

Université de Montréal

**ANALYSE GÉNÉTIQUE DE L'ACTIVITÉ  
IMMORTALISANTE DE L'ANTIGÈNE GRAND T DU VIRUS  
DU POLYOME MURIN**

par  
André Pilon

**PROGRAMME DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**  
Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en biologie moléculaire

octobre, 1995  
© André Pilon, 1995



QH  
506  
U54  
1996  
V,001

Nom \_\_\_\_\_ André Pilon

Dissertation Abstracts International est organisé en catégories de sujets. Veuillez s.v.p. choisir le sujet qui décrit le mieux votre thèse et inscrivez le code numérique approprié dans l'espace réservé ci-dessous.

Biologie moléculaire

SUJET

0 3 0 7

U·M·I

CODE DE SUJET

## Catégories par sujets

### HUMANITÉS ET SCIENCES SOCIALES

#### COMMUNICATIONS ET LES ARTS

Architecture	0729
Beaux-arts	0357
Bibliothéconomie	0399
Cinéma	0900
Communication verbale	0459
Communications	0708
Danse	0378
Histoire de l'art	0377
Journalisme	0391
Musique	0413
Sciences de l'information	0723
Théâtre	0465

#### ÉDUCATION

Généralités	515
Administration	0514
Art	0273
Collèges communautaires	0275
Commerce	0688
Économie domestique	0278
Éducation permanente	0516
Éducation préscolaire	0518
Éducation sanitaire	0680
Enseignement agricole	0517
Enseignement bilingue et multiculturel	0282
Enseignement industriel	0521
Enseignement primaire	0524
Enseignement professionnel	0747
Enseignement religieux	0527
Enseignement secondaire	0533
Enseignement spécial	0529
Enseignement supérieur	0745
Évaluation	0288
Finances	0277
Formation des enseignants	0530
Histoire de l'éducation	0520
Langues et littérature	0279

Lecture	0535
Mathématiques	0280
Musique	0522
Orientation et consultation	0519
Philosophie de l'éducation	0998
Physique	0523
Programmes d'études et enseignement	0727
Psychologie	0525
Sciences	0714
Sciences sociales	0534
Sociologie de l'éducation	0340
Technologie	0710

#### LANGUE, LITTÉRATURE ET LINGUISTIQUE

Langues	
Généralités	0679
Anciennes	0289
Linguistique	0290
Modernes	0291
Littérature	
Généralités	0401
Anciennes	0294
Comparée	0295
Médiévale	0297
Moderne	0298
Africaine	0316
Américaine	0591
Anglaise	0593
Asiatique	0305
Canadienne (Anglaise)	0352
Canadienne (Française)	0355
Germanique	0311
Latino-américaine	0312
Moyen-orientale	0315
Romane	0313
Slave et est-européenne	0314

#### PHILOSOPHIE, RELIGION ET

THEOLOGIE	
Philosophie	0422
Religion	
Généralités	0318
Clergé	0319
Études bibliques	0321
Histoire des religions	0320
Philosophie de la religion	0322
Théologie	0469

#### SCIENCES SOCIALES

Anthropologie	
Archéologie	0324
Culturelle	0326
Physique	0327
Droit	0398
Économie	
Généralités	0501
Commerce-Affaires	0505
Économie agricole	0503
Économie du travail	0510
Finances	0508
Histoire	0509
Théorie	0511
Études américaines	0323
Études canadiennes	0385
Études féministes	0453
Folklore	0358
Géographie	0366
Gérontologie	0351
Gestion des affaires	
Généralités	0310
Administration	0454
Banques	0770
Comptabilité	0272
Marketing	0338
Histoire	
Histoire générale	0578

Ancienne	0579
Médiévale	0581
Moderne	0582
Histoire des noirs	0328
Africaine	0331
Canadienne	0334
États-Unis	0337
Européenne	0335
Moyen-orientale	0333
Latino-américaine	0336
Asie, Australie et Océanie	0332
Histoire des sciences	0585
Loisirs	0814
Planification urbaine et régionale	0999
Science politique	
Généralités	0615
Administration publique	0617
Droit et relations internationales	0616
Sociologie	
Généralités	0626
Aide et bien-être social	0630
Criminologie et établissements pénitentiaires	0627
Démographie	0938
Études de l'individu et de la famille	0628
Études des relations interethniques et des relations raciales	0631
Structure et développement social	0700
Théorie et méthodes	0344
Travail et relations industrielles	0629
Transports	0709
Travail social	0452

### SCIENCES ET INGÉNIERIE

#### SCIENCES BIOLOGIQUES

Agriculture	
Généralités	0473
Agronomie	0285
Alimentation et technologie alimentaire	0359
Culture	0479
Élevage et alimentation	0475
Exploitation des pétaurages	0777
Pathologie animale	0476
Pathologie végétale	0480
Physiologie végétale	0817
Sylviculture et faune	0478
Technologie du bois	0746
Biologie	
Généralités	0306
Anatomie	0287
Biologie (Statistiques)	0308
Biologie moléculaire	0307
Botanique	0309
Cellule	0379
Écologie	0329
Entomologie	0353
Génétique	0369
Limnologie	0793
Microbiologie	0410
Neurologie	0317
Océanographie	0416
Physiologie	0433
Radiation	0821
Science vétérinaire	0778
Zoologie	0472
Biophysique	
Généralités	0786
Médicale	0760
SCIENCES DE LA TERRE	
Biogéochimie	0425
Géochimie	0996
Géodésie	0370
Géographie physique	0368

Géologie	0372
Géophysique	0373
Hydrologie	0388
Minéralogie	0411
Océanographie physique	0415
Paléobotanique	0345
Paléocologie	0426
Paléontologie	0418
Paléozoologie	0985
Palynologie	0427

#### SCIENCES DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT

Économie domestique	0386
Sciences de l'environnement	0768
Sciences de la santé	
Généralités	0566
Administration des hôpitaux	0769
Alimentation et nutrition	0570
Audiologie	0300
Chimiothérapie	0992
Dentisterie	0567
Développement humain	0758
Enseignement	0350
Immunologie	0982
Loisirs	0575
Médecine du travail et thérapie	0354
Médecine et chirurgie	0564
Obstétrique et gynécologie	0380
Ophtalmologie	0381
Orthophonie	0460
Pathologie	0571
Pharmacie	0572
Pharmacologie	0419
Physiothérapie	0382
Radiologie	0574
Santé mentale	0347
Santé publique	0573
Soins infirmiers	0569
Toxicologie	0383

#### SCIENCES PHYSIQUES

Sciences Pures	
Chimie	
Généralités	0485
Biochimie	487
Chimie agricole	0749
Chimie analytique	0486
Chimie minérale	0488
Chimie nucléaire	0738
Chimie organique	0490
Chimie pharmaceutique	0491
Physique	0494
Polymères	0495
Radiation	0754
Mathématiques	0405
Physique	
Généralités	0605
Acoustique	0986
Astronomie et astrophysique	0606
Electronique et électricité	0607
Fluides et plasma	0759
Météorologie	0608
Optique	0752
Particules (Physique nucléaire)	0798
Physique atomique	0748
Physique de l'état solide	0611
Physique moléculaire	0609
Physique nucléaire	0610
Radiation	0756
Statistiques	0463
Sciences Appliquées Et Technologie	
Informatique	0984
Ingénierie	
Généralités	0537
Agricole	0539
Automobile	0540

Biomédicale	0541
Chaleur et thermodynamique	0348
Conditionnement (Emballage)	0549
Génie aérospatial	0538
Génie chimique	0542
Génie civil	0543
Génie électronique et électrique	0544
Génie industriel	0546
Génie mécanique	0548
Génie nucléaire	0552
Ingénierie des systèmes	0790
Mécanique navale	0547
Métallurgie	0743
Science des matériaux	0794
Technique du pétrole	0765
Technique minière	0551
Techniques sanitaires et municipales	0554
Technologie hydraulique	0545
Mécanique appliquée	0346
Géotechnologie	0428
Matières plastiques (Technologie)	0795
Recherche opérationnelle	0796
Textiles et tissus (Technologie)	0794

#### PSYCHOLOGIE

Généralités	0621
Personnalité	0625
Psychobiologie	0349
Psychologie clinique	0622
Psychologie du comportement	0384
Psychologie du développement	0620
Psychologie expérimentale	0623
Psychologie industrielle	0624
Psychologie physiologique	0989
Psychologie sociale	0451
Psychométrie	0632



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

**ANALYSE GÉNÉTIQUE DE L'ACTIVITÉ  
IMMORTALISANTE DE L'ANTIGÈNE GRAND T DU VIRUS  
DU POLYOME MURIN**

présentée par  
André Pilon

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Président du jury	Richard Bertrand
Directrice de recherche	Anne-Marie Mes-Masson
Membre du jury	Rashmi Kothary
Examineur externe	Mark Featherstone

Thèse acceptée le: 29 novembre 1995

## SOMMAIRE

---

Nous avons analysé l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome murin. L'antigène grand T du virus du polyome est en mesure d'interagir avec pRb *in vitro* et son activité immortalisante semble dépendre de sa capacité à lier pRb par le biais d'une séquence contenue entre les acides aminés 141-146. Cette région contient la séquence consensus de liaison à pRb (D/N-L-X-C-X-E) et est homologue à la région conservée 2 de la protéine E1A d'adénovirus qui est non seulement capable d'interagir avec pRb mais aussi avec la protéine p107 et p130.

Dans un premier temps, nous avons ciblé la région conservée 2 de l'antigène grand T du virus du polyome. Nous avons démontré que la région conservée 2 de l'antigène grand T du virus du polyome est nécessaire pour la liaison de pRb, p107 et p130 *in vitro*. Nous avons ensuite examiné la nature des interactions entre pRb, p107 et la région conservée 2 de l'antigène grand T du virus du polyome murin et corrélié la formation de complexes avec l'activité immortalisante de la protéine. Pour ce faire, nous avons généré une série d'antigènes grand T mutants dans la région conservée 2 en introduisant des mutations ponctuelles au coeur de la séquence consensus de liaison à pRb et dans sa région C-terminale. Ces antigènes grand T mutants nous ont permis de démontrer que chaque acide aminé conservé du coeur de la séquence consensus de liaison à pRb (D/N-L-X-C-X-E) est absolument nécessaire pour la liaison de pRb et de p107 *in vitro*. De plus, la substitution de résidus non-conservés dans la région flanquant le coeur de la séquence de liaison à pRb peut aussi influencer la liaison de pRb et de p107 à l'antigène grand T de polyome *in vitro*. Les antigènes grand T mutants incapables de former des complexes avec pRb à des niveaux significatifs *in vitro*, sont également incapables d'immortaliser des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de rat *in vivo*. Nos résultats suggèrent que la liaison de p107 n'est pas nécessaire pour conférer à l'antigène grand T de polyome l'habileté à immortaliser des cellules primaires de rat. Nous avons donc pu démontrer qu'il y a une corrélation étroite entre la capacité de l'antigène grand T de polyome à lier pRb *in vitro* et à immortaliser des cellules embryonnaires de rat *in vivo*. Cependant le niveau absolu de liaison de pRb et de p107 *in vitro* par l'antigène grand T n'a aucune influence sur l'activité

immortalisante de la protéine *in vivo* mais semble plutôt affecter les caractéristiques de croissance des lignées cellulaires dérivées de ces transfections en leur permettant d'atteindre de plus fortes densités de saturation.

Nous avons aussi démontré l'importance du motif de phosphorylation par la CKII, flanquant la séquence consensus de liaison à pRb, dans l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome. Ainsi, l'addition de résidus acides dans ce motif vient doubler la fréquence d'immortalisation de la molécule hybride. De plus, nous avons démontré que la région conservée 2 de l'antigène grand T de SV40 peut remplacer la région conservée 2 de l'antigène grand T du virus du polyome murin. La molécule hybride est en mesure d'immortaliser des cellules embryonnaires de rat à une fréquence équivalente à l'antigène grand T de polyome sauvage. La délétion des acides aminés correspondant à la position du domaine de liaison à pRb chez l'antigène grand T de SV40 génère un antigène grand T mutant qui est en mesure d'immortaliser des cellules embryonnaires de rat à une fréquence deux fois plus élevée que l'antigène grand T sauvage. Les lignées cellulaires dérivées des transfections avec ces trois antigènes grand T mutants possèdent des phénotypes particuliers. Ces lignées cellulaires sont toutes en mesure de former des colonies en agar mou à une fréquence élevée.

L'ensemble de nos résultats révèle une corrélation intéressante entre la capacité de lier les protéines pRb et p107 *in vitro* et l'activité immortalisante de l'antigène grand T de polyome *in vivo*. En effet, les antigènes grand T mutants capables de lier pRb à des niveaux équivalents ou supérieurs à la protéine sauvage et dont la capacité de lier p107 est diminuée, démontrent tous une fréquence d'immortalisation supérieure à l'antigène grand T sauvage. Ces observations nous amènent à suggérer un modèle d'immortalisation cellulaire par l'antigène grand T de polyome où le rapport entre la quantité de pRb et de p107 lié par l'antigène grand T du virus du polyome pourrait avoir un effet sur l'activité immortalisante de la protéine.

Dans la troisième partie de cette étude, nous avons examiné la contribution du motif de doigt de zinc à l'activité immortalisante de l'antigène grand T de polyome. Un fragment N-terminal de 219 acides aminés est en mesure d'immortaliser des cellules embryonnaires de rat mais à une fréquence équivalente à seulement 22% de l'antigène grand T sauvage. La formation de complexes de hauts poids moléculaires, qui nécessite le motif de doigt de zinc, pourrait être importante pour la pleine activité immortalisante de la protéine. Nous avons délété le motif de doigt de zinc de l'antigène grand T de polyome et déterminé l'activité immortalisante de la protéine *in vivo*. Nos résultats indiquent que la délétion du motif de doigt de zinc ne diminue pas la capacité de l'antigène grand T mutant à immortaliser des cellules embryonnaires de rat mais augmente plutôt sa fréquence relative d'immortalisation. Le motif de doigt de zinc n'est donc pas nécessaire pour l'immortalisation de cultures primaires de cellules embryonnaires de rat. Ces résultats suggèrent que d'autres domaines de la protéine sont nécessaires pour conférer à l'antigène grand T de polyome sa pleine activité immortalisante.

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>SOMMAIRE</b> .....	iii
Liste des tableaux .....	ix
Liste des figures .....	x
Liste des sigles et abréviations .....	xiii
Remerciements.....	xvii
Dédicace .....	xviii
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
1.0 Le virus du polyome murin .....	3
1.1 Historique.....	3
1.2 Structure du virus .....	3
1.3 L'antigène grand T du virus du polyome murin.....	7
1.3.1 Analyse des domaines fonctionnels de l'antigène grand T du virus du polyome murin .....	7
1.3.2 Autres cibles potentielles: p130 et p300.....	10
1.4 Activation des gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN et à la production des enzymes nécessaires aux précurseurs par l'antigène grand T du virus du polyome.....	11
1.5 Similarités et différences entre les antigènes grand T de polyome et de SV40.....	11
2.0 Carcinogénèse virale .....	16
2.1 Formation de complexes spécifiques entre les oncoprotéines virales et pRb .....	17
2.1.1 Régions conservées, immortalisation et transformation cellulaire .....	18
2.1.2 Région conservée 1 (CR1) .....	19
2.1.3 Région conservée 2 (CR2) .....	22
2.1.4 Motif de phosphorylation par la kinase à caséine II (CKII) .....	25
2.1.5 Région conservée 3 (CR3): domaine du doigt de zinc .....	28
2.1.6 Région entre les acides aminés 256 et 272 .....	32
2.2 Dissociation du complexe pRb/E2F.....	32

3.0 Sénescence et immortalité.....	36
3.1 Génétique et senescence.....	36
3.2 Immortalisation cellulaire .....	37
3.3 La régulation de la sénescence se fait par un mécanisme comportant deux étapes: M1 et M2.....	38
3.4 Sénescence, immortalisation et cycle cellulaire .....	41
3.5 Les voies de transduction des signaux régulées par les agents mitogènes sont perturbées dans les cellules sénescents .....	42
3.5.1 Déficience des voies de régulation des gènes de la réponse précoce dans les cellules sénescents.....	42
3.5.2 Événements de la phase G1 tardive déficients dans les cellules sénescents.....	43
3.6 Télomères et activité télomérase.....	47
4.0 Régulation du cycle cellulaire par le produit du gène suppresseur du rétinoblastome .....	51
4.1 Historique.....	51
4.2 Domaines fonctionnels de pRb.....	52
4.2.1 Domaine A/B .....	52
4.2.2 Le domaine de l'espaceur .....	55
4.2.3 Le domaine C-terminal.....	56
4.3 pRb et le contrôle du cycle cellulaire.....	56
4.3.1 Contrôle de la phosphorylation de pRb.....	57
4.3.2 Fonction biochimique de pRb: contrôle de la transcription par E2F.....	59
4.3.3 Autres voies biochimiques régulées par pRb.....	63
4.3.4 pRb, intégrateur des signaux positifs régulant la croissance cellulaire .....	64
4.3.5 pRb, intégrateur des signaux négatifs régulant la croissance cellulaire .....	65
4.4 Modèle de régulation du cycle cellulaire par pRb .....	67
4.5 pRb et le cancer .....	72
4.6 Rôle biologique de pRb au cours du développement et de la différenciation .....	76

<b>DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>82</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>85</b>
5.0 Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen conserved region 2: effects on pRb and p107 binding <i>in vitro</i> and immortalization activity <i>in vivo</i> (Soumis à: J. of Virology. 1995).....	85
6.0 Polyomavirus large T antigen binds the “pRb related” protein p130 through sequences in conserved region 2 (En préparation) .....	126
7.0 Polyomavirus large T antigen zinc finger is not required for efficient immortalization of primary rat embryo fibroblasts (Soumis à: Virology. 1995) .....	139
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>151</b>
8.0 Effet des mutations ponctuelles et des délétions de pRb et p107 à l’antigène grand T de polyome <i>in vitro</i> et immortalisation cellulaire <i>in vivo</i> .....	153
8.1 Liaison de pRb et de p107 <i>in vitro</i> aux antigènes grand T hybrides et immortalisation cellulaire <i>in vivo</i> .....	159
8.2 Motif CKII et immortalisation cellulaire .....	161
8.3 Liaison de l’antigène grand T de polyome à p130.....	165
8.4 Liaison de l’antigène grand T de polyome à pRb, p107, p130 et progression du cycle cellulaire .....	166
8.5 Délétion du motif de doigt de zinc de l’antigène grand T du virus du polyome et immortalisation cellulaire .....	168
8.6 Autres domaines fonctionnels impliqués dans l’activité immortalisante de l’antigène grand T du virus du polyome?.....	169
8.7 Seuil critique pour l’immortalisation cellulaire .....	170
8.8 Caractéristiques de croissance des lignées cellulaires dérivées des cellules immortalisées par certains antigènes grand T mutants .....	173
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>176</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>177</b>

## LISTE DES TABLEAUX

---

### INTRODUCTION

Tableau 1: Protéines liées par pRb.....	81
---	----

### RÉSULTATS

5.0 functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen conserved region 2: effects on pRb and p107 binding *in vitro* and immortalization activity *in vivo*

Table 1: <i>In vitro</i> pRb- and p107-binding and relative immortalization frequency of primary REF by wild-type and mutant Py LT-Ags.....	124
Table 2: Growth characteristics of wild-type and mutant Py LT-Ag immortalized cell lines .....	125

## LISTE DES FIGURES

---

### INTRODUCTION

Figure 1: Carte du génome du virus du polyome murin .....	6
Figure 2: Représentation schématique des domaines fonctionnels des antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome murin ...	13
Figure 3: Alignement des séquences de la CR1 d'oncoprotéines de différents virus à ADN oncogènes .....	21
Figure 4: Alignement des séquences de la CR2 d'oncoprotéines de différents virus à ADN oncogènes .....	24
Figure 5: A) Alignement des motifs de doigt de zinc des antigènes grand T du groupe des virus du polyome .....	30
B) Représentation schématique du doigt de zinc de l'antigène grand T du virus du polyome murin .....	30
Figure 6: Modèle de la dissociation du complexe pRb/E2F, p107/E2F par la protéine E1A d'adénovirus .....	35
Figure 7: Sommaire des événements physiologiques induits par le sérum dans les fibroblastes humains diploïdes (HDFs) sénescents et quiescents .....	45
Figure 8: Modèle d'inhibition de la synthèse de l'ADN chez les HDFs sénescents .....	49
Figure 9: Représentation schématique de la structure de la protéine Rb humaine .....	54

Figure 10: Représentation schématique des complexes cycline/CDKs impliqués dans la phosphorylation de pRb au cours du cycle cellulaire et de l'interaction entre p130, pRb, p107 et du facteur de transcription E2F .....	61
Figure 11: Modèle de la régulation de l'activité cycline D/CDK4 au cours de la phase G1.....	69
Figure 12: Modèle du contrôle du point de restriction en G1 par la cycline D .....	71
Figure 13: Voies biochimiques convergeant vers pRb qui sont perturbées dans plusieurs types de cancer chez l'humain .....	74
Figure 14: Modèle de la fonction biologique de pRb.....	80

## RÉSULTATS

### 5.0 FUNCTIONAL IMPLICATIONS OF MUTATIONS WITHIN POLYOMAVIRUS LARGE T ANTIGEN CONSERVED REGION 2: EFFECTS ON pRb AND p107 BINDING *IN VITRO* AND IMMORTALIZATION ACTIVITY *IN VIVO*

Figure 1: Sequence comparison of the CR2 and CKII motifs of selected DNA tumor virus oncoproteins. ....	118
Figure 2: Schematic representation of the functional domains within Py LT-Ag and SV40 T antigen. ....	119
Figure 3: Structure of the recombinant plasmids and experimental strategy used in this study.....	120
Figure 4: Amino acid substitutions in Py LT-Ag in the pRb-binding and CKII motifs.....	121

Figure 5: *In vitro* pRb and p107 binding assays..... 122

Figure 6: Relative immortalization frequency of primary REF by wild-type and mutant Py LT-Ag..... 123

## 6.0 POLYOMAVIRUS LARGE T ANTIGEN BINDS THE pRb RELATED PROTEIN p130 THROUGH SEQUENCES IN CONSERVED REGION 2

Figure 1: Schematic representation of wild-type and mutant PyLT-Ags..... 137

Figure 2: *In vitro* pRb, p107 and p130 binding assays..... 138

## 7.0 POLYOMAVIRUS LARGE T ANTIGEN ZINC FINGER IS NOT REQUIRED FOR EFFICIENT CELLULAR IMMORTALIZATION OF PRIMARY RAT EMBRYO FIBROBLASTS

Figure 1: Schematic representation of recombinant plasmids. .... 149

Figure 2: Relative immortalization frequency of primary rat embryo fibroblasts by wild-type and mutant Py LT-Ag. .... 150

## DISCUSSION

Figure 15: Modèle d'un seuil critique pour l'immortalisation cellulaire .....172

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

---

- $^{35}\text{S}$ : Isotope 35 du soufre  
Ad5: Adénovirus de type 5  
ADN: Acide déoxyribonucléique  
ARNm: acide ribonucléique messenger  
Asp: Acide aspartique (Aspartic acid)  
ATP: Adénosine-tri-phosphate  
BCCP: Biotin carboxylase carrier protein  
BKV: virus BK  
BPyV: virus du polyome bovin  
BRK: Cellules de rein de souris (Baby rat kidney cells)  
c.p.m.: Coups par minutes (Counts per minutes)  
C: Cystéine  
CAK: Kinase activant les kinases dépendantes des cyclines  
(Cyclin dependent kinase activating kinase)  
CDK: Kinase dépendante des cyclines (Cyclin dependent kinase)  
CDKI: Inhibiteur de kinase dépendante des cyclines  
(Cyclin dependent kinase inhibitor)  
cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid  
Ci: Curie  
CKII: Kinase à caséine II (Casein kinase II)  
CO<sub>2</sub>: Dioxide de carbone  
CR1: Région conservée 1 (Conserved region 1)  
CR2: Région conservée 2 (Conserved region 2)  
CR3: Région conservée 3 (Conserved region 3)  
cRNA: Complementary ribonucleic acid  
D: Acide aspartique (Aspartic acid)  
DHFR: Dihydrofolate réductase  
DMEM: Milieu de Eagle modifié par Dubelcco  
(Dubelcco modified Eagle medium)  
DNA: Deoxyribonucleic acid  
E: Acide glutamique (Glutamic acid)  
EDTA: Acide tétraacétique ethylenediamine (Ethylenediamine-tetraacetic acid)

EGF: Facteur de croissance de l'épidermes (epidermal growth factor)  
Enh: Enhancer  
FBS: Sérum de boef foetal (Fetal bovine serum)  
G-418: Généticine  
g: gramme  
G0: Phase G0 du cycle cellulaire (Gap phase 0)  
G1: Phase G1 du cycle cellulaire (Gap phase 1)  
Glu: Acide glutamique (Glutamic acid)  
GST: Glutathione S-transferase  
HaPV. virus du polyome de hamster  
HCl: Acide chloridrique  
HDF: Fibroblastes humains diploïdes (Human diploid fibroblasts)  
HEPES: Acide sulfonique N2--Hydroxyethylpiperazine-N'2-ethane  
(N2--Hydroxyethylpiperazine-N'2-ethane sulfonic acid)  
His: Histidine  
HPV: Virus du papillome humain (Human papillomavirus)  
hr: hour; heure  
IPTG: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside  
IVS: Intervening sequence  
JCV: virus JC  
kb: Kilo paire de bases  
kDa: kilo Dalton  
KV: virus K  
L: Leucine  
l: litre  
 $\lambda$ :Lambda  
LPV: virus du polyome lymphotrope (Lymphotropic polyomavirus)  
M1: Phase de mortalité cellulaire 1  
M2: Phase de mortalité cellulaire 2  
mg: milligramme  
ml: millilitre  
MLP: Promoteur majeur tardif (Major late promoter)  
mm: millimètre  
N: Asparagine

NaCl: Chlorure de sodium  
NLS: Signal de localisation nucléaire (Nuclear localization signal)  
ori: Origine de réplication (origin of replication)  
PAGE: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide  
(Polyacrylamide gel electrophoresis)  
PBS: Solution tamponnée au phosphate (Phosphate buffered saline)  
PCNA: Antigène de prolifération nucléaire  
PCR: Réaction d'amplification à la polymérase (polymerase chain reaction)  
Phe: Phénylalanine  
PKC: Protéine kinase C  
PMSF: Phenyl-methylsulfonyl fluoride  
polyA: Signal de polyadénylation (Polyadenylation signal)  
pRb: produit du gène suppresseur du rétinoblastome  
Py LT-Ag: Antigène grand T du virus du polyome murin  
(Polyomavirus large T antigen)  
PyV: virus du polyome murin  
R: Point R du cycle cellulaire (Restriction point)  
REF: Fibroblaste embryonnaire de rat (Rat embryo fibroblast)  
RNA: Ribonucleic Acid  
RNR: Ribonucléotide réductase  
S.E: Erreur standard (Standard error)  
S: Sérine  
S: Phase S du cycle cellulaire; synthèse de l'ADN  
SDS: Sodium dodecyl sulfate  
SRE: Elément de réponse au sérum (Serum responsive élément)  
SRF: Facteur de réponse au sérum (Serum responsive factor)  
β: Beta  
SV40 T: Antigène grand T du virus simien 40  
(Simian virus 40 large T antigen)  
TCA: Acide trichloroacétique (Trichloroacetic acid)  
TK: Thymidine kinase  
Tris: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane  
TS: Thymidilate synthétase  
V: Valine

W: Tryptophane

Y: Tyrosine

$\mu$ : micro;  $1 \times 10^{-6}$

MEF: Fibroblastes embryonnaires de souris (Mouse embryo fibroblast)

VP1: Protéine virale 1 (Viral protein 1)

VP2: Protéine virale 2 (Viral protein 2)

VP3: Protéine virale 3 (Viral protein 3)

## REMERCIEMENTS

---

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, le Dr. Anne-Marie Mes-Masson, pour la confiance qu'elle a su me témoigner au cours des cinq dernières années, pour sa patience, sa disponibilité et la liberté qu'elle m'a accordée non seulement dans mon projet de recherche mais aussi à l'intérieur du laboratoire.

“I've tried to thank you along the way but if I didn't,  
let me thank you now”

*Leonard Cohen*

Je tiens à remercier le Dr Luke Masson pour les précieux conseils techniques qu'il a apporté à la réalisation de ce projet. De plus, j'aimerais souligner sa disponibilité et sa générosité pour la production de diapositives et de montages photographiques.

J'aimerais aussi remercier les techniciennes qui ont participé à la réalisation de ce projet de recherche, en particulier Manon Landy, Marie-Josée Milot et Louise Champoux. J'aimerais aussi remercier Chantal Corriveau de son aide précieuse à la bibliothèque de l'Institut du cancer.

Finalement, j'aimerais remercier Yves et Martin Pilon pour la mise en page de ce document et souligner particulièrement le travail de Yves Pilon qui en a réalisé toutes les illustrations.

## DÉDICACE

---

A ma complice, ma meilleure amie et mon épouse Carmen Voghel qui a su partager mes espoirs et mes rêves et sans qui rien n'aurait été possible.

### ONE BELIEVER

The winter trees stand naked. It's almost dark.

One man walk slowly, alone in the park.

His mind is full of visions only he can see,

And Lord, Lord, Lord, he sure looks like me

One Believer,

that's all he's praying for.

One Believer,

to open just one door.

*par Dennis Walker et John Cambell*

Carmen, merci d'avoir cru.

Pour Francis et Dominique sans qui rien n'aurait de sens.

## INTRODUCTION

---

Il existe plusieurs évidences suggérant que le cancer se développe par un processus impliquant plusieurs étapes. Ainsi l'analyse statistique de la fréquence de cancer en fonction de l'âge chez les humains nous indique que cinq ou six événements distincts sont nécessaires pour la formation d'une tumeur (Peto *et al.*, 1975). La nature séquentielle de la carcinogénèse est aussi suggérée par l'analyse d'échantillons obtenus durant la progression tumorale. L'analyse moléculaire de ces échantillons nous révèle que ces tumeurs sont généralement clonales à toutes les étapes, ce qui suggère que la progression tumorale est due à un événement génétique rare dans une seule cellule qui mène à l'étape suivante. Dans le modèle de progression tumorale le plus connu, celui du cancer du côlon, on a pu définir une série d'étapes progressant de l'hyperplasie au carcinome métastatique (Fearon et Vogelstein, 1990).

L'étude de cellules de rongeurs en culture nous indique que la transformation cellulaire *in vitro* est un processus qui requiert au moins deux événements distincts (Rassoulzadegan *et al.*, 1982) et coopératifs (Land *et al.*, 1983). Le premier événement, l'immortalisation cellulaire, permet à la cellule d'échapper à la sénescence et d'acquérir un potentiel de croissance indéfinie *in vitro*. Des événements additionnels, comme la coopération avec un deuxième oncogène, amèneront la transformation cellulaire complète, ce qui permet à la cellule d'acquérir des propriétés de croissance nettement tumorales ou néoplasiques. La progression tumorale a souvent été caractérisée par des essais d'immortalisation et de transformation *in vitro*. Ces études de complémentation *in vitro* ont mené à la classification des oncogènes en deux catégories: les oncogènes immortalisants et les oncogènes transformants (résumé par Weinberg 1985).

L'étude de souris transgéniques a aussi apporté plusieurs évidences suggérant que la coopération entre oncogènes est un phénomène qui se produit aussi *in vivo*. Les souris transgéniques exprimant un seul oncogène, sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique ou ubiquitaire, démontrent généralement une augmentation de l'incidence de cancer mais les tumeurs apparaissent normalement à un âge avancé. Au contraire, quand deux lignées de souris transgéniques portant

chacune un oncogène approprié sont croisées, l'apparition de tumeurs est souvent accélérée. Ces études suggèrent deux choses. Premièrement, le développement de tumeurs chez les souris porteuses d'un seul oncogène nécessite au moins un, et plus probablement plusieurs événements génétiques additionnels. Deuxièmement, les oncogènes exprimés dans les souris transgéniques de la première génération, F1, sont en mesure de coopérer *in vivo*. Ainsi, les lignées de souris transgéniques porteuses d'un seul oncogène nous fournissent un excellent modèle pour étudier la progression tumorale parce qu'elles nous permettent d'identifier les événements secondaires nécessaires à cette progression.

L'antigène grand T du virus du polyome murin est un oncogène immortalisant (Asselin et Bastin, 1985; Rassoulzadegan *et al.*, 1982; Rassoulzadegan *et al.*, 1983). On croit généralement que l'immortalisation cellulaire est une étape importante de la carcinogénèse (Newbold, 1985). Cette hypothèse découle des études sur le potentiel de réplication limité observé chez les fibroblastes humains en culture et des travaux avec des cellules primaires de rongeurs qui ont démontré que l'immortalisation, ou l'établissement, est une étape essentielle pour la transformation cellulaire. Puisque les événements mutationnels nécessaires à la carcinogénèse sont "fixés" dans le génome durant la réplication de l'ADN, il est raisonnable d'assumer que les événements permettant à la cellule d'acquérir un plus grand potentiel de prolifération peuvent contribuer à la carcinogénèse. Une des étapes critiques de la progression tumorale est donc pour la cellule normale d'échapper aux limites de prolifération imposées par le processus de sénescence. Ainsi, la compréhension des gènes et des mécanismes impliqués dans l'immortalisation cellulaire pourra nous donner des informations essentielles sur une des étapes critiques et peut-être limitantes de la carcinogénèse.

## 1.0 LE VIRUS DU POLYOME MURIN

### 1.1 HISTORIQUE

Le potentiel oncogénique du virus du polyome murin a d'abord été identifié par Ludwik Gross en 1953 (revue dans Gross, 1983). Le développement d'un système de culture du virus *in vitro* (Stewart *et al.*, 1958) a permis d'étudier sa structure et sa réplication. Ce système permettait la propagation du virus dans des cultures de cellules embryonnaires de souris et a permis de démontrer que le virus pouvait induire la formation de tumeurs dans plusieurs types d'organes d'où le nom polyome; du grec poly (plusieurs) ome (tumeurs). La possibilité de produire une grande quantité de virus du polyome murin *in vitro* a permis son analyse biochimique. Ces études ont démontré que la particule virale consiste en une molécule circulaire d'ADN double brin, associée aux histones produits par la cellule hôte pour former la chromatine virale, et qui est entourée d'une capsidie icosaédrale formée de 72 unités ou capsomères. Chaque capsomère est formé d'une protéine majeure de la capsidie, VP1, et de deux protéines mineures de la capsidie VP2 et VP3 (revue dans Tooze, 1980).

### 1.2 STRUCTURE DU VIRUS

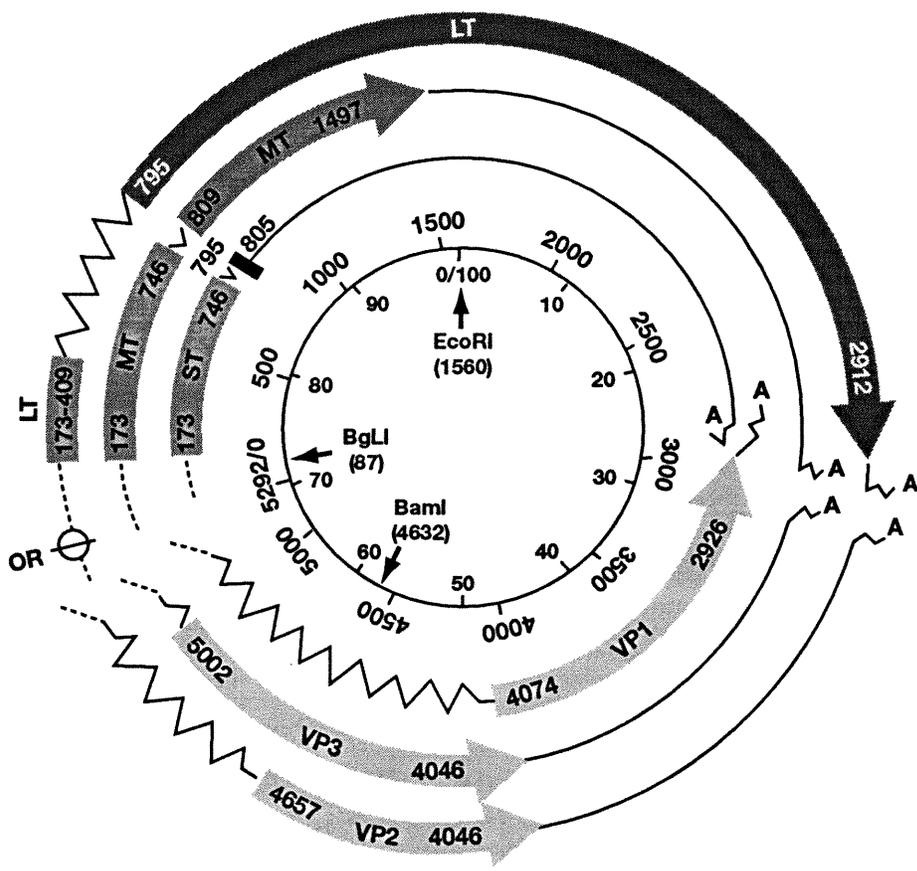
Le virus du polyome murin est un petit virus à ADN qui peut avoir deux types d'interactions avec les cellules sensibles. Le premier type d'interaction, le cycle lytique, amène la production de nouvelles particules virales et mène éventuellement à la mort cellulaire. Le cycle lytique du virus du polyome murin se produit dans les cellules de souris qui sont dites permissives. Le deuxième type d'interaction mène à la transformation néoplasique de la cellule qui peut alors continuer à se diviser dans des conditions qui inhibent la division cellulaire des cellules normales. *In vitro*, le virus du polyome murin peut transformer une variété de cellules de rongeurs et ces cellules transformées peuvent induire des tumeurs lorsque transplantées dans des animaux immunodéficients. L'infection par le virus du polyome se retrouve de façon endémique dans une grande proportion de souris autant sauvages (Rowe *et al.*, 1961) que chez les souris de laboratoire. Ces souris ne démontrent cependant aucun symptôme pathologique lié à l'infection virale.

La séquence complète du génome viral de la souche A2 a été déterminée et contient 5297 paires de bases (Soeda *et al.*, 1980). Le génome du virus du polyome murin peut être divisé en deux parties: la partie codant pour les protéines exprimées de façon précoce lors de l'infection virale et la partie codant pour les protéines exprimées de façon tardive et est illustré à la figure 1. La région codant pour les protéines exprimées de façon précoce code pour trois protéines: les antigènes grand T, moyen T et petit T. Ces antigènes T sont produits à partir d'un seul ARNm épissé de façon différentielle. Leurs séquences ont été établies de façon précise après que les ADNc, codant pour les messagers de la région précoce, furent clonés et séquencés (Rassoulzadegan *et al.*, 1982; Treisman *et al.*, 1981; Tyndall *et al.*, 1981). La transcription, l'épissage différentiel et la traduction des ARNs messagers ont pour effet de produire trois protéines contenant les mêmes acides aminés en position N-terminale. Les trois protéines commencent au même codon d'initiation (entre les nucléotides 173 et 175 selon la nomenclature de Soeda *et al.*, 1978) et partagent initialement le même cadre de lecture. L'antigène grand T partage le même cadre de lecture que les antigènes moyen T et petit T jusqu'au nucléotide 409 ce qui a pour effet de produire trois protéines partageant les mêmes 79 premiers acides aminés.

La capacité du virus du polyome murin à induire la synthèse de l'ADN durant l'infection lytique est une observation qui a retenu l'attention des chercheurs depuis fort longtemps (Dulbecco *et al.*, 1965). Puisqu'un virus du polyome murin mutant, codant pour une seule protéine de la région précoce, l'antigène grand T, est en mesure d'induire la répllication de l'ADN cellulaire (Schlegel et Benjamin, 1978), l'antigène grand T semble jouer un rôle central dans ce processus. La capacité de l'antigène grand T du virus du polyome à induire la synthèse de l'ADN se manifeste aussi dans d'autres contextes. La protéine peut aussi immortaliser des cellules primaires de façon dépendante à son interaction avec le produit du gène suppresseur du rétinoblastome (pRb) (Larose *et al.*, 1991). Mais, l'interaction entre l'antigène grand T et pRb n'est probablement qu'un des points d'intégration entre le cycle de vie du virus et de l'induction du cycle cellulaire par le virus qui finissent par se chevaucher. D'autres points pourraient inclure l'habileté des particules virales ou des protéines VP1 de la capsidie à induire l'expression de gènes de la réponse immédiate comme *c-myc* et *c-fos* (Zullo *et al.*, 1987). De plus, la capacité des antigènes moyen T et petit T d'induire des gènes de la réponse précoce (Glenn et Eckhart, 1990; Schonthal *et al.*, 1992;

**FIGURE 1****CARTE DU GÉNOME DU VIRUS DU POLYOME MURIN**

Cette carte du génome du virus du polyome a été établie à partir des coordonnées de Soeda et al., (1980). Le génome viral peut être divisé en deux parties qui peuvent être séparées par la région contenant l'origine de réplication. La première région code pour les protéines qui sont exprimées de façon précoce au cours de l'infection virale et qui comprend les antigènes grand, moyen et petit T. La deuxième région code pour les protéines exprimées plus tard au cours de l'infection et comprend les protéines de la capsid: les protéines VP1, VP2 et VP3.



Zullo *et al.*, 1987) et le rôle de l'antigène moyen T dans la phosphorylation de la protéine VP1 et l'assemblage du virus (Garcea *et al.*, 1985; Garcea et Benjamin, 1983) jouent aussi un rôle dans la modulation du cycle cellulaire par le virus du polyome murin.

### 1.3 L'ANTIGÈNE GRAND T DU VIRUS DU POLYOME MURIN

L'antigène grand T du virus du polyome murin est une phosphoprotéine nucléaire de 785 acides aminés et dont le poids moléculaire varie de 90 à 100 kDa (Tooze, 1980). La protéine est impliquée dans plusieurs processus après l'infection virale dont la stimulation de la synthèse de l'ADN de la cellule hôte, l'initiation de la réplication de l'ADN viral, la répression de l'expression des gènes codés par la région précoce et la transition de l'expression des protéines codées par la région précoce vers celles codées par la région tardive. De plus, l'antigène grand T du virus du polyome est impliqué dans l'intégration, l'excision et l'amplification de l'ADN viral dans le chromosome de la cellule hôte lors des infections menant à la transformation néoplasique (Fried et Prives, 1986).

#### 1.3.1 Analyse des domaines fonctionnels de l'antigène grand T du virus du polyome murin

Les analyses génétiques et biochimiques de l'antigène grand T du virus du polyome murin ont démontré que cette protéine est multifonctionnelle et composée de plusieurs domaines distincts. L'initiation de la réplication de l'ADN viral *in vivo* et *in vitro* nécessite deux éléments: l'antigène grand T et une région de 95 paires de bases du génome viral, l'origine de réplication (Francke et Eckhart, 1973). L'antigène grand T de polyome lie la séquence consensus 5'-G(A/G)GGC-3' dont on retrouve plusieurs copies dans l'origine de réplication (Cowie et Kamen, 1984; Pomerantz et Hassell, 1984; Scheller et Prives, 1985). Cowie et al (1986) ont démontré que l'introduction de mutations dans le domaine de liaison à l'ADN viral rendait les antigènes grand T mutants incapables de lier et de répliquer l'ADN viral mais n'affectait pas leur efficacité d'immortaliser des cultures primaires de cellules embryonnaires de rat (Cowie et al., 1986).

L'antigène grand T de polyome possède aussi une activité hélicase dépendante de l'ATP qui permet à la protéine de dérouler l'ADN double brin (Wang et Prives, 1991). De plus, on y retrouve un domaine ATPase qui est le domaine le plus conservé parmi les virus du polyome (Pipas, 1992). Ce domaine contient le motif consensus GXXXXGK qui a été associé à la liaison de nucléotides chez plusieurs protéines.

L'antigène grand T du virus du polyome joue un rôle important dans la l'immortalisation de cellules primaires et est en mesure de coopérer avec plusieurs autres oncogènes, dont *ras* et moyen T, pour induire leur transformation complète (Land *et al.*, 1983; Rassoulzadegan *et al.*, 1983). L'antigène grand T de polyome est cependant incapable de transformer des cellules par lui-même. Les cellules immortalisées par l'antigène grand T de polyome ont donc un phénotype normal tel que défini par leur capacité à se diviser à faible densité de saturation et d'être dépendantes de la présence d'un support pour se diviser. Cependant les cellules immortalisées par l'antigène grand T de polyome ont la caractéristique de pouvoir croître dans un milieu à faible concentration de sérum, ce qui est une caractéristique inhabituelle pour les cellules spontanément immortalisées comme par exemple les cellules NIH 3T3. Des résultats similaires ont été obtenus en transfectant un antigène grand T du virus du polyome ne codant que pour que la région N-terminale de la protéine. Ainsi, un antigène grand T tronqué, ne comprenant que les 334 premiers acides aminés, est suffisant pour immortaliser des cultures primaires de cellules de souris ou de rat (Rassoulzadegan *et al.*, 1983). Ces résultats ont suggéré que l'activité immortalisante de l'antigène grand T de polyome réside dans la partie N-terminale de la protéine. Par la suite, on a déterminé que les 219 premiers résidus de l'antigène grand T étaient suffisants pour immortaliser des cellules embryonnaires de rat (Asselin et Bastin, 1985). Le même groupe a par la suite examiné la corrélation entre l'activité immortalisante et l'activité trans-activatrice de promoteurs viraux d'une série d'antigènes grand T mutants contenant des délétions dans l'exon 2, qui contient entre autre la CR2 (Larose *et al.*, 1990). Ces travaux ont permis de démontrer que l'habileté à trans-activer des promoteurs viraux n'est pas suffisante pour conférer à l'antigène grand T du virus du polyome la capacité d'immortaliser des cultures primaires de cellules embryonnaires de rat. Finalement, la délétion des acides aminés 141-146, qui correspond en fait au coeur de la séquence de liaison à pRb, abolit l'activité immortalisante de la protéine mutante sans affecter son habileté à trans-activer les promoteurs tardifs de polyome et du virus simien 40 (SV40).

A la même époque, les travaux effectués sur les protéines E1A et l'antigène grand T de SV40 ont impliqué la liaison de ces oncoprotéines virales au produit du gène suppresseur du rétinoblastome dans leurs activités oncogéniques. Le groupe de Bastin *et al.*, (1991) a par la suite démontré que l'immortalisation de cellules embryonnaires de rat dépendait de la liaison de l'antigène grand T du virus du polyome à pRb (Larose *et al.*, 1991). Dans cette étude, les auteurs ont ciblé les régions CR1 et CR2 dont l'importance dans le processus d'immortalisation avait été démontrée pour la protéine E1A d'adénovirus et l'antigène grand T de SV40. Cette étude a démontré que la délétion des résidus 141 à 146 abolissait toute liaison à pRb *in vitro* et l'activité immortalisante de la protéine *in vivo*. Il est intéressant de noter que la délétion des acides aminés 152-155, qui affecte la région entre le coeur de la séquence de liaison à pRb et le premier résidu du motif potentiel de phosphorylation par la kinase à caséine II (CKII) (serine-155) diminue la fréquence d'immortalisation de l'antigène grand T mutant à environ 40% de la fréquence de l'antigène grand T sauvage. Cet antigène grand T mutant code pour une protéine stable qui est en mesure de lier pRb *in vitro*. Quand à la délétion des résidus 149 à 176, qui élimine entièrement le motif potentiel de phosphorylation par la CKII sans toucher au coeur de la séquence de liaison à pRb, elle abolit complètement l'activité immortalisante de la protéine. Malheureusement, les auteurs n'ont pas vérifié si cet antigène grand T mutant code pour une protéine stable et s'il est en mesure de lier pRb *in vitro*. Il est donc impossible de déterminer si ce mutant est incapable d'immortaliser des cultures primaires de cellules embryonnaires de rat parce qu'il n'est pas en mesure de lier pRb ou si le motif potentiel de phosphorylation par la CKII joue un rôle dans l'immortalisation cellulaire.

