1992. Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. *Oncogene* **7**:1681-1686.
- Perros, M., L. Deleu, J. M. Vanacker, Z. Kherrouche, N. Spruyt, S. Faisst, and J. Rommelaere. 1995. Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and in its stimulation in *ras*-transformed cells. *J. Virol.* **69**:5506-5515.
- Perros, M., et al. Submitted for publication.
- Pines, J. 1995. Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv. Cancer Res.* **66**:181-212.
- Pines, J. 1995. Cyclins, CDKs and cancer. *Semin. Cancer Biol.* **6**:63-72.
- Polyak, K., J. Y. Kato, M. J. Solomon, C. J. Sherr, J. Massague, J. M. Roberts, and A. Koff. 1994. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* **8**:9-22.
- Polyak, K., M. H. Lee, H. Erdjument Bromage, A. Koff, J. M. Roberts, P. Tempst, and J. Massague. 1994. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimetogenic signals. *Cell* **78**:59-66.
- Resnitzky, D., M. Gossen, H. Bujard, and S. I. Reed. 1994. Acceleration of the G₁/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* **14**:1669-1679.
- Rhode, S. D. 1973. Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system. *J. Virol.* **11**:856-861.
- Sassone-Corsi, P. 1995. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**:355-377.
- Schulze, A., K. Zerfass, D. Spitkovsky, S. Middendorp, J. Berges, K. Helin, P. Jansen-Dürr, and B. Henglein. 1995. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:11264-11268.
- Seed, B., and J. Y. Sheen. 1988. A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acetyl-transferase activity. *Gene* **67**:271-277.
- Shao, Z. H., and P. D. Robbins. 1995. Differential regulation of E2F and Sp1-mediated transcription by G1 cyclins. *Oncogene* **10**:221-228.

47. Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* **9**:1149-1163.
48. Shiyonov, P., S. Bagchi, G. Adami, J. Kokontis, N. Hay, M. Arroyo, A. Morozov, and P. Raychaudhuri. 1996. p21 disrupts the interaction between cdk2 and the E2F-p130 complex. *Mol. Cell. Biol.* **16**:737-744.
49. Siegl, G., and M. Gautschi. 1973. The multiplication of parvovirus Lu3 in a synchronized culture system. II. Biochemical characteristics of virus replication. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **40**:119-127.
50. Smith, E. J., and J. R. Nevins. 1995. The Rb-related p107 protein can suppress E2F function independently of binding to cyclin A/cdk2. *Mol. Cell. Biol.* **15**:338-344.
51. Southern, P. J., and P. Berg. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under the control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:327-341.
52. Spegelaere, P., B. van Hille, N. Spruyt, S. Faisst, J. J. Cornelis, and J. Rommelaere. 1991. Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-*ras* oncogene. *J. Virol.* **65**:4919-4928.
53. Suzuki Takahashi, L., M. Kitagawa, M. Saijo, H. Higashi, H. Ogino, H. Matsumoto, Y. Taya, S. Nishimura, and A. Okuyama. 1995. The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene* **10**:1691-1698.
54. Tattersall, P., and J. Bratton. 1983. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* **46**:944-955.
55. Tommasi, S., and G. P. Pfeifer. 1995. In vivo structure of the human *cdc2* promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of *cdc2* expression. *Mol. Cell. Biol.* **15**:6901-6913.
56. Vairo, G., D. M. Livingston, and D. Ginsberg. 1995. Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev.* **9**:869-881.
57. Vanacker, J. M., R. Corbau, G. Adelmant, M. Perros, V. Laudet, and J. Rommelaere. 1996. Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element. *J. Virol.* **70**:2369-2377.
58. Won, K. A., Y. Xiong, D. Beach, and M. Z. Gilman. 1992. Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:9910-9914.
59. Yee, A. S., P. Raychaudhuri, L. Jakoi, and J. R. Nevins. 1989. The adenovirus-inducible factor E2F stimulates transcription after specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* **9**:578-585.
60. Yoshizumi, M., C. M. Hsieh, F. Zhou, J. C. Tsai, C. Patterson, M. A. Perrella, and M. E. Lee. 1995. The ATF site mediates downregulation of the cyclin A gene during contact inhibition in vascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* **15**:3266-3272.
61. Zerfass, K., A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein, and P. Jansen-Dürr. 1995. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J. Virol.* **69**:6389-6399.
62. Zerfass-Thome, K., A. Schulze, W. Zwerschke, B. Vogt, K. Helin, J. Bartek, B. Henglein, and P. Jansen-Dürr. 1997. p27^{KIP1} blocks cyclin E-dependent transactivation of cyclin A gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **17**:407-415.

2.4.3 Discussion

2.4.3.1 Activation du promoteur P4 en phase S par les facteurs de transcription E2F/DP

Nous avons identifié un premier élément susceptible de participer à la dépendance des parvovirus vis-à-vis de la prolifération cellulaire: le motif E2F. L'intégrité de ce motif est indispensable à l'induction du promoteur P4 lors de la phase S du cycle cellulaire. Cette induction contribue, comme nous le verrons, à l'enclenchement d'une production massive de protéine NS1 lorsque les cellules hôtes entrent en phase S. Toutefois l'activité du promoteur P4 en phase G1 n'est pas nulle. Il est donc possible que le taux de NS1 produit en G1 soit suffisant pour la réplication du virus et que cette dernière ne se fasse pas pour d'autres raisons (par exemple l'absence de conversion du génome viral monocaténaire en forme répllicative bicaténaire). Afin d'analyser le rôle précis du motif E2F dans le cycle viral, l'effet de mutations introduites dans ce site doit être testé au sein de clones génomiques viraux, ce qui fera l'objet du cinquième article.

Le motif E2F fixe des facteurs de transcription de la famille E2F/DP, inactivés en G1 par la protéine p130 et en fin de phase S par le complexe p107/cycline A/cdk2. Nos résultats montrent clairement que lors de la phase G1 le site E2F du promoteur P4 est inactif mais n'est pas inhibiteur. Des résultats différents ont été rapportés pour d'autres promoteurs dont l'activité transcriptionnelle s'est avérée être inhibée par des protéines à domaine "poche" qui s'y lie par l'intermédiaire d'un facteur de transcription (Weintraub *et al.*, 1995, Weintraub *et al.*, 1992). Ainsi pRb s'associe à une protéine dé-acétylant les histones et inhibe l'activité de l'ARN polymérase II (Brehm *et al.*, 1998, Luo *et al.*, 1998, Magnaghi-Jaulin *et al.*, 1998). On peut supposer que les autres protéines à domaine "poche" agissent par un mécanisme similaire. Les travaux de Rolf Müller suggèrent que l'inhibition de promoteurs en G1 requiert un motif AGGA à proximité du site E2F (Zwicker & Müller, 1997). Ce motif existe effectivement à proximité du motif E2F du promoteur P4, mais fixe le facteur de transcription Ets. Nous n'avons pas pu mettre en évidence aucune autre protéine associée au motif AGGA. Nous pouvons ainsi supposer que l'absence d'inhibition via le motif E2F en G0/G1 est liée au contexte du promoteur P4, en particulier la présence d'un site activateur EBS (reconnu par le facteur Ets) à proximité immédiate du site E2F, et d'éléments de fixation de facteurs ATF/CREB (qui peuvent interagir avec d'autres protéines acétylant les histones). A ce titre il

serait intéressant de comparer les activités des simples mutants CRE⁻E2F⁺, CRE⁺E2F⁻ et du double mutant CRE⁻E2F⁻ en G0/G1 afin de déterminer si le site E2F devient un répresseur en absence des éléments CRE.

Les complexes E2F observés dans le contexte du promoteur P4 sont semblables à ceux décrits pour les membres E2F-4 et E2F-5 (Beijersbergen & Bernards, 1996). Ces derniers interagissent spécifiquement avec les protéines p130 et p107. Cependant aucun des anticorps dirigés contre E2F-4 que nous avons utilisés ne semble capable de modifier les complexes liés à la sonde E2F. Un autre test possible de l'implication de E2F4 ressort de récentes publications montrant que ce facteur n'est pas présent au sein du noyau lors de la phase S (Muller *et al.*, 1997, Verona *et al.*, 1997). Toutes nos études ont été réalisées à l'aide d'extraits cellulaires totaux, ne permettant pas de distinguer les protéines nucléaires des protéines cytoplasmiques. Il serait intéressant d'analyser séparément les protéines cytoplasmiques et nucléaires obtenues à différentes phases du cycle cellulaire, afin de déterminer si les complexes observés à la transition G1/S impliquent un facteur qui est exclu du noyau lors de la progression en S.

2.4.3.II Inhibition du promoteur P4 dans des cellules à confluence

Les éléments CRE sont responsables de la répression du promoteur P4 dans des cellules à confluence. Cette inhibition est perdue progressivement lorsque les cellules réintègrent le cycle mitotique. On peut cependant remarquer que l'activité du promoteur sauvage n'augmente pas lors de la phase G1, contrairement à ce que l'on attendrait de la perte de l'inhibition présente à confluence. Il se peut qu'en G1, une répression via un autre site prenne le relais de l'inhibition spécifique de l'état de confluence. A ce titre la région fixant le facteur YY-1 mérite d'être prise en considération car des observations préliminaires suggèrent qu'elle pourrait être le médiateur d'une répression du promoteur P4 dans des cellules asynchrones. Cette étude nécessite cependant d'être approfondie.

La répression de l'activité du promoteur dans des cellules à confluence peut être reproduite par sur-expression de la protéine p27 dans des cellules asynchrones. Nous avons ainsi découvert une nouvelle propriété de la protéine p27 qui permet de la distinguer de la protéine p21, un autre membre de la famille CIP/KIP. Ceci nous conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle cette inhibition requiert le domaine C-terminal de la protéine p27, les domaines N-terminaux de p21 et p27 étant homologues (Sherr & Roberts, 1995). L'introduction de mutations dans les éléments CRE n'est pas suffisante pour abolir entièrement la répression du

promoteur P4 par p27 dans des cellules asynchrones. Il est connu que la protéine p27 peut inactiver des promoteurs possédant un élément E2F, en empêchant la phosphorylation de protéines "poche" à fonction inhibitrice. Il s'en sort que la répression résiduelle observée pourrait se faire par l'intermédiaire du site E2F du promoteur P4. Toutefois lorsque la protéine p27 est sur-exprimée dans des cellules à confluence, seuls les éléments CRE sont impliqués dans la répression du promoteur. Ceci suggère que l'effet répresseur de p27 via les éléments CRE ne résulte pas du maintien de l'état hypo-phosphorylé des protéines "poche".

2.5 L'activation du promoteur P4 est nécessaire à la réplication du virus en phase S

2.5.1 Résumé

Le travail décrit dans les chapitres précédents a permis une meilleure compréhension des mécanismes de contrôle de l'activité du promoteur P4. Nous connaissons maintenant différents sites responsables de l'activation du promoteur P4 en réponse à la transformation cellulaire par l'oncogène *ras* et à la phase S du cycle cellulaire. Le promoteur P4 dirige l'unité de transcription NS. L'étude de P4 est basée sur l'hypothèse que la modulation du promoteur se reflète au niveau du taux de NS1 et que ce taux pourrait être un facteur limitant pour la réplication des parvovirus. Afin de tester cette hypothèse, nous avons introduit des mutations dans les sites EBS et E2F du promoteur P4, dans le contexte d'un clone génomique viral infectieux. Nous n'avons pas produit de génome viral muté au niveau des motifs CRE puisqu'il a déjà été montré que la résolution du dimère de génomes viraux requiert la fixation du facteur PIF au niveau du site CRE (Christensen *et al.*, 1997).

Nous disposons dans le laboratoire de plasmides bactériens au sein desquels la séquence d'ADN du parvovirus MVMP a été clonée sous forme double brin. Le site de résolution du pont de dimère par NS1 a été introduit à gauche de la séquence virale. L'extrémité droite possède naturellement un site de coupure par NS1. Après introduction de cette construction par transfection dans des cellules permissives, l'expression de NS1 permet l'excision du génome, par des événements de clivage analogues à ceux se produisant au cours de la réplication virale. Les mutations ponctuelles au niveau des sites EBS ou E2F du promoteur P4 ont été introduites dans ces clones viraux.

Les clones sauvage et muté dans le site EBS ont permis la production de virus à des titres équivalents. Par contre l'inactivation mutationnelle du site E2F empêche la production de particules virales après transfection du clone modifié. Le site E2F est responsable de l'activation du promoteur P4 lors de la transition entre les phases G1 et S. Nous avons donc étudié l'expression et la réplication des différents clones viraux après transfection de cellules synchronisées. Afin de pouvoir mesurer le taux de transcription en absence de réplication, c'est à dire sans augmentation du nombre de matrices d'ADN, nous avons également construit des clones dont le palindrome à l'extrémité droite du génome a été supprimé, ce qui empêche la réplication de l'ADN. A l'aide d'expériences de protection à la RNase, nous avons pu tout

d'abord vérifier que le promoteur P4 est activé en phase S et que cette activation nécessite un élément E2F fonctionnel. D'autre part nous avons montré par la quantification de l'ADN viral extrait selon la méthode de Hirt à partir des cellules transfectées, que l'inactivation du site E2F a pour conséquence l'absence de réplication de l'ADN viral. Cette observation peut être interprétée de deux façons: le taux de NS1 est un élément limitant pour la réplication virale, ou la séquence même du motif E2F est requise pour la réplication. Afin de faire un choix entre ces deux interprétations, l'expression et la réplication du mutant E2F a été analysée lorsque les protéines NS1 sont co-exprimées en trans sous contrôle du promoteur constitutif du virus CMV. Dans ce cas nous avons pu obtenir la production de particules virales, parfaitement capables d'infecter des cellules mais incapables de s'y répliquer. Ces résultats confirment l'importance de l'induction du promoteur P4 via les sites E2F en début de phase S pour assurer la production d'un taux minimal de protéine NS1 nécessaire à l'enclenchement de la réplication parvovirale.

2.5.2 Article 5

Activation of Promoter P4 of the Autonomous Parvovirus Minute Virus of Mice (MVM) at the Early S Phase is Required for Productive Infection.

LAURENT DELEU, AURORA PUJOL, STEFFEN FAISST AND JEAN ROMMELAERE*

Applied Tumor Virology, Abteilung F0100 and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 375, Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, 69120 Heidelberg, Germany

***) Corresponding author:** Applied Tumor Virology Unit,
Abteilung F0100 and INSERM U 375,
Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie,
Deutsches Krebsforschungszentrum,
Postfach 10 19 49,
69009 Heidelberg,
Germany
Phone: +49 6221 42 4960
Fax: +49 6221 42 4962

Keywords: Parvovirus / MVM / promoter / cell cycle / E2F / NS1

ABSTRACT

Autonomous parvoviruses are extensively dependent on host cell factors for all steps of their life cycle. In particular, DNA replication and gene expression of the prototype strain of the minute virus of mice (MVMp) are closely linked to the onset of host cell DNA replication, suggesting the involvement of S phase-specific host cell factors in the realization of the viral genetic program. Furthermore, the viral non-structural protein NS-1 is absolutely required for parvovirus DNA replication. We previously showed that the promoter P4, directing the expression of the transcription unit that codes for the NS proteins, is activated at the S phase onset. This activation is dependent on an E2F motif in the proximal region of promoter P4. An infectious MVM clone was mutated in the E2F motif of P4. The wild-type and the E2F mutant derivative were tested for their ability to produce viral progeny after transfection in permissive cell lines. The E2F mutation abolished P4 activation in S phase and, consequently, inactivated the virus. The virus could be rescued when NS proteins were provided *in trans*, showing that P4 hyperactivity in S was needed to reach an initial NS1 expression level in order to start the viral replication cycle, thus explaining, at least in part, the parvoviruses dependence on proliferating cells. Hence, the S phase-specific expression of the NS transcription unit might be one important prerequisite for the concerted replication and expression of the parvoviral genome.

INTRODUCTION

Parvoviruses are a large family of viruses which infect animal species from insects to humans (24). The prototype strain of the parvovirus minute virus of mice (MVMp) belongs to the genus of autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. MVM contains a linear, single-stranded genome of about 5 kb, which comprises two overlapping transcription units. One promoter, P4, directs the synthesis of a transcript whose spliced derivatives, R1 and R2, encode the non-structural proteins NS-1 and NS-2, respectively. NS-1 and NS-2 are phosphoproteins which share their 85 N-terminal

amino acids, but differ in their C-terminal portion as a result of the splicing process (6). NS-1 is a multifunctional DNA-binding protein, endowed with ATPase, helicase and nickase activities (5, 33). These functions are required for parvovirus DNA replication. Besides its replicative activities, NS-1 has been described to exert cytotoxic activities, notably in transformed cells, and to act as a transcriptional transregulator (32). Among others, NS-1 transactivates the second parvovirus promoter, P38, that regulates the expression of the transcription unit encoding the viral capsid proteins VP1 and VP2 (4, 17).

Because of their low genetic complexity, parvoviruses depend extensively on host cell

factors for all steps of their life-cycle (30). The availability of these factors is largely dependent on the proliferative activity of the host cell. As already described for other DNA viruses, parvovirus replication depends on cellular functions transiently expressed during the S phase of the cell cycle (22, 25, 29). However, parvoviruses distinguish themselves from other DNA viruses by their inability to induce resting cells to enter S phase (29). Hence, before starting their replication cycle, parvoviruses have to wait until the host cells enter a new round of DNA replication by their own program.

It has been shown that the early steps of the parvovirus life cycle can proceed irrespective of the host cell's position in the cell cycle, allowing parvoviruses to infect resting and proliferating cells with the same efficiency (22, 25, 28). The next step of the replication cycle consists in the conversion of the single-stranded virus genome into double-stranded replicative DNA, providing a duplex template that is required for parvovirus mRNA transcription. It has not yet been determined whether conversion occurs in a cell cycle-independent manner, or whether synthesis of the complementary DNA strand depends on cellular functions only provided by the host cell after S phase onset. Production of the viral proteins, NS and VP, has been described to occur only after S phase induction, thus suggesting that either conversion of the single-stranded MVM genome into a double-stranded DNA template, or expression of MVM genes, or both, might be S phase-dependent events. However, it has recently been shown (7) that the MVM P4 promoter contains a DNA element that interacts in a cell cycle-dependent manner with transcription factors of the E2F family, leading to

strong activation of promoter P4 at the very beginning of S phase. This suggests that, even if conversion might occur during G1 phase, MVM gene expression and, in particular, NS1 production will only take place at the beginning of the S phase. In this respect the P4 promoter E2F element would constitute a determinant of the S phase-dependency of parvoviruses.

Results presented in this paper indicate that parvoviruses mutated in the E2F element are unable to replicate in permissive cell lines. This failure to replicate is independent of the conversion of the genome since both infectious virions and infectious double-stranded DNA clones lost their infectivity upon mutation of the E2F-binding site. Ectopic expression of NS proteins restored infectivity of the mutant, suggesting that the E2F site of promoter P4 was not required by the MVM DNA replication machinery. It might, however, play an important role in the replication cycle by providing a threshold level of NS expression at the very beginning of S phase which would be sufficient to induce a first round of MVM DNA replication.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and synchronization.

The established A9 and NBK cell lines were grown in Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 5% aseptic fetal calf serum (FCS) at 37°C in a 5% CO₂ incubator.

Cells were arrested in G0 phase by cultivation for 72 h in MEM supplemented with 0.5% FCS (serum starvation) and synchronously released into a new cell cycle by addition of FCS to a final concentration of 20%.

Plasmids and cell transfection.

Plasmid pMVM, containing an infectious clone of MVMP, was obtained from P. Tattersall. The mutant derivatives pMVM-E2F and pMVM-Ets were constructed by site-directed mutagenesis in the proximal region of the promoter P4. The mutagenesis procedure has been previously described (7). Briefly, the 185 nt long right arm of the palindrome (fragment *AflIII*-*NcoI*), was cloned into the *SalI* site of the pAlter vector (Promega), allowing site-directed mutagenesis with the Altered Sites System (Promega) according to the manufacturer's recommendations. For this purpose we used the oligonucleotides

5'-AAACCAAGGCATGAAAAGGAAG-3' (mE2F) and 5'-AACCAAGGCGCGAAA

ATGAAGTGG-3' (mEts). The mutations (indicated in bold) abolish the binding of transcription factors of the E2F (mE2F) and Ets (mEts) families respectively. The mutated right P4 fragments were substituted for the equivalent wild-type *AflIII*-*NcoI* fragments of plasmid pMVM, thus generating pMVM-E2F and pMVM-Ets vectors. Ori^r derivatives were obtained by deleting the 329 nt *PshAI*-*XbaI* fragment, within pMVM and pMVM-E2F, containing the right-end origin of replication, yielding pMVMori^r and pMVM-E2Fori^r.

A total amount of 10 µg of plasmid DNA was used for the transfection of 10⁶ cells in a 100 mm petri dish. Cells were transfected with the polybrene/DMSO (30%) shock method (3, 13).

Hirt extraction and hybridization of viral DNA.

Viral DNA was extracted after lysis of the cells by addition of 2 ml Hirt extraction buffer (10 mM Tris pH 7.4, 10 mM EDTA, 0.6% SDS)

per 100 mm petri dish. The cell lysate was treated with proteinase K (100 µg/ml) for 3 h at 37°C. Protein and high molecular weight DNA were subsequently precipitated by addition of ¼ Vol of 5M NaCl, followed by incubation over-night on ice, and centrifugation for 1 h at 12 000 rpm in a Sorvall SS34 rotor. The supernatant was precipitated by addition of 2 ½ Vol of EtOH. The pellet was resuspended in 100 µl Tris pH 7.4:EDTA (10 mM:1 mM), treated with RNase A (50 µg/ml) for ½ h at 37°C, followed by a further proteinase K treatment (100 µg/ml) for ½ h at 37°C. After phenol-extraction and EtOH precipitation, the DNA was resuspended in 100 µl TE. 10 µl per sample were loaded on a 1% agarose gel, and the products were separated by electrophoresis in TAE buffer at 80 mA for 3 h. After electrophoresis, DNA within the gel was denatured in 0.5 M NaOH-1.5 M NaCl for 30' and neutralized in 1.5 M NaCl-0.5 M Tris-HCl (pH 7.4) for 2x 30'. Following Southern transfer on nitrocellulose (Hybond C, Amersham), the DNA was immobilized by baking for 1 h at 80°C in a dried atmosphere. The membrane was hybridized with a radioactive probe covering the *HindIII* fragment of MVMP coding for the VPs.

RNA extraction and RNase protection.

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The RNA was treated with the RQ1 DNase (Promega) prior to RNase protection assay, in order to eliminate any contaminating DNA. The P38 region of MVM was amplified by PCR using the primers 5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGGCCAGGTA CTTGTAGCCAGGAG-3' (containing the T7 promoter) and 5'-

TGGCCCATGATTTGTGC-3', allowing the synthesis of a radioactive labeled anti-sense RNA probe with the use of the T7 RNA Maxi kit (Ambion). The probe was separated on a 6% acrylamide/8M urea gel and eluted in hybridization buffer (80% formamide, 1mM EDTA, 40mM PIPES, pH 6.4, 200 mM sodium acetate). 10 µg of total RNA were hybridized overnight with 10^6 cpm of the probe in 20 µl of hybridization buffer at 50°C. 180 µl of digestion buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 200 mM sodium acetate) containing 2U of RNase One (Promega) was added to the samples. The digestion of single-stranded RNA was performed for one hour at room temperature and stopped by addition of 20 µl of 1 mg/ml tRNA in 10% SDS. The protected fragments were precipitated by adding 550 µl of cold 100% ethanol, resuspended in 10 µl loading buffer (80% deionized formamide, 1 mM EDTA, 0.1 % bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol, 0.1 % SDS) and resolved by electrophoresis through a 6% polyacrylamide/8M urea gel using 1X TBE buffer. The labeled products were detected and quantified on a Phospho Imager or by autoradiography.

DNA microinjection and filter assays.

Microinjection and DNA hybridization were performed as previously described (21). Briefly, about 500 A9 cells, localized on a marked area of a 12-mm-diameter coverslip (CELLocate; Eppendorf) were microinjected with 0.1 pl of plasmid DNA at 10 µg/ml. Microinjection was performed with a Zeiss-AIS computer-controlled system. Coverslips were further incubated for 24 h in normal growth medium at 37 °C. The cells were transferred and lysed on a nitrocellulose

filter, presaturated with 0.5 M NaOH-1.5M NaCl. Filter were neutralized with 1.5 M NaCl-0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), and the DNA was immobilized by baking for 1 h at 80°C in a dried atmosphere. The filters were hybridized with a radioactive probe covering the HindIII fragment of MVMp coding for the VPs.

Virus titration.

Two different methods were used to determine virus titers, as described by Maxwell *et al* (18). A9 or NBK cells were infected in duplicate with different dilutions of the virus, in order to determine the virus titer by plaque assay or DNA hybridization. For DNA hybridization, cells were transferred and lysed on a nitrocellulose filter, 20 hours post infections. The filters were hybridized with a radioactive probe specific for the parvovirus genome, as described in the previous section. For plaque assay, infected cells were overlaid with 2ml of 0.75% agarose in 0.5x PBS-0.5x Opti-MEM, 5% FCS. After 6 days plaque were visualized by overlay of 2 ml 0.75% agarose containing 0.04% Neutral red.

Protein analysis by Western blotting.

Extraction of total protein was performed according to Kumar *et al.* (14) with previously described modifications (2). Briefly, A9 cells were harvested with a rubber policeman, collected in ice-cold PBS, and washed twice. The pellet was resuspended in 1.5 volumes of lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.9, 0.4 M NaCl, 25% glycerol, 1 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 1mM PMSF). After incubation on ice for 20 min, the lysate was frozen at -70°C, thawed on ice, and vigorously vortexed. After centrifugation (18,000 x g, 10 min, 4°C) the supernatant was recovered, frozen in liquid

nitrogen, and used as whole-cell protein extract. 20 µg of the protein extract were fractionated by electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel containing 1% SDS. Proteins were transferred onto a Hybond ECL membrane (Amersham) in a Trans-Blot semi-dry electrophoretic transfer cell (BioRad) (200 mA for 1h) according to the manufacturer's instructions. The membranes were first incubated for 1 h in blocking buffer (5% powdered milk, 1% sodium caseinate), then for 1 h with antibodies diluted in blocking buffer. Polyclonal antisera raised against the C-terminal part of NS1 was used at a dilution of 1:2500. Each membrane was washed three times for 5 min in PBS containing 0.1% Tween20, then further incubated for 1 h with horseradish-peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit IgG (Dianova; 1:1000 dilution in blocking buffer). All incubations were performed at room temperature. Immunocomplexes were detected with ECL reagent (Amersham) according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

Construction of infectious molecular MVMp DNA clones.

It has been shown in reporter gene assays that the activity of the P4 promoter is modulated in *cis* through motifs known to bind cellular transcription factors. Among others, an Ets- and an E2F-binding site were found within the proximal P4 promoter region (7, 11). The E2F-binding site mediates the activation of the P4 promoter at the very beginning of the S phase of the cell cycle, and its destruction reduces P4 activity by 80% in S phase, but has no obvious transcriptional effect during other phases of the

cell cycle (7). The Ets-binding site activates promoter P4 in a cell cycle-independent manner, and its destruction reduces P4 activity by about 40 to 50% during both G1 and S phase.

In order to investigate whether the S phase-specific activation of promoter P4 has any physiological importance for the MVM replication cycle, infectious molecular MVM clones were constructed carrying point mutations within either the E2F- or, as a control, the Ets-binding site. The Ets-binding site was chosen as a control for S phase-specific transcriptional activation since the Ets- and the E2F-binding site, respectively, have similar importance for the overall P4 promoter activity measured in asynchronously growing cells (9). To this end, a full-length double-stranded genome of MVMp was cloned into a plasmid backbone, giving rise to plasmid pMVM. After transfection in permissive cells, the MVMp genome becomes excised from the vector, replicates and leads to production of viral particles. Subsequently, point were introduced by site-directed mutagenesis which had previously been shown to inactivate the respective DNA elements (7, 11). The clones obtained, referred to as pMVM-E2F and pMVM-Ets, as well as the wild-type clone, pMVM, were fully sequenced to verify that no further mutations had been introduced during the cloning process. The sequence of the three clones did not differ from each other apart from the mutations introduced by directed mutagenesis, but showed some minor divergences compared to the published MVMp sequence. These alterations were mainly located within the non-translated 5'-region of the MVM genome, and may be explained by inter-clone variations (data not shown).

Table 1: Titers of virus produced by transfection of permissive cell lines with wild type and mutant derivatives parvoviruses.

| producer cell line | A9 | | | NBK | | |
|---------------------|----------------------|----------|----------------------|----------------------|----------|----------------------|
| Viral clone | pMVM | pMVM-E2F | pMVM-Ets | pMVM | pMVM-E2F | pMVM-Ets |
| Indicator cell line | | | | | | |
| A9 | 8,4.10 ⁵ | 43,33 | 8,72.10 ⁵ | 4,13.10 ⁵ | 18,33 | 3,78.10 ⁵ |
| NBK | 9,43.10 ⁵ | 53 | 8,74.10 ⁵ | 7,8.10 ⁵ | 34 | 8,74.10 ⁵ |

Cultures of 10⁶ A9 or NBK cells were transfected with 10 µg DNA of pMVM or the respective mutant derivatives pMVM-E2F and pMVM-Ets. Cells and supernatants were collected 7 days post-transfection, submitted to sonication in order to release progeny virus. The virus titer in the different supernatants was determined on both A9 and NBK cells by DNA hybridization, according to Maxwell *et al* (18)

Destruction of the P4 promoter E2F-binding site causes defectiveness of the MVMp genome.

Wild-type plasmid DNA and mutant derivatives thereof were subsequently transfected into cells of the permissive mouse A9 and human NBK cell lines, respectively. One week post-transfection, when pMVM- and pMVM-Ets-transfected cells showed a clear cytopathic effect (CPE), the cultures were harvested and briefly sonicated to release progeny virions. No CPE was observed at this time or later (up to 5 weeks) in cultures transfected with pMVM-E2F. In order to quantify the number of progeny virus produced, indicator cell cultures (A9 and NBK cells, respectively) were subsequently infected with serial dilutions of the virus suspensions obtained. 48 hours post-infection, infected indicator cells were transferred *in situ* onto nitrocellulose membranes and hybridized with radioactively labeled MVM DNA. Single cells which had been infected and in which the viral genome was amplified were then visualized by

autoradiography, allowing the determination of the titer of virions allowing transduction of the viral genome ("transducing units", Tab. 1). pMVM and pMVM-Ets gave rise to equivalent numbers of progeny virus, irrespective of the cell line used for preparation and/or titration (Tab. 1). However, the yield of progeny virus after transfection with clone pMVM-E2F was found to be very low, both in A9 and NBK cells (Tab. 1), suggesting that the deficiency of the E2F-mutant was not species-specific. Hence, the lack of cytopathogenicity after transfection of the E2F-mutant might be due to the virtual absence of virion production.

The E2F-binding site of promoter P4 is required for the burst of viral gene expression at the G1/S phase transition.

The parvovirus replication cycle is S phase-dependent, and synthesis of viral transcripts can only be observed after the onset of host cell S phase (23). In reporter gene assays, S phase-activation of promoter P4 requires a functional

E2F element (7). Hence, viral transcription was analyzed as a function of the cell cycle after transfection of pMVM, pMVM-Ets and pMVM-E2F DNA, respectively, in synchronized A9 cells. To this end, A9 cells were serum starved for 72 hours in 0.5 % FCS, arresting more than 95% of the cell population in G0 phase. At this time, arrested cells were transfected with the different MVM constructs and subsequently released from growth arrest by increasing the serum concentration to 20% at 24 h, 32 h, 36 h, 40 h and 48 h post transfection. Total RNA was isolated at 48 h post transfection, when cells were, according to the time of induction with serum, in G0 (0 h after induction), G1 (8 h after induction) or S phase (12 h, 16 h and 24h after induction). The amount of viral messenger RNA species was subsequently analyzed by RNase protection assay. As expected, wild-type and Ets-mutant, but not E2F-mutant MVM genomes were transcribed in a cell cycle-dependent manner (Fig. 1). Transcription of wild-type or Ets-mutant genomes took place at a low level during G0 and G1, but was strongly activated during S phase (Fig. 1). This is in particular true for the R3 transcript, which is directed by the P38 promoter. As mentioned above, promoter P38 is transactivated by the non-structural protein NS1 (4), which is expressed from the R1 transcript. Hence, the strong induction of the R3 messenger transcription indicated that functional NS1 was produced in the transfected cells. The MVM genome carrying a point mutation within its E2F-binding site, however, did not show any change in the transcription rate after S phase onset, suggesting that, also in the viral context, inactivation of the E2F-binding site impairs the S

phase-specific burst of viral transcription, both directed from promoters P4 and P38.

The lack of S phase-specific gene expression of the E2F-mutant correlates with its inability to replicate its genome.

The burst of viral transcription in early S phase might be due to E2F-mediated P4 promoter activation. However, also template amplification, occurring in early S phase as a consequence of the onset of parvoviral genome replication, could be responsible for the increased transcription rates. In order to analyze, whether enhanced promoter activity, or DNA replication, or both, were implicated in S phase-specific MVM transcription, we analyzed both transcription rates and genome amplification of pMVM and pMVM-E2F DNA by RNase protection and Southern blot analysis, respectively. As controls, replication-deficient pMVM and pMVM-E2F clones, referred to as pMVMori⁻ and pMVM-E2Fori⁻, were analyzed in parallel. The ori⁻-constructs were obtained by deleting the right hand origin of replication of the wild-type and E2F-mutant clones, respectively.