Un fragment N-terminal de 219 acides aminés de l'antigène grand T du virus du polyome murin est suffisant pour immortaliser des cellules embryonnaires de rat (Asselin et Bastin, 1985). Cependant, ce fragment possède une activité immortalisante réduite correspondant à seulement 22% de l'activité de l'antigène grand T sauvage (Asselin et Bastin, 1985). Holman *et al.*, (1994) ont caractérisé un fragment N-terminal contenant les premiers 259 acides aminés de l'antigène grand T du virus de polyome (Holman *et al.*, 1994). Ce fragment N-terminal de 259 acides aminés est suffisant pour immortaliser des cultures primaires de cellules embryonnaires de rat mais à une fréquence correspondant à 60% de l'activité de la

protéine complète. Ces résultats permettent cependant de démontrer que le domaine de liaison à l'ADN, qui est situé entre les acides aminés 282-398 (Sunstrom *et al.*, 1991) n'est pas nécessaire pour l'immortalisation cellulaire. Cette étude a aussi permis de démontrer que le même fragment N-terminal de l'antigène grand T du virus du polyome est en mesure de lier pRb et p107. La région impliquée dans la liaison de ces deux protéines n'a cependant pas été déterminée précisément. Il est cependant intéressant de noter que l'antigène grand T complet lie quatre fois plus de pRb et 10 fois plus de p107 que le fragment N-terminal de 259 acides aminés. Ces derniers résultats suggèrent que la conformation de la protéine ou que d'autres séquences de l'antigène grand T du virus de polyome pourraient aussi jouer un rôle dans sa liaison avec pRb. La formation de complexes protéiques de hauts poids moléculaires pourrait être importante pour atteindre la pleine activité immortalisante de l'antigène grand T de polyome, ce qui serait impossible pour les protéines tronquées amputées de leur motif de doigt de zinc. Par ailleurs, le motif de doigt de zinc pourrait aussi contribuer à la dissociation du complexe pRb/E2F comme c'est le cas pour la protéine E7 du virus du papillome humain (HPV) de type 16 (Jewers *et al.*, 1992).

### 1.3.2 Autres cibles potentielles: p130 et p300

Les protéines E1A d'adénovirus, l'antigène grand T de SV40 et la protéine E7 de HPV16 sont en mesure de lier les trois protéines de la famille de pRb; pRb, p107 et p130 (Ewen *et al.*, 1991; Whyte *et al.*, 1988). La liaison de p107 et de p130 à l'antigène grand T de SV40 et à la protéine E1A d'adénovirus semble impliquer la région conservée 2 (CR2) (Barbeau *et al.*, 1994; Corbeil et Branton, 1994; Dyson *et al.*, 1989; Ewen *et al.*, 1989). La liaison de p300 à ces deux mêmes protéines impliquerait quant à elle la région conservée 1 (CR1). Puisque l'antigène grand T du virus du polyome murin démontre une grande homologie de séquence avec les autres oncoprotéines virales dans les domaines impliqués dans la liaison à ces protéines, il est possible qu'il puisse aussi lier ces protéines.

#### 1.4 ACTIVATION DE GÈNES IMPLIQUÉS DANS LA SYNTHÈSE DE L'ADN ET À LA PRODUCTION DES ENZYMES NÉCESSAIRES AUX PRÉCURSEURS PAR L'ANTIGÈNE GRAND T DU VIRUS DU POLYOME

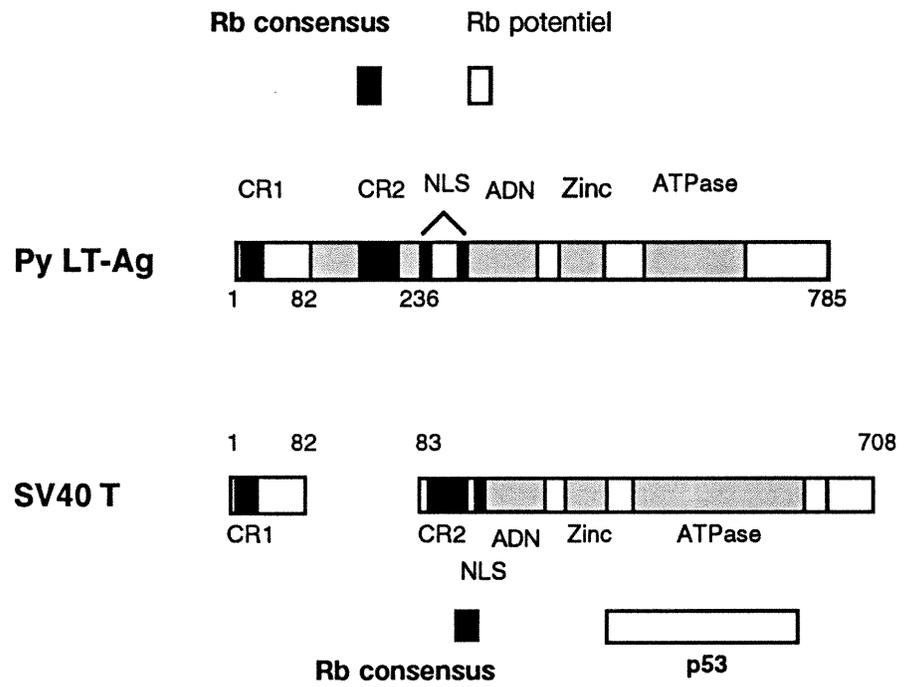
L'induction de l'expression de l'antigène grand T sous le contrôle du promoteur MMTV, inducible par les hormones stéroïdiennes, dans des fibroblastes de souris "Swiss 3T3" a permis de démontrer que la protéine virale pouvait transactiver de façon coordonnée la transcription de cinq gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN ou dans la production d'enzymes nécessaires à la synthèse de précurseurs (Mudrak *et al.*, 1994). On a ainsi démontré que les gènes codant pour la dihydrofolate réductase (DHFR), la thymidine kinase (TK), la thymidilate synthétase (TS), la polymérase à ADN alpha et l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) pouvaient être stimulés à la frontière G1/S du cycle cellulaire par l'induction de l'expression de l'antigène grand T de polyome. De façon intéressante, une lignée cellulaire codant pour une forme mutante de l'antigène grand T de polyome (Glu-146-Asp) est incapable de lier le produit du gène suppresseur du rétinoblastome ou d'induire l'expression de ces mêmes gènes. Le promoteur de trois de ces gènes, ceux codant pour la DHFR, la TK et la polymérase à ADN-alpha, possèdent des sites de liaison pour le facteur de transcription E2F ce qui suggère que la formation de complexes avec le facteur de transcription E2F est une cible pour l'antigène grand T de polyome dans sa régulation du cycle cellulaire.

#### 1.5 SIMILARITÉS ET DIFFÉRENCES ENTRE LES ANTIGÈNES GRAND T DE POLYOME ET DE SV40

L'antigène grand T du polyome est très similaire à l'antigène grand T de SV40 en terme de séquence et de fonction. Les deux protéines partagent une homologie au niveau de la séquence d'acides aminés d'environ 60% (Soeda *et al.*, 1980). Ils sont tous deux nécessaires pour la répllication de l'ADN viral, possèdent une activité de liaison à l'ADN (Scheller et Prives, 1985), une activité ATPase (Clertant *et al.*, 1984) et une activité hélicase (Wang et Prives, 1991) similaire. Il existe aussi une importante conservation de l'organisation et de la nature des différents domaines fonctionnels intrinsèques aux deux protéines qui sont illustrés à la figure 2. Des différences importantes peuvent cependant être observées. L'antigène grand T de polyome possède une séquence de 154 acides aminés qui lui est unique. De plus, le domaine de liaison à pRb, dans la CR2, se retrouve dans une position qui n'est pas équivalente à la position du domaine de liaison à pRb de SV40.

**FIGURE 2****REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DOMAINES FONCTIONNELS DES ANTIGÈNES GRAND T DE SV40 ET DU VIRUS DU POLYOME MURIN**

Cette figure illustre la conservation de la nature et de la structure des domaines fonctionnels à l'intérieur des antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome. Une homologie importante existe entre les deux protéines et dépend de l'introduction d'un espace dans l'antigène grand T de SV40 afin d'accommoder une séquence de 154 acides aminés unique à l'antigène grand T du virus du polyome murin. CR1: région conservée 1; CR2: région conservée 2; NLS: signal de localisation nucléaire; Zinc: domaine du doigt de zinc; ATPase: domaine ATPase; ADN: domaine de liaison à l'ADN.



Malgré le fait que les deux protéines démontrent une certaine ressemblance, elles possèdent des activités oncogéniques très différentes. L'antigène grand T de SV40 est non seulement capable d'immortaliser des cellules primaires mais il est aussi en mesure de les transformer (Caldas *et al.*, 1994; Colby et Shenk, 1982; Jat et Sharp, 1986) tandis que l'antigène grand T du virus du polyome est seulement en mesure de les immortaliser (Livingston et Bradley, 1987). La liaison de deux protéines cellulaires, p53 et pRb, a été impliquée dans l'activité transformante de l'antigène grand T de SV40 (DeCaprio *et al.*, 1988; Peden *et al.*, 1989). Cependant, un antigène grand T mutant, contenant seulement les 147 premiers acides aminés est en mesure de transformer des cellules primaires en culture même s'il est incapable de lier p53 (Sompayrac et Danna, 1991). De plus, des protéines hybrides contenant la portion N-terminale de l'antigène grand T du virus du polyome murin et la portion C-terminale de l'antigène grand T de SV40 sont incapables de transformer des cellules primaires en culture malgré le fait qu'elles puissent lier pRb et p53 (Manfredi et Prives, 1990). Le résultat de ces expériences et ceux rapportés dans la littérature suggèrent donc que la liaison de pRb et de p53 est nécessaire mais non suffisante pour induire la transformation complète de cellules primaires.

L'expression d'un antigène grand T hybride PyT<sub>1-521</sub>-SVT<sub>336-708</sub>, contenant la portion N-terminale de grand T du virus du polyome murin (1-521) et la portion C-terminale de l'antigène grand T de SV40 (336-708) modifie les caractéristiques de croissance de cellules primaires de rat (Manfredi et Prives, 1993). Cette construction hybride est capable d'immortaliser des fibroblastes embryonnaires de rat. L'analyse de lignées cellulaires établies dérivées de cellules transfectées avec cet antigène grand T hybride a révélé qu'elles possédaient des caractéristiques de croissance différentes. Si ces lignées cellulaires ne sont pas en mesure de former des foyers, elles sont cependant capables de proliférer dans un milieu pauvre en sérum et d'atteindre de fortes densités de saturation. Ces cellules sont aussi capables de former des colonies en milieu semi-solide mais les colonies sont beaucoup plus petites que les colonies formées par des cellules transformées par l'antigène grand T de SV40 sauvage. Manfredi et Prives (1993) suggèrent que la portion N-terminale de la protéine hybride, qui contient les 521 premiers acides aminés de l'antigène grand T du virus du polyome murin, ne possède pas toutes les

fonctions ou activités biochimiques qui sont nécessaires pour induire la transformation complète des cellules primaires de rat. Mais, il est aussi possible que la différence de potentiel oncogénique entre les antigènes grand T du virus du polyome murin et de SV40 découlent de leurs domaines de liaison à pRb qui possèdent des structures similaires mais qui ne sont pas identiques.

## 2.0 CARCINOGENÈSE VIRALE

Les petits virus à ADN partagent plusieurs caractéristiques qui reflètent leurs besoins de répliquer leurs propres génomes indépendamment des restrictions qui régissent la répllication de l'ADN de la cellule hôte. Ces virus ont développé une stratégie commune qui leur permet d'exploiter les processus métaboliques de base de la cellule en interagissant et contrôlant les mécanismes de régulation du cycle cellulaire. A cause de leur cycle de vie intimement lié à celui de la cellule et de l'intérêt scientifique à propos des mécanismes régissant la répllication de l'ADN, du contrôle de la transcription, du métabolisme de l'ARN et de la carcinogénèse, les petits virus à ADN ont été et restent un outil puissant nous permettant d'analyser et de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire.

Même si ces virus sont très différents, ils partagent tous la propriété de coder pour une ou plusieurs oncoprotéines virales capables de perturber le contrôle du cycle cellulaire et d'induire la synthèse de l'ADN. Ainsi, la protéine E1A d'adénovirus, la protéine E7 du virus du papillome humain et les antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome murin ont toutes été impliquées dans la modulation des processus métaboliques de base de la cellule et la transformation cellulaire (DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1988). Les oncoprotéines virales sont des molécules complexes composées de plusieurs domaines fonctionnels distincts qui sont caractérisés par leurs activités biochimiques propres. Ces protéines fonctionnent en partie en ciblant les régulateurs les plus importants du cycle cellulaire et en s'associant à eux par contact direct protéine-protéine. Les oncoprotéines virales ciblent en particulier le produit de gènes suppresseurs tel pRb et de p53; les autres protéines de la famille de pRb, p107 et p130; les cyclines A et E; et la kinase cdk2 (DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989; Faha *et al.*, 1993; Giordano *et al.*, 1989; Pines et Hunter, 1990; Whyte *et al.*, 1988).

## 2.1 FORMATION DE COMPLEXES SPÉCIFIQUES ENTRE LES ONCOPROTÉINES VIRALES ET pRb

La protéine E1A d'adénovirus, la protéine E7 du virus du papillome humain et les antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome murin lient la forme sous-phosphorylée de pRb, qui est sa forme active retrouvée en phase G0 et G1 (DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989; Harlow *et al.*, 1986; Larose *et al.*, 1991). Cette interaction a pour effet d'inactiver la fonction de pRb d'une façon similaire à l'effet d'une mutation ou d'une délétion que l'on retrouve fréquemment dans différents types de cancers humains (Cobrinik *et al.*, 1992; Goodrich et Lee, 1993). De façon plus importante, cette interaction est nécessaire pour l'habileté de certaines de ces protéines virales à induire la transformation cellulaire dans les cellules susceptibles (Chen et Paucha, 1990; Cherington *et al.*, 1988; DeCaprio *et al.*, 1988; Lillie *et al.*, 1987; Moran, 1988; Moran et Mathews, 1987; Whyte *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989). De plus, les oncoprotéines mutantes des virus à ADN oncogènes ayant perdu leur capacité à former des complexes avec pRb ont toutes un potentiel transformant diminué, ce qui suggère que la liaison à pRb est critique pour leur activité oncogénique (résumé dans Cobrinik *et al.*, 1992; Goodrich et Lee, 1993). L'activité transformante de ces oncoprotéines virales dépend donc, en partie, de leur capacité à lier le produit du gène suppresseur du rétinoblastome, pRb.

L'analyse de l'interaction des différentes oncoprotéines virales avec pRb nous a permis de cerner la relation existante entre la carcinogénèse virale, la progression tumorale et la régulation du cycle cellulaire. Les premières études ont démontré que la protéine E1A pouvait former un complexe stable avec pRb et que la formation de ce complexe était dépendante de séquences distinctes à l'intérieur de la protéine nécessaires à la transformation cellulaire (Whyte *et al.*, 1988). Par la suite, d'autres études ont démontré que l'antigène grand T de SV40 (DeCaprio *et al.*, 1988) et la protéine E7 de HPV (Münger *et al.*, 1989) formaient aussi des complexes similaires avec pRb, et que la formation de ces complexes dépendait aussi de séquences nécessaires pour leurs activités oncogéniques.

Les séquences de la protéine E1A d'adénovirus impliquées dans la liaison à pRb sont essentielles pour l'immortalisation de cellules primaires en culture et pour sa capacité à coopérer avec d'autres oncogènes. Ces mêmes séquences ont été impliquées dans la

dissociation du complexe pRb/E2F (Chellappan *et al.*, 1991). Ces résultats suggèrent que l'interaction de pRb avec E2F est importante pour contrôler la prolifération cellulaire et que la dissociation du complexe pRb/E2F est un mécanisme par lequel E1A est en mesure d'inactiver la fonction de pRb. Plusieurs études ont démontré que pour la protéine E1A et l'antigène grand T de SV40, les CR1 et CR2 étaient nécessaires pour la dissociation du complexe pRb/E2F. Les régions impliquées dans la dissociation du complexe pRb/E2F par la protéine E7 de HPV16 semblent plutôt impliquer la CR2 et des séquences situées en position N-terminale induisant une partie d'un motif de doigt de zinc et formant la région conservée 3 (CR3) (Jewers *et al.*, 1992). Cependant, les CR1, CR2 et la CR3 de la protéine E1A, des antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome murin et de la protéine E7 des HPV16 et 18, ont aussi toutes été impliquées dans l'immortalisation ou la transformation cellulaire. Nous allons donc tout d'abord décrire l'organisation de ces régions et leurs importances pour l'activité oncogénique de ces différentes protéines.

### 2.1.1 Régions conservées, immortalisation et transformation cellulaire

Pour la protéine E1A d'adénovirus, on a démontré que la séquence d'acides aminés de deux régions différentes est nécessaire pour l'activité transformante du virus (Halley *et al.*, 1984; Moran et Zerler, 1988; Moran *et al.*, 1986; Subramanian *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1988; Zerler *et al.*, 1986). Ces séquences ne sont pas continues (Whyte *et al.*, 1989) et elles ont été désignées région conservée 1 et 2 (CR1 et CR2). Ces séquences sont essentielles pour la formation de complexes stables entre E1A et diverses protéines cellulaires dont pRb, p107, p130, p300, la cycline A et cdk2 (Ewen *et al.*, 1991; Pines et Hunter, 1990; Tsai *et al.*, 1991; Whyte *et al.*, 1988). Des séquences d'acides aminés homologues à ces deux régions de la protéine E1A ont été identifiées dans plusieurs autres oncoprotéines virales, entre autre chez les protéines E7 des différents types de HPV et les antigènes grand T des différents virus de polyome de primates (tel que SV40, BKV et JCV) et de rongeurs (virus du polyome murin et de hamster) (Barbosa *et al.*, 1990; DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989; Figge *et al.*, 1988; Phelps *et al.*, 1988).

Les séquences d'acides aminés conservées importantes pour une liaison de haute affinité de E1A à pRb sont situées entre les résidus 30-60 (CR1) et 120-127 (CR2) (Egan *et al.*, 1989; Egan *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989). Les CR1 et CR2 de E1A ne contribuent pas également à la liaison à pRb (Egan *et al.*, 1988). La protéine mutante

E1A où la CR2 a été déléetée est incapable de coimmunoprécipiter avec pRb chez des cellules infectées par le virus (Egan *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989). Cependant la protéine E1A mutante dont la CR1 a été déléetée est encore en mesure de coimmunoprécipiter avec pRb, mais à un niveau fortement réduit (Egan *et al.*, 1988; Whyte *et al.*, 1989). En utilisant des peptides synthétiques correspondant aux CR1 et CR2 de la protéine E1A d'adénovirus, on a démontré que chacune de ces régions peut lier pRb de façon indépendante. (Dyson *et al.*, 1992). Ces interactions ont été analysées dans des essais de compétition et de liaison *in vitro*. Dans les deux types d'essais, on a pu démontrer que la CR2 lie pRb avec une plus grande affinité que la CR1. Cependant un peptide contenant le CR1 et le CR2 démontre une plus forte affinité pour pRb. De plus, les essais de compétition suggèrent que les CR1 et CR2 sont des points de contact entre la protéine E1A et pRb (Dyson *et al.*, 1992).

### 2.1.2 Région conservée 1 (CR1)

La séquence consensus de la CR1 de la protéine E1A d'adénovirus consiste en la séquence E-X-X-X-L-X-X-L. On retrouve une séquence similaire, la séquence L-X-X-L-L, qui est conservée dans tous les antigènes grand T des virus du groupe du polyome (voir figure 3). Chez l'antigène grand T de SV40 cette séquence correspond aux acides aminés 9 à 19, une région qui a été impliquée dans l'activité transformante de la protéine (Peden *et al.*, 1990; Yaciuk *et al.*, 1991). Un antigène grand T de SV40, contenant les acides aminés 82-708, peut lier pRb, p107 et p53 mais est quand même incapable de transformer des cellules en culture. Par contre, l'antigène petit T est en mesure de compléter cette fonction (Montano *et al.*, 1990). La CR1 de la protéine E1A d'adénovirus est en mesure de lier la protéine cellulaire p300 qui est nécessaire à son activité oncogénique (Whyte *et al.*, 1989). Yaciuk *et al.*, (1991) ont démontré que l'antigène grand T de SV40 est en mesure de compléter en *trans* un mutant de la protéine E1A incapable de lier p300 pour restaurer son activité transformante. Cette complémentation est abolie par la déléetion des acides aminés 17-27 de grand T de SV40. Ces résultats suggèrent que l'antigène grand T de SV40 est aussi en mesure d'interagir avec la protéine p300.

L'antigène grand T du virus du polyome murin contient aussi cette CR1 mais elle a été peu caractérisée. Cette séquence conservée se retrouve aussi entre les acides aminés 9 et 19. On a démontré que la déléetion des acides aminés 13 à 17, ou

**FIGURE 3****ALIGNEMENT DES SÉQUENCES DE LA CR1 D'ONCOPROTÉINES DE  
DIFFÉRENTS VIRUS À ADN ONCOGÈNES**

Cette figure illustre la conservation de la CR1 que l'on retrouve chez différentes oncoprotéines de virus à ADN oncogènes. Les acides aminés conservés apparaissent en caractères gras et la séquence consensus est notée au bas de la figure. E1A: protéine E1A d'adénovirus de type 5; E7: protéine E7 de HPV16; SV40: antigène grand T du virus simien 40; BKV: antigène grand T du virus BK; JCV: antigène grand T du virus JC; LPV: antigène grand T du virus du polyome lymphotropique; PyV: antigène grand T du virus du polyome murin; HaPV: antigène grand T du virus du polyome de hamster. Cons: séquence consensus.

**E1A** 39 **EPPTLHEL**YDL 49  
**E7** 4 **DTPTLHEYMLDL** 15  
  
**SV40** 9 **ESLQLMDLLGLERSAWGNIP**LM 30  
**BKV** 9 **ESMELMDLLGLERSAWGNLP**LM 30  
**JCV** 9 **ESMELMDLLGLDRSAWGNIP**VM 30  
**LPV** 9 **ERNELMDLLQITRAAWGNLS**MM 30  
  
**PyV** 9 **DKERLLELLKLPRQLWGDF**GRM 30  
**HaPV** 9 **EKQALISLLDLEPQYWGDY**GRM 30  
  
**Cons.** **EXXXLXELXXL**  
**D D I**

la substitution des résidus Leu-13 ou Leu-16 pour une valine, avait pour effet de diminuer considérablement ou d'abolir l'activité immortalisante de la protéine sans affecter grandement la liaison à pRb (Larose *et al.*, 1991). Les auteurs suggèrent que la liaison à pRb est essentielle mais non suffisante pour l'activité immortalisante de la protéine. Aucune interaction entre l'antigène grand T de polyome et p300 n'a cependant été rapportée jusqu'à présent dans la littérature.

### 2.1.3 Région conservée 2 (CR2)

La CR2 contient une séquence d'environ 10 acides aminés que l'on retrouve dans toutes les oncoprotéines virales et chez quelques protéines cellulaires liant pRb (figure 4). Les cyclines de type D, par exemple, contiennent aussi ce motif (Dowdy *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1993). Au coeur de cette région, on retrouve la séquence conservée L-X-C-X-E (DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989; Figge *et al.*, 1988; Phelps *et al.*, 1988). On a démontré que cette séquence est essentielle pour l'interaction entre le produit du gène suppresseur du rétinoblastome et la protéine E7 de différents types de HPV, la protéine E1A d'adénovirus, et des antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome murin (Dyson et Harlow, 1992; Imai *et al.*, 1991; Larose *et al.*, 1991; Ludlow *et al.*, 1989).

La CR2 de la protéine E1A et de l'antigène grand T de SV40 sont des points de contact pour pRb (DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1992). Pour la protéine E1A d'adénovirus, la délétion des acides aminés 122 à 129, soit le coeur de la séquence de liaison à pRb, résulte dans l'abolition du virus à induire des foyers dans des cultures de cellules de rein de souris (Whyte *et al.*, 1988).

La séquence consensus se retrouve entre les résidus 102-107 de l'antigène grand T de SV40 et est présente dans tous les antigènes grand T des virus du polyome à l'exception du virus BFDV (Pipas, 1992). On a démontré que les antigènes grand T de SV40, de BKV, de JCV et du virus du polyome murin formaient des complexes stables avec pRb *in vitro* (Dyson *et al.*, 1990) ou *in vivo* (DeCaprio *et al.*, 1988; Khandjian et Tremblay, 1992; Resnick-Silverman *et al.*, 1991).

**FIGURE 4****ALIGNEMENTS DES SÉQUENCES DE LA CR2 D'ONCOPROTÉINES DE  
DIFFÉRENTS VIRUS À ADN ONCOGÈNES**

Cette figure illustre la conservation de la CR2 que l'on retrouve chez différentes oncoprotéines de virus à ADN oncogènes. La CR2 est divisée en trois motifs: le coeur de la séquence de liaison à pRb qui est constitué des résidus **D/N-L-X-C-X-E**, la région flanquant le coeur de la séquence consensus de liaison à pRb contenant de 3 à 8 acides aminés et le motif de phosphorylation par la CKII qui contient la séquence minimale reconnue par l'enzyme **S/T-X-X-D**. Les acides aminés conservés du coeur de la séquence consensus de liaison à pRb apparaissent en caractères gras à l'intérieur de la boîte grise foncée. La séquence reconnue par la CKII apparaît à l'intérieur de la boîte grise pâle et les résidus pouvant être phosphorylés sont en caractères gras.

		Coeur	Séquence flanquante	Motif CKII		
<b>E1A</b>	120	I	<b>DLTCHE</b>	AGFPP	<b>SDDEDE</b>	137
<b>E7</b>	20	T	<b>DLICYE</b>	QLND	<b>SSEEEDE</b>	37
<b>SV40</b>	101	E	<b>NLFCSE</b>	EMP	<b>SSDDEAT</b>	117
<b>BKV</b>	103	E	<b>DLFCHE</b>	DMFA	<b>SDEEAT</b>	119
<b>JCV</b>	103	E	<b>DLFCHE</b>	EMFA	<b>SDDENT</b>	119
<b>LPV</b>	129	D	<b>DLFCSE</b>	TMSS	<b>SSSDEDT</b>	145
<b>PyV</b>	140	P	<b>DLFCYE</b>	EPLLSPNP	<b>SSPTDTP</b>	161
<b>HaPV</b>	128	E	<b>DLTCQE</b>	ELSS	<b>SSEDEFT</b>	144
<b>pRb cons.</b>			<b>DLXCXE</b>			
			<b>N</b>			
<b>CKII cons.</b>				<b>SXXXD</b>		
				<b>T</b>		

#### 2.1.4 Motif de phosphorylation par la kinase à caséine II (CKII)

Le coeur de la séquence de liaison à pRb des oncoprotéines virales E1A d'adénovirus de type 5, des protéines E7 de la plupart des types de HPV, et les antigènes grand T de tous les virus du groupe des virus du polyome est flanqué d'un motif de phosphorylation par la CKII (figure 4). La CKII est une kinase dont l'activité est indépendante des nucléotides cycliques et du calcium et qui est en mesure de phosphoryler les sérines et les thréonines présentes sur différentes protéines (Blumenthal *et al.*, 1987). La CKII est une enzyme exprimée de façon ubiquitaire que l'on retrouve dans le cytoplasme et dans le noyau (Hathaway et Traugh, 1982). La CKII est en mesure de phosphoryler plus de 100 substrats différents dont plusieurs ont été impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et de la transduction des signaux (revue par Allende et Allende, 1995). La CKII phosphoryle entre autre plusieurs facteurs de transcription (*c-myc*, *c-myb*, le SRE, *N-myc*, *c-jun*), les gènes suppresseurs pRb et p53, les kinases p34cdc2 et PKC, les oncoprotéines virales E1A, E7 et l'antigène grand T de SV40. La CKII phosphoryle plusieurs protéines nucléaires, incluant les topoisomérases à ADN de type I et II (Ackerman *et al.*, 1985; Durban *et al.*, 1985), l'ARN polymérase I et II (Dahmus, 1981; Duceman *et al.*, 1981), et des protéines qui contribuent à la régulation de la synthèse de l'ARN. De plus, la CKII possède une homologie de séquence importante avec l'enzyme *cdc28* de levure, une kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (Takio *et al.*, 1987). Il est aussi intéressant de noter que l'activité de la CKII est rapidement augmentée dans les cellules traitées avec une dose physiologique d'insuline ou de facteur de croissance de l'épiderme (Epidermal growth factor: EGF) (Sommercorn *et al.*, 1987). Finalement, on a aussi démontré que la CKII est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire puisqu'elle est nécessaire pour la transition des phases G0/G1 et G1/S (Rainer *et al.*, 1994).

La caséine n'est probablement pas un substrat physiologique pour la CKII mais elle constitue un outil important pour en détecter l'activité. L'examen des sites phosphorylés par la CKII dans la caséine a révélé qu'ils partageaient une caractéristique commune soit de se trouver dans une séquence contenant plusieurs résidus acides (Chan *et al.*, 1986; Meggio *et al.*, 1978; Pinna *et al.*, 1979; Tuazon *et al.*, 1979; Walton *et al.*, 1985). La spécificité de la CKII a aussi été étudiée avec l'aide de peptides synthétiques. La séquence consensus minimale reconnue par l'enzyme est S/T-X-X-D/E, où les résidus sérine ou thréonine peuvent être phosphorylés (Kuenzel

*et al.*, 1987). On a démontré qu'à l'intérieur d'une séquence acide, un résidu sérine était phosphorylé 10 fois plus rapidement qu'un résidu thréonine (Kuenzel *et al.*, 1987). De plus, la présence d'un résidu acide en position n+3 est nécessaire pour que le peptide soit reconnu comme un substrat (Kuenzel *et al.*, 1987). Dans une étude similaire, on a mesuré l'effet du nombre de résidus acides en position C-terminale du site de phosphorylation (Marin *et al.*, 1986). Ainsi, cette étude a démontré qu'un peptide contenant un groupe de 5 résidus acides en position C-terminale du site de phosphorylation est phosphorylé 10 fois plus rapidement qu'un peptide ne contenant que 3 résidus acides.

L'importance de ce motif de phosphorylation dans le processus d'immortalisation ou de transformation cellulaire a été peu étudiée mais un survol de la littérature scientifique et l'examen des résultats obtenus par différents mutants des oncoprotéines virales nous permettent d'en apprécier l'importance.

Pour la protéine E1A de l'adénovirus de type 5, la délétion des acides aminés 133 à 142, qui a pour effet d'amputer le motif CKII de ses résidus acides, entraîne la diminution de la formation de foyers après infection de cellules de rein de souris à 6% des niveaux observés avec le virus sauvage (Whyte *et al.*, 1988). L'importance du motif de phosphorylation par la CKII a été étudiée plus en détail chez HPV et a été impliquée dans son potentiel oncogénique. La protéine E7 de la plupart des types de HPV contient aussi un motif de phosphorylation par la CKII en aval de la séquence impliquée dans la liaison à pRb (Barbosa *et al.*, 1990). Cette étude a démontré que les résidus sérine-31 et -32 de la protéine E7 du HPV16 sont phosphorylés *in vitro* et que cette phosphorylation est inhibée à de faibles concentrations d'héparine, un inhibiteur connu de la CKII, et se produisait aussi bien en présence de GTP que d'ATP, ce qui suggère que la caséine kinase est responsable de cette activité. La protéine E7 contenant la double mutation sérine-31/32 n'est pas phosphorylée par la CKII purifiée ou par des extraits de cellules HeLa qui sont en mesure de phosphoryler la protéine sauvage. De plus, l'interruption de la séquence de cinq acides aminés acides par l'introduction d'un résidu aspartate en position 35 et d'un résidu histidine en position 36, ce qui réduit à trois le nombre d'acides aminés acides en aval des résidus sérines, a pour effet de réduire de façon drastique la phosphorylation de la protéine mutante.

L'activité biologique des protéines mutantes a aussi été mesurée dans des essais de transformation cellulaire. La protéine E7 sauvage peut induire la croissance de cellules NIH 3T3 en absence de support. La substitution d'un seul résidu sérine (31 ou 32) a un effet marginal sur la capacité de la protéine mutante à induire la croissance de cellules NIH 3T3 en absence de support alors qu'une double substitution (arginine-31/proline-32) réduit cette activité à 19% de celle de la protéine sauvage (Barbosa *et al.*, 1990). La mutation du résidu cystéine-24 ou de l'acide glutamique-26, deux résidus conservés de la séquence liaison à pRb, a pour effet d'abolir la liaison de pRb *in vitro*. Cependant, aucune des mutations dans le domaine de phosphorylation CKII n'affecte l'association de pRb à la protéine E7 de HPV16. Ces résultats démontrent que les mutations des sérines 31 et 32 n'ont pas d'effet sur la liaison de pRb mais réduisent néanmoins l'activité biologique de la protéine et suggèrent que la liaison à pRb n'est pas suffisante pour la pleine activité biologique de la protéine E7 de HPV16.

La capacité de la protéine E7 du VPH16 à coopérer avec l'oncogène *ras* activé a été mesurée dans des essais de co-transformation dans des cellules de rein de rat (Baby rat kidney cells: BRK) (Firzlaff *et al.*, 1991). Les substitutions des résidus sérine-31 et -32 par des résidus alanines, ou les substitutions des six résidus acides du site de phosphorylation CKII par des résidus glycines, ont pour effet d'abolir la capacité de la protéine E7 à coopérer avec un oncogène *ras* activé. Il est intéressant de noter qu'il a été impossible d'établir des lignées cellulaires immortelles à partir de cellules transfectées avec un vecteur codant pour l'une ou l'autre de ces différentes mutations alors que cela est possible avec un vecteur codant pour la protéine E7 sauvage.

La liaison des différents mutants de la protéine E7 de HPV16 à pRb a par la suite été mesurée et on ne trouve aucune différence significative dans la capacité de lier pRb chez les trois protéines. Cependant, comme le notent les auteurs, ces expériences n'éliminent pas la possibilité de différences mineures dans l'affinité de liaison à pRb des trois protéines.

Le site de phosphorylation pour la CKII a d'autre part été associé à la cinétique du transport vers le noyau de l'antigène grand T de SV40 (Jans et Jans, 1994). La

substitution des résidus sérines 111 et 112 par des résidus non-phosphorylables, ou la mutation des résidus (Asp-113-Asp-Glu) faisant partie du motif reconnu par la CKII, diminuent le taux d'importation au noyau à 4% de la molécule sauvage.

### 2.1.5 Région conservée 3 (CR3); domaine du doigt de zinc

Les oncoprotéines virales E7 de HPV, la protéine E1A d'adénovirus et l'antigène grand T de polyome sont des protéines qui peuvent lier le zinc (Barbosa *et al.*, 1989; Bergqvist *et al.*, 1990; Culp *et al.*, 1988). Elle contiennent toutes des motifs qui ont été impliqués dans la liaison d'un atome de zinc grâce à des résidus cystéines et histidines, qui forment une structure appelée doigt de zinc. Il existe plusieurs types de motifs doigt de zinc que l'on retrouve au sein de différents types de protéines comme certains facteurs de transcription, des enzymes et des récepteurs hormonaux (Berg, 1986; Coleman, 1992).

Les doigts de zinc retrouvés chez tous les antigènes grand T du groupe des virus du polyome ont un motif  $C_2H_2$  illustré à la figure 5A (Pipas, 1992). Ce motif contient des paires de cystéines et d'histidines qui sont séparées par une boucle de 11 à 17 acides aminés. On peut imaginer cette structure comme une boucle d'acides aminés ancrée par un atome de zinc (voir figure 5B). Tous les antigènes grand T contiennent aussi un troisième résidu histidine. Bien que les motifs doigt de zinc aient été souvent impliqués dans la liaison à l'ADN, ils peuvent aussi jouer un rôle dans les interactions protéines-protéines (Berg, 1986; Coleman, 1992). On a démontré que la région contenant le doigt de zinc de l'antigène grand T de SV40 était nécessaire pour la formation d'hexamère et la dénaturation de l'origine de réplication (Loeber *et al.*, 1991). En présence d'ATP, il y a formation de complexes protéiques composés d'un double hexamère d'antigène grand T qui possèdent une plus grande affinité pour l'origine de réplication virale que l'antigène grand T non-complexé (Borowiec et Hurwitz, 1988; Dean *et al.*, 1987; Deb et Tegtmeyer, 1987; Mastrangelo *et al.*, 1989). Le motif de doigt de zinc joue aussi un rôle important dans l'activité transformante du virus puisque la mutation d'un seul résidu cystéine ou histidine diminue l'efficacité de transformation de cellules primaires de souris par environ 50% (Loeber *et al.*, 1989). Ludlow *et al.*, (1990) ont démontré que la formation de complexes entre l'antigène grand T de SV40 et pRb impliquait les

**FIGURE 5****A) ALIGNEMENT DES MOTIFS DOIGT DE ZINC DES ANTIGÈNES GRAND T  
DU GROUPE DES VIRUS DU POLYOME**

SV40: virus simien 40; BKV: virus BK; JCV: virus JC; LPV: virus du polyome lymphotrope; PyV: virus du polyome murin; HaPV: virus du polyome de hamster; KV: virus K; BPV: virus du polyome bovin; BFDV: virus de la maladie de l'oiselet de la perruche.

**B) REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU DOIGT DE ZINC DE L'ANTIGÈNE  
GRAND T DU VIRUS DU POLYOME MURIN**

Le motif de type C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> comprend les résidus cystéine-452 et -455 et histidine-469 et -472 qui sont séparés par une boucle de 13 acides aminés.

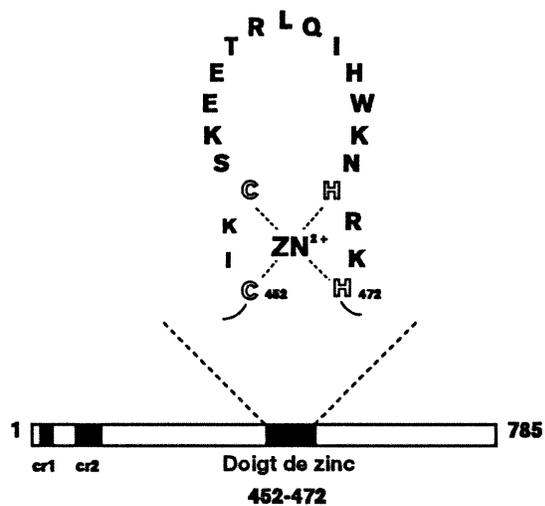
A

```

SV40 297YSFEMCLKCIKKEQPSHYKY-----HEK-HYAN323
BKV  299YNVEECKKCQKKDQPYHFKY-----HEK-HFAN325
JCV  298ENPQQCKKCEKKDQPNHFNH-----HEK-HYYN324
LPV  362VEPGKCGKCEKKQHKFHNY-----HKA-HHAN388
PyV  443KEVPSCIKCSKEETRLQIHWKN----HRK-HAEN471
HaPV421QCESSCKKCAEALPRMKVHWAN----HSQ-HLEN449
KV   314SPVPNCSKCENRMLTNHFKF-----HKE-HHEN340
BPoV254TAPEACKVCDNPRRLEHRRH-----HTKDHTLN281
BFDV220QPTDKCPECQKDKDTVKKRSTHIDDHPR-HQHN252

```

B



formes oligomériques de la protéine virale (Ludlow *et al.*, 1990). Si l'analyse de l'antigène grand T de SV40 a démontré l'importance du motif du doigt de zinc pour la formation d'hexamères impliqués dans la réplication de l'ADN viral, ces études n'ont cependant pas examiné la liaison du zinc par la protéine virale.

La protéine E7 est la principale protéine transformante des HPV de type 16 et 18. La protéine E7 est une phosphoprotéine de 98 acides aminés et d'environ 11 kDa qui est aussi en mesure de lier le zinc par deux motifs Cys-X-X-Cys dans sa portion C-terminale (Barbosa et Schlegel, 1989; Smotkin et Wettstein, 1987). La protéine E7 des HPV16, 18, 31 et 33 est capable d'immortaliser des cellules primaires de cellules de rongeurs et peut coopérer avec la forme activée de l'oncogène *ras* pour induire leur transformation complète (Münger *et al.*, 1989). L'expression continue de E7 est nécessaire à la conservation d'un phénotype transformé chez les cellules primaires de rongeurs (Crook *et al.*, 1989). Plusieurs études ont démontré que l'immortalisation de kératinocytes primaires humaines nécessite les protéines E7 et E6 des HPV du groupe à haut risque (Barbosa et Schlegel, 1989; Münger *et al.*, 1989). De plus, le motif de doigt de zinc de la protéine E7 a aussi été impliqué dans l'activité immortalisante ou transformante de la protéine. L'introduction de mutations dans le motif doigt de zinc présent dans la portion C-terminale de la protéine E7 entraîne l'élimination de l'activité immortalisante sur des kératinocytes (Jewers *et al.*, 1992) et l'inhibition complète ou partielle de la transformation dans les cellules de rongeurs (Edmonds et Vousden, 1989). McIntyre *et al.*, (1993) ont démontré que la protéine E7 de HPV18 est en mesure de former un homodimère par son interaction avec le zinc (McIntyre *et al.*, 1993). Les mutants E7 possédant une mutation dans l'un ou l'autre des motifs Cys-X-X-Cys de la protéine sont incapables de former des homodimères et de transformer, en coopération avec le gène *ras* activé, des cultures primaires de cellules embryonnaires de rat. Ils n'ont cependant observé aucune altération dans l'habileté de la protéine à lier pRb.

On a démontré que l'antigène grand T du virus du polyome était aussi en mesure de former des complexes oligomériques d'environ 670 kDa ce qui correspond à la taille d'un hexamère composé de six unités de 90 à 100 kDa chacune (Wang et Prives, 1991). Le motif de doigt de zinc est constitué des résidus cystéines 452 et 455 ainsi que les résidus histidines 465-469 et 472. Rose et Schaffhausen (1995) ont

démontré qu'une mutation ponctuelle impliquant un des quatre résidus conservés (Cys-452, Cys-455, His-465 et His-469) bloquait l'habileté de l'antigène grand T à répliquer l'ADN viral sans empêcher la liaison de l'antigène grand T à l'ADN (Rose et Schaffhausen, 1995). Ces antigènes grand T mutants sont aussi incapables de s'associer pour former des complexes de hauts poids moléculaire. Le motif de doigt de zinc de l'antigène grand T du virus du polyome est donc essentiel pour la réplication du génome viral. Mais pour l'antigène grand T du virus du polyome murin, l'importance du motif de doigt de zinc dans l'immortalisation cellulaire n'a pas été étudiée directement.

### 2.1.6 Région entre les acides aminés 256 et 272

Cette région de l'antigène grand T de polyome, entre les acides aminés 256 et 272, correspond à la position du domaine de liaison à pRb chez l'antigène grand T de SV40. On y retrouve deux des quatre acides aminés de la séquence consensus de liaison à pRb soit; D-X-X-C-X-X. Pour ces raisons, nous avons désigné cette région comme site "potentiel" (cryptic) de liaison à pRb. Cette région de l'antigène grand T du virus du polyome a été peu étudié. Backus *et al.*, (1987) ont démontré que cette région est un site majeur de phosphorylation des résidus sérines et thréonines mais son importance pour l'activité biologique de la protéine reste inconnu.

## 2.2 DISSOCIATION DU COMPLEXE pRb/E2F

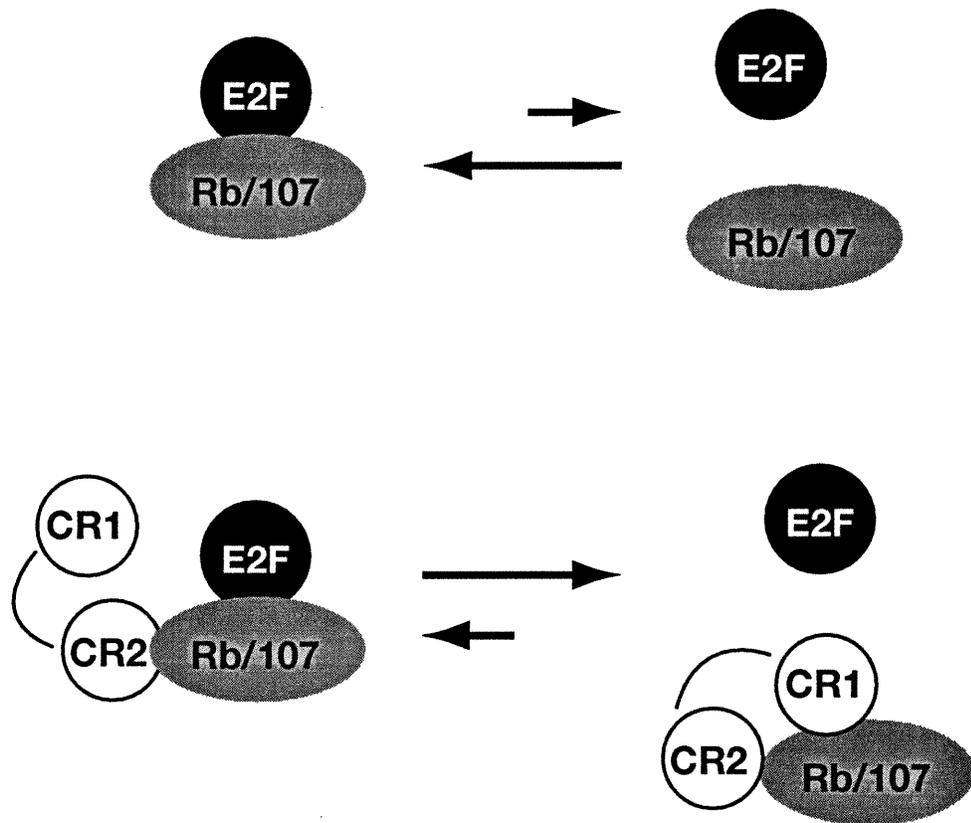
Plusieurs oncoprotéines virales sont en mesure de dissocier le complexe pRb/E2F. L'interaction de haute affinité entre le domaine A/B de pRb et les oncoprotéines virales se fait par le motif L-X-C-X-E dans la CR2 des protéines E1A d'adénovirus (Whyte *et al.*, 1988), la protéine E7 de HPV (Münger *et al.*, 1989), et les antigènes grand T de SV40 (Ludlow *et al.*, 1989) et du virus du polyome murin (Larose *et al.*, 1991; Pilon *et al.*, soumis). Le facteur de transcription E2F-1 ne contient pas le motif L-X-C-X-E mais le complexe pRb/E2F-1 peut être dissocié *in vitro* par un peptide contenant ce motif (Helin *et al.*, 1992; Kaelin *et al.*, 1992). Seul le domaine A/B de pRb est nécessaire pour la liaison du facteur de transcription E2F tandis que la formation d'un complexe pRb/E2F et DNA nécessite aussi le

domaine C-terminal de pRb (Hiebert, 1993; Qian *et al.*, 1992; Qin *et al.*, 1992). Bien que le peptide contenant le motif L-X-C-X-E puisse dissocier le complexe pRb/E2F il n'est pas en mesure de dissocier le complexe pRb/E2F/ADN (Huang *et al.*, 1993; Ikeda et Nevins, 1993; Walton *et al.*, 1985).

Comment les oncoprotéines virales dissocient-elles le complexe pRb/E2F/ADN? Pour la protéine E1A d'adénovirus, on a démontré que la CR1 et la CR2 sont nécessaires pour la dissociation du complexe pRb/E2F (Ikeda et Nevins, 1993). Pour la protéine E7 de HPV16, on a démontré que la dissociation du complexe pRb/E2F nécessitait plutôt les CR2 et CR3 (Huang *et al.*, 1993). On a proposé un modèle de la dissociation du complexe pRb/E2F par les oncoprotéines virales qui est illustré à la figure 6 (Fattaey *et al.*, 1993; Ikeda et Nevins, 1993). Premièrement, le motif L-X-C-X-E de la CR2 permet à l'oncoprotéine virale de cibler pRb par une interaction de haute affinité avec le domaine A/B de pRb. Cette interaction permet ensuite une interaction plus faible de la CR1 de E1A, ou la CR3 de E7, qui permet de déplacer le facteur de transcription E2F de pRb (Fattaey *et al.*, 1993; Ikeda et Nevins, 1993).

**FIGURE 6****MODÈLE DE LA DISSOCIATION DU COMPLEXE pRb/E2F, p107/E2F PAR LA PROTÉINE E1A D'ADÉNOVIRUS.**

La protéine E1A interagit avec les protéines pRb (ou p107) par deux régions différentes, la CR1 et la CR2. La CR2 permet l'interaction initiale avec le complexe pRb/E2F. La dissociation du complexe se fait dans des conditions d'équilibre normales grâce à la CR1 qui déplace E2F et lie pRb (ou p107) empêchant ainsi le complexe de se former à nouveau. La protéine E1A entraîne l'équilibre de cette réaction vers la dissociation des complexes pRb/E2F (ou p107/E2F) et la présence de facteur de transcription E2F libre.



### 3.0 SÉNESCENCE ET IMMORTALITÉ

Chez les eucaryotes, la capacité de la plupart des cellules différenciées à proliférer est limitée; une cellule normale est capable d'effectuer un nombre déterminé de divisions cellulaires. Ce processus, appelé vieillissement ou sénescence cellulaire, a d'abord été décrit il y a plus de trente ans par Hayflick et Moorhead et est caractérisé par l'arrêt de croissance chez des fibroblastes en culture (Hayflick et Moorhead, 1961). Ils ont observé que les cellules normales en culture étaient capables d'effectuer un nombre déterminé de divisions cellulaires, démontraient des changements morphologiques particuliers et cessaient toute prolifération (Hayflick, 1976). Cependant, une cellule peut occasionnellement échapper au processus de sénescence et acquérir une capacité de prolifération apparemment illimitée, ce qui donne naissance à une lignée cellulaire immortelle.

Il existe plusieurs raisons de croire que la sénescence cellulaire se produit aussi *in vivo*. Par exemple, il y a une étroite corrélation entre la capacité des cellules à se diviser en culture et l'âge du donneur duquel ces cellules sont dérivées (Martin *et al.*, 1970). Cette corrélation a aussi été démontrée pour plusieurs tissus chez la souris (Cameron, 1972) et de l'épiderme chez l'humain (Grove et Klingman, 1983). Des cellules dérivées de glandes mammaires normales de souris, transplantées en série, démontrent une capacité de prolifération limitée tout comme les cellules de la moelle osseuse (Daniel, 1972).

### 3.1 GÉNÉTIQUE ET SÉNESCENCE.

Plusieurs études ont démontré que la fusion d'une cellule normale et d'une cellule immortelle résulte en une cellule hybride sénescente (Koi et Barrett, 1986; Pereira-Smith et Smith, 1988). Ces résultats suggèrent que le phénotype de sénescence est dominant et le phénotype de l'immortalité cellulaire est récessif. L'explication la plus simple de cette observation est que l'immortalisation cellulaire nécessite la perte des deux allèles d'un gène dominant. Mais il est peu probable que le processus de sénescence soit sous le contrôle d'un seul locus puisque:

- 1- Des études portant sur la fusion cellulaire ont établi que chez les cellules humaines il existe au moins quatre groupes de complémentation pour l'immortalité cellulaire (Pereira-Smith et Smith, 1988).
- 2- Le transfert de chromosome a démontré que des gènes impliqués dans la sénescence étaient présents sur les chromosomes humains 1, 4 et X (Klein *et al.*, 1991; Ning *et al.*, 1991; Suguwara *et al.*, 1990). Toutefois, l'identité et la fonction de ces gènes sont encore inconnues.
- 3- Les oncogènes immortalisant les cellules humaines codent généralement pour des protéines nucléaires multifonctionnelles qui lient et inactivent au moins deux protéines, en particulier le produit des gènes suppresseurs, pRb et p53.

### 3.2 IMMORTALISATION CELLULAIRE.

La fréquence d'immortalisation cellulaire spontanée dépend de l'espèce animale dont originent les cellules. Pour la plupart des cellules de rongeurs, la fréquence à laquelle un variant immortel apparaît spontanément dans une culture cellulaire sénescence est un événement rare mais mesurable, se produisant à une fréquence de  $1 \times 10^{-5}$  à  $1 \times 10^{-6}$  (Todaro et Green, 1963). La fréquence d'immortalisation peut être augmentée de façon significative par le traitement des cellules avec des agents cancérigènes ou par la transfection d'oncogènes (Chang, 1986). Les oncoprotéines virales des virus à ADN oncogènes tel que l'antigène grand T de SV40 (Todaro et Green, 1964), l'antigène grand T du virus du polyome murin (Rassoulzadegan *et al.*, 1983), la protéine E7 de HPV16 (Münger *et al.*, 1989) et la protéine E1A d'adénovirus (Zerler *et al.*, 1986) sont très efficaces pour immortaliser ou transformer les cellules de rongeurs.

Cependant, chez les cellules humaines, la sénescence est virtuellement complète, l'immortalisation spontanée de fibroblastes humains n'ayant jamais été rapportée dans la littérature et sa fréquence est probablement moins de  $1 \times 10^{-12}$  (McCormick et Campisi, 1991). Les cellules humaines peuvent être immortalisées par de fortes doses d'agents cancérigènes ou par l'introduction d'oncogènes viraux

mais la fréquence d'immortalisation reste très faible, de l'ordre de  $1 \times 10^{-6}$  à  $1 \times 10^{-7}$  (McCormick et Campisi, 1991). Plusieurs études de l'immortalisation de cellules humaines par l'antigène grand T de SV40, suggèrent que celle-ci nécessite au moins deux altérations génétiques pour développer un phénotype d'immortalité (Radna *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989).

### 3.3 LA RÉGULATION DE LA SÉNESCENCE SE FAIT PAR UN MÉCANISME COMPORTANT DEUX ÉTAPES: M1 ET M2.

Les cellules humaines sont résistantes aux traitements (agents mutagènes, cancérigènes et transfection d'oncogènes) qui immortalisent les cellules de rongeurs. Les cellules humaines peuvent être immortalisées par l'antigène grand T de SV40 à une fréquence faible de  $1 \times 10^{-7}$  mais ce système est quand même utile pour étudier l'immortalisation cellulaire. La fonction immortalisante de SV40 réside dans son antigène grand T. Plusieurs groupes ont démontré que l'expression continue de l'antigène grand T était nécessaire pour la prolifération des fibroblastes humains immortalisés. En effet, ces cellules arrêtent de se diviser aussitôt que l'expression de grand T est arrêtée ou inactivée par l'incubation des cellules à la température restrictive, si elles ont été immortalisées par un antigène grand T thermosensible (Radna *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1989). Les cellules prennent alors une morphologie typique des cellules sénescents et expriment une série de marqueurs associés à la sénescence.

Les fibroblastes humains transfectés avec l'antigène grand T de SV40 voient leur durée de vie prolongée d'environ 20 doublements de population (Ide *et al.*, 1984; Stein, 1985). Après cette période, la culture entre dans une période de crise où les taux de répllication et de mort cellulaire sont d'abord équivalents et la taille de la population cellulaire reste la même puis décline. A une fréquence d'environ  $1 \times 10^{-7}$ , une cellule échappe à cette période de crise pour donner naissance à une colonie qui éventuellement produira une lignée cellulaire établie (Shay et Wright, 1989). Les cellules transfectées avec un antigène grand T inductible sont dépendantes de l'expression de l'antigène grand T pour leur prolifération cellulaire non seulement durant la période où leur durée de vie est prolongée mais aussi après la période de crise, alors qu'elles forment des lignées cellulaires (Ide *et al.*, 1984; Wright *et al.*, 1989).

Shay *et al.*, (1989, 1991) ont décrit un modèle en deux étapes de la sénescence cellulaire afin d'expliquer ces observations (Shay *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1989). Durant la première étape de mortalité (M1), certaines molécules sont présentes et empêchent la division cellulaire. En liant et inactivant ces molécules, l'antigène grand T de SV40 contourne ce mécanisme et permet aux cellules de se diviser, ce qui prolonge leur durée de vie, jusqu'à ce que la deuxième étape de mortalité (M2) soit induite. M2 cause la crise et l'inactivation d'un gène critique, possiblement par une mutation, et permet aux cellules d'échapper au mécanisme M2 et de devenir immortelles. Ces cellules immortelles ont cependant conservé un mécanisme M1 intact et nécessitent donc l'expression continue de l'antigène grand T pour bloquer son action.

Ainsi, la différence observée entre la fréquence d'immortalisation des cellules humaines et de rongeurs pourrait être expliquée par le nombre d'événements requis pour l'immortalisation cellulaire (McCormick et Maher, 1988; Shay et Wright, 1989). Selon cette hypothèse, l'immortalisation des cellules de rongeurs se fait par un mécanisme en une seule étape, un seul événement étant suffisant pour contourner le mécanisme de sénescence M1. Cette hypothèse suppose que les cellules de rongeurs possèdent un mécanisme M2 beaucoup moins efficace puisqu'elles n'entrent pas en crise et semblent être immortalisées directement. D'autre part, l'immortalisation de cellules humaines nécessiterait l'inactivation des mécanismes M1 et M2.

Les gènes "suppresseurs" pRb et p53 ont été ainsi nommés à cause de leur capacité à induire un arrêt de la croissance cellulaire lorsqu'ils sont exprimés dans des lignées cellulaires immortelles (Finlay *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1988). Les oncoprotéines virales de plusieurs virus à ADN oncogènes (DeCaprio *et al.*, 1988; Münger *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1988) lient et inactivent p53 et pRb *in vivo* et la perte de ces interactions résulte en l'abolition de leur activité immortalisante (Larose *et al.*, 1991; Shay *et al.*, 1991; Whyte *et al.*, 1989). Nous considérons l'immortalisation cellulaire comme un processus où l'activation d'un ou plusieurs gènes cellulaires entraîne la perturbation du cycle cellulaire et la réplication de l'ADN de façon continue et ce, de façon indépendante de stimulateurs exogènes. Chez beaucoup de types cellulaires, la cellule perçoit cette perturbation du cycle

cellulaire où deux signaux physiologiques s'opposent, prolifération cellulaire et arrêt du cycle cellulaire, et répond en activant son programme de mort cellulaire ou apoptose. Il n'est donc pas étonnant de constater que la plupart des virus à ADN oncogènes possèdent la capacité de lier ou d'inactiver p53 qui est nécessaire pour certaines voies d'apoptose.

Un rôle important pour pRb et p53 dans le processus d'immortalisation cellulaire nous est suggéré par plusieurs expériences récentes. Christensen *et al.*, (1995) ont établi des lignées cellulaires de fibroblastes provenant d'embryons normaux pour le gène Rb (pRb +/+) et d'embryons homozygotes pour une mutation dans ce même gène (pRb -/-) (Christensen et Imperiale, 1995). Ils notent que les cellules dérivées d'embryons Rb -/- n'entrent pas en crise et s'établissent facilement, alors que les cellules Rb +/+ entrent en crise avant qu'une minorité de cellules donnent naissance à des lignées cellulaires. De plus, les cellules Rb -/- ont tendance à atteindre de fortes densités de saturation et à former des foyers. Les auteurs ont pensé que la mise en culture des cellules aurait pu avoir pour effet de sélectionner les cellules ayant acquis une mutation dans le gène p53. L'analyse de p53 dans ces cellules a indiqué que le gène était sauvage. Ces résultats suggèrent donc que pRb est impliqué dans le processus de sénescence cellulaire.

Harvey *et al.*, (1993) ont caractérisé la croissance de cellules embryonnaires de souris isolées d'embryons homozygotes pour une mutation dans le gène p53 (p53 -/-) (Harvey *et al.*, 1993). Leur étude a démontré que les fibroblastes de souris homozygotes p53 -/- croissent rapidement et atteignent plus de 50 passages sans jamais entrer en crise comme le font les cellules isolées d'embryons hétérozygotes p53 +/- et normaux p53 +/+. De façon surprenante, les cellules hétérozygotes p53 +/- perdent l'allèle sauvage du gène p53 très tôt pendant leur passage en culture et malgré cela, la plupart de ces cellules entrent en sénescence. Ces résultats suggèrent que la perte de p53 n'est pas suffisante pour conférer l'immortalité cellulaire et n'a pour effet que de faciliter d'autres altérations génétiques nécessaires à l'immortalisation.

### 3.4 SÉNESCENCE, IMMORTALISATION ET CYCLE CELLULAIRE

Les fibroblastes sont parmi les cellules les plus faciles à propager en culture et pour cette raison, elles sont fréquemment utilisées dans l'étude du processus de sénescence. Elles sont aussi les cellules les plus souvent utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires de contrôle de la croissance cellulaire. Ainsi, les progrès les plus récents de notre compréhension de la sénescence découlent de la fusion de ces deux champs d'études.

L'étude des gènes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire suggère que les gènes induits pendant la transition de la phase G0 à la phase G1 et S du cycle cellulaire peuvent être classifiés en trois catégories selon l'ordre temporel de leur expression:

- 1- Les gènes de la réponse précoce sont induits 1 à 2 heures après la stimulation mitogénique et de façon indépendante à l'expression antérieure d'autres gènes.
- 2- Les gènes exprimés à partir du milieu de la phase G1 jusque tardivement en G1, qui sont induits plusieurs heures après la stimulation par des agents mitogènes et qui nécessitent la synthèse de protéines *de novo*.
- 3- Les gènes de la réponse tardive en G1 qui sont exprimés tout juste avant le début de la phase S (Herschmann, 1991).

On croit généralement que les cellules sénescents sont arrêtées en phase G0/G1 du cycle cellulaire parce qu'elles contiennent une quantité d'ADN correspondant à ce stade (Yanischevsky *et al.*, 1974). L'induction de certains gènes de la réponse précoce et du milieu de la phase G1 dans les cellules sénescents sans l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire, suggère que les cellules sénescents sont effectivement bloquées en G1. L'incapacité d'induire l'expression des gènes codants pour cdc2, la cycline A et de phosphoryler pRb chez les cellules sénescents (Futreal et Barrett, 1991; Richter *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1990; Stein *et al.*, 1991) sont des observations en accord avec l'hypothèse selon laquelle les cellules sénescents sont arrêtées tard en G1, près de la frontière G1/S. Il est donc possible que le produit des gènes impliqués dans la sénescence soient des régulateurs négatifs qui arrêtent les

cellules de façon permanente en G1 en interférant avec les protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S.

### 3.5 LES VOIES DE TRANSDUCTION DES SIGNAUX RÉGULÉES PAR LES AGENTS MITOGÈNES SONT PERTURBÉES DANS LES CELLULES SÉNESCENTES

Les fibroblastes humains diploïdes (Human Diploid Fibroblasts: HDF) entrent dans une phase de quiescence (G0), quand ils atteignent une forte densité cellulaire ou si ils sont privés de sérum. Les cellules quiescentes et sénescents bloquées en G0/G1 ont beaucoup en commun. Cependant une différence importante existe entre elles; les cellules quiescentes peuvent quitter cet état quand elles sont stimulées par le sérum alors que les cellules sénescents en sont incapables. Ainsi, la stimulation par le sérum de HDFs quiescentes induit une cascade de signaux culminant par l'entrée des cellules en phase S après 12 à 18 heures. Par contre, les HDFs sénescents sont incapables de passer en phase S après une stimulation par le sérum. Ainsi, en comparant la réponse des deux populations, on a pu déterminer des différences importantes dans leurs réponses respectives face à des agents mitogènes et ainsi déterminer les voies de transduction des signaux non fonctionnelles.

#### 3.5.1 Déficience des voies de régulation des gènes de la réponse précoce dans les cellules sénescents

Les cellules HDFs sénescents sont incapables d'exprimer *c-fos* lorsqu'elles sont stimulées par le sérum (Seshadri et Campisi, 1990). La protéine *c-fos* fait partie du facteur de transcription AP-1 dont l'activité est requise pour entrer en phase S chez les fibroblastes stimulés par le sérum (Riabowol *et al.*, 1992). Cependant, l'induction de l'expression de *c-fos* et de l'activité AP-1 dans les HDFs sénescents par la microinjection d'un oncogène *ras* activé n'entraîne pas la synthèse de l'ADN ce qui suggère la présence d'autres mécanismes empêchant la progression du cycle cellulaire (Rose *et al.*, 1992).

L'élément de réponse au sérum (Serum Responsive Element: SRE) du promoteur de *c-fos* lie plusieurs facteurs de transcription dont le facteur de réponse au sérum (Serum Response Factor: SRF) qui est hyperphosphorylé dans les cellules

sénescentes (Atadja *et al.*, 1994). La forme hyperphosphorylée du SRF est incapable de lier le SRE ce qui suggère que cette altération pourrait être responsable de la diminution de l'expression de *c-fos* dans les cellules sénescentes stimulées par le sérum.

Les esters de phorbol, qui sont des activateurs de la protéine kinase C (PKC), peuvent induire l'expression de *c-fos* dans les cellules quiescentes et les cellules sénescentes (DeTata *et al.*, 1993; Riabowol *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que les cellules sénescentes sont déficientes dans l'activation de la PKC en réponse à la stimulation par le sérum. De plus, les cellules sénescentes sont incapables d'activer la phospholipase D, ce qui entraîne l'incapacité de générer des quantités suffisantes de diacylglycérol qui est l'activateur endogène de la PKC (Venable *et al.*, 1994).

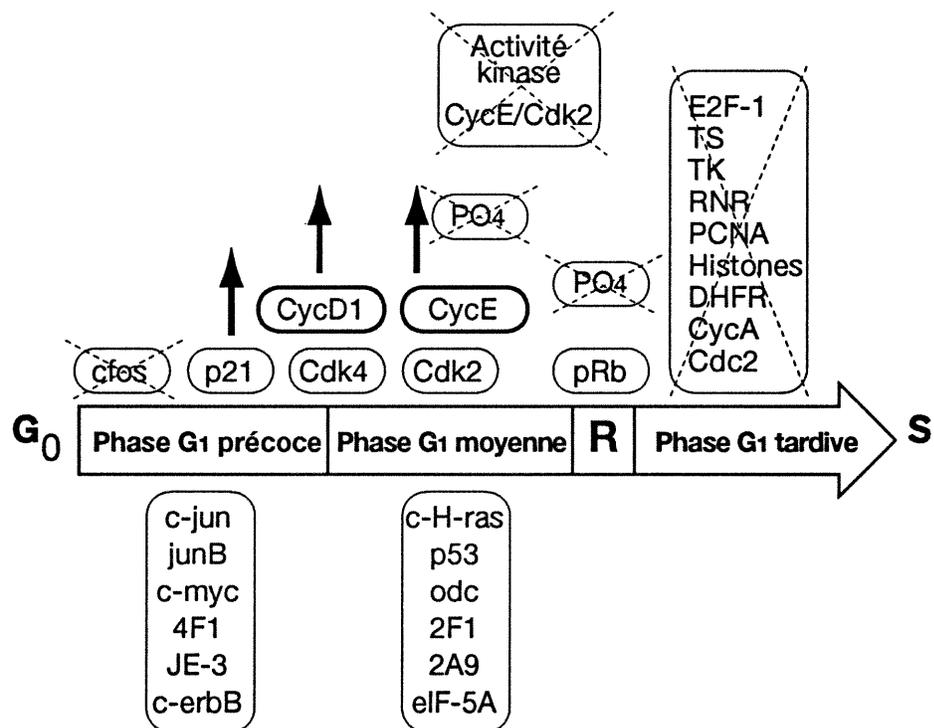
Les MAP kinases font partie d'une voie de transduction des signaux essentielle à la progression cellulaire et qui est induite par les agents mitogènes (Hall, 1994). Cette voie biochimique implique l'activation séquentielle de Ras, Raf, et des MAP kinase kinases qui activent alors les MAP kinases en les phosphorylant. Une des fonctions de la MAP kinase activée est de phosphoryler le complexe ternaire qui lie le promoteur de *c-fos* (Gille *et al.*, 1992), ce qui suggère que le manque de stimulation de *c-fos* pourrait dépendre d'une MAP kinase inactive. Dans les cellules sénescentes, la forme de MAP kinase de 42 kDa n'est pas phosphorylée après la stimulation par le sérum alors que cette même protéine est phosphorylée dans les cellules quiescentes (Afshari *et al.*, 1993).

### 3.5.2 Événements de la phase G1 tardive déficients dans les cellules sénescentes

Les cellules sénescentes stimulées par le sérum sont incapables d'exprimer plusieurs gènes de la phase G1 tardive (résumé à la figure 7). Parmi ces gènes, on retrouve ceux codant pour TK, la DHFR, le PCNA, la polymérase à ADN alpha, la cycline A, *cdc2*, de même que les histones (Chang et Chen, 1988; Pang et Chen, 1994; Pang et Chen, 1993; Stein *et al.*, 1991). Ces résultats suggèrent que les cellules sénescentes sont incapables de passer le point de restriction (R). Le point R a été défini comme un événement ou un mécanisme qui engage les cellules dans leur progression dans la phase de synthèse de l'ADN et de la division cellulaire sans le besoin ultérieur de stimulation mitogénique (Pardee, 1989).

**FIGURE 7****SOMMAIRE DES ÉVÉNEMENTS PHYSIOLOGIQUES INDUITS PAR LE SÉRUM  
DANS LES FIBROBLASTES HUMAINS DIPLOÏDES (HDFS) SÉNESCENTS ET  
QUIESCENTS**

Les HDFs quiescents stimulés par le sérum induisent l'expression des gènes et effectuent les activités biochimiques qui apparaissent à la figure 1 tandis que les HDFs sénescents sont incapables d'induire l'expression des gènes ou des événements biochimiques qui sont marqués d'une croix en traits pointillés. On observe aussi chez les HDFs sénescents des niveaux élevés de p21 et des cyclines D1 et E avant et après stimulation par le sérum, soulignés par les flèches en caractère gras. Tous les événements du diagramme représentent l'induction de la synthèse d'ARNm et/ou de protéines.



La phosphorylation de pRb pourrait faire partie du mécanisme contrôlant le point R. On a démontré que ces gènes sont tous régulés, ou potentiellement régulés, par le facteur de transcription E2F (Dalton, 1992; Nevins, 1992; Yamamoto *et al.*, 1994). Puisque pRb est sous-phosphorylé de façon constitutive dans les cellules sénescentes (Stein *et al.*, 1990), le facteur de transcription E2F pourrait être régulé continuellement de façon négative par pRb. Cette hypothèse est en accord avec l'observation que l'expression de l'ARNm de E2F-1, un membre de la famille des facteurs de transcription E2F, est réprimée dans les cellules sénescentes (Dimri *et al.*, 1994). De plus, l'expression de E2F-1 est régulée de façon dépendante du cycle cellulaire et atteint son plus haut niveau à la frontière G1/S (Shan *et al.*, 1992; Slansky *et al.*, 1993). Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle E2F exerce son action principalement à cette période du cycle cellulaire et que la transcription régulée par E2F-1 pourrait être une étape limitante de la prolifération cellulaire.

Les travaux de Singh *et al.*, (1994) ont été les premiers à impliquer directement l'expression non-contrôlée de E2F-1 et la prolifération cellulaire. Ainsi, la surexpression du facteur de transcription E2F-1 dans des cellules embryonnaires de rat entraîne leur transformation néoplasique complète (Singh *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que E2F-1 est un élément clé contrôlant la progression du cycle cellulaire. Le potentiel oncogénique de E2F-1 est dépendant de l'intégrité des domaines de liaison à l'ADN et de transactivation mais n'est pas dépendant de sa capacité à interagir directement avec pRb (Singh *et al.*, 1994). L'expression du facteur de transcription E2F-1 est aussi suffisante pour induire l'entrée en phase S de cellules quiescentes (Johnson *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 1994; Shan et Lee, 1994; Singh *et al.*, 1994). De plus, E2F-1 est en mesure de coopérer avec l'oncogène *ras* activé pour transformer des cellules embryonnaires de rat (Johnson *et al.*, 1994). Cependant, si l'expression du facteur de transcription E2F-1 induit la synthèse de l'ADN il semble aussi induire l'apoptose dans certaines lignées cellulaires (Kowalik *et al.*, 1995; Qin *et al.*, 1994; Shan et Lee, 1994). Finalement, l'expression ectopique de E2F-1 dans deux lignées cellulaires humaines et dans une lignée cellulaire murine n'est pas en mesure d'induire la synthèse de l'ADN. Ces observations suggèrent que certaines cellules nécessitent des facteurs positifs additionnels ou l'inactivation de facteurs négatifs de régulation (Dimri *et al.*, 1994).

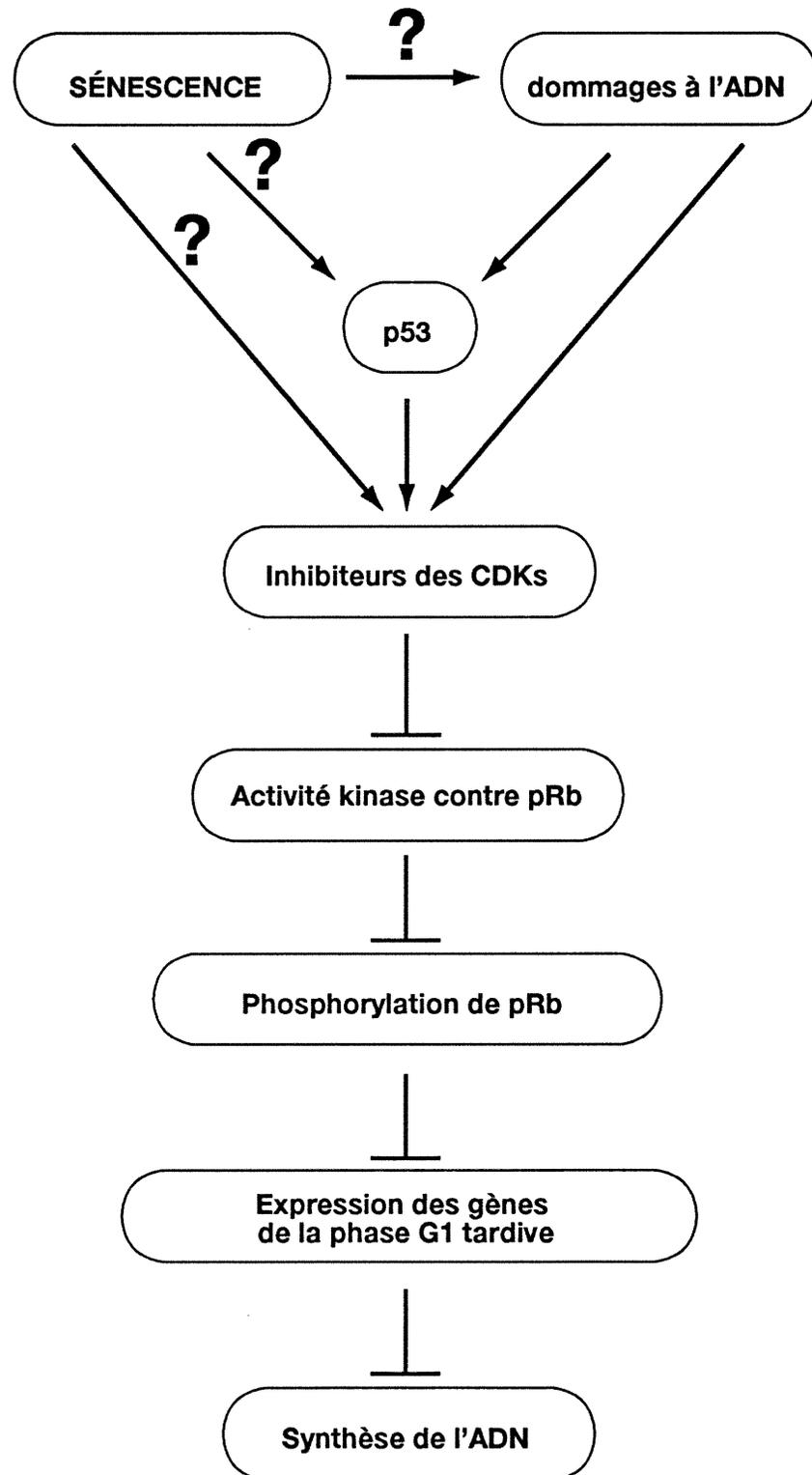
pRb est phosphorylée par un complexe cycline D et une kinase dépendante des cyclines 4 (CDK4), ou cycline E/CDK2, qui sont activés au cours de la phase G1 (Sherr, 1994). Les cellules sénescents contiennent une forte concentration d'un inhibiteur des CDKs connu sous le nom de p21<sup>SDI</sup>, CIP1, WAF1 ou simplement, p21 (Noda *et al.*, 1994). Le niveau d'ARNm de p21 est de 10 à 20 fois plus élevé dans les cellules sénescents que dans les cellules en prolifération. De plus, Stein et Dulic (1995) ont observé que le niveau d'expression du gène p16<sup>INK4</sup> (Serrano *et al.*, 1993), un autre inhibiteur des complexes cycline/CDK, est aussi plus élevé dans les cellules sénescents (Stein et Dulic, 1995). Puisque p53 est en mesure de transactiver l'expression de p21 (El-Deiry *et al.*, 1993), il est possible que l'augmentation de l'expression de l'ARNm de p21 dans les cellules sénescents soit dépendante de p53. Bien que des expériences antérieures aient démontré qu'il y a peu de différence entre le niveau d'expression de p53 dans les cellules sénescents et les cellules quiescentes (Afshari *et al.*, 1993), p53 joue clairement un rôle dans le processus de sénescence cellulaire puisque les cellules homozygotes pour une mutation dans p53 ont une durée de vie prolongée et peuvent entrer en crise (Bond *et al.*, 1994; Shay *et al.*, 1993). Cependant l'effet sur p21 n'est pas nécessairement lié directement à p53 car il existe des voies d'induction de l'expression de p21 qui sont indépendantes de p53 (Michieli *et al.*, 1994).

### 3.6 TÉLOMÈRES ET ACTIVITÉ TÉLOMÉRASE

Les télomères des HDFs en culture perdent de 50 à 65 paires de bases à chaque fois que l'ADN cellulaire est répliqué puisque ces cellules n'ont pas d'activité télomérase (Counter *et al.*, 1992; Harley *et al.*, 1990). Les cellules humaines cancéreuses et immortelles possèdent une activité télomérase et sont capables de maintenir l'intégrité de leurs télomères indépendamment du nombre de divisions cellulaires (Counter *et al.*, 1992; Harley *et al.*, 1990). L'érosion des télomères dans les cellules normales pourrait servir d'horloge biologique reflétant le nombre de divisions qu'une cellule a accompli. Une hypothèse intéressante du processus de sénescence est présentée à la figure 8 et émerge des expériences récentes qui ont démontré que les dommages à l'ADN induits par les radiations ionisantes amènent un arrêt en G1 dépendant de p53 et associé à l'induction de p21, à l'inactivation du complexe cycline E/CDK2 et à la sous-phosphorylation de pRb (Dulic *et al.*, 1994). Puisque

**FIGURE 8****MODÈLE D'INHIBITION DE LA SYNTHÈSE DE L'ADN CHEZ LES HDFs SÉNESCENTES**

Le niveau élevé de l'inhibiteur de CDK p21 bloque l'activité des complexes cyclines/CDKs qui normalement phosphorylent et inactivent pRb. D'autres inhibiteurs de CDKs pourraient aussi jouer un rôle dans l'arrêt en G1 des cellules sénescentes. Le blocage de la phosphorylation de pRb empêcherait l'expression de gènes de la phase G1 tardive dont le produit est nécessaire à la progression en G1/S. Les points d'interrogations des voies biochimiques à partir du processus de sénescence indiquent que les mécanismes par lesquels le niveau de p21 est plus élevé dans les HDFs sénescents sont inconnus. Il est possible que ces mécanismes soient similaires à ceux qui entraînent une augmentation du niveau de p21 après des dommages à l'ADN qui causent un arrêt en G1. L'érosion des télomères pourrait être perçue par la cellule comme une forme de dommage à l'ADN.



les cellules sénescents démontrent les mêmes caractéristiques, il est possible que ces cellules perçoivent l'érosion des télomères comme une forme de dommage à l'ADN et provoquent un arrêt en G1 par l'intermédiaire de p21 (DiLeonardo *et al.*, 1994; Dulic *et al.*, 1994).

Dans les cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de souris, la longueur des télomères diminue aussi à chaque division cellulaire (Prowse et Greider, 1995). Cependant, dans les lignées cellulaires immortalisées de façon spontanée, la longueur des télomères est stable et on peut détecter dans ces cellules une activité télomérase. De façon intéressante, ce groupe a noté que contrairement aux tissus humains, plusieurs tissus chez la souris possédaient une activité télomérase. Les auteurs de cette étude suggèrent que la présence de cette activité télomérase pourrait expliquer la facilité avec laquelle on peut immortaliser des cellules de souris en culture alors que l'immortalisation de cellules humaines est beaucoup plus rare.

Quelle est donc la signification de cette limite à la prolifération cellulaire? La sénescence peut être vue comme une manifestation, au niveau cellulaire, du vieillissement d'un organisme. Cette idée découle en partie de l'observation que pour une population cellulaire donnée, le nombre maximum de divisions cellulaires est généralement inversement proportionnel à l'âge du donneur et directement proportionnel à la durée de vie maximale de l'espèce. De plus, les cellules dérivées de patients atteints du syndrome de Werner, qui vieillissent de façon prématurée, sénescents généralement après moins de doublements de population que les cellules dérivées de donneurs sains du même âge (Martin *et al.*, 1970; Salk, 1982). D'autre part, la sénescence peut être vue comme un mécanisme ayant pour but de contrôler la croissance cellulaire et de prévenir l'apparition de tumeurs. Cette théorie découle de l'observation selon laquelle les événements qui confèrent à une cellule un potentiel de croissance infinie, augmentent de façon significative la susceptibilité à la transformation. Ces deux points de vue ne sont pas mutuellement exclusifs et suggèrent que le phénotype de croissance cellulaire est contrôlé génétiquement. L'inactivation de gènes impliqués dans le contrôle du processus de sénescence cellulaire pourrait permettre à certaines cellules d'échapper aux limites de prolifération cellulaire et de devenir immortelles, favorisant ainsi la progression néoplasique.

## 4.0 RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE PAR LE PRODUIT DU GÈNE SUPPESSEUR DU RÉTINOBLASTOME

### 4.1 HISTORIQUE

Le rétinoblastome se manifeste par l'apparition de tumeurs malignes intraoculaires qui se développent tôt au cours de l'enfance (revue dans Goodrich et Lee, 1993). Il existe deux formes distinctes de la maladie: une forme héréditaire et une forme sporadique. Sous sa forme héréditaire, laquelle représente près de 40% des cas, les tumeurs apparaissent de façon bilatérale, peuvent se présenter en foyers multiples, et apparaissent à un très jeune âge. Des rétinoblastomes bilatéraux sont quelques fois diagnostiqués chez des nouveaux-nés. Sous la forme sporadique, les tumeurs sont unilatérales, à foyer unique et apparaissent généralement vers l'âge de deux ans.

L'observation de rétinoblastomes au sein d'une même famille a été rapportée dans la littérature depuis 1821 et ces cas familiaux suggéraient que la susceptibilité au rétinoblastome pouvait être transmise par les cellules germinales (Vogel, 1979). Par analyse statistique, Knudson avait prédit que ce cancer était produit par deux événements génétiques successifs qui donnaient naissance au phénotype néoplasique (Knudson, 1971). Par la suite, Comings (1973) a suggéré que les deux mutations inactivaient les deux allèles d'un seul gène responsable de la suppression du rétinoblastome (Comings, 1973). Ces observations ont permis d'établir le modèle suivant. Dans les cas familiaux, une de ces mutations serait transmise par les cellules germinales, la deuxième apparaissant de façon indépendante durant le développement. Dans les cas sporadiques, les deux allèles du même gène suppresseur seraient inactivées dans une même cellule par des mutations indépendantes au cours du développement.

Des analyses de caryotypes sur des patients atteints de la forme héréditaire du rétinoblastome ont démontré que les deux événements successifs se produisaient en position 13q14 (Benedict *et al.*, 1983). Le gène du rétinoblastome humain a été cloné grâce à ces informations (Dryja *et al.*, 1986; Friend *et al.*, 1986; Fung *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987). Il couvre 200 kb d'ADN et contient 27 exons qui codent pour une phosphoprotéine nucléaire de 928 acides aminés, qui est exprimée de

façon ubiquitaire (Friend *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1987). Puisque la perte de Rb était associée au développement de rétinoblastome, les chercheurs ont alors suggéré que le gène était impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire. Depuis, des mutations dans le gène du rétinoblastome ont été impliquées dans plusieurs cancers chez l'humain dont les ostéosarcomes, le cancer du poumon, du sein, de la vessie et de la prostate (revue par Weinberg, 1991). Une preuve plus directe du rôle de Rb comme gène suppresseur a été apportée par l'introduction du gène du rétinoblastome dans une lignée cellulaire Rb  $-/-$  qui résulte en sa perte de tumorigénécité (Bookstein *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1988).

## 4.2 DOMAINES FONCTIONNELS DE pRb

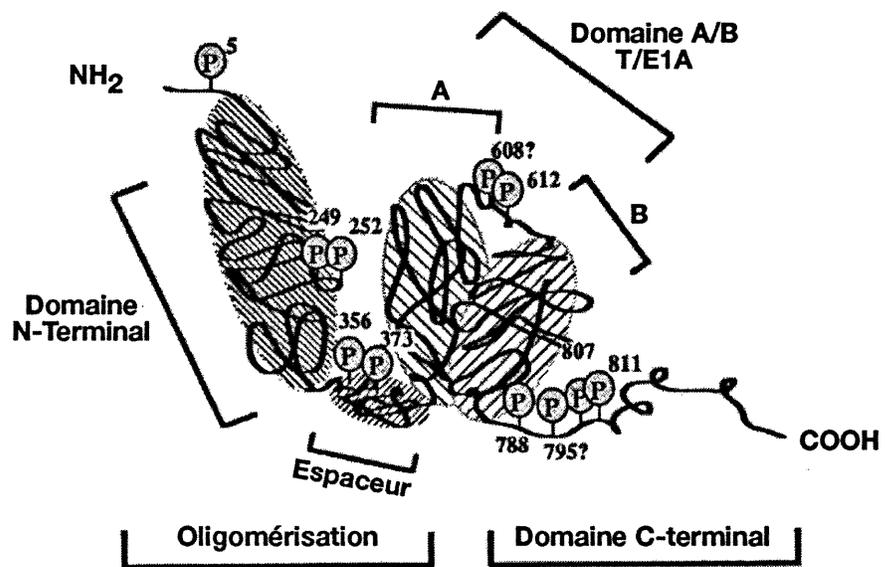
On a démontré que le produit du gène suppresseur du rétinoblastome interagit avec plusieurs protéines cellulaires et virales. Des études de liaison *in vitro* ont permis de définir plusieurs domaines fonctionnels de pRb impliqués dans les interactions protéines-protéines. La figure 9 illustre les différents domaines structuraux de la protéine et permet de mieux visualiser ses interactions avec d'autres protéines cellulaires ou virales. Le premier domaine à être décrit est le domaine A/B ou poche T/E1A, qui comprend deux régions distinctes de la protéine le domaine A et le domaine B, séparés par une séquence située entre les acides aminés 573 et 645. Le deuxième domaine est le domaine C-terminal, entre les acides aminés 768 à 928, lequel fonctionne de façon indépendante du domaine A/B. Finalement, le domaine N-terminal de la protéine, entre les acides aminés 1 et 378, est aussi impliqué dans les interactions protéines-protéines.

### 4.2.1 Domaine A/B

Le premier domaine identifié chez pRb est constitué de deux régions distinctes d'acides aminés, le domaine A (entre les acides aminés 379 et 572) et le domaine B (entre les acides aminés 646 et 772) qui forment une structure propice à la liaison de protéines et que l'on appelle la poche A/B ou T/E1A. Cette structure a d'abord été définie comme site de liaison pour deux oncoprotéines virales, E1A et l'antigène grand T de SV40 (Hu *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; Kaelin *et al.*, 1990).

**FIGURE 9****REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE DE LA PROTÉINE Rb HUMAINE.**

La protéine peut être divisée en au moins quatre domaines qui sont représentés par les portions ombragées. Le domaine N-terminal (les acides aminés 1-379) est important pour l'oligomérisation de la protéine *in vitro* et n'est pas nécessaire pour son activité suppressive dans les cellules SAOS-2. Le domaine A/B, ou pochette T/E1A, est formé de deux régions non continues, les sous-domaines A (entre les acides aminés 379-572) et B (entre les acides aminés 646-772) et est nécessaire pour la liaison du facteur de transcription E2F et des diverses oncoprotéines virales. Les sous-domaines A et B sont séparés par le domaine de l'espaceur (entre les acides aminés 572-646) qui n'interagit avec aucune protéine. Le domaine C-terminal (entre les acides aminés 772-928) possède des résidus qui peuvent contribuer à la liaison de protéines par le domaine A/B, est en mesure d'interagir avec la protéine kinase c-abl et contient un signal de localisation nucléaire. Les sites potentiels de phosphorylation sont indiqués par la lettre P, de même que la position des résidus sérine et thréonine correspondants. Tiré de Goodrich et Lee (1993).



Le domaine A/B interagit avec plusieurs protéines cellulaires dont le facteur de transcription E2F (Chellappan *et al.*, 1991; Kaelin *et al.*, 1991). Toutes les mutations naturelles ayant pour effet la perte de fonction de pRb donnant une protéine stable se situent dans le domaine A/B, ce qui en souligne l'importance (Bookstein *et al.*, 1990; Horowitz *et al.*, 1989; Hu *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; Kaelin *et al.*, 1990; Templeton *et al.*, 1991). De plus, tous ces mutants sont incapables de lier les oncoprotéines virales et ne sont pas phosphorylés pendant le cycle cellulaire.

Un domaine A/B fonctionnel est nécessaire, mais n'est pas suffisant, pour que pRb ait une activité suppressive de la croissance cellulaire. L'expression de la protéine pRb complète cause un arrêt en G1 lorsqu'elle est exprimée de façon ectopique dans des cellules Saos-2 (une lignée cellulaire qui n'exprime pas de pRb endogène) mais l'expression d'une protéine tronquée contenant seulement le domaine A/B est sans effet sur la progression du cycle cellulaire (Hiebert, 1993; Qin *et al.*, 1992). Dans les cellules Saos-2, l'arrêt du cycle cellulaire en G1 nécessite l'expression ectopique de pRb contenant non seulement le domaine A/B mais aussi le domaine C-terminal (Hiebert, 1993).

Il est maintenant clair que le produit du gène suppresseur du rétinoblastome fait partie d'une famille de protéines contenant un domaine A/B. Deux de ces protéines ont été clonées, p107 et p130, grâce à l'homologie qu'elles démontrent dans les domaines A et B (Mayol *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1993).

#### 4.2.2 Le domaine de l'espaceur

Les domaines A et B sont séparés par une séquence de 75 acides aminés (Hu *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990). De petites délétions dans cette séquence n'affectent pas l'activité de pRb, mais sa délétion complète inactive la capacité de pRb à lier les protéines virales (Hu *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990). La séquence de l'espaceur peut être remplacée par une séquence aléatoire de longueur identique, ce qui restaure l'activité de la protéine (Hu *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; Qian *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que la fonction de l'espaceur est de garder un espace déterminé entre les domaines A et B, nécessaire à la formation de la poche A/B. Aucune protéine connue n'interagit avec ce domaine de pRb mais les domaines de l'espaceur des autres protéines de la famille de Rb, p107 et p130, sont en mesure de lier la cycline A (Ewen *et al.*, 1992; Faha *et al.*, 1992).

### 4.2.3 Le domaine C-terminal

La région de pRb nécessaire à sa phosphorylation a été cartographiée à l'extérieur du domaine minimal A/B (Hamel *et al.*, 1990; Hamel *et al.*, 1992; Lees *et al.*, 1991). Les régions à l'extérieur du domaine minimal de liaison semblent déterminer la conformation de pRb et réguler sa fonction. Ainsi, plusieurs études révèlent une corrélation entre la grande poche de pRb (les domaines A et B ainsi que toutes les séquences C-terminales de la protéine) et plusieurs propriétés biologiques et fonctionnelles de pRb. Par exemple, la grande poche est suffisante pour conférer la capacité d'inhiber la croissance cellulaire par pRb (Goodrich *et al.*, 1991; Qin *et al.*, 1992), pour interagir avec le facteur de transcription E2F *in vitro* (Hiebert *et al.*, 1992; Qin *et al.*, 1992) et pour interagir avec les cyclines de type D *in vitro* et *in vivo* (Dowdy *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1993).

Le domaine C-terminal de pRb, entre les acides aminés 768-928, a également la capacité d'interagir avec la tyrosine kinase c-abl (Welch et Wang, 1993). La liaison de c-abl à pRb se fait par un mécanisme différent de la liaison du facteur de transcription E2F ou de la cycline D. En effet, la liaison de c-abl n'est pas affectée par les oncoprotéines virales qui déplacent les protéines liées à la poche T/E1A. Les domaines A/B et C-terminal peuvent donc interagir avec différentes protéines de façon simultanée (Welch et Wang, 1993). En effet, pRb peut lier l'antigène grand T de SV40 et c-abl simultanément (Welch et Wang, 1993).

### 4.3 pRb ET LE CONTRÔLE DU CYCLE CELLULAIRE

Le gène suppresseur du rétinoblastome exerce son influence au début de la phase G1 du cycle cellulaire. Dans la phase G1 du cycle cellulaire, on retrouve pRb sous une forme sous-phosphorylée. Par ailleurs, l'analyse de pRb pendant les dernières heures de la phase G1, indique que la protéine est au contraire hyperphosphorylée. La protéine pRb maintient cet état d'hyperphosphorylation au cours du reste du cycle cellulaire jusqu'à la phase M où elle est subitement déphosphorylée.

Plusieurs évidences suggèrent que la forme sous-phosphorylée de pRb est responsable de son activité inhibitrice à la progression du cycle cellulaire:

- 1- les oncoprotéines virales éliminent la fonction biologique de pRb en liant et séquestrant la forme sous-phosphorylée de pRb, ignorant les formes hyper-phosphorylées.
- 2- la forme sous-phosphorylée contrôle un certain nombre de protéines cellulaires, dont particulièrement certains facteurs de transcription nécessaires à la progression du cycle cellulaire.
- 3- les conditions responsables de la phosphorylation de pRb entraînent la prolifération cellulaire.

L'état de phosphorylation de pRb suggère un modèle fonctionnel de régulation du cycle cellulaire. La cellule qui passe à travers la phase G1 du cycle cellulaire arrive à une porte, le point R, qui est fermée par pRb. Si les conditions sont propices, pRb est phosphorylé et inactivé, ce qui permet à la cellule d'avancer en phase G1 vers la phase S. Ainsi, l'inactivation de pRb permet aux cellules de traverser la phase G1 vers la phase S sans le contrôle normalement imposé par Rb et sans les influences qui régissent sa phosphorylation. Les facteurs qui influencent la phosphorylation de pRb incluent des facteurs qui promouvoient la croissance cellulaire tels que les agents mitogènes de même que les agents inhibiteurs de la croissance comme le TGF $\beta$  et l'inhibition de contact. En perdant pRb, ces signaux physiologiques perdent leur habileté à contrôler la progression du cycle cellulaire de façon ordonnée.

#### 4.3.1 Contrôle de la phosphorylation de pRb

L'analyse phosphopeptidique de pRb suggère que plus d'une douzaine de sites, des sérines et des thréonines, sont phosphorylés. La nature des kinases impliquées dans ces événements de phosphorylation est encore inconnue.

Les séquences en acides aminés des sites de phosphorylation de pRb sont typiques à celles modifiées par les CDKs (Lees *et al.*, 1991). Les cyclines de la phase

G1, qui servent d'éléments de régulation de leurs CDKs respectives, déterminent la spécificité de l'holoenzyme pour leurs substrats.

Les cyclines de type D (D1, D2 et D3), lesquels régulent l'action des kinases CDK4 et CDK6, sont les plus susceptibles d'être impliquées dans la phosphorylation de pRb. L'incubation de cyclines D avec CDK4 ou 6 et une protéine de fusion GST/Rb entraîne sa phosphorylation *in vitro* (Ewen *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993). De plus, différents régulateurs physiologiques qui interfèrent avec l'action des CDKs bloquent aussi la phosphorylation de pRb *in vivo*. Les cyclines de type D sont uniques à cause de leur capacité à former des complexes avec pRb par la séquence conservée L-X-C-X-E, ou X peut-être n'importe quel acide aminé (Dowdy *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1993).

Le complexe cycline E/CDK2 pourrait aussi phosphoryler pRb *in vivo*. L'expression ectopique de la cycline E dans des cellules humaines dérivées d'ostéosarcomes induit la phosphorylation de pRb (Hinds *et al.*, 1992). De plus, dans la plupart des cellules, le niveau d'ARNm codant pour la cycline E augmente de façon dramatique au milieu de la phase S, au même moment où pRb est phosphorylé (Koff *et al.*, 1991; Lew *et al.*, 1991).

Il est intéressant de noter que pRb est phosphorylé normalement dans les cellules transformées par les virus à ADN oncogènes (DeCaprio *et al.*, 1989). Dans ces cellules, l'oncoprotéine virale occupe chez pRb le site que les cyclines de type D occupent normalement (DeCaprio *et al.*, 1989). Ces résultats suggèrent que certains complexes cycline/CDKs, qui ne dépendent pas de leur association à pRb, peuvent aussi participer à sa phosphorylation en phase G1. En particulier, le complexe cycline E/CDK2 pourrait participer à la phosphorylation de pRb de façon tardive en phase G1 du cycle cellulaire.

La nature précise de la collaboration entre les complexes cyclines D et E/CDKs dans la phosphorylation de pRb reste obscure. Un modèle simple de la régulation de la phosphorylation de pRb suggère que les complexes cyclines D/CDK4 ou CDK6 sont responsables de la phosphorylation initiale de pRb. Les résidus phosphorylés sont maintenus dans cet état par le complexe cycline E/CDK2. D'autre part, les complexes cyclines D/CDK4 ou D/CDK6 pourraient modifier pRb de façon que celui-ci devienne un substrat plus spécifique pour le complexe cycline E/CDK2.