The replication-deficient pMVMori⁻ clone was found to retain its ability to induce S phase-specific transcription of the "early" R1 and R2 mRNAs (Fig. 2A), although to a significantly lesser extent as observed with the wild-type pMVM clone (Fig. 2C). This suggests that the induction of transcription observed with pMVMori⁻ was directly linked to S phase-specific P4 promoter activation, whereas the enhanced transcription rate of pMVM would result from the concerted action of P4 promoter activation and DNA template amplification. On the other hand, both the pMVM-E2F clone and its replication-

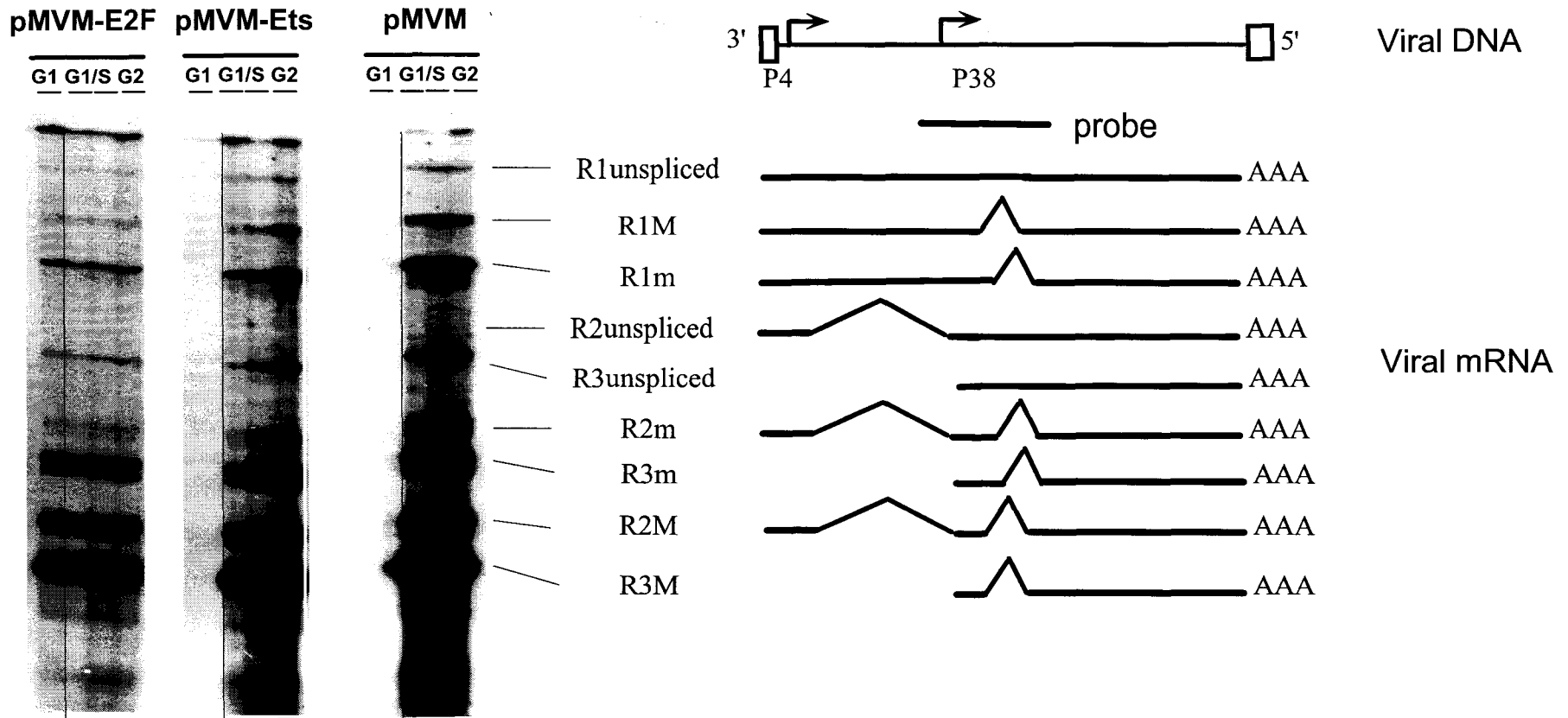


Figure 1: Expression of the different viral mRNA species in synchronously growing A9 cells.

G0 arrested A9 cells were transfected with plasmid DNA of the pMVM, pMVM-Ets or pMVM-E2F viral clones. DCS was added to a final concentration of 20 % at 24 h (G2), 32 h (S), 36 h (G1/S) and 44 h (G1) post transfection. Total RNA was extracted 48 h post transfection and used for RNase protection. The localization on the viral DNA of the RNA probe used for the RNase protection as well as the different viral mRNA species, major (M) and minor (m) are illustrated on the right panel of the figure.

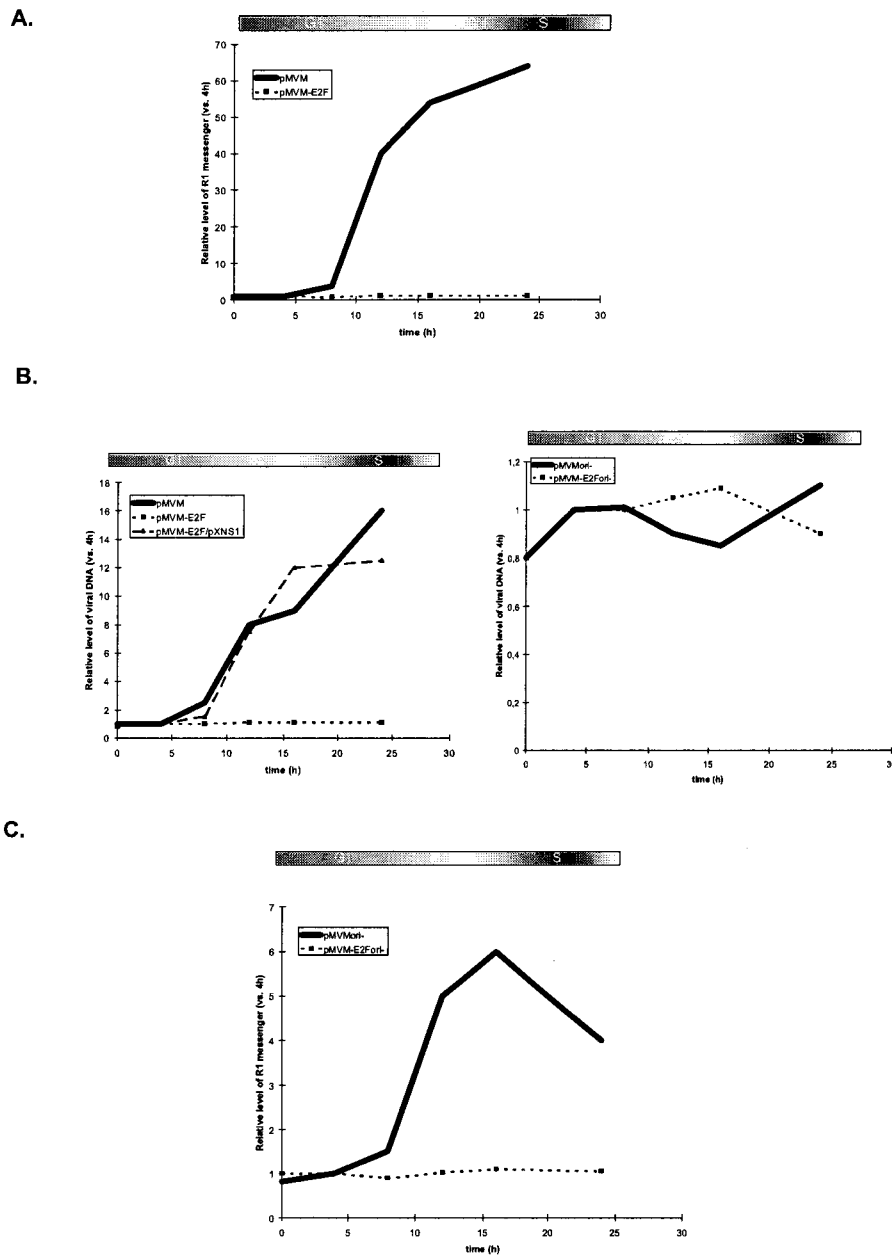


Figure 2: Activation of viral DNA expression and replication in populations of synchronously growing A9 cells.

G0 arrested cells were transfected with pMVM or pMVM-E2F replicative competent (A. and B. upper panel), pMVMori- or pMVM-E2Fori- (B. lower panel and C) replicative incompetent. Serum was added to a final concentration of 20% at 24 h (G2), 32 h (S), 36 h (G1/S), 40 h (G1), 44 h (G1) and 48 h (G0) post transfection. RNA and viral DNA were isolated 48 h post transfection. The relative amount of the replicative viral forms and R1 mRNA were estimated by use of a phospho imager. The ratios of the sum of the different values obtained for the R1 mRNA species at a given time post serum induction over the similar sum at the time 4 h, are presented (A and C). The same calculations were done with the replicative viral DNA (B). Plasmid pXNS1 directs the expression of NS1 proteins under the control of the constitutive CMV early promoter. Cells co-transfected with the pMVM-E2F construct and pXNS1 were analyzed for DNA replication of the MVM-E2F virus only.

deficient derivative did not show any induction of P4 promoter-directed transcription after S phase onset (Fig. 2A and C). This finding suggests that not only pMVM-E2Fori⁻, but also pMVM-E2F might represent replication-deficient parvovirus genomes. In order to test this latter possibility, Southern blot analysis was performed. Indeed, no changes in the DNA amount of pMVMori⁻, pMVM-E2Fori⁻, and pMVM-E2F (Fig. 2B) were observed at different time points post release.

Altogether, these data point to a dual role of the E2F-binding site for the parvovirus replication cycle: firstly, E2F mediates P4 promoter activation at the G1/S transition in a DNA replication-independent manner. Secondly, a functional E2F-binding site seems to trigger MVM DNA replication, since its destruction renders the MVM genome replication-deficient. In turn, ongoing DNA replication influences the efficiency of gene transcription positively, most probably by providing increased numbers of transcriptionally active DNA templates.

Replication-competence of pMVM-E2F can be restored *in trans* by protein NS1.

The replication-deficiency of pMVM-E2F either might be due to the requirement of the replication machinery for the E2F-binding site itself, or may be a consequence of an insufficient level of expression of NS proteins in S phase. If the amount of NS1 would be the limiting factor, ectopic expression of NS proteins should render pMVM-E2F replication-competent.

In order to test this possibility, Southern blot analysis of pMVM-E2F DNA, which had been co-transfected with a NS-expressing plasmid (pXNS1) in synchronized A9 cells, was performed. Indeed, ectopic expression of NS

proteins restored the ability of the E2F-mutant to replicate its DNA to an extent which was similar to that found with wild-type MVM DNA (Fig. 2B). Hence, these findings suggest that destruction of the E2F-binding site within promoter P4 did not prevent virus replication because a functional E2F-binding site was required for the replication machinery, but because of the failure of the E2F-mutant to induce the expression of sufficient NS proteins to induce DNA replication.

In support of this assumption, pMVM and pMVM-E2F constructs were compared for their ability to express NS1 in G1 and S phase in synchronized A9 cells in the absence and presence of plasmid pXNS1. In the absence of pXNS1, no NS1 expression could be detected during G1 phase after transfection of either MVM clone (Fig. 3, upper panel). In the presence of pXNS1, low levels of NS1 expression were observed in G1 after transfection with pMVM and pMVM-E2F, respectively (Fig. 3, lower panel). In S phase, however, only pMVM was capable of synthesizing increased amounts of NS1 by its own program, whereas pMVM-E2F failed to do so (Fig. 3, upper panel). Co-expression of NS1, however, resulted in a S phase-specific burst of NS1 production, irrespective of the parvovirus clone analyzed (Fig. 3, lower panel). Expression of NS1 from plasmid pXNS1, however, is not expected to be S phase-regulated. Hence, this finding indicates that the low level production of NS1 brought about by plasmid pXNS1 and already observed during G1 was sufficient to induce MVM DNA replication of clone pMVM-E2F (cf. Fig. 2B). This was followed by template amplification of the mutant genome and a subsequent burst of NS production from the amplified mutant genome.

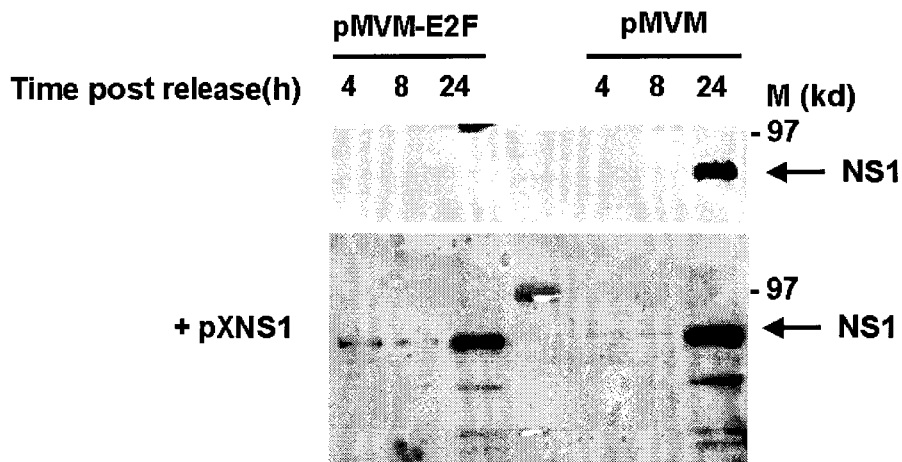


Figure 3: Level of NS1 protein in synchronously growing A9 cells, in the presence or absence of a plasmid vector overexpressing NS1.

Whole cell protein extracts, obtained at 4 h, 8 h and 24 h after serum induction of pMVM transfected cells (lane 1-3) or pMVM-E2F transfected cells (lane 4-6) in the absence (upper panel) or presence (lower panel) of a NS1 expression vector (pXNS1), were separated by 10% SDS-PAGE. NS1 was visualized, after transfer of the protein on a PVDF membrane, by a polyclonal serum directed against the C-terminal region of the protein.

In order to further substantiate this finding, microinjection experiments were carried out which allowed the administration of defined amounts of plasmid DNA into host cells. When pMVM-E2F was injected into A9 cells either alone or together with pXNS1 in a ratio of 10:1, no replication of the mutant MVM DNA was detected subsequently by *in situ*-hybridization (Fig 4). However, increasing the ratio of pMVM-E2F/pXNS1 to 2:1 restored the ability of the mutant MVM genome to replicate (Fig 4). As a control, wild-type MVM genomes were found to replicate in the absence or in the presence of co-microinjected pXNS1 at either concentration.

These results support the assumption that the replication-deficiency of clone pMVM-E2F is due to its failure to produce sufficient amounts of NS proteins allowing the induction of DNA replication.

Production of pMVM-E2F progeny virus after ectopic NS-expression.

Since ectopic expression of NS1 was sufficient to restore S phase-specific replication and expression of the E2F-mutant MVM genome, we further studied the ability of NS proteins provided in *trans* to support the production of E2F-mutant progeny virus. Again, A9 cells were transfected with wild-type, Ets- and E2F-mutant constructs, the latter together with or without the NS-expressing plasmid, and analyzed for the production of progeny virions. Progeny viruses were quantified by both *in situ*-hybridization and plaque assays on A9 indicator cells. As already shown, wild-type and Ets-mutant constructs gave rise to similar amounts of progeny virions which were detectable both as transducing particles by the *in situ*-hybridization assay and as fully

infectious viruses by the plaque test assay (Fig. 5A and B). As expected, the pMVM-E2F transfected cells did not produce any particle that were detectable by either method (Fig. 5A and B). In the presence of the NS-expressing plasmid, however, pMVM-E2F proved to produce transducing particles, albeit to a significantly lower extent as wild-type or Ets-mutant constructs did (Fig. 5A). Nevertheless, pMVM-E2F-derived virions were found to be defective, since they were not capable of propagation by their own, as demonstrated by their failure to produce plaques in the absence of ectopic NS1 expression (Fig. 5B).

DISCUSSION

In a previous report, we showed that promoter P4 is activated at the very beginning of S phase, and that this S phase-specific activation requires a functional E2F-binding site (7). The generic name E2F designates heterodimeric transcription factors composed of two polypeptides, an E2F- and a DP-family member (15, 16, 19). The transcriptional activity of E2F-DP dimers, often referred to as "free E2F", is regulated according to the point in the cell cycle by formation of higher-order complexes. In particular, interaction with members of the "pocket protein" family (pRb, p130, p107) prevents E2F from activating responsive promoters. Binding of pocket proteins to E2F heterodimers (and hence the activity of the E2F transcription factor) is regulated by pocket protein phosphorylation, apparently catalyzed mainly by cell-cycle-regulated cyclin-dependent kinases (cdks) (8, 27). E2F proteins interact with cyclins and cdks either directly or through pocket proteins. After phosphorylation by cyclin/cdk kinases at the G1/S transition, pocket proteins can

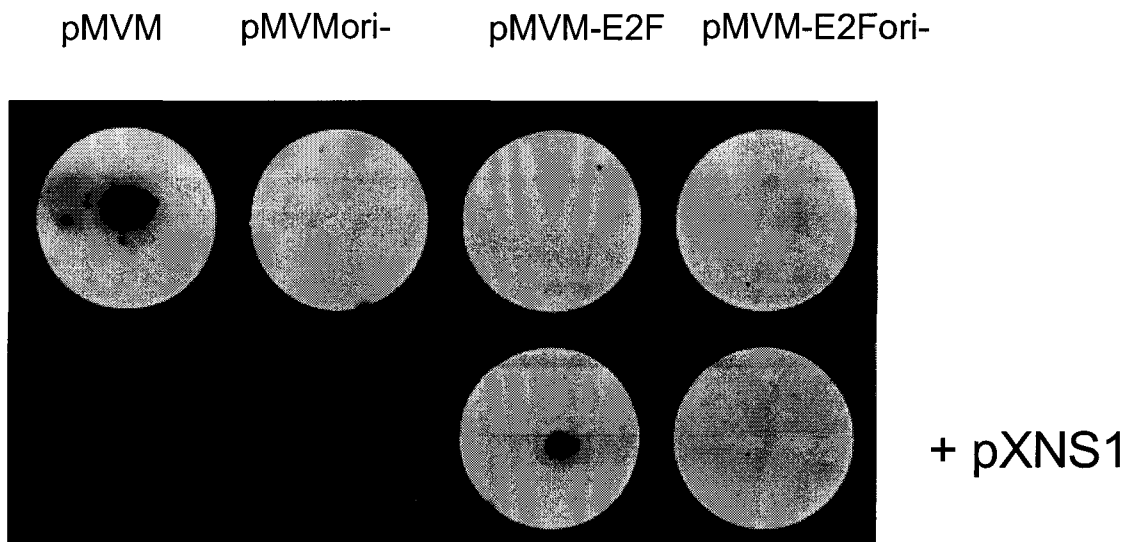
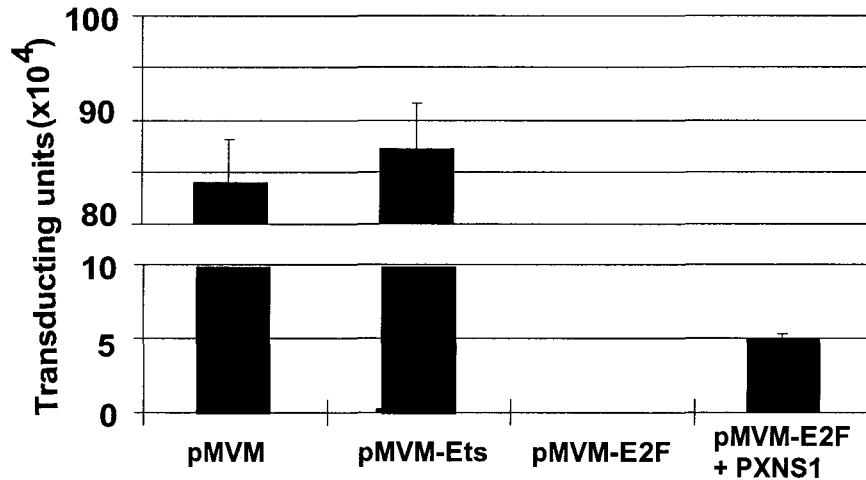


Figure 4: Replication of MVM-E2F virus after microinjection of pMVM-E2F plasmid together with a vector expressing NS1.

Around 500 A9 cells were microinjected with DNA constructs in the central part of a coverslip. 24 h post microinjection, cells were transferred on a nitrocellulose filter. DNA was extracted by lysis of the cells and fixed on the filter by baking for 1 h at 80°C. The filters were hybridized with a radioactive probe corresponding to the VP region of MVMp. Wild type and mutant derivative viral vectors, replication competent (ori+) or incompetent (ori-), were microinjected in the absence (upper panel) or presence (lower panel) of an NS1 expressing vector (pXNS1).

A.



B.

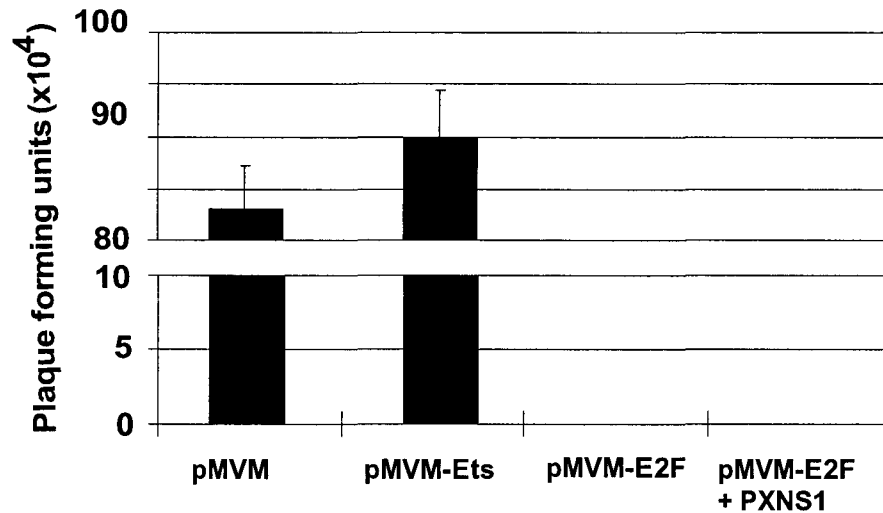


Figure 5: Titers of virus produced by transfection of A9 cells with wild type and mutant derivative MVM clones.

A9 cells were transfected with pMVM or the respective mutant derivatives pMVM-E2F and pMVM-Ets, or the pMVM-E2F mutant together with the NS1 expressing plasmid pXNS1. Cells and supernatant were collected 7 days post-transfection, submitted to sonication in order to release progeny virus. The virus titers in the different supernatants were determined on A9 cells according to Maxwell *et al* (18). (A.) 24 hours post infection cells were transferred to and lyzed on nitrocellulose filters, as described in the legend of Figure 4. The filters were hybridized with a VP specific probe, and positive spots were counted. (B.) A9 cells were subjected to the classical plaque assay protocol.

no longer bind to E2F proteins. This leads to the formation of transcriptionally active 'free E2F', known to transactivate target promoters at the G1/S transition (20).

Accordingly, variations in P4 promoter activity throughout the cell cycle correlate with the binding of different complexes to the E2F binding site. During G1 phase, this site is occupied by an E2F-p130 protein complex. In agreement with the ability of p130 to prevent E2F from activating transcription (31), only basal P4 activity is detected in G1. P4 activation at the G1/S transition is accompanied by replacement of the E2F/p130 complex by "free" E2F at the E2F binding site, in keeping with the view that "free" dimers are the transcription-enhancing forms of E2F (1). Transient P4 hyperactivity during S phase coincides with maintenance of "free" E2F at this site and the appearance of an additional higher-order complex containing p107, cyclin A, and cdk2. This complex is thought to be involved in the later inhibition of E2F-mediated transactivation (1). All these complexes fade in late S and G2, when the P4 promoter reverts to its basal activity.

The above data were obtained by transfection of reporter gene plasmids in which promoter P4 directs the expression of the firefly luciferase gene. In this report, we extend our previous observations by showing, also in the viral context, (i) that promoter P4 is activated during S phase, (ii) that this activation requires a functional E2F-binding site and (iii) is crucial for the viral replication cycle.

In reporter gene assays, when cells released from serum starvation entered S phase, promoter P4 was shown to be activated by a factor of ten. Results presented in this report, measured by

RNase protection assays, indicate an S phase-specific increase of R1 mRNA synthesis in the absence of ongoing DNA replication by a factor of about five. This difference might be explained by variations in the stability or elongation efficiency of R1 and luciferase mRNAs, respectively, or by the possibility that P4 promoter regulation in the viral context differs from that of the isolated P4 promoter. However, if S phase-activated transcription occurs in parallel to DNA replication, R1 mRNAs were found to be accumulated by a factor of about 60. Even when P4 promoter activity decreased in the middle of S phase, which was observed in reporter gene assays and confirmed herein with replication-deficient mutants, the total amount of R1 mRNA still increased due to viral DNA amplification. Thus, the burst in viral transcription is not only due to increased P4 promoter activation, but also to template amplification due to ongoing DNA replication.

Because of their low genetic complexity, parvoviruses require a variety of host cell factors for their replication. In particular, parvoviruses depend heavily on host cells entering S phase, pointing to an urgent need for host cell factors provided only by host cells duplicating their own DNA. The parvovirus replication cycle comprises a number of steps which may or may not require S phase-specific cellular factors.

Firstly, conversion of the single-stranded genome into a duplex molecule may require enzymes (such as polymerases) that are only active in S phase. It is, however, still unclear whether the viral genome already becomes converted in G1 phase of the host cell cycle, or whether this step is dependent on the S phase

onset. It is generally admitted that conversion has to take place before parvovirus DNA replication and gene transcription can occur, both being only observed after S phase onset. This might implicate conversion as an S phase-specific event. However, results presented in this report suggest that the presence of double-stranded genomic DNA, at least in the context of plasmid DNA, was not sufficient to allow induction of DNA replication and gene expression. Hence, irrespective of whether conversion is an S phase-dependent phenomenon or not, further S phase-specific events have to take place before an infection cycle is induced.

Secondly, before replication of converted duplex genomes can occur, NS1 protein has to be produced, which necessitates the presence of a double-stranded transcriptionally active (converted) DNA template. Subsequent steps within the replication cycle, i. e. synthesis of higher order replicative forms of DNA, require both the presence of NS1 and a number of host cell factors, S phase-specific, presumably involved in the replication complex. The requirement of parvoviruses for S phase-specific enzymatic activities that catalyze DNA replication is very likely to account for their S phase-dependency. Our results indicate that, although double-stranded template was already present and although low-level transcription of the NS transcription unit could already be observed during G1 phase, NS1 expression was only detectable after S phase onset. This might be explained by a further S phase-specific requirement, that had to be fulfilled before DNA replication can occur. This additional requirement involved a functional E2F-binding site, which was not implicated in replicative processes, but in S

phase-specific activation of NS gene transcription. Accordingly, ectopic expression of NS proteins was found to overcome the defectiveness imposed by an inactive E2F-binding site.

Together, these data suggest that, in order to successfully initiate parvovirus DNA replication, a minimum level of NS1 protein has to be synthesized in the host cell. This assumption was verified by showing that low amounts of NS-expressing plasmids co-injected into permissive host cells did not restore replication-competence of E2F-mutant MVM genomes. Hence, E2F-mediated P4 promoter activation at the very beginning of S phase seems to be required in order to surpass a threshold level in NS1 concentration and to subsequently trigger DNA replication. Ongoing replication, in turn, led to the amplification of transcription templates, further increasing NS production. This circuit composed of two S phase-dependent steps seems to constitute the main regulatory event determining S phase-dependency of MVM infection.

The restriction imposed by the need of S phase-specific P4 promoter activation could be easily bypassed by the evolutionary development of a P4 promoter with stronger basal activity. This would, however, result in strong expression of the cytotoxic NS proteins during other phases of the cell cycle, where they are not required for the virus replication cycle. Hence, it might be speculated that expression of NS proteins during other cell cycle phases than S would have either direct or indirect negative effects for virus multiplication within its host. In natural rat or mouse populations, parvovirus infections are often persistent and without clinical signs (12). In most cases, the infectious viral DNA persists in animal

tissue, without any sign of gene expression. This DNA does not seem to be defective since induction of cell proliferation, like tumor formation or organ regeneration, allows the expression of the viral genes and production of viral progeny. The absence of viral expression could be explained by the maintenance of the viral DNA in the single-stranded conformation. However, for other parvoviruses like AAV, it has been shown that after infection of muscle cells, no expression is detected due to the absence of conversion of the viral genome. But, one week post infection, a significant population of the viruses converts its DNA and expresses the viral products (10, 26). It cannot be excluded that

mechanisms may exist in persistently MVM infected cells, that allow conversion of the genome prior to S-phase entry. This suggests that mechanisms may exist disabling gene expression from converted genomes in other cell cycle phases, thus allowing inapparent infection of healthy tissues by parvoviruses. In that case the E2F site may serve as such a viral control element. Therefore, it would be of particular interest to analyze a mutant virus in which a motif that binds a strong and constitutive activator of transcription is substituted for the E2F motif and the ability of this mutant to induce persistent infection.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Roger Fisher (DKFZ, Heidelberg, Germany) for help with the microinjection procedure, Tarig Bashir (DKFZ) for fruitful discussion and critical reading of the manuscript. This work was supported by the Commission of the European Community. L.D. and A.P. are fellows of the Commission of the European Communities.

REFERENCES

1. **Beijersbergen, R. L., and R. Bernards.** 1996. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1287**:103-120.
2. **Boeuf, H., B. Reimund, P. Jansen Durr, and C. Keding.** 1990. Differential activation of the E2F transcription factor by the adenovirus E1a and E1V products in F9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:1782-1786.
3. **Chaney, W. G., D. R. Howard, J. W. Pollard, S. Sallustio, and P. Stanley.** 1986. High-frequency transfection of CHO cells using polybrene. *Somat. Cell Mol. Genet.* **12**:237-244.
4. **Christensen, J., S. F. Cotmore, and P. Tattersall.** 1995. Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J. Virol.* **69**:5422-5430.
5. **Cotmore, S. F., J. Christensen, J. P. Nuesch, and P. Tattersall.** 1995. The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]₂₋₃. *J. Virol.* **69**:1652-1660.
6. **Cotmore, S. F., and P. Tattersall.** 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrate. *Adv. Virus Res.* **33**:91-174.
7. **Deleu, L., F. Fuks, D. Spitkovsky, R. Horlein, S. Faisst, and J. Rommelaere.** 1998. Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells. *Mol Cell Biol.* **18**:409-19.
8. **Dynlacht, B. D., O. Flores, J. A. Lees, and E. Harlow.** 1994. Differential regulation of E2F trans-activation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev.* **8**:1772-1786.

9. **Faisst, S., M. Perros, L. Deleu, N. Spruyt, and J. Rommelaere.** 1994. Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice. *Virology*. **202**:466-470.
10. **Ferrari, F. K., T. Samulski, T. Shenk, and R. J. Samulski.** 1996. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol*. **70**:3227-34.
11. **Fuks, F., L. Deleu, C. Dinsart, J. Rommelaere, and S. Faisst.** 1996. ras oncogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of mice through a proximal P4 element interacting with the Ets family of transcription factors. *J. Virol*. **70**:1331-1339.
12. **Gaertner, D. J., A. L. Smith, and R. O. Jacoby.** 1996. Efficient induction of persistent and prenatal parvovirus infection in rats. *Virus Res*. **44**:67-78.
13. **Kawai, S., and M. Nishizawa.** 1984. New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1172-1174.
14. **Kumar, V., and P. Chambon.** 1988. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*. **55**:145-156.
15. **La Thangue, N. B.** 1994. DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. *Trends Biochem. Sci.* **19**:108-114.
16. **La Thangue, N. B.** 1996. E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control. *Biochem. Soc. Trans.* **24**:54-59.
17. **Lorson, C., L. R. Burger, M. Mouw, and D. J. Pintel.** 1996. Efficient transactivation of the minute virus of mice P38 promoter requires upstream binding of NS1. *J. Virol.* **70**:834-842.
18. **Maxwell, I. H., and F. Maxwell.** 1994. A modified plaque assay and infected cell hybridization assay for wild-type and recombinant LuIII autonomous parvovirus. *Biotechniques*. **16**:876-81.
19. **Mudryj, M., S. W. Hiebert, and J. R. Nevins.** 1990. A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *EMBO J.* **9**:2179-2184.
20. **Neuman, E., E. K. Flemington, W. R. Sellers, and W. G. Kaelin.** 1994. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol. Cell. Biol.* **14**:6607-6615.
21. **Pujol, A., L. Deleu, J. P. Nuesch, C. Cziepluch, J. C. Jauniaux, and J. Rommelaere.** 1997. Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1. *J Virol*. **71**:7393-403.
22. **Rhode, S. d.** 1973. Replication process of the parvovirus H-1 I Kinetics in a parasynchronous cell system. *J. Virol.* **11**:856-861.
23. **Schoborg, R. V., and D. J. Pintel.** 1991. Accumulation of MVM Gene Products Is Differentially Regulated by Transcription Initiation-RNA Processing and Protein Stability. *Virology*. **181**:22-34.
24. **Siegl, G.** 1984. Biology and pathogenicity of autonomous parvoviruses, p. 297-348. *In* K.I.Berns (ed.), *The parvoviruses*. Plenum Press, New York.
25. **Siegl, G., and M. Gautschi.** 1973. The multiplication of parvovirus Lu3 in a synchronized culture system II Biochemical characteristics of virus replication. *Arch.Gesamte.Virusforsch.* **40**:119-127.
26. **Snyder, R. O., S. K. Spratt, C. Lagarde, D. Bohl, B. Kaspar, B. Sloan, L. K. Cohen, and O. Danos.** 1997. Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther.* **8**:1891-900.
27. **Suzuki Takahashi, I., M. Kitagawa, M. Saijo, H. Higashi, H. Ogino, H. Matsumoto, Y. Taya, S. Nishimura, and A. Okuyama.** 1995. The interactions of E2F with pRB and with p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene*. **10**:1691-1698.
28. **Tattersall, P.** 1972. Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J.Virol.* **10**:586-590.
29. **Tattersall, P., and J. Bratton.** 1983. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* **46**:944-955.
30. **Tattersall, P., and E. M. Gardiner.** 1990. Autonomous parvovirus-host-cell interactions, p. 111-121. *In* P. Tijssen (ed.), *Handbook of parvoviruses*, vol. 1. CRC Press, Boca Raton.
31. **Vairo, G., D. M. Livingston, and D. Ginsberg.** 1995. Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev.* **9**:869-881.

32. **Vanacker, J. M., and J. Rommelaere.** 1995. Non-structural proteins of autonomous parvoviruses: from cellular effects to molecular mechanisms. *Seminars in Virology*. **6**:291-297.

33. **Wilson, G. M., H. K. Jindal, D. E. Yeung, W. Chen, and C. R. Astell.** 1991.

Expression of Minute Virus of Mice Major Nonstructural Protein in Insect Cells -Purification and Identification of ATPase and Helicase Activities. *Virology*. **185**:90-98.

2.5.3 Discussion

Nous avons testé l'effet de deux mutations au sein du promoteur P4 sur le cycle parvoviral. La mutation inactivant le site EBS ne semble avoir aucune conséquence sur la réplication parvovirale alors que l'intégrité du motif E2F est indispensable à la production de particules virales. Ceci peut paraître contradictoire avec notre première publication montrant que ces deux sites participent pour une part équivalente à l'activité totale du promoteur P4. Toutefois dans ce premier travail, nous avons mesuré la résultante des effets des mutations sur l'activité du promoteur durant les différentes phases du cycle cellulaire. En phase S, le site E2F participe pour 80% à l'activité du promoteur et c'est à ce moment que le taux de NS1 est limitant pour la réplication du virus. En absence de site E2F fonctionnel le niveau de production de NS1 est insuffisant pour enclencher la réplication de l'ADN viral en phase S.

Le site E2F constitue donc l'un des éléments de la dépendance des *parvovirus* vis-à-vis de la phase S. Il n'est toutefois pas le seul déterminant de cette dépendance. Ainsi la réplication de l'ADN parvoviral semble dépendre de facteurs cellulaires exprimés spécifiquement durant la phase S. Les résultats du laboratoire montrent ainsi que la première étape de conversion de l'ADN simple brin en forme répllicative bicaténaire se déroule lorsque les cellules franchissent le passage G1/S. De plus, comme la formation d'ADN bicaténaire est requise, selon toute vraisemblance, pour la constitution d'un promoteur actif, lors d'une infection naturelle par un parvovirus à génome monocaténaire, le promoteur P4 ne devient sans doute fonctionnel qu'après la conversion de l'ADN en forme duplex, c'est à dire à la transition G1/S. Il s'en suit que tout motif contribuant de façon majeure à l'action de P4, même de façon indépendante du cycle (par exemple la boîte GC), aura à priori le même effet que le site E2F, à savoir sera nécessaire à l'enclenchement de la réplication au début de la phase S. Quel pourrait donc être l'avantage relatif pour le virus de la présence d'un site E2F, fort et S-dépendant, au sein du promoteur P4? Les protéines NS1 sont cytotoxiques, et il est permis de penser qu'il est avantageux pour le virus de retarder leur production jusqu'au moment où elles sont indispensables à la réplication virale, à savoir la phase S. Un risque de production de NS1 en phase G1 pourrait se présenter pour deux raisons. Tout d'abord, une petite fraction des particules virales renferme un génome de polarité positive qui, dans une cellule infectée par plusieurs virions, pourrait s'hybrider au brin négatif présent dans la majorité des particules, et donner naissance à un promoteur P4 fonctionnel. Par ailleurs, des travaux récents montrent que dans des cellules quiescentes infectées par des vecteurs AAV, un niveau significatif

d'expression de la cassette parvovirale s'établit à la longue, ce qui est indicatif d'une conversion, inefficace mais existante, du génome parvoviral (Ferrari *et al.*, 1996, Snyder *et al.*, 1997). Il semble que ce verrou ne soit pas indispensable à la multiplication du virus dans des cultures cellulaires puisque des virus dont la région E2F est remplacée par un site constitutivement actif au cours du cycle cellulaire peuvent être propagés dans ces conditions. Par exemple des parvovirus MVMi chimères, dont la région proximale du promoteur P4 a été remplacée par la région promotrice du virus HIV activée par la protéine virale tat, se répliquent efficacement dans des lymphocytes T modifiés pour exprimer constitutivement la protéine tat (Tattersall *et al.*, 1997). Par ailleurs, il est permis de supposer qu'*in vivo*, lors d'infections persistantes de l'animal par des parvovirus, il est nécessaire de réduire au maximum le taux d'expression des protéines non-structurales avant que les conditions propices à la réplication ne soient remplies en phase S. Ceci permettrait d'éviter la destruction de la cellule hôte avant que le virus ne se soit répliqué. A ce titre il serait intéressant d'étendre l'étude des virus mutants, et de comparer le virus sauvage à un dérivé dont le site E2F a été remplacé par une seconde boîte GC, chez l'animal ou dans des cultures quiescentes.

3 DISCUSSION GENERALE

Le génome des parvovirus se distingue par sa petite taille (environ 5.10^3 nt) et son organisation simple (deux unités transcriptionnelles). De ce fait le cycle de réplication de ce virus dépend étroitement de diverses protéines cellulaires, comme l'ADN polymérase que le virus est incapable de produire. Les parvovirus codent toutefois pour des protéines non-structurales (NS) qui participent à la réalisation des étapes majeures de la multiplication de ces agents. Les protéines NS sont soumises à des modifications post-traductionnelles (phosphorylation ou myristylation) susceptibles de moduler leurs fonctions. Toutefois le taux d'expression des protéines NS constitue l'un des niveaux de contrôle essentiel du cycle parvoviral. L'expression des protéines non-structurales est notamment déterminée par le niveau d'activité du promoteur précoce P4. Il était donc intéressant d'entreprendre dans le cadre de ce travail de thèse, l'identification des facteurs de transcription participant à la régulation de l'activité du promoteur P4. Les expériences d'empreintes sur ADN, d'interactions ADN-protéines et d'expression stable ou transitoire, nous ont permis d'identifier divers éléments régulateurs du promoteur P4. La séquence du promoteur parvoviral est utilisée de façon intensive, les motifs de contrôle de la transcription couvrant l'essentiel de cette séquence.

3.1 Activation du promoteur P4 dans les cellules transformées par l'oncogène ras

Nous avons principalement cherché à comprendre les mécanismes moléculaires permettant la sur-expression du promoteur P4 dans les cellules transformées. L'introduction de mutations dans les régions régulatrices, nous a permis de prouver l'implication dans cette activation des deux éléments CRE et du motif EBS (Figure 35). Cependant la construction d'un promoteur muté simultanément au sein des éléments CRE et EBS serait nécessaire pour affirmer que seuls ces motifs sont nécessaires à l'activation du promoteur P4 dans les cellules transformées par l'oncogène *ras*. Tous les oncogènes testés à ce jour, à l'exception des protéines transformantes E6 et E7 du virus du papillome bovin de type 1, se sont avérés capables de sensibiliser les cellules cibles à l'action lytique des parvovirus (Salome *et al.*, 1990). Nous n'avons pas la preuve que dans tous les cas le promoteur P4 est activé par la transformation cellulaire. En effet les réseaux de signalisations activés par Ras ne le sont pas

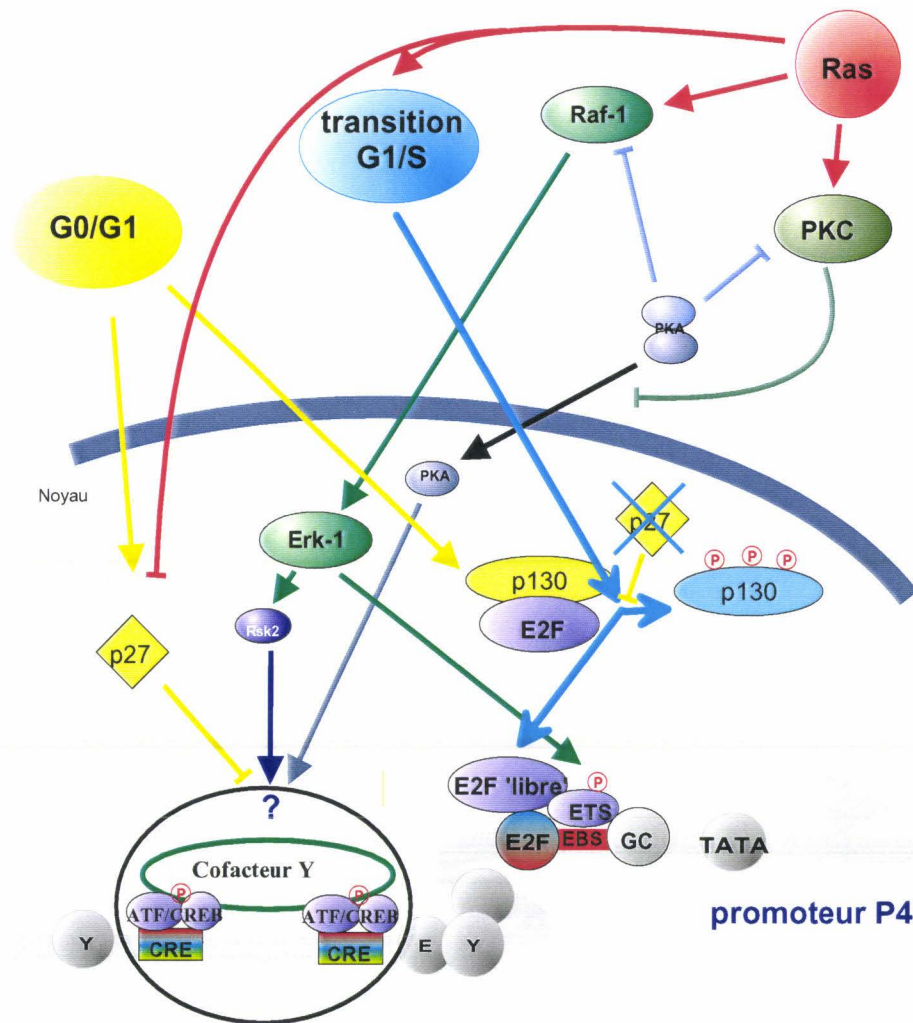


Figure 35: Modèle des mécanismes moléculaires médiateurs de l'activation du promoteur P4 en fonction du cycle et de la transformation cellulaire.

Les mécanismes principaux sont indiqués

- en **jaune** pour les cellules en **G0/G1**

- Le facteur de transcription E2F lié à la protéine "poche" p130 est inactif (la fixation du complexe inactif sur le motif E2F n'est pas représentée).
- La protéine p27 empêche la phosphorylation de la p130 par les cycline/cdk et inhibe l'activité du promoteur P4 par l'intermédiaire des éléments CRE.

- en **bleu** pour les cellules en phase **S**

- La protéine poche p130 phosphorylée, le facteur E2F, libéré, active le promoteur P4
- La protéine p27 dégradée, les éléments CRE activent le promoteur P4

- en **rouge** pour les cellules transformées par l'oncogène *ras*.

- Ras induit la dégradation de la p27 et accélère l'entrée des cellules en phase S, les mécanismes décrits ci-dessus sont activés.
- la voie des MAPK $Ras \rightarrow Raf-1 \rightarrow Erk-1$ active:
 - ✓ la kinase p90Rsk2 qui phosphoryle les facteurs de transcription ATF/CREB. Cette phosphorylation est reconnue par des cofacteurs et permet l'activation du promoteur P4.
 - ✓ les facteurs de transcription de la famille Ets. Le promoteur P4 est activé par la fixation, sur l'élément EBS, d'une protéine de type Ets phosphorylée.
- La protéine kinase C (PKC), activée, bloque:
 - ✓ l'inhibition de la voie MAPK, décrite ci-dessus, par la protéine kinase A (PKA)
 - ✓ La translocation de la sous-unité nucléaire de la PKA.

par tous les oncogènes. Il est ainsi permis de supposer que dans certains cas la transformation est associée à une plus grande efficacité de réplication de l'ADN viral, ce qui peut également stimuler la production des protéines NS par suite de l'accroissement du nombre de matrices d'ADN susceptibles d'être transcrites. Ceci semble par exemple être le cas des cellules transformées par l'antigène T du virus SV40 (Chen *et al.*, 1986, Kuntz-Simon *et al.*, 1997). Dans ce cas il semble également que le promoteur P4 soit légèrement activé (d'un facteur environ 2) par l'intermédiaire de la boîte Y (Gu *et al.*, 1998).

L'activation du promoteur P4 contribue à l'accumulation des protéines NS dans les cellules transformées. Comme nous l'avons montré dans la dernière publication, le site EBS n'est pas nécessaire à la production virale. De même nous n'avons observé aucune différence entre les virus EBS⁻ et sauvage dans leur effet toxique sur les cellules FREJ4 (résultats non présentés). Pourtant le taux d'expression des ARN messagers codant pour les protéines NS1 est plus faible dans des cellules infectées par un virus muté au niveau du site Ets (article 5). Il semble donc que la réduction de l'activité du promoteur P4 par un facteur 2, comme c'est le cas du mutant EBS⁻, n'a pas de répercussion décelable sur le cycle viral. Nous n'avons pas encore construit et testé des génomes viraux mutés au niveau des éléments CRE du promoteur P4. Ces éléments sont requis pour la fixation non seulement des facteurs de transcription ATF/CREB, mais aussi de la protéine cellulaire de réplication PIF nécessaire à la résolution du dimère viral. L'introduction de mutations empêchant la fixation des protéines de la famille ATF/CREB sur les éléments CRE du promoteur P4 abolirait également la liaison du facteur PIF et de ce fait la réplication de l'ADN viral. Comme nous l'avons montré dans la seconde publication, l'activation du promoteur P4 par l'oncogène *ras* requiert l'intégrité des deux éléments CRE. Etant donné que le motif CRE de l'origine de réplication est nécessaire à la coupure d'ADN simple brin induite par NS1, des génomes viraux dont le CRE de l'origine inactive est muté devraient rester compétents pour la réplication de l'ADN tout en n'étant plus activables par l'oncogène *ras*. Ces mutations pourraient également être introduites dans le contexte d'un génome viral dont le motif EBS du promoteur P4 a été muté. De tels mutants devraient nous permettre d'évaluer l'effet de l'activation du promoteur P4 dans les cellules transformées par *ras* sur le cycle du virus et en particulier l'oncotropisme. La sur-expression de NS1 dans les cellules transformées est susceptible de contribuer à leur hypersensibilité à l'attaque parvovirale. En effet, au plus des cellules de rat transformées par *ras* expriment NS1 à un niveau élevé, au plus elles sont sensibles à l'action lytique du virus

(Mousset *et al.*, 1994, Salome *et al.*, 1990). Il convient toutefois de remarquer que le niveau d'expression de NS1 ne suffit pas à expliquer la différence de sensibilité des cellules normales et transformées à l'effet lytique du parvovirus. En effet, l'expression induite d'un taux élevé des protéines NS n'est pas suffisante pour lyser des fibroblastes non transformés de rat; l'établissement d'un état stable de transformation, qui semble modifier les propriétés et/ou cibles de NS1, est indispensable à la lyse cellulaire. Il serait donc intéressant d'évaluer au moyens de génomes viraux EBS`CRE` les rôles respectifs de la sur-expression et de la toxicité acquise de NS1 dans la sensibilisation des cellules transformées à l'effet cytotoxique du produit viral. D'autre part comme nous l'avons indiqué ci-dessus, ces génomes pourraient être étudiés dans divers système cellulaires afin de déterminer la dépendance de l'activation du promoteur P4 vis-à-vis de la nature de l'agent transformant.

Notre connaissance de l'activation du cycle parvoviral en réponse à la transformation cellulaire devrait permettre une meilleure utilisation des parvovirus dans la thérapie génique anticancéreuse. Dans les vecteurs parvoviraux développés à ce jour les gènes thérapeutiques sont placés sous le contrôle du promoteur P38, dont l'activité est induite par les protéines NS également induite par le vecteur (Dinsart *et al.*, 1996). Ainsi le promoteur P4 permet l'expression conditionnelle des gènes thérapeutiques suivant l'état de transformation de la cellule cible (Spegelaere *et al.*, 1991). Nous avons pu déterminer les éléments du promoteur P4 impliqués dans l'activité constitutive et dans la réponse à l'état de transformation de la cellule, au moins par l'oncogène *ras*. La construction d'un promoteur P4 modifié, enrichi en éléments de réponse aux oncogènes, pourrait permettre d'accroître la spécificité des vecteurs pour les cellules transformées. Toutefois comme notre étude l'a révélée nous devons tenir compte de la synergie possible entre facteurs de transcription et des rôles multiples que certains motifs d'ADN peuvent jouer en réponse à divers stimuli.

3.2 Le rôle des éléments CRE dans l'activité du promoteur P4

Un des éléments clés de l'activité du promoteur P4 réside dans la répétition des motifs CRE. Ces éléments participent à l'activation du promoteur par l'oncogène *ras* et à sa répression par l'inhibiteur des cycline/cdk p27. Dans le cas de l'activation par *ras*, les résultats biochimiques soulevant la possibilité que l'activation dépend de la formation d'un dimère entre les protéines ATF-1 et un autre membre de la famille ATF/CREB (vraisemblablement ATF-1 ou ATF-2). Par contre aucune modification biochimique des complexes protéiques n'est observée en réponse à p27. Dans les deux cas, cependant, la réponse des éléments CRE se produit uniquement lorsque ces motifs sont présents en au moins deux copies. Il est donc concevable que les réponses du promoteur P4, d'une part à la transformation par *ras* et d'autre part à la protéine p27 impliquent des voies chevauchantes de régulation convergeant sur les éléments CRE.

Il n'est pas certain que les modifications biochimiques observées suffisent à expliquer la réponse du promoteur P4 à la transformation par *ras*. Par exemple, elles n'expliquent pas la coopérativité des éléments CRE et ne témoignent pas de l'état de phosphorylation de tous les facteurs ATF/CREB, comme par exemple CREB. D'autre part, les éléments CRE du promoteur P4 ne répondent pas de façon conventionnelle à la stimulation par des drogues telles que l'AMPc. Comme nous l'avons déjà mentionné, la réponse des motifs CRE du promoteur P4 à l'AMPc, laquelle est plus prononcée dans les cellules FR3T3 que dans les dérivés transformés, est un phénomène à long terme. Or il a été montré que le traitement de cellules à l'AMPc stabilise la protéine p27, et en conséquence arrête la progression des cellules en G1. D'après les résultats obtenus, faisant l'objet de la cinquième publication, la stabilisation de la protéine p27 induit une répression du promoteur via les éléments CRE. Nous avons également préalablement évoqué (chapitre 2.2.3.III) que l'activation de la PKA, notamment par l'AMPc, peut bloquer la voie des MAPK permettant la phosphorylation de CREB par la kinase p90Rsk2. La répression à long terme du promoteur P4 en réponse à l'AMPc pourrait donc être principalement due d'une part à la sur-expression de p27 et à l'accumulation des cellules en G1 et d'autre part à l'inhibition de la phosphorylation de CREB (Figure 35).

3.3 Activation du promoteur P4 en phase S

Le promoteur P4 est induit en phase S du cycle cellulaire par l'intermédiaire d'un motif E2F. Cette régulation pourrait également contribuer à l'hyper-activité du promoteur P4 dans les cellules transformées, en plus de la voie CRE-dépendante discutée ci-dessus. En effet, les cellules FREJ4 transformées par *ras* prolifèrent plus rapidement par rapport aux cellules normales FR3T3. Au sein d'une population asynchrone, la proportion de cellules FREJ4 en phase S est supérieure à celle observée pour les cellules FR3T3 (données non présentées). Bien que le taux d'activation du promoteur P4 à la transition G1/S soit identique entre les cellules normales et transformées, la proportion plus importante de cellules en phase S se traduira par une activité globale supérieure du promoteur dans ces cellules par rapport à la lignée non transformée. A ce titre, le site E2F de P4 contribue indirectement à l'activation de P4 dans les cellules transformées par le biais de la capacité à induire P4 en phase S. Cet effet "E2F" semble toutefois quantitativement moins important que l'effet "CRE" sus mentionné. En effet, dans les cellules transformées, le mutant E2F a une activité supérieure à celle des mutants CRE⁻ (résultats non présentés). Ce qui montre que, dans ces cellules, la participation du motif E2F à l'activité du promoteur P4 est inférieure à celle des motifs CRE.

L'étude d'un dérivé du génome viral muté au niveau du site E2F nous a permis de démontrer l'importance physiologique de l'activation du promoteur P4 en phase S: cette induction est en effet cruciale pour la production d'un niveau seuil de protéines NS nécessaires à l'initiation de la réplication virale.

3.4 Perspectives

Le modèle parvoviral nous a permis de révéler un nouveau contrôle transcriptionnel dont la protéine p27 est le médiateur. Cette régulation est doublement intéressante: d'une part, elle dépend de la présence d'au moins deux éléments CRE; d'autre part, elle suppose un rôle spécifique de la protéine p27. Cette nouvelle fonction distingue les membres p27 et p21 de la famille CIP/KIP de CKI, ce qui pourrait être rapproché du rôle différentiel de ces deux protéines dans la différenciation et l'ontogenèse lors du développement embryonnaire, comme nous l'avons évoqué précédemment (chapitre 1.2.1.IV.d).

Les protéines identifiées à ce jour comme capables de se lier aux éléments CRE du promoteur P4 sont les facteurs de transcription de la famille ATF/CREB et le facteur de réplication PIF. La protéine PIF semble dépourvue d'activités transcriptionnelles, ainsi il est vraisemblable que les cibles directes ou indirectes de la régulation par la protéine p27 soient les facteurs ATF/CREB. Comme nous l'avons décrit dans l'Introduction, les facteurs ATF/CREB sont activés par phosphorylation et liaison au cofacteur CBP. La protéine p27 est un inhibiteur des complexes cycline/cdk (CKI). Certains facteurs ATF/CREB, dont CREM, peuvent être activés par la kinase cdk1. On peut donc imaginer que la protéine p27 empêche l'activation de l'un de ces facteurs en inhibant sa phosphorylation. Une telle régulation a déjà été décrite pour le facteur de transcription NF κ B; qui est activé par le complexe cyclineE/cdk2, grâce à la fixation de la kinase et de sa cible sur la protéine p300: cette activation est inhibée par une CKI, la protéine p21. Toutefois nous n'avons pas détecté la présence de CREM dans les complexes protéiques A, B et C formés avec les éléments CRE du promoteur P4. De plus, la cdk1, bien qu'inhibée par la protéine p27 n'est pas active en phase G0 du cycle cellulaire. Enfin, si CREM était impliqué dans l'inhibition de P4 par p27, une régulation similaire devrait être observée pour la protéine p21 puisque p21 et p27 toutes deux inhibent les mêmes complexes cycline/cdk; or seule p27 réprime la transcription dirigée par P4 via les motifs CRE. Il serait intéressant de chercher si des molécules p27 modifiées, n'interagissant plus avec les complexes cycline/cdk, sont toujours capables de réprimer l'activité transcriptionnelle de promoteurs via leurs éléments CRE. Cette recherche permettrait d'identifier les domaines de la protéine p27 impliqués dans l'inhibition à médiation CRE; la région C-terminale de p27 constitue un candidat potentiel, étant donné qu'elle n'est pas partagée par la protéine p21.

La protéine CBP permet l'activation transcriptionnelle de promoteurs pourvus d'éléments CRE. Nous avons comparé le taux de protéines CBP entre les cellules synchronisées par confluence ou par privation en sérum. A notre grande surprise le facteur CBP est pratiquement indécélable dans les cellules confluentes, alors que son taux dans les cellules privées de sérum est équivalent à celui de cultures en croissance (Figure 36). Les résultats obtenus sont identiques, quel que soit le domaine (C- ou N-terminal) de la protéine reconnu par l'anticorps, ce qui suggère que la structure de CBP n'est pas affectée mais que son taux est réduit dans les cellules confluentes. Il serait intéressant de mesurer le niveau de CBP après sur-expression de la protéine p27 dans des cellules en croissance, afin de déterminer si l'effet observé est spécifique de la protéine p27. La protéine CBP n'interagit pas exclusivement avec les facteurs de la famille ATF/CREB mais également avec d'autres facteurs de transcription, parmi lesquels Jun/Fos. Il conviendrait donc de rechercher si les promoteurs pourvus d'un site TRE, fixant le dimère Jun/Fos, sont également réprimés dans des cellules confluentes ou sur-expimant la protéine p27.

Ni la phosphorylation des facteurs ATF/CREB par une protéine kinase inhibée par p27, ni la modification ou la dégradation de CBP dans les cellules confluentes ne rendent comptes de l'effet coopératif des sites CRE dans l'inhibition du promoteur P4 par p27. Les études biochimiques montrent que les deux sites, malgré une différence mineure de séquence, fixent les mêmes complexes protéiques avec une affinité semblable. Dans le cas du facteur de transcription Sp1, il a été montré qu'un domaine de la protéine permet l'association entre les facteurs Sp1 fixés sur des sites plus ou moins adjacents au sein d'un promoteur. La formation de ces complexes d'ordre multiple permet l'activation synergique du promoteur. On peut imaginer que la protéine p27 défait des interactions similaires entre différents complexes ATF/CREB, réduisant le promoteur à l'activité basale. L'étude de la répression de promoteurs minimaux devrait permettre de tester cette hypothèse. En effet, l'activité des promoteurs minimaux augmente lors de l'addition d'éléments CRE supplémentaires, alors que en présence de p27 elle reste toujours identique à celle d'un promoteur minimum contenant un seul CRE (Figure 37). Il semblerait donc que la protéine p27 puisse agir sur des complexes ATF/CREB d'ordre supérieur. Il conviendrait d'étudier, par des expériences d'EMSA et de liaison chimique ("cross linking"), les complexes protéiques formés au niveau de deux éléments CRE, en présence et en absence de la protéine p27. Ceci devrait indiquer si des interactions entre les

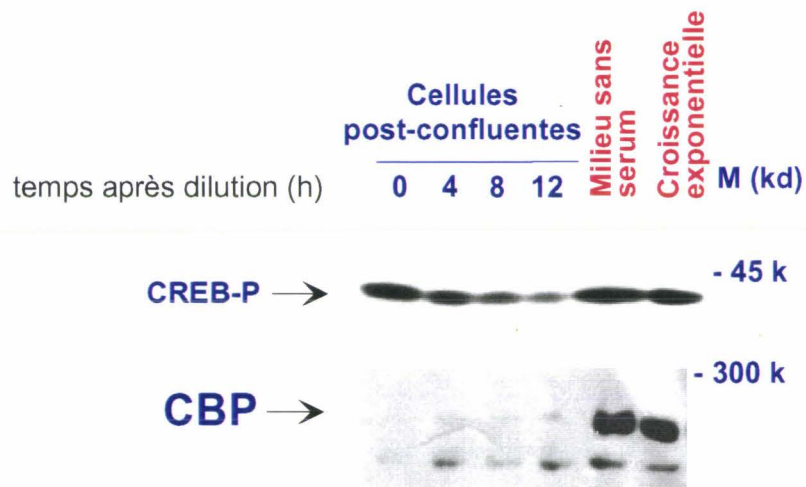


Figure 36: La protéine CBP n'est pas détectée dans des extraits de cellules FR3T3 à confluence.

Des extraits protéiques totaux ont été préparés à partir de cellules FR3T3 en croissance exponentielle, privées de sérum, cultivées à haute densité (confluence) ou à différents temps après dilution au 1/3 de cellules confluentes. Ces extraits ont été analysés par la méthode de transfert dite "Western blotting" afin de déterminer le taux de protéines CBP et de la forme phosphorylée (au niveau du résidu Sérine 133) de CREB (CREB-P) qu'ils contiennent. M, poids moléculaire apparent déterminé à l'aide de protéines standards.

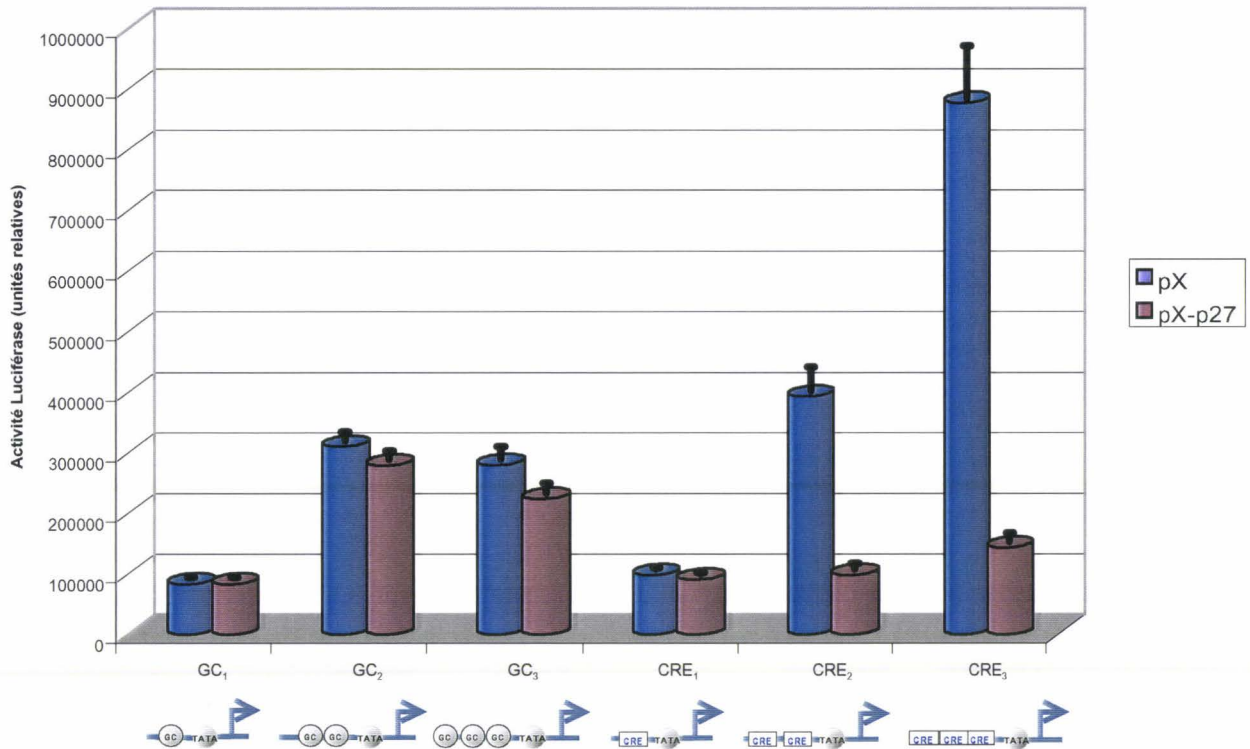


Figure 37: L'activation synergique de promoteurs par les éléments CRE est inhibée par la surexpression de la p27.

Nous avons construit des plasmides permettant d'étudier l'expression du gène de la Luciférase sous le contrôle de promoteurs minimaux (schématisés sous le graphe), correspondant à 1, 2 ou 3 boîte(s) GC ou CRE en amont de la boîte TATA du promoteur P4. Ces constructions ont été utilisées pour cotransfecter des cultures de cellules FR3T3 en croissance exponentielle avec un vecteur permettant la surexpression (pX-p27) ou non (pX) de la protéine p27. Les activités Luciférase sont mesurées 48 h après la transfection.

protéines liées aux deux sites ATF/CREB existent, et si elles sont dissociées en présence de la protéine p27.

Afin d'identifier le réseau de protéines participant à l'inhibition de promoteurs via le motif CRE, nous pourrions tirer profit de l'expression de gènes placés sous le contrôle du promoteur P4 pour sélectionner des cellules résistantes à l'inhibition par la protéine p27. Nous proposons d'utiliser à cette fin des virus recombinant exprimant des ADN complémentaires tronqués (codant pour une mini protéine), ou des ADN complémentaires anti-sens susceptibles d'exercer une action négative dominante. Après infection, par ces virus recombinants, de cellules ayant intégré de façon stable un construction dirigeant le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur P4 et sur-exprimant la protéine p27, des clones cellulaires au sein desquels la protéine p27 n'est plus capable de réprimer le promoteur P4 seraient isolés par cytométrie de flux. Ces expériences permettraient d'identifier des gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie de signalisation responsable de l'inhibition de promoteurs via les CRE en présence de p27. Ces expériences seraient facilitées par la disponibilité d'une molécule de p27 mutée, capable de réprimer les promoteurs contenant des éléments CRE mais incapable de bloquer la prolifération cellulaire en phase G1. Dans ce cas, nous pourrions remplacer le gène *gfp* par celui de résistance à la néomycine et sélectionner des clones résistant à l'antibiotique après infection par les virus recombinant.

Une autre approche de cette question consiste en l'utilisation de la levure. Nous avons observé que le promoteur P4 est actif dans la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Il est par ailleurs connu que le domaine N-terminal de la protéine p21 n'inhibe pas l'activité des complexes cycline/cdk de levure. Nous avons sur-exprimé la protéine p27 chez *Schizosaccharomyces pombe*, et observé un faible retard de la croissance des levures. Les protéines de la famille ATF/CREB présentent un degré de conservation élevé entre les cellules de mammifères et *Schizosaccharomyces pombe*. Les protéines des deux types d'organismes reconnaissent les même séquences d'ADN et sont capables d'activer des promoteurs. D'autre part le contrôle de la transcription est similaire entre *Schizosaccharomyces pombe* et les cellules d'eucaryotes supérieurs. En utilisant la génétique des levures, nous pourrions dans une approche similaire à celle décrite précédemment, isoler des levures capables de croître en présence de la protéine p27 sur des milieux sélectifs. Les gènes de mammifères homologues à ceux identifiés chez la levure pourraient ensuite être recherchés. Une condition préalable à

cette étude réside dans la capacité de la protéine p27 à induire la répression de promoteurs via les motifs CRE au sein des cellules de levure. Nous avons obtenu des résultats préliminaires suggérant que tel est bien le cas. La levure pourrait donc s'avérer un excellent modèle d'étude pour découvrir de nouvelles fonctions des protéines inhibitrices des kinases dépendantes des cyclines.

L'étude de la régulation du promoteur P4 en fonction de la transformation et du cycle cellulaire nous a permis de mieux comprendre les interactions entre les parvovirus et la cellule hôte, en particulier dans le contexte de l'oncotropisme et de la dépendance vis-à-vis du cycle cellulaire manifestés par ce virus. L'identification dans le promoteur viral précoce d'éléments de réponse à l'oncogène *ras* ouvre la voie au développement de nouveaux vecteurs parvoviraux dont la spécificité d'expression de gènes thérapeutiques dans les cellules tumorales est accrue. La simplicité de l'organisation génomique des parvovirus nous a également permis leur utilisation comme sonde afin d'identifier des mécanismes de contrôle de l'expression génique au cours du cycle cellulaire, en particulier une répression propre aux cellules quiescentes. A ce titre, le parvovirus constitue également un système modèle de choix pour l'identification de facteurs cellulaires impliqués dans le contrôle de la réplication de l'ADN génomique en fonction du cycle cellulaire.