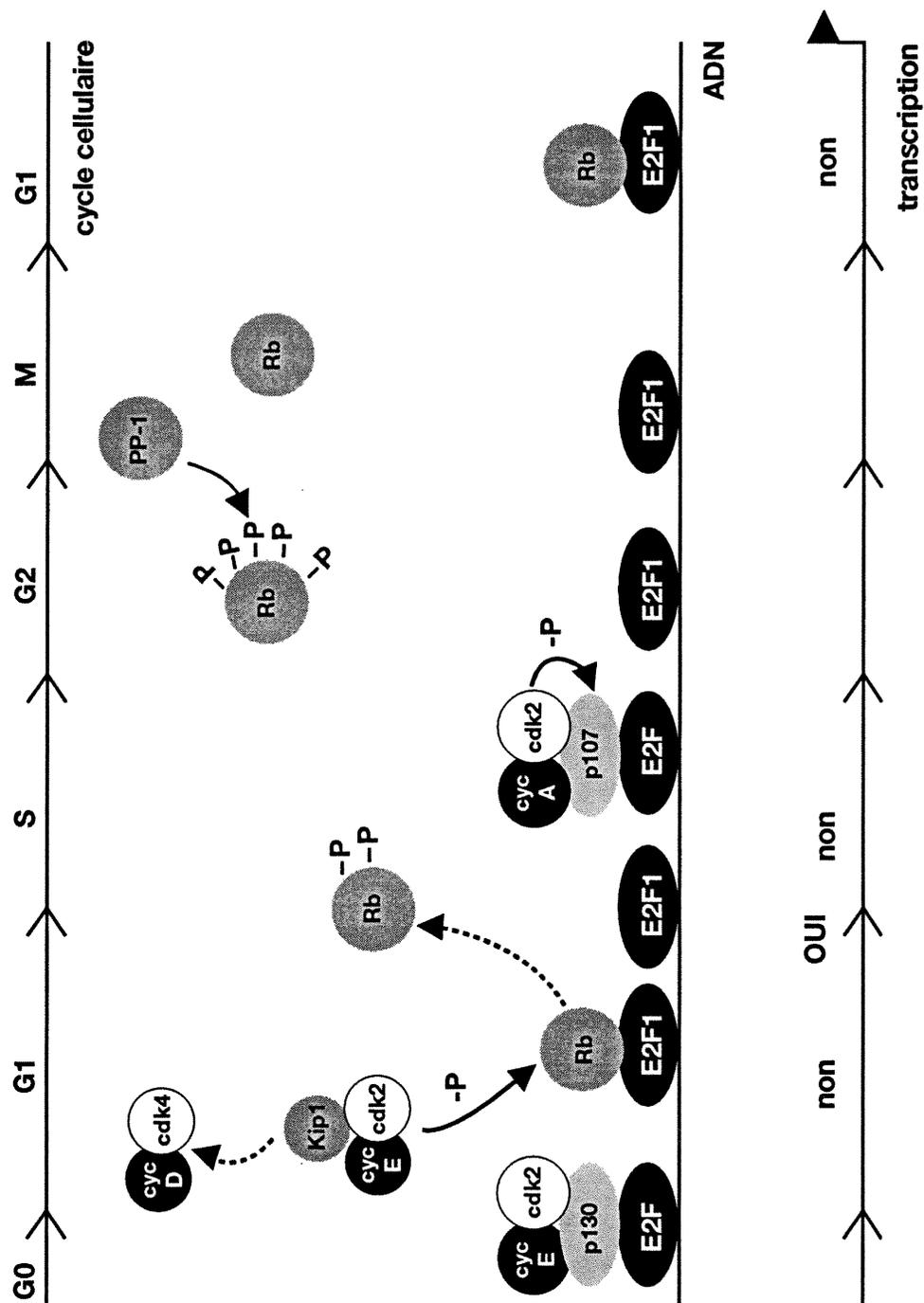
Un aspect intéressant de la régulation de pRb par la phosphorylation est sa localisation cellulaire en fonction de sa phosphorylation. Durant la phase G1, alors que pRb est hypophosphorylé, la protéine est ancrée au noyau et la phosphorylation de pRb en G1/S entraîne la perte de cette association (Mittnacht et Weinberg, 1991; Templeton, 1992; Templeton *et al.*, 1991). Les mutants du domaine A/B, qui sont incapables de lier les oncoprotéines virales, sont transportés vers le noyau mais n'y sont pas ancrés (Mittnacht et Weinberg, 1991; Templeton *et al.*, 1991). L'association au noyau semble être régulée par l'état de phosphorylation de pRb. L'incubation de pRb hypophosphorylé avec des noyaux déficients pour pRb amène son association avec le noyau alors que l'addition de pRb hyperphosphorylé n'entraîne pas son association au noyau (Templeton, 1992). De plus, les noyaux de cellules quiescentes ou de cellules en G1, qui ne contiennent que pRb hypophosphorylé, démontrent un marquage beaucoup plus intense en immunofluorescence que les cellules en phase S ou G2 (Mittnacht et Weinberg, 1991). On a démontré que les lamines A et C peuvent interagir avec pRb *in vitro* (Mancini *et al.*, 1994). La capacité de pRb à s'associer au noyau pourrait donc être une caractéristique importante de pRb nécessaire à la régulation du cycle cellulaire.

#### 4.3.2 Fonction biochimique de pRb: contrôle de la transcription par E2F

La forme sous-phosphorylée de pRb est capable de lier et de former un complexe avec le facteur de transcription E2F (Chellappan *et al.*, 1991). La phosphorylation de pRb modifie l'interaction entre pRb et E2F. Cette modification résulte en la dissociation du complexe pRb/E2F ce qui libère le facteur de transcription qui est alors en mesure d'activer la transcription des gènes sous son contrôle (Chellappan *et al.*, 1991). Il est maintenant établi que E2F est en fait une famille de facteurs de transcription étroitement liés. Le facteur de transcription E2F est un hétérodimère formé d'une protéine de la famille E2F (E2F-1,2,3,4 ou 5) et d'une protéine de la famille DP (DP1, 2 ou 3) (La Thangue, 1994). Le facteur de transcription E2F lie la séquence consensus TTTCGCGC qui a été identifiée dans plusieurs promoteurs de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et de la synthèse de l'ADN dont notamment *c-myc*, B-myb, cdc2, DHFR, TK, TS et les promoteurs du facteur de transcription E2F-1 lui-même (La Thangue, 1994; Nevins, 1992). Selon le modèle actuel, illustré à la figure 10, pRb régule l'expression de certains gènes

**FIGURE 10****REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES COMPLEXES CYCLINE/CDKS IMPLIQUÉS DANS LA PHOSPHORYLATION DE pRb AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE ET DE L'INTERACTION ENTRE p130, pRb, p107 ET DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION E2F**

Le complexe p130/E2F (E2F-5) se retrouve principalement au cours de la phase G0 et au début de la phase G1. Le complexe pRb/E2F est présent au cours de la transition G1/S et est phosphorylé par le complexe cycline D/CDK4, cycline D/CDK6 ou cycline E/CDK2. Ces complexes pourraient aussi collaborer pour phosphoryler pRb. La déphosphorylation de pRb libère le facteur de transcription E2F (E2F-1, -2, ou -3) qui est alors en mesure d'activer la transcription des gènes nécessaires à la progression G1/S. PP-1 représente la protéine phosphatase de type 1 qui lie pRb et pourrait catalyser sa déphosphorylation. pRb déphosphorylé est de nouveau en mesure de lier et d'inhiber l'activité transcriptionnelle de E2F. On retrouve le complexe p107/E2F (E2F-4 ou -5) en G1/S et G2. Les conséquences fonctionnelles de la phosphorylation de ce complexe p107/E2F par le complexe cycline A/CDK2 n'est pas connue. La lettre P indique la phosphorylation.



impliqués dans la progression du cycle cellulaire et de la synthèse de l'ADN en séquestrant le facteur de transcription E2F. Mais ce scénario est maintenant beaucoup plus complexe avec l'arrivée en scène des protéines de la famille de pRb: p107 et p130. Ces protéines régulent aussi l'activité transcriptionnelle des membres de la famille du facteur de transcription E2F et leur surexpression peut causer un arrêt du cycle cellulaire en G1. La protéine p130 semble impliquée dans la régulation de l'activité transcriptionnelle pendant la transition G0/G1 du cycle cellulaire (Cobrinik *et al.*, 1993) alors que p107 exerce son influence au cours de la transition G1/S et en G2. Des cinq facteurs de transcription de la famille E2F, E2F-1, E2F-2 et E2F-3 lient la forme hypophosphorylée de pRb alors que E2F4 et E2F5 ne lient pRb que faiblement. E2F4 et E2F5 lient fortement p107 et p130 (Beijersbergen *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1992; Cobrinik *et al.*, 1993; Dyson *et al.*, 1993; Ginsberg *et al.*, 1994; Lees *et al.*, 1993; Shirodkar *et al.*, 1992). Il est donc possible que deux voies biochimiques parallèles existent et cette possibilité soulève beaucoup de questions. Il n'est pas clair si les différents facteurs de transcription E2F ciblent les mêmes gènes ou s'ils sont spécialisés dans le contrôle d'un sous-groupe de gènes pouvant répondre à E2F. De plus, comme nous l'avons illustré à la figure 4, chaque protéine de la famille de pRb forme des complexes spécifiques à des périodes précises du cycle cellulaire, ce qui suggère que les différents complexes pourraient assurer le contrôle de gènes spécifiques durant cette période.

La nature du mécanisme de régulation des facteurs de transcription de la famille E2F est aussi beaucoup plus subtile que la simple séquestration et libération du facteur de transcription pendant le cycle cellulaire. Plusieurs études ont démontré que les complexes pRb/E2F, p107/E2F et p130/E2F pouvaient lier la séquence consensus TTTTCGCGC que l'on retrouve dans plusieurs promoteurs sous le contrôle de E2F (La Thangue, 1994; Nevins, 1992). Ces résultats suggèrent que la liaison à pRb, p107 ou p130 n'empêche pas le facteur de transcription E2F de se lier à l'ADN. pRb peut donc agir directement sur le promoteur en utilisant E2F pour se lier. Ainsi, plusieurs expériences suggèrent que pRb peut effectivement réprimer la transcription de gènes où le complexe pRb/E2F est lié. La dissociation du complexe pRb/E2F de l'ADN du site de liaison E2F peut par la suite libérer ce promoteur de la répression transcriptionnelle médiée par pRb (Hiebert *et al.*, 1992; Lam et Watson, 1993; Weintraub *et al.*, 1992).

### 4.3.3. Autres voies biochimiques régulées par pRb

Le rôle de pRb ne se réduit pas à la simple régulation du facteur de transcription E2F. pRb est une protéine nucléaire qui est deux fois plus abondante que le facteur de transcription E2F (Weinberg, 1995). pRb a été impliqué dans la régulation d'un certain nombre d'autres molécules effectrices dont Elf-1, MyoD, PU.1, ATF-2, et c-abl (Wang *et al.*, 1994). L'effet de la plupart de ces implications reste inconnu. L'interaction de pRb avec c-abl est particulièrement intéressante. Le domaine C-terminal de la forme sous-phosphorylée de pRb lie directement le domaine catalytique de la kinase c-abl et bloque sa fonction tandis que la forme hyperphosphorylée de pRb perd cette habileté (Welch et Wang, 1995; Welch et Wang, 1993). Ce domaine C-terminal est unique à pRb et ne se retrouve pas chez les autres membres de cette famille de protéine comme p107 (Ewen *et al.*, 1991). De plus, la capacité du domaine C-terminal de pRb à lier c-abl n'est pas affectée par les oncoprotéines virales (Welch et Wang, 1993).

En liant plusieurs effecteurs comme E2F et c-abl, pRb pourrait être en mesure de moduler l'activité de plusieurs voies biochimiques différentes. Ainsi, pRb peut interagir avec différentes protéines cellulaires de trois façons différentes:

- 1- Par le domaine A/B, comme le font les oncoprotéines virales et le facteur de transcription E2F.
- 2- Par les domaines A/B et C-terminal par son interaction avec les cyclines de type D.
- 3- Par le domaine C-terminal par son interaction avec la protéine kinase c-abl.

Cependant, plusieurs évidences suggèrent que la régulation de l'activité transcriptionnelle de E2F par pRb est sa fonction la plus importante. L'expression ectopique du facteur de transcription E2F-1 seul permet aux cellules de quitter l'état de quiescence et de traverser la phase G1 pour atteindre la phase S et induire la synthèse de l'ADN (Johnson *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 1994; Shan et Lee, 1994). De plus, l'introduction d'un vecteur permettant l'expression de E2F-1 dans des cellules humaines, dérivées d'un ostéosarcome, permet d'outrepasser un bloc de la prolifération cellulaire imposé par pRb (Qin *et al.*, 1994). Un lien direct entre E2F-1

et le cancer vient d'être établi par Saito *et al.*, (1995) qui ont décrit l'amplification du gène codant pour le facteur de transcription E2F-1 et sa sur-expression dans la lignée cellulaire érythroleucémique HEL (Saito *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent que la modulation de l'expression de E2F est un événement déterminant de la progression en G1 vers la phase S et pourrait même être le seul effecteur limitant la progression du cycle cellulaire par l'action de pRb en G1.

#### 4.3.4 pRb, intégrateur des signaux positifs régulant la croissance cellulaire

pRb est à la croisée des chemins régissant le cycle cellulaire, recevant d'une part une série de signaux convergeant vers lui et répondant à ces signaux en régulant l'activité d'un certain nombre d'effecteurs, comme E2F et *c-abl*, situés en aval dans cette voie biochimique.

Les signaux physiologiques qui favorisent la prolifération cellulaire devraient entraîner la phosphorylation de pRb. La plupart de ces signaux originent des agents mitogènes qui interagissent avec les récepteurs de la membrane cellulaire et activent différentes voies cytoplasmiques impliquées dans la transduction de signaux, pour finalement apporter le signal stimulant la croissance cellulaire jusqu'au noyau. La relation existant entre les différentes voies biochimiques impliquées dans la transduction de signaux est encore bien peu connue.

L'action de la cycline D est la plus connue. La cycline D contribue de façon importante à la phosphorylation de pRb par sa liaison avec les CDKs. Comme la protéine *c-myc*, sa demi-vie est très courte, de l'ordre de 15 minutes, et son niveau d'expression décline rapidement lorsqu'on enlève les agents mitogènes du milieu de culture (Matsushime *et al.*, 1991; Sherr, 1993). Ces résultats suggèrent qu'au milieu de la phase G1, quand pRb est sur le point d'être phosphorylé, la machinerie cellulaire est en mesure d'évaluer le niveau d'agents mitogènes présents dans l'environnement extracellulaire en déterminant le niveau de cycline D1. Des niveaux de cycline D dépassant un seuil critique favoriseraient la phosphorylation de pRb et des niveaux de cycline D1 sous le seuil critique rendraient cette étape difficile.

L'activité d'une CDK est contrôlée par son association avec les cyclines et par la phosphorylation du polypeptide CDK lui-même. Par exemple, le résidu thréonine 160 de la CDK2 est phosphorylé et cette modification est essentielle pour son activité enzymatique (Desai *et al.*, 1992; Solomon *et al.*, 1992). Cette phosphorylation est effectuée par un complexe enzymatique appelé CAK (Cyclin-dépendant Kinase-activating kinase) qui est lui-même constitué d'une CDK (Mo15, maintenant appelé CDK7) et d'une cycline (la cycline H) (Fisher et Morgan, 1994; Mäkalä *et al.*, 1994).

#### 4.3.5 pRb, intégrateur des signaux négatifs régulant la croissance cellulaire

Nous savons que plusieurs signaux physiologiques inhibent la phosphorylation de pRb et de cette façon bloquent la progression du cycle cellulaire à travers le point R et tardivement en G1 (Wang *et al.*, 1994). Ces signaux ne semblent pas agir sur pRb directement mais modulent plutôt l'activité des complexes cycline/CDKs qui sont responsables de sa phosphorylation. On a démontré que trois mécanismes moléculaires pouvaient bloquer la phosphorylation de pRb: la régulation par TGF $\beta$ , par l'AMP cyclique (AMPC) et par l'inhibition de contact. Dans chaque cas, un signal de croissance négatif mobilise un inhibiteur de CDK (un Cyclin-dépendant kinase inhibitor, ou CDKI) qui s'associe avec la CDK ou avec le complexe cycline/CDK et bloque sa fonction.

Trois mécanismes moléculaires ont été proposés pour expliquer la capacité de TGF $\beta$  de bloquer la phosphorylation de pRb. Le premier implique p27Kip1, un CDKI qui interagit avec CDK2, CDK4 et CDK6 et qui empêche leur activation par CAK (Polyak *et al.*, 1994; Slingerland *et al.*, 1994; Toyoshima et Hunter, 1994). Alors que les niveaux de p27Kip1 ne sont pas affectés par TGF $\beta$ , la CDK2 de cellules traitées au TGF $\beta$  est associée à p27Kip1, ce qui suggère une forme de régulation post-transcriptionnelle (Ewen *et al.*, 1993; Polyak *et al.*, 1994).

Un deuxième mécanisme est suggéré par la découverte que TGF $\beta$  peut induire l'expression de p15INK4B, un autre CDKI, par un facteur de plus de 30 fois. p15 cible CDK4 et CDK6 en compétitionnant avec les cyclines D pour la liaison à CDK4/6 (Hannon et Beach, 1994). Des résultats plus récents suggèrent que p15 et p16INK4A peuvent seulement inhiber la prolifération cellulaire de cellules possédant une protéine Rb fonctionnelle (Guan *et al.*, 1994; Serrano *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent que

la seule cible physiologique des complexes cyclines D/CDK4 ou CDK6 est pRb. Ainsi l'augmentation de l'expression de p15 par TGF $\beta$  et l'inhibition des CDK4 et CDK6, ont pRb comme cible finale.

TGF $\beta$  réduit aussi de façon dramatique le niveau de CDK4 dans certains types de cellules (Ewen *et al.*, 1993). Cela a aussi pour effet de bloquer la phosphorylation de pRb par le complexe cyclineD/CDK4. Le niveau de CDK4 ainsi réduit peut entraîner la libération de p27Kip inhibant ainsi l'activité d'autres CDKs. L'inhibition de contact et l'AMPc semblent aussi impliquer p27Kip (Kato *et al.*, 1994; Polyak *et al.*, 1994). Les résultats de ces différents mécanismes d'inhibition de croissance sont les mêmes: ils convergent tous vers pRb en bloquant sa phosphorylation et prévenant ainsi le passage par le point R, la progression du cycle cellulaire et la synthèse de l'ADN.

Les radiations et autres agents pouvant causer des dommages à l'ADN peuvent aussi bloquer la phosphorylation de pRb par un autre CDKI appelé p21, WAF, Cip1 ou SDI (Dulic *et al.*, 1994; El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993). La cellule ayant subi des lésions génétiques en S, G2, M ou en début de la phase G1 est bloquée en G1 par pRb ce qui permet à la machinerie cellulaire impliquée dans la réparation de l'ADN de restaurer l'intégrité génomique. Une fois les lésions à l'ADN réparées, le bloc imposé en G1 par pRb est enlevé ce qui permet à la cellule de progresser en phase S et de répliquer son génome. Si les lésions à l'ADN sont irréparables, la cellule peut alors s'engager dans la voie de la mort cellulaire programmée, ou apoptose.

Dans ces mécanismes de régulation de pRb face au dommages à l'ADN, un autre gène suppresseur, p53, joue le rôle d'intermédiaire. Après des dommages infligés à l'ADN, le niveau protéique de p53 augmente rapidement et sa demi-vie, qui est normalement d'environ 15 minutes, est stabilisée. On sait maintenant que p53 active l'expression de la CDKI p21 et que p21 bloque l'activité de CDK2, CDK4 et CDK6 (Hall *et al.*, 1993; Kastan *et al.*, 1991). Comme les autres signaux négatifs de prolifération cellulaire, ce mécanisme a pour effet de prévenir la phosphorylation de pRb et de bloquer le passage de la cellule au point R.

#### 4.4 MODÈLE DE LA RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE PAR pRb

L'interaction des cyclines, des CDKs, des CDKI et de pRb a pour effet d'établir une horloge biologique qui règle la progression ordonnée du cycle cellulaire. Ce modèle, utilisant les différentes composantes de l'horloge biologique, permet d'imaginer divers types de régulation pouvant expliquer la progression du cycle cellulaire.

Le premier mécanisme opérerait au milieu de la phase G1 et utiliserait l'activation de la cycline D/CDK4 et D/CDK6 comme événement déclencheur de la progression du cycle cellulaire. Ce modèle, illustré à la figure 11, propose que l'inhibiteur de CDK, p27Kip, est exprimé à des niveaux constants au cours de la phase G1. Tôt en G1, tous les complexes cyclines D/CDK4 et D/CDK6 présents sont associés et inactivés par p27Kip, qui est initialement présent en excès. Les niveaux de cycline D/CDK4 et D/CDK6 augmentent graduellement au cours de G1 et finissent éventuellement par excéder un seuil critique où ils ne sont plus en mesure d'être inhibés par p27Kip. Cet excédent de complexes cyclines D/CDK4 et D/CDK6 est alors capable d'être phosphorylé par CAK et ainsi activé, initie la phosphorylation de pRb et permet de passer le point R.

Un deuxième mécanisme impliquerait la CDKI p16INK4 qui lie CDK4 et CDK6 et est illustré à la figure 12. On a découvert que p16 est surexprimé dans les cellules qui sont transformées par les virus à ADN oncogènes et qui contiennent un pRb inactivé (Serrano *et al.*, 1993). De plus, pRb régule négativement le promoteur du gène codant pour p16 (Li *et al.*, 1994). Finalement, l'expression de p16 augmente fortement à la fin de G1, après que pRb ait été inactivé par sa phosphorylation (Tam *et al.*, 1994).

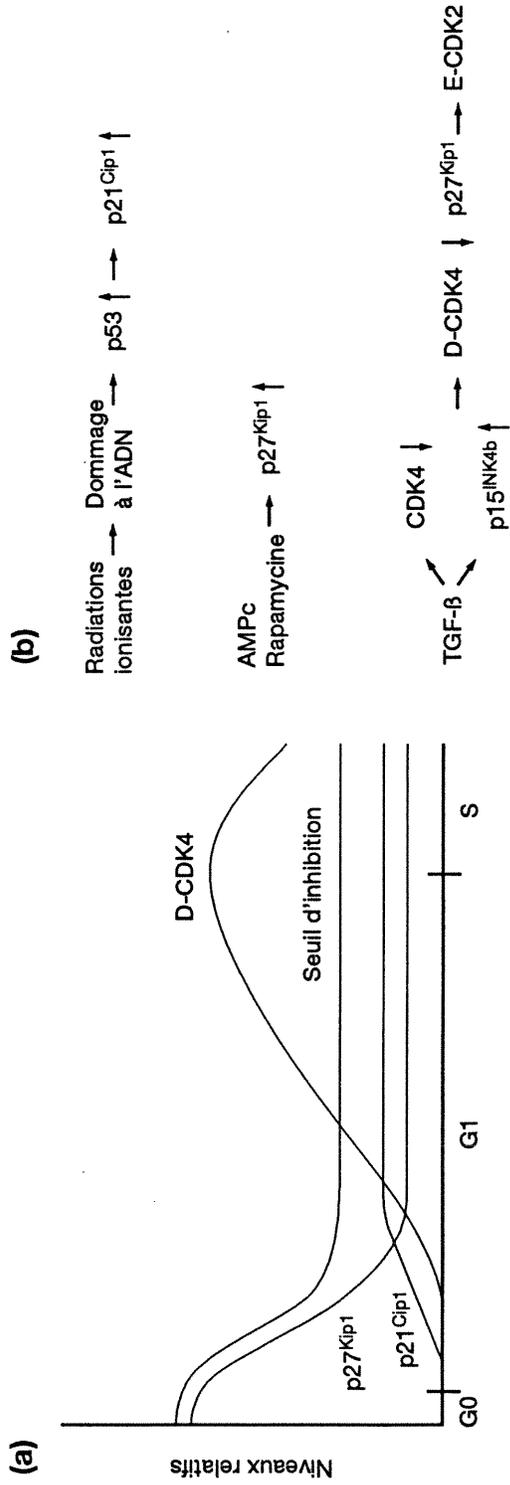
Ces observations permettent de suggérer le modèle suivant::

- 1- Le complexe cycline D/CDK4, ou D/CDK6, entraîne la phosphorylation de pRb.
- 2- pRb, maintenant inactivé induit la transcription de p16.
- 3- p16 lie les complexes cyclines D/CDK4 et D/CDK6 en déplaçant la cycline D et en inactivant ainsi le complexe.

**FIGURE 11****MODÈLE DE LA RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ CYCLINE D/CDK4 AU COURS DE LA PHASE G1**

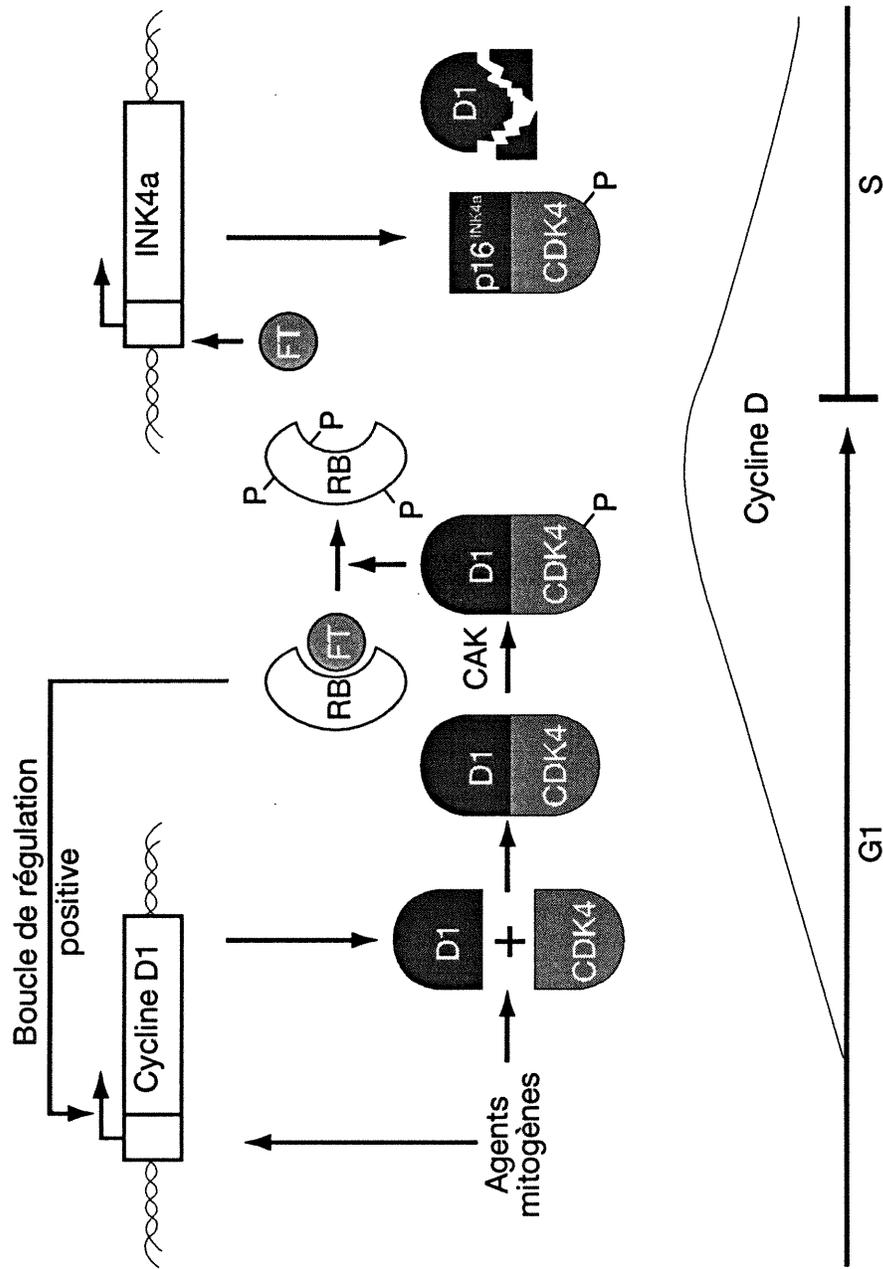
A) A l'entrée des cellules en G1, le niveau de p27Kip1 décline alors que celui de p21Cip1 augmente. Le niveau de ces deux protéines établit un seuil critique d'inhibiteur d'activité kinase. L'augmentation progressive du niveau de cycline D/CDK4 au cours de la phase G1 parvient à titrer ces inhibiteurs, jusqu'à ce que les niveaux de cycline D/CDK4 soient en mesure d'excéder ce seuil critique.

B) Plusieurs signaux antiprolifératifs peuvent affecter ce seuil critique. Les niveaux de p21Cip1 augmentent en réponse à l'induction de p53. Des analogues de l'AMP cyclique (AMPC) peuvent induire la synthèse de p27Kip1 dans certains types cellulaires. Le TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) inhibe la synthèse de CDK4 et induit l'expression de p15INK4b ce qui inhibe la formation de complexes cyclines D/CDK4 et permet à l'inhibiteur de kinase p27Kip1 d'inhiber l'activité du complexe cycline E/CDK2.



**FIGURE 12****MODÈLE DU CONTRÔLE DU POINT DE RESTRICTION EN G1 PAR LA CYCLINE D**

Les agents mitogènes induisent la synthèse de la cycline D et régulent son assemblage avec CDK4 (et CDK6 qui n'est pas représenté). Le complexe cycline D/CDK4 est activé par CAK et le complexe fonctionnel est en mesure de phosphoryler pRb. La phosphorylation de pRb libère le facteur de transcription E2F qui active les gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire et de la synthèse de l'ADN. Le complexe cycline E/CDK2 (qui n'est pas représenté) pourrait aussi contribuer à ce processus. De façon hypothétique, la transcription de p16INK4a permettrait d'inactiver CDK4 et d'induire la dégradation de la cycline D pendant la phase S. Dans les cellules où Rb est inactivé, les niveaux d'ARNm et de protéines pour la cycline D sont grandement diminués. L'expression ectopique de pRb dans ces cellules induit la synthèse de la cycline D1 endogène ce qui suggère que pRb régule positivement la transcription de la cycline D1 par un mécanisme encore inconnu. Les cellules tumorales qui n'expriment pas pRb expriment p16INK4a constitutivement et cet inhibiteur de kinase se retrouve complexé avec CDK4 au détriment des cyclines de type D. De plus, ces cellules n'ont plus besoin de cycline D1 pour entrer en phase S. FT: facteur de transcription.



- 4- La cycline D, qui n'est plus protégée par son association avec CDK4 ou CDK6, est dégradée, ce qui coïncide avec la fin de son activité tard en G1 (Tam *et al.*, 1994).

Ce mécanisme permet la participation de la cycline D dans la régulation du cycle cellulaire dans une fenêtre qui débute juste avant le point R et qui se termine à la fin de la transition des phases G1/S.

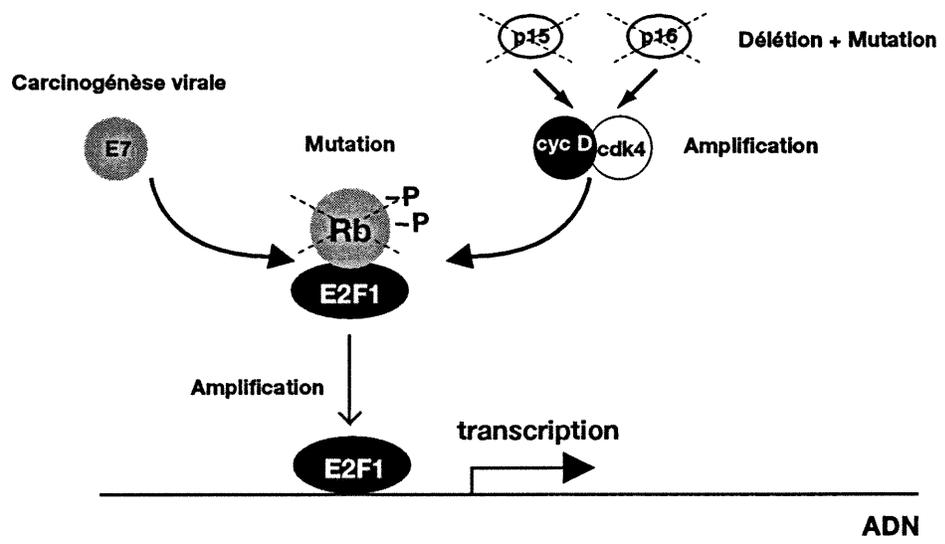
#### 4.5 pRb ET LE CANCER

Plusieurs voies biochimiques qui sont perturbées dans de nombreux cancers chez l'humain convergent en fait vers le gène suppresseur du rétinoblastome et sont illustrées à la figure 13.

Chez le rétinoblastome, le cancer du poumon à petites cellules, et chez plusieurs sarcomes, il y a perte de fonction de pRb suite à une mutation (Horowitz *et al.*, 1990). Dans la grande majorité des cancers du col de l'utérus, l'inactivation de pRb implique la protéine E7 du virus du papillome humain (Dyson *et al.*, 1989; zur Hausen, 1991). Dans plusieurs cancers de l'oesophage, du sein et des carcinomes à cellules épidermoïdes, le gène de la cycline D est amplifié (Jiang *et al.*, 1992; Lammie *et al.*, 1991). La cycline D1 est surexprimée dans les lymphomes des cellules B à cause d'une translocation chromosomique (Motokura *et al.*, 1991). Le gène CDK4 est amplifié dans plusieurs glioblastomes et dans quelques gliomes (He *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1994). On a aussi démontré que les gènes codant pour p15 et p16 peuvent être délétés dans plusieurs cancers, tel les carcinomes à cellules épidermoïdes de l'oesophage, glioblastomes, cancers du poumon, de la vessie et du pancréas (Caldas *et al.*, 1994; Jen *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 1994). De plus, des formes mutantes de p15 ou p16 sont présentes dans les cellules germinales de familles à haut risque de développer des mélanomes (Hussussian *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994). Finalement, on a observé que le gène codant pour le facteur de transcription E2F-1 est amplifié dans les lignées cellulaires érythroleucémiques HEL (Saito *et al.*, 1995).

**FIGURE 13****VOIES BIOCHIMIQUES CONVERGEANT VERS pRb QUI SONT PERTURBÉES  
DANS PLUSIEURS TYPES DE CANCER CHEZ L'HUMAIN**

Chez le rétinoblastome, le cancer du poumon à petites cellules et chez plusieurs sarcomes, la fonction de pRb est perdue directement suite à une mutation. Dans la majorité des cancers du col de l'utérus, pRb est inactivé par la protéine E7 de HPV. Chez plusieurs cancers de l'oesophage et de carcinomes à cellules épidermoïdes, il y a amplification du gène codant pour la cycline D1. Le gène CDK4 est amplifié dans plusieurs glioblastomes et dans quelques gliomes. Les gènes codant pour p15 et p16 sont délétés dans plusieurs types de cancers tel les carcinomes à cellules épidermoïdes de l'oesophage, des glioblastomes, des cancers du poumon, de la vessie et du pancréas. Finalement, le gène codant pour E2F-1 est amplifié dans les cellules érythroleucémiques HEL.



L'importance de cette voie biochimique de contrôle du cycle cellulaire par Rb et de sa dérégulation est soulignée par l'étude de 55 cancers du poumon à petites cellules. Dans ces tumeurs, l'expression de pRb était anormale dans 48 échantillons mais démontrait une expression normale de p16. Six des sept échantillons qui exprimaient pRb à des niveaux normaux démontraient une délétion de p16 (Otterson *et al.*, 1994).

Ainsi, dans tous les types de cancer énumérés plus haut, toutes les voies biochimiques perturbées convergent vers pRb et résultent en son inactivation fonctionnelle, soit par sa séquestration par une oncoprotéine virale, soit par la dérégulation de sa phosphorylation ou finalement, par son inactivation génétique par le biais d'une mutation. Ces événements ont pour conséquence directe la libération du facteur de transcription E2F et permettent le passage de la phase G1 en phase S en absence d'un élément de contrôle du cycle cellulaire.

Finalement, Almasan *et al.*, (1995) ont examiné la participation du gène de susceptibilité au rétinoblastome à contrôler la transition G1/S (Almasan *et al.*, 1995). Ils ont utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris (Mouse embryo fibroblasts: MEF) dont l'une (pRb +/-) ou les deux (pRb -/-) allèles du gène Rb étaient inactivées pour déterminer la contribution spécifique de Rb à la progression du cycle cellulaire et l'expression de gènes exprimés au cours du cycle cellulaire. Les MEFs dont les deux allèles du gène Rb sont inactivés entrent en phase S en présence d'un inhibiteur de la DHFR, le méthotrexate. Deux gènes cibles du facteur de transcription E2F, DHFR et la TS ont des niveaux élevés d'ARNm et de protéines dans les cellules pRb -/-. Puisque l'absence d'une protéine pRb fonctionnelle dans les MEFs est suffisante pour l'entrée en phase S dans des conditions limitant la croissance, ces résultats suggèrent que le complexe pRb/E2F, et non les complexes p107/E2F ou p130/E2F, est un facteur limitant dans la transition G1/S. Ces résultats sont en contradiction avec les études suggérant que pRb est un facteur mineur dans la formation de complexes avec E2F et que p107 et p130 sont les éléments majeurs des complexes avec E2F en G0 et au début et la fin de la phase G1 (Cobrinik *et al.*, 1993). Cependant, la perte de Rb a été impliquée dans de nombreux cas de cancer (Wang *et al.*, 1994) tandis que l'inactivation de p107 n'a été rapportée pour aucun cancer chez l'humain (Almasan *et al.*, 1995). De plus,

aucun phénotype particulier n'a été observé chez les souris transgéniques déficientes pour p107 (Almasan *et al.*, 1995). Il est toutefois possible que p107 et p130 jouent un rôle important dans la transition G1/S chez d'autres types cellulaires ou dans des conditions différentes que celles testées par Almasan *et al.*, (1995).

La présence de drogue antinéoplasique cause une accumulation de p53 dans les noyaux des cellules pRb +/+ et pRb -/-. L'induction de p53 entraîne l'apoptose dans les cellules pRb-/- mais non dans les cellules pRb+/- ou pRb +/+ qui démontrent un arrêt en G1. Ces résultats suggèrent que les différents signaux de croissance convergent vers pRb pour réguler l'entrée en phase S et qu'en absence de pRb, ces signaux activent une réponse d'apoptose dépendante de p53.

#### 4.6 RÔLE BIOLOGIQUE DE pRb AU COURS DU DÉVELOPPEMENT ET DE LA DIFFÉRENTIATION

La compréhension du rôle biologique de pRb a été grandement illuminée par les résultats d'expériences où Rb est inactivé chez diverses lignées de souris transgéniques. Les embryons homozygotes mutants pour Rb se développent de façon normale jusqu'au jour 12-13 de gestation où ils meurent et démontrent des anomalies du système hématopoïétique et du développement du système nerveux (Clarke *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994). A ce stade de développement, la plupart des décisions morphogénétiques ont été prises et effectuées en absence de pRb, une protéine qui est normalement exprimée de façon ubiquitaire et devrait contrôler la prolifération cellulaire dans l'embryon. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Il pourrait exister d'autres voies biochimiques, indépendantes de pRb, pouvant réguler la progression du cycle cellulaire et la différenciation. D'autres protéines de la famille de pRb, p107 et p130, sont d'intéressants candidats puisque toutes deux peuvent lier certains membres de la famille des facteurs de transcription E2F et les complexes CDK2/cycline A et CDK2/cycline E (Cao *et al.*, 1992; Chittenden *et al.*, 1993; Cobrinik *et al.*, 1993; Devoto *et al.*, 1992; Ewen *et al.*, 1992; Faha *et al.*, 1992; Lees *et al.*, 1992; Shirodkar *et al.*, 1992). D'autre part, la fonction de gène suppresseur de Rb pourrait être dépendante du type de cellule. Ainsi, les individus porteurs d'une mutation dans Rb dans leurs cellules germinales ne développent pas de leucémie à un taux supérieur à

la population en général, même si les leucémies sont les formes de cancers les plus répandues chez les enfants (Hamel *et al.*, 1993). Pourtant, la fréquence de mutation des rétinoblastes et des cellules souches du système hématopoïétique devraient être les mêmes. pRb semble jouer un rôle important dans le développement des cellules souches du système hématopoïétique. Chez les embryons homozygotes contenant une mutation dans le gène codant pour pRb, les érythrocytes sont immatures, étant incapables de perdre leurs noyaux ce qui pourraient causer une anémie entraînant la mort de l'embryon (Jacks *et al.*, 1992). Ces deux hypothèses n'étant pas mutuellement exclusives, pRb pourrait jouer un rôle différent dans différents types cellulaires en étant impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire ou dans la différenciation.

Cette hypothèse nous permet de concilier les observations *in vivo* qui sont en apparence contradiction avec plusieurs autres résultats indiquant que pRb joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Par exemple, le niveau d'expression de pRb augmente fortement pendant la différenciation des kératinocytes et des cellules des cryptes intestinales (Szekely *et al.*, 1992). De plus, dans un système *in vitro*, le niveau de CDK4, pour qui pRb semble être le seul substrat, diminue fortement pendant l'induction de la différenciation des cellules érythroleucémiques (Kiyokawa *et al.*, 1994). Cette perte de CDK4 rendrait la cellule incapable de phosphoryler pRb et on peut effectivement observer dans ces cellules une accumulation de pRb hypophosphorylé pendant la différenciation. On peut prévenir la différenciation de ces cellules en exprimant CDK4 de façon constitutive (Kiyokawa *et al.*, 1994). Il semble donc que le bloc du cycle cellulaire au milieu de la phase G1 soit nécessaire pour permettre à ces cellules de se différencier.

Chez un autre modèle de différenciation *in vitro* impliquant des cellules myéloïdes, on peut induire leur différenciation en neutrophiles. Dans ce cas, l'expression de la cycline D et de CDK4 est diminuée alors que les cellules atteignent un certain état de différenciation et l'expression ectopique de la cycline D2 et D3 empêche la différenciation (Kato *et al.*, 1993). L'inhibition de la phosphorylation de pRb bloque les cellules en G1 et semble donc essentielle pour leur différenciation subséquente.

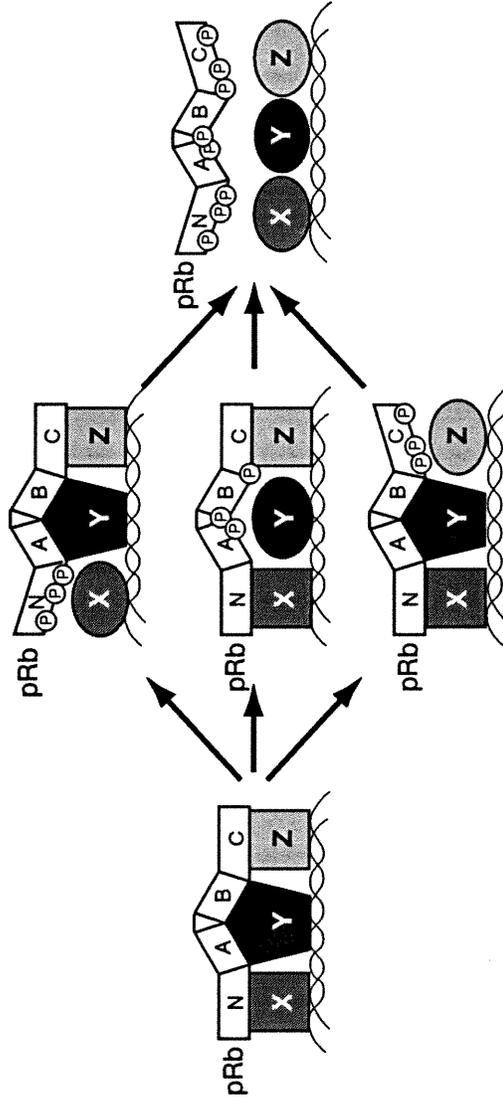
Ces différentes observations ont permis d'élaborer un modèle du fonctionnement de Rb qui est illustré à la figure 14. Il est clair que pRb peut interagir avec plusieurs protéines différentes grâce à ses différents domaines fonctionnels. L'interaction la plus connue est certainement celle du domaine A/B avec le facteur de transcription E2F et les oncoprotéines virales. Ce type d'interaction ne nécessite que les séquences du domaine A et du domaine B. Un deuxième type d'interaction avec les cyclines de type D et les complexes E2F/ADN nécessite les domaines A/B et une partie du domaine C-terminal. Le domaine C-terminal peut, quand à lui, interagir avec la protéine c-abl de façon indépendante du domaine A/B. Finalement, la région N-terminale de pRb est aussi en mesure de lier un certain nombre de protéines.

Puisque pRb contient plusieurs domaines indépendants lui permettant de lier des protéines différentes, il pourrait servir à recruter et à assembler des complexes contenant des protéines qui n'interagissent pas directement entre elles. Ainsi, des protéines pourraient lier les domaines A/B, C-terminal et N-terminal formant ainsi un complexe multiprotéique comme on l'a démontré pour Rb/c-abl/SV40LT dans les cellules Cos-1 (Welch et Wang, 1993). Cette hypothèse est intéressante puisqu'elle permet d'expliquer pourquoi pRb lie un si grand nombre de protéines (Voir tableau 1). Ce modèle où le rôle de pRb est d'assembler des complexes protéiques pourrait aussi expliquer sa fonction spécifique à certains types cellulaires. Ainsi, pRb pourrait interagir avec MyoD dans les cellules exprimant ce facteur de transcription (Edmondson et Olson, 1993), avec le facteur de transcription elf-1 dans les lignées cellulaires lymphoïdes (Thompson *et al.*, 1992), ou finalement avec le facteur de transcription PU.1 dans les macrophages et les cellules B (Klemsz *et al.*, 1990). Donc, selon la disponibilité de certaines protéines, pRb pourrait assembler différents complexes protéiques qui auraient des effets spécifiques sur la régulation du cycle cellulaire ou sur la différenciation cellulaire.

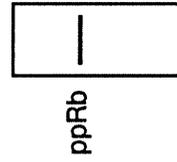
**FIGURE 14****MODÈLE DU RÔLE BIOLOGIQUE DE pRb**

Le rôle de pRb pourrait être d'assembler des complexes par l'interaction simultanée de ses domaines fonctionnels avec différentes protéines. Dans ce diagramme, pRb est en mesure de lier trois protéines (X, Y, Z) par le domaine N-terminal, le domaine A/B et le domaine C-terminal. Les complexes assemblés sont représentés sur l'ADN parce que plusieurs protéines liant pRb sont en mesure de lier l'ADN. Les protéines liées par pRb ne sont pas nécessairement situées de façon colinéaires sur l'ADN; pRb pourrait coordonner l'interaction de protéines qui sont situées à de grande distance entre elles sur la molécule d'ADN. Par ailleurs, les complexes protéiques assemblés par pRb pourraient être associés aux structures nucléaires puisque pRb est en mesure d'interagir avec certaines protéines de la matrice nucléaire.

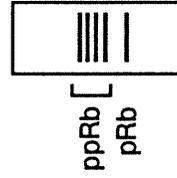
Dans ce modèle, l'activité de chaque domaine est régulée par la phosphorylation de ses résidus sérines et thréonines. Les bandes que l'on peut observer en phase S et G2 représentent les différentes formes de pRb où l'un ou l'autre de ses domaines sont inactivés par la phosphorylation. La phosphorylation de ces domaines fonctionnels de pRb n'entraîne pas nécessairement la dissociation de la protéine liée à pRb. Par exemple, la phosphorylation du domaine C-terminal peut mettre fin à l'inhibition de la protéine kinase c-abl et la protéine modifiée peut phosphoryler une protéine liée au domaine A/B afin de modifier sa fonction. Bien sûr, les oncoprotéines virales déplacent les protéines telles E2F liées au domaine A/B.



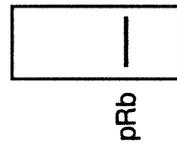
**Mitose**



**S et G2**



**Q et G1**



**TABEAU I**  
**Protéines liées par pRb**

Protéine	Fonction	Effet de la phosphorylation de pRb sur la liaison			Références
		Liaison	Conséquences de la liaison	Conséquences de la liaison	
Antigène grand T	Oncoprotéine	A/B	Contribue à la transformation virale	DeCaprio <i>et al.</i> (1988); Dyson <i>et al.</i> (1989)	
E7	Oncoprotéine	A/B	Contribue à la transformation virale	Dyson <i>et al.</i> (1989); Imai <i>et al.</i> (1991)	
E1A	Oncoprotéine	A/B	Contribue à la transformation virale	Whyte <i>et al.</i> (1988)	
EBNA-5	Réplication virale?	?	?	Szekely <i>et al.</i> (1993a)	
E2F-1, -2, -3	Facteur de transcription	A/B	Inhibe l'activité	Helin <i>et al.</i> (1992); Kaelin <i>et al.</i> (1992)	
E2F-DNA	Facteur de transcription	Grand A/B		Qin <i>et al.</i> (1992); Heibert (1993)	
MyoD	Facteur de transcription	B	?	Gu <i>et al.</i> (1993)	
Myogénine	Facteur de transcription	B	?	Gu <i>et al.</i> (1993)	
Elf-1	Facteur de transcription	A/B	Inhibe l'activité	Wang <i>et al.</i> (1993)	
PU. 1	Facteur de transcription	A/B	?	Hagemier <i>et al.</i> (1993)	
c-Myc	Facteur de transcription	A/B	?	Rustgi <i>et al.</i> (1991)	
ATF-2	Facteur de transcription	A/B	Active	Kim <i>et al.</i> (1992)	
GATA-3	Facteur de transcription	?	Active	V. Smith and A. Winoto (personal communication)	
c-Abl	Tyrosine kinase	C	Inhibition de l'activité tyrosine kinase	Welch and Wang (1993)	
D1, D2, D3	Cyclines	Grand A/B	Cible pRb pour sa phosphorylation?	Dowdy <i>et al.</i> (1993); Ewen <i>et al.</i> (1993)	
cdk2	Ser/Tbl kinase	?	Phosphorylation de pRb?	Hu <i>et al.</i> ; Kitagawa <i>et al.</i> (1992)	
cdk2	Ser/Tbl kinase	?	Phosphorylation de pRb?	Akiyama <i>et al.</i> (1992)	

Tiré de Lee *et al.*, (1995)

## DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE

---

Une des étapes critiques de la carcinogénèse est pour la cellule normale d'échapper aux limites de prolifération imposées par le processus de sénescence. L'étude des gènes et des mécanismes moléculaires impliqués dans l'immortalisation cellulaire est donc essentielle à notre compréhension d'une des étapes critiques et peut-être limitante de la carcinogénèse. Les petits virus à ADN oncogènes ont été et restent un outil puissant nous permettant de disséquer et de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. En particulier, l'analyse des interactions entre les oncoprotéines virales et le produit de gènes suppresseurs a permis d'établir un lien entre la carcinogénèse virale, la progression tumorale et la régulation du cycle cellulaire.

L'antigène grand T du virus du polyome murin immortalise des cellules primaires en culture et coopère avec plusieurs oncoprotéines pour induire leur transformation complète (Land *et al.*, 1983; Rassoulzadegan *et al.*, 1983). Cependant, on connaît peu de chose des domaines fonctionnels impliqués dans l'activité immortalisante de la protéine. L'antigène grand T du virus du polyome interagit avec pRb *in vitro* (Dyson *et al.*, 1990) et son activité immortalisante semble dépendre de sa capacité à lier pRb par une séquence contenue entre les acides aminés 141-146 (Larose *et al.*, 1991). Cette région contient la séquence consensus de liaison à pRb (D/N-L-X-C-X-E) (Figge *et al.*, 1988) et est homologue à la CR2 de la protéine E1A d'adénovirus qui est non seulement capable d'interagir avec pRb mais aussi avec les protéines p107 et p130 impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Mayol *et al.*, 1994; Whyte *et al.*, 1989). Un fragment N-terminal de 259 acides aminés de l'antigène grand T du virus du polyome murin interagit avec p107 mais la localisation précise du domaine de liaison n'a pas été établie (Holman *et al.*, 1994). Cependant on ne sait pas si l'antigène grand T de polyome est en mesure d'interagir avec p130. Ce projet de recherche a pour but de définir plus précisément la contribution des différents domaines fonctionnels de l'antigène grand T du virus du polyome à son activité immortalisante.

Dans la première partie de cette étude, nous avons ciblé la CR2 de l'antigène grand T du virus du polyome et examiné sa contribution à l'activité immortalisante de la protéine. La CR2 peut être divisée en trois sous-régions: le coeur de la séquence de liaison à pRb, sa région adjacente et le motif de phosphorylation par la CKII. Nous avons généré une série d'antigènes grand T mutants où chacun des acides aminés conservés du coeur de la séquence de liaison à pRb ont été substitués (D/N-L-X-C-X-E). De plus, nous avons substitué quelques acides aminés non-conservés entre le coeur de la séquence de liaison à pRb et le domaine de phosphorylation par la CKII. Nous avons aussi apporté des modifications importantes au motif de phosphorylation par la CKII de l'antigène grand T du virus du polyome murin. Nous avons également introduit des modifications plus importantes dans la CR2 de l'antigène grand T du virus du polyome murin pour produire des molécules hybrides. Ainsi, nous avons remplacé la CR2 de l'antigène grand T de polyome par celle de SV40. De plus, nous avons introduit une deuxième CR2 dans l'antigène grand T de polyome afin de déterminer si la quantité de protéine liée pouvait avoir un effet sur l'activité immortalisante de la protéine. Finalement, nous avons délété les acides aminés correspondant à la position du domaine de liaison à pRb chez l'antigène grand T de SV40, entre les acides aminés 256 et 272 de l'antigène grand T de polyome, et qui contient deux des quatre acides aminés de la séquence consensus de liaison à pRb.

Ces antigènes grand T mutants ont été utilisés pour étudier les interactions entre pRb, p107 et la CR2 de l'antigène grand T de polyome *in vitro*. La formation de complexes entre les antigènes grand T mutants et hybrides et les protéines pRb et p107 *in vitro* a été corrélée par la suite avec l'activité immortalisante de la protéine dans des essais d'immortalisation de cellules embryonnaires de rat *in vivo*. Nous avons ainsi déterminé de façon plus précise les résidus de la CR2 importants pour la liaison de pRb et p107 *in vitro* et pour l'activité immortalisante de la protéine *in vivo*.

Dans la deuxième partie de cette étude, nous avons examiné l'interaction de l'antigène grand T du virus du polyome murin et de la protéine p130 *in vitro*. Ces travaux ont permis de déterminer que la CR2 de l'antigène grand T de polyome est nécessaire pour lier les trois protéines de la famille de pRb; pRb, p107 et p130

Dans la troisième partie de cette étude nous avons examiné la contribution du motif de doigt de zinc à l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome. Ce motif est extrêmement conservé et retrouvé chez les antigènes grand T de tout le groupe des virus du polyome et est nécessaire à la formation de complexes protéiques de hauts poids moléculaires impliqués dans la réplication de l'ADN viral (Pipas, 1992). Plusieurs groupes ont démontré que le motif du doigt de zinc pouvait aussi jouer un rôle important dans l'activité oncogénique d'oncoprotéines virales (Loeber *et al.*, 1989; Ludlow *et al.*, 1990; Peden *et al.*, 1989; Tack *et al.*, 1989). L'antigène grand T du virus du polyome forme des complexes oligomériques d'environ 670 kDa ce qui correspond à la taille d'un hexamère composé de six unités de 90 à 100 kDa chacune (Wang et Prives, 1991). Un fragment N-terminal ne contenant que les 219 premiers acides aminés de l'antigène grand T du virus du polyome est suffisant pour immortaliser des REFs mais a une fréquence équivalente à 22% de l'antigène grand T sauvage (Asselin et Bastin, 1985). La formation de complexes de hauts poids moléculaires pourrait donc être importante pour la pleine activité immortalisante de la protéine. Pour tester cette hypothèse, un antigène grand T mutant où seul le motif de doigt de zinc a été délété fut généré. Nous avons pu ainsi déterminer l'importance du motif de doigt de zinc dans l'activité immortalisante de la protéine par des essais d'immortalisation de cellules embryonnaires de rat.

## RÉSULTATS

---

**5.0 FUNCTIONAL IMPLICATIONS OF MUTATIONS WITHIN POLYOMAVIRUS  
LARGE T ANTIGEN CONSERVED REGION 2: EFFECTS ON pRb AND p107  
BINDING *IN VITRO* AND IMMORTALIZATION ACTIVITY *IN VIVO***

ARTICLE SOUMIS À: JOURNAL OF VIROLOGY  
(1995)

Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen  
Conserved Region 2: Effects on pRb and p107 binding *in vitro*  
and immortalization activity *in vivo*.

Running title: Rb mutants of polyomavirus large T-antigen

André A. Pilon<sup>1</sup>, Paul Desjardins<sup>2</sup>, John A. Hassell<sup>2</sup>, and Anne-Marie Mes-  
Masson<sup>1,3\*</sup>.

Centre de recherche Louis-Charles Simard/Institut du cancer de Montréal, 1560,  
rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1<sup>1</sup>, Institute for  
Molecular Biology and Biotechnology, McMaster University, Hamilton, Ontario,  
Canada, L8S 4K1<sup>2</sup>, Département de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128,  
succursale A, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7<sup>3</sup>

\* Corresponding author

Tel: (514)876-5491

Fax: (514) 876-5476

## Abstract

In this study, we have extensively modified the Rb-binding domain of polyomavirus large T-antigen. Mutant polyomavirus large T antigens were tested for their ability to bind pRb and p107 *in vitro* and assayed for their capacity to immortalize primary rat embryo fibroblasts *in vivo*. Polyomavirus large T antigen bound pRb and p107 through a common region located between amino acid 141-158 containing the consensus Rb-binding sequence D/N-L-X-C-X-E. Substitution of any amino acid within the core Rb-binding sequence abolished Rb and p107 binding *in vitro* and immortalization activity *in vivo*. Substitution of amino acids outside the core Rb-binding sequence reduced Rb and p107 binding *in vitro* and decreased or abolished immortalization of rat embryo fibroblasts *in vivo*. Although duplication of the Rb-binding domain within polyomavirus large T antigen results in a molecule that can bind at least twice as much Rb *in vitro*, this mutant displayed essentially wild-type levels of immortalization activity. More importantly, we found that the addition of acidic residues within the casein kinase II consensus phosphorylation region flanking the Rb-binding domain, or the deletion of amino acids 256-272, increased the immortalizing activity of the mutant polyomavirus large T antigen while retaining wild-type levels of Rb binding *in vitro*. These two mutants displayed a decreased affinity for p107 binding *in vitro*. These results indicate that polyomavirus large T antigen immortalization activity depends directly on its ability to interact with the product of the retinoblastoma tumor suppressor gene. However, the ability of some polyomavirus large T antigen mutants to bind pRb at levels above that of the wild-type large T antigen does not correlate with an increased immortalization activity.

## Introduction

Central to the transforming potential of DNA tumor viruses is the ability of one or more of their encoded proteins to form specific complexes with cellular proteins, and in particular to target the products of tumor suppressor genes, such as Rb and p53. The oncoproteins encoded by several tumor viruses share regions of sequence similarity, designated conserved region 1 (CR1) and conserved region 2 (CR2), that are implicated in cellular transformation. Several groups have shown that the conserved Rb-binding motif in the CR2 (Fig. 1), consisting of the amino acids D/N-L-X-C-X-E (the “core” Rb-binding sequence), is essential for the interaction between Rb and various viral oncoproteins (14, 19). The capacity of these various oncoproteins to transform cells has been linked to their ability to bind pRb (20, 35, 40, 41, 54, 55, 57).

The Rb gene product plays an important role in regulating the cell cycle (42). At interphase, it is believed that pRb maintains cells in a quiescent state by repressing transcription of genes required for cell cycle progression (25). It has been shown that pRb exerts its influence in part through its interaction with the E2F transcription factor (1, 8, 9). The interaction of the viral oncoproteins with pRb results in the release of E2F, which is required for the expression of cell cycle genes (2, 25). While pRb is clearly involved in the control of the transcriptional activity of the E2F complex in the late G1/S phase of the cell cycle (25) it has become increasingly clear that E2F is also a cellular target for the “pRb-related proteins”, p107 and p130, which also possess the E1A/T binding pocket (11, 34). Both pRb-related proteins bind E2F (7, 11, 47), and p107 also regulates E2F-specific transcriptional activity *in vivo* (30). p107 and p130 have been shown to inhibit cell proliferation suggesting a tumor suppressor-like activity (10, 58). The interaction of pRb, p107, p130 with the E2F transcription factor is required to effect progression through the cell-cycle.

The large T antigen of polyomavirus (Py LT-Ag) plays an important role in the immortalization of primary cells and is required to complement the ability of several other oncoproteins to achieve full transformation (31, 45). However, Py LT-Ag cannot induce cellular transformation by itself. Thus, Py LT-Ag provides a unique opportunity to study the mechanisms of immortalization independent of transformation. Py LT-Ag binds to pRb *in vitro* (15) and *in vivo* (28), but unlike SV40 large T antigen (SV40 T), no interaction with p53 has been detected (53). Mutations in Py LT-Ag CR2 that abolish pRb binding *in vitro* also abolish its ability to immortalize primary rat embryo fibroblasts (REF) and mutations within CR1 may also decrease immortalization activity (32). Py LT-Ag and SV40 T share significant homology across their entire length except for a 154 amino acid insert unique to Py LT-Ag (48). There is significant conservation of both the nature and organization of the various functional domains intrinsic to these large T antigens (Fig. 2). The CR2 Rb-binding domain is an exception; this region is displaced in Py LT-Ag relative to SV40 T antigen. The net effect of displacing the Rb-binding domain is to maintain equivalent spacing between the CR1 and CR2 domain. Amino acids in Py LT-Ag which are positionally equivalent to the SV40 Rb-binding domain maintain some, but not all, the features of a consensus Rb-binding domain and form what we refer to as polyomavirus “cryptic” Rb-binding domain.

Py LT-Ag and SV40 T antigen display very different oncogenic potential: SV40 T antigen is a “dual” oncogene, capable of both immortalizing and transforming primary cells *in vitro* whereas Py LT-Ag possesses only immortalizing activity (38). The binding of two cellular proteins, p53 and pRb, has been implicated in the transforming activity of SV40 T antigen (13, 43). However, an SV40 mutant encoding a truncated large T antigen that is only 147 amino acids long is able to transform primary REF despite the fact that it does not bind p53 (49). Additionally, hybrid molecules, containing Py LT-Ag N-terminal and SV T antigen C-terminal sequences, are unable to transform primary

REF despite the fact that they bind both pRb and p53 (36). This chimaeric protein may possess partial transforming functions as cell lines expressing this fusion protein display altered growth characteristics (37). Therefore, the simple binding of pRb and p53 to this hybrid molecule is not sufficient to bring about full cellular transformation.

Differences in the oncogenic potential of the two large T antigens may also stem from the fact that although their Rb-binding domains are similar in structure, they are not identical. Within the primate polyomaviruses it has been shown that the SV40 T antigen Rb-binding domain binds to pRb more tightly than does the JCV large T antigen (51). Additionally, there is a tight correlation between the oncogenic potential of the HPV6, 16 and 18 viruses, the rate of phosphorylation of the casein kinase II (CKII) site flanking the Rb-binding site, and the amount of pRb binding (4). HPV18 E7, considered the most oncogenic, is phosphorylated faster and binds pRb more efficiently than HPV6 E7, which is principally associated with benign lesions. These results indicate that pRb binding and CKII phosphorylation represent two distinct but interrelated biological functions in HPV. Mutations in the CKII domain of SV40 T antigen has not been associated with its transformation activity but rather seems to influence the kinetics of nuclear transport (46).

The N-terminal region of Py LT-Ag contains sequences between amino acids 141-146 required for Rb binding and immortalization (32). However, the precise coordinates of the Rb-binding domain have not been determined. Furthermore, whereas Py LT-Ag binds p107 through a sequence located within its first 259 amino acids (26) it is not known whether the Rb and p107 binding domains overlap or constitute separate entities. In the present study, we have extensively modified the Rb-binding domain of Py LT-Ag. These mutant Py LT-Ag were tested for their ability to bind pRb and p107 *in vitro* and assayed for their capacity to immortalized primary rat embryo fibroblasts (REF).

## Materials and methods.

### *Plasmids construction and site directed mutagenesis.*

The structure of the recombinant plasmids and the experimental strategy used in this study are illustrated in Fig. 3. The expression vector pPyLT has been described elsewhere (50). pPyLT-1 was generated by inserting a *Bam*HI/*Bgl*II/*Xho*I linker in pPyLT, destroying the first *Xho*I site. A *Xho*I-*Kpn*I fragment containing the pRb-binding site was excised from pPyLT and re-cloned into pBluescript-SK- (Stratagene) to produce pSKLT. Single stranded DNA was prepared as described previously (39).

Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis was performed using either the *in vitro* mutagenesis system (Amersham), on single-stranded DNA, or in the case of one mutant (PyLT- $\Delta$ 141-158) by the Transformer site-directed mutagenesis kit (Clontech) on double stranded DNA (pPyLT-1). Py LT-Ag mutants were screened by differential hybridization, sequenced and the mutant *Xho*I-*Kpn*I fragment re-cloned into pPyLT-1. The Py LT-Ag mutants are listed in Fig. 4. PyLT-D141E, replaces aspartic acid-141 by a glutamic acid; -L142V, replaces leucine-142 by a valine; -C144S, replaces cysteine-144 with a serine; -E146N, replaces glutamic acid-146 with an asparagine; -E146W, replaces glutamic acid-146 with a tryptophan; -L149H, replaces leucine-149 with an histidine; -N153Y, replaces asparagine-153 with a tyrosine residue; - $\Delta$  141-148, deletion of amino acid 141 to 158; - $\Delta$ 256-272, deletion of amino acid 256-272. PyLT-RbC replaces amino acid 256 to 272 of Py LT-Ag with amino acid 141 to 158 of Py LT-Ag thus creating a duplication of the Py LT-Ag CR2. In addition, PyLT-CKII replaces amino acid 157 to 161 of Py LT-Ag with amino acid 33 to 37 of the E7 protein of human papilloma virus 16. PyLT-SV40C replaces amino acid 141 to 158 of Py LT-Ag with amino acid

102 to 118 of SV40 T antigen while PyLT-SV40CdlC/S carries the same modification as PyLT-SV40C except that cysteine-105 and serine-106 of SV40 T antigen were deleted.

BapSV40Ttsa58A was a gift from Dr. R. MacKay. It contains the ts58A temperature sensitive allele of SV40 T antigen (52), under the control of the  $\beta$ -actin promoter. BPyLT was constructed by excising the SV40 T antigen coding region with BamHI and replacing it with the BamHI fragment from pPyLT-1 containing the Py LT-Ag sequences. Because this vector proved to be more efficient at immortalizing primary REF than pPyLT-1 all Py LT-Ag mutants were recloned in the BPyLT vector as BamHI fragments and sequenced.

*In vitro binding assays.*

pGEX-Rb was produced by inserting a 3.7 kb EcoRI fragment encoding residues 301-928 of human Rb (33), into the SmaI site of pGEX-3X (Pharmacia) in frame with the glutathione S-transferase (GST) gene. pGex-107 was produced by inserting a fragment encoding residues 228-1078 of human p107 (58). The GST-Rb and GST-107 fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) after induction with 0.5mM isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 2.5 hours at 37°C. The cells were pelleted and resuspended in 1/100 culture volume of ice cold PBS supplemented with 1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 $\mu$ g/ml leupeptin, 1 $\mu$ g/ml aprotinin, 1 $\mu$ g/ml pepstatin, 1mM EDTA and 1% Triton X-100. The cells were lysed by mild sonication for 1 minute on ice. The lysate was cleared by centrifugation at 12,000xg for 5 minutes at 4°C and incubated with glutathione-Sepharose beads (Pharmacia; 1ml per liter of culture) for 2 hours at 4°C. The beads were collected by centrifugation, washed extensively with ice cold PBS containing protease inhibitors and the proteins analyzed by SDS-PAGE. Complementary RNAs were synthesized from linearized pSKLT templates (*Nsi*I)

according to standard *in vitro* transcription methodology.  $^{35}\text{S}$ -methionine labeled proteins were synthesized by the *in vitro* translation of 2  $\mu\text{g}$  cRNA in 35  $\mu\text{l}$  of rabbit reticulocyte lysate as directed by the supplier (Promega). Synthesis of large T antigen proteins were monitored by TCA precipitation and liquid scintillation counting. The integrity of large T antigen was determined by SDS-PAGE.

Equal amounts of GST, GST-Rb or GST-107 fusion proteins (2  $\mu\text{g}$ ) bound to glutathione-Sepharose beads (5-10  $\mu\text{l}$ ) were diluted with 500  $\mu\text{l}$  of binding buffer (50 mM HEPES pH 7.0; 250 mM NaCl; 0.1% (v/v) Nonidet P-40). Equal numbers of TCA-precipitable counts ( $3 \times 10^5$  c.p.m.) of  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins were added and the mixture was rocked at 4°C for three hours. The beads were collected by centrifugation and washed four times with 1.0 ml of binding buffer at 4°C. Bound proteins were eluted by boiling the beads in SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE and fluorography.

The Py LT-Ag mutants were translated *in vitro* in the presence of  $^{35}\text{S}$ -methionine and tested for their ability to interact with immobilized GST-Rb or GST-107. Aliquots of the lysate were either directly loaded onto SDS-PAGE (Input: 1/10 of the amount used in the binding reactions) or incubated with GST, GST-RB or GST-107 glutathione-Sepharose beads. Bound proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE. For titration experiments, the  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins were serially diluted in binding buffer before incubation with the fusion proteins. Interactions between Py LT-Ag mutants and pRb or p107 protein binding was quantitated by two methods: densitometry of the autoradiograms and direct quantification of eluted proteins in a liquid scintillation counter.

#### *Cell lines and immortalization assays.*

All cells were grown at 37°C in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and maintained in a 5%

CO<sub>2</sub> atmosphere. Primary cultures of REFs were isolated from 16-day-old Fisher rat embryos obtained from Charles River (St-Constant, Québec). Embryos were minced and placed in DMEM containing 200 units of crude collagenase for one hour at 37°C. The cells were dispersed by pipetting, washed and plated in complete medium. Cells were plated at a density of  $7 \times 10^5$  cells per 100 mm plates and transfected by the calcium phosphate-DNA co-precipitation method (56). The wild-type or mutant DNA to be assessed (10 µg) was precipitated with 10 µg of pSV2Neo and left on the cells for 16 hours. Cells that were transfected with pSV2Neo alone were incubated in the presence of 10µg of pSV2Neo and 10 µg of salmon sperm DNA (Pharmacia). The cells were then washed twice with PBS and complete medium was added. After 24 hours the cells were passaged at a 1:5 dilution and replated in complete medium containing G418 (400 µg/ml). Approximately 4 weeks later, individual G-418 resistant colonies (50-200 colonies) were picked and transferred to 24-well plates. These clones were expanded before reaching confluence. Cell strains were considered immortal if they could be passaged in 100 mm plates 5 or more times, at a 1:5 dilution.

*Growth characteristic assays.*

Growth in low serum of primary REF, wild-type and mutant Py LT-Ag immortalized cells was determined by plating cells at an initial density of  $1 \times 10^5$  cells/60 mm plates in DMEM containing 0.5% FBS. Growth curves were generated by monitoring cell growth by trypsinizing and counting cells using an hemacytometer at 2 days intervals for 12 to 15 days. Doubling times were determined by analysis of the growth curves using data from the exponential phase of growth. Similarly, growth in complete medium was determined by plating cells in DMEM containing 10% FBS and generating growth curves for the various cell lines. Saturation densities were determined by analysis of the growth curves.

Cell lines were also assayed for their ability to grow with anchorage independence by plating  $1 \times 10^5$  cells in 0.33 % agar in complete medium (DMEM, 10% FBS) on a bed of 0.66 % agar also in complete medium (DMEM, 10% FBS). After 2 to 4 weeks colonies were visualized and counted.

## Results.

### *Modifications of Py LT-Ag.*

Py LT-Ag carrying mutations within CR2 were generated to assess its importance in the immortalizing activity of the protein (Fig. 4). Mutant PyLT- $\Delta$ 141-158 carries a deletion of the entire Rb-binding domain from amino acids 141 to 158. A second deletion mutant was made in which the portion that corresponds to the location of the Rb-binding site in SV40 T antigen was deleted (PyLT- $\Delta$ 256-272). We also introduced different point mutations (mutants PyLT-D141E, -L142V, -C144S, -E146N and E146W) affecting conserved residues in the core Rb-binding sequence. Single amino acid substitutions were introduced in non-conserved residues flanking the core Rb-binding sequence (PyLT-L149H and -N153Y). To assess the importance of the putative CKII phosphorylation site flanking the pRb-binding region, acidic amino acids were substituted in the CKII phosphorylation motif to mimic that of HPV16 E7 CKII phosphorylation motif (PyLT-CKII). In order to determine whether Py LT-Ag and SV40 T antigen Rb-binding domains possess equivalent activities, mutant PyLT-SV40C was generated in which Py LT-Ag Rb-binding domain was replaced by SV40 T antigen Rb-binding domain. Finally, an hybrid molecule where Py LT-Ag Rb-binding domain is duplicated within the molecule (PyLT-RbC) was constructed to determine if the amount of Rb protein bound to Py LT-Ag could influence its immortalization potential.

To ensure that the various Py LT-Ag were expressed at equivalent levels and produced stable proteins their synthesis was monitored by immunoprecipitation after transfection of Cos-1 cells. All mutants expressed a unique species of Py LT-Ag corresponding to its expected size (data not shown). The protein stability of PyLT-Ag mutants PyLT-CKII, PyLT-SV40C and PyLT-RbC and PyLT- $\Delta$ 256-272 were

assessed and compared to the stability of the wild-type protein. Densitometry was performed on autoradiograms to estimate protein half-lives. All the proteins tested showed comparable half-lives (data not shown).

*In vitro* pRb and p107 binding.

The various Py LT-Ag mutants were tested for their ability to associate with GST-Rb and GST-p107 fusion protein *in vitro*. Recombinant GST-Rb and GST-107 fusion proteins were synthesized in *E. coli* BL21, purified and immobilized on glutathione-Shepharose beads. The GST-pRb or GST-p107 beads were mixed with radioactively labelled wild-type or mutant Py LT-Ag and incubated at 4°C for three hours. Bound proteins were eluted by boiling the beads in SDS sample buffer and applied to SDS-polyacrylamide gels. Results of representative experiments are shown in Fig. 5 and summarized in Table 1. These experiments demonstrate that any mutation in the consensus Rb-binding sequence abolished pRb and p107 binding *in vitro*, although some residual pRb binding activity was retained by mutant PyLT-C144S and PyLT-D141E. Mutations in residues flanking the core Rb-binding sequence also affected pRb binding *in vitro*. For example, substitution of a leucine for a histidine at position 149 (PyLT-L149H) or substitution of an asparagine for a tyrosine at position 153 (PyLT-N153Y) substantially reduced pRb binding to 20 (PyLT-L149H) and 28 % (PyLT-N153Y) of the level seen with wild-type Py LT-Ag. Both mutants also displayed a decrease in p107-binding to less than 1% for PyLT-L149H and 25% for PyLT-N153Y of wild-type levels, indicating that mutations outside the core Rb-binding motif influenced both pRb and p107 binding *in vitro* but to a different extent. Deletion of the entire Rb-binding domain (mutant PyLT-Δ141-158) completely abolished pRb and p107 binding. This mutant retains the “cryptic” Rb-binding site between aa 256-272. Deletion of

amino acids 256-272 (PyLT- $\Delta$ 256-272) resulted in a mutant that bound three times as much pRb than the wild-type Py LT-Ag (Fig. 5A; lane 13 vs 15) but only 22% of wild-type levels of p107 *in vitro* (Fig. 5B: lane 13 vs 15). Similarly, substitution of acidic residues in the putative CKII phosphorylation domain (PyLT-CKII) increased pRb binding *in vitro* to levels approximately 2 times that of the wild-type Py LT-Ag (Fig. 5A: lane 4 vs 6) but decreased p107 binding to 23% of wild-type levels (Fig. 5B: lane 4 vs 6). Thus, the effect of these mutations is to significantly decrease p107 binding to approximately 20-25% that of wild-type Py LT-Ag while retaining wild-type levels of pRb binding *in vitro*. Replacement of the Py LT-Ag Rb-binding domain with that of SV40 T antigen yielded a molecule (PyLT-SV40C) that bound both pRb and p107 at levels approximately 3 times that of wild-type Py LT-Ag. Duplication of the polyomavirus Rb-binding domain resulted in a molecule that bound 4 times more pRb as well as p107 *in vitro* as did wild-type Py LT-Ag. These results were confirmed by titration assays and by direct quantitation of eluted proteins in a liquid scintillation counter (data not shown).

#### *Immortalization assays.*

To learn whether there was any correlation between the ability of the various large T antigens to bind to pRb and p107 and their immortalizing activity, we measured their capacity to immortalize REF. Primary cultures of REFs were co-transfected with pSV2Neo and the BPyLT expression vector coding for either wild-type or mutant Py LT-Ag under the control of the rat  $\beta$ -actin promoter. After 4 weeks of selection, individual G-418 colonies (50 to 200) were isolated and expanded to 100 mm plates. The cell strains derived were considered immortal if they could be passaged in 100 mm plates 5 or more times at a 1:5 dilution. The result of these experiments are illustrated in Fig. 6. The relative immortalization

efficiency of the different Py LT-Ag mutants is expressed as a percentage of the wild-type immortalization frequency and represents the average of at least 2 different experiments. Deletion of the entire Rb-binding domain (PyLT- $\Delta$ 141-158) greatly reduced the immortalization potential of the mutant molecule to a frequency of 12% of wild-type levels. Point mutations affecting any of the conserved residues within the core Rb-binding sequence of Py LT-Ag essentially abolished the immortalizing activity of the corresponding mutant. Mutants PyLT-D141E (12%), PyLT-L142V (9%), PyLT-C144S (5%), PyLT-E146W (3%) were unable to immortalize primary REFs at a frequency clearly above background (pSV2neo; 8%). Only mutants PyLT-E146N (24%) retained some immortalizing activity. Substitution of residues outside the core Rb-binding sequence also affected the immortalization frequency of the corresponding mutant. Mutant PyLT-L149H immortalized REF at 62% the frequency of wild-type Py LT-Ag whereas PyLT-N153Y (6%) was unable to immortalize REF at a frequency above background.

Interestingly, duplication of Py LT-Ag CR2 (PyLT-RbC) did not significantly affect the immortalization frequency of primary REFs (104% of wild-type levels) although the mutant bound four times as much pRb and p107 *in vitro* than wild-type T antigen. Replacing Py LT-Ag Rb-binding domain with the SV40 T antigen Rb-binding domain resulted in a hybrid T-antigen (PyLT-SV40C) that efficiently immortalized primary REF (95%). Mutations which should enhance the specificity of the putative CKII phosphorylation site flanking the Rb-binding domain (PyLT-CKII) significantly increased the immortalizing potential of the hybrid molecule to twice that of the wild-type Py LT-Ag (PyLT-CKII; 196%). Rather surprisingly, deletion of Py LT-Ag residues 256-272, which correspond to the position of the "cryptic" Rb-binding site, produced a molecule (PyLT- $\Delta$ 256-272) which also displayed a significant increase in immortalization activity (178% ) as compared to the wild-type Py LT-Ag.

*Growth characteristics of the immortalized cell lines.*

Py LT-Ag is necessary for the ability of immortalized cells to grow in low serum concentration (44) and this activity has been shown to reside in the amino terminal portion of the protein (45). Although Py LT-Ag cannot induce cellular transformation by itself (27, 44), chimaeric Py LT-Ag-SV40 T antigen proteins have been shown to possess partial transforming activities since cell lines expressing this fusion protein displayed altered growth characteristics (37). In light of these results, we determined the growth characteristics of established cell lines derived from transfection of REF with wild-type and mutant Py LT-Ag. Among the growth characteristics tested were: the ability to overcome inhibition of cell division at high cell density; the ability to grow in medium containing reduced levels of serum; the ability to form colonies in the absence of anchorage. These results are summarized in Table 2. Cell lines derived from wild-type Py LT-Ag had saturation densities comparable to that of the parental REF. By contrast, immortalized cell lines established from the hybrid PyLT-RbC (R-RbC-A1, -A5, -B1) consistently achieved higher saturation densities (varying from  $3.5 \times 10^6$  to  $5.9 \times 10^6$  cells/60mm plates) than non-transfected REF ( $1.9 \times 10^6$  cells/60mm plates) or cell lines immortalized by wild-type Py LT-Ag (from  $2.1$  to  $3.8 \times 10^6$  cells/60mm plates). All immortalized cell lines grew well in low serum (0.5%) and had doubling times considerably shorter than the parental REF cell line (approximately 100 h for REF vs 48 h for the immortalized cell lines).

The established cell lines also displayed varying abilities to grow in soft-agar. Cell lines derived from wild-type Py LT-Ag failed to grow in soft agar whereas hybrid PyLT-RbC and PyLT-SV40C transformed cells were able to form small colonies at a significant, but low, frequency. In contrast, cell lines derived from the deletion mutant PyLT- $\Delta$ 256-272 and the casein kinase domain mutant PyLT-CKII

were able to form large colonies in soft agar at higher frequency. Furthermore, cell lines derived from the PyLT-CKII mutant displayed a distinct and characteristic morphology when grown as a monolayer. Normal REF have a flat spindle shaped morphology. Cell lines derived from the PyLT-CKII mutant often had a cuboidal shape. At confluence, these cells also displayed the tendency to form refractile foci in which cells remained in a monolayer.

## Discussion.

The ability of the polyomavirus to immortalize primary rat embryo fibroblasts resides in its large T antigen (45). This immortalizing function appears to be dependent on the capacity of Py LT-Ag to bind the product of the retinoblastoma tumor suppressor gene (32). To explore this correlation in further detail, we assessed the effect of mutations within CR2 on the *in vitro* pRb and p107 binding activity and *in vivo* immortalizing activity of the mutant T antigens.

In this study, we demonstrate that the region between residues 141-158, corresponding to CR2, is required for pRb and p107 binding *in vitro*. Our results also demonstrate that the core Rb-binding sequence is absolutely required for pRb and p107 binding. However, amino acid substitution in the flanking region also influences binding of both pRb and p107. Thus, as in the E1A protein of adenovirus (3, 12) and SV40 T antigen (16, 21), the pRb and p107 binding domains overlap within Py LT-Ag.

Our analysis of mutations within the Rb-binding domain confirms its importance in immortalization. The role of the recently characterized "pRb related" protein p107 in cell cycle regulation (5, 6, 17, 22, 58) and its interactions with both E1A (3, 12) and SV40 T antigen (16, 21) underlines the importance of examining its interactions in the process of immortalization with Py LT-Ag. We have been able to demonstrate that mutation of any conserved residues within the core Rb-binding sequence (D/N-L-X-C-X-E) abolished pRb and p107 binding *in vitro*, and the immortalizing activity of the molecule *in vivo*. However, substitution of non-conserved residues flanking the core Rb-binding domain also influenced the immortalizing activity of the mutant Py LT-Ag. For example, substitution of leucine-149 for an histidine drastically reduced the ability of this mutant large T

antigen to bind both pRb and p107 *in vitro*. This mutation also decreased the immortalizing activity of the mutant T antigen. Similarly, substitution of asparagine for tyrosine at position 153 also diminished pRb binding and p107 binding *in vitro*. This mutation completely abolished the immortalizing activity of Py LT-Ag *in vivo*. Hence, the ability of Py LT-Ag to bind to pRb and to p107 is required for the immortalization of REF.

It is interesting to note that although mutant PyLT-RbC bound four times as much pRb and p107 *in vitro*, its immortalization potential was not significantly different from that of wild-type Py LT-Ag. It has been shown that both CR1 and CR2 of the E1A protein of Ad5 are actual contact sites with pRb (18). It has been proposed that CR2 constitutes a high affinity pRb binding site, whereas CR1 is a low affinity site. Furthermore, competition assays have shown that CR2 is important for specifically binding pRb whereas CR1 is able to compete with E2F for pRb binding (23). These experiments have led to a two step model for the disruption of pRb/E2F complexes where the initial high affinity binding of either pRb or p107 to CR2 would bring these proteins in close proximity to CR1, which would then displace E2F through competition for pRb binding. CR1 would then occupy the E2F binding site in pRb or p107. Thus duplicating CR2 in Py LT-Ag without duplicating the CR1 may enable the molecule to bind more pRb/E2F or p107/E2F but such protein may not be able to disrupt pRb/E2F complexes with increased efficiency. This hypothesis is supported by the observation that mutations affecting the CR1 of Py LT-Ag may result in a decreased immortalization frequency of primary cultures of REF (32), underlying the importance of the CR1 in the immortalization of primary cells. Apparently, the absolute level of pRb and p107 binding *in vitro* is not the sole determinant of the immortalizing potential of Py LT-Ag as demonstrated by mutant PyLT-RbC and PyLT-SV40C, which bound more

than twice as much pRb and p107 as did wild-type Py LT-Ag without any concomittant increase in immortalizing activity.

Mutations within Py LT-Ag CR2 did not only affect the immortalization efficiency of some mutant T antigens but also altered the growth characteristics of the cell lines derived from REF immortalized by PyLT-RbC, PyLT-SV40C, PyLT- $\Delta$ 256-272, and PyLT-CKII. For example, cell lines derived from PyLT-RbC immortalized REF (R-RbC-A1, -A5, -B1) were able to achieve much higher saturation densities than cell lines derived from REF immortalized with wild-type Py LT-Ag. Furthermore, the two cell lines tested (R-RbC-A5 and -B1) were able to form colonies in soft agar. Similarly, cell lines derived from REF immortalized by PyLT-SV40C displayed the ability to form small colonies in soft agar. Cell lines derived from PyLT-CKII and PyLT- $\Delta$ 256-272 formed large colonies in soft agar at a frequency similar to Cos-1 cells. Thus, although Py LT-Ag CR2 may be implicated in altering growth parameters of established cell lines, our results suggest that other domains of the protein may also be involved.

In all viral oncoproteins that bind pRb, the carboxy terminal of the Rb-binding domain is flanked by a CKII phosphorylation domain and a nuclear localization signal (4). Previous observations with CKII sites in other proteins have shown that acidic residues on the carboxy-terminus side of the serine (as found in Ad5 E1A and HPV16 E7) are required for efficient serine phosphorylation (29). An Adenovirus E1A mutant, in which the number of acidic amino acids in the CKII recognition site was reduced from five to three, has a reduced ability to complement an activated *ras* oncogene in a BRK cooperation assay (40). Replacement of the acidic stretch of the HPV16 E7 protein (Glu-33-Glu-Glu-Asp-Glu) by a stretch of five glutamine residues severely impaired the ability of mutant E7 protein to cooperate with *ras* to transform primary REF (24). Interestingly, the authors were

not able to establish immortalized cell lines from this mutant underlying the importance of this motif in immortalization. Barbosa *et al.*, (1990) have shown that for the E7 protein of HPV16, substitution of the two serine residues (31 and 32) in the CKII domain by non-phosphorylatable residues abolished phosphorylation and led to a reduction in the transforming activity, but did not change pRb binding (4). Furthermore, they observed a tight correlation between the oncogenic potential of the HPV6, 16 and 18 viruses and both the rate of phosphorylation of the E7 protein and its capacity to bind pRb; E7 proteins from the most oncogenic HPV16 and 18 were phosphorylated faster and bound more pRb than the E7 protein from HPV6 which is mostly associated with benign lesions (3). These results suggest that pRb binding and CKII phosphorylation represent two distinct but interrelated biological functions. The PyLT-CKII hybrid molecule was constructed to address the importance of the putative CKII phosphorylation site flanking the Rb-binding domain in Py LT-Ag. Mutant PyLT-CKII displayed more than twice the immortalizing frequency of wild-type Py LT-Ag. This clearly demonstrates that a mutation that should enhance the specificity of the CKII phosphorylation domain has a significant effect on the immortalization potential of the mutant T antigen.

Replacement of the pRb binding domain of Py LT-Ag with that of SV40 T antigen resulted in a protein capable of immortalizing REFs at a frequency equivalent to that of the wild-type Py LT-Ag. This suggests that the SV40 T antigen and Py LT-Ag Rb-binding domains are interchangeable. It is important to note that the PyLT-SV40C mutant contains not only the SV40 T antigen Rb-binding sequences but also retains SV40 T antigen flanking CKII motif which is more acidic than that of wild-type Py LT-Ag. Therefore it appears that although the SV40 T antigen CKII motif is more acidic than Py LT-Ag CKII motif, this does not affect the immortalizing activity of mutant PyLT-SV40C. In contrast, substitution of

acidic amino acids within Py LT-Ag CKII motif significantly increased the immortalizing activity of mutant PyLT-CKII to levels twice that of the wild-type Py LT-Ag. The reasons for this difference is obscure but may be reflected by the different growth characteristics observed from cell lines derived from wild-type Py LT-Ag, PyLT-SV40C and PyLT-CKII mutants. All cell lines immortalized by wild-type Py LT-Ag were unable to grow in soft agar whereas cell lines immortalized by PyLT-SV40C were able to form small colonies. Cell lines immortalized by PyLT-CKII displayed the ability to form large colonies in soft agar at a high frequency. Thus, as the acidic nature of the CKII motif increased we observed a gradation in the ability of the immortalized cell lines to grow in suspension.

We have demonstrated that pRb and p107 both require the same region of Py LT-Ag located between residues 141-158 for binding. Since the pRb- and p107-binding domains overlap, it is tempting to speculate that pRb and p107 may compete for binding to this stretch of amino acids. It can be argued that mutations that decrease the affinity of Py LT-Ag for any one of the Rb related proteins would alter the balance toward binding of the other Rb related proteins to Py LT-Ag and this could play an important role in determining the immortalization activity of the molecule. Presumably, as cells progress from G1 to S-phase, Py LT-Ag/Rb and Py LT-Ag/p107 complexes are in a state of equilibrium within a cell. Thus, a mutation that decreases Py LT-Ag affinity for p107 would shift the equilibrium toward Py LT-Ag/Rb complex formation. The increased immortalization frequency observed with both PyLT- $\Delta$ 256-272 and PyLT-CKII, both of which bind wild-type levels of pRb but which show a much lower affinity towards p107, may be explained by this model which fits well with our current understanding of the role of pRb as a gatekeeper for the G1/S progression.

**Acknowledgments.**

We wish to thank Manon Landry, Marie-Josée Milot and Laura Hastings for their excellent technical assistance. We also thank Dr L. Masson for reading the manuscript and helpful discussions. This research was funded by MRC grant MT-10959 to A.-M.M.-M. and by an NCI grant to J.A.H. A.-M. M.-M. is a recipient of an F.R.S.Q. fellowship.

**References.**

1. Bagchi, S., R. Weinmann, and P. Raychaudhuri. 1991. The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* 65:1063-1072.
2. Bandara, L. R., V. M. Buck, M. Zamanian, L. H. Johnston, and N. B. La Thangue. 1993. Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *EMBO J.* 12:4317-4324.
3. Barbeau, D., R. Charbonneau, S. G. Whalen, S. T. Bayley, and P. E. Branton. 1994. Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. *Oncogene* 9:359-373.
4. Barbosa, M. S., C. Edmonds, C. Fisher, J. T. Schiller, D. R. Lowy, and K. H. Vousden. 1990. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* 9:153-160.
5. Beijersbergen, R. L., L. Carlée, R. M. Kerkhoven, and R. Bernards. 1995. Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes. *Genes Dev.* 9:1340-1353.
6. Beijersbergen, R. L., R. M. Kerkhoven, L. Zhu, L. Carlee, P. M. Voorhoeve, and R. Bernards. 1994. E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 *in vivo*. *Genes Dev.* 8:2680-2690.
7. Cao, L., B. Faha, M. Dembski, L. H. Tsai, E. Harlow, and N. Dyson. 1992. Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature* 355:176-179.
8. Chellappan, S. P., S. Hiebert, M. Mudryj, J. M. Horowitz, and J. R. Nevins. 1991. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65:1053-1061.

9. Chittenden, T., D. M. Livingston, and W. G. Kaelin, Jr. 1991. The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* 65:1073-1082.
10. Claudio, P. P., C. M. Howard, A. Baldi, A. De Luca, Y. Fu, G. Condorelli, Y. Sun, N. Colburn, B. Calabretta, and A. Giordano. 1994. p130/pRb2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107. *Cancer Res.* 54:5556-5560.
11. Cobrinik, D., P. Whyte, D. S. Peeper, T. Jacks, and R. A. Weinberg. 1993. Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev.* 7:2392-2404.
12. Corbeil, H. B., and P. E. Branton. 1994. Functional importance of complex formation between the retinoblastoma tumor suppressor family and adenovirus E1A proteins as determined by mutational analysis of E1A conserved region 2. *J. Virol.* 68:6697-6709.
13. DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, J. Figge, J. Y. Shew, C. M. Huang, W. H. Lee, E. Marsilio, E. Paucha, and D. M. Livingston. 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54:275-283.
14. DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, D. Lynch, Y. Furukawa, J. Griffin, H. Piwnica-Worms, C. M. Huang, and D. M. Livingston. 1989. The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 58:1085-1095.
15. Dyson, N., R. Bernards, S. H. Friend, L. R. Gooding, J. A. Hassell, E. O. Major, J. M. Pipas, T. Vandyke, and E. Harlow. 1990. Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J. Virol.* 64:1353-1356.

16. Dyson, N., K. Buchkovich, P. Whyte, and E. Harlow. 1989. The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell* 58:249-255.
17. Dyson, N., M. Dembski, A. Fattaey, C. Ngwu, M. Ewen, and K. Helin. 1993. Analysis of p107-associated proteins: p107 associates with a form of E2F that differs from pRb-associated E2F-1. *J. Virol.* 67:7641-7647.
18. Dyson, N., P. Guida, C. McCall, and E. Harlow. 1992. Adenovirus E1A makes two distinct contacts with the retinoblastoma protein. *J. Virol* 66:4606-4611.
19. Dyson, N., P. M. Howley, K. Münger, and E. Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934-937.
20. Edmonds, C., and K. H. Vousden. 1989. A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virol.* 63:2650-2656.
21. Ewen, M. E., J. W. Ludlow, E. Marsilio, J. A. DeCaprio, R. C. Millikan, S. H. Cheng, E. Paucha, and D. M. Livingston. 1989. An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110Rb and a second cellular protein, p120. *Cell* 58:257-267.
22. Ewen, M. E., Y. G. Xing, J. B. Lawrence, and D. M. Livingston. 1991. Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 66:1155-1164.
23. Fattaey, A. R., E. Harlow, and K. Helin. 1993. Independent regions of adenovirus E1A are required for binding to and dissociation of E2F-protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* 13:7267-7277.

24. Firzlaff, J. M., B. Luscher, and R. N. Eisenman. 1991. Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5187-5191.
25. 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.
26. Holman, P. S., O. V. Gjoerup, T. Davin, and B. S. Schaffhausen. 1994. Characterization of an immortalizing N-terminal domain of polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* 68:668-673.
27. Jat, P. S., and P. Sharp. 1986. Large T antigen of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J. Virol.* 59:746-750.
28. Khandjian, E. W., and S. Tremblay. 1992. Phosphorylation of the retinoblastoma protein is modulated in mouse kidney cells infected with polyomavirus. *Oncogene* 7:909-917.
29. Kuenzel, E. A., J. A. Mulligan, J. Sommercorn, and E. G. Krebs. 1987. Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 262:9136-9140.
30. Lam, E. W., J. D. Morris, R. Davies, T. Crook, R. J. Watson, and K. H. Vousden. 1994. HPV16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes. *EMBO J.* 13:871-878.
31. Land, H., L. F. Parada, and R. A. Weinberg. 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304:596-602.

32. Larose, A., N. Dyson, M. Sullivan, E. Harlow, and M. Bastin. 1991. Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J. Virol.* 65:2308-2313.
33. Lee, W. H., R. Bookstein, F. Hong, L. J. Young, J. Y. Shew, and E. Y. Lee. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235:1394-1399.
34. Lees, E., B. Faha, V. Dulic, S. I. Reed, and E. Harlow. 1992. Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev.* 6:1874-1885.
35. Lillie, J. W., M. Green, and M. R. Green. 1986. An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression. *Cell* 46:1043-1051.
36. Manfredi, J. J., and C. Prives. 1990. Binding of p53 and p105-RB is not sufficient for oncogenic transformation by a hybrid polyomavirus-simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 64:5250-5259.
37. Manfredi, J. J., and C. Prives. 1993. Primary rat cells expressing a hybrid polyomavirus-simian virus 40 large T antigen have altered growth properties. *J. Virol.* 67:4750-4759.
38. Manfredi, J. J., and C. Prives. 1994. The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochi. Biophys Acta* 1198:65-83.
39. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and S. J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, U.S.A.
40. Moran, E., B. Zerler, T. M. Harrison, and M. B. Mathews. 1986. Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization activity and the activation of virus early genes. *Mol. Cell. Biol.* 6:3470-3480.

41. Münger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow, and P. M. Howley. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8:4099-4105.
42. Nevins, J. R. 1992. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258:424-429.
43. Peden, K. W., A. Srinivasan, J. M. Farber, and J. M. Pipas. 1989. Mutants with changes within or near a hydrophobic region of simian virus 40 large tumor antigen are defective for binding cellular protein p53. *Virology* 168:13-21.
44. Rassoulzadegan, M., A. Cowie, A. Carr, N. Glaichenhaus, R. Kamen, and F. Cuzin. 1982. The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300:713-718.
45. Rassoulzadegan, M., Z. Naghashfar, A. Cowie, A. Carr, M. Grisoni, R. Kamen, and F. Cuzin. 1983. Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblast cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4354-4358.
46. Rihs, H. P., D. A. Jans, H. Fan, and R. Peters. 1991. The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10:633-639.
47. Shirodkar, S., M. Ewen, J. A. DeCaprio, J. Morgan, D. M. Livingston, and T. Chittenden. 1992. The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* 68:157-166.
48. Soeda, E., J. R. Arrand, N. Smolar, J. E. Walsh, and B. E. Griffin. 1980. Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* 283:445-453.