REFERENCES

- Adnane, J., Shao, Z. & Robbins, P. D. (1995). The retinoblastoma susceptibility gene product represses transcription when directly bound to the promoter. *J Biol Chem* **270**, 8837-43.
- Agbandje, M., Parrish, C. R. & Rossmann, M. G. (1995). The structure of parvoviruses. *Seminars in Virology* **6**, 299-309.
- Ahn, J. K., Gavin, B. J., Kumar, G. & Ward, D. C. (1989). Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants. *J. Virol.* **63**, 5425-5439.
- Ahn, J. K., Pitluk, Z. W. & Ward, D. C. (1992). The GC box and TATA transcription control elements in the P38 promoter of the minute virus of mice are necessary and sufficient for transactivation by the nonstructural protein NS1. *J. Virol.* **66**, 3776-3783.
- Alberts, A. S., Montminy, M., Shenolikar, S. & Feramisco, J. R. (1994). Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **14**, 4398-407.
- Allen, K. E., de la Luna, S., Kerkhoven, R. M., Bernards, R. & La Thangue, N. B. (1997). Distinct mechanisms of nuclear accumulation regulate the functional consequence of E2F transcription factors. *J Cell Sci* **110**, 2819-31.
- Anouja, F., Wattiez, R., Mousset, S. & Caillet-Fauquet, P. (1997). The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol* **71**, 4671-8.
- Antonietti, J. P., Sahli, R., Beard, P. & Hirt, B. (1988). Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of minute virus of mice. *J Virol* **62**, 552-7.
- Arias, J., Alberts, A. S., Brindle, P., Claret, F. X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. & Montminy, M. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* **370**, 226-9.
- Baldauf, A. Q., Willwand, K., Mumtsidu, E., Nuesch, J. P. & Rommelaere, J. (1997). Specific initiation of replication at the right-end telomere of the closed species of minute virus of mice replicative-form DNA. *J Virol* **71**, 971-80.
- Bantel-Schaal, U. (1993). Carcinogen-induced accumulation of adeno-associated parvovirus DNA is transient as a result of two antagonistic activities that both require de novo protein synthesis. *Int J Cancer* **53**, 334-9.
- Basuyaux, J. P., Ferreira, E., Stehelin, D. & Buttice, G. (1997). The Ets transcription factors interact with each other and with the c- Fos/c-Jun complex via distinct protein domains in a DNA-dependent and - independent manner. *J Biol Chem* **272**, 26188-95.
- Beijersbergen, R. L. & Bernards, R. (1996). Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1287**, 103-20.
- Ben-Asher, E. & Aloni, Y. (1984). Transcription of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, may be regulated by attenuation. *J. Virol.* **52**, 266-276.
- Bigger, C. B., Melnikova, I. N. & Gardner, P. D. (1997). Sp1 and Sp3 regulate expression of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor beta4 subunit gene. *J Biol Chem* **272**, 25976-82.
- Bisotto, S., Minorgan, S. & Rehfuss, R. P. (1996). Identification and characterization of a novel transcriptional activation domain in the CREB-binding protein. *J Biol Chem* **271**, 17746-50.

- Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J.-C., Rommelaere, J. & Salomé, N. (1997). Identification of a cellular interaction partner of the non-structural proteins NS2 of MVMP, using the yeast two-hybrid system. In *VIIIth International Parvovirus Workshop*. Heidelberg, Germany.
- Botz, J., Zerfass-Thome, K., Spitkovsky, D., Delius, H., Vogt, B., Eilers, M., Hatzigeorgiou, A. & Jansen-Durr, P. (1996). Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promoter. *Mol Cell Biol* **16**, 3401-9.
- Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B. & Rommelaere, J. (1990). NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMP. *Virology* **174**, 576-84.
- Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**, 597-601.
- Bremner, R., Cohen, B. L., Sopta, M., Hamel, P. A., Ingles, C. J., Gallie, B. L. & Phillips, R. A. (1995). Direct transcriptional repression by pRB and its reversal by specific cyclins. *Mol Cell Biol* **15**, 3256-65.
- Brindle, P., Linke, S. & Montminy, M. (1993). Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature* **364**, 821-4.
- Brockhaus, K., Plaza, S., Pintel, D. J., Rommelaere, J. & Salome, N. (1996). Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members. *J Virol* **70**, 7527-34.
- Brown, K. E., Anderson, S. M. & Young, N. S. (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**, 114-7.
- Brown, K. E., Gerard O'Sullivan, M. & Young, N. S. (1995). Simian parvovirus. *Seminars in Virology* **6**, 339-346.
- Brown, K. E. & Young, N. S. (1997). Parvovirus B19 in human disease. *Annu Rev Med* **48**, 59-67.
- Brownstein, D. G., Smith, A. L., Johnson, E. A., Pintel, D. J., Naeger, L. K. & Tattersall, P. (1992). The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J Virol* **66**, 3118-24.
- Brunstein, J. & Astell, C. R. (1997). Analysis of the internal replication sequence indicates that there are three elements required for efficient replication of minute virus of mice minigenomes. *J Virol* **71**, 9087-95.
- Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P. & Rommelaere, J. (1990). Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *Embo J* **9**, 2989-95.
- Cardoso, M. C., Leonhardt, H. & Nadal-Ginard, B. (1993). Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* **74**, 979-92.
- Cater, J. E. & Pintel, D. J. (1992). The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol* **73**, 1839-43.
- Chen, Y. Q., de Foresta, F., Hertoghs, J., Avalosse, B. L., Cornelis, J. J. & Rommelaere, J. (1986). Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res* **46**, 3574-9.

- Cheng, M., Sexl, V., Sherr, C. J. & Roussel, M. F. (1998). Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1091-6.
- Christensen, J., Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1995). Minute Virus of Mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J. Virol.* **69**, 5422-5430.
- Christensen, J., Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1997). A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J Virol* **71**, 1405-16.
- Christensen, J., Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1997). Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA-binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs. *J Virol* **71**, 5733-41.
- Clemens, K. E., Cerutis, D. R., Burger, L. R., Yang, C. Q. & Pintel, D. J. (1990). Cloning of minute virus of mice cDNAs and preliminary analysis of individual viral proteins expressed in murine cells. *J Virol* **64**, 3967-73.
- Colomar, M. C., Hirt, B. & Beard, P. (1998). Two segments in the genome of the immunosuppressive minute virus of mice determine the host-cell specificity, control viral DNA replication and affect viral RNA metabolism. *J Gen Virol* **79**, 581-6.
- Connell-Crowley, L., Elledge, S. J. & Harper, J. W. (1998). G1 cyclin-dependent kinases are sufficient to initiate DNA synthesis in quiescent human fibroblasts. *Curr Biol* **8**, 65-8.
- Corbau, R., Nüesch, J. P. F., Salome, S. & Rommelaere, J. (1997). Phosphorylation study of minute virus of mice NS1 protein. In *VIIth International Parvovirus Workshop*. Heidelberg, Germany.
- Correa-Bordes, J. & Nurse, P. (1995). p25rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34cdc2 mitotic kinase. *Cell* **83**, 1001-9.
- Cossons, N., Faust, E. A. & Zannis-Hadjopoulos, M. (1996). DNA polymerase delta-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindrome of the minute virus of mice genome. *Virology* **216**, 258-64.
- Cotmore, S. F., Christensen, J., Nuesch, J. P. & Tattersall, P. (1995). The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]2-3. *J Virol* **69**, 1652-60.
- Cotmore, S. F., D. Abramo AM, J., Carbonell, L. F., Bratton, J. & Tattersall, P. (1997). The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* **231**, 267-80.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* **33**, 91-174.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1994). An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *Embo J* **13**, 4145-52.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1995). DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Seminars in Virology* **6**, 271-281.
- Courey, A. J. & Tjian, R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**, 887-98.
- Crawford, L. V. (1966). A minute virus of mice. *Virology* **26**, 602-612.
- Cziepluch, C., Kordes, E., Poirey, R., Grewenig, A., Rommelaere, J. & Jauniaux, J. C. (1998). Identification of a novel cellular TPR-containing protein, SGT, that interacts with the nonstructural protein NS1 of parvovirus H-1. *J. Virol.* **72**.

- de Groot, R. P., den Hertog, J., Vandenheede, J. R., Goris, J. & Sassone-Corsi, P. (1993). Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the CREM activator function. *Embo J* **12**, 3903-11.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J., Elledge, S. & Leder, P. (1995). Mice lacking p21^{CIP1/WAF1} undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-684.
- Desdouets, C., Matesic, G., Molina, C. A., Foulkes, N. S., Sassone-Corsi, P., Brechot, C. & Sobczak-Thepot, J. (1995). Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP- responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol* **15**, 3301-9.
- Dettwiler, S., Corbau, R., Rommelaere, J. & Nüesch, J. P. F. (1997). Replicative functions of MVM NS1 are regulated by members of the protein kinase C family. In *VIIth International Parvovirus Workshop*. Heidelberg, Germany.
- Dinsart, C., Cornelis, J. & Rommelaere, J. (1996). Recombinant autonomous parvoviruses: new tools for the gene therapy of cancer? *Chimica oggi* **14**, 32-38.
- Doerig, C., Hirt, B., Antonietti, J. P. & Beard, P. (1990). Nonstructural protein of parvovirus B19 and minute virus of mice controls transcription. *Journal of Virology* **64**, 387-396.
- Doerig, C., Hirt, B., Beard, P. & Antonietti, J. P. (1988). Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter. *J Gen Virol* **69**, 2563-73.
- Downward, J. (1997). Cell cycle: routine role for Ras. *Curr Biol* **7**, R258-60.
- Draetta, G. F. (1997). Cell cycle: will the real Cdk-activating kinase please stand up. *Curr Biol* **7**, R50-2.
- Dupressoir, T., Vanacker, J. M., Cornelis, J. J., Duponchel, N. & Rommelaere, J. (1989). Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **49**, 3203-8.
- Elledge, S., Winston, J. & Harper, J. (1996). A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. *Trends in Cell Biology* **6**, 388-392.
- Enders, G., Dotsch, J., Bauer, J., Nutzenadel, W., Hengel, H., Haffner, D., Schalasta, G., Searle, K. & Brown, K. E. (1998). Life-threatening parvovirus B19-associated myocarditis and cardiac transplantation as possible therapy: two case reports. *Clin Infect Dis* **26**, 355-8.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. & Hunt, T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**, 389-96.
- Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J. & Livingston, D. M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D- type cyclins. *Cell* **73**, 487-97.
- Faisst, S., Guittard, D., Benner, A., Cesbron, J. Y., Schlehofer, J. R., Rommelaere, J. & Dupressoir, T. (1998). Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection. *Int J Cancer* **75**, 584-9.
- Fan, J. & Bertino, J. (1997). Functional roles of E2F in cell cycle regulation. *Oncogene* **14**, 1191-1200.
- Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T. & Samulski, R. J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* **70**, 3227-34.

- Field, S. J., Tsai, F. Y., Kuo, F., Zubiaga, A. M., Kaelin, W. G., Jr., Livingston, D. M., Orkin, S. H. & Greenberg, M. E. (1996). E2F-1 functions in mice to promote apoptosis and suppress proliferation. *Cell* **85**, 549-61.
- Fisher, K. J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haecker, S. E., High, K., Pathak, R., Raper, S. E. & Wilson, J. M. (1997). Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* **3**, 306-12.
- Fisher, R. P., Jin, P., Chamberlin, H. M. & Morgan, D. O. (1995). Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase. *Cell* **83**, 47-57.
- Font de Mora, J., Uren, A., Heidarani, M. & Santos, E. (1997). Biological activity of p27kip1 and its amino- and carboxy-terminal domains in G2/M transition of *Xenopus* oocytes. *Oncogene* **15**, 2541-51.
- Foulkes, N. & Sassone-Corsi, P. (1996). CREM: a bZip transcription factor central to the cAMP nuclear response. In *Eukaryotic Gene Transcription*, pp. 59-101. Edited by S. Goodbourn. Oxford; New York: IRL Press at Oxford University Press.
- Foulkes, N. S. & Sassone-Corsi, P. (1996). Transcription factors coupled to the cAMP-signalling pathway. *Biochim Biophys Acta* **1288**, F101-21.
- Gabrielli, B. G., Clark, J. M., McCormack, A. K. & Ellem, K. A. (1997). Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2. *J Biol Chem* **272**, 28607-14.
- Gaertner, D. J., Smith, A. L. & Jacoby, R. O. (1996). Efficient induction of persistent and prenatal parvovirus infection in rats. *Virus Res* **44**, 67-78.
- Gareus, R., Gigler, A., Hemauer, A., Leruez-Ville, M., Morinet, F., Wolf, H. & Modrow, S. (1998). Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J Virol* **72**, 609-16.
- Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. & Lamb, N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**, 1169-79.
- Gnatenko, D., Arnold, T. E., Zolotukhin, S., Nuovo, G. J., Muzyczka, N. & Bahou, W. F. (1997). Characterization of recombinant adeno-associated virus-2 as a vehicle for gene delivery and expression into vascular cells. *J Invest Med* **45**, 87-98.
- Goldman, P. S., Tran, V. K. & Goodman, R. H. (1997). The multifunctional role of the co-activator CBP in transcriptional regulation. *Recent Prog Horm Res* **52**, 103-19; discussion 119-20.
- Gu, M. L. & Rhode, S. L. (1992). Trans-activation of H-1 P38 promoter is correlated with increased binding of cellular protein(s) to the trans-activation element (tar). *Virology* **190**, 116-123.
- Gu, Z., Kuntz-Simon, G., Rommelaere, J. & Cornelis, J. (1998). Transformation-dependent expression of a transcription factor NF-Y subunit. *Cancer research* **submitted**.
- Gu, Z., Plaza, S., Perros, M., Cziepluch, C., Rommelaere, J. & Cornelis, J. J. (1994). NF-Y controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interactions with an unusual binding site. *J. Virol.* **69**, 239-246.
- Guetta, E., Graziani, Y. & Tal, J. (1986). Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J Natl Cancer Inst* **76**, 1177-80.
- Hai, T. & Curran, T. (1991). Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3720-4.
- Hanson, N. D. & Rhode, S. L. d. (1991). Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J. Virol.* **65**, 4325-4333.
- Harrison, S. C. (1991). A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* **353**, 715-9.

- Hateboer, G., Kerkhoven, R., Shvarts, A., Bernards, R. & Beijersbergen, R. (1996). Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes Dev.* **10**, 2960-2970.
- Hauser, P. J., Agrawal, D., Chu, B. & Pledger, W. J. (1997). p107 and p130 associated cyclin a has altered substrate specificity. *J Biol Chem* **272**, 22954-9.
- Haut, D. D. & Pintel, D. J. (1998). Intron definition is required for excision of the minute virus of mice small intron and definition of the upstream exon. *J Virol* **72**, 1834-43.
- Helin, K., Wu, C. L., Fattaey, A. R., Lees, J. A., Dynlacht, B. D., Ngwu, C. & Harlow, E. (1993). Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev* **7**, 1850-61.
- Hershko, A. (1997). Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 788-99.
- Herzog, R. W., Hagstrom, J. N., Kung, S. H., Tai, S. J., Wilson, J. M., Fisher, K. J. & High, K. A. (1997). Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5804-9.
- Hirama, T. & Koeffler, H. P. (1995). Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* **86**, 841-54.
- Hoffmann, I., Draetta, G. & Karsenti, E. (1994). Activation of the phosphatase activity of human cdc25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *Embo J* **13**, 4302-10.
- Horton, L. E. & Templeton, D. J. (1997). The cyclin box and C-terminus of cyclins A and E specify CDK activation and substrate specificity. *Oncogene* **14**, 491-8.
- Hunt, T. (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* **2**, 213-22.
- Hurford, R. K., Jr., Cobrinik, D., Lee, M. H. & Dyson, N. (1997). pRb and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2f responsive genes. *Genes Dev* **11**, 1447-63.
- Hurst, H. C. (1995). Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* **2**, 101-68.
- Imoto, M., Doki, Y., Jiang, W., Han, E. K. & Weinstein, I. B. (1997). Effects of cyclin D1 overexpression on G1 progression-related events. *Exp Cell Res* **236**, 173-80.
- Jackman, M. R. & Pines, J. N. (1997). Cyclins and the G2/M transition. *Cancer Surv* **29**, 47-73.
- Jacoby, R. O., Ball-Goodrich, L. J., Besselsen, D. G., McKisic, M. D., Riley, L. K. & Smith, A. L. (1996). Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci* **46**, 370-380.
- Jacoby, R. O., Johnson, E. A., Ball-Goodrich, L., Smith, A. L. & McKisic, M. D. (1995). Characterization of mouse parvovirus infection by in situ hybridization. *J Virol* **69**, 3915-9.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. & Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-20.
- Joneson, T. & Bar-Sagi, D. (1997). Ras effectors and their role in mitogenesis and oncogenesis. *J Mol Med* **75**, 587-593.
- Jongeneel, C. V., Sahli, R., McMaster, G. K. & Hirt, B. (1986). A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J Virol* **59**, 564-73.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.

- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grosveld, G. & Sherr, C. J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**, 649-59.
- Karlseder, J., Rotheneder, H. & Wintersberger, E. (1996). Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol* **16**, 1659-67.
- Katayose, Y., Kim, M., Rakkar, A. N., Li, Z., Cowan, K. H. & Seth, P. (1997). Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin- dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* **57**, 5441-5.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E. & Sherr, C. J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* **7**, 331-42.
- Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J. & Sherr, C. J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* **79**, 487-96.
- Kee, B. L., Arias, J. & Montminy, M. R. (1996). Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* **271**, 2373-5.
- Kilham, L. & Olivier, L. (1959). A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* **7**, 428-437.
- King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M. & Kirschner, M. W. (1996). How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**, 1652-9.
- Kiyokawa, H., Kineman, R. D., Manova-Todorova, K. O., Soares, V. C., Hoffman, E. S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A. C., Frohman, L. A. & Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* **85**, 721-32.
- Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. & Lehner, C. F. (1994). Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during Drosophila embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77**, 107-20.
- Kobayashi, M. & Kawakami, K. (1997). Synergism of the ATF/CRE site and GC box in the housekeeping Na,K-ATPase alpha1 subunit gene is essential for constitutive expression. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 169-74.
- Kobayashi, M., Shimomura, A., Hagiwara, M. & Kawakami, K. (1997). Phosphorylation of ATF-1 enhances its DNA binding and transcription of the Na,K-ATPase alpha 1 subunit gene promoter. *Nucleic Acids Res* **25**, 877-82.
- Koering, C. E., Geuskens, M. & Rommelaere, J. (1996). Continuous production of minute virus of mice by an untransformed variant of Fisher rat fibroblast (FR3T3). *J Gen Virol* **77**, 447-52.
- Kolch, W., Philipp, A., Mischak, H., Dutil, E. M., Mullen, T. M., Feramisco, J. R., Meinkoth, J. L. & Rose, D. W. (1996). Inhibition of Raf-1 signaling by a monoclonal antibody, which interferes with Raf-1 activation and with Mek substrate binding. *Oncogene* **13**, 1305-14.
- Kollek, R. & Goulian, M. (1981). Synthesis of parvovirus H-1 replicative form from viral DNA by DNA polymerase gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6206-10.
- Kollek, R., Tseng, B. Y. & Goulian, M. (1982). DNA polymerase requirements for parvovirus H-1 DNA replication in vitro. *J Virol* **41**, 982-9.
- Krady, J. K. & Ward, D. C. (1995). Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 524-533.

- Krauskopf, A., Bengal, E. & Aloni, Y. (1991). The block to transcription elongation at the Minute Virus of Mice attenuator is regulated by cellular elongation factors. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3515-3521.
- Krauskopf, A., Resnekov, O. & Aloni, Y. (1990). A cis downstream element participates in regulation of in vitro transcription initiation from the P38 promoter of minute virus of mice. *J Virol* **64**, 354-60.
- Kuntz-Simon, G., Willwand, K., Bashir, T. & Rommelaere, J. (1997). Analysis of the dependency of parvovirus DNA replication on the neoplastic transformation of host cells. In *VIIIth International Parvovirus Workshop*. Heidelberg, Germany.
- Kwok, R. P., Lundblad, J. R., Chrivia, J. C., Richards, J. P., Bachinger, H. P., Brennan, R. G., Roberts, S. G., Green, M. R. & Goodman, R. H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* **370**, 223-6.
- La Thangue, N. B. (1994). DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 443-50.
- La Thangue, N. B. (1996). E2F and the molecular mechanisms of early cell-cycle control. *Biochem Soc Trans* **24**, 54-9.
- LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A. & Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**, 847-62.
- Lavoie, J. N., G. L. A., Brunet, A., Muller, R. & Pouyssegur, J. (1996). Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* **271**, 20608-16.
- Lee, K. A., Fink, J. S., Goodman, R. H. & Green, M. R. (1989). Distinguishable promoter elements are involved in transcriptional activation by E1a and cyclic AMP. *Mol Cell Biol* **9**, 4390-7.
- Legendre, D. & Rommelaere, J. (1992). Terminal regions of the NS1 protein of the parvovirus Minute Virus of Mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J. Virol.* **66**, 5705-5713.
- Legendre, D. & Rommelaere, J. (1994). Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **68**, 7974-85.
- Legrand, C., Rommelaere, J. & Caillet-Fauquet, P. (1993). MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virology* **195**, 149-55.
- Lehner, C. F. & O. Farrell, P. H. (1990). The roles of Drosophila cyclins A and B in mitotic control. *Cell* **61**, 535-47.
- Leng, X., Connell-Crowley, L., Goodrich, D. & Harper, J. W. (1997). S-Phase entry upon ectopic expression of G1 cyclin-dependent kinases in the absence of retinoblastoma protein phosphorylation. *Curr Biol* **7**, 709-12.
- Lew, D. J. & Kornbluth, S. (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 795-804.
- Li, X. & Rhode, S. L. d. (1991). Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro. *Virology* **184**, 117-30.
- Li, X. & Rhode, S. L. d. (1993). The parvovirus H-1 NS2 protein affects viral gene expression through sequences in the 3' untranslated region. *Virology* **194**, 10-9.

- Lin, S. Y., Black, A. R., Kostic, D., Pajovic, S., Hoover, C. N. & Azizkhan, J. C. (1996). Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol Cell Biol* **16**, 1668-75.
- Linden, R. M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. & Berns, K. I. (1996). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11288-94.
- Linser, P., Bruning, H. & Armentrout, R. W. (1977). Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J Virol* **24**, 211-21.
- Linser, P., Bruning, H. & Armentrout, R. W. (1979). Uptake of minute virus of mice into cultured rodent cells. *J Virol* **31**, 537-45.
- Liu, J. J., Chao, J. R., Jiang, M. C., Ng, S. Y., Yen, J. J. & Yang-Yen, H. F. (1995). Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* **15**, 3654-63.
- Liu, N., Lucibello, F. C., Korner, K., Wolfrain, L. A., Zwicker, J. & Muller, R. (1997). CDF-1, a novel E2F-unrelated factor, interacts with cell cycle-regulated repressor elements in multiple promoters. *Nucleic Acids Res* **25**, 4915-20.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Agbandje-McKenna, M. & Almendral, J. M. (1997). The major capsid protein of the parvovirus minute virus of mice translocates to the nucleus by a novel β -stranded nuclear localization motif. In *VIIIth International Parvovirus Workshop*. Heidelberg, Germany.
- Lorson, C., Pearson, J., Burger, L. & Pintel, D. J. (1998). An Sp1-binding site and TATA element are sufficient to support full transactivation by proximally bound NS1 protein of minute virus of mice. *Virology* **240**, 326-37.
- Lorson, C. & Pintel, D. J. (1997). Characterization of the Minute Virus of Mice P38 core promoter elements. *J. Virol.* **71**, 6568-6575.
- Lukas, J., Bartkova, J., Rohde, M., Strauss, M. & Bartek, J. (1995). Cyclin D1 is dispensable for G1 control in retinoblastoma gene-deficient cells independently of cdk4 activity. *Mol Cell Biol* **15**, 2600-11.
- Lukas, J., Herzinger, T., Hansen, K., Moroni, M. C., Resnitzky, D., Helin, K., Reed, S. I. & Bartek, J. (1997). Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway. *Genes Dev* **11**, 1479-92.
- Luo, R. X., Postigo, A. A. & Dean, D. C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92**, 463-73.
- Maeda, Y., Ikeda, U., Ogasawara, Y., Urabe, M., Takizawa, T., Saito, T., Colosi, P., Kurtzman, G., Shimada, K. & Ozawa, K. (1997). Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Cardiovasc Res* **35**, 514-21.
- Magnaghi-Jaulin, L., Groisman, R., Naguibneva, I., Robin, P., Lorain, S., Le Villain, J. P., Troalen, F., Trouche, D. & Harel-Bellan, A. (1998). Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**, 601-5.
- Martin-Castellanos, C. & Moreno, S. (1997). Recent advances on cyclins, CDKs and CDK inhibitors. *Trends in Cell Biol.* **7**, 95-98.
- Martinez, A. M., Afshar, M., Martin, F., Cavadore, J. C., Labbe, J. C. & Doree, M. (1997). Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity. *Embo J* **16**, 343-54.
- Massague, J. & Polyak, K. (1995). Mammalian antiproliferative signals and their targets. *Current opinion in Genetics and Development* **5**, 91-96.
- Matsushime, H., Quelle, D. E., Shurtleff, S. A., Shibuya, M., Sherr, C. J. & Kato, J. Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **14**, 2066-76.
- McCormick, F. (1993). Signal transduction: how receptors turns Ras on. *Nature* **363**, 15-16.

- McMaster, G. K., Beard, P., Engers, H. D. & Hirt, B. (1981). Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to the minute virus of mice. *J Virol* **38**, 317-26.
- Mischak, H., Seitz, T., Janosch, P., Eulitz, M., Steen, H., Schellerer, M., Philipp, A. & Kolch, W. (1996). Negative regulation of Raf-1 by phosphorylation of serine 621. *Mol Cell Biol* **16**, 5409-18.
- Missero, C., Di Cunto, F., Kiyokawa, H., Koff, A. & Dotto, G. P. (1996). The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* **10**, 3065-75.
- Mitchell, P. J. & Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-8.
- Moffatt, S., Yaegashi, N., Tada, K., Tanaka, N. & Sugamura, K. (1998). Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol* **72**, 3018-28.
- Molina, C. A., Foulkes, N. S., Lalli, E. & Sassone-Corsi, P. (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* **75**, 875-86.
- Monahan, P. E., Samulski, R. J., Tazelaar, J., Xiao, X., Nichols, T. C., Bellinger, D. A., Read, M. S. & Walsh, C. E. (1998). Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia. *Gene Ther* **5**, 40-9.
- Montminy, M. (1997). Transcriptional regulation by cyclic AMP. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 807-822.
- Morgan, D. O. (1996). The dynamics of cyclin dependent kinase structure. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 767-72.
- Morkel, M., Wenkel, J., Bannister, A. J., Kouzarides, T. & Hagemeyer, C. (1997). An E2F-like repressor of transcription. *Nature* **390**, 567-8.
- Moussset, S., Ouadrhiri, Y., Caillet-Fauquet, P. & Rommelaere, J. (1994). The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J Virol* **68**, 6446-53.
- Muller, H., Moroni, M. C., Vigo, E., Petersen, B. O., Bartek, J. & Helin, K. (1997). Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol* **17**, 5508-20.
- Murphy, F. A. (1995). Virus Taxonomy : Classification and nomenclature of viruses : sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of virology Suppl.* **10**.
- Murray, A. W. & Kirschner, M. W. (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**, 275-80.
- Murray, A. W., Solomon, M. J. & Kirschner, M. W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* **339**, 280-6.
- Naeger, L. K., Salome, N. & Pintel, D. J. (1993). NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J Virol* **67**, 1034-43.
- Nakajima, T., Fukamizu, A., Takahashi, J., Gage, F. H., Fisher, T., Blenis, J. & Montminy, M. R. (1996). The signal-dependent coactivator CBP is a nuclear target for pp90RSK. *Cell* **86**, 465-74.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D. Y. & Nakayama, K. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85**, 707-20.
- Nasmyth, K. (1996). At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet* **12**, 405-12.

- Nichols, M., Weih, F., Schmid, W., DeVack, C., Kowenz-Leutz, E., Luckow, B., Boshart, M. & Schutz, G. (1992). Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *Embo J* **11**, 3337-46.
- Niculescu, A. B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C. & Reed, S. I. (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* **18**, 629-43.
- Norbury, C. & Nurse, P. (1992). Animal cell cycles and their control. *Annu Rev Biochem* **61**, 441-470.
- Nugroho, T. T. & Mendenhall, M. D. (1994). An inhibitor of yeast cyclin-dependent protein kinase plays an important role in ensuring the genomic integrity of daughter cells. *Mol Cell Biol* **14**, 3320-8.
- Oleksiewicz, M. B., Costello, F., Huhtanen, M., Wolfenbarger, J. B., Alexandersen, S. & Bloom, M. E. (1996). Subcellular localization of Aleutian mink disease parvovirus proteins and DNA during permissive infection of Crandell feline kidney cells. *J Virol* **70**, 3242-7.
- Op De Beeck, A., Anouja, F., Mousset, S., Rommelaere, J. & Caillet-Fauquet, P. (1995). The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2. *Cell Growth Differ* **6**, 781-7.
- Op De Beeck, A. & Caillet-Fauquet, P. (1997). The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin? *J Virol* **71**, 5323-9.
- Ormondroyd, E., de la Luna, S. & La Thangue, N. B. (1995). A new member of the DP family, DP-3, with distinct protein products suggests a regulatory role for alternative splicing in the cell cycle transcription factor DRTF1/E2F. *Oncogene* **11**, 1437-46.
- Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W. & Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* **11**, 961-71.
- Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F. & Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269**, 682-5.
- Pathak, D. & Sigler, P. (1992). Updating structure-function relationships in the bZIP family of transcription factors. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 116.
- Pines, J. (1996). Cyclin from sea urchins to HeLas: making the human cell cycle. *Biochem Soc Trans* **24**, 15-33.
- Pitluk, Z. W. & Ward, D. C. (1991). Unusual Sp1-GC Box Interaction in a Parvovirus Promoter. *J. Virol.* **65**, 6661-6670.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M. & Koff, A. (1994). p27kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* **8**, 9-22.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., Cordon-Cardo, C. & DePinho, R. A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-23.
- Previsani, N., Fontana, S., Hirt, B. & Beard, P. (1997). Growth of the parvovirus minute virus of mice MVMp3 in EL4 lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification: cell- specific differences in virus uncoating in vitro. *J Virol* **71**, 7769-80.

- Pujol, A., Deleu, L., Nuesch, J. P., Cziepluch, C., Jauniaux, J. C. & Rommelaere, J. (1997). Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1. *J Virol* **71**, 7393-403.
- Puri, P. L., Cimino, L., Fulco, M., Zimmerman, C., La Thangue, N. B., Giordano, A., Graessmann, A. & Levrero, M. (1998). Regulation of E2F4 mitogenic activity during terminal differentiation by its heterodimerization partners for nuclear translocation. *Cancer Res* **58**, 1325-31.
- Qing, K., Khuntirat, B., Mah, C., Kube, D. M., Wang, X. S., Ponnazhagan, S., Zhou, S., Dwarki, V. J., Yoder, M. C. & Srivastava, A. (1998). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: correlation of tyrosine phosphorylation of the cellular single-stranded D sequence-binding protein with transgene expression in human cells in vitro and murine tissues in vivo. *J Virol* **72**, 1593-9.
- Raff, M. (1996). Size Control: The regulation of cell numbers in animal development. *Cell* **86**, 173-175.
- Rayet, B., Rommelaere, J. & Dinsart, C. (1997). Possible interconnection between the intracellular apoptotic pathways activated by TNF- α and H-1 virus. In *VIIIth International Parvovirus Workshop*. Heidelberg, Germany.
- Reed, S. I. (1997). Control of the G1/S transition. *Cancer Surv* **29**, 7-23.
- Resnitzky, D., Hengst, L. & Reed, S. I. (1995). Cyclin A-associated kinase activity is rate limiting for entrance into S phase and is negatively regulated in G1 by p27Kip1. *Mol Cell Biol* **15**, 4347-52.
- Respondek, M., Bratosiewicz, J., Pertynski, T. & Liberski, P. P. (1997). Parvovirus particles in a fetal-heart with myocarditis: ultrastructural and immunohistochemical study. *Arch Immunol Ther Exp* **45**, 465-70.
- Reynisdottir, I. & Massague, J. (1997). The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev* **11**, 492-503.
- Rhode, S. d. & Richard, S. M. (1987). Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* **61**, 2807-2815.
- Roesler, W. J., Graham, J. G., Kolen, R., Klemm, D. J. & McFie, P. J. (1995). The cAMP response element binding protein synergizes with other transcription factors to mediate cAMP responsiveness. *J Biol Chem* **270**, 8225-32.
- Rolling, F., Nong, Z., Pisvin, S. & Collen, D. (1997). Adeno-associated virus-mediated gene transfer into rat carotid arteries. *Gene Ther* **4**, 757-61.
- Rommelaere, J. & Cornelis, J. J. (1991). Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* **33**, 233-51.
- Roy, R., Adamczewski, J. P., Seroz, T., Vermeulen, W., Tassan, J. P., Schaeffer, L., Nigg, E. A., Hoeijmakers, J. H. & Egly, J. M. (1994). The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription- DNA repair factor. *Cell* **79**, 1093-101.
- Russell, S. J., Brandenburger, A., Flemming, C. L., Collins, M. K. & Rommelaere, J. (1992). Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J Virol* **66**, 2821-8.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J. & Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**, 325-31.
- Salome, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J. & Cornelis, J. J. (1990). Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes. *Oncogene* **5**, 123-30.

- Salome, N., van Hille, B., Geuskens, M. & Rommelaere, J. (1989). Partial reversion of conditional transformation correlates with a decrease in the sensitivity of rat cells to killing by the parvovirus minute virus of mice but not in their capacity for virus production: effect of a temperature-sensitive v-src oncogene. *J Virol* **63**, 4797-807.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. & Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**, 1497-501.
- Sauer, K., Knoblich, J. A., Richardson, H. & Lehner, C. F. (1995). Distinct modes of cyclin E/cdc2c kinase regulation and S-phase control in mitotic and endoreduplication cycles of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* **9**, 1327-39.
- Schoborg, R. V. & Pintel, D. J. (1991). Accumulation of MVM Gene Products Is Differentially Regulated by Transcription Initiation-RNA Processing and Protein Stability. *Virology* **181**, 22-34.
- Schulze, A., Zerfass, K., Spitkovsky, D., Middendorp, S., Berges, J., Helin, K., Jansen-Durr, P. & Henglein, B. (1995). Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11264-8.
- Sclafani, R. A. (1996). Cyclin dependent kinase activating kinases. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 788-94.
- Serizawa, H., Conaway, J. W. & Conaway, R. C. (1994). An oligomeric form of the large subunit of transcription factor (TF) IIE activates phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by TFIIF. *J Biol Chem* **269**, 20750-6.
- Serizawa, H., Makela, T. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Weinberg, R. A. & Young, R. A. (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIIF. *Nature* **374**, 280-2.
- Sewing, A., Wiseman, B., Lloyd, A. C. & Land, H. (1997). High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol* **17**, 5588-97.
- Sherr, C. & Roberts, J. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* **9**, 1149-1163.
- Sherr, C. J. (1995). Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians* **107**, 181-6.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* **274**, 1672-7.
- Shiekhatar, R., Mermelstein, F., Fisher, R. P., Drapkin, R., Dynlacht, B., Wessling, H. C., Morgan, D. O. & Reinberg, D. (1995). Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIF. *Nature* **374**, 283-7.
- Shikama, N., Lyon, J. & La Thangue, N. (1997). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *trends in cell biology* **7**, 230-236.
- Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E. & Tattersall, P. (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology* **23**, 61-73.
- Snyder, R. O., Spratt, S. K., Lagarde, C., Bohl, D., Kaspar, B., Sloan, B., Cohen, L. K. & Danos, O. (1997). Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum Gene Ther* **8**, 1891-900.
- Sobczak-Thepot, J., Harper, F., Florentin, Y., Zindy, F., Brechot, C. & Puvion, E. (1993). Localization of cyclin A at the sites of cellular DNA replication. *Exp Cell Res* **206**, 43-8.
- Sokol, L. & Prchal, J. T. (1995). Human genome--chromosome no. 19. *Cas Lek Cesk* **134**, 625-9.

- Spalholz, B. A. & Tattersall, P. (1983). Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain- dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* **46**, 937-43.
- Spegelaere, P., van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J. J. & Rommelaere, J. (1991). Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene. *J. Virol.* **65**, 4919-4928.
- Stern, B. & Nurse, P. (1996). A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet* **12**, 345-50.
- Storgaard, T., Christensen, J., Aasted, B. & Alexandersen, S. (1993). cis-acting sequences in the Aleutian mink disease parvovirus late promoter important for transcription: comparison to the canine parvovirus and minute virus of mice. *J. Virol.* **67**, 1887-1895.
- Tattersall, P. & Bratton, J. (1983). Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J. Virol.* **46**, 944-955.
- Tattersall, P. & Cotmore, S. F. (1986). The rodent parvoviruses. In *Viral and mycoplasmal infectious of laboratory rodents: effect on biomedical research*, pp. 305-348. Edited by P. N. Bhatt, R. O. Jacoby, H. C. Morse & A. E. New. New York: Academic Press.
- Tattersall, P., D'Abramo, A. & Cotmore, S. F. (1997). Replication competent chimeric parvovirus dependent upon the HIV tat transactivator. In *VIIIth International Parvovirus Workshop*. Heidelberg, Germany.
- Tattersall, P., Shatkin, A. J. & Ward, D. C. (1977). Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J Mol Biol* **111**, 375-94.
- Taylor, S. & Shalloway, D. (1996). Cell cycle-dependent activation of Ras. *Curr Biol* **6**, 1621-1627.
- Tijssen, P. & Bergoin, M. (1995). Densonucleosis viruses constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Seminars in Virology* **6**, 347-355.
- Toolan, H. W. (1967). Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters. *Nature* **214**, 1036.
- Toolan, H. W., Dalldorf, G. & Barclay, M. (1960). An unidentified filterable agent isolated from transplanted human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 1256-1259.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 205-215.
- Triezenberg, S. J. (1995). Structure and function of transcriptional activation domains. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 190-6.
- Trimarchi, J. M., Fairchild, B., Verona, R., Moberg, K., Andon, N. & Lees, J. A. (1998). E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2850-5.
- Tullis, G. E., Burger, L. R. & Pintel, D. J. (1992). The trypsin-sensitive RVER domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but not for proteolytic processing in vivo. *Virology* **191**, 846-57.
- van den Ent, F. M., van Wijnen, A. J., Lian, J. B., Stein, J. L. & Stein, G. S. (1994). Cell cycle controlled histone H1, H3, and H4 genes share unusual arrangements of recognition motifs for HiNF-D supporting a coordinate promoter binding mechanism. *J Cell Physiol* **159**, 515-30.
- Van Hille, B., Duponchel, N., Salome, N., Spruyt, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P., Cornelis, J. J. & Rommelaere, J. (1989). Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras-transformed rat cells to minute virus of mice. *Virology* **171**, 89-97.

- van Wijnen, A. J., Aziz, F., Grana, X., De Luca, A., Desai, R. K., Jaarsveld, K., Last, T. J., Soprano, K., Giordano, A., Lian, J. B. & et al. (1994). Transcription of histone H4, H3, and H1 cell cycle genes: promoter factor HiNF-D contains CDC2, cyclin A, and an RB-related protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12882-6.
- Vanacker, J. M., Corbau, R., Adelmant, G., Perros, M., Laudet, V. & Rommelaere, J. (1996). Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element. *J Virol* **70**, 2369-77.
- Vanacker, J. M. & Rommelaere, J. (1995). Non-structural proteins of autonomous parvoviruses: from cellular effects to molecular mechanisms. *Seminars in Virology* **6**, 291-297.
- Vaughan, P. S., van der Meijden, C. M., Aziz, F., Harada, H., Taniguchi, T., van Wijnen, A. J., Stein, J. L. & Stein, G. S. (1998). Cell cycle regulation of histone H4 gene transcription requires the oncogenic factor IRF-2. *J Biol Chem* **273**, 194-9.
- Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J. P. & Lees, J. A. (1997). E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Mol Cell Biol* **17**, 7268-82.
- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V. & Vuento, M. (1998). Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* **72**, 802-6.
- Vlach, J., Hennecke, S. & Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* **16**, 5334-44.
- Waga, S., Hannon, G., Beach, D. & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-578.
- Wakiya, K., Begue, A., Stehelin, D. & Shibuya, M. (1996). A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J Biol Chem* **271**, 30823-8.
- Walker, D. H. & Maller, J. L. (1991). Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication. *Nature* **354**, 314-7.
- Wang, D., Yuan, W., Davis, I. & Parrish, C. R. (1998). Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virology* **240**, 273-81.
- Wang, E. H., Zou, S. & Tjian, R. (1997). TAFII250-dependent transcription of cyclin A is directed by ATF activator proteins. *Genes Dev* **11**, 2658-69.
- Wasylyk, B., Wasylyk, C., Flores, P., Begue, A., Leprince, D. & Stehelin, D. (1990). The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. *Nature* **346**, 191-3.
- Watanabe, H., Pan, Z. Q., Schreiber-Agus, N., DePinho, R. A., Hurwitz, J. & Xiong, Y. (1998). Suppression of cell transformation by the cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2 requires binding to proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1392-7.
- Weinberg, R. A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* **254**, 1138-46.
- Weintraub, S. J., Chow, K. N., Luo, R. X., Zhang, S. H., He, S. & Dean, D. C. (1995). Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. *Nature* **375**, 812-5.
- Weintraub, S. J., Prater, C. A. & Dean, D. C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* **358**, 259-61.
- Willwand, K. & Hirt, B. (1993). The major capsid protein VP2 of minute virus of mice (MVM) can form particles which bind to the 3'-terminal hairpin of MVM replicative-form DNA and package single-stranded viral progeny DNA. *J Virol* **67**, 5660-3.

- Willwand, K., Mumtsidu, E., Kuntz-Simon, G. & Rommelaere, J. (1998). Initiation of DNA replication at palindromic telomeres is mediated by a duplex-to-hairpin transition induced by the minute virus of mice nonstructural protein NS1. *J Biol Chem* **273**, 1165-74.
- Wolffe, A. P. & Pruss, D. (1996). Targeting chromatin disruption: Transcription regulators that acetylate histones. *Cell* **84**, 817-9.
- Wu, Y., Ruef, J., Rao, G. N., Patterson, C. & Runge, M. S. (1998). Differential transcriptional regulation of the human thrombin receptor gene by the Sp family of transcription factors in human endothelial cells. *Biochem J* **330**, 1469-74.
- Xie, S., Price, J., Luca, M., Jean, D., Ronai, Z. & Bar-Eli, M. (1997). Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene* **15**, 2069-2075.
- Xing, J., Ginty, D. & Greenberg, M. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* **273**, 959-963.
- Xu, M., Sheppard, K. A., Peng, C. Y., Yee, A. S. & Piwnicka-Worms, H. (1994). Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **14**, 8420-31.
- Yamamoto, K. K., Gonzalez, G. A., Biggs, W. H. d. & Montminy, M. R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* **334**, 494-8.
- Yan, Y., Frisen, J., Lee, M. H., Massague, J. & Barbacid, M. (1997). Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev* **11**, 973-83.
- Yoshizumi, M., Wang, H., Hsieh, C. M., Sibinga, N. E., Perrella, M. A. & Lee, M. E. (1997). Down-regulation of the cyclin A promoter by transforming growth factor- β 1 is associated with a reduction in phosphorylated activating transcription factor-1 and cyclic AMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem* **272**, 22259-64.
- Young, N. S. (1996). Parvovirus infection and its treatment. *Clin Exp Immunol* **104 Suppl 1**, 26-30.
- Zavitz, K. & Zipursky, S. (1997). Controlling cell proliferation in differentiating tissues: genetic analysis of negative regulators of G1->S-phase progression. *Current opinion in cell biology* **9**, 773-781.
- Zhang, P., Liegeois, N. J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J. C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R. A. & Elledge, S. J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* **387**, 151-8.
- Zhao, J., Dynlacht, B., Imai, T., Hori, T. & Harlow, E. (1998). Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S- phase entry. *Genes Dev* **12**, 456-61.
- Zhao, Q., Schoborg, R. V. & Pintel, D. J. (1994). Alternative splicing of pre-mRNAs encoding the nonstructural proteins of minute virus of mice is facilitated by sequences within the downstream intron. *J Virol* **68**, 2849-59.
- Zhao, Y., Bjorbaek, C. & Moller, D. E. (1996). Regulation and interaction of pp90(rsk) isoforms with mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **271**, 29773-9.
- Zwicker, J. & Müller, R. (1997). Cell-cycle regulation of gene expression by transcriptional repression. *Trends in genetics* **13**, 3-6.

ANNEXE

En annexe sont consignées deux publications ne faisant pas directement l'objet du travail de thèse et qui ont été obtenues en collaboration avec d'autres membres du laboratoire.

Inhibition of Parvovirus Minute Virus of Mice Replication by a Peptide Involved in the Oligomerization of Nonstructural Protein NS1

AURORA PUJOL, LAURENT DELEU, JÜRGEN P. F. NÜESCH, CELINA CZIEPLUCH,
JEAN-CLAUDE JAUNIAUX, AND JEAN ROMMELAERE*

*Applied Tumor Virology Unit, Abteilung 0610, and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U 375,
Deutsches Krebsforschungszentrum, 69120 Heidelberg, Germany*

Received 11 March 1997/Accepted 24 June 1997

The large nonstructural protein NS1 of the minute virus of mice and other parvoviruses is involved in essential steps of the viral life cycle, such as DNA replication and transcriptional regulation, and is a major contributor to the toxic effect on host cells. Various biochemical functions, such as ATP binding, ATPase, site-specific DNA binding and nicking, and helicase activities, have been assigned to NS1. Homo-oligomerization is a prerequisite for a number of proteins to be fully functional. In particular, helicases generally act as homo-oligomers. Indirect evidence of NS1 self-association has been recently obtained by a nuclear cotransport assay (J. P. Nüesch and P. Tattersall, *Virology* 196:637–651, 1993). In order to demonstrate the oligomerizing property of NS1 in a direct way and localize the protein region(s) involved, the yeast two-hybrid system was used in combination with deletion mutagenesis across the whole NS1 molecule, followed by high-resolution mapping of the homo-oligomerization domain by a peptide enzyme-linked immunosorbent assay method. This study led to the identification of a distinct NS1 peptide that contains a bipartite domain involved in NS1 oligomerization. Furthermore, this isolated peptide was found to act as a specific competitive inhibitor and suppress NS1 helicase activity *in vitro* and parvovirus DNA replication *in vivo*, arguing for the involvement of NS1 oligomerization in these processes. Our results point to drug targeting of oligomerization motifs of viral regulatory proteins as a potentially useful antiviral strategy.

Parvoviridae is a family of small single-stranded DNA viruses with genome sizes in the range of 5 kb. Vertebrate autonomous parvoviruses, including the prototype minute virus of mice (MVMp), are characterized by similar genomic organizations. Because of the smallness of their genomes, parvoviruses rely on various genetic strategies to optimize coding potential. These include the use of two promoters, overlapping open reading frames, alternative mRNA splicing, polyadenylation signals, posttranslational modifications, and multifunctional proteins (7, 18, 32, 53). The genome can basically be divided into two parts, with the left-hand portion encoding two types of nonstructural proteins, NS1 and NS2, and the right-hand portion coding for virus structural proteins (7, 16, 22, 32). Nonstructural proteins NS1 and NS2 are phosphorylated and show localization that is mainly nuclear (NS1) or both cytoplasmic and nuclear (NS2) (17, 20). NS2 seems to be required in a cell type-dependent manner for efficient viral DNA and protein synthesis and for virus production (43, 44). NS1 plays essential roles in viral DNA replication (7, 18, 19), viral gene expression (18, 25, 29), and cytotoxicity (12, 42).

Biochemical studies have shown that the NS1 proteins of autonomous parvoviruses and the analogous Rep78 and Rep68 products of adeno-associated viruses (a group of defective members of *Parvoviridae*) possess intrinsic ATP-dependent helicase, ATPase, and site-specific endonuclease activities (7, 15, 18, 31). These functions are involved in viral DNA synthesis, particularly in the resolution of telomeres and concatemeric intermediates leading to the covalent attachment of NS1 to the

5' ends of DNA replication products (21). On the other hand, the NS1 protein contains a transcription-activating domain and controls viral gene expression, modulating the activity of its own promoter (P4) to a small extent and strongly inducing the P38 promoter that drives the structural transcription unit (18, 25, 29). NS1 binds to DNA in a sequence-specific manner through a motif (ACCA)_{2,3} that is highly represented in the parvoviral genome (15) but not restricted to it (61). Multiple *cis*-acting sequences, including a transactivation-responsive upstream motif, GC and TATA boxes, and a downstream element, were reported to be important for the activity and NS1 induction of promoter P38 (29).

NS1 is a DNA-binding protein with replicational and transcriptional functions. It is noteworthy that a number of proteins exhibiting either one of these activities proved to act as homo- and/or hetero-oligomers. This is the case particularly for most helicases (64), transcription factors (5, 35, 39, 62), endonucleases (3, 49), and multifunctional proteins, such as large T antigen (LTag) of simian virus 40 (SV40) (40). In the latter case, tetrameric or smaller-order LTag homo-oligomers bind to a 35-bp sequence within the SV40 DNA origin of replication in the absence of ATP, whereas DNA binding is enhanced 10-fold and a 70-bp sequence containing the entire origin is protected by two hexamers of LTag when ATP is added (38, 40). It is tantalizing to speculate that NS1 also binds to DNA through an interaction of this type, since this protein induces the formation of a large footprint that extends over 43 nucleotides on both strands around the origin of replication but only in the presence of ATP or antibody that is assumed to act as a cross-linker (15). The same conditions are required for NS1 to bind to the transactivation-responsive region of promoter P38, which also results in a large and asymmetric footprint (14). Indirect evidence of NS1 homo-oligomerization has

* Corresponding author. Mailing address: Applied Tumor Virology Unit, Abteilung 0610 and INSERM U 375, Deutsches Krebsforschungszentrum, Postfach 10 19 49, 69009 Heidelberg, Germany. Phone: 49 6221 42 4960. Fax: 49 6221 42 4962.

been obtained by a cotransport assay (47). Mutant forms of NS1 protein from MVMP lacking the nuclear localization signal (NLS⁻) were found to be transported into the nucleus when they were coexpressed with wild-type (wt) NS1, presumably through association of the former with the latter NS1 polypeptide. NLS⁻ mutant forms of NS1 lacking amino acids (aa) 95 to 254 or the 67 C-terminal aa were still competent for nuclear translocation in the presence of wt NS1, suggesting that the homo-oligomerization domain is narrowed down to a distinct region(s) of the protein. However, direct evidence of NS1-NS1 interaction and a role for homo-oligomerization in NS1 functioning was lacking. This prompted us to investigate these questions by using the NS1 proteins of the closely related MVMP and H1 viruses as models.

We first determined whether NS1 homo-oligomers were physically detectable and whether a defined continuous amino acid stretch(es) could be identified as being necessary to their formation. Should this be the case, the role of oligomerization could then be tested by overloading cells or in vitro reaction mixtures with the corresponding peptide to prevent full-length NS1 molecules from interacting with each other and by assessing the consequences for NS1 functioning. Initial demonstration and mapping of an NS1 linear domain involved in homo-oligomerization were attempted by using the yeast two-hybrid system (6). This approach is based on the modular nature of the yeast GAL4 protein, which comprises separable domains responsible for DNA binding and transcriptional activation (33). Plasmids encoding two hybrid proteins, with one consisting of the GAL4 DNA-binding domain (BD) fused to intact NS1 and the other consisting of the GAL4 activation domain (AD) fused to a mutant form of NS1, were constructed and introduced together into yeast. This allowed NS1 mutant forms retaining a functional oligomerization motif to be identified through interaction with intact NS1. Indeed, this interaction led to reconstitution of a functional GAL4 activator capable of inducing the expression of a reporter gene that was placed under the control of a regulatory region containing multiple recognition sites for the GAL4 BD. This system is highly sensitive and offers an in vivo alternative to in vitro approaches for studying protein-protein interactions. In a second step, mapping of the NS1 homo-oligomerization domain was refined by using a synthetic peptide library that covered an NS1 region found to be essential for oligomerization in the two-hybrid system and by testing their interaction with NS1 by a recently described enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (63).

The results presented here indicate that a 20-aa peptide of NS1 is sufficient to bind full-length NS1. This peptide comprises a bipartite oligomerization motif that is able to inhibit NS1 oligomerization and helicase activities in vitro. When it was microinjected into host cells, the interaction peptide suppressed parvovirus DNA replication, arguing for a role of oligomerization in essential NS1 function(s). Furthermore, these data show that antiviral agents can be designed in the form of short synthetic peptides that target the oligomerization domains of viral regulatory proteins.

MATERIALS AND METHODS

Construction of NS1 vectors for expression in yeast. The GAL4-NS1 chimeric plasmids used (Fig. 1A; Table 1) were constructed by standard procedures (57). The mutations introduced (see below) were confirmed by double-strand sequencing by the dideoxy method. With the exception of one case that was noted and discarded, no spontaneous alterations were observed. All plasmids were amplified in the bacterial strain *Escherichia coli* sure (Stratagene). NS1 coding sequences were derived from the genome of H1 or MVMP virus.

(i) **H1 virus NS1-expressing plasmids.** The full-length NS1 coding sequence of parvovirus H1 DNA was produced by PCR from the infectious molecular clone pSR19 (27) in the form of a 5' *Bam*HI-*Sall* 3' fragment. This fragment was

inserted into the pGAD424 and pGBT9 vectors (Clontech) downstream from and in-frame with the GAL4 coding sequence (23). Different strategies were used to generate plasmid derivatives harboring specific deletions.

A series of terminal and internal deletions were obtained by endonuclease digestion and religation with convenient restriction sites and insertion of double-stranded adapters to keep the NS1 reading frame. Deletion of the sequence encoding the 69 C-terminal amino acids of NS1 was achieved by restriction digestion of pGAD-NS1 and pGBT9-NS1 with *Xba*I and *Sall* endonucleases and insertion of adapter 5' CTAGACTAACCCGGG 3', generating pGAD-dlC69 and pGBT9-dlC69, respectively. pGAD-dl543:605 was produced by digestion with *Bst*EII and *Xba*I and insertion of adapter 5' GTTACCAATCTGCT 3'. pGAD-dl504:543 was produced by digestion with *Bsm*I and *Bst*EII and insertion of adapter 5' CAACAAAGGAG 3'. pGAD-dl360:509 was digested with *Nhe*I and *Bsm*I and religated with adapter 5' CTAGCACCAGAAATGCT 3'.

Another set of NS1 deletion mutants was produced by PCR technology. Oligonucleotides AP1 (5' CACTGTCATGTGCTG 3') and AP4 (5' TGGCATGGCAGACTT 3'), which anneal to the NS1 template at codons 128 and 381 in the forward and reverse senses, respectively, served as external primers for PCR mutagenesis. Oligonucleotides causing a defined sequence of the template to loop outward was used as overlapping internal primers. To generate mutant pGAD-dl307:353 (deletion of NS1 codons 307 to 353), oligonucleotide pairs AP1 and AP6 (5' GTTTGCTCATCATCCAGTC 3') and AP4 and AP5 (5' GACTGGATGATGATGAGCAAATAGCCAAC 3') were used to amplify deleted derivatives of sequences encompassing codons 128 to 356 and 303 to 381, respectively. Both PCR products were purified, denatured, annealed, and amplified again with outside primers AP1 and AP4. The final PCR product was substituted for the equivalent wild-type DNA fragment. Similarly, plasmid pGAD-dl349:358 was generated with primer pairs AP1 and AP8 (5' TCTGGTGTAGCCATAGCTTTTTCCAGAAT 3') and AP4 and AP7 (5' ATTCTGGAAAAGCTATGGCTAGCACCAGA 3'). Other small deletion mutants were created by using chimeric PCR primers that contained an *Eco*RI site (underlined in sequences below) as a substitute for the extruded sequence from the viral DNA template. The following pairs of primers were used: for pGAD-dl226:275, AP1 and AP2 (5' TCTAGTTTGAATCTGTCCCTGGTG GACT 3'); for pGAD-dl278:350, AP4 and AP3 (5' CGCGGCAGAAATCCA AAGCAAAGTACCCAAC 3'); and for pGAD-dl278:305, AP4 and AP9 (5' CGCGGCAGAAATCCAATGATGATGCAGCCA 3').

(ii) **MVMP NS1-expressing plasmids.** The NS1 coding region from MVMP DNA was isolated as a *Nco*I-*Sall* fragment from vector pTM1-NS1 (47) and introduced into pGAD424 and pGBT9 with the help of an adapter encompassing the *Nco*I site (5' AATCCCATATGGA 3'), creating pGAD-NS1(MVMP) and pGBT9-NS1(MVMP), respectively. The deletion giving rise to the previously described dl158 mutant form of NS1 was isolated as an *Eco*RV-*Xho*I fragment from vector pTHisNS1 dl158 (46) and inserted into *Eco*RV-*Sall*-digested pGAD-NS1(MVMP) to generate double mutant pGAD-dl158:C67. The mutation responsible for the previously described NS1 K405M substitution (45) was transferred through an *Eco*RI-*Bst*EII fragment into pGAD-NS1(MVMP) and pGAD-NS1(H1) to give rise to pGAD-MVMP 405M and chimera pGAD-H1/MVMP 405M, respectively. The same fragment encoding the original K at position 405 was used to produce chimera pGAD-H1/MVMP.

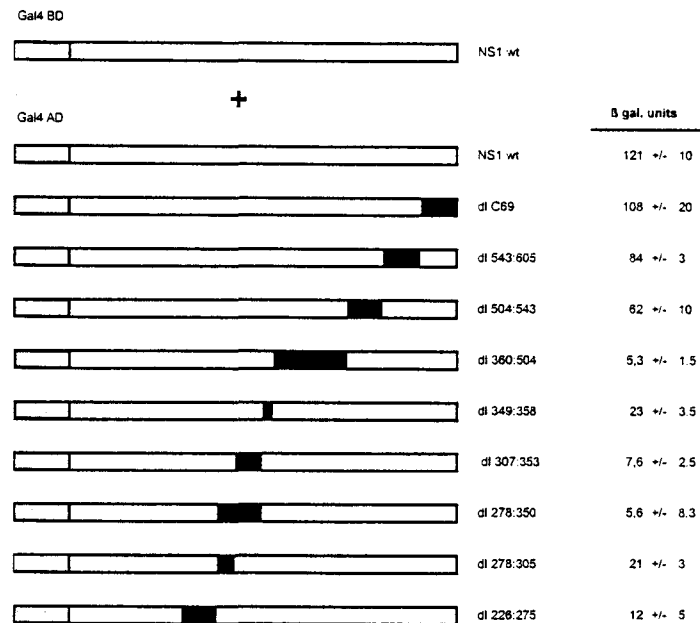
(iii) **MVMP NS2-expressing plasmids.** The NS2 coding region was isolated as a *Nco*I-*Bgl*II fragment from vector pQE-NS2p (48) and introduced into pGBT9 and pGAD424 with the help of an adapter that encompassed the *Nco*I site (8).

Yeast two-hybrid analysis. Yeast genetic manipulations were performed as previously described (6) with *Saccharomyces cerevisiae* HF7c and SFY526 and shuttle vectors pGBT9 and pGAD424 (Clontech). Plasmid pGBT9 harbors the coding sequence for the first 149 aa of the GAL4 protein, comprising the BD, as well as the yeast selectable gene *TRP1*. Vector pGAD424 contains the sequence encoding the GAL4 AD (aa 768 to 881) and the yeast selectable gene *LEU2*. Both plasmids harbor the 2 μ m origin of replication. The expression of GAL4 fusion proteins is driven by the constitutively active yeast *ADH1* promoter.

Recombinant vectors were introduced into SFY526 and HF7c cells as previously described (26). Yeast cultures were maintained at 30°C in SD minimal medium (0.67% [wt/vol] Bacto yeast nitrogen base, 2% [wt/vol] dextrose) containing the appropriate amino acid supplements.

β -Galactosidase assays. Protein-protein interactions in the two-hybrid system can be observed on plates in the presence of X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) or quantitated in liquid cultures by measuring the cell-associated β -galactosidase activity. Plate assays were performed by the filter lift method (10). Quantitative liquid assays were carried out as follows. Aliquots (0.5 or 1 ml) from exponentially growing cultures (optical density at 600 nm [OD₆₀₀] of ~1) were spun and resuspended in 0.5 ml of Z buffer (100 mM phosphate buffer [pH 7.0], 10 mM KCl, 1 mM Mg₂SO₄, 50 mM β -mercaptoethanol). After chloroform (50 μ l) and 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS; 50 μ l) were added, samples were vortexed for 30 s, supplemented with *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (160 μ l of a 4 mg/ml solution in sodium phosphate buffer), and incubated at 30°C for various times. Reactions were stopped with 250 μ l of 1 M sodium carbonate. OD₂₁₀s were read. Background values (obtained with non-transformed cells) were subtracted, and the results were expressed in OD₂₁₀ units/min of reaction for 1 ml of culture at an OD₆₀₀ of 1. Assays were done in duplicate for at least 10 independent transformants.

A.



B.

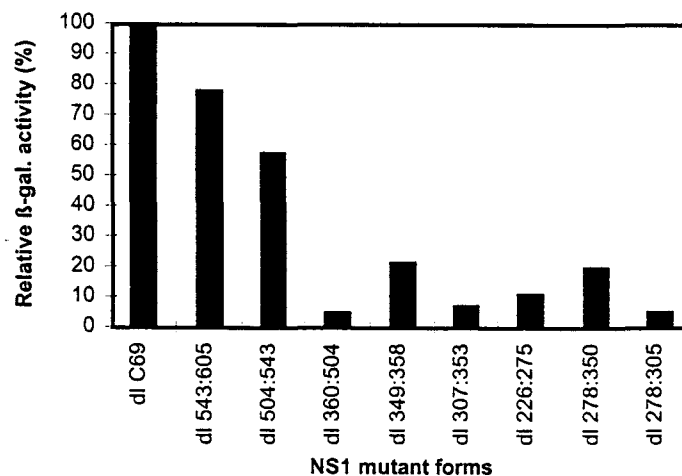


FIG. 1. Mapping of an NS1 homo-oligomerization domain by using the two-hybrid system. (A) H1 virus wt NS1 protein and deleted derivatives were produced as fusion polypeptides with the GAL4 AD and tested in cotransformation experiments for the ability to interact with wt NS1 fused to the GAL4 BD. In-frame deletions in GAL4 AD-NS proteins are shown by black boxes and lie between the amino acids indicated in the respective designations. β -Galactosidase (β gal.) activities were determined in duplicate for more than 10 individual colonies and are averages from four independent experiments (standard deviations were less than 20%). The background value obtained with untransformed cells was less than 0.1 β -galactosidase units. The inducing activity of the GAL4 BD-wt NS1 fusion protein alone (\sim 6 β -galactosidase units) was subtracted. (B) β -galactosidase (β -gal.) activities exhibited by cells cotransformed with the indicated NS1 deletion mutant proteins are expressed as percentages of the NS1 dlC69 value. Each bar represents one deletion mutant form of NS1; the order is determined by the central positions of the respective deletions along the NS1 amino acid sequence. Data are averages and standard deviations from at least four independent assays.

Peptides and ELISA. Peptides linked at their N termini to a biotin residue through a 4-aa SGSG spacer were synthesized (Chiron Mimotopes, Clayton, Australia) to cover the wt NS1 protein with 16- or 5-aa overlaps. An additional set of peptides, in which each residue from aa 261 to 280 was substituted in turn by alanine, was generated. Lyophilized peptides were dissolved in dimethyl sulfoxide at 13 μ g/ μ l and stored at -20°C .

Whole-protein extracts were prepared from A9 cells at 20 h after mock treatment or MVMp inoculation (multiplicity of infection, 10 PFU/cell). Briefly, cells were collected in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), washed twice, and resuspended in 1 volume of lysis buffer (20 mM HEPES [pH 7.9], 0.4 M NaCl,

25% glycerol, 1 mM EDTA, 2.5 mM dithiothreitol [DTT], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After incubation on ice for 20 min, the cell suspension was frozen at -70°C , thawed on ice, and vigorously vortexed. After centrifugation ($18,000 \times g$, 10 min, 4°C), the supernatant was frozen in liquid nitrogen. The protein concentrations of extracts were determined with a ready-to-use solution provided by Bio-Rad. His-tagged NS1 protein was produced from recombinant baculovirus and purified as previously described (4). Streptavidin-coated plates (Chiron Mimotopes) were blocked by incubation for 1 h at room temperature with PBS containing 1% sodium caseinate and 0.5% Tween 20 (100 μ l/well). After four washes with PBS containing 0.1% Tween 20, peptides (650 ng in 100

TABLE 1. NS1 oligomerization and transcription activation in yeast^a

| GAL4 AD fusion | β-Galactosidase activity ^b | | | | |
|----------------------|---------------------------------------|-----------|---------------------|-----------------|-----------|
| | BD | H1 NS | | MVMp NS | |
| | | BD-wt NS1 | BD-NS1 <i>dIC69</i> | BD-wt NS2 | BD-wt NS1 |
| AD | <0.1 | 6 | <0.1 | <0.1 | 60 |
| H1 NS | | | | | |
| AD-wt NS1 | <0.1 | 127 | 7 | ND ^c | ND |
| AD-NS1 <i>dIC69</i> | <0.1 | 114 | 0.9 | ND | ND |
| MVMp NS | | | | | |
| AD-wt NS1 | <0.1 | ND | ND | <0.1 | 230 |
| AD- <i>dI158:C67</i> | <0.1 | ND | ND | ND | 190 |
| AD-NS1 | <0.1 | ND | ND | ND | 120 |
| Met405 | | | | | |
| AD-wt NS2 | <0.1 | ND | ND | <0.1 | 60 |
| H1-MVM chimeric NS | | | | | |
| AD-wt NS1 | <0.1 | 200 | ND | ND | ND |
| AD-NS1 | <0.1 | 205 | ND | ND | ND |
| Met405 | | | | | |

^a NS1 was used both as bait and prey by fusing the protein with the separate BD and AD of GAL4. A *lacZ* gene placed under the control of GAL4 recognition motifs served as the reporter to reveal the capacity of NS1 for activating transcription by itself (cell transformation with BD-NS1 alone) or for homo-oligomerization and reconstitution of a functional GAL4 activator (cell cotransformation with BD-NS1 and AD-NS1). The NS1 proteins tested were the wt and mutant derivatives that harbored an amino acid substitution in the ATP-binding site (Met405), a C-terminal deletion encompassing the AD (NS1 *dIC69* and *dI158:C67*), or an internal deletion affecting the BD (*dI158:C67*). NS1 proteins of MVMp and H1 virus origins, as well as chimeric polypeptides consisting of the H1 virus wt protein in which the sequence from aa 276 to 543 (comprising the ATP-binding site) was replaced by the equivalent portion from MVMp wt NS1 or NS1 Met405, were analyzed. The NS2 protein of MVMp, sharing 85 N-terminal aa with NS1, was tested in a similar way for self-association and cross-interaction with NS1.

^b *lacZ* gene expression was measured and quantified in international β-galactosidase units (41). Data are averages from at least four independent experiments (standard errors were less than 20%). In each experiment, β-galactosidase assays were performed in duplicate for at least 10 independent transformants.

^c ND, not determined.

μl of PBS supplemented with 0.1% sodium caseinate) were added individually to appropriate wells and allowed to bind for 1 h at room temperature. All subsequent incubations were carried out in a total volume of 100 μl for 1 h at room temperature, with extensive washing of plates with PBS containing 0.5% Tween 20 between each step. Peptide-coated wells were treated with 10 μg of total protein extract or 300 ng of purified His-tagged NS1 protein. SP8 anti-NS1 antiserum (11) was added at a 1/1,000 dilution in PBS containing 0.1% sodium caseinate and 1% sheep serum, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit antibodies (Dianova) at a 1/2,000 dilution. Bound antibodies were detected by using the chromogenic substrate 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate) as a 0.5 mg/ml solution in 0.1 M Na₂HPO₄-0.08 M citric acid-0.01% (wt/vol) hydrogen peroxide. Plates were read at 405 and 492 nm.