49. Sompayrac, L., and K. J. Danna. 1991. The amino-terminal 147 amino acids of SV40 large T antigen transform secondary rat embryo fibroblasts. *Virology* 181:412-415.
50. Sunstrom, N.-A., N. H. Acheson, and J. A. Hassell. 1991. Determination of the origin-specific DNA-binding domain of polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* 65:6998-7003.
51. Tavis, J. E., P. W. Trowbridge, and R. J. Frisque. 1994. Converting the JCV T antigen Rb binding domain to that of SV40 does not alter JCV's limited transforming activity but does eliminate viral viability. *Virology* 199:384-392.
52. Tegtmeyer, P., and H. L. Ozer. 1971. Temperature-sensitive mutants of simian virus 40: infection of permissive cells. *J. Virol.* 8:516-524.
53. Wang, E. H., P. N. Friedman, and C. Prives. 1989. The murine p53 protein blocks replication of SV40 DNA *in vitro* by inhibiting the initiation functions of SV40 large T antigen. *Cell* 57:379-392.
54. Whyte, P., H. E. Ruley, and E. Harlow. 1988. Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.* 62:257-265.
55. Whyte, P., N. M. Williamson, and E. Harlow. 1989. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* 56:67-75.
56. Wigler, M., A. Pellicer, S. Silverstein, and R. Axel. 1978. Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* 14:725-731.
57. Zerler, B., B. Moran, K. Maruyama, J. Moomaw, T. Grodzicker, and H. E. Ruley. 1986. Adenovirus E1A coding sequences that enable ras and pmt oncogenes to transform cultured primary cells. *Mol. Cell. Biol.* 6:887-899.
58. Zhu, L., S. van den Heuvel, K. Helin, A. Fattaey, M. Ewen, D. Livingston, N. Dyson, and E. Harlow. 1993. Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 7:1111-1125.

### Figure legends.

**Figure 1: Sequence comparison of the CR2 and CKII motifs of selected DNA tumor virus oncoproteins.**

The sequences of Adenovirus E1A, HPV16 E7 and various polyomavirus large T-antigen proteins are aligned to show the region of homology within the pRb-binding and CKII phosphorylation motifs. Conserved amino acids within the core pRb-binding sequence are shown in bold. The CKII motifs are shaded with phosphorylatable serine residues shown in bold.

**Figure 2: Schematic representation of the functional domains within Py LT-Ag and SV40 T antigen.**

This figure illustrates the conservation of the nature and organization of the functional domains within Py LT-Ag and SV40 T antigen. While significant homologies exist between Py LT-Ag and SV40 T antigen, the alignment of the proteins depends on the introduction of a gap in SV40 T antigen to accommodate a unique stretch of 154 amino acids found only in Py LT-Ag (48). CR1: conserved region 1; CR2: conserved region 2; NLS: nuclear localization signal; DNA: DNA binding domain; Zinc: zinc finger motif.

**Figure 3: Structure of the recombinant plasmids and experimental strategy used in this study.**

The structure of the parent plasmid pPyLT is described elsewhere (50). pPyLT-1 was generated by inserting a BamHI/BglII/XhoI adaptor in pPyLT, at the XhoI site. An XhoI-KpnI fragment containing the pRb binding site was excised from pPyLT and re-cloned into pBluescript-SK- (Stratagene) to produce pSKLT and used to

generate Py LT-Ag mutants as described in Materials and Methods. BapSV40Ttsa58A contains a temperature sensitive allele of SV40 T antigen (52) inserted downstream of the  $\beta$ -actin promoter and intervening sequence. BPyLT was derived from BapSV40Ttsa58A by replacing the SV40 T antigen coding sequence by Py LT-Ag cDNA excised from pPyLT-1 with BamHI.

**Figure 4: Amino acid substitutions in Py LT-Ag in the pRb-binding and CKII motifs.**

The Py LT-Ags used in this study are presented with the amino acid substitutions aligned below the corresponding residues of the wild-type sequence. The extent of amino acid deletion is indicated by a solid line. Conserved amino acids of the core pRb-binding sequence are shown in bold while the putative CKII phosphorylation motifs are shaded with phosphorylatable serine residues shown in bold. The consensus pRb-binding sequence and CKII motifs are presented under the wild-type Py LT-Ag sequence.

**Figure 5: *In vitro* pRb and p107 binding assays.**

The Py LT-Ag mutants were translated *in vitro* in the presence of  $^{35}\text{S}$ -methionine and tested for their ability to interact with immobilized GST-Rb or GST-107. Approximately equal amounts of GST, GST-pRb or GST-p107 were added and the mixture was rocked at  $4^\circ\text{C}$  for three hours. The beads were collected by centrifugation and washed four times with 1.0 ml of binding buffer. Bound proteins were eluted by boiling in SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE and fluorography. Panel A: representative *in vitro* pRb-binding assay. Panel B: representative *in vitro* p107-binding assay.

**Figure 6: Relative immortalization frequency of primary REF by wild-type and mutant Py LT-Ag.**

Colonies of G-418 resistant cells were picked 4 weeks after selection and transferred to 24-well plates. Before reaching confluence, these clones were expanded. Cell lines were considered immortal if they could be passaged 5 or more times, at a 1:5 dilution, after reaching 100mm plates. The relative immortalization frequency of primary REF by the different mutants is expressed as a percentage of the immortalizing activity of the wild-type Py LT-Ag and the data represent the average of at least 2 experiments.

FIGURE 1: Pilon *et al.*,

		Core	Flanking	CKII	
<b>E1A</b>	120	I <b>DLTCHE</b>	AGFP	<b>PSDDEDE</b>	137
<b>E7</b>	20	T <b>DLYCYE</b>	QLND	<b>SSEEEDE</b>	37
<b>SV40</b>	101	E <b>NLFCSE</b>	EMP	<b>SSDDEAT</b>	117
<b>BKV</b>	103	E <b>DLFCHE</b>	DMFA	<b>SDEEAT</b>	119
<b>JCV</b>	103	E <b>DLFCHE</b>	EMFA	<b>SDDENT</b>	119
<b>LPV</b>	129	D <b>DLFCSE</b>	TMS	<b>SSSDEDT</b>	145
<b>PyV</b>	140	P <b>DLFCYE</b>	EPL	<b>LSPNPSSPTDTP</b>	161
<b>HaPV</b>	128	E <b>DLTCQE</b>	ELS	<b>SSEDEFT</b>	144
<b>pRb cons.</b>		<b>DLXCXE</b>			
		<b>N</b>			
<b>CKII cons.</b>				<b>SXXXD</b>	
				<b>T</b>	

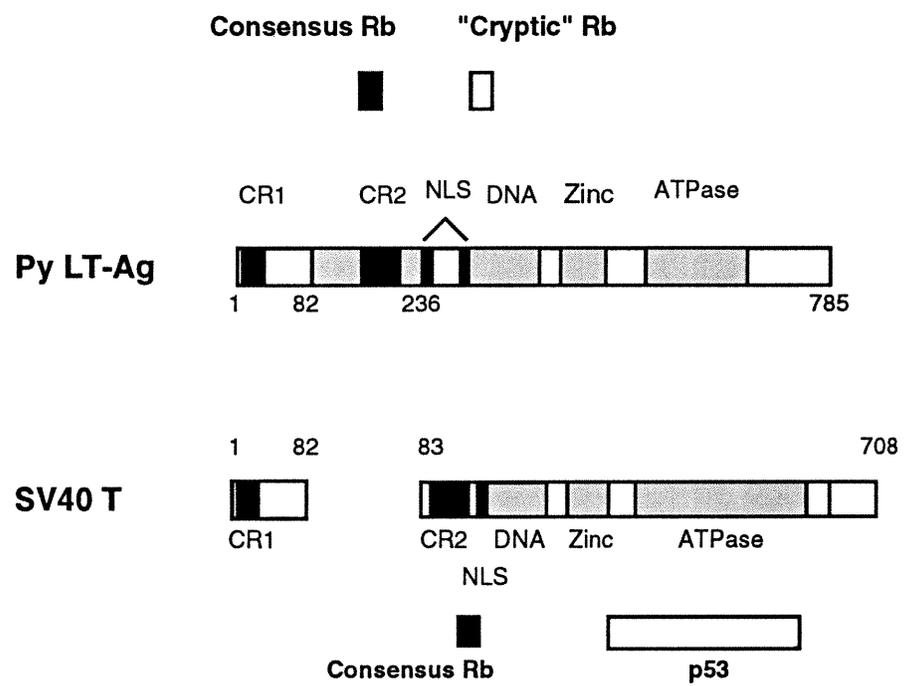
FIGURE 2: Pilon *et al.*,

FIGURE 3: Pilon *et al.*,

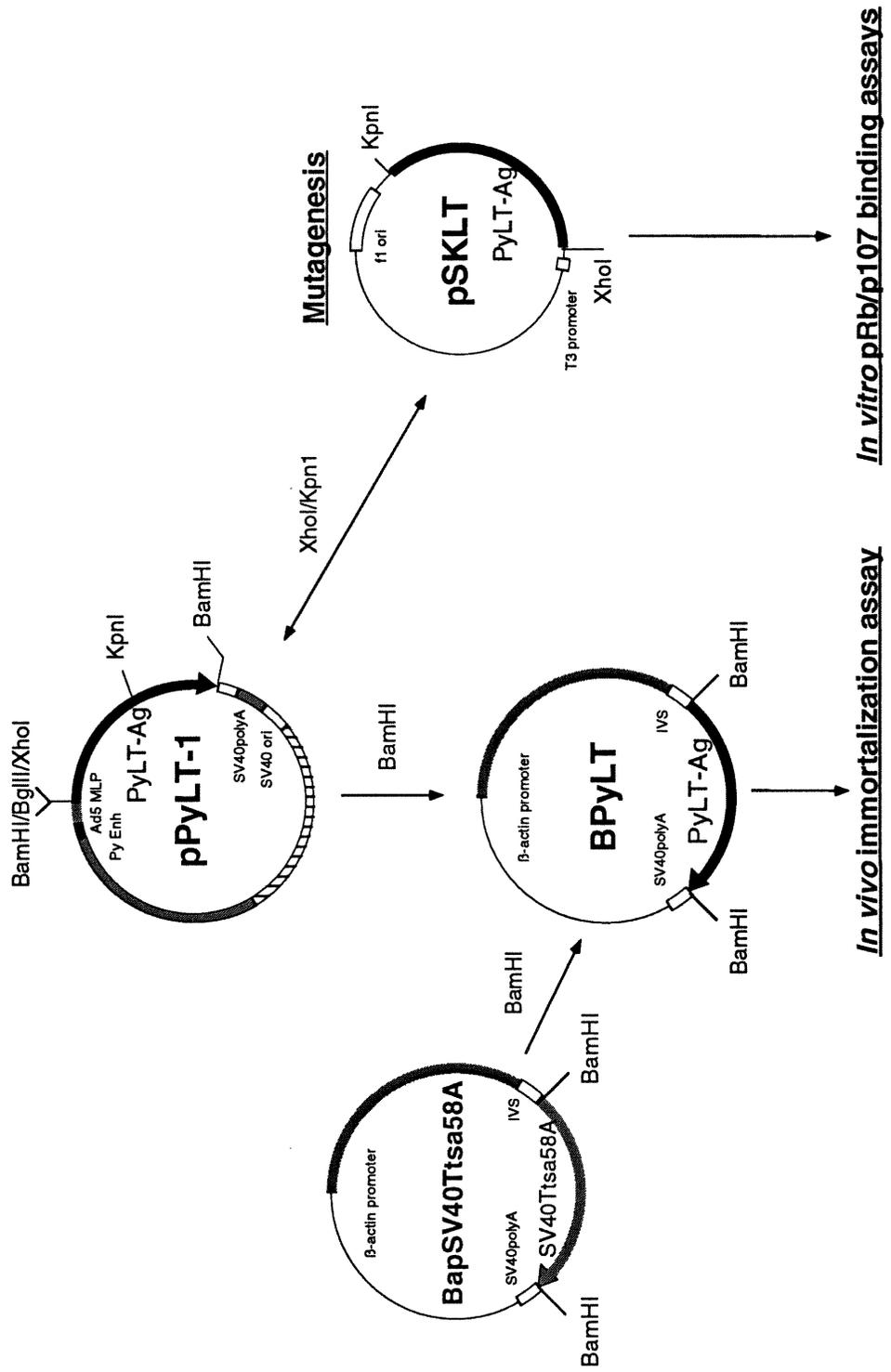


FIGURE 4: Pilon *et al.*,

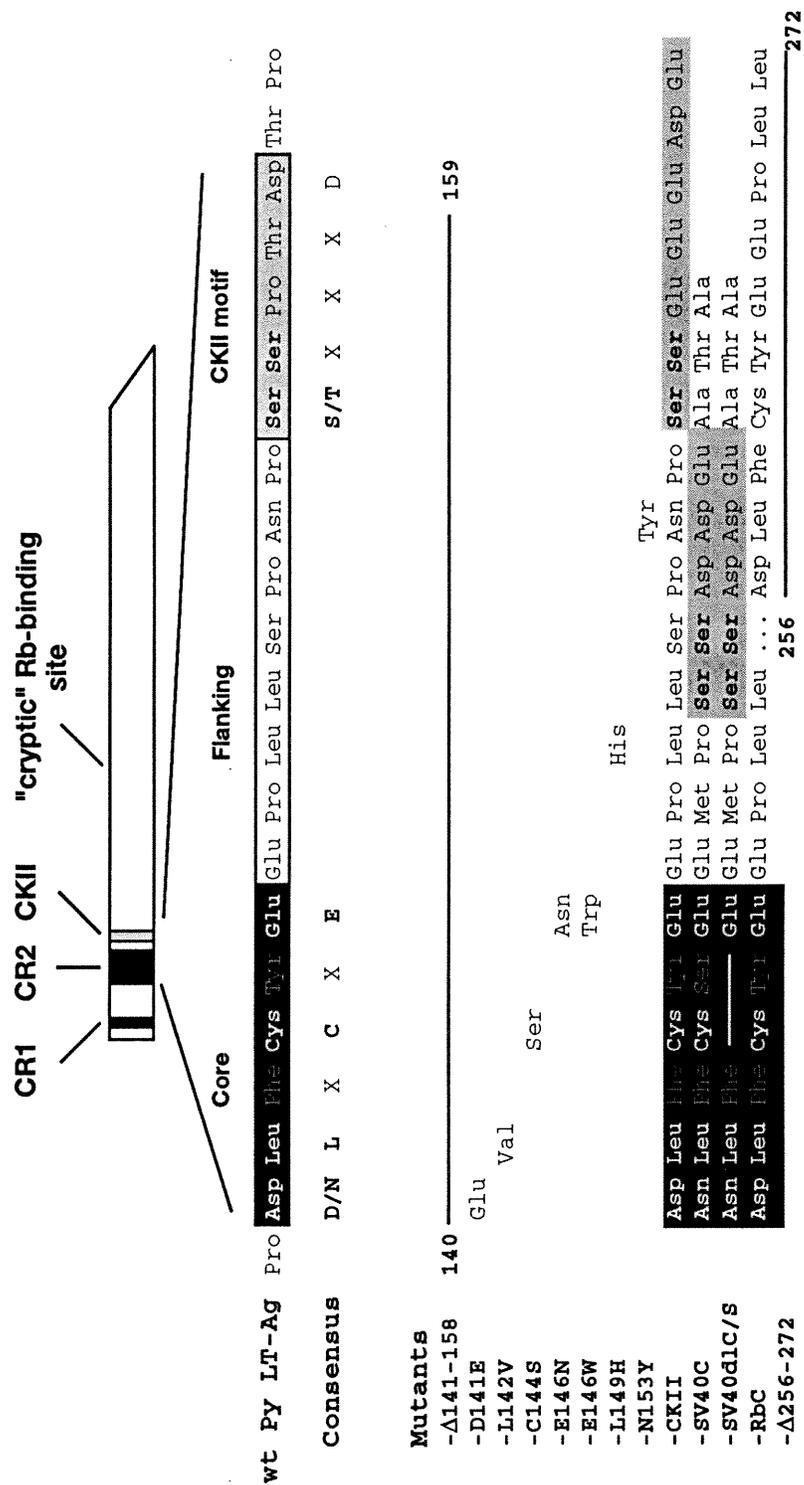


FIGURE 5: Pilon *et al.*,

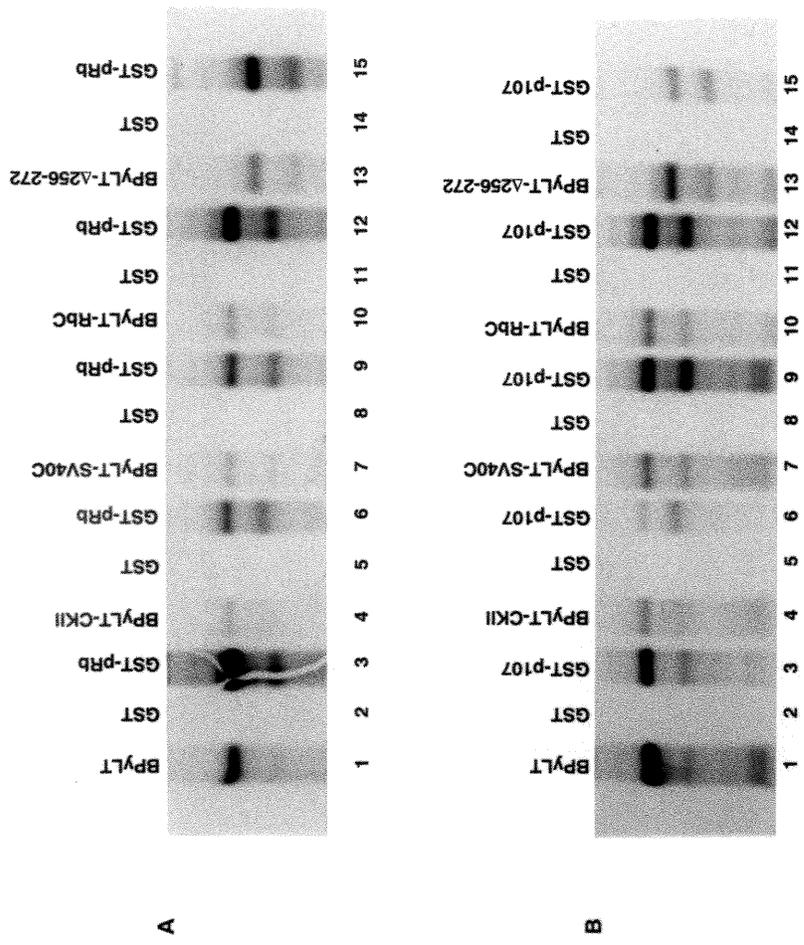


FIGURE 6: Pilon *et al.*,

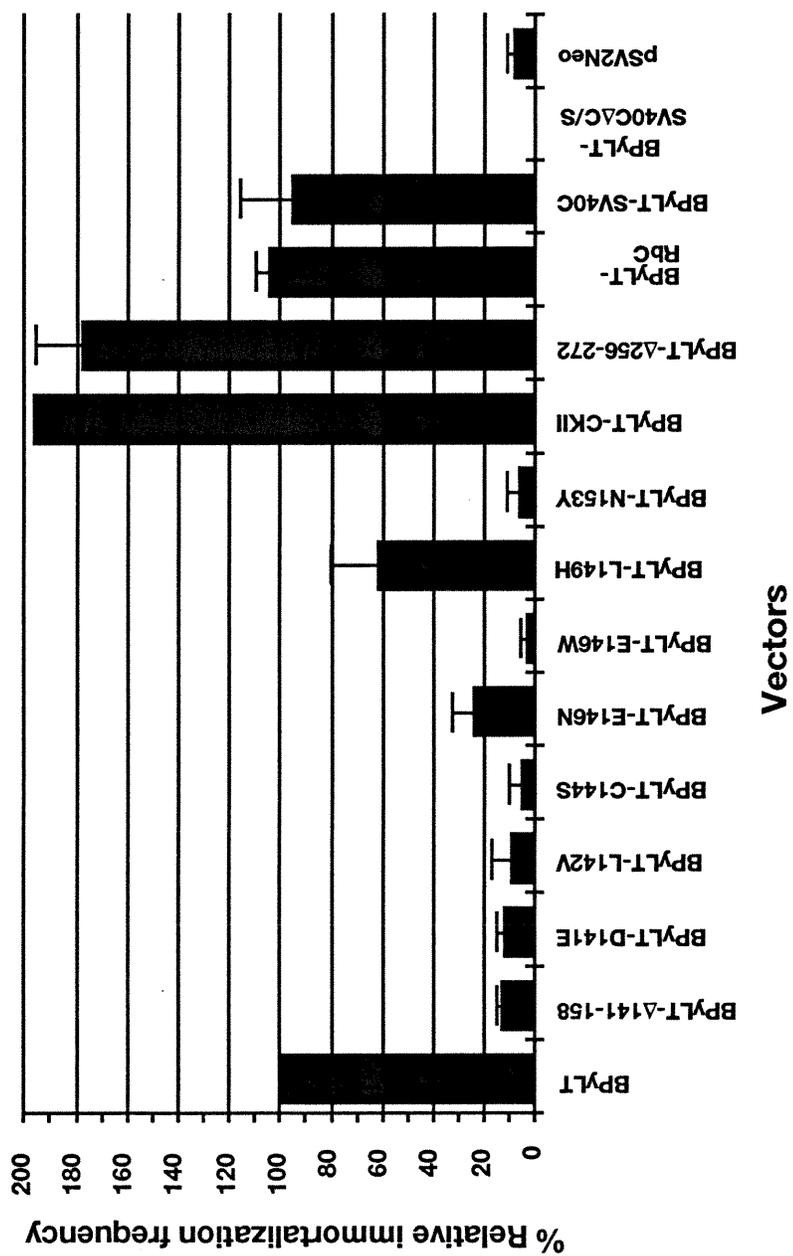


TABLE 1: Pilon *et al.*,

*IN VITRO* pRb- AND p107-BINDING AND RELATIVE IMMORTALIZATION  
 FREQUENCY OF PRIMARY REF BY WILD-TYPE AND MUTANT PY LT-AGS

Vector	pRb	p107	Rel. Imm. Freq. (% $\pm$ S.E.)
BPyLT	100	100	100
pSV2Neo	n.d.	n.d.	8 $\pm$ 3.2
BPyLT- $\Delta$ 141-158	0	0	13 $\pm$ 1.5
BPyLT-D141E	1	0	12 $\pm$ 2.5
BPyLT-L142V	0	0	9 $\pm$ 9
BPyLT-C144S	5	0	5 $\pm$ 4.5
BPyLT-E146N	0	0	24 $\pm$ 12.5
BPyLT-E146W	0	0	3 $\pm$ 2.5
BPyLT-L149H	20	0	62 $\pm$ 21
BPyLT-N153Y	28	25	6 $\pm$ 5.5
BPyLT-CKII	180	23	196 $\pm$ 0
BPyLT- $\Delta$ 256-272	295	22	178 $\pm$ 17.5
BPyLT-RbC	440	398	104 $\pm$ 3.5
BPyLT-SV40C	319	298	95 $\pm$ 11.3
BPyLT-SV40CAC/S	0	0	0

TABLE 2: Pilon *et al.*,GROWTH CHARACTERISTICS OF WILD-TYPE AND  
MUTANT PY LT-AG IMMORTALIZED CELL LINES

Cell lines	Saturation densities in 10% serum*	Doubling time in .5% serum (hr)	Growth in soft agar
REF	1.9	100	(-)
BPyLT-D4	2.9	48	(-)
BPyLT-D5	2.1	48	(-)
BPyLT-CKII-9C4	3.5	40	(++)
BPyLT-CKII-4C6	3.1	48	(+)
BPyLT-CKII-3A5	3.1	n.d.	(++)
BPyLT-Δ256-272-D1	1.8	100	(++)
BPyLT-Δ256-272-E6	1.9	40	(++)
BPyLT-SV40C-F6	4.2	48	(+/-)
BPyLT-SV40C-A3	2.2	100	(+/-)
BPyLT-SV40C-D2	n.d.	n.d.	(+/-)
BPyLT-SV40C-C4	n.d.	n.d.	(+/-)
BPyLT-SV40C-D1	n.d.	n.d.	(+/-)
BPyLT-RbC-A1	3.5	48	(-)
BPyLT-RbC-A5	5.9	100	(-)
BPyLT-RbC-B1	5.2	100	(-)

\* X 10<sup>6</sup> CELLS/60 MM PLATES

**6.0 POLYOMAVIRUS LARGE T ANTIGEN BINDS THE pRb RELATED  
PROTEIN p130 THROUGH SEQUENCES IN CONSERVED REGION 2**

ARTICLE EN PRÉPARATION

(VIROLOGY: SHORT COMMUNICATIONS)

Polyomavirus large T antigen binds the “pRb related” protein p130  
through sequences in conserved region 2.

**Running title:** Polyomavirus large T antigen binds p130 *in vitro*.

André A. Pilon<sup>1</sup>, Paul Desjardins<sup>2</sup>, John A. Hassell<sup>2</sup>, and Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,3\*</sup>.

Centre de recherche Louis-Charles Simard/Institut du cancer de Montréal, 1560, rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1<sup>1</sup>, Institute for Molecular Biology and Biotechnology, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada, L8S 4K1<sup>2</sup>, Département de Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale A, Québec, Canada H3C 3J7<sup>3</sup>

\* Corresponding author

Tel: (514)876-5491

Fax: (514) 876-5476

**Abstract.**

DNA tumor viruses encode proteins that target key cellular regulators to affect cell cycle progression. Many of these viral oncoproteins have the ability to form complexes with the product of the retinoblastoma tumor suppressor gene through homologous conserved regions. pRb is only one member of a family of proteins, which include the p107 and p130 proteins, that have been involved in the regulation of the cell cycle. It has now been shown that the E1A protein of adenovirus is able to complex with all three pRb related proteins through sequences in the conserved regions 1 and 2. Polyomavirus large T antigen is also able to complex pRb and p107 through homologous regions. In a previous study, we have shown that the pRb and p107 binding domains overlap between residues 141 and 158 (1). In this study, we demonstrate that polyomavirus large T antigen is also able to bind p130 *in vitro* through the same conserved sequences in conserved region 2.

Many viral oncoproteins have the ability to form specific complexes with the product of the retinoblastoma tumor suppressor gene. Complex formation is dependent upon homologous conserved regions within these proteins. The E1A oncoprotein of adenovirus interacts with pRb through two distinct non-continuous sequences that have been called conserved region 1 and 2 (CR1 and CR2) (2). Homologous sequences have been found in the large T antigens (LT) of simian virus 40 (SV40) (3) and murine polyomavirus (4), and the human papilloma virus (HPV) E7 protein (5). The large T antigens of human JC virus, human BK virus, murine polyomavirus, baboon SA12 virus, and monkey lymphotropic papovavirus have been shown to form specific complexes with pRb *in vitro* (4). This association with pRb, via a consensus Rb-binding domain, is an important component of virus-mediated transformation. Several groups have shown that the conserved Rb-binding motif in the CR2, consisting of the amino acids D/N-L-X-C-X-E (the "core" Rb-binding sequence), is essential for the interaction between Rb and various viral oncoproteins (5, 6) and that this interaction is required for transformation (2, 7-12).

Several studies have led researchers to propose a model of the regulation of the cell cycle by pRb [reviewed in (13)]. At interphase, it is believed that pRb maintains cells in a quiescent state by repressing transcription of genes required for cell cycle progression (14). It has been shown that pRb exerts its influence in part through its interaction with the E2F transcription factor (15-17). The interaction of the viral oncoproteins with pRb results in the release of E2F, which is required for the expression of genes involved in the regulation of the cell cycle (14, 18). While pRb is clearly involved in the control of the transcriptional activity of the E2F complex in the late G1/S phase of the cell cycle (14) it has become increasingly clear that E2F is also a cellular target for the "pRb-related proteins", p107 and p130,

which also possess the E1A/T binding pocket (19, 20). Both pRb-related proteins bind E2F (20-22), and p107 also regulates E2F-specific transcriptional activity *in vivo* (23). p107 and p130 have been shown to inhibit cell proliferation suggesting a tumor suppressor-like activity (24, 25). The interaction of pRb, p107, p130 with the E2F transcription factor may be required to effect progression through the cell-cycle. Thus, these pRb related proteins may play an important role in tumorigenesis and their interaction with DNA tumor virus oncoproteins needs to be examined in more detail.

Polyomavirus large T antigen plays an important role in the immortalization of primary cells and is required to complement the ability of several other oncoproteins to achieve full transformation (26, 27). However, polyomavirus large T antigen cannot induce cellular transformation by itself. In a previous study, we have shown that the ability of polyomavirus large T antigen to immortalize primary rat embryo fibroblasts is entirely dependent on its capacity to bind pRb (1). The domain responsible for pRb-binding and immortalization has been localized to amino acids 141-146 of polyomavirus large T antigen (28), and has been recently more precisely characterized in relation to its interaction with both pRb and p107 (1). The E1A viral oncoprotein has been shown to form specific complexes, through its CR2 transforming domain, with the recently characterized p130 protein (29). However, it is not known if polyomavirus large T antigen interacts with p130 protein. In this report, we have investigated the ability of the wild-type polyomavirus large T antigen and a mutant polyomavirus large T antigen mutated in CR2 to complex with p130.

Since the E1A/p130 interaction involves the CR2 of the viral oncoprotein, we targeted the homologous region for deletion within polyomavirus large T antigen. Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis was performed on the

pPyLT-1 expression vector to delete residues 141 to 158, which correspond to polyomavirus large T antigen CR2, to create the pPyLT- $\Delta$ 141-158 mutant (Fig. 1). Sequences containing the first 196 residues of polyomavirus wild-type and mutant  $\Delta$ 141-158 large T antigen were cloned in the pGEX vector (Pharmacia) to produce the desired GST-LT fusion proteins. The GEX-PyLT and GEX-PyLT- $\Delta$ 141-158 fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and immobilized on glutathione-Sepharose beads (Pharmacia). Complementary RNAs were synthesized from linearized pSPUTK-Rb, pSPUTK-107 or pSPUTK-130 templates according to standard *in vitro* transcription methodology and translated *in vitro* in the presence of  $^{35}\text{S}$ -methionine as described by the supplier (Promega). pSPUTK-Rb was created by cleaving and subcloning a fragment, coding for residues 301-928 of human Rb, from p4.95BT (kindly provided by T.P. Dryja) and subcloning into the pSPUTK vector (32). pSPUTK-107 was created by cleaving and subcloning into pSPUTK (32) a fragment, coding for residues 228-1068 of human p107 from pCMV-107 (25). Finally, pSPUTK-130 was created by cleaving from pBS-SK130 (31) a fragment coding for residues 322-1139 of human p130 and cloning into pSPUTK (32). The proteins were then tested for their ability to interact with immobilized GST-PyLT or GST-PyLT $\Delta$ 141-158. The GST-PyLT or GST-PyLT- $\Delta$ 141-158 beads were mixed with radioactively labelled pRb, p107 or p130, and incubated at 4°C for three hours. Bound proteins were eluted by boiling the beads in SDS sample buffer and applied to a SDS-polyacrylamide gel. The result of this experiment is illustrated in Fig. 2. The wild-type polyomavirus large T antigen protein was able to associate not only with pRb (lane 3) and p107 (lane 11), but also with p130 (lane 7). However, the deletion mutant PyLT- $\Delta$ 141-158 was not able to associate with any of these proteins (lane 4, 8 and 12), suggesting that the deleted stretch of amino acids is essential not only for pRb and p107 binding but also for interaction with p130.

In this study, using wild-type and CR2 mutant polyomavirus large T antigen, we were able to demonstrate that polyomavirus large T antigen binds p130 *in vitro*. This is, to our knowledge, the first report of any interaction between polyomavirus large T antigen and p130. In addition, we were able to determine that p130 binds polyomavirus large T antigen between residues 141-158, a region encompassing the pRb-binding motif. Thus, within polyomavirus large T antigen, this stretch of amino acids is required to bind all pRb related proteins; pRb, p107 and p130. These results correlate well with the finding that the E1A oncoprotein also binds all three pRb related proteins through the homologous CR2 region (29). This suggests that in these two viral oncoproteins, the CR2 is not only highly homologous in sequence but also seems to possess similar biochemical activity. Further experiments will be needed to address the specific role of p130 in the process of cellular immortalization by polyomavirus large T antigen.

#### **Acknowledgments.**

We wish to thank Laura Hastings for her excellent technical assistance. This research was funded by MRC grant MT-10959 to A.-M.M.-M. and by an NCI grant to J.A.H. A.-M. M.-M. is a recipient of an F.R.S.Q. fellowship.

## References.

1. Pilon, A. A., P. Desjardins, J. A. Hassell, and A.-M. Mes-Masson. *Submitted* (1995).
2. Whyte, P., H. E. Ruley, and E. Harlow. *J. Virol.* 62:257-265 (1988).
3. DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, J. Figge, J. Y. Shew, C. M. Huang, W. H. Lee, E. Marsilio, E. Paucha, and D. M. Livingston. *Cell* 54:275-283 (1988).
4. Dyson, N., R. Bernards, S. H. Friend, L. R. Gooding, J. A. Hassell, E. O. Major, J. M. Pipas, T. Vandyke, and E. Harlow. *J. Virol.* 64:1353-1356 (1990).
5. Dyson, N., P. M. Howley, K. Münger, and E. Harlow. *Science* 243:934-937 (1989).
6. DeCaprio, J. A., J. W. Ludlow, D. Lynch, Y. Furukawa, J. Griffin, H. Piwnica-Worms, C. M. Huang, and D. M. Livingston. *Cell* 58:1085-1095 (1989).
7. Edmonds, C., and K. H. Vousden. *J. Virol.* 63:2650-2656 (1989).
8. Lillie, J. W., M. Green, and M. R. Green. *Cell* 46:1043-1051 (1986).
9. Moran, E., B. Zerler, T. M. Harrison, and M. B. Mathews. *Mol. Cell. Biol.* 6:3470-3480 (1986).
10. Münger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow, and P. M. Howley. *EMBO J.* 8:4099-4105 (1989).
11. Whyte, P., N. M. Williamson, and E. Harlow. *Cell* 56:67-75 (1989).
12. Zerler, B., B. Moran, K. Maruyama, J. Moomaw, T. Grodzicker, and H. E. Ruley. *Mol. Cell. Biol.* 6:887-899 (1986).
13. Weinberg, R. A. *Cell* 81:323-330 (1995).
14. Hiebert, S. W., S. P. Chellappan, J. M. Horowitz, and J. R. Nevins. *Genes Dev.* 6:177-185 (1992).

15. Bagchi, S., R. Weinmann, and P. Raychaudhuri. *Cell* 65:1063-1072 (1991).
16. Chellappan, S. P., S. Hiebert, M. Mudryj, J. M. Horowitz, and J. R. Nevins. *Cell* 65:1053-1061 (1991).
17. Chittenden, T., D. M. Livingston, and W. G. Kaelin, Jr. *Cell* 65:1073-1082 (1991).
18. Bandara, L. R., V. M. Buck, M. Zamanian, L. H. Johnston, and N. B. La Thangue. *EMBO J.* 12:4317-4324 (1993).
19. Lees, E., B. Faha, V. Dulic, S. I. Reed, and E. Harlow. *Genes Dev.* 6:1874-1885 (1992).
20. Cobrinik, D., P. Whyte, D. S. Peeper, T. Jacks, and R. A. Weinberg. *Genes Dev.* 7:2392-2404 (1993).
21. Cao, L., B. Faha, M. Dembski, L. H. Tsai, E. Harlow, and N. Dyson. *Nature* 355:176-179 (1992).
22. Shirodkar, S., M. Ewen, J. A. DeCaprio, J. Morgan, D. M. Livingston, and T. Chittenden. *Cell* 68:157-166 (1992).
23. Lam, E. W., J. D. Morris, R. Davies, T. Crook, R. J. Watson, and K. H. Vousden. *EMBO J.* 13:871-878 (1994).
24. Claudio, P. P., C. M. Howard, A. Baldi, A. De Luca, Y. Fu, G. Condorelli, Y. Sun, N. Colburn, B. Calabretta, and A. Giordano. *Cancer Res.* 54:5556-5560 (1994).
25. Zhu, L., S. van den Heuvel, K. Helin, A. Fattaey, M. Ewen, D. Livingston, N. Dyson, and E. Harlow. *Genes Dev.* 7:1111-1125 (1993).
26. Rassoulzadegan, M., Z. Naghashfar, A. Cowie, A. Carr, M. Grisoni, R. Kamen, and F. Cuzin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4354-4358 (1983).
27. Land, H., L. F. Parada, and R. A. Weinberg. *Nature* 304:596-602 (1983).

28. Larose, A., N. Dyson, M. Sullivan, E. Harlow, and M. Bastin.  
*J. Virol.* 65:2308-2313 (1991).
29. Mayol, X., X. Grana, A. Baldi, N. Sang, H. Qianjin, and A. Giordano.  
*Oncogene* 8:2561-2566 (1994).
30. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and S. J. . Cold Spring Harbor Laboratory,  
Cold Spring Harbor. U.S.A.(1982).
31. Li, Y., C. Graham, S. Lacy, A. M. V. Duncan, and P. Whyte.  
*Genes Dev.* 7:2366-2377 (1993).
32. Falcone, D., and D. W. Andrews. *Mol. Cell. Biol.* 11:2656-2664 (1991).
33. Pipas, J. M. *J. Virol.* 66:3979-3985 (1992).

**Figure legends.****Figure 1: Schematic representation of wild-type and mutant PyLT-Ags.**

The wild type and mutant Py LT-Ags mutant used in this study are presented here with the extent of amino acid deletion indicated by a solid line. Conserved amino acids of the core pRb-binding sequence are shown in bold while the putative CKII phosphorylation motifs are shaded with phosphorylatable serine residues shown in bold. The consensus pRb-binding sequence and CKII motifs are presented under the wild-type Py LT-Ag sequence.

**Figure 2: *In vitro* pRb, p107 and p130 binding assays.**

The pSPUTK-Rb, pSPUTK-107 and pSPUTK-130 were linearized downstream of their coding sequences, and transcribed with SP6 RNA polymerase (Gibco, BRL). <sup>35</sup>S-methionine labeled proteins were synthesized by *in vitro* translation of 2 µg of cRNA in 35 µl of rabbit reticulocyte lysate as directed by the supplier (Promega). Equal amount (2 µg) of GST, GST-PyLT or GST-PyLT-Δ141-158 fusion proteins were diluted in 500 µl of binding buffer (50 mM Hepes, pH 7.0; 250 mM NaCl; 0.1% Nonidet P-40). Equal numbers of TCA-precipitable counts ( $3 \times 10^5$ ) of labeled proteins were added and the mixture was rocked at 4°C for three hours. The beads were collected by centrifugation and washed four times with 1.0 ml of binding buffer. Bound proteins were eluted by boiling in SDS sample buffer and subjected to SDS-PAGE and fluorography. Lane 1, 3 and 9: Input of radiactively labelled pRb, p130 and p107. Lane 2, 6 and 10: *in vitro* binding of labeled pRb, p130 or p107 proteins to GST protein alone. Lane 3, 7 and 11: *In vitro* binding of labeled pRb, p107 and p130 proteins to wild-type polyomavirus large T antigen. Lane 4, 8 and 12: *In vitro* binding of labeled pRb, p130 and p107 proteins to polyomavirus large T antigen mutant PyLT-Δ141-158.

FIGURE 1: Pilon *et al.*,

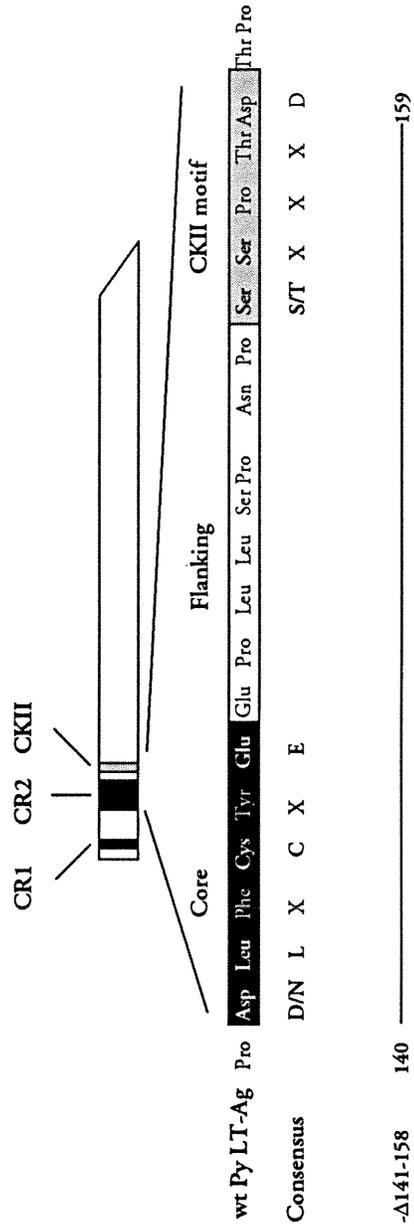
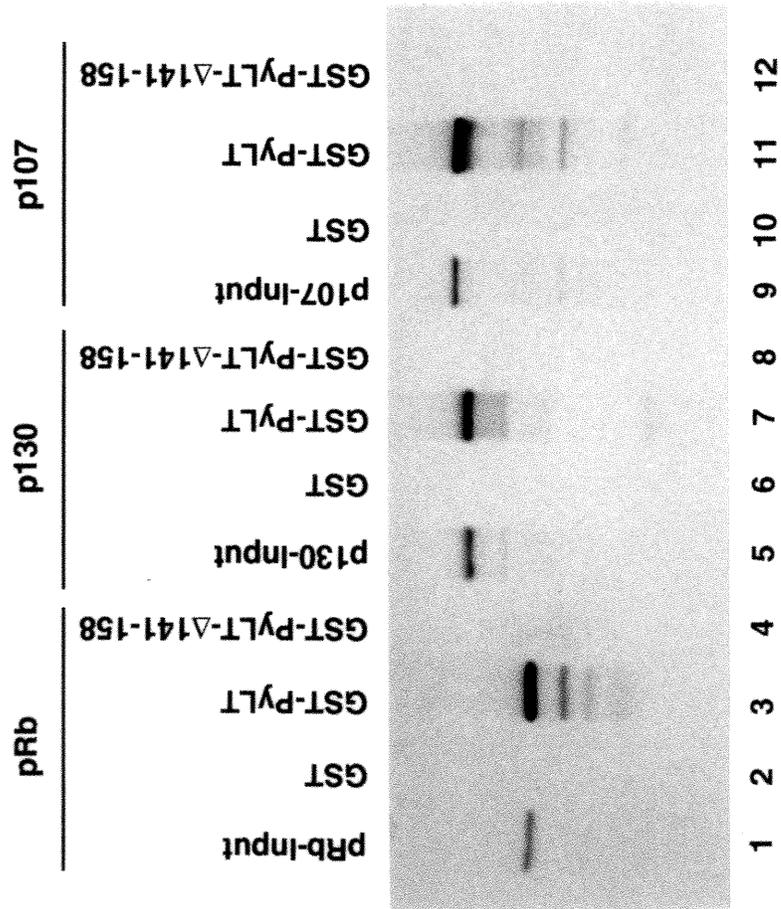


FIGURE 2: Pilon *et al.*,



**7.0 POLYOMAVIRUS LARGE T ANTIGEN ZINC FINGER IS NOT REQUIRED  
FOR EFFICIENT CELLULAR IMMORTALIZATION OF PRIMARY RAT EMBRYO  
FIBROBLASTS**

**Article soumis à: Virology**

**SHORT COMMUNICATIONS**

**(1995)**

**Polyomavirus large T antigen zinc finger is not required  
for efficient cellular immortalization of primary rat embryo fibroblasts.**

**Running title:** Polyomavirus large T antigen zinc finger mutant.

André A. Pilon<sup>1</sup> and Anne-Marie Mes-Masson<sup>1, 2\*</sup>.

Centre de recherche Louis-Charles Simard/Institut du cancer de Montréal, 1560  
rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1<sup>1</sup> and Département de  
Médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale A, Montréal, Québec,  
Canada, H3C 3J7<sup>2</sup>

\* Corresponding author

Tel (514) 876-5491

Fax (514) 876-5476

e-mail mesmassa@ere.umontreal.ca

**Abstract.**

The polyomavirus large T antigen contains a zinc finger domain required for the formation of hexamers involved in viral DNA replication. Since mutations within the zinc finger domains of transforming proteins like SV40 large T antigen and human papilloma virus E7 protein generally decrease their overall transforming activity, we have examined the ability of a mutant polyomavirus large T antigen that harbors a deletion in sequences within the zinc finger motif to immortalize primary rat embryo fibroblasts. In contrast to result obtained with SV40 large T antigen and the human papilloma virus E7 protein we show that deletion of the entire zinc finger motif enhances the immortalization efficiency of this mutant T antigen.

Polyomavirus large T antigen (Py LT-Ag) is a multifunctional 785 amino acid nuclear phosphoprotein of approximately 100 kDa. During productive infection, PyLT-Ag induces the host cell entry into S-phase (1), is involved in viral DNA replication (2), and regulates early and late transcription of viral genes (3). Many of the viral oncoproteins contain zinc finger consensus sequences and are able to bind zinc. Although the zinc finger motif is often found in DNA binding proteins, these motifs have also been implicated in protein-protein interactions as has been shown for the E1A protein of adenovirus (4), SV40 large T antigen (5, 6) and HPV16 E7 protein (7). PyLT-Ag contains a zinc finger motif, located between residues 452-472, that has been shown to play an important role in viral replication (9). The PyLT-Ag zinc finger motif contains two cysteine residues, (residues 452 and 455), as well as three histidines (residues 465, 469 and 472) (9). Mutation of any of the conserved residues (Cys-452, Cys-455, His-465 or His-469) abolished the ability of PyLT-Ag to replicate viral DNA but did not affect binding to the viral origin of replication (9). PyLT-Ag can form multimeric T antigen complexes of high molecular weight which corresponds to the size of a hexamer (8). All mutations within the conserved sequence of the zinc finger motif abolished the ability of PyLT-Ag to self-associate (9).

PyLT-Ag has the ability to immortalize primary rat embryo fibroblasts (10). This immortalizing activity has been shown to involve binding of the retinoblastoma tumor suppressor gene product to PyLT-Ag between residues 141 and 146 (11, 12). Although the expression of a PyLT-Ag N-terminal fragment (residues 1 to 219) is sufficient for the immortalization of primary rat embryo fibroblasts, the immortalizing activity of this truncated protein is reduced to 22% of wild-type levels (23). Furthermore, a larger N-terminal fragment containing residues 1-259 was shown to possess only 60% of the wild-type activity (13). This

decrease in immortalizing activity of the 259 amino acid truncated protein cannot be explained by altered protein stability since pulse-chase experiments have shown little difference in stability between it and the full-length Py LT-Ag (13).

The large T antigens of SV40 and polyomavirus show a high degree of sequence and functional homology. Like Py LT-Ag, SV40 large T antigen is also able to form multimeric T antigen complexes involved in DNA replication (14-19). Complex formation in SV40 large T antigen is dependant on the zinc finger motif which is believed to stabilize protein-protein interactions (6). The SV40 large T antigen zinc finger also plays an important role in the transforming activity of the virus. For example, certain point mutations in the zinc finger motif within SV40 large T antigen abolish the viability of the virus in addition to decreasing its ability to transform baby mouse kidney cells by more than 50% (6). Interestingly, few transformed foci could successfully be established as cell lines. Indeed, less than 5% of these foci could be expanded into cell lines while more than 90% of the foci induced by wild-type SV40 large T antigen produced established cell lines (6). These results suggest that the zinc finger motif of SV40 large T antigen plays a role in immortalization.

Since the 259 amino acid Py LT-Ag N-terminal fragment has a reduced immortalizing activity and fails to form multimeric complexes (13), it is tempting to speculate that the ability of Py LT-Ag to form high molecular weight complexes is important for its immortalizing activity. To address this question, we have generated a mutant Py LT-Ag (PyLT-dlZ) where amino acids 452-469 from within the zinc finger motif have been deleted and determined its ability to immortalize primary rat embryo fibroblasts. The expression vector used in this study is illustrated in Fig. 1. pPyLT-1 was generated by inserting a *Bam*HI/*Bgl*II/*Xho*I adaptor into pPyLT which has been described previously (20). Py LT-Ag mutant PyLT-dlZ was

generated by site-directed mutagenesis on the pPyLT-1 vector using the transformer mutagenesis system (Clontech, USA). After independent transient transfection of Cos-1 cells by pPyLT-1 and PyLT-dlZ, proteins were labelled with  $^{35}\text{S}$ -methionine and PyLT-Ag was immunoprecipitated using polyclonal anti-Py LT-Ag antisera. Both pPyLT-1 and PyLT-dlZ produce a unique species of T antigen corresponding to the approximate size of wild-type Py LT-Ag (data not shown). As the pPyLT-1 starting vector that was used to generate the PyLT-dlZ mutant only poorly immortalizes primary rat embryo fibroblasts, DNA sequences coding for wild-type and mutant Py LT-Ag were re-cloned in the BapSV40Ttsa58A vector (a gift from Dr. R. MacKay) to create the expression vectors BPyLT and BPyLT-dlZ.