Mammalian cell lines and viruses. A9 cells were cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with 5% fetal calf serum. In order to obtain cell extracts containing NS1 protein, A9 cells on 15-cm-diameter dishes were incubated for 1 h at 37°C in 5 ml of MEM supplemented with cesium chloride-purified MVMp (multiplicity of infection, 5 PFU/cell). After removal of the inoculum, cultures were washed and further incubated with fresh complete MEM for 24 h.

Helicase assay. Helicase assays were performed as previously described (46). The M13-VAR substrate was constructed by reverse primer annealing to single-stranded M13 DNA and extension for 5 min at room temperature in the presence of all four deoxynucleoside triphosphate (dNTP) precursors (including [α-³²P]dATP) and Sequenase. ³²P-labeled fragments of various lengths were obtained by the addition of ddGTP and further incubation for 20 min at room temperature. Purified NS1 (10 ng) produced from recombinant vaccinia virus in HeLa cells (45, 46) was incubated with various amounts of NS1-derived peptides for 5 min at room temperature before M13-VAR substrate (20 ng) was added.

The helicase reaction was carried out in 20 mM HEPES-KOH (pH 7.5)-5 mM MgCl₂-5 mM KCl-0.1 mM DTT-2 mM ATP for 30 min at 32°C. The reaction was stopped by the addition of SDS and EDTA, and the products were analyzed by 7% nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of 0.1% SDS.

Protein immunoprecipitation. The complete MVMp NS1 coding sequence was isolated from vector pRSV-NS1 (60), filled in with Klenow DNA polymerase, and introduced in the blunted *EcoRI* site of vector pX (50), giving rise to pX-NS1. To create pX-dIC67 (encoding a truncated NS1 protein lacking the 67 C-terminal aa), *XhoI* digestion and religation were performed.

Full-length NS1 and *dIC67* NS1 were independently produced from plasmids pX-NS1 and pX-dIC67 with a TNT transcription-translation kit from Promega according to the instructions of the manufacturer in the presence of [³⁵S]methionine (translabel [1,000 Ci/mmol]; ICN Pharmaceuticals). Reaction products (10⁶ cpm) were diluted either separately or together in 400 μl of immunoprecipitation buffer (50 mM HEPES [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μg of leupeptin per ml, 10 U of aprotinin per ml, and 1 mM NaF), and different amounts of inhibitor peptides were added. Immunoprecipitation took place at 4°C overnight in the presence of a 50% suspension of protein A-G Sepharose beads (Pharmacia). After four washes with immunoprecipitation buffer, immunocomplexes were separated by electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel containing 1% SDS and visualized by autoradiography.

Antiserum. The SP8 polyclonal rabbit antiserum is directed against a carboxy-terminal peptide of NS1 and is equivalent to the previously described SP7 serum (11).

Microinjection. A9 cells were plated on 12-mm-diameter coverslips (CELLocate; Eppendorf) on individual 35-mm-diameter dishes to give half-confluent monolayers after 24 h of incubation. About 500 cells within a marked area in the center of each coverslip were microinjected in less than 30 min with 0.1 μl of an aqueous solution of an infectious MVMp molecular clone (a kind gift of P. Tattersall) (10 μg/ml) supplemented (or not) with a synthetic NS1 peptide (6.5 to 65 ng/ml). The replication-defective MVM ΔNS DNA clone (24) was used as a negative control. Microinjection was performed with a Zeiss-AIS computer-controlled system. Coverslips were further incubated in normal growth medium (MEM enriched with 5% fetal calf serum) at 37°C. As an internal control for monitoring cells after microinjection, fluorescein isothiocyanate-dextran (final concentration, 0.5%) was used as a coinjection marker. At 24 h after microinjection, fluorescent cells were counted and the coverslip was discarded if survivor cells did not reach 75% of the total number of microinjected cells.

DNA hybridization. At 48 h after microinjection, cells were washed twice with PBS. A 25-mm-diameter nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) was gently applied to the cell layer and pressed two times (2 min each) with Whatman 3MM paper presaturated with 0.5 M NaOH-1.5 M NaCl. After neutralization with 3MM paper saturated with 1.5 M NaOH-0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), the membrane was backed for 1 h at 80°C in order to immobilize transferred DNA. Prehybridization and hybridization were performed in 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)-4× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl plus 0.015 M sodium citrate)-0.5× Denhardt's reagent-1% SDS-100 μg of salmon sperm DNA per ml-50% formamide at 42°C. A radioactive probe spanning the whole genome of MVMp was obtained in the form of a *BamHI* DNA fragment that was excised from plasmid pMM1984, purified by agarose gel electrophoresis, and labeled with [³²P]dCTP by using a Megaprime kit (Amersham). After overnight hybridization, the membrane was washed first in 2× SSC-2% SDS at room temperature for 20 min and then in 0.2× SSC-0.2% SDS at 65°C for 20 min.

RESULTS

NS1 homo-oligomerization in yeast. Yeast strains SFY526 and HF7c contain the *E. coli lacZ* gene under the control of GAL4 DNA-binding sites in distinct promoters and were used to reveal the binding of a transcriptional activator to the DNA recognition motif for GAL4. Similar results were obtained with both strains: the results for SFY526 cells are shown in Table 1. Data are β-galactosidase activities above the background value given by cells cotransformed with plasmids that expressed separately the GAL4 BD and AD alone (preventing the former from directing the latter to the target promoter).

Cells coexpressing AD and a BD fusion with the wt NS1 protein of either H1 or MVM virus (BD-wt NS1) showed a significant increase in β-galactosidase activity compared with that of the AD-plus-BD control (Table 1). This induction is likely to result from both BD-mediated targeting of the *GAL1* promoter driving the *lacZ* gene and the intrinsic capacity of NS1 for activating transcription, as demonstrated previously in mammalian cells (29, 37, 54, 55). In agreement with the assumption that NS1 retains this capacity to some extent in yeast,

no stimulation of β -galactosidase production was detected with the BD-NS1 *d1C69* fusion comprising a C-terminally deleted mutant form of NS1 previously shown to lack the AD (36).

A dramatic increase in β -galactosidase activity was observed when BD-wt NS1 was introduced with AD-wt NS1 instead of AD alone (Table 1). This result argued for the occurrence of NS1 homo-oligomerization in this system, which bridged the GAL4 AD and BD and allowed the former to induce the target promoter. The NS1 proteins of both MVM and H1 viruses proved able to oligomerize not only with themselves but also with each other, in keeping with the high (95%) amino acid homology of the NS1 products of these closely related viruses (18). The NS1 capacity for oligomerization exhibited some specificity since no significant interaction was detected between BD-NS1 and AD fusions with other proteins, such as lamin A, p53, and SV40 LTA_g (data not shown). Furthermore, the two-hybrid system failed to reveal the formation of oligomers between NS1 and the other parvovirus nonstructural products, NS2 (Table 1). Similarly, NS1-NS2 complexes were not detected in parvovirus-infected mammalian cells by coimmunoprecipitation (11). NS1 and NS2 proteins share 85 N-terminal aa that are accessible to antibodies (SP12 antiserum) (11) in both polypeptides. Altogether, these data suggest that the NS1 oligomerization domain lies downstream from this region within the NS1-specific amino acid sequence. This is consistent with the apparent inability of NS2 to form homo-oligomers in yeast (Table 1). It should also be stated that the C-terminally deleted mutant NS1 *d1C69*, which lacks the transcription-activating region, retained the capacity for homo-oligomerization (Table 1), pointing to the involvement of distinct NS1 domains in these respective functions. This conclusion was further tested with the reciprocal set of effector plasmids by fusing the NS1 *d1C69* mutant form to the BD and determining its ability to oligomerize with full-length NS1 fused to the AD. A positive signal was also obtained with this combination of constructs, confirming that the NS1 *d1C69* mutant form kept the capacity for physically interacting with NS1 (1). Therefore, these results argued against the requirement of either the N- or C-terminal portion of NS1 for the homo-oligomerization of this protein. This tentative conclusion was sustained by more refined mapping (see below).

Disruption in the NLS prevents NS1 from migrating into the nucleus, unless the mutant protein is coexpressed with wt NS1 (47). This rescue was ascribed to the cotransport of NLS⁻ NS1 mutants with wt NS1, providing indirect evidence of NS1 homo-oligomerization. The capacity of wt NS1 for the cotransport of NLS⁻ derivatives was found to be abolished by an amino acid substitution at position 405 (K405M or K405R) within the NTP-binding site of the protein (45). It was therefore of interest to determine the effect of this substitution at position 405 on NS1 homo-oligomerization in yeast. In contrast with its interference with cotransport in mammalian cells, the K405M substitution failed to prevent NS1 from interacting with itself in the two-hybrid system (Table 1). This was true for both the NS1 protein of MVMp and a chimeric NS1 polypeptide in which aa residues 276 to 543 from MVMp wt NS1 or K405M were substituted for the equivalent sequence of H1 virus NS1. The discrepancy in the requirement of oligomerization for NTP binding between the two-hybrid and cotransport assays may be due to the fact that dimer formation is enough for positive scoring in the former but multimers are conceivably involved in the latter. Indeed, the SV40 LTA_g, which shares structural (A-type purine nucleotide-binding motif and helicase domain) and functional (replicative and transcriptional activities) features with NS1 (2, 31), was reported to depend on ATP fixation for the formation of DNA-binding

hexamers but not for dimerization or tetramerization (38, 40). Furthermore, similar amino acid substitutions in Rep78 and Rep68 proteins, the equivalent of NS1 in the adeno-associated virus group of *Parvoviridae*, were reported to exert a dominant negative effect on wt Rep78 and Rep68 helicase and DNA replication activities (13, 34), arguing for the occurrence at least to some extent of oligomerization in the absence of ATP binding.

Mapping of an NS1 region necessary for self-association. NS1 proteins from MVMp deleted at either an internal (aa 95 to 254; NS1 *d1158*) or C-terminal (from aa 605; mutant C67) position were still able to interact with wt NS1 in the cotransport assay (47). This was confirmed in the present work by constructing the double mutant NS1 *d1158:C67* and showing its competence to associate with wt NS1 and to give a positive signal in the two-hybrid system (Table 1). Knowing that NS1 proteins are unlikely to bind to each other through their N termini (see above), this result suggests that the region from aa 255 to 605 of NS1 comprises an oligomerization domain(s).

This possibility was tested by introducing deletions scanning this whole region (Fig. 1A) and by measuring the residual abilities of corresponding GAL4AD-NS1 deletion fusions to interact with GAL4BD-wt NS1. As shown in Fig. 1, all deletions within the region from aa 225 to 504 strongly reduced the formation of oligomers in yeast, allowing the NS1 region necessary for self-association to be narrowed down to this internal amino acid sequence.

No further conclusions could be drawn from these data with regard to the position of the NS1-NS1 interaction motif(s). Indeed, NS1 mutant proteins scoring negative in the two-hybrid system may be altered in other regions besides the dimerization motif itself, e.g., at sites that affect the accessibility of this motif or the overall stability of the polypeptide. Therefore, an alternative peptide mapping method was used in an attempt at circumventing these intricacies and identifying the critical NS1 element(s) that is sufficient to bind wt NS1.

Peptide mapping of an NS1 motif sufficient for interaction with wt NS1. In order to refine the localization of the NS1 oligomerization motif(s), synthetic peptides scanning the region of interest (aa 221 to 529) were tested for the ability to trap NS1 proteins extracted from infected cells. A set of peptides was used to this end; each comprised 20 aa, with a 16-aa overlap between adjacent peptides (Fig. 2A). Bound NS1 was revealed by an ELISA with SP8 anti-NS1 antibodies (11) directed against the C terminus that is not involved in oligomerization (see above). Of 79 peptides, only one (peptide 11) was able to bind NS1 when it was incubated with MVMp-infected cell extracts (Fig. 2B). A similar result was obtained with purified, baculovirus-produced NS1 protein (data not shown), indicating that the interaction was direct rather than mediated by a cellular bridging protein. The sequence of NS1-binding peptide 11 is shown in Fig. 2A. The fact that the flanking peptides (peptides 10 and 12) failed to interact with NS1 argued for the requirement of amino acid residues both upstream and downstream from the peptide 10 and 12 overlapping sequence, i.e., outside the frame (Fig. 2A), for binding. It should be stated that a similar screening was done with 20-aa-long peptides (with 5-aa overlaps) covering the rest of the NS1 protein on either side of the region from aa 221 to 529. None of these peptides was able to capture NS1 (data not shown), in agreement with the aforementioned dispensability of NS1 N- and C-terminal portions for dimerization in the two-hybrid system.

With the object of identifying the residues of peptide 11 that are critical for interaction with NS1, each amino acid was replaced in turn by alanine (with the exception of A268, for

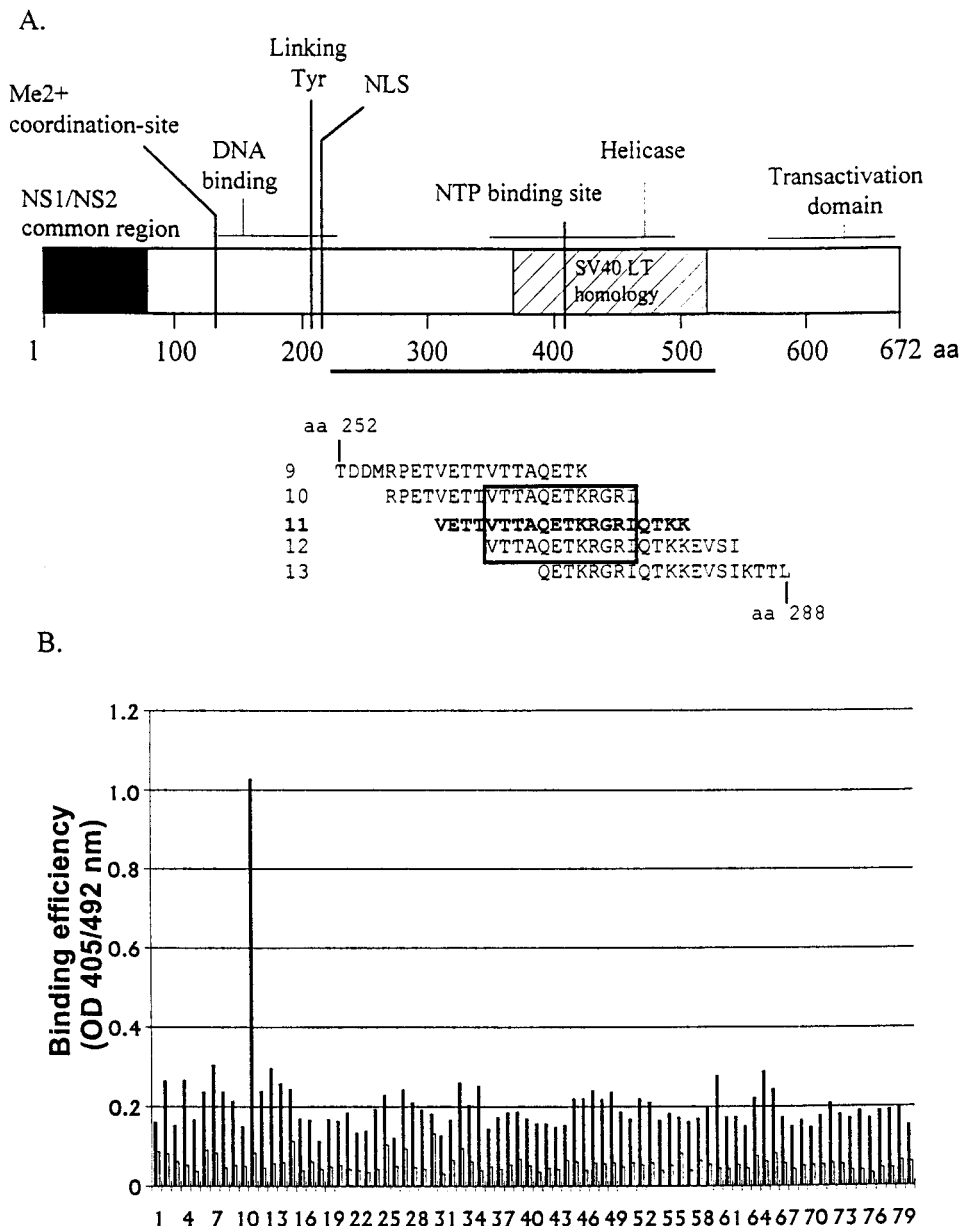


FIG. 2. Direct interaction of the full-length NS1 protein with NS1-derived peptides. (A) Schematic representation of the NS1 protein, showing the common NS1/NS2 N terminus (filled), the linking tyrosine for covalent DNA attachment, NLS, Me²⁺ coordination site, the homology region with SV40 LTA_g (LT) containing the NTP-binding site (hatched), and the domains involved in DNA binding, helicase function, and transactivation (36, 46, 65). Peptides (20-mers) derived from the MVMp NS1 sequence were synthesized to cover the region from aa 221 to 529 (solid bar) in an overlapping fashion (16-aa overlap) and were numbered from 1 to 79. The amino acid sequences of peptides 9 to 13 are given, with a frame showing the overlap among peptides 10, 11, and 12. (B) Plates coated with the indicated peptides were incubated with MVMp (filled) or mock-infected (open) A9 cell extracts. NS1 binding was revealed by ELISA with an NS1-specific antiserum (SP8) and was expressed as the OD₄₀₅ and OD₄₉₂.

which T was substituted). As illustrated in Fig. 3A, the NS1 binding profile of this set of substituted derivatives of peptide 11 showed two distinct regions in which amino acid changes caused strong reductions in the capacity for trapping NS1, compared with that of the original peptide. As indicated in the amino acid sequence (Fig. 3A), these results defined a bipartite motif (VETVTX₀IQT) that appeared to be sufficient for interaction with NS1. This structure accounts for the failure of both flanking peptides, peptides 10 and 12, to bind NS1, presumably due to the lack of one part of the motif. It is worth noting that the bipartite motif is strictly conserved within the parvovirus genus (Fig. 3B).

Inhibition of NS1 oligomerization by peptide 11. As mentioned above, oligomerization of NS1 from H1 virus with a C-terminally truncated version of the protein (*dIC69*) was readily detectable in the two-hybrid assay. A similar mutant form of NS1 from MVMp also scored positive for association with the wt protein in the cotransport assay (47) and retained a significant capacity for viral DNA amplification and cytotoxicity (37). With the aim of ascertaining whether the NS1-NS1 interaction from MVMp could be competed by peptide 11, we used a transcription-translation system (TNT; Promega) to coexpress ³⁵S-labeled wt NS1 and *dIC67* molecules from a mixture of vectors pX-NS1 and pX-*dIC67* (Fig. 4, lanes 11 to

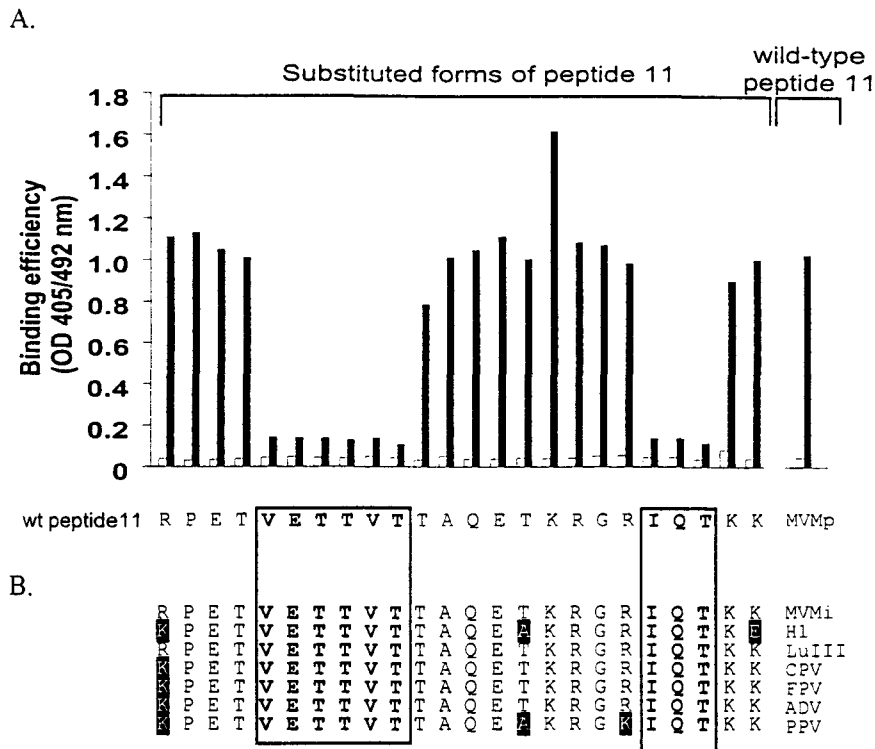


FIG. 3. Substitution analysis of peptide 11 residues required for NS1 binding. (A) Substituted derivatives of peptide 11 from MVMp NS1 were produced with each carrying an amino acid change at one position (A for all residues, except for A268, which was replaced by a T). Substituted derivatives and wt peptide 11 were compared for the ability to bind recombinant baculovirus-produced NS1 of MVMp (filled) or an equivalent preparation from wt baculovirus-infected cell extract (open) by ELISA as described in the legend to Fig. 2. Each pair of columns in the histogram corresponds to a substituted form of peptide 11 and is positioned along the wt sequence (x axis) according to the location of the amino acid change. Data obtained with wt peptide 11 are shown on the right for comparison. The amino acids whose replacement impaired NS1 binding are indicated in bold in the peptide 11 sequence. (B) Equivalent sequences from NS1 proteins of various autonomous parvoviruses are aligned. Amino acid differences with respect to the MVMp sequence are shown by black boxes and do not concern the framed bipartite binding motif. CPV, canine parvovirus; FPV, feline parvovirus; PPV, porcine parvovirus; ADV, Aleutian disease virus.

13). The reaction products were subjected to immunoprecipitation in the presence of different synthetic NS1 peptides with the SP8 antiserum directed against the C terminus of NS1, and immunocomplexes were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 4, lanes 1 to 10). When mutant and wt forms of NS1 were produced separately, wt NS1 (Fig. 4, lane 10) but not *d1C67* (lane 9) was immunoprecipitated with SP8 antibodies. This is in keeping with the fact that the SP8 antiserum is directed against an NS1 portion which is absent from *d1C67*. In addition, the SP8 antiserum recognized a species slightly smaller than the *d1C67* polypeptide that was presumably produced from an internal start site in the NS1 transcript. In contrast, a small but significant amount of NS1 *d1C67* was present in the immunoprecipitate when the mutant form was coexpressed with the wt protein (Fig. 4, lane 1), arguing for the interaction of both polypeptides (wt NS1 and *d1C67*) under the conditions tested. The small amount of NS1 *d1C67* coimmunoprecipitated with wt NS1 may indicate that the *d1C67* product could not effectively compete with wt NS1 in oligomer formation. In addition, the SP8 antiserum may precipitate wt homo-oligomers preferentially, since multiple copies of the carboxy terminus are available. As illustrated in Fig. 4, lanes 2 to 4, peptide 11 abolished the coimmunoprecipitation of *d1C67* with wt NS1 in a dose-dependent manner. This effect was specific since peptides 2, 10, and 12 failed to suppress the association of both NS1 polypeptides (Fig. 4, lanes 5 to 8).

Inhibition of NS1 helicase activity by peptide 11. By analogy with other helicases (64), particularly SV40 LTA_g, which is

structurally related to NS1 in the helicase domain (2), the oligomerization of NS1 can be expected to be required for helicase activity. In order to investigate this possibility, we determined whether blocking of the NS1-NS1 interaction by peptide 11 prevented NS1 from exerting its helicase function. To this end, NS1 was incubated in the presence of various amounts of synthetic NS1 peptide 11 (specific for the oligomerization domain) or peptide 2 (unrelated before the M13-VAR substrate was added). The helicase reaction was allowed to take place for 30 min, and the products were analyzed by non-denaturing PAGE. The helicase-deficient K405R mutant of NS1 (45) served as a negative control. As shown in Fig. 5, lanes 1 to 8, peptide 11 led to suppression of the NS1 helicase activity, ranging from a significant reduction to a complete inhibition at the lowest (2.75 ng/ μ l) and highest (65 ng/ μ l) peptide concentrations tested, respectively. This suppression was specific for the interacting peptide, since no inhibition was observed when unrelated peptides were used up to a concentration of 65 μ g/ μ l, as shown for peptide 2 (GGYFLSSDSGWKTN FLKEGE) (Fig. 5, lanes 9 to 12). In addition, no inhibition occurred when peptide 11 was added after the onset of the reaction (data not shown). This observation, together with the fact that peptide 11 is located outside of the helicase domain of NS1 (aa 398 to 470 [31]), also makes it unlikely that inhibition of the unwinding reaction results from a direct block of the helicase at its active center. Therefore, our results suggest that the motif from aa 261 to 280 is essential for the NS1 helicase activity in an indirect way, most likely by mediating the forma-

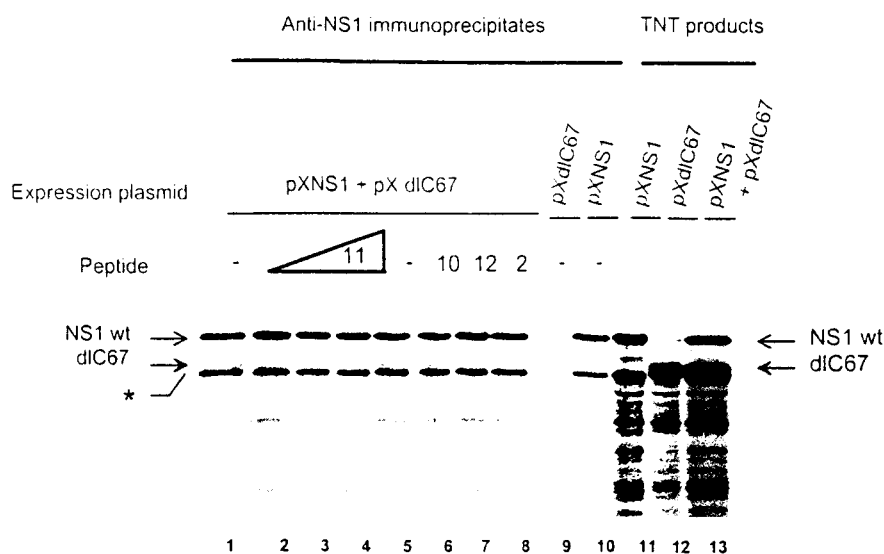


FIG. 4. Interference of NS1 peptides with coimmunoprecipitation of wt NS1 and *dIC67* proteins. ^{35}S -labeled wt NS1 and *dIC67* proteins were produced with an *in vitro* transcription-translation system (TNT; lanes 11 to 13). wt NS1 (lane 10) and *dIC67* (lane 9) preparations or mixtures (lanes 1 to 8) were incubated with antiserum SP8, which is directed against the C terminus of NS1 and fails to recognize the *dIC67*-terminally deleted protein. Immunoprecipitation was carried out in the absence (-; lanes 1, 5, 9, and 10) or presence of 2.6 (lane 2), 12 (lane 3), or 26 (lanes 4 and 6 to 8) ng/ μl of the indicated peptide. Immunoprecipitates were recovered and analyzed by SDS-PAGE. *, truncated NS1 translation product.

tion of NS1 oligomers that are the actual effectors of the helicase function.

Inhibition of viral DNA replication *in vivo* by peptide 11. The multifunctional NS1 protein is essential for parvovirus DNA replication (7) and may associate with the 3' viral DNA replication origin in the form of an oligomer, as recently hypothesized from footprinting data (15). This led us to further investigate whether *in vitro*-identified peptide 11 was able to interact with NS1 and suppress parvovirus DNA replication in target cells, presumably as a result of competition for NS1 oligomerization. To this end, an infectious MVMP DNA clone was microinjected with or without increasing amounts of peptide 11 into A9 cell nuclei. Parallel cultures were treated in a similar way with overlapping peptides 10 and 12 or unrelated peptide 2 (all were unable to bind NS1 in an ELISA [Fig. 2]) and served as negative controls for nonspecific effects of injected synthetic peptides. An automated device that allowed the routine microinjection of around 500 nuclei in a confined area in the center of a coverslip for each dose of peptide was used. Two days after injection, total DNA was denatured *in situ* and transferred to a nitrocellulose membrane that was hybridized with a ^{32}P -labeled MVMP DNA probe. In the absence of any peptide, a strong hybridization signal was detected (Fig. 6A). Since DNA was extracted at 48 h after microinjection, it cannot be ruled out that some progeny virus spread occurred and contributed to enlargement of the corresponding autoradiographic spot. In the presence of peptide 11, only a residual signal was visible; this represented input viral DNA since it was equivalent to the signal produced when the replication-defective MVM ΔNS molecular clone was microinjected (Fig. 6B). This led us to conclude that peptide 11 is indeed capable of inhibiting intracellular MVMP DNA replication. This effect was dependent on the peptide concentration (Fig. 6A) and was specific, since no reduction of the hybridization signal was observed in cells treated with peptide 2, 10, or 12 at the concentration (70.9 μM) at which peptide 11 abolished MVM DNA replication (Fig. 6B). Therefore, these data argued for both the accessibility and functional impor-

tance of this domain in allowing NS1 to interact with constituent peptide 11 under physiological conditions.

DISCUSSION

NS1 homo-oligomerization. Nuclear cotransport studies provided indirect evidence of NS1 homo-oligomerization (47). The present study substantiates this conclusion in a direct way by showing that NS1-NS1 interaction takes place both in yeast (two-hybrid system) and in mammalian cell extracts (coimmunoprecipitation). This property is in line with the known roles played by the multifunctional NS1 protein in the control of DNA replication and transcription (7, 18). Indeed, a number of proteins involved in DNA metabolism have been found to act as homo-oligomers; these include transcription factors (5, 35, 39, 58, 62), replication factors (28), and multifunctional polypeptides, such as SV40 LTag (40). The interactions of some of these factors with DNA appear to be site specific. Similarly, NS1 was recently reported to bind to DNA sequences containing the motif (ACCA) $_{2-3}$ (15). This NS1 responsive element is present in particular in the viral 3' replication origin, where its interaction with NS1 generates a large footprint that is suggestive of higher-order oligomer formation (15). The degree of homo-oligomerization achieved by NS1 could not be estimated in the present study since the formation of homodimers would be sufficient to give rise to positive signals in the assays used. ATP binding was found to be dispensable for SV40 LTag antigen dimerization and tetramerization but necessary for the formation of functional DNA-binding double hexamers (40). This may account for our finding that an amino acid substitution in the NTP-binding site of NS1 (Met-405) did not impede NS1-NS1 interaction in the two-hybrid system, whereas it abolished NS1 cotransport (47), which may require conformational changes that involve ATP binding and multimerization. Another hint at the capacities of parvoviral nonstructural proteins for self-association to some extent in the absence of ATP is given by the dominant negative effects of NTP-binding site mutant forms of adeno-associated

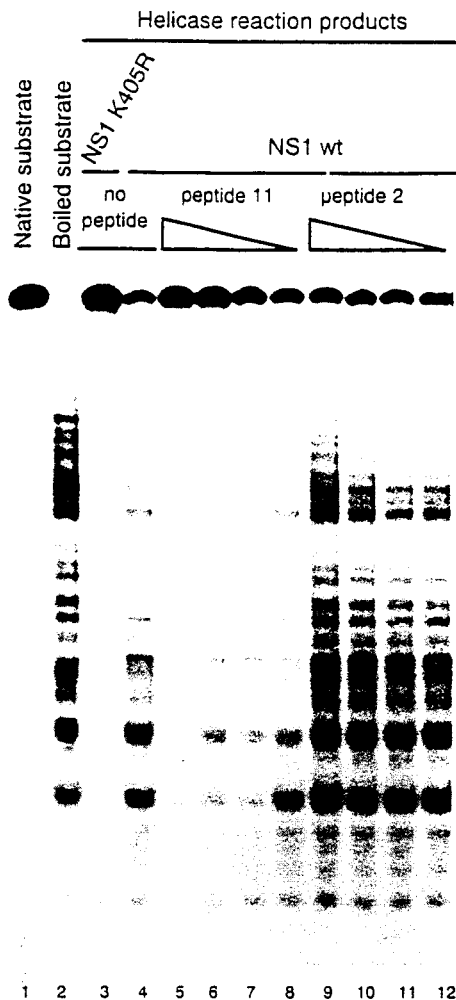
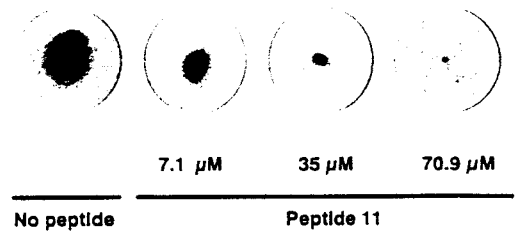


FIG. 5. Interference of NS1 peptides with the in vitro helicase activity of full-length NS1. Recombinant vaccinia virus-produced NS1 of MVMp was tested for its ability to displace ^{32}P -labeled oligonucleotides annealed to circular M13 single-stranded DNA. Reaction products were fractionated by PAGE and visualized by autoradiography. The profile of the heat-denatured DNA substrate (Boiled substrate) is shown in lane 2 for comparison. All other reactions were carried out with native substrate in the absence of NS1 (lane 1) or in the presence of either the replication-deficient mutant protein NS1 K405R (lane 3) or wt NS1 (lanes 4 to 12). The helicase activity of wt NS1 was tested in the absence of synthetic peptide (lanes 3 and 4) or in the presence of 1.3 (lanes 5 and 9), 0.4 (lanes 6 and 10), 0.165 (lanes 7 and 11), or 0.055 (lanes 8 and 12) μg of peptide 11 (lanes 5 to 8) or peptide 2 (lanes 9 to 12).

virus Rep78 and Rep68 proteins on the helicase and viral DNA replication functions of the wt polypeptide (13, 34). Alternatively, the GAL4 AD fusion may lead NS1 to undergo a conformational change that compensates for the Met405 substitution with regard to NS1-NS1 interaction.