The importance of Py LT-Ag zinc finger motif on its immortalizing activity was assessed in an *in vitro* immortalization assay. Primary cultures of rat embryo fibroblasts were co-transfected with pSV2Neo and an expression vector coding for either the wild-type (BPyLT) or mutant Py LT-Ag (BPyLT-dlZ). After four weeks of selection, individual G-418 colonies (30 to 50) were isolated and expanded to 100 mm plates. The cell strains derived were considered immortal if they could be passaged five or more times at a 1:5 dilution. The result of these experiments are illustrated in Fig. 2. The relative immortalization efficiency of the PyLT-dlZ mutant is expressed as a percentage of the wild-type immortalization frequency and represents the average of two separate experiments. Deletion of amino acids within the zinc finger motif did not impair the immortalization activity of the PyLT-dlZ mutant. In fact, PyLT-dlZ mutant had the ability to immortalize primary rat embryo fibroblasts at an increased frequency (182%) compared to the wild-type protein. Cells established from BPyLT-dlZ transfected colonies had a morphology that was similar to cell lines derived from wild-type immortalized cells. These results indicate that the Py LT-Ag zinc finger motif is dispensable for T antigen

immortalizing activity. By extension, these results indicate that the formation of high molecular weight complexes is not required for immortalization of primary rat embryo fibroblasts by Py LT-Ag (13). Our results further suggest that other sequences, which are deleted in the N-terminal 259 amino acid deletion mutant of Py LT-Ag, may be required for its full immortalization activity.

These results are in sharp contrast with the observation that a mutant E7 protein of human papilloma virus (HPV) 16 carrying a mutation in its zinc finger motif is unable to immortalize primary rat embryo fibroblasts (21). Several groups have shown that HPV16 and HPV18 E7 proteins are unable to cooperate with an activated *ras* oncogene to transform primary rat embryo fibroblasts (21, 22). If immortalization is a prerequisite for the subsequent cooperation with an activated *ras* oncogene these experiments may reflect differences in the process of cellular immortalization by these two molecules.

In this study, we have examined the influence of the zinc finger domain on the immortalizing activity of Py LT-Ag. We have shown that mutation of the zinc finger motif does influence the immortalization efficiency of the mutant T antigen, not by decreasing it as was expected, but rather by increasing it significantly. However, the reason for this increased immortalizing activity remains obscure. The relative immortalization frequency of the Py LT-Ag zinc finger mutant suggests that a deletion within the zinc finger motif did not seriously alter the conformation of the protein as to impair pRb binding since we have previously demonstrated that pRb binding is absolutely necessary to immortalize primary rat embryo fibroblasts (11). Finally, our results suggest that sequences located downstream of a 259 amino acid N-terminal fragment and distinct from the zinc finger domain may significantly affect the immortalization activity of Py LT-Ag.

### Acknowledgments.

We are grateful to Manon Landry and Marie-Josée Milot for excellent technical assistance. We thank Dr. L. Masson for critical reading of the manuscript. A.-M. M.-M. is a recipient of an F.R.S.Q. fellowship. This research was funded by MRC grant MT-10959 to A.-M.M.-M.

### References.

1. Schlegel, R., and T. L. Benjamin. *Cell* 14:587-599 (1978).
2. Francke, B., and W. Eckhart. *Virology* 55:127-135 (1973).
3. Kern, F. G., S. Pelligrini, A. Cowie, and C. Basilio. *J. Virol.* 60:275-285 (1986).
4. Webster, L. C., and R. P. Ricciardi. *Mol. Cell. Biol.* 11:4287-4296 (1991).
5. Loeber, G., J. E. Stenger, S. Ray, R. E. Parsons, M. E. Anderson, and P. Tegtmeyer. *J. Virol.* 65:3167-3174 (1991).
6. Loeber, G., R. Parsons, and P. Tegtmeyer. *J. Virol.* 63:94-100 (1989).
7. Barbosa, M. S., D. R. Lowy, and J. T. Schiller. *J. Virol.* 63:1404-1407 (1989).
8. Wang, E. H., and C. Prives. *Virology* 184:399-403 (1991).
9. Rose, P. E., and B. S. Schaffhausen. *J. Virol.* 69:2842-2849 (1995).
10. Rassoulzadegan, M., Z. Naghashfar, A. Cowie, A. Carr, M. Grisoni, R. Kamen, and F. Cuzin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4354-4358 (1983).
11. Pilon, A. A., P. Desjardins, J. A. Hassell, and A.-M. Mes-Masson.  
*Submitted.*
12. Larose, A., N. Dyson, M. Sullivan, E. Harlow, and M. Bastin. *J. Virol.* 65:2308-2313 (1991).

13. Holman, P. S., O. V. Gjoerup, T. Davin, and B. S. Schaffhausen. *J. Virol.* 68:668-673 (1994).
14. Borowiec, J. A., and J. Hurwitz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:64-68 (1988).
15. Dean, F. B., M. Dodson, H. Echols, and J. Hurwitz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8991-8995 (1987).
16. Dean, F. B., P. Bullock, Y. Murakami, C. R. Wobbe, L. Weisbach, and J. Hurwitz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:16-20 (1987).
17. Goetz, G. S., F. B. Dean, J. Hurwitz, and S. W. Matson. *J. Biol. Chem.* 263:383-392 (1988).
18. Mastrangelo, I. A., P. V. C. Hough, J. S. Wall, M. Dodson, F. B. Dean, and J. Hurwitz. *Nature (London)* 338:658-662 (1989).
19. Wold, M. S., J. J. Li, and T. J. Kelly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3643-3647 (1987).
20. Sunstrom, N.-A., N. H. Acheson, and J. A. Hassell. *J. Virol.* 65:6998-7003 (1991).
21. Chesters, P. M., C. Edmonds, K. H. Vousden, and D. J. McCance. *J. Gen. Virol.* 71:449-453 (1990).
22. McIntyre, M. C., M. G. Frattini, S. R. Grossman, and L. A. Laimins. *J. Virol.* 67:3142-3150 (1993).

## Figure Legends

### Figure 1: Schematic representation of recombinant plasmids.

pPyLT-1 was generated by inserting a *Bam*HI/*Bgl*II/*Xho*I adaptor into pPyLT which has been described previously (36). Py LT-Ag mutant PyLT-dlZ was generated by site-directed mutagenesis on the pPyLT-1 vector. Sequences within the zinc finger motif, located between amino acid 452-469, were deleted using the transformer mutagenesis system (Clontech, USA). For immortalization assays, DNA sequence coding for wild-type and mutant Py LT-Ag were re-cloned in the BapSV40Ttsa58A vector (a gift from Dr. R. MacKay) to create the expression vectors BPyLT and BPyLT-dlZ.

### Figure 2: Relative immortalization frequency of primary rat embryo fibroblasts by wild-type and mutant Py LT-Ag.

Cells were plated at a density of  $7 \times 10^5$  cells per 100 mm plates and transfected by the calcium phosphate-DNA co-precipitation method (41). The wild-type or mutant DNA to be assessed (10 $\mu$ g) was precipitated with 10  $\mu$ g of pSV2Neo and left on the cells for 16 hours. Cells that were transfected with pSV2Neo alone were incubated in the presence of 10 $\mu$ g of pSV2Neo and 10  $\mu$ g of salmon sperm DNA (Pharmacia). The cells were then washed twice with PBS and complete medium was added. After 24 hours the cells were passaged at a 1:5 dilution and replated in complete medium containing G418 (400  $\mu$ g/ml). Individual G-418 resistant colonies (30 to 50) were picked four weeks later and transferred to 24-well plates. These clones were expanded before reaching confluence. Cell strains were considered immortal if they could be passaged five or more times, at a 1:5 dilution. The relative immortalization efficiency of PyLT-dlZ mutant is expressed as a percentage of the wild-type immortalization frequency and represent the average of two separate experiments.

FIGURE 1: Pilon et Mes-Masson

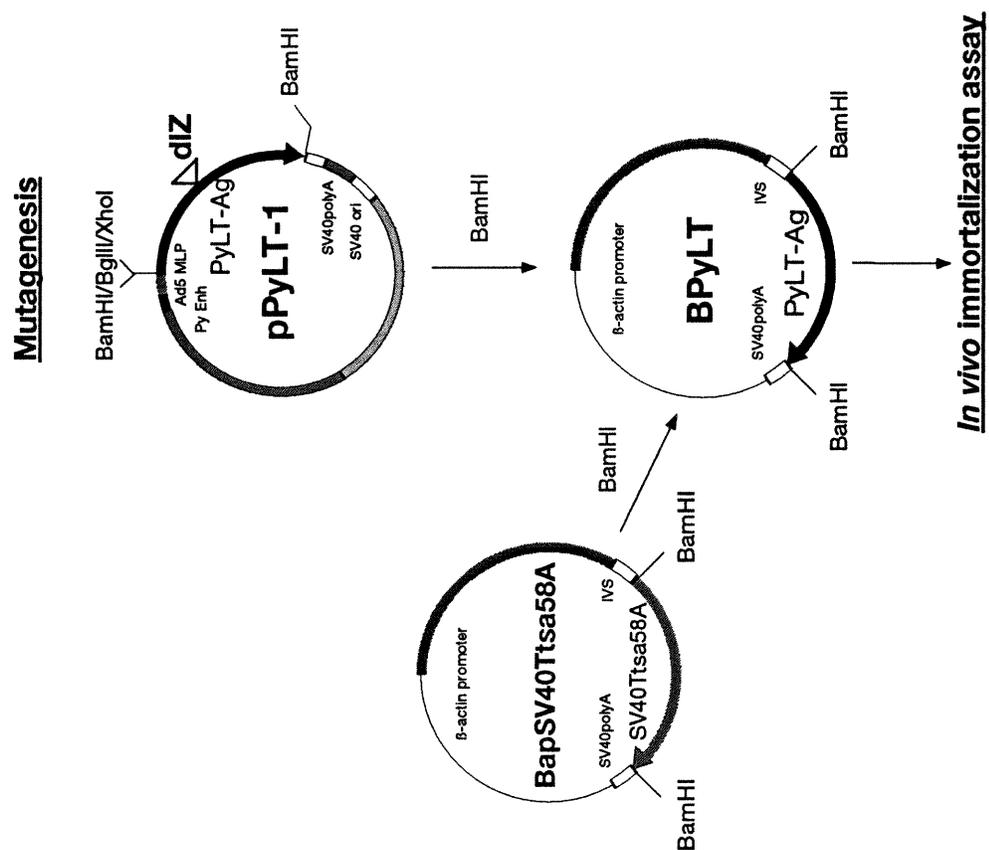
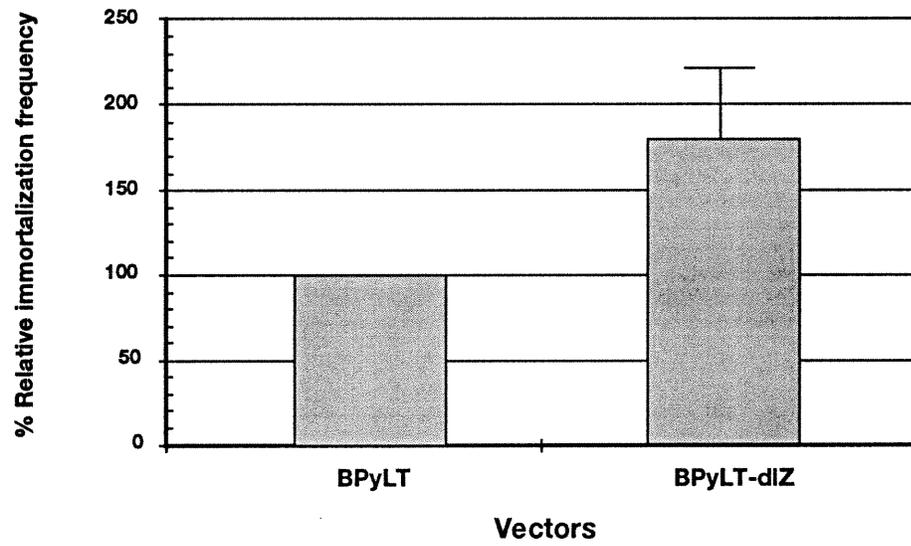


FIGURE 2: Pilon et Mes-Masson



## DISCUSSION

---

Les petits virus à ADN partagent plusieurs caractéristiques qui reflètent leurs besoins de répliquer le génome viral indépendamment des restrictions qui régissent la répllication de l'ADN de la cellule hôte. Ces virus ont développé une stratégie commune qui leur permet d'exploiter les processus métaboliques de base de la cellule en interagissant et contrôlant les mécanismes de régulation du cycle cellulaire. Ils partagent tous la propriété de coder pour une ou plusieurs oncoprotéines virales capables de perturber le contrôle du cycle cellulaire et induire la synthèse de l'ADN. Ainsi, les petits virus à ADN sont des outils puissants nous permettant de disséquer et de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire.

La protéine E1A d'adénovirus, la protéine E7 de HPV et les antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome murin ont toutes été impliquées dans la modulation du cycle cellulaire (DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989; Whyte *et al.*, 1988). Ces oncoprotéines virales sont des molécules complexes composées de plusieurs domaines fonctionnels distincts qui sont caractérisés par leur activité biochimique propre. Ces protéines fonctionnent, en partie, en ciblant les régulateurs les plus importants du cycle cellulaire et en s'associant à eux par contact direct protéine-protéine. Les oncoprotéines virales ciblent en particulier le produit de gènes suppresseurs tel pRb et p53 (DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1990). La protéine E1A d'adénovirus, la protéine E7 des HPV et les antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome murin lient la forme sous-phosphorylée de pRb, qui est sa forme active retrouvée en phase G0 et G1 du cycle cellulaire (DeCaprio *et al.*, 1988; Dyson *et al.*, 1989; Harlow *et al.*, 1986; Larose *et al.*, 1991). Ces interactions ont pour effet d'inactiver la fonction de pRb. Ces oncoprotéines virales s'associent à pRb par le biais des séquences homologues CR1 et CR2 qui sont également nécessaires pour leurs activités transformantes.

Les analyses génétiques et biochimiques de l'antigène grand T du virus du polyome murin ont démontré que cette protéine est multifonctionnelle et composée de plusieurs domaines distincts. L'antigène grand T du virus du polyome joue un

rôle important dans l'immortalisation de cellules primaires et coopère avec plusieurs autres oncogènes, dont *ras* et *myc*, pour induire leurs transformations complètes (Land *et al.*, 1983; Rassoulzadegan *et al.*, 1983). L'immortalisation de cellules embryonnaires de rat dépend de la liaison de l'antigène grand T du virus du polyome au produit du gène suppresseur du rétinoblastome par le biais de séquences homologues aux CR1 et CR2 de la protéine E1A d'adénovirus (Larose *et al.*, 1991).

Dans cette étude, nous avons examiné l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome murin induite par une série de mutants des différents domaines fonctionnels de la protéine sur des fibroblastes embryonnaires de rat. Dans un premier temps, nous avons ciblé la CR2 de l'antigène grand T du virus du polyome. Cette région est nécessaire pour l'activité immortalisante de la protéine et la liaison à pRb (Larose *et al.*, 1991). Cependant, les résidus essentiels du domaine de liaison de pRb ne sont pas connus. De plus, bien que l'on ait démontré que l'antigène grand T du virus du polyome lie pRb et p107 grâce à une séquence contenue dans ses premiers 259 acides aminés, contenant la CR1 et la CR2 (Holman *et al.*, 1994), on ne sait pas si les deux domaines de liaison se chevauchent ou constituent des entités différentes.

On a récemment démontré que la protéine p130, qui est aussi impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, est en mesure de lier la protéine E1A par la CR2 (Mayol *et al.*, 1994). Nous avons examiné la capacité de l'antigène grand T du virus du polyome à lier p130 et déterminé la région impliquée dans cette interaction.

Finalement, plusieurs oncoprotéines virales sont capables de lier un atome de zinc et de former des doigts de zinc. Chez ces protéines le motif de doigt de zinc a été impliqué dans les interactions protéine-protéine. Les antigènes grand T de SV40 et du virus du polyome sont en mesure de former des hexamères qui sont impliqués dans la réplication de l'ADN viral. Pour l'antigène grand T de SV40, la substitution d'un seul acide aminé conservé du motif de doigt de zinc entraîne une forte diminution de son activité transformante et immortalisante. Bien qu'un fragment N-terminal de 219 acides aminés de l'antigène grand T du virus du polyome soit en mesure d'immortaliser des cultures primaires de cellules

embryonnaires de rat, l'efficacité de la protéine tronquée n'est que de 22% de l'activité de la protéine sauvage. Nous avons donc examiné la contribution du motif de doigt de zinc dans l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome en délétant ce motif et en comparant l'efficacité d'immortalisation de la protéine mutante à la protéine sauvage.

#### 8.0 EFFET DES MUTATIONS PONCTUELLES ET DES DÉLÉTIONS SUR LA LIAISON DE pRb ET p107 À L'ANTIGÈNE GRAND T DE POLYOME *IN VITRO* ET IMMORTALISATION CELLULAIRE *IN VIVO*.

Dans la première partie de cette étude, nous avons examiné la nature des interactions entre pRb, p107 et la CR2 de l'antigène grand T du virus du polyome murin et corrélié la formation de complexes *in vitro* avec l'activité immortalisante de la protéine *in vivo*. Les résultats de cette étude démontrent que la liaison de pRb et p107 à l'antigène grand T du virus du polyome nécessite la présence de la région contenue entre les acides aminés 141 à 158. Ces résultats viennent confirmer et étendre les résultats obtenus par d'autres groupes (Gjørup *et al.*, 1994; Larose *et al.*, 1991). Ainsi, la délétion des résidus 141 à 158 confirme son importance dans la liaison de pRb *in vitro* et nous permet de localiser précisément la région nécessaire à la liaison de p107 à l'antigène grand T de polyome. Les domaines de liaison de pRb et de p107 semblent donc se chevaucher à l'intérieur de la CR2 qui est contenue entre les acides aminés 141 à 158 de l'antigène grand T du virus du polyome. De plus, nous avons démontré que la CR2 de l'antigène grand T du virus du polyome est aussi en mesure de lier p130 *in vitro*. C'est, à notre connaissance, la première fois qu'on démontre une interaction entre ces deux protéines. Ainsi, la CR2 de l'antigène grand T de polyome est capable de lier les trois protéines de la famille de pRb tout comme la protéine E1A d'adénovirus (Mayol *et al.*, 1994; Whyte *et al.*, 1989).

Nos résultats démontrent qu'à l'intérieur de cette région, la séquence consensus D/N-L-X-C-X-E est absolument nécessaire pour la liaison de pRb *in vitro*. Ainsi, la substitution de l'acide aspartique-141, de la leucine-142, de la cystéine-144 ou de l'acide glutamique-146 de l'antigène grand T abolit pratiquement toute liaison à pRb. Seule la substitution de la cystéine-144 par une

sérine permet au mutant PyLT-C144S de lier faiblement pRb à un niveau équivalent à environ 5% de l'antigène grand T sauvage. Une autre protéine pouvant lier Rb, la protéine phosphatase 1A, contient une sérine à la même position de la séquence consensus (Durfée *et al.*, 1993). Les résultats obtenus avec le mutant PyLT-D141E, qui est incapable de lier pRb, sont, quant à eux quelque peu surprenants puisque la cycline D, qui contient la séquence E-L-X-C-X-E, et qui correspond exactement à la séquence du mutant PyLT-D141E, est en mesure de lier pRb (Dowdy *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993). Apparemment, l'antigène grand T de polyome ne peut tolérer aucune substitution dans cette séquence consensus ce qui suggère que d'autres régions de la protéine pourraient influencer sa conformation et influencer sa liaison à pRb. La substitution de résidus non-conservés dans la région flanquant le coeur de la séquence de liaison à pRb peut aussi influencer la liaison de pRb à l'antigène grand T de polyome. Ainsi, la substitution du résidu leucine-149 par une histidine entraîne une diminution de l'habileté du mutant PyLT-L149H à complexer pRb *in vitro*. Ce mutant est en mesure de lier pRb à un niveau équivalent à environ 20% de la molécule sauvage. L'incapacité du mutant PyLT-L149H à lier pRb pourrait être expliquée par la nature de la substitution qui n'est pas conservatrice. En effet, le résidu histidine contient un radical assez volumineux et chargé positivement. Cette substitution pourrait avoir pour effet d'altérer considérablement la conformation de la protéine et par conséquent d'influencer la liaison à pRb. De plus, la charge positive du résidu histidine pourrait avoir un effet négatif sur la liaison à pRb. La substitution du résidu asparagine-153 par une tyrosine, qui possède aussi un radical assez volumineux, a pour effet de diminuer considérablement l'interaction du mutant PyLT-N153Y avec pRb *in vitro*. Ainsi, l'antigène grand T mutant PyLT-N153Y lie pRb à un niveau équivalent à 28% de l'antigène grand T sauvage. Ces résultats suggèrent que la composition de la séquence présente en position C-terminale du coeur de la séquence de liaison à pRb peut altérer l'interaction de l'antigène grand T avec pRb.

Notre étude des mutations ponctuelles au coeur de la séquence consensus de liaison à pRb nous indique qu'aucun acide aminé ne peut être changé sans abolir la liaison à pRb. Une étude récente vient confirmer nos résultats quant à l'importance du coeur de la séquence consensus de liaison à pRb et nous permet de souligner l'importance de la conservation de chaque résidu qui la compose. L'importance de

la CR2 de la protéine E1A d'adénovirus dans la liaison à pRb est confirmée par une analyse mutationnelle utilisant un système de double marquage ("double-tagging assay") dans *E. coli* (Wang et Germino, 1995). Cette technique peut être utilisée pour déterminer les acides aminés importants pour une interaction protéine-protéine donnée. La technique consiste à fusionner le gène d'intérêt à la portion carboxy-terminale de la protéine BCCP (Biotin carboxylase carrier protein: BCCP) ce qui entraîne sa biotinylation *in vivo*. Un gène "rapporteur" est fusionné au gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase dans un vecteur de bactériophage  $\lambda$ . Ce vecteur est ensuite utilisé pour infecter des bactéries exprimant la protéine de fusion ce qui permet la formation de complexes s'il y a interaction entre les deux protéines. Après quelques heures, le bactériophage  $\lambda$  lyse les bactéries et expose les protéines de fusion biotinylées et les protéines liées à celle-ci, qui peuvent être récupérées grâce à un filtre couvert d'avidin. La présence de complexe protéique peut être détectée en effectuant un essai d'activité  $\beta$ -galactosidase sur les filtres et les phages positifs peuvent être facilement récupérés. Grâce à cette technique, les auteurs ont examiné l'interaction de pRb avec la CR2 de la protéine E1A d'adénovirus. Ils ont utilisé un oligonocléotide dégénéré, correspondant à la séquence consensus de liaison à pRb, pour produire toutes les combinaisons possibles de nucléotides codant pour les acides aminés de la séquence consensus D-L-X-C-X-E par réaction en chaîne à la polymérase. Ces produits d'amplification ont été utilisés pour produire une banque de phages. Ces phages codent donc pour une série de protéines de fusion LacZ-E1A et ont été utilisés pour infecter des bactéries *E. coli* exprimant la protéine de fusion pRb-BCCP. Après avoir récupéré les clones positifs et séquencé la CR2, ils ont observé que tous les clones positifs possédaient la séquence identique: D-L-T-C-X-E-X. Ces résultats démontrent sans équivoque que, pour la protéine E1A d'adénovirus, l'acide aspartique-121, la leucine-122, la cystéine-124 et l'acide glutamique-126 sont absolument nécessaires pour l'interaction entre les deux protéines et qu'aucun de ces résidus ne peut être substitué sans abolir la liaison à pRb *in vitro*.

La même tendance se manifeste dans l'interaction entre l'antigène grand T de polyome et p107. La substitution de n'importe lequel des acides aminés de la séquence consensus abolit aussi toute liaison à p107. La substitution de résidus conservés du coeur de la séquence consensus de liaison à pRb semble avoir un effet encore plus drastique sur la liaison de p107 à l'antigène grand T de polyome. En

effet, aucune interaction n'a pu être détectée entre p107 et les mutants PyLT-D141E ou PyLT-C144S. La substitution de résidus dans la région flanquant le coeur de la séquence de liaison à pRb a aussi un effet important sur la liaison de p107. Par exemple, le mutant PyLT-L149H est incapable de lier p107 alors qu'il est en mesure d'interagir avec pRb. Par contre, le mutant PyLT-N153Y forme un complexe avec p107 à un niveau équivalent à environ 25% de l'antigène grand T sauvage. Ainsi la substitution des résidus leucine-149 ou asparagine-153 influence non seulement la liaison de l'antigène grand T de polyome à pRb mais aussi à la protéine p107.

Il est probable que les domaines de liaison de pRb et de p107 se chevauchent au sein de la CR2 de l'antigène grand T de polyome mais que la contribution des différents acides aminés de la séquence consensus de liaison à pRb de même que les acides aminés des régions avoisinantes, jouent un rôle différent dans la liaison de pRb et de p107. Cette hypothèse est appuyée par une étude des interactions de la protéine E1A d'adénovirus avec pRb, p107 et p130. Par exemple, pour la protéine E1A d'adénovirus, le mutant  $\Delta$ 1107 (délétion des résidus 111 à 123 de la CR2 de E1A et dont la limite de la délétion correspond chez l'antigène grand T de polyome aux résidus Asp-141, Leu-142 et Phe-143) est incapable de lier pRb et p130 alors qu'elle lie p107 (Barbeau *et al.*, 1994; Barbeau *et al.*, 1992). Les résultats obtenus dans notre étude appuient une telle hypothèse. Par exemple, les mutants PyLT-L149H et PyLT-N153Y en sont de bons exemples. Ces deux mutants lient des niveaux équivalents de pRb mais des niveaux différents de p107. Ainsi, bien que pRb et p107 nécessitent la présence des acides aminés conservés du coeur de la séquence de liaison à pRb, il est possible que chaque protéine interagisse aussi avec d'autres résidus de la région avoisinante.

Les antigènes grand T mutants qui sont incapables de former des complexes avec pRb à des niveaux significatifs sont incapables d'immortaliser des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de rat. Par exemple, les antigènes grand T mutants PyLT-D141E et PyLT-C144S lient pRb à des niveaux respectifs équivalents à environ 1 et 5% de la protéine sauvage. Ces deux antigènes grand T mutants sont incapables d'immortaliser des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de rat à une fréquence supérieure à la fréquence d'immortalisation spontanée. L'antigène grand T mutant PyLT-L149H complexe pRb *in vitro* à un niveau

équivalent à environ 20% de la molécule sauvage. Ce même mutant immortalise des REFs à une fréquence équivalente à 62% de la fréquence d'immortalisation de l'antigène grand T sauvage. Par contre, l'antigène grand T mutant PyLT-N153Y lie pRb *in vitro* à un niveau équivalent à 28% de l'antigène grand T sauvage mais est incapable d'immortaliser des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de rat. Ces résultats suggèrent que l'antigène grand T de polyome doit lier une certaine quantité de pRb, un seuil critique, pour immortaliser des cultures primaires de cellules embryonnaires de rat. Cependant le résultat obtenu avec le mutant PyLT-N153Y, qui lie pRb à un niveau équivalent au mutant PyLT-L149H mais qui ne possède pas d'activité immortalisante, suggère que la liaison à pRb n'est pas le seul facteur déterminant.

Il est plus difficile d'évaluer la contribution de p107 dans l'activité immortalisante de l'antigène grand T de polyome. En effet, un seul des mutants que nous avons produit interagit strictement avec pRb et non avec p107. Ce mutant, PyLT-L149H immortalise des fibroblastes embryonnaires de rat à une fréquence équivalente à 62% de la fréquence d'immortalisation de l'antigène grand T sauvage. Ce résultat suggère donc que la capacité de lier p107 n'est pas nécessaire pour conférer à l'antigène grand T de polyome l'habileté à immortaliser des cellules primaires de rat. D'autres observations nous permettent de suggérer que l'interaction entre p107 et l'antigène grand T de polyome n'est pas un facteur clé. Premièrement, on peut noter dans la littérature une forte corrélation entre l'habileté des oncoprotéines virales à lier pRb et leurs activités biologiques. Nos résultats sont aussi généralement en accord avec les travaux de Corbeil et Branton (1994) qui ont examiné la capacité de protéines E1A mutantes dans la CR2 à lier pRb, p107 et p130 *in vitro* et *in vivo* et mesuré leurs activités biologiques. Dans une étude similaire, ce groupe a observé que toutes les protéines mutantes E1A qui ne peuvent former de complexes avec pRb à un niveau significatif, sont incapables de transformer des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de rat. De plus, le mutant T123P est incapable de transformer ces mêmes cellules bien qu'il lie p107 et p130 à des niveaux comparables à la protéine E1A sauvage. Ces résultats suggèrent que les interactions entre la protéine E1A et les protéines p107 et p130 sont insuffisantes pour conférer à la protéine E1A une activité transformante.

La délétion des acides aminés 256 à 272 a pour effet d'augmenter la capacité du mutant PyLT- $\Delta$ 256-272 à lier pRb *in vitro*. En effet, ce mutant est en mesure de lier des niveaux de pRb qui sont environ 3 fois plus élevés que l'antigène grand T sauvage. Par contre, ce même mutant démontre une diminution dramatique de sa capacité à lier p107 qui atteint un niveau équivalent à 22% de l'antigène grand T sauvage. Les résultats des essais de liaison *in vitro* nous indiquent donc que la délétion des résidus 256 à 272 a pour effet d'altérer l'affinité de la protéine mutante pour pRb et p107. Nous avons démontré que la délétion des acides aminés 256 à 272 (PyLT- $\Delta$ 256-272) augmente de façon significative la fréquence d'immortalisation de l'antigène grand T mutant qui passe à un niveau équivalent à 178% de la fréquence observée pour l'antigène grand T sauvage. Des résultats similaires ont été obtenus par le groupe de Bastin pour une délétion dans une région avoisinante. En effet, la délétion des acides aminés 270 à 280 augmente aussi la fréquence d'immortalisation du mutant pLT97 (Asselin et Bastin, 1985). Ces deux mutations, PyLT- $\Delta$ 256-272 et pLT97 (270-280) semblent donc se situer dans une région importante pour déterminer l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome dans des cultures primaires de cellules embryonnaires de rat. Ces délétions se situent à proximité du domaine de liaison à l'ADN de l'antigène grand T du virus du polyome qui se retrouve entre les résidus 282-398 (Sunstrom *et al.*, 1991). Le groupe de Bastin a démontré que le mutant pLT3, qui contient la délétion des acides aminés 270 à 280, était incapable de répliquer l'ADN viral (Roberge et Bastin, 1988). Pour cette étude, les auteurs avaient utilisé un vecteur contenant une partie de la région précoce du génome viral contenant l'origine de répllication et la séquence codant pour l'antigène grand T de polyome. Roberge et Bastin suggèrent que l'augmentation de l'activité immortalisante du mutant LT97 est causée par la délétion des acides aminés 270 à 280 qui inactive l'effet cytotoxique de la protéine. Cet effet cytotoxique est dû à la sur-répllication du plasmide par l'antigène grand T qui interagit avec l'origine de répllication virale. Cette hypothèse permet d'expliquer les résultats obtenus par le groupe de Bastin mais ne pourrait être évoquée pour expliquer nos propres résultats. Nous observons aussi une augmentation significative de la fréquence d'immortalisation du mutant PyLT- $\Delta$ 256-272 mais cette protéine est exprimée à partir d'un vecteur contenant le promoteur de la  $\beta$ -actine de rat. Une hypothèse plus appropriée nous est suggérée par les travaux ayant permis de localiser les principaux sites de phosphorylation de

l'antigène grand T de polyome (Bockus et Schaffhausen, 1987). L'antigène grand T de polyome est une protéine qui est fortement phosphorylée sur ses résidus sérines et thréonines (Hassauer *et al.*, 1986; Schaffhausen *et al.*, 1978) et on peut détecter par électrophorèse sur gel de polyacrylamide plusieurs formes de la protéine dont la mobilité est différente (Hunter *et al.*, 1978; Hutchinson *et al.*, 1978; Ito *et al.*, 1977). Mais on ne connaît pas la relation existant entre les différentes formes de la protéine et leurs fonctions biologiques. L'étude du patron de phosphorylation de l'antigène grand T de polyome nous indique que la protéine est phosphorylée dans deux régions précises. Un premier domaine se situe en position N-terminale et correspond aux premiers 183 acides aminés. Un deuxième domaine est situé en position distale vers le C-terminale et est localisé entre les acides aminés 257 à 285. Cette région contient 7 résidus sérines et un résidu thréonine. Dans le cas du mutant PyLT- $\Delta$ 256-272, la délétion des résidus 256 à 272 a pour effet d'éliminer 5 de ces 7 résidus sérines. Bien que l'on ne connaisse pas l'importance exacte de ces modifications post-traductionnelles sur l'activité biologique de la protéine, il est possible que la délétion de ces résidus sérine puisse avoir un effet important sur l'activité biologique de la protéine. La phosphorylation de ces résidus pourrait influencer la conformation de la protéine ou altérer l'activité des autres domaines fonctionnels associés à l'activité immortalisante de l'antigène grand T de polyome.

### 8.1 LIAISON DE pRb ET DE p107 *IN VITRO* AUX ANTIGÈNES GRAND T HYBRIDES ET IMMORTALISATION CELLULAIRE *IN VIVO*.

Dans cette partie de notre étude, nous avons examiné l'effet de changements plus radicaux à l'intérieur de l'antigène grand T du virus du polyome sur la liaison de pRb et de p107 *in vitro* et sur son activité biologique *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons déterminé si le niveau absolu de liaison de pRb par l'antigène grand T avait une influence sur son activité biologique. Nous avons donc reproduit la CR2 à l'intérieur de l'antigène grand T et examiné sa capacité à lier le pRb et p107 *in vitro*. Cette molécule hybride PyLT-RbC est en mesure de lier des niveaux de pRb et de p107 qui correspondent à environ quatre fois ceux de la protéine sauvage. Il est difficile d'expliquer pourquoi cette protéine hybride est en mesure de lier 4 fois (plutôt que 2 fois) plus de pRb que l'antigène grand T sauvage. Ce résultat pourrait découler de la procédure expérimentale utilisée pour ces essais de liaison *in vitro*. En

effet, nous avons mesuré la capacité des antigènes grand T sauvages ou mutants de polyome à lier les protéines pRb et p107 dans de simple essais de liaison *in vitro*. Cette façon de mesurer l'interaction entre deux protéines est possiblement moins précise que des essais de liaison où différentes concentrations de protéine sont testées de façon à établir si l'essai est linéaire. Cependant, nous devons souligner que nous avons obtenu sensiblement les mêmes résultats, en mesurant directement la quantité de radioactivité récupérée en éluant les protéines liées directement dans le liquide de scintillation, qu'en déterminant la quantité de protéine par densitométrie. Cette observation suggère que les résultats obtenus avec cet essai sont très reproductibles. Il semble donc que la relation entre la quantité de protéines liées et le nombre de sites de liaison ne soit pas linéaire. Si la mutation introduisant une deuxième CR2 à l'intérieur de l'antigène grand T de polyome (PyLT-RbC) génère une molécule hybride capable de lier quatre fois plus de pRb et de p107 que la protéine sauvage *in vitro*, cet antigène grand T hybride ne démontre pas une activité immortalisante supérieure à l'antigène grand T sauvage *in vivo*. La raison pourrait en être fort simple. La dissociation des complexes pRb/E2F et p107/E2F par la protéine E1A d'adénovirus nécessite deux régions indépendantes de la protéine E1A pour la liaison et la dissociation soit la CR2 et la CR1 (Fattaey *et al.*, 1993). Ainsi, le mutant PyLT-RbC, qui ne possède qu'une CR1, pourrait être en mesure de lier plus de complexes pRb/E2F, p107/E2F et p130/E2F mais sa capacité à les dissocier n'est pas affectée car la molécule hybride ne possède qu'une CR1.

La substitution de la CR2 de l'antigène grand T de polyome par celle de SV40 nous donne une protéine hybride qui est en mesure de lier pRb et p107 à des niveaux supérieurs de ceux de l'antigène grand T sauvage. Ces résultats suggèrent que bien que les deux CR2 soient comparables, elles ne possèdent pas la même affinité. En effet, il semble que l'affinité de la CR2 de SV40 pour pRb et p107 soit beaucoup plus grande que l'affinité de la CR2 de l'antigène grand T de polyome pour les mêmes protéines. Des résultats identiques ont déjà été observés chez le groupe des polyomavirus de primate, où on a pu démontrer que l'antigène grand T de SV40 avait une plus grande affinité pour pRb que l'antigène grand T du JCV (Tavis *et al.*, 1994). On peut aussi observer chez les différents types de HPV, que les protéines E7 des souches à risques élevés, HPV18 et HPV16, ont une affinité beaucoup plus grande pour pRb que les protéines E7 des souches à faibles risques

telles HPV6 et HPV11 (Storey *et al.*, 1988). Au niveau expérimental, on peut signaler qu'il est beaucoup plus difficile de co-immunoprécipiter l'antigène grand T de polyome et pRb que l'antigène grand T de SV40 et pRb. La substitution de la CR2 de l'antigène grand T de polyome par celle de SV40 nous donne une protéine hybride fonctionnelle qui immortalise des cellules embryonnaires de rat à une fréquence équivalente à l'antigène grand T du virus du polyome sauvage. C'est la première fois, à notre connaissance, que l'on démontre que les CR2 de l'antigène grand T de polyome et de SV40 sont interchangeables, comme on l'a démontré pour les protéines E1A d'adénovirus et l'antigène grand T de SV40 (Moran, 1988).

## 8.2 MOTIF CKII ET IMMORTALISATION CELLULAIRE

Les protéines E1A, E7, et les antigènes grand T du virus de polyome et de SV40 contiennent toutes un motif de phosphorylation par la CKII en position C-terminale du coeur de la séquence de liaison à pRb. La séquence minimale reconnue par la CKII est constituée du motif S/T-X-X-D et la présence de résidus acides en position C-terminale est nécessaire pour la phosphorylation efficace des résidus sérines ou thréonines (Kuenzel *et al.*, 1987). Plusieurs groupes ont démontré que le motif de phosphorylation par la CKII jouait un rôle important dans l'activité biologique de plusieurs oncoprotéines virales (Barbosa *et al.*, 1990; Firzlaff *et al.*, 1991; Moran *et al.*, 1986). Par exemple, une protéine E1A mutante, dont le nombre de résidus acides du motif de phosphorylation est réduit de cinq à trois, voit sa capacité à coopérer avec l'oncogène *ras* activé pour transformer des cellules de rein de souris, diminuer de façon significative (Moran *et al.*, 1986). La substitution de cinq résidus acides par cinq résidus glycines au sein du motif de phosphorylation de la CKII de la protéine E7 de HPV16 diminue aussi son habileté à coopérer avec l'oncogène *ras* activé pour transformer des REFs (Firzlaff *et al.*, 1991). Il est intéressant de noter que ce groupe n'a pas été en mesure de dériver des lignées cellulaires à partir de ce mutant, ce qui suggère que le motif CKII joue un rôle important dans l'immortalisation cellulaire. La substitution des résidus sérine-31 et -32 de la protéine E7 du HPV16, par des résidus ne pouvant être phosphorylés, empêche sa phosphorylation et entraîne une diminution de sa capacité à transformer des cellules NIH 3T3 mais n'a aucun effet sur le niveau de liaison de pRb *in vitro* (Barbosa *et al.*, 1990). Bien que cette étude n'ait cependant pas examiné la liaison de p107 à la protéine E7, ces

résultats suggèrent que la liaison à pRb et la phosphorylation par la CKII représentent deux activités distinctes de la CR2 contribuant à l'activité biologique de ces protéines.

Chez l'antigène grand T du virus de polyome ce motif de phosphorylation est constitué par la séquence minimale reconnue par la CKII. Nous avons donc examiné son importance dans l'activité immortalisante de la protéine en augmentant sa spécificité. L'addition de résidus acides en position C-terminale du coeur de la séquence de liaison à pRb a pour effet d'influencer la liaison de pRb et de p107. En effet, le mutant PyLT-CKII lie pRb à un niveau équivalent à près de deux fois (180%) le niveau de liaison de l'antigène grand T sauvage. Cependant, sa liaison à p107 est affectée d'une toute autre façon puisque le mutant ne lie p107 qu'à 23% du niveau de l'antigène grand T sauvage. Les résultats obtenus avec les mutants PyLT-L149H et PyLT-N153Y nous ont déjà permis de démontrer que la mutation de résidus en dehors du coeur de la séquence consensus de liaison à pRb peuvent avoir une influence sur la liaison de pRb et de p107 *in vitro*. L'addition de résidus acides au sein du motif de phosphorylation de la CKII influence donc la liaison de l'antigène grand T PyLT-CKII à pRb et de p107. Le mutant PyLT-CKII démontre une activité immortalisante nettement supérieure à l'antigène grand T sauvage puisqu'il est en mesure d'immortaliser des cultures de cellules embryonnaires de rat à une fréquence relative de 180%. Par ailleurs, l'importance du motif de phosphorylation par la CKII dans l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome murin est à mon avis bien illustrée par les résultats obtenus par le groupe de Bastin *et al.*, (1991) avec les mutants *dl-152* et *dl-149* (Larose *et al.*, 1991). Le mutant *dl-152* de l'antigène grand T du virus du polyome contient la délétion des acides aminés 152 à 155 ce qui correspond à la région entre le coeur de la séquence consensus de liaison à pRb et le motif de phosphorylation par la CKII. Cette délétion élimine donc le premier résidu sérine pouvant être phosphorylé mais conserve les autres résidus du motif CKII soit Ser-156-Pro-Thr-Asp. Le mutant *dl-152* est en mesure de lier pRb *in vitro* et d'immortaliser des cellules embryonnaires de rat à une fréquence réduite correspondant à environ 40% de la fréquence de l'antigène grand T sauvage. Chez le mutant *dl-149*, la délétion des acides aminés 159 à 176 a pour effet de déléter le motif de phosphorylation par la CKII, entre les acides aminés 155 à 159, en laissant le coeur de la séquence consensus de liaison à pRb intacte. Pourtant cet antigène grand T mutant est tout à

fait incapable d'immortaliser des cellules embryonnaires de rat dans des essais d'immortalisation pratiquement identiques à ceux que nous avons employés. Malheureusement, ce groupe n'a pas mesuré la stabilité de cette protéine mutante et sa capacité à lier pRb *in vitro*. Néanmoins, l'ensemble de ces résultats suggère que le motif de phosphorylation par la CKII joue un rôle déterminant dans l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome murin.

L'importance du motif de phosphorylation par la CKII dans l'activité biologique des oncoprotéines virales a été plus particulièrement étudiée pour la protéine E7 de HPV16 et l'antigène grand T de SV40. L'analyse mutationnelle de la protéine E7 de HPV16 a démontré que l'interaction E7/pRb est essentielle pour sa coopération avec *ras* (Phelps *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1990). Cependant, les protéines E7 de HPV6 et 11 coopèrent avec *ras* mais avec une efficacité beaucoup plus faible (Storey *et al.*, 1988). Ce résultat peut être expliqué par l'observation que les protéines E7 de HPV6 et 11 lient pRb avec beaucoup moins d'affinité que les protéines E7 des HPV de type 16 ou 18 (Ciccolini *et al.*, 1994). L'analyse du cœur de la séquence conservée de liaison à pRb des protéines E7 de HPV6 ou 11 révèle une différence d'un acide aminé, un acide glycine en position 21, alors que l'on retrouve un acide aspartique à la même position dans les protéines E7 des HPV16 ou 18. La protéine E7 de HPV de type 1 possède un acide aspartique en position 21 du domaine de liaison à pRb et est en mesure de lier pRb, *in vitro* et *in vivo*, avec la même affinité que les protéines E7 des HPV de type 16 ou 18. Cependant, la protéine E7 du HPV de type 1 est incapable d'activer le facteur de transcription E2F-1 ou de coopérer avec l'oncogène *ras* pour induire la transformation de cellules primaires de rat. La protéine E7 de HPV de type 1 lie aussi p107 et le complexe cyclineA/CDK2 avec la même affinité que les protéines E7 des HPV de type 16 ou 18. Ces résultats suggèrent que la capacité de lier les protéines cellulaires avec une haute affinité n'est pas suffisante pour déterminer le potentiel oncogénique de cette protéine. De plus, la comparaison de l'activité transformante de la protéine E7 du HPV de type 1 en coopération avec *ras* a révélé que les colonies isolées des cellules transfectées avec E7 de HPV1 et *ras* sont incapables de survivre à plus d'un seul passage, alors que les colonies isolées des cellules transfectées avec la protéine E7 de HPV16 ou 18 peuvent survivre pendant plusieurs mois. L'activité immortalisante de la protéine E7 dans cet essai *in vitro* ne semble donc pas être dépendante de la

capacité de lier pRb avec une grande affinité. L'analyse de la CR2 de la protéine E7 de HPV de type 1 nous révèle cependant une différence importante avec les protéines E7 des HPV de type 16 ou 18. En effet, la protéine E7 du HPV de type 1 ne possède pas de site de phosphorylation par la CKII en aval du coeur de la séquence de liaison à pRb. Ainsi, le motif de phosphorylation par la CKII semble aussi jouer un rôle important pour déterminer l'activité immortalisante de la protéine E7.

Le motif de phosphorylation par la CKII a aussi été impliqué dans la cinétique du transport vers le noyau de l'antigène grand T de SV40 (Rihs *et al.*, 1991). Le signal de localisation nucléaire de l'antigène grand T de SV40 (PKKKRKV-132) est nécessaire et suffisant pour cibler la protéine de fusion vers le noyau (Kalderon *et al.*, 1984). Cependant, la phosphorylation du motif CKII augmente de façon significative le transport de la protéine vers le noyau (Rihs *et al.*, 1991). De plus, la phosphorylation du résidu thréonine-124 par la kinase cdc2 inhibe le transport de l'antigène grand T vers le noyau (Jans *et al.*, 1991). Les auteurs de cette étude suggèrent donc que ces trois éléments, le signal de localisation nucléaire, le motif de phosphorylation par la CKII et le motif de phosphorylation par la cdc2, pourraient composer un domaine fonctionnel régulant le transport d'une protéine vers le noyau. Ainsi, les domaines CKII et cdc2 pourraient être phosphorylés de façon indépendante, déterminer la cinétique du transport de la protéine vers le noyau et établir le rapport d'antigènes grand T se trouvant dans le noyau et le cytoplasme. Ils notent que ce domaine CcN (CKII, cdc2, NLS) se retrouve chez plusieurs protéines nucléaires dont la protéine p53 humaine, *c-myc* humain, les lamines A et C, la protéine c-abl, le facteur de transcription SW15 chez la levure et l'antigène grand T de polyome. L'antigène grand T de polyome contient deux signaux de localisation nucléaire (Richardson *et al.*, 1986). Le premier est situé entre les acides aminés 191 et 193 et le deuxième entre les acides aminés 279 et 286 et la délétion de l'un ou l'autre nous indique qu'un seul est suffisant pour cibler l'antigène grand T vers le noyau (Richardson *et al.*, 1986). Il est intéressant de noter que chacun de ces deux signaux de localisation nucléaire comporte tous les éléments nécessaires pour former un domaine CcN tel que défini par Jans *et al.*, 1991. Une hypothèse intéressante permettant d'expliquer l'augmentation de la fréquence d'immortalisation par le mutant PyLT-CKII impliquerait l'addition de

résidus acides dans le motif de phosphorylation par la CKII, ce qui pourrait influencer la cinétique du transport de l'antigène grand T mutant vers le noyau. Cette hypothèse doit cependant être écartée car la délétion des acides aminés 256 à 272, chez le mutant PyLT- $\Delta$ 256-272 a pour effet d'éliminer le motif de phosphorylation par la CKII situé entre les acides aminés 260 et 264 et que cet antigène grand T mutant est en mesure d'immortaliser des cellules embryonnaires de rat à une fréquence supérieure à l'antigène grand T sauvage. Il est difficile de concevoir comment l'addition de résidus acides au motif de phosphorylation de la CKII chez le mutant PyLT-CKII puisse augmenter la fréquence d'immortalisation de ce mutant alors que sa délétion chez le mutant PyLT- $\Delta$ 256-272 augmente aussi sa fréquence d'immortalisation. Dans cette étude nous n'avons pas déterminé si les motifs de phosphorylation par la CKII étaient effectivement phosphorylés. Il serait donc important de déterminer si la séquence minimale de phosphorylation par la CKII (Ser-Ser-Pro-Thr-Asp-159) présente dans l'antigène grand T sauvage de polyome est en mesure d'être phosphorylée par la CKII *in vitro* et si l'addition de résidus acides chez le mutant PyLT-CKII a un effet sur la cinétique de phosphorylation de ce motif *in vitro*. De cette façon, nous pourrions corrélérer directement le niveau de phosphorylation de ce motif et l'activité immortalisante de l'antigène grand T sauvage et du mutant PyLT-CKII. Nous pouvons cependant conclure que l'addition de résidus acides au sein du motif de phosphorylation adjacent à la séquence consensus de liaison à pRb a pour effet d'altérer la liaison de pRb et de p107 *in vitro* et d'augmenter de façon significative la fréquence d'immortalisation de l'antigène grand T mutant *in vivo*.

### 8.3 LIAISON DE L'ANTIGÈNE GRAND T DE POLYOME À p130

Nous avons démontré que l'antigène grand T du virus du polyome lie non seulement pRb et p107 mais aussi p130 *in vitro*. C'est, à notre connaissance, la première fois que l'on démontre une interaction entre l'antigène grand T de polyome et p130. L'antigène grand T de polyome est donc en mesure d'interagir avec chacune des protréines de la famille de pRb. Tout comme pRb, les protéines p107 et p130 sont associées au facteur de transcription E2F. Le rôle biologique des complexes p107/E2F et p130/E2F sont assez peu connus et il est difficile de définir leur rôle biologiques. Il est cependant clair que p107 n'est pas nécessaire pour

l'immortalisation de cellules embryonnaires de rat. De plus, il semble que p107 ne soit pas nécessaire au développement et à la survie de l'embryon chez la souris comme c'est le cas pour pRb. Bien que p107 et p130 possèdent une structure similaire, il semble que p130 soit impliquée dans le processus de différenciation chez certain types cellulaires (Kiess *et al.*, 1995). Le complexe p130/E2F est aussi présent chez les cellules embryonnaires de souris quiescentes (Cobrinik *et al.*, 1993). L'antigène grand T de polyome est donc capable d'interagir avec les trois protéines membres de la famille de pRb.

#### 8.4 LIAISON DE L'ANTIGÈNE GRAND T DE POLYOME À pRb, p107, p130 ET PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE

Nos résultats révèlent une corrélation intéressante entre la capacité de lier les protéines pRb et p107 et l'activité immortalisante de l'antigène grand T de polyome. En effet, les antigènes grand T mutants capables de lier pRb à des niveaux équivalents ou supérieurs à la protéine sauvage et dont la capacité de lier p107 est diminuée démontrent tous une fréquence d'immortalisation supérieure à l'antigène grand T sauvage. PyLT-CKII et PyLT-Δ256-272 lient pRb à des niveaux environ deux fois plus élevés que l'antigène grand T sauvage tandis que ces deux mêmes mutants lient p107 à des niveaux équivalents à environ 25 % de l'antigène grand T sauvage. Plusieurs observations suggèrent que pRb est le facteur limitant pour la progression des cellules de la phase G1 à la phase S. Comme nous l'avons déjà mentionné, nos travaux et ceux d'autres groupes, suggèrent que l'habileté des oncoprotéines virales à immortaliser ou transformer les cellules primaires est dépendante de leur capacité à lier pRb (Corbeil et Branton, 1994; Larose *et al.*, 1991; Pilon *et al.*, soumis). De plus, en utilisant des fibroblastes embryonnaires de souris dont les deux allèles du gène Rb sont inactivées (pRb<sup>-/-</sup>) on a démontré que ces cellules sont en mesure de passer de la phase G1 en phase S en présence de méthotrexate, un inhibiteur de la DHFR alors que les cellules pRb<sup>+/+</sup> ou pRb<sup>+/-</sup> en sont incapables (Almasan *et al.*, 1995). L'expression de deux gènes régulés par le facteur de transcription E2F, les gènes codant pour la DHFR et la TS, est induite chez les cellules embryonnaires de souris pRb<sup>-/-</sup> même en présence de méthotrexate et pourrait ainsi augmenter le pool de nucléotides à l'intérieur de ces cellules et permettre de passer de la phase G1 en phase S. On sait maintenant que le facteur de transcription E2F est en fait une famille de gènes qui ont des partenaires

spécifiques au cours du cycle cellulaire. Ainsi, pRb lie les facteurs de transcription E2F-1, 2 et 3 tandis que p107 et p130 lient E2F-4 et 5 (La Thangue, 1994). On a aussi démontré que la sur-expression du facteur de transcription E2F-1 seul pouvait non seulement entraîner le passage de plusieurs types cellulaires de la phase G1 à la phase S mais aussi induire la transformation de cellules embryonnaires de rat (Johnson *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1994; Kowalik *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 1994). La micro injection d'un mutant dominant-négatif du facteur de transcription E2F-1 est en mesure de bloquer la synthèse de l'ADN induite par la protéine E1A ce qui suggère que cette voie biochimique dépendante de E2F-1 est dominante (Dobrowolski *et al.*, 1994). Finalement, on a récemment observé une amplification du gène codant pour E2F-1 dans les cellules érythroleucémiques HEL (Saito *et al.*, 1995).

Durant la progression du cycle cellulaire, de la phase G1 à la phase S, plusieurs complexes différents contenant les protéines de la famille de pRb (pRb, p107 et p130) et de E2F/DP (E2F-1, -2, -3, -4 et -5/DP-1, -2)) sont formés. On peut observer la présence de complexes pRb/E2F en phase G1 et S, de complexes p130/E2F en phase G0 et au début de la phase G1 (Cobrinik *et al.*, 1993) et de complexes p107/E2F en phase G1 et en phase S (Devoto *et al.*, 1992; Lees *et al.*, 1992; Shirodkar *et al.*, 1992). Ainsi, tous les complexes des membres de la famille pRb/E2F sont présents dans les phases G1 et S. Les protéines E1A d'adénovirus, la protéine E7 de HPV16 et l'antigène grand T de SV40 sont en mesure de dissocier ces complexes pour libérer le facteur de transcription E2F qui est alors libre de participer à la régulation des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Chellappan *et al.*, 1992; Mudryj *et al.*, 1991; Raychaudhuri *et al.*, 1991). Un certain équilibre doit donc exister entre ces différents complexes au cours de la transition G1/S. Si l'affinité d'une oncoprotéine virale pour l'une ou l'autre de ces protéines de la famille de pRb est altérée cet équilibre est rompu. Cela pourrait être le cas pour les antigènes grand T de polyome mutants (PyLT-CKII et PyLT-Δ256-272) dont l'affinité pour p107 est réduite. Si, comme nous le croyons, l'inactivation de pRb est le facteur limitant la progression de la phase G1 à la phase S, l'affinité réduite de l'antigène grand T de polyome pour p107 aurait pour effet de changer cet équilibre entre les différents complexes et la déplacer vers la dissociation des complexes pRb/E2F. De plus, la plupart des complexes p107/E2F et p130/E2F qui sont liés à l'ADN contiennent aussi des CDKs. Ces complexes sont autant de liens

directs entre les kinases qui régulent la progression du cycle cellulaire et l'expression temporelle des gènes nécessaires pour la prolifération cellulaire. Bien que l'on suppose que le lien entre les CDK et le facteur de transcription E2F est important les conséquences d'une telle interaction sont encore inconnues. Plusieurs modèles ont été proposés: il est possible que ces complexes servent à cibler la kinase à un substrat lié à l'ADN. Il est aussi possible que la kinase puisse phosphoryler p107 ou p130 et réguler les interactions p107/E2F ou p130/E2F. Il est aussi possible que ces complexes servent à séquestrer la kinase et l'empêcher d'interagir avec un autre substrat. Ainsi, les mutants PyLT-CKII et PyLT- $\Delta$ 256-272 qui démontrent une affinité réduite pour la protéine p107 pourraient entraîner une augmentation du niveau de p107 libre qui serait alors en mesure d'interagir avec d'autres substrats.

#### 8.5 DÉLÉTION DU MOTIF DE DOIGT DE ZINC DE L'ANTIGÈNE GRAND T DU VIRUS DU POLYOME ET IMMORTALISATION CELLULAIRE.

Un fragment N-terminal ne contenant que les 219 premiers acides aminés de l'antigène grand T du virus du polyome est suffisant pour immortaliser des cellules embryonnaires de rat mais à une fréquence équivalente à 22% de celle générée par l'antigène grand T sauvage (Asselin et Bastin, 1985). Un autre groupe a démontré qu'un fragment N-terminal de 260 acides aminés de l'antigène grand T de polyome est en mesure d'immortaliser des cellules embryonnaires de rat à une fréquence de 60% de l'antigène grand T sauvage (Holman *et al.*, 1994). De plus, le même groupe a démontré que ce fragment était incapable de former des complexes de hauts poids moléculaires. La capacité de l'antigène grand T sauvage à former des hexamères est dépendante de la présence d'un motif de doigt de zinc qui est en mesure de stabiliser les interactions protéine-protéine (Rose et Schaffhausen, 1995). La structure et la séquence du motif de doigt de zinc sont hautement conservées dans le groupe des virus du polyome. Il a été impliqué dans l'activité immortalisante et transformante de l'antigène grand T de SV40 (Loeber *et al.*, 1989). La formation d'hexamères par l'antigène grand T de polyome pourrait donc jouer un rôle important dans l'activité immortalisante de la protéine. Dans cette partie de notre étude, nous avons délété le motif de doigt de zinc de l'antigène grand T de polyome afin de déterminer son importance pour l'activité immortalisante de la protéine. Nous avons donc déterminé la capacité d'antigène grand T sauvage (BPyLT) ou

mutant (BPyLT-dIZ) à immortaliser des cultures de cellules embryonnaires de rat. Nos résultats indiquent que la délétion du motif de doigt de zinc ne diminue pas la capacité de l'antigène grand T mutant (PyLT-dIZ) à immortaliser des REFs mais que sa délétion augmente sa fréquence relative d'immortalisation, la portant à 182%. Ces résultats confirment que le motif de doigt de zinc n'est pas nécessaire pour l'immortalisation de cultures primaires de REFs. De plus, ces résultats suggèrent que la formation de complexes de haut poids moléculaire n'est pas nécessaire pour l'immortalisation de REFs. Cependant, la raison pour laquelle cet antigène grand T mutant est en mesure d'immortaliser des cultures primaires de REFs à une fréquence supérieure à l'antigène grand T de polyome sauvage est difficile à expliquer. Nous n'avons pas été en mesure de mesurer la capacité de ce mutant à lier pRb et p107 *in vitro*. La délétion du motif de doigt de zinc ne doit pas altérer sérieusement la conformation de la protéine de manière à affecter sa liaison à pRb puisque, comme nous l'avons démontré, l'activité immortalisante de l'antigène grand T dépend de son habileté à lier pRb. Nos résultats suggèrent donc que d'autres domaines de l'antigène grand T du virus du polyome pourraient contribuer à déterminer l'activité immortalisante de la protéine.

#### 8.6 AUTRES DOMAINES FONCTIONNELS IMPLIQUÉS DANS L'ACTIVITÉ IMMORTALISANTE DE L'ANTIGÈNE GRAND T DU VIRUS DU POLYOME?

L'ensemble de nos résultats suggèrent que d'autres domaines fonctionnels de l'antigène grand T de polyome sont impliqués dans son activité immortalisante. De plus, on a démontré qu'un fragment N-terminal de l'antigène grand T, contenant les 259 premiers résidus, est en mesure d'induire l'entrée en phase S de cellules NIH 3T3 quiescentes et ainsi de compléter un fragment C-terminal de l'antigène grand T de polyome (résidus 264 à 785) pour répliquer l'ADN viral (Gjørup *et al.*, 1994). De façon plus importante, le même groupe a démontré qu'un fragment N-terminal dont le site de liaison à pRb est muté est aussi capable de stimuler les cellules quiescentes et d'induire leur entrée en phase S. De plus, une protéine E1A dont le site de liaison à pRb est muté, est aussi en mesure de compléter ce fragment N-terminal de l'antigène grand T du virus du polyome afin d'induire la réplication de l'ADN viral dans les cellules quiescentes. Ainsi, la liaison à pRb, p107 et p130 n'est pas nécessaire pour induire l'entrée des cellules en phase S. Cependant, ces

essais ont été effectués dans des cellules NIH 3T3 qui sont, il faut le rappeler, une lignée cellulaire immortelle et pourraient ne pas refléter les interactions pouvant se produire dans des cellules primaires. Ces résultats mettent en évidence que le domaine N-terminal de l'antigène grand T du virus du polyome contient d'autre(s) activité(s) biologique(s) capable(s) de stimuler la progression du cycle cellulaire. La nature de cette fonction reste à être élucidée. La capacité de la protéine E1A à compléter le fragment C-terminal et l'homologie existant entre les domaines N-terminal de l'antigène grand T de polyome et de SV40 permet de supposer que ces trois protéines possèdent un autre domaine fonctionnel capable d'interagir avec la même protéine. Un candidat logique est la protéine p300. En effet, on a démontré que l'antigène grand T de SV40 était en mesure de compléter, en *trans*, une protéine E1A incapable de lier p300 pour transformer des cellules de rein de souris (Yaciuk *et al.*, 1991). On a aussi récemment démontré que l'antigène grand T de SV40 était en mesure de lier p300. L'homologie importante existant entre les trois protéines nous permet de suggérer que l'antigène grand T de polyome pourrait être aussi en mesure d'interagir avec p300.

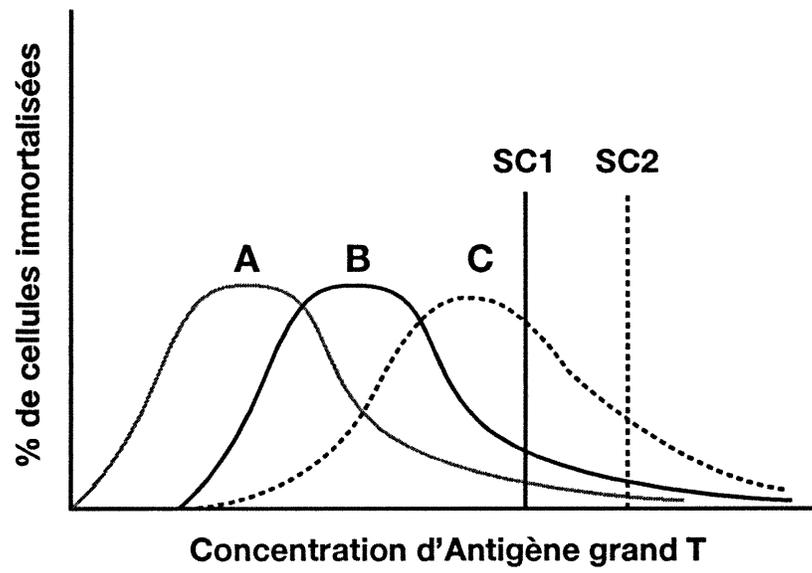
#### 8.7 SEUIL CRITIQUE POUR L'IMMORTALISATION CELLULAIRE

L'ensemble de nos résultats nous amène à proposer le modèle suivant pour expliquer les différentes fréquences d'immortalisation cellulaire démontrées par les antigènes grand T mutants et que nous appellerons modèle du seuil critique d'activité immortalisante. Afin d'immortaliser une cellule primaire, l'antigène grand T utilisé doit être exprimé à un niveau suffisant élevé pour induire la progression du cycle cellulaire. L'antigène grand T du virus de polyome est une protéine multifonctionnelle qui est en mesure d'interagir avec un nombre important de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Dans cette étude, nous nous sommes attardés à l'interaction entre l'antigène grand T du virus du polyome et les protéines de la famille du gène suppresseur du rétinoblastome, pRb, p107 et p130. L'antigène grand T est aussi en mesure d'interagir avec la polymérase à ADN alpha. De plus, l'antigène grand T du virus du polyome contient une autre activité biologique, indépendante de sa liaison aux protéines de la famille de pRb, capable d'induire la synthèse de l'ADN cellulaire, possiblement par une interaction avec p300. L'activité immortalisante de l'antigène grand T peut être vue comme la somme de ces différentes activités biochimiques.

FIGURE 15

## MODÈLE D'UN SEUIL CRITIQUE POUR L'IMMORTALISATION CELLULAIRE

Quand une culture primaire de cellules embryonnaires de rat est transfectée avec l'antigène grand T du virus du polyome il y aura une distribution normale de la concentration d'antigènes grand T dans ces cellules qui dépendra de facteurs tels que le nombre de copies du plasmide qui se sont intégrés et du site d'intégration, illustré par la courbe B. Seules les cellules qui exprimeront une concentration d'antigènes grand T excédant un certain seuil critique (par exemple SC1) seront immortalisées. Si les cellules sont transfectées avec un antigène grand T mutant dont la stabilité, l'affinité pour pRb, ou son habilité à dissocier les complexes pRb/E2F est moindre que celle de l'antigène grand T sauvage, la distribution normale de la concentration d'antigène grand T à l'intérieure de cette population sera plus faible et la courbe sera déplacée vers la gauche, illustré par la courbe A et la fraction de la population cellulaire transfectée dépassant le seuil critique (SC 1) sera plus faible. L'efficacité relative d'immortalisation de ce mutant sera plus faible. Si, par contre, on transfecte une culture primaire des cellules embryonnaires de rat avec un antigène grand T mutant dont la capacité de dissocier des complexes pRb/E2F est plus grande cela aura le même effet que de déplacer la courbe vers la droite, tel qu'illustré par la courbe C. Une plus grande fraction de la population cellulaire transfectée atteindra le seuil critique nécessaire pour l'immortalisation. Pour un autre type de cellule, par exemple des cellules humaines, le seuil critique à atteindre pour l'immortalisation cellulaire sera différent, ce qui est illustré par le seuil critique SC2.



La transfection de cellules primaires avec un vecteur codant pour l'antigène grand T de polyome nous donnera une population cellulaire qui exprimera l'antigène grand T à des niveaux différents. Le niveau d'expression peut varier en fonction du site d'intégration du plasmide et du nombre de copies intégrées. L'antigène grand T de polyome doit être exprimé à un niveau assez élevé pour lier et inactiver pRb et permettre la progression du cycle cellulaire. Ainsi, pour l'ensemble d'une population cellulaire donnée, il y aura après transfection avec un vecteur codant pour l'antigène grand T de polyome, une distribution normale de la concentration d'antigènes grand T dans cette population une situation qui est illustrée par la courbe B à la figure 15. Seules les cellules dont la concentration d'antigènes grand T dépassent un certain seuil critique (SC1) seront immortalisées. Si, par exemple, l'antigène grand T transfecté est instable, cela aura pour effet de déplacer la courbe vers la gauche (illustré par la courbe A) et le nombre de cellules qui sera en mesure d'atteindre le seuil critique sera diminué. On peut prédire le même effet avec un antigène grand T mutant dont l'affinité pour pRb serait diminuée, ce qui est le cas du mutant PyLT-L149H. Si au contraire, l'affinité de l'antigène grand T mutant pour une protéine cellulaire clé est augmentée, par exemple pRb, cela aurait pour effet de déplacer la courbe vers la droite (courbe C) et d'augmenter le nombre de cellules dépassant le seuil critique et donc l'activité immortalisante de la protéine. Le seuil critique que l'on doit atteindre pour l'immortalisation est différent d'un type cellulaire à un autre, et pourrait se situer à SC2 pour des cellules humaines par exemple.

#### 8.8 CARACTÉRISTIQUES DE CROISSANCE DES LIGNÉES CELLULAIRES DÉRIVÉES DES CELLULES IMMORTALISÉES PAR CERTAINS ANTIGÈNES GRAND T MUTANTS

L'antigène grand T du virus du polyome confère aux cellules primaires la capacité de se diviser dans un milieu à faible concentration de sérum (0.5 %) (Rassoulzadegan *et al.*, 1982; Rassoulzadegan *et al.*, 1983). Cette caractéristique de croissance est particulière aux cellules immortalisées par l'antigène grand T de polyome. Les lignées cellulaires NIH 3T3 ou FR3T3, qui sont des lignées cellulaires immortelles, sont incapables de se diviser dans de telles conditions et éventuellement ces cellules meurent.

Les lignées cellulaires que nous avons dérivées des fibroblastes embryonnaires de rat transfectées avec l'antigène grand T sauvage possèdent les

caractéristiques de croissance typiques décrites dans la littérature: capacité de croître et de se diviser dans un milieu pauvre en sérum, de se diviser lorsque cultivées à très faible densité (Rassoulzadegan *et al.*, 1982; Rassoulzadegan *et al.*, 1983). Mais l'antigène grand T du virus du polyome est incapable d'induire la formation de foyers, de conférer aux cellules la capacité de se diviser en absence de support, ou la capacité d'atteindre de forte densité de saturation (Rassoulzadegan *et al.*, 1982; Rassoulzadegan *et al.*, 1983). Les lignées cellulaires dérivées des cellules transfectées avec les antigènes grand T mutants conservent les caractéristiques de croissance propre à l'antigène grand T sauvage, mais démontrent aussi des différences importantes. Les lignées cellulaires REF-RbC sont capables d'atteindre de fortes densités de saturation mais sont incapables de se diviser en absence de support. Par contre, les lignées cellulaires REF-SV40C sont capables de former des colonies à faible fréquence lorsque cultivées en agar mou. Finalement, les lignées cellulaires REF-CKII et REF- $\Delta$ 256-272 sont capables de former des colonies à une fréquence élevée en agar mou. Ces lignées cellulaires ne sont cependant pas entièrement transformées puisqu'elles ne sont pas capables de former des foyers lorsque cultivées en monocouche.

Manfredi et Prives (1993) ont examiné les caractéristiques de croissance de lignées cellulaires dérivées de fibroblastes embryonnaires de rat transfectées avec une construction hybride PyT1-521-SV40T336-708 (Manfredi et Prives, 1993). Cette protéine hybride contient en N-terminal les 521 premiers acides aminés de l'antigène grand T du virus du polyome et en C-terminal les résidus 336-708 de l'antigène grand T de SV40. L'expression de l'antigène grand T hybride PyT1-521-SV40T336-708 dans des fibroblastes embryonnaires de rat ne transforme pas complètement ces cellules puisqu'elles sont incapables de former des foyers quand elles sont cultivées en monocouche. Ces lignées cellulaires sont cependant capables de se diviser en milieu contenant une faible concentration de sérum et sont aussi capables d'atteindre de fortes densités de saturation et de se diviser en absence de support. Les auteurs suggèrent que la capacité de se diviser en milieu à faible concentration de sérum est conférée par la portion N-terminale de la protéine hybride, celle codant pour les 521 premiers acides aminés de l'antigène grand T de polyome, puisque cette activité biologique réside dans les 334 premiers acides aminés de l'antigène grand T sauvage. Mais, ils suggèrent que la capacité d'atteindre de fortes densités de saturation et de se diviser en absence de support est

probablement conférée par la portion C-terminale de la protéine hybride dérivée de l'antigène grand T de SV40, probablement par sa capacité à lier p53. Nos résultats démontrent clairement que des mutations dans la CR2 et dans la région entre les résidus 256-272, sont aussi en mesure d'altérer les caractéristiques de croissance des lignées cellulaires dérivées des cellules embryonnaires de rat transfectées avec les antigènes grand T mutants de polyome PyLT-SV40C, PyLT-CKII, PyLT-RbC et PyLT- $\Delta$ 256-272 sans qu'il y ait interaction avec p53. Ainsi la liaison à p53 n'est pas nécessaire pour modifier les caractéristiques de croissance des lignées cellulaires dérivées de cellules transfectées avec certains antigènes grand T mutants de polyome.

## CONCLUSIONS

---

Nous avons démontré que la région conservée 2 de l'antigène grand T du virus du polyome, située entre les acides aminés 141 et 158, est en mesure de lier les trois protéines de la famille de pRb *in vitro*: pRb, p107, p130. A l'intérieur de cette région conservée 2 le coeur de la séquence consensus de liaison à pRb, **D/N-L-X-C-X-E**, est absolument nécessaire pour la liaison de pRb et de p107 *in vitro*. De plus, la substitution de résidus non-conservés dans la région flanquant le coeur de la séquence de liaison à pRb peut aussi influencer la liaison de pRb et de p107 à l'antigène grand T de polyome. Les antigènes grand T mutants qui sont incapables de former des complexes avec pRb à des niveaux significatifs *in vitro* sont incapables d'immortaliser des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de rat *in vivo*. Nos résultats démontrent donc qu'il y a une corrélation étroite entre la capacité de l'antigène grand T de polyome à lier pRb *in vitro* et à immortaliser des cellules embryonnaires de rats *in vivo*. Cependant le niveau absolu de liaison de pRb et de p107 *in vitro* par l'antigène grand T ne semble pas influencer l'activité immortalisante de la protéine *in vivo*. Nous avons aussi démontré que la région conservée 2 de l'antigène grand T de SV40 peut remplacer la région conservée 2 de l'antigène grand T du virus du polyome murin.

Nous avons aussi démontré l'importance du motif de phosphorylation par la CKII dans l'activité immortalisante de l'antigène grand T du virus du polyome puisque l'addition de résidus acides dans ce motif vient doubler la fréquence relative d'immortalisation de la molécule hybride.

Il semble que la nature de la CR2 présente à l'intérieur de l'antigène grand T du virus puisse avoir une influence sur les caractéristiques de croissance des lignées cellulaires dérivées des cellules transfectées avec certaines constructions. Ainsi, la duplication de la CR2 à l'intérieur de la protéine a pour effet de permettre aux cellules d'atteindre de plus fortes densités de saturation. De plus, des modifications importantes du motif de phosphorylation par la CKII, la substitution de la CR2 de l'antigène grand T de SV40 ou la délétion des acides aminés 256 à 272 a pour effet de modifier de façon importante le phénotype des cellules immortalisées leur permettant de se diviser en agar mou.

Nos résultats confirment que le motif de doigt de zinc de l'antigène grand T de polyome n'est pas nécessaire pour l'immortalisation de REFs. Ainsi, le mutant PyLT-dIZ immortalise des REFs à une fréquence relative supérieure à l'antigène grand T sauvage. Ces résultats suggèrent que des séquences situées en aval des 259 premiers acides aminés, et distinctes du motif de doigt de zinc, pourraient affecter l'activité immortalisante de la protéine.

Nos résultats révèlent une corrélation intéressante entre la capacité de lier les protéines pRb et p107 et l'activité immortalisante de l'antigène grand T de polyome. En effet, les antigènes grand T mutants capables de lier pRb à des niveaux équivalents ou supérieurs à la protéine sauvage et dont la capacité de lier p107 est diminuée démontrent tous une fréquence d'immortalisation supérieure à l'antigène grand T sauvage.

L'ensemble de nos résultats nous amène à suggérer un modèle d'immortalisation cellulaire par l'antigène grand T du virus du polyome murin. Dans ce modèle, l'antigène grand T du virus du polyome murin doit être exprimé à un niveau suffisamment élevé pour atteindre et dépasser un seuil critique lui permettant d'inactiver un certain nombre de protéines cellulaires impliquées dans la progression du cycle cellulaire. L'introduction de certaines mutations à l'intérieur de l'antigène grand T du virus du polyome peut avoir pour effet de modifier l'affinité de la protéine pour certaines protéines cellulaires clé et modifier l'équilibre existant à l'intérieur d'une certaine population cellulaire. Nos résultats suggèrent que le rapport entre la quantité de pRb et de p107 liés par l'antigène grand T du virus du polyome peut avoir un effet sur l'activité immortalisante de cette protéine. Cependant, nous ne pouvons exclure la possibilité que ces mutations viennent aussi modifier les interactions avec d'autres protéines cellulaires impliquées dans la progression du cycle cellulaire. A cet égard, les travaux d'autres groupes suggèrent que d'autres domaines de l'antigène grand T de polyome pourraient être impliqués dans l'activité immortalisante de la protéine.

Cette étude démontre l'utilité des oncoprotéines virales, en particulier de l'antigène grand T du virus du polyome murin, dans l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans l'immortalisation et la transformation cellulaire. D'autres travaux seront nécessaires afin de définir plus précisément la nature des interactions entre pRb, p107, p130 et l'antigène grand T de polyome de façon à tester le modèle que nous avons proposé. Finalement, d'autres travaux seront aussi nécessaires afin de déterminer les autres domaines fonctionnels de l'antigène grand T impliqués dans l'immortalisation cellulaire.

## BIBLIOGRAPHIE

---

Ackerman, P., Glover, C. V. C., et Osheroff, N. (1985). Phosphorylation of DNA topoisomerase II by casein kinase II: modulation of eukaryotic topoisomerase II activity *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 3164-3168.

Adnane, J., et Robbins, P. D. (1995). The retinoblastoma gene product regulates Myc-mediated transcription. Oncogene **10**, 381-387.

Afshari, C. A., Vojta, P. J., Annab, L. A., Futreal, P. A., Willard, T. B., et Barret, J. C. (1993). Investigation of the role of G1/S cell-cycle mediators in cellular senescence. Exp. Cell Res. **209**, 231-237.

Almasan, A., Yin, Y., Kelly, R. E., Lee, E.-H. P., Bradley, A., Li, W., Bertino, J. R., et Wahl, G. M. (1995). Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 5436-5440.

Asselin, C., et Bastin, M. (1985). Sequences from polyomavirus and simian virus 40 large T genes capable of immortalizing primary rat embryo fibroblasts. J. Virol. **56**, 958-968.

Atadja, P. W., Stringer, K. F., et Riabowol, K. T. (1994). Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging. Mol. Cell. Biol. **14**, 4991-4999.

Barbeau, D., Charbonneau, R., Whalen, S. G., Bayley, S. T., et Branton, P. E. (1994). Functional interactions within adenovirus E1A protein complexes. Oncogene **9**, 359-373.

Barbeau, D., Marcellus, R. C., Bacchetti, S., Bayley, S. T., et Branton, P. E. (1992). Quantitative analysis of regions of adenovirus E1A products involved in interactions with cellular proteins. [Review]. Biochem. Cell Biol. **70**, 1123-1134.

Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R., et Vousden, K. H. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* **9**, 153-160.

Barbosa, M. S., Lowy, D. R., et Schiller, J. T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc binding proteins. *J. Virol.* **63**, 1404-1407.

Barbosa, M. S., et Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage *in vitro* transformation of human keratinocytes. *Oncogene* **4**, 1529-1532.

Beijersbergen, R. L., Kerkhoven, R. M., Zhu, L., Carlee, L., Voorhoeve, P. M., et Bernards, R. (1994). E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 *in vivo*. *Genes Dev.* **8**, 2680-2690.

Benedict, W. F., Murphree, A. L., Spina, C. A., Sparkes, M. C., et Sparkes, R. S. (1983). Patients with chromosome 13 deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science* **219**, 973-975.

Berg, J. M. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* **232**, 485-487.

Bergqvist, A., Nilsson, M., Bondeson, K., et Magnusson, G. (1990). Loss of DNA-binding and new trans-activation function in polyomavirus large T-antigen with mutation of zinc finger motif. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2715-2720.

Blumenthal, D. K., Edelman, A., et Krebs, E. G. (1987). Protein serine/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 567-613.

Bockus, B. J., et Schaffhausen, B. (1987). Localization of the Phosphorylations of Polyomavirus Large T Antigen. *J. Virol.* **61**, 1155-1163.

Bond, J. A., Wyllie, F. S., et Wynford-Thomas, D. (1994). Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. *Oncogene* **9**, 1885-1889.

Bookstein, R., Shew, J., Chen, P., Scully, P., et Lee, W. (1990). Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 247, 712-715.

Borowiec, J. A., et Hurwitz, J. (1988). Localized melting and structural changes in the SV40 origin of replication induced by T-antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 64-68.

Caldas, C., Hahn, S. A., daCosta, L. T., Redston, M. S., Schutte, M., Seymour, A. B., Weinstein, C. L., Hruban, R. H., Yeo, C. J., et Kern, S. E. (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16(MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nature. Genet.* 8, 27-32.

Cameron, I. (1972). Minimum number of cell doublings in an epithelial cell population during the lifespan of the mouse. *J. Gerontol.* 27, 157-161.

Cao, L., Faha, B., Dembski, M., Tsai, L. H., Harlow, E., et Dyson, N. (1992). Independent binding of the retinoblastoma protein and p107 to the transcription factor E2F. *Nature* 355, 176-179.

Chan, P.-K., M., A., Cook, R. G., et Busch, H. (1986). Amino acid sequence of protein B23 phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* 261, 1868-1872.

Chang, S. (1986). In vitro transformation of human epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 823, 161-194.

Chang, Z. F., et Chen, K. Y. (1988). Regulation of ornithine decarboxylase and other cell cycle-dependent genes during senescence of IMR-90 human diploid fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 263, 11431-11435.

Chellappan, S., Kraus, V. B., Kroger, B., Münger, K., Howley, P. M., Phelps, W. C., et Nevins, J. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 proteins share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4549-4553.

Chellappan, S. P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J. M., et Nevins, J. R. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65, 1053-1061.

Chen, S., et Paucha, E. (1990). Identification of a region of simian virus 40 large T antigen required for cell transformation. *J. Virol.* 64, 3350-3357.

Cheriton, V., Brown, M., Paucha, E., St. Louis, J., Spiegelman, B. M., et Roberts, T. M. (1988). Separation of simian virus 40 large-T-antigen-transforming and origin-binding functions from the ability to block differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1380-1384.

Chittenden, T., Livingston, D. M., et DeCaprio, J. A. (1993). Cell cycle analysis of E2F in primary human T cells reveals novel E2F complexes and biochemically distinct forms of free E2F. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3975-3983.

Christensen, J. B., et Imperiale, M. J. (1995). Inactivation of the retinoblastoma susceptibility protein is not sufficient for the transforming function of the conserved region 2-like domain of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 65, 3945-3948.

Ciccolini, F., Di Pasquale, G., Carlotti, F., Crawford, L., et Tommasino, M. (1994). Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene* 9, 2633-2638.

Clarke, A. R., Maandag, E. R., van Roon, M., van der Lugt, N. M. T., van der Valk, M., Hooper, M. L., Berns, A., et Riele, H. T. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* 359, 328-330.

Clertant, P., Gaudray, P., May, E., et Cuzin, F. (1984). The nucleotide binding site detected by affinity labeling in the large T proteins of polyoma and SV40 viruses is distinct from their ATPase catalytic site. *J. Biol. Chem.* 259, 15196-15203.

Cobrinik, D., Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Mittnacht, S., et Weinberg, R. A. (1992). The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends Biochem. Sci.* 17, 312-315.

Cobrinik, D., Whyte, P., Peeper, D. S., Jacks, T., et Weinberg, R. A. (1993). Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev.* 7, 2392-2404.

Colby, W. W., et Shenk, T. (1982). Fragments of the simian virus 40 transforming gene facilitate transformation of rat embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 5189-5193.

Coleman, J. E. (1992). Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 61, 897-946.

Comings, D. E. (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3324-3328.

Corbeil, H. B., et Branton, P. E. (1994). Functional importance of complex formation between the retinoblastoma tumor suppressor family and adenovirus E1A proteins as determined by mutational analysis of E1A conserved region 2. *J. Virol.* 68, 6697-6709.

Counter, C. M., Avillion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., et Bachetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11, 1921-1929.

Cowie, A., De Villiers, J., et Kamen, R. (1986). immortalization of rat embryo fibroblasts by mutant polyomavirus large T antigens deficient in DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4344-4352.

Cowie, A., et Kamen, R. (1984). Multiple binding sites for polyomavirus large T antigen within regulatory sequences of polyomavirus DNA. *J. Virol.* 52, 750-760.

Crook, T., Morgenstern, J. P., Crawford, L., et Banks, L. (1989). Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transfected by HPV-16 plus EJ-ras. *EMBO J.* 8, 513-519.

Culp, J. F., Webster, L. C., Friedman, D. J., Smith, C. L., Huang, W. J., Wu, Y. H., Rosenberg, M., et Ricciardi, R. P. (1988). The 289-amino acid E1a protein of adenovirus binds zinc in a region that is important for trans-activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6450-6454.

Dahmus, M. E. (1981). Calf thymus RNA polymerase I and II do not contain subunits structurally related to casein kinase I and II. *J. Biol. Chem.* 256, 3332-3339.

Dalton, S. (1992). Cell cycle regulation of the human *cdc2* gene. *EMBO J.* 11, 1797-1804.

Daniel, C. (1972). Aging of cells during serial propagation *in vivo*. *Adv. Gerontol. Res.* 4, 167-199.

Dean, F. B., Dodson, M., Echols, H., et Hurwitz, J. (1987). ATP-dependent formation of a specialized nucleoprotein structure by simian virus (SV40) large tumor antigen at the SV40 replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8991-8995.

Deb, S. P., et Tegtmeyer, P. (1987). ATP enhances the binding of simian virus 40 large T antigen to the origin of replication. *J. Virol.* 61, 3649-3654.

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E., et Livingston, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275-283.

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Piwnicka-Worms, H., Huang, C. M., et Livingston, D. M. (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 58, 1085-1095.

Desai, D., Gu, Y., et Morgan, D. O. (1992). Activation of human cyclin-dependant kinases *in vitro*. *Mol. Biol. Cell* 3, 571-582.

DeTata, V. A., Ptasznik, A., et Cristofalo, V. J. (1993). Effect of the tumor promotor phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on proliferation of young and senescent WI-38 human diploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 205, 261-269.

Devoto, S. H., Mudryj, M., Pines, J., Hunter, T., et Nevins, J. R. (1992). A cyclin A-protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity: p33cdk2 is a component of the E2F-cyclin A complex. *Cell* 68, 167-176.

DiLeonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., et Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of CIP1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8, 2540-2551.

Dimri, G. P., Hara, E., et Campisi, J. (1994). Regulation of two E2F-related genes in presenescent and senescent human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 16180-16186.

Dobrowolski, S. F., Stacey, D. W., Harter, M. L., Stine, J. T., et Hiebert, S. W. (1994). An E2F dominant negative mutant blocks E1A induced cell cycle progression. *Oncogene* 9, 2605-2612.

Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A., et Weinberg, R. A. (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73, 499-511.

Dryja, T. P., Rapaport, J. M., Joyce, J. M., et Petersen, R. A. (1986). Molecular detection of deletions involving band q14 of chromosome 13 in retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7391-7394.

Duceman, B. W., Rose, K. M., et Jacobs, S. T. (1981). Activation of purified hepatoma RNA polymerase I by homologous protein kinase NII. *J. Biol. Chem.* 256, 10755-10758.

Dulbecco, R., Hatwell, L. H., et Vogt, M. (1965). Induction of cellular DNA synthesis by polyoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53, 403-410.

Dulic, V., Kaufmann, W. K., Wilson, S. J., Tlsty, T. D., Lees, E., Harper, J. W., Elledge, S. J., et Reed, S. I. (1994). p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinases activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* 76, 1013-1023.

Durban, E., Goodenough, M., Mills, J., et Busch, H. (1985). Topoisomerase I phosphorylation *in vitro* and in rapidly growing Novikoff hepatoma cells. *EMBO J.* 4, 2921-2926.

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., et Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7, 555-569.

Dyson, N., Bernards, R., Friend, S. H., Gooding, L. R., Hassell, J. A., Major, E. O., Pipas, J. M., Vandyke, T., et Harlow, E. (1990). Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J. Virol.* 64, 1353-1356.

Dyson, N., Buchkovich, K., Whyte, P., et Harlow, E. (1989). The cellular 107K protein that binds to adenovirus E1A also associates with the large T antigens of SV40 and JC virus. *Cell* 58, 249-255.

Dyson, N., Dembski, M., Fatteacy, A., Ngwu, C., Ewen, M., et Helin, K. (1993). Analysis of p107-associated proteins: p107 associates with a form of E2F that differs from pRb-associated E2F-1. *J. Virol.* 67, 7641-7647.

Dyson, N., Guida, P., McCall, C., et Harlow, E. (1992). Adenovirus E1A makes two distinct contacts with the retinoblastoma protein. *J. Virol.* 66, 4606-4611.

Dyson, N., et Harlow, E. (1992). Adenovirus E1A targets key regulators of cell proliferation. *Cancer Sur.* 12, 161-195.

Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K., et Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.

Edmonds, C., et Vousden, K. H. (1989). A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virol.* 63, 2650-2656.

Edmondson, D. G., et Olson, E. N. (1993). Helix-loop-helix proteins as regulators of muscle-specific transcription. *J. Biol. Chem.* 268, 755-758.

Egan, C., Bayley, S. T., et Branton, P. E. (1989). Binding of the RB-1 protein to E1A products is required for adenovirus transformation. *Oncogene* 4, 383-388.

Egan, C., Jelsma, T. N., Howe, J. A., Bayley, S. T., Ferguson, B., et Branton, P. E. (1988). Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3955-3959.

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., et Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Ewen, M. E., Faha, B., Harlow, E., et Livingston, D. M. (1992). Interaction of p107 with cyclin A independent of complex formation with viral oncoproteins. *Science* 255, 85-87.

Ewen, M. E., Ludlow, J. W., Marsilio, E., DeCaprio, J. A., Millikan, R. C., Cheng, S. H., Paucha, E., et Livingston, D. M. (1989). An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110Rb and a second cellular protein, p120. *Cell* 58, 257-267.

Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J., et Livingston, D. M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73, 487-497.

Ewen, M. E., Sluss, H. K., Whitehouse, L. L., et Livingston, D. M. (1993). TGF $\beta$  inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell* 74, 1009-1020.

Ewen, M. E., Xing, Y. G., Lawrence, J. B., et Livingston, D. M. (1991). Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell* 66, 1155-1164.

Faha, B., Ewen, M. E., Tsai, L. H., Livingston, D. M., et Harlow, E. (1992). Interaction between human cyclin A and adenovirus E1A-associated p107 protein. *Science* 255, 87-90.

Faha, B. E., Harlow, E., et Lees, E. (1993). The adenovirus-associated kinase consists of cyclin E-p33cdk2 and cyclin A-p33cdk2. *J. Virol.* 67, 2456-2465.

Fattaey, A. R., Harlow, E., et Helin, K. (1993). Independent regions of adenovirus E1A are required for binding to and dissociation of E2F-protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7267-7277.

Fearon, E. R., et Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Figge, J., Webster, T., Smith, T. F., et Paucha, E. (1988). Prediction of similar transforming regions in simian virus 40 large T, adenovirus E1A, and myc oncoproteins. *J. Virol.* 62, 1814-1818.

Finlay, C., Hinds, P., et Levine, A. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.

Firzlaff, J. M., Luscher, B., et Eisenman, R. N. (1991). Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5187-5191.

Fisher, R. P., et Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78, 713-724.

Francke, B., et Eckhart, W. (1973). Polyoma gene function required for viral DNA synthesis. *Virology* 55, 127-135.

Fried, M., et Prives, C. (1986). The Biology of Simian Virus 40 and Polyomavirus. In *DNA tumor viruses. Control of Gene Expression and Replication.*, M. Botchan, T. Grodzicker et P. A. Sharp, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 1-16.

Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Alberts, D. M., et Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-646.

Friend, S. H., Horowitz, H. M., Gerber, M. R., Wang, X., Bogenmann, E., Li, F. P., et Weinberg, R. A. (1987). Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9059-9063.

Fung, Y. K., Murphree, A. L., Tang, A., Qian, J., Hinrichs, S. H., et Benedict, W. F. (1987). Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 236, 1657-1661.

Futreal, P. A., et Barrett, J. C. (1991). Failure of senescent cells to phosphorylate the Rb protein. *Oncogene* 6, 1109-1113.

Garcea, R. L., Ballmer-Hoffer, K., et Benjamin, T. L. (1985). Virion assembly defect of polyomavirus hr-t mutants: underphosphorylation of major capsid protein VP1 before viral DNA encapsidation. *J. Virol.* 54, 311-316.

Garcea, R. L., et Benjamin, T. L. (1983). Host range transforming gene of polyomavirus plays an important role in virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 3613-3617.

Gille, H., Sharrocks, A. D., et Shaw, P. E. (1992). Phosphorylation of transcription factor p62tcf by MAP kinase stimulates ternary complex formation at *c-fos* promoter. *Nature* 358, 414-417.

Ginsberg, D., Vairo, G., Chittenden, T., Xiao, Z. X., Xu, G., Wydner, K. L., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B., et Livingston, D. M. (1994). E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev.* 8, 2665-2679.

Giordano, A. P., Whyte, P., Harlow, E., Franza, B. R., Beach, D., et Draetta, G. (1989). A 60 kd cdc2-associated polypeptide complexes with the E1A proteins in adenovirus-infected cells. *Cell* 58, 981-990.

Gjørup, O. V., Rose, P. E., Holman, P. S., Bockus, B. J., et Schaffhausen, B. S. (1994). Protein domains connect cell cycle stimulation directly to initiation of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12125-11129.

Glenn, G., et Eckhart, W. (1990). Transcriptional regulation of early-response genes during polyomavirus infection. *J. Virol.* 64, 2193-2201.

Goodrich, D. W., et Lee, W.-H. (1993). Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim. Biophys. Acta.* 1155, 43-61.

Goodrich, D. W., Wang, N. P., Qian, Y.-W., Lee, E. Y.-H. P., et Lee, W.-H. (1991). The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 67, 293-302.

Gross, L. (1983). *Oncogenic viruses* (Oxford, England: Pergamon Press).

Grove, G., et Klingman, A. (1983). Age associated changes in human epidermal cell renewal. *J. Gerontol.* 38, 137-142.

Guan, K.-L., Jenkins, C. W., Li, Y., Nichols, M. A., Wu, X., O'Keefe, C. L., Matera, A. G., et Xiong, Y. (1994). Growth suppression by p18, a p16INK4B/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type Rb function. *Genes Dev.* 8, 2939-2952.

Hall, A. (1994). A biochemical function for Ras at last. *Science* 264, 1413-1414.

Hall, P. A., McKee, P. H., Menage, H. P., Dover, R., et Lane, D. (1993). High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 8, 203-207.

Halley, K. P., Overhauser, J., Babiss, L. E., Ginsberg, H. S., et Jones, N. C. (1984). Transformation properties of type 5 adenovirus mutants that differentially express the E1A gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5734-5738.

Hamel, P. A., Cohen, B. L., Sorce, L. M., Gallie, B. L., et Phillips, R. A. (1990). Hyperphosphorylation of the retinoblastoma gene product is determined by domains outside the simian virus 40 large T antigen-binding regions. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6586-6595.

Hamel, P. A., Gill, R. M., Phillips, R. A., et Gallie, B. L. (1992). Regions controlling hyperphosphorylation and conformation of the retinoblastoma gene product are independent of domains required for transcriptional repression. *Oncogene* 7, 693-701.

Hamel, P. A., Phillips, R. A., Muncaster, M., et Gallie, B. L. (1993). Speculations on the roles of RB1 in tissue-specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression. *FASEB J.* 7, 846-854.

Hannon, G. J., et Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF $\beta$  induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-260.

Harley, C. B., Futcher, A. B., et Greider, C. (1990). Telomeres shorten during cellular aging of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.

Harlow, E., Whyte, P., Franza, B. R. J., et Schley, C. (1986). Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1579-1589.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., et Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.

Harvey, M., Sands, A. T., Weiss, R. S., Hegi, M. E., Wiseman, R. W., Pantazis, P., Giovanella, B. C., Tainsky, M. A., Bradley, A., et Donehower, L. A. (1993). In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice. *Oncogene* 8, 2457-2467.

Hassauer, M., Scheidtmann, K., et Walter, G. (1986). Mapping of phosphorylation sites in polyoma virus large T antigen. *J. Virol.* 58, 805-816.

Hathaway, G. M., et Traugh, J. A. (1982). Casein kinases-multipotential protein kinases. *Curr. Top. Cell. Regul.* 211, 101-127.

Hayflick, L. (1976). The cell biology of human aging. *N. Engl. J. Med.* 295, 1302-1308.

Hayflick, L., et Moorhead, P. S. (1961). *Exp. Cell Res.* 25, 585-595.

He, J., Allen, J. R., Collins, V. P., Allalunis-Turner, M. J., Godbout, R., Day, R. S. I., et James, C. D. (1994). CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res.* 54, 5804-5807.

Helin, K., Lees, J. A., Vidal, M., Dyson, N., Harlow, E., et Fattaey, A. (1992). A cDNA encoding a pRb-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell* 70, 337-350.

Herschmann, H. R. (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 281-319.

Hiebert, S. W. (1993). Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3384-3391.

Hiebert, S. W., Chellappan, S. P., Horowitz, J. M., et Nevins, J. R. (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* 6, 177-185.

Hinds, P. W., Mitnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I., et Weinberg, R. A. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70, 993-1006.

Holman, P. S., Gjoerup, O. V., Davin, T., et Schaffhausen, B. S. (1994). Characterization of an immortalizing N-terminal domain of polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* 68, 668-673.

Horowitz, J. M., Park, S.-H., Bogenmann, E., Cheng, J.-C., Yandell, D. W., Kaye, F. J., Minna, J. D., Dryja, T. P., et Weinberg, R. A. (1990). Frequent inactivation of the retinoblastoma antioncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2775-2779.

Horowitz, J. M., Yandell, D. W., Park, S., Canning, S., Whyte, P., Buchovich, K., Harlow, E., et Dryja, T. P. (1989). Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 243, 937-940.

Hu, Q., Dyson, N., et Harlow, E. (1990). The regions of the retinoblastoma protein needed for binding to adenovirus E1A or SV40 large T antigen