NS1 interaction motif. By using synthetic NS1 peptides in an ELISA-type protein-binding assay (30, 63), we identified a discrete NS1 element, VETT₂₆₁VTTA₂₇₀QETK₂₇₅R₂₈₀GRI₂₈₅Q₂₉₀T₂₉₅KK₃₀₀ (aa 261 to 280), which is sufficient for interaction with full-length NS1 under in vitro conditions. Critical residues in this element define a putative bipartite interaction motif within the sequence VETT₂₆₁VTX₂₇₀,IQT. This motif is located in a region that is essential for NS1 oligomerization in yeast. Furthermore, a peptide encompassing the interaction motif was found to act as a specific competitor and to inhibit NS1-NS1 association in coimmunoprecipitation experiments with reticulocyte extracts.

A.



B.

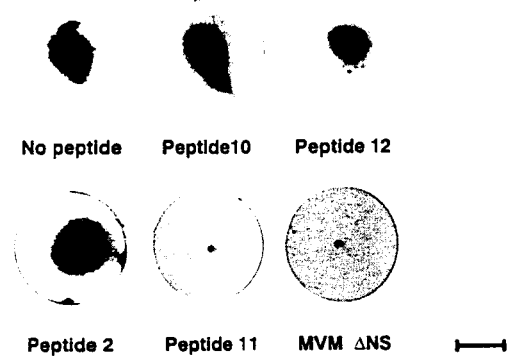


FIG. 6. Interference of specific NS1 peptides with MVMp DNA replication in permissive cells. A9 cells were microinjected intranuclearly with an infectious MVMp DNA clone in the presence or absence (No peptide) of the indicated amounts of NS1 peptides. At 48 h postinjection, cells were transferred under denaturing conditions to the center of each circular nitrocellulose membrane. Viral DNA amplification was measured by hybridization with a ^{32}P -labeled MVMp DNA probe. As a control in panel B, a replication-defective MVMp molecular clone (MVM ΔNS), instead of infectious MVMp DNA, was microinjected in the absence of any peptide. Bar, 10 mm.

Altogether, these data argue for the involvement of this motif in NS1 dimerization.

This conclusion was substantiated by functional assays. Since most helicases are known to work as oligomers, the intrinsic helicase activity of NS1 (65) was tested for its sensitivity to competitive inhibition by free NS1 peptides comprising (or not) the interaction motif. A dose-dependent reduction in NS1 helicase activity was indeed observed in the presence of the interaction peptide but not other NS1 peptides, suggesting that homo-oligomerization through the interaction motif plays a role in at least some NS1 functions. This possibility was further supported by showing that the interaction peptide was able to abolish in a specific way MVMp DNA replication after microinjection into permissive cells, whereas other NS1-derived peptides were inactive in this respect. It is worth noting that the amino acid sequence of the NS1 interaction motif is fully conserved among a number of autonomous parvoviruses, in keeping with its importance for virus replication. Altogether, these data indicate that a potent suppression of virus replication can be achieved by blocking a domain required for the oligomerization of an essential viral nonstructural protein. Our results point to oligomerization motifs of viral regulatory proteins as targets for the design of new peptide-mimetic antiviral agents.

It should also be stated that although a single NS1 peptide was able to trap the wt NS1 protein in the in vitro binding assay, NS1 oligomerization in the two-hybrid system was impaired by deletions not only in this element but also in neigh-

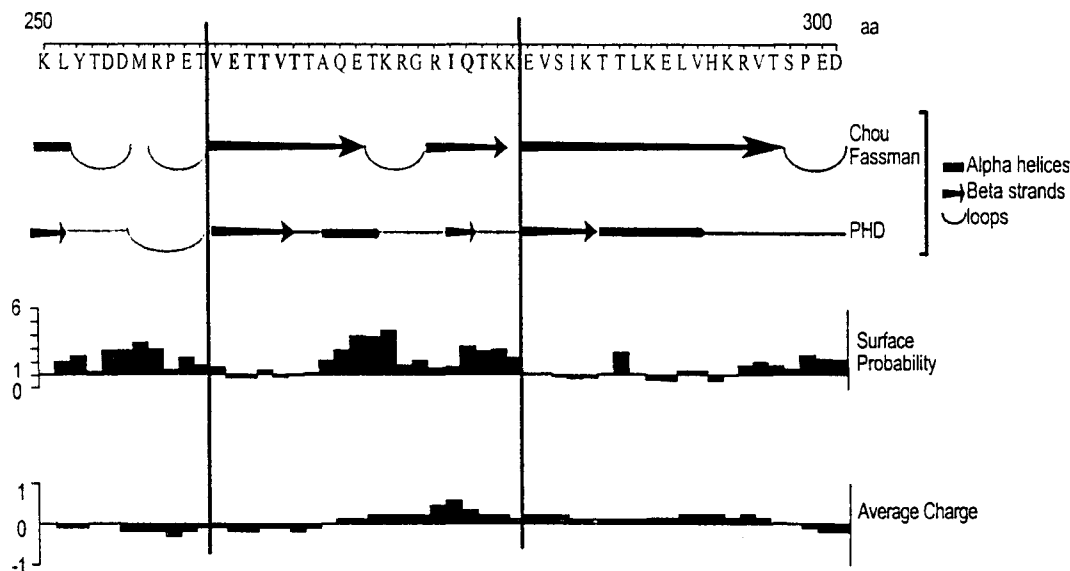


FIG. 7. Structural features of the NS1-NS1 interaction region. The sequence of the NS1 region from aa 250 to 300 is shown, with the interaction peptide delimited by vertical lines and the residues essential for interaction in bold. Linear plots of computer-predicted secondary structure (Chou-Fassman and PHD algorithms), surface probability, and charge distribution (Emini algorithm) in this region were determined by using DNASTar and PHD (EMBL) softwares.

boring regions on either side of the interaction motif. These results suggest that the identified motif lies in a conformational domain which has to be preserved for proper interactions between full-length NS1 molecules. Moreover, there may be additional domains that are involved in NS1 self-association but fail to be revealed by the peptide ELISA method, e.g., due to their lack of confinement to the peptides used as baits or posttranslational modification constraints. Thus, the ability of the interaction peptide on its own to trap NS1 *in vitro* does not rule out the possibility that in the context of the whole protein, this motif takes part in intramolecular interactions that make NS1 competent for homo-oligomerization through other domains. Finally, there is a possibility that NS1 dimerization leads to structural modifications which uncover additional interaction motifs, allowing the formation of higher-order multimers.

NS1 structure in the region of the interaction motif. In the absence of available X-ray crystallographic or nuclear magnetic resonance data and given our failure to identify potential folding patterns in NS1 by comparison with reference polypeptides from data banks, the DNASTar and PHD (European Molecular Biology Laboratory [EMBL], Heidelberg, Germany) softwares were used to predict the secondary structure of the NS1-NS1 interaction region. As illustrated in Fig. 7, both elements of the bipartite interaction motif are assigned to β -strands that can be distinguished by the degree of hydrophobicity and overall charge. The contribution of β -sheets to the formation of protein dimer interfaces is well documented (9, 52). Therefore, it can be speculated that the NS1 region containing the bipartite motif interacts with itself in homo-oligomerization. A similar type of association has previously been reported for a number of homo-oligomeric proteins (51, 56, 59). Additional experiments particularly with NS1 clones modified by site-directed mutagenesis are needed to assess the role of this putative β -strand structure in NS1-NS1 interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Gerrit Vriend and Luis Serrano (EMBL) for advice about protein structure predictions, Michael Trendelenburg

and Roger Fisher (DKFZ, Heidelberg, Germany) for help with the microinjection procedure, Peter Tattersall (Yale University, New Haven, Conn.) and Elisabeth Kordes and Ursula Bodendorf (DKFZ) for gifts of plasmids, and Nathalie Salomé for fruitful discussions.

This work was supported by the Commission of the European Communities, the Deutsche Krebshilfe-Dr. Mildred Scheel Stiftung für Krebsforschung, and the German-Israeli Foundation for Scientific Research and Development. A.P. and L.D. are fellows of the Commission of the European Communities.

REFERENCES

- Allen, J. B., M. W. Walberg, M. C. Edwards, and S. J. Elledge. 1995. Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. *Trends Biochem. Sci.* 20:511-516.
- Astell, C. R., C. D. Mol, and W. F. Anderson. 1987. Structural and functional homology of parvovirus and papovavirus polypeptides. *J. Gen. Virol.* 68:885-893.
- Athanasiadis, A., M. Vlasi, D. Kotsifaki, P. A. Tucker, K. S. Wilson, and M. Kokkinidis. 1994. Crystal structure of PvuII endonuclease reveals extensive structural homologies to EcoRV. *Nat. Struct. Biol.* 1:469-475.
- Baldauf, A. Q., K. Willwand, E. Mumsidu, J. P. F. Nuesch, and J. Rommelaere. 1997. Specific initiation of replication at the right-end telomere of the closed species of minute virus of mice replicative-form DNA. *J. Virol.* 71:971-980.
- Baler, R., G. Dahl, and R. Voellmy. 1993. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol. Cell. Biol.* 13:2486-2496.
- Bartel, P. L., C.-T. Chien, R. Sternglanz, and S. Fields. 1993. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions, p. 153-179. *In* D. A. Hartley (ed.), *Cellular interactions in development: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Berns, K. I. 1990. Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* 54:316-329.
- Bodendorf, U. Unpublished results.
- Bourne, Y., A. S. Arvai, S. L. Bernstein, M. H. Watson, S. I. Reed, J. E. Endicott, M. E. Noble, L. N. Johnson, and J. A. Tainer. 1995. Crystal structure of the cell cycle-regulatory protein *sucl* reveals a beta-hinge conformational switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:10232-10236.
- Breedon, L., and K. Nasmyth. 1985. Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:643-650.
- Brockhaus, K., S. Plaza, D. J. Pintel, J. Rommelaere, and N. Salome. 1996. Nonstructural protein NS2 of minute virus of mice associates *in vivo* with 14-3-3 protein family members. *J. Virol.* 70:7527-7534.
- Caillet Fauquet, P., M. Perros, A. Brandenburger, P. Spiegelaere, and J. Rommelaere. 1990. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J.* 9:2989-2995.
- Chejanovsky, N., and B. J. Carter. 1990. Mutation of a consensus purine nucleotide binding site in the adeno-associated virus rep gene generates

- a dominant negative phenotype for DNA replication. *J. Virol.* **64**:1764-1770.
14. Christensen, J., S. F. Cotmore, and P. Tattersall. 1995. Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J. Virol.* **69**:5422-5430.
 15. Cotmore, S. F., J. Christensen, J. P. Nuesch, and P. Tattersall. 1995. The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]₂₋₃. *J. Virol.* **69**:1652-1660.
 16. Cotmore, S. F., L. J. Sturzenbecker, and P. Tattersall. 1983. The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides. *Virology* **129**:333-343.
 17. Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1990. Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* **177**:477-487.
 18. Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**:91-174.
 19. Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1995. DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Semin. Virol.* **6**:271-281.
 20. Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1986. The NS1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Res.* **4**:243-250.
 21. Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1988. The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands. *J. Virol.* **62**:851-860.
 22. Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1986. Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **58**:724-732.
 23. Cziepluch, C. Unpublished results.
 24. Deleu, L. Unpublished results.
 25. Doerig, C., B. Hirt, J. P. Antonietti, and P. Beard. 1990. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J. Virol.* **64**:387-396.
 26. Dohmen, R. J., A. W. Strasser, C. B. Honer, and C. P. Hollenberg. 1991. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**:691-692.
 27. Faisst, S., S. R. Faisst, T. Dupressoir, S. Plaza, A. Pujol, J. C. Jauniaux, S. L. Rhode, and J. Rommelaere. 1995. Isolation of a fully infectious variant of parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells. *J. Virol.* **69**:4538-4543.
 28. Gounari, F., R. De-Francesco, J. Schmitt, P. van-der-Vliet, R. Cortese, and H. S. O. Stunnenberg. 1990. Amino-terminal domain of NF1 binds to DNA as a dimer and activates adenovirus DNA replication. *EMBO J.* **9**:559-566.
 29. Gu, M. L., F. X. Chen, and S. L. Rhode. 1992. Parvovirus H-1 P38 promoter requires the trans-activation region (tar), an SP1 site, and a TATA box for full activity. *Virology* **187**:10-17.
 30. Hall, P. A., J. M. Kearsey, P. J. Coates, D. G. Norman, E. Warbrick, and L. S. Cox. 1995. Characterisation of the interaction between PCNA and Gadd45. *Oncogene* **10**:2427-2433.
 31. Jindal, H. K., C. B. Yong, G. M. Wilson, P. Tam, and C. R. Astell. 1994. Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA helicase functions. *J. Biol. Chem.* **269**:3283-3289.
 32. Jongeneel, C. V., R. Sahli, G. K. McMaster, and B. Hirt. 1986. A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J. Virol.* **59**:564-573.
 33. Keegan, L., G. Gill, and M. Ptashne. 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**:699-704.
 34. Kyostio, S. R., and R. A. Owens. 1996. Identification of mutant adeno-associated virus Rep proteins which are dominant-negative for DNA helicase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**:294-299.
 35. Lazazzera, B. A., D. M. Bates, and P. J. Kiley. 1993. The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. *Genes Dev.* **7**:1993-2005.
 36. Legendre, D., and J. Rommelaere. 1994. Targeting of promoters for *trans* activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **68**:7974-7985.
 37. Legendre, D., and J. Rommelaere. 1992. Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter *trans* inhibition. *J. Virol.* **66**:5705-5713.
 38. Mastrangelo, I. A., M. Bezanilla, P. K. Hansma, P. V. Hough, and H. G. Hansma. 1994. Structures of large T antigen at the origin of SV40 DNA replication by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **66**:293-298.
 39. Mastrangelo, I. A., A. J. Courey, J. S. Wall, S. P. Jackson, and P. V. Hough. 1991. DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5670-5674.
 40. Mastrangelo, I. A., P. V. Hough, J. S. Wall, M. Dodson, F. B. Dean, and J. Hurwitz. 1989. ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature* **338**:658-662.
 41. Miller, J. H. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
 42. Mousset, S., Y. Ouadrhiri, P. Caillet Fauquet, and J. Rommelaere. 1994. The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J. Virol.* **68**:6446-6453.
 43. Naeger, L. K., J. Cater, and D. J. Pintel. 1990. The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *J. Virol.* **64**:6166-6175.
 44. Naeger, L. K., N. Salome, and D. J. Pintel. 1993. NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J. Virol.* **67**:1034-1043.
 45. Nuesch, J. P., S. F. Cotmore, and P. Tattersall. 1992. Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif. *Virology* **191**:406-416.
 46. Nuesch, J. P., S. F. Cotmore, and P. Tattersall. 1995. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* **209**:122-135.
 47. Nuesch, J. P., and P. Tattersall. 1993. Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport. *Virology* **196**:637-651.
 48. Nuesch, J. P. F. Unpublished results.
 49. Oh, E. Y., L. Claassen, S. Thiagalingam, S. Mazur, and L. Grossman. 1989. ATPase activity of the UvrA and UvrAB protein complexes of the *Escherichia coli* UvrABC endonuclease. *Nucleic Acids Res.* **17**:4145-4159.
 50. Pagano, M., R. Pepperkok, F. Verde, W. Ansorge, and G. Draetta. 1992. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J.* **11**:961-971.
 51. Pal, G., L. Szilagy, and L. Graf. 1996. Stable monomeric form of an originally dimeric serine proteinase inhibitor, ecotin, was constructed via site directed mutagenesis. *FEBS Lett.* **385**:165-170.
 52. Parge, H. E., A. S. Arvai, D. J. Murtari, S. I. Reed, and J. A. Tainer. 1993. Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control. *Science* **262**:387-395.
 53. Pintel, D., D. Dadachanji, C. R. Astell, and D. C. Ward. 1983. The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acids Res.* **11**:1019-1038.
 54. Rhode, S. L. D. 1985. *trans*-activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J. Virol.* **55**:886-889.
 55. Rhode, S. L. D., and S. M. Richard. 1987. Characterization of the *trans*-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* **61**:2807-2815.
 56. Riede, I., H. Schwarz, and F. Jahng. 1987. Predicted structure of tail-fiber proteins of T-even type phages. *FEBS Lett.* **215**:145-150.
 57. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
 58. Serizawa, H., J. W. Conaway, and R. C. Conaway. 1994. An oligomeric form of the large subunit of transcription factor (TF) IIE activates phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by TFIIF. *J. Biol. Chem.* **269**:20750-20756.
 59. Skelton, N. J., F. Aspiras, J. Ogez, and T. J. Schall. 1995. Proton NMR assignments and solution conformation of RANTES, a chemokine of the C-C type. *Biochemistry* **34**:5329-5342.
 60. Spegelaere, P., J. J. Cornelis, M. Tuynder, and J. Rommelaere. 1994. Lack of a detectable effect of capsid proteins on the cell-dependent activity of parvovirus MVMp promoters. *Res. Virol.* **145**:5-12.
 61. Tenenbaum, L., F. Dupont, P. Spegelaere, L. Zentilin, P. Norio, M. Giacca, S. Riva, A. Falaschi, and J. Rommelaere. 1993. Inhibition of heterologous DNA replication by the MVMp nonstructural NS-1 protein: identification of a target sequence. *Virology* **197**:630-641.
 62. Wang, P., M. Reed, Y. Wang, G. Mayr, J. E. Stenger, M. E. Anderson, J. F. Schwedes, and P. Tegtmeyer. 1994. p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol. Cell. Biol.* **14**:5182-5191.
 63. Warbrick, E., D. P. Lane, D. M. Glover, and L. S. Cox. 1995. A small peptide inhibitor of DNA replication defines the site of interaction between the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1 and proliferating cell nuclear antigen. *Curr. Biol.* **5**:275-282.
 64. West, S. C. 1996. DNA helicases: new breeds of translocating motors and molecular pumps. *Cell* **86**:177-180.
 65. Wilson, G. M., H. K. Jindal, D. E. Yeung, W. Chen, and C. R. Astell. 1991. Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* **185**:90-98.

The minute virus of mice (MVM) nonstructural protein NS1 induces nicking of MVM DNA at a unique site of the right-end telomere in both hairpin and duplex conformations *in vitro*

Kurt Willwand,¹ Andreas Q. Baldauf,¹ Laurent Deleu,¹ Eleni Mumtsidu,¹ Eithne Costello,² Peter Beard² and Jean Rommelaere¹

¹Deutsches Krebsforschungszentrum, Department of Applied Tumor Virology, Abt. 0610 and Formation INSERM U375, Postfach 101949, D-69009 Heidelberg, Germany

²Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Epalinges, Switzerland

The right-end telomere of replicative form (RF) DNA of the autonomous parvovirus minute virus of mice (MVM) consists of a sequence that is self-complementary except for a three nucleotide loop around the axis of symmetry and an interior bulge of three unpaired nucleotides on one strand (designated the right-end 'bubble'). This right-end inverted repeat can exist in the form of a folded-back strand (hairpin conformation) or in an extended form, base-paired to a copy strand (duplex conformation). We recently reported that the right-end telomere is processed in an A9 cell extract supplemented with the MVM nonstructural protein NS1. This processing is shown here to result from the NS1-dependent nicking of the complementary strand at a unique position 21 nt inboard of the folded-back genomic 5' end. DNA species terminating in duplex or hairpin con-

figurations, or in a mutated structure that has lost the right-end bulge, are all cleaved in the presence of NS1, indicating that features distinguishing these structures are not prerequisites for nicking under the *in vitro* conditions tested. Cleavage of the hairpin structure is followed by strand-displacement synthesis, generating the right-end duplex conformation, while processing of the duplex structure leads to the release of free right-end telomeres. In the majority of molecules, displacement synthesis at the right terminus stops a few nucleotides before reaching the end of the template strand, possibly due to NS1 which is covalently bound to this end. A fraction of the right-end duplex product undergoes melting and re-folding into hairpin structures (formation of a 'rabbit-ear' structure).

Introduction

Minute virus of mice (MVM) is a member of the genus *Parvovirus* of the family *Parvoviridae* (Siegl *et al.*, 1985). The MVM genome contained in purified virions (Cotmore & Tattersall, 1989) is linear single-stranded DNA, 5149 nt in length (Astell *et al.*, 1986), terminating in short self-complementary sequences that fold into stable hairpin structures (Bourguignon *et al.*, 1976). Early in infection, the incoming genome is converted into a double-stranded replicative form (RF) by extension of the 3' (left-end) hairpin until the growing strand reaches the folded-back 5' terminus at the genomic right end (Tattersall *et al.*, 1973). A subsequent ligation step was proposed resulting in a covalently closed DNA (cRF) (Cotmore & Tattersall, 1987), a form which has been detected in

parvovirus-infected cells (Cotmore *et al.*, 1989; Löchelt *et al.*, 1989) and which was recently generated *in vitro* (Baldauf *et al.*, 1997). RF amplification is assumed to involve opening of cRF at its right end by the major MVM nonstructural protein, NS1, followed by displacement and copying of the right-end telomere (Astell *et al.*, 1985). Melting of the extended duplex terminus thus created and re-formation of hairpin structures are thought to provide a primer for strand-displacement synthesis leading to the formation of dimer RF DNA (Cotmore & Tattersall, 1987; Baldauf *et al.*, 1997; Cossons *et al.*, 1996). In agreement with this model, dimer-length as well as higher order concatemeric molecules have been isolated from parvovirus-infected cells (Ward & Dadachanji, 1978).

We have recently developed an *in vitro* DNA replication system that is based on mouse A9 cell extract and supports nicking of the right-end hairpin of MVM cRF DNA when supplemented with recombinant baculovirus-produced MVM NS1. Nicking is followed by the generation of a molecule

Author for correspondence: Kurt Willwand.

Fax +49 6221 424962. e-mail k.willwand@dkfz-heidelberg.de

extended at its right end and designated 5'eRF, given that the RF right end corresponds to the genomic 5' terminus. We noted that the 5'eRF species is a target for further NSI-induced nicking at the right-end inverted repeat, indicating that this reaction does not require the substrate to have a covalently closed hairpin structure. However, the efficiency of NSI-mediated nicking of the MVM right end may still depend on its secondary structure. This possibility is raised by recent *in vivo* data obtained with a mutant MVM virus, designated MVMx, in which the three nucleotides normally unpaired within the right-end hairpin are fully base-paired, eliminating the bulge from this position (Costello *et al.*, 1995). During infection of A9 cells, the ratio of duplex to hairpin RF right ends was found to be significantly lower for the MVMx virus as compared to MVMwt. This may indicate that the NSI-mediated processing of the right-end hairpin into the duplex form is somewhat impaired in the absence of the bulge, implying that a hairpin, complete with bulge, is a more favourable substrate for NSI than the extended duplex structure, since the latter contains no bulge. A preference for the hairpin structure may minimize the reported nicking of the extended right end of 5'eRF molecules (Baldauf *et al.*, 1997), a process whose usefulness is not evident and which leads to the release of free right-end telomeres.

In the present study, we tested the influence of the bulge on NSI-induced *in vitro* processing of the right-end telomere of MVM RF DNA. Nicking and extension of this telomere were found to occur with a similar efficiency, irrespective of the presence of the bulge. This result and our previous analysis of *in vitro* replication of cRF and 5'eRF molecules (Baldauf *et al.*, 1997) indicate that neither the covalently closed structure nor the bulge are prerequisites for the NSI-mediated resolution of the right end of replicative forms.

Methods

■ **Cultivation of cells, preparation of extracts and production of recombinant NSI.** Mouse A9 cells were grown in suspension and processed for the preparation of cytosolic extracts as previously described (Baldauf *et al.*, 1997). Nuclear extracts were prepared according to Dignam *et al.* (1983). NSI was produced in Sf9 insect cells infected with recombinant baculovirus (kindly provided by D. Pintel) and purified by affinity chromatography as previously reported (Baldauf *et al.*, 1997).

■ **DNA templates.** A9 cells were infected with the prototype strain of minute virus of mice (MVMp) or the mutant form, MVMx, and RF DNA was extracted according to the Hirt method (Hirt, 1967) modified as previously described (Baldauf *et al.*, 1997). RF DNA templates were purified on neutral and alkaline sucrose gradients (Straus *et al.*, 1976).

■ ***In vitro* replication and analysis of product DNA.** *In vitro* replication was carried out as reported (Baldauf *et al.*, 1997) except for the use of a mixture of cytosolic and nuclear extract (60 µg and 30 µg respectively of total protein per reaction) instead of pure cytosolic extract. Purified baculovirus-expressed NSI was added where indicated. Replication products were analysed either directly, or after restriction digestion, on 5% polyacrylamide gels. Analysis under denaturing conditions was performed in 6% polyacrylamide-7 M urea gels which

were run at 72 °C to ensure complete denaturation of hairpin segments. Size markers consisted of a yeast DNA ladder obtained according to the method of Sanger *et al.* (1977) or Maxam-Gilbert sequencing products (Maxam & Gilbert, 1980) of a right-end MVM DNA fragment (nt 4916-5068).

Results

Copying and segregation of the MVM right-end hairpin

We recently presented an *in vitro* replication assay that measures specific nicking of the right-end hairpin of MVM cRF DNA by recombinant NSI followed by DNA extension at the nick site (Baldauf *et al.*, 1997). These events, which are schematically depicted in Fig. 1 (centre portion), were demonstrated by cleavage of the *in vitro*-labelled replication product with *Psh*AI at nt 4916 followed by fractionation of the DNA fragments on a polyacrylamide gel (Baldauf *et al.*, 1997). A representative experiment of this type is illustrated in Fig. 2(A), lanes 1 and 2. MVM cRF DNA used as a template gave rise to a major labelled DNA species, designated E, and two minor species, designated (T+H)1 and (T+H)2.

(i) Species E migrated at the position expected for the right-end *Psh*AI fragment of extended duplex RF DNA. This was confirmed by further digestion of gel-purified band E with the restriction enzyme *Afl*III (Fig. 2B, lanes 1 and 2). *Afl*III cuts MVM DNA at nt 4984 and 5104, generating three segments from the right-end extended *Psh*AI fragment (marked a, b and c in Fig. 1, centre portion). *Afl*III subfragments were found at the anticipated positions of left-hand (70 bp) and internal (120 bp) segments b and a, respectively, while the third subfragment migrated around the 68 bp position and thus was slightly retarded in comparison with the 61/64 bp long right-end segment c expected from the reported size of *in vivo*-synthesized extended RF DNA (Astell *et al.*, 1985; Cotmore & Tattersall, 1989). This retardation may be due to proteinase K-resistant residues of the NSI protein which is known to become covalently attached to the 5' ends of *in vivo* (Cotmore & Tattersall, 1988) and *in vitro* (Baldauf *et al.*, 1997) processed RF molecules.

(ii) The identity of the faster migrating species (T+H)1 (Fig. 2A, lane 2) was also investigated by gel purification and digestion with *Afl*III. For reasons to be explained below, this DNA species is actually made up of two components that could not be resolved in the gel shown in Fig. 2(A), hence the designation (T+H). As illustrated in Fig. 2(B), lanes 3 and 4, *Afl*III cleaved (T+H)1 DNA into two major fragments, one of which comigrated with the E segment b (70 bp) while the other one ran ahead of it. This is in line with the assumption that the main component of species (T+H)1 consists of the right-end *Psh*AI fragment in the turn-around configuration, since *Afl*III digestion of this fragment should generate segment b and a smaller turn-around segment, marked a' in Fig. 1, right-hand part. The identification of species T1 with a turn-around right-end *Psh*AI fragment was confirmed by the denaturing gel

NS1-induced processing of the MVM right-end telomere

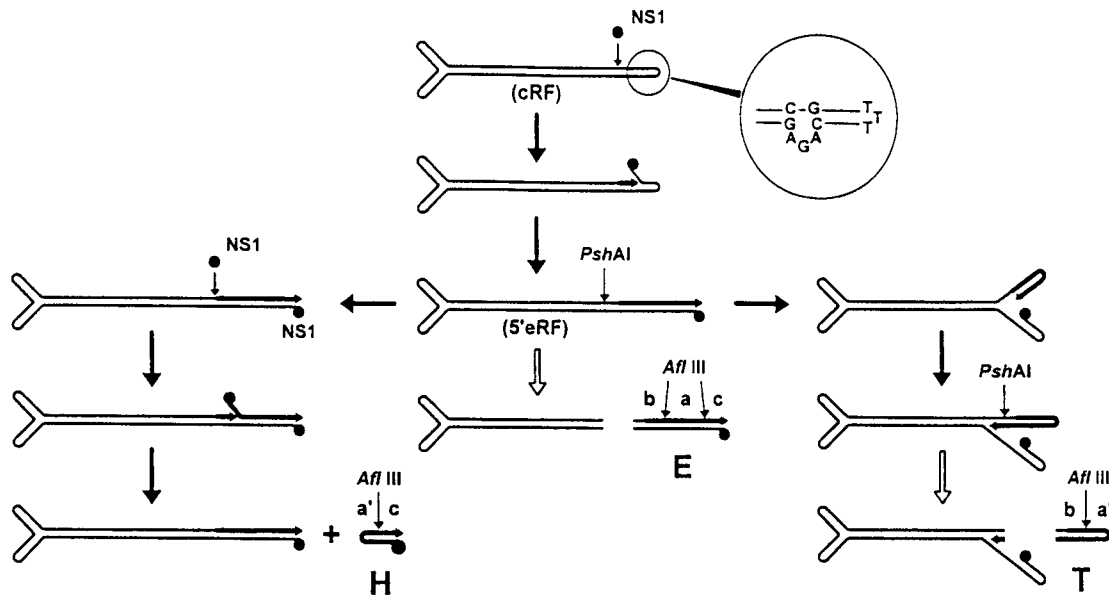


Fig. 1. Proposed scheme for replication reactions occurring at the right terminus of MVM RF DNA. The 3'-hydroxyl primer is symbolized by a small arrow. NS1 is depicted as a solid circle. Thin and heavy lines represent parental and newly synthesized DNA, respectively. H denotes segregated right-end hairpin DNA, while E and T designate *Psh*AI-generated right-end extended and turn-around fragments. *Afl*III-derived DNA segments were named a, b, c and a'. Recognition sites for *Psh*AI and *Afl*III are shown. The *Psh*AI digestion involved in T production occurs after primer elongation up to the restriction site. See text for details.

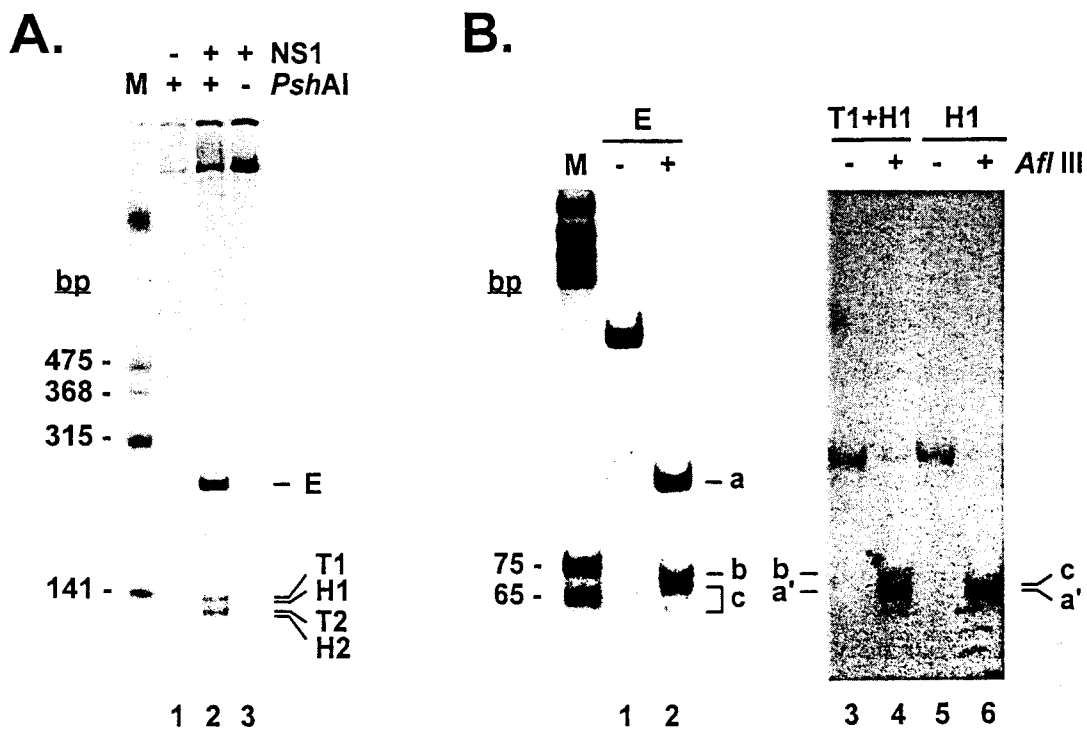


Fig. 2. Resolution of cRF DNA at its right end. (A) cRF DNA was incubated in A9 extract in the absence (lane 1) or presence (lanes 2 and 3) of NS1. Replication products were analysed directly (lane 3) or after digestion with *Psh*AI (lanes 1 and 2) on a neutral 5% polyacrylamide gel. Lane M shows the migration of 3' end-labelled *Taq*I restriction fragments of pBR322 DNA used as size markers. (B) Gel-purified E (T+H)1 and H1 DNA (see Fig. 1) were fractionated as in panel (A) with (lanes 2, 4 and 6) or without (lanes 1, 3 and 5) previous digestion with *Afl*III. A *Hinf*I digest of pGEM-5 DNA was run under M. The size of marker fragments in base-pairs is indicated.

K. Willwand and others

analysis illustrated below. Labelling of the T1 species was unlikely to result from repair synthesis taking place on the input cRF template, since detection of this fragment was dependent on NS1 (Fig. 2A, compare lanes 1 and 2). Furthermore, the level of unspecific labelling in the assay was low. Therefore, these data were interpreted in terms of the mechanism depicted in Fig. 1 (right-hand part), i.e. a fraction of copied right-end telomeres was folded back into the 'rabbit-eared' structure and was extended at least past the *PshAI* site.

(iii) Labelled DNA products were also detected at the (T+H)1 position in the absence of *PshAI* digestion, although to a lesser extent (Fig. 2A, lane 3). Digestion of this DNA with *AflIII* gave rise to one broad band that comigrated with segments c and a' (Fig. 2B, lanes 5 and 6). As depicted in Fig. 1 (left-hand part), this was the pattern expected from free right-end telomeres that would fold back into a hairpin structure after being displaced from RF DNA through secondary rounds of NS1-induced nicking and extension reactions (Baldauf *et al.*, 1997). Accordingly, this DNA species was designated H1 for hairpin. The H1-comigrating band from the *PshAI*-treated sample (Fig. 2B, lane 3) must also contain H1 besides T1, hence its above designation (T+H)1. At the gel resolution level, the H1 and T1 species could not be separated, in keeping with the fact that the NS1 and *PshAI* cleavage sites defining their respective free ends are only a few nucleotides apart.

(iv) In addition to T1/H1 DNA, faster-migrating species were detected at the T2/H2 position (Fig. 2A, lanes 2 and 3). The analysis of the (T+H)2 and H2 species gave essentially the same results as with (T+H)1 and H1 DNA, respectively, except for a small difference in the migration of the turn-around *AflIII* fragment a' (data not shown). This difference could be ascribed to a structural modification due to the repair of the right-end bulge on the hairpin stem (see below). Therefore, the T1/T2 and H1/H2 species are referred to collectively as T and H in Fig. 1, respectively.

Structural requirements for right-end telomere nicking and extension

The conclusion that *in vitro*-produced duplex right termini may be re-nicked and re-extended in the presence of NS1 (as illustrated in Fig. 1, left-hand part) implies that the closed right-end hairpin structure of cRF is not a prerequisite for these events. This was ascertained by showing that 5'eRF DNA indeed served as a substrate for NS1-induced strand-displacement synthesis at the right-end telomere, as measured by the appearance of labelled E and H fragments during analysis of *PshAI*-digested or undigested product DNA (Fig. 3, lanes 2 and 5). Given that re-nicking of the extended product of *in vitro*-processed cRF DNA is a rare event (compare the relative intensities of bands H and E in Fig. 2A, lanes 3 and 2, respectively), the efficiencies of cRF versus 5'eRF cleavage and extension could be assessed from the labelling of E and H species with both types of substrates. As illustrated in Fig. 3, the duplex right terminus and the closed hairpin telomere were

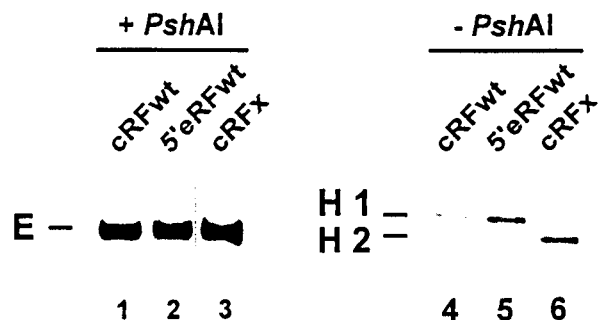


Fig. 3. Influence of the right-end structure on the initiation of MVM RF DNA replication. The right-end duplex intermediate (5'eRF) and bubble-containing (cRFwt) or bubble-less (cRFx) right-end hairpin molecules were compared for their ability to serve as substrates in *in vitro* strand-displacement synthesis initiated by NS-mediated nicking at the right-end telomere. Products were analysed on neutral 5% polyacrylamide gels as in Fig. 2 either directly (lanes 4–6) or after digestion with *PshAI* (lanes 1–3). Only the E and H regions of the gels are shown.

processed with similar efficiency, producing comparable amounts of the *in vitro*-extended *PshAI* fragment (lane 2 versus 1) and displaced hairpin DNA (lane 5 versus 4). Therefore, the hairpin structure appeared to have little influence on the capacity of the right-end telomere to undergo NS1-dependent nicking and extension under the *in vitro* conditions tested. The variable observance of hairpin products (H1 or H2) for different templates is discussed in detail below.

The mutant virus MVMx was produced by insertion of three complementary nucleotides opposite the unpaired nt 5024–5026 of MVMp, eliminating the bulge within the right-end hairpin (Costello *et al.*, 1995). During infection of A9 cells, replication of the bulge-less MVMx DNA was impaired as compared to the replication of wt MVMp DNA (Costello *et al.*, 1995), raising the possibility that the bulge controls *in cis* the processing of the right-end telomere. To directly test this possibility we compared cRF templates from MVMwt- and MVMx-infected cells for their competence to be nicked and extended in the presence of NS1. As is apparent in Fig. 3 from the labelling of either E (lanes 1 and 3) or H (lanes 4 and 6) DNA, no impairment of right-terminal processing was observed in the absence of the bulge. Therefore, the *in vitro* assay used revealed no evidence for a functional role of the bulge in nicking and extension of the right-end telomere.

Structural analysis of replication products

As stated above, the hairpin products released from *in vitro*-processed cRFwt DNA migrated as two discrete species denoted H1 and H2 (Fig. 3, lane 4). In contrast, similarly assayed 5'eRFwt and cRFx substrates each yielded a single major low-molecular-mass product that comigrated with H1 or H2, respectively (Fig. 3, lanes 5 and 6). The various H DNA products were further characterized to understand the reason for the heterogeneity. Gel-purified band H1 (from cRFwt and 5'eRFwt templates) and H2 (from cRFwt and cRFx templates) were analysed under denaturing conditions on a

NS1-induced processing of the MVM right-end telomere

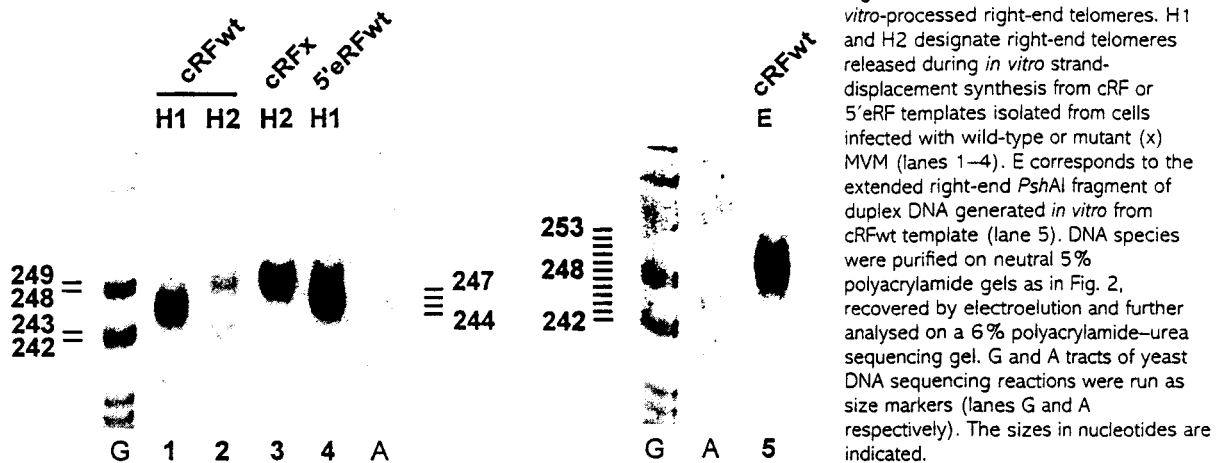


Fig. 4. Determination of the size of *in vitro*-processed right-end telomeres. H1 and H2 designate right-end telomeres released during *in vitro* strand-displacement synthesis from cRF or 5'eRF templates isolated from cells infected with wild-type or mutant (x) MVM (lanes 1–4). E corresponds to the extended right-end *PshAI* fragment of duplex DNA generated *in vitro* from cRFwt template (lane 5). DNA species were purified on neutral 5% polyacrylamide gels as in Fig. 2, recovered by electroelution and further analysed on a 6% polyacrylamide-urea sequencing gel. G and A tracts of yeast DNA sequencing reactions were run as size markers (lanes G and A respectively). The sizes in nucleotides are indicated.

polyacrylamide-urea gel. The H1 species released during the processing of both cRFwt and 5'eRF wt migrated as a broad spot corresponding to a size of 244–249 nt (Fig. 4, lanes 1 and 4). Notwithstanding the heterogeneity, this length agreed with the identity of H1 as a displaced right-end telomere (see Fig. 1, left-hand part). The H2 product of cRFwt DNA replication was distinguished by the fact that it was resolved into two spots bracketing the H1 species and corresponding to an average length difference of six nucleotides (Fig. 4, lane 2). This raised the possibility that H2 DNA resulted from an *in vitro* mismatch-correction process (Umar *et al.*, 1994) which eliminated the bubble by inserting (upper spot) or deleting (lower spot) three nucleotides. Consistent with this hypothesis, the H2 upper spot comigrated, under denaturing conditions, with the cRFx segregation product, in which the bulge was removed by a three nucleotide insertion (Fig. 4, lanes 2 and 3). Furthermore, the slower migration of the H1 species in comparison with H2 molecules originating from both cRFwt and cRFx under neutral conditions (Fig. 3, lanes 4 and 6) fits with the known electrophoretic retardation of mismatch-containing versus fully base-paired double-stranded DNA fragments (Costello *et al.*, 1995; Lilley, 1995). It is also worth noting that most hairpins released from 5'eRF templates were of the H1 type (Fig. 3, lane 5; Fig. 4, lane 4), in agreement with the fact that the bulge is not present and thus cannot be eliminated in the extended telomere. The right-end E fragment resulting from *PshAI* digestion of *in vitro*-extended cRFwt templates was also gel-purified and analysed under denaturing conditions (Fig. 4, lane 5). Labelled E strands showed the same length heterogeneity as H1 products (see below) but were of an average longer size, consistent with the position of the *PshAI* restriction site a few nucleotides inboard of the right-end telomere (see Fig. 1).

Mapping of the NS1 nick site

The heterogeneity of the E and H species observed by gel electrophoresis under denaturing conditions may result from

NS1-mediated nicking of the right-end telomere at different positions, thus giving rise to terminal extensions of various lengths. Alternatively, NS1 may nick the right-end telomere at a single site, but extension of the complementary strand fails to go to completeness. This premature arrest of extension may result from steric hindrance due to the NS1 protein which is covalently linked to the 5' ends of RF molecules produced *in vivo* (Cotmore & Tattersall, 1988) and *in vitro* (Baldauf *et al.*, 1997). This possibility was tested by determining whether gel-purified native E and H1 DNA produced from cRF template contained recessed 3' ends which could be filled-in by means of the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I, knowing that bound NS1 was mostly removed during the proteinase K digestion step of DNA isolation. As a control, a 220 bp long *AvaII*-generated pGEM DNA fragment having 3'-recessed ends was 5'-end labelled, gel-purified and treated with Klenow polymerase in the same way. Untreated and Klenow enzyme-treated samples were analysed in a sequencing gel along with yeast DNA ladders. As shown in Fig. 5(A), lanes 1 and 2, incubation of the control pGEM DNA fragment with Klenow polymerase resulted in a size shift expected for the filling of the *AvaII*-generated recessed ends. Similarly, the Klenow enzyme treatment converted the heterogeneous E and H1 patterns into single bands migrating on the high-molecular-mass edge of the respective original smears (Fig. 5A, lanes 3–6). We conclude that the NS1-induced cleavage of the right-end telomere is site-specific, but that the ensuing extension reaction is incomplete except for a small (yet detectable) minority of molecules (Fig. 5A, lanes 3 and 5).

In order to map the NS1 nick site, the gel-purified H1 species produced from a 5'eRF template was digested with *AfIII* and subsequently treated with Klenow polymerase. This procedure was expected to yield a DNA fragment extending from the NS1 to the *AfIII* cleavage sites in which any recessed ends, either caused by incomplete extension or asymmetric *AfIII* digestion, were filled-in by the Klenow enzyme. This sample was analysed by electrophoresis through a

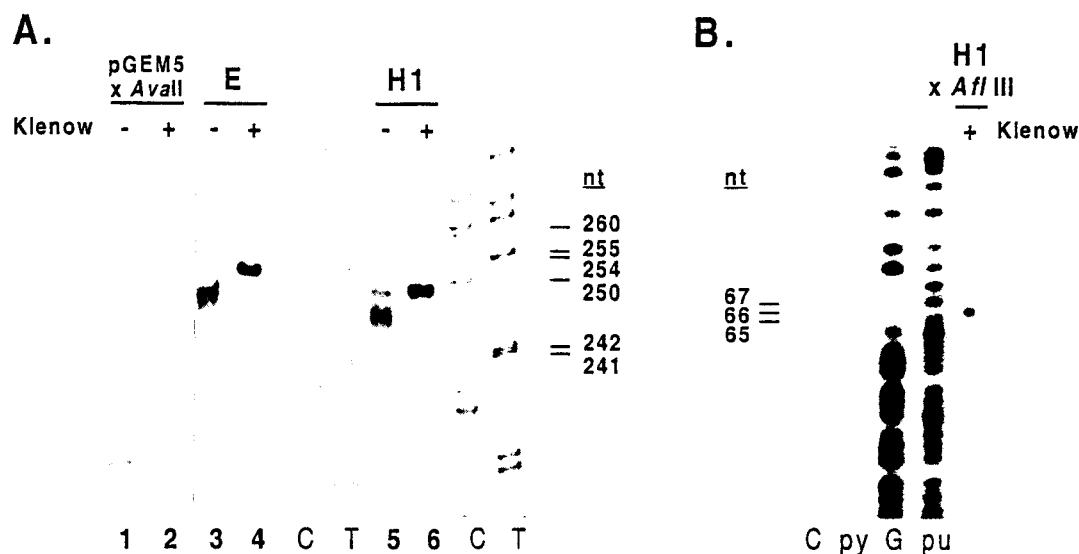


Fig. 5. Completion of the extension of *in vitro*-processed right-end telomeres. (A) Duplex RF right-end *Psh*AI restriction fragment (E, lanes 3 and 4) and displaced right-end hairpin DNA (H1, lanes 5 and 6) were obtained *in vitro* from cRFwt template, purified on a neutral 5% polyacrylamide gel as in Fig. 2 and recovered by electroelution. DNA species were treated (+) or not (–) with Klenow polymerase and analysed on a 6% polyacrylamide–urea sequencing gel. As a control, the *Ava*II digestion product of pGEM-5 DNA, which has 3'-recessed termini, was treated in the same way (lanes 1 and 2). C and T tracts of yeast DNA sequencing reactions were run as size markers, with the lengths (in nucleotides) indicated on the right. (B) Purified H1 DNA was digested with *Afl*III, treated with Klenow polymerase and analysed in a sequencing gel as described for panel (A). Maxam and Gilbert sequencing products of the MVM p98 *Psh*AI–*Sall* fragment (nt 4916–5068) were used as size markers.

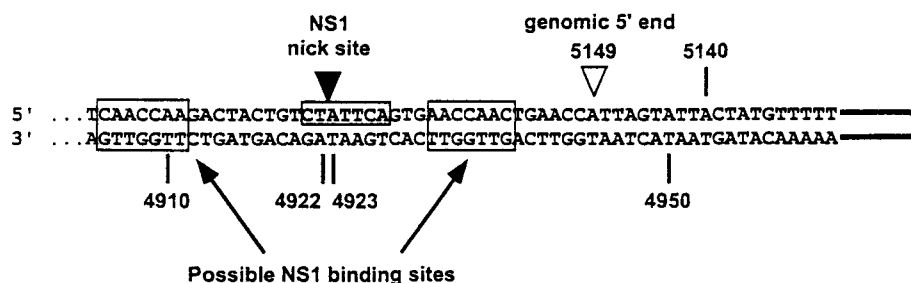


Fig. 6. Schematic representation of functional elements within the MVM DNA right-end telomere. The position of the NS1 nick site, as deduced from the sizes of DNA species analysed in Fig. 5, is indicated relative to the MVM 5'-terminal genomic hairpin. Nucleotide numbering is according to Astell *et al.* (1985). Possible NS1 binding sites (open boxes; Cotmore *et al.*, 1995) and the NS1 nick site consensus (shaded box; Cotmore & Tattersall, 1994) are shown.

polyacrylamide–urea gel along with Maxam–Gilbert sequencing products from a *Psh*AI–*Sall* fragment (nt 4916–5068) of the MVM infectious DNA clone p98 (Antonietti *et al.*, 1988). According to these size markers, the NS1–*Afl*III H1 fragment was 66 nt in length (Fig. 5B), corresponding to an NS1 nick site located 21 nt inboard of the folded-back genomic 5' end. A 66 nt long oligodeoxynucleotide synthesized according to the MVM sequence from this position to the filled-in *Afl*III site (nt 4922–4988) was found to comigrate with the fragment above, confirming the determination of the nick site (data not shown). A nick site at this position fits with the length of 254 nt determined for the full-length *Psh*AI-produced E fragment analysed in Fig. 5(A) and predicts a size of 248 nt for the full-length H1 strand.

Actually, the H1 DNA species was slightly retarded and migrated at the 249 nt position (Fig. 5A), which is likely to be due to the residual amino acids of the NS1 protein covalently bound to the 5' end and not totally removed by the proteinase K treatment (see Fig. 1 and Baldauf *et al.*, 1997). Similarly, a faint band could be detected at the 67 nt position after overexposure of Fig. 5(B) (data not shown), and may correspond to the amino acid-bound strand of the NS1–*Afl*III H1 fragment. This is in line with the fact that only the 66 nt band was detected in *Afl*III-digested E DNA produced from the cRF template (data not shown), in keeping with the lack of association of the labelled E DNA strand with NS1 (see Fig. 1). Thus, the data of Fig. 5(A, B) both indicate NS1-mediated nicking of MVM DNA at a unique position 21 nt inboard of

the folded-back genomic 5' end, i.e. between T and A opposite nt 4922 and 4923, as depicted in Fig. 6.

Discussion

We recently reported that the MVM double-stranded DNA intermediate that is covalently closed at both ends (cRF) is specifically resolved at the right terminus when incubated in mouse A9 cell extract supplemented with the MVM non-structural protein NS1. This resolution involves the NS1-induced nicking of the right-end hairpin and subsequent elongation of the primer thus created, leading to the formation of a right-hand extended DNA molecule (5'eRF). Furthermore, previous data (Baldauf *et al.*, 1997) substantiated in the present work indicate that 5'eRF DNA can be re-nicked by NS1 and undergoes (an) additional round(s) of strand-displacement synthesis resulting in the release of free right-end telomeres which fold back into the hairpin configuration (H DNA). This shedding of H DNA from RF molecules seems futile for the virus and is possibly minimized under *in vivo* conditions as a result of the structural transformation of the extended right-end telomere into a 'rabbit-eared' configuration allowing further strand elongation and production of multimeric intermediates (Cotmore & Tattersall, 1987; Ward & Dadachanji, 1978). The 5'eRF DNA restriction pattern presented in this work also provides evidence for 'rabbit-eared' formation at a low frequency *in vitro*.

The investigation of the role of the hairpin in the NS1-dependent processing of the right-end telomere is complicated by the fact that (i) re-nicking events might mask original differences in the affinity of NS1 towards distinct DNA structures and (ii) 'rabbit-ear' formation within a portion of terminally extended duplex molecules recreates a hairpin substrate for NS1-induced events. However, a measurement of the relative levels of precursor incorporation into released H DNA versus extended right-end telomeres (*PshAI* fragment E) indicated that secondary rounds of NS1-mediated nicking and extension were infrequent. Furthermore, only a minor fraction of 5'eRF was found to become rearranged into the 'rabbit-eared' structure as apparent from the relative amounts of *PshAI* right-end turn-around (T) versus extended (E) fragments in Fig. 2. Therefore, it seemed justified to draw a conclusion from the comparison of cRF and 5'eRF substrates as to the influence of the DNA right-end structure on NS1-induced processing.

Similar amounts of radiolabelled right-end extension products were detected irrespective of whether cRF or 5'eRF was used as a template, arguing against a major effect of the hairpin on the sensitivity of the right terminus to NS1-dependent nicking and extension. This was additionally supported by the fact that cRF DNA used as template, and therefore present in high excess over the small amount of 5'eRF product formed during the reaction (see above), did not prevent the occurrence of secondary rounds of cleavage and displacement synthesis from extended product molecules.

Strand-displacement synthesis at the right terminus as monitored in the present assay requires DNA nicking followed by primer extension. Therefore, it cannot be ruled out that a difference between hairpin and extended substrates in the first step still exists but is masked by the limiting availability of (a) cellular factor(s) involved in the second step. This possibility is unlikely, however, since the extent of right-end telomere processing was found to increase in proportion to the amount of both template DNA and NS1 for a given extract concentration (data not shown). It should also be mentioned that the reactivity of DNA substrates present in the *in vitro* assay might be modulated by their binding to cellular extract proteins. A dependence of protein binding upon DNA conformation might therefore result in structure-dependent variations in replication efficiencies. However, varying the concentration of cellular proteins in the *in vitro* assay was found to influence the reactivity of both kinds of substrates in a comparable way. This argues against a major effect of the DNA conformation upon protein-mediated modulation of substrate reactivity (data not shown).

Altogether, these results support the conclusion that NS1 drives the resolution of MVM hairpin and extended right-end telomeres with similar efficiency. This contrasts with recent reports concerning the resolution activity of the equivalent nonstructural proteins Rep 68/78 encoded by adeno-associated virus (AAV), a helper-dependent genus of the *Parvoviridae*. Indeed, the hairpin structure was found to be a preferred target, in comparison with the extended form, for Rep binding to the AAV inverted terminal repeat (Ashktorab & Srivasta, 1989; Im & Muzyczka, 1989; Ryan *et al.*, 1996) and subsequent site-specific nicking (Snyder *et al.*, 1993). It is worth noting in this respect that the cRF DNA of autonomous parvoviruses like MVM terminates in closed hairpins at both ends but that only the right-end hairpin is resolved in the presence of NS1, as recently demonstrated *in vitro* (Baldauf *et al.*, 1997). This feature accounts for the fact that the right terminus of MVM DNA exists in two possible orientations (designated flip and flop), due to the transfer of the imperfect hairpin from one strand to the other (Rhode & Klaassen, 1982). In contrast, the left terminus (comprising the genomic 3' end) is found in one orientation only (Astell *et al.*, 1985), because its resolution by NS1 does not take place in monomeric RF but at the level of the (3'-3') bridge of head-to-head multimeric intermediates (Cotmore *et al.*, 1993; Cotmore & Tattersall, 1994; Liu *et al.*, 1994). The involvement of NS1 in both types of reactions may be related to its ability to act with similar efficiencies on hairpin and extended termini. Multimeric RF molecules are also detected in AAV-infected cells, yet their resolution may not involve the bridge region (Berns, 1990). This is consistent with the occurrence of sequence inversion at both ends of the AAV genome (Lusby *et al.*, 1980).

The right-end hairpin of MVM DNA contains a three nucleotide bulge loop (the so-called 'bubble'). Bulge loops have been described as important functional elements within

K. Willwand and others

DNA and RNA molecules (for a review see Lilley, 1995). The conservation of this right-terminal mismatch among a number of autonomous parvoviruses suggests that it constitutes a recognition element of a process involving the hairpin, given that the mismatch is present in the stem of the hairpin but not the right-end duplex configuration. The finding that bulge-less and natural right-end hairpins are resolved with similar efficiency in the presence of NS1 argues against an involvement of the bulge in the initiation of RF replication. Thus, the reduced amount of extended versus turn-around RF right termini, as observed in cells infected with the bubble-less mutant MVMx (Costello *et al.*, 1995), may result from a role of the bulge in DNA replication step(s) subsequent to the initiation event analysed here, e.g. in gene expression or genome encapsidation. Encapsidation of the MVM viral strand is thought to be coupled with its release from monomeric RF DNA by strand displacement synthesis initiated at the right terminus (Müller & Siegl, 1983). The bulge loop on the right-end hairpin might therefore be involved in recognition of the displaced genome by preformed capsids. Experiments demonstrating MVM capsid binding to the genomic left end failed to reveal any interaction with the right-end hairpin (Willwand & Hirt, 1991). However, this result does not rule out that the bulge plays a role in encapsidation by inducing a structural change in the right-end telomere. It has been noted that inverted repeated sequences encompassing the bulge region may generate a cruciform structure within the right-end hairpin (Cotmore & Tattersall, 1987). Cruciform extrusion should be facilitated by the bulge which can be calculated to reduce the energy for the structural transition from 129.7 to 81.2 kJ/mol (Jaeger *et al.*, 1989, 1990; Zuker, 1989). The cruciform configuration at the DNA right end may conceivably contribute to encapsidation, given its resemblance to the genomic left-end hairpin structure that was shown to interact with capsids (Willwand & Hirt, 1991).

The *in vitro*-resolved right terminus was analysed in order to map the NS1 nick site. This study revealed an unexpected size heterogeneity of *in vitro*-resolved right-end telomeres, ascribed to the fact that the displacement synthesis reaction does not always go to completion. This premature arrest of elongation is hypothesized to result from steric hindrance by the NS1 protein, which becomes covalently bound to the 5' end of nicked DNA (Cotmore & Tattersall, 1988; Baldauf *et al.*, 1997). In agreement with this possibility, the extension reaction could be completed in the presence of Klenow DNA polymerase on proteinase K-treated gel-purified product DNA. Occurrence *in vivo* of this premature arrest of right-end strand-displacement synthesis (see below) would not be detrimental, since the sequences within the inverted terminal repeat that are located 5' to the axis of symmetry are repaired after hairpin refolding and further elongation. Taking this into consideration, the nick site was mapped 21 nt inboard of the folded-back genomic 5' end. The position of the NS1 cleavage site has been inferred before from the analysis of extended RF molecules

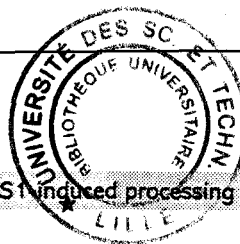
isolated from MVM-infected cells. According to the sequencing data of Astell *et al.* (1985), nicking was suggested to take place 18 nt inboard of the genomic hairpin. Yet, the *in vivo*-produced RF DNA showed size heterogeneity at the right end, in agreement with our *in vitro* results. The assignment of this heterogeneity to incomplete extension may account for the present location of the NS1 nick site three nucleotides further away from the right-end hairpin, after experimental completion of strand elongation. Furthermore, primer extension studies of RF DNA extracted from MVM-infected cells led Cotmore & Tattersall (1989) to localize the NS1-mediated nick site 21 nt from the folded-back genomic 5' end, in line with the present determination.

As stated above, NS1 induces the nicking and resolution not only of the right-end (5') telomere but also of the left-end (3') inverted repeat duplicated in the form of a 3'-3' bridge inside multimeric intermediates (Cotmore *et al.*, 1993; Cotmore & Tattersall, 1994; Liu *et al.*, 1994). The CTWWTCA sequence (where W designates A or T) was previously noticed in the vicinity of both the left-end and right-end inverted repeats of MVM DNA (Cotmore & Tattersall, 1994). The present work mapped the NS1-mediated cleavage of the right-end telomere between the second and third nucleotide of this sequence (depicted in Fig. 6), which is equivalent to the position determined by Cotmore & Tattersall (1994) for the major *in vitro* nick site of the 3'-3' bridge. Cotmore *et al.* (1995) recently showed that NS1 interacts with ACCA repeats that are present in particular in the vicinity of the 3'-3' nick site. Another NS1-binding element of somewhat lower affinity is the CAACCAA sequence (Cotmore *et al.*, 1995). This motif is present both 3' and 5' to the NS1 nick site (Fig. 6). NS1 was shown to bind to given ACCA elements in an asymmetrical fashion, projecting more to the 5' side than to the 3' side of the binding motif (Cotmore *et al.*, 1995). This would favour the usage of the CAACCAA element located 3' to the nick site (Fig. 6) in the NS1-mediated cleavage reaction. We are currently conducting a mutational analysis of the right-end region of MVM DNA in order to assess the respective roles played by these elements in the NS1-directed resolution of right-end telomeres.

We thank Bernhard Hirt (Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Epalinges, Switzerland), Peter Tattersall (Yale University, New Haven, Conn., USA), and Gaëlle Kuntz-Simon, Jürg Nüesch, Katalin Toth, Jörg Langowski and Georg Sczakiel (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg, Germany) for helpful discussions. We are indebted to David Pintel (University of Missouri, Columbia, Mo., USA) for providing recombinant baculovirus. We also thank Remy Poirey (DKFZ) for the preparation of yeast DNA sequencing products and Odilia Popanda and Heinz Thielmann (DKFZ) for giving access to the Pharmacia MacroPhor electrophoresis unit.

References

- Antonietti, J.-P., Sahli, R., Beard, P. & Hirt, B. (1988). Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of minute virus of mice. *Journal of Virology* **62**, 552-557.



- Ashktorab, H. & Srivasta, A. (1989). Identification of nuclear proteins that specifically interact with adeno-associated virus type 2 inverted terminal repeat hairpin DNA. *Journal of Virology* **63**, 3034–3039.
- Astell, C. R., Chow, M. B. & Ward, D. C. (1985). Sequence analysis of the termini of virion and replicative forms of minute virus of mice DNA suggests a modified rolling hairpin model for autonomous parvovirus DNA replication. *Journal of Virology* **54**, 171–177.
- Astell, C. R., Gardiner, E. M. & Tattersall, P. (1986). DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *Journal of Virology* **57**, 656–669.
- Baldauf, A., Willwand, K., Mumtsidu, E., Nüesch, J. & Rommelaere, J. (1997). Specific initiation of replication at the right-end telomere of the closed species of minute virus of mice replicative form DNA. *Journal of Virology* **71**, 971–980.
- Berns, K. I. (1990). Parvovirus replication. *Microbiological Reviews* **54**, 316–329.
- Bourguignon, G. J., Tattersall, P. J. & Ward, D. C. (1976). DNA of minute virus of mice: self-priming, nonpermuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex. *Journal of Virology* **20**, 290–306.
- Cossons, N., Faust, E. A. & Zannis-Hadjopoulos, M. (1996). DNA polymerase-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindromic of the minute virus of mice genome. *Virology* **216**, 258–264.
- Costello, E., Sahli, R., Hirt, B. & Beard, P. (1995). The mismatched nucleotides in the 5'-terminal hairpin of minute virus of mice are required for efficient viral DNA replication. *Journal of Virology* **69**, 7489–7496.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Advances in Virus Research* **33**, 91–173.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1988). The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands. *Journal of Virology* **62**, 851–860.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1989). A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *Journal of Virology* **63**, 3902–3911.
- Cotmore, S. F. & Tattersall, P. (1994). An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO Journal* **13**, 4145–4152.
- Cotmore, S. F., Gunther, M. & Tattersall, P. (1989). Evidence for a ligation step in the DNA replication of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *Journal of Virology* **63**, 1002–1006.
- Cotmore, S. F., Nüesch, J. P. F. & Tattersall, P. (1993). Asymmetric resolution of a parvovirus palindrome *in vitro*. *Journal of Virology* **67**, 1579–1589.
- Cotmore, S. F., Christensen, J., Nüesch, J. P. & Tattersall, P. (1995). The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]₂₋₃. *Journal of Virology* **69**, 1652–1660.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Research* **11**, 1475–1489.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *Journal of Molecular Biology* **26**, 365–369.
- Im, D.-S. & Muzyczka, N. (1989). Factors that bind to adeno-associated virus terminal repeats. *Journal of Virology* **63**, 3095–3104.
- Jaeger, J. A., Turner, D. H. & Zuker, M. (1989). Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **86**, 7706–7710.
- Jaeger, J. A., Turner, D. H. & Zuker, M. (1990). Predicting optimal and suboptimal secondary structure for RNA. *Methods in Enzymology* **183**, 281–306.
- Lilley, D. M. J. (1995). Kinking of DNA and RNA by base bulges. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 7140–7142.
- Liu, Q., Yong, C. B. & Astell, C. R. (1994). *In vitro* resolution of the dimer bridge of the minute virus of mice (MVM) genome supports the modified rolling hairpin model for MVM replication. *Virology* **201**, 251–262.
- Löchelt, M., Delius, H. & Kaaden, O.-R. (1989). A novel replicative form DNA of Aleutian disease virus: the covalently closed linear DNA of the parvoviruses. *Journal of General Virology* **70**, 1105–1116.
- Lusby, E., Fife, K. H. & Berns, K. I. (1980). Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *Journal of Virology* **34**, 402–409.
- Maxam, A. M. & Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology* **65**, 499–560.
- Müller, D.-E. & Siegl, G. (1983). Maturation of parvovirus Lullii in a subcellular system. I. Optimal conditions for *in vitro* synthesis and encapsidation of viral DNA. *Journal of General Virology* **64**, 1043–1054.
- Rhode, S. L. & Klaassen, B. (1982). DNA sequence of the 5'-terminus containing the replication origin of parvovirus replicative form DNA. *Journal of Virology* **41**, 990–999.
- Ryan, J. H., Zolotukhin, S. & Muzyczka, N. (1996). Sequence requirements for binding of Rep68 to the adeno-associated virus terminal repeats. *Journal of Virology* **70**, 1542–1553.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **74**, 5463–5467.
- Straus, S. E., Sebring, E. D. & Rose, J. A. (1976). Concatemers of alternating plus and minus strands are intermediates in adeno-associated virus DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **73**, 742–746.
- Siegl, G., Bates, R. C., Berns, K. I., Carter, B. J., Kelly, D. C., Kurstak, E. & Tattersall, P. (1985). Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Interovirology* **23**, 61–73.
- Snyder, R. O., Im, D.-S., Ni, T., Xiao, X., Samulski, R. J. & Muzyczka, N. (1993). Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral Rep protein. *Journal of Virology* **67**, 6096–6104.
- Tattersall, P., Crawford, L. V. & Shatkin, A. J. (1973). Replication of the parvovirus MVM. II. Isolation and characterization of intermediates in the replication of the viral deoxyribonucleic acid. *Journal of Virology* **12**, 1446–1456.
- Umar, A., Boyer, J. C. & Kunkel, T. A. (1994). DNA loop repair by human cell extract. *Science* **266**, 814–816.
- Ward, D. C. & Dadachanji, D. K. (1978). Replication of minute virus of mice DNA. In *Replication of Mammalian Parvoviruses*, pp. 297–313. Edited by D. C. Ward & P. Tattersall. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Willwand, K. & Hirt, B. (1991). The minute virus of mice capsid specifically recognizes the 3' hairpin structure of the viral replicative-form DNA: mapping of the binding site by hydroxyl radical footprinting. *Journal of Virology* **65**, 4629–4635.
- Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* **244**, 48–52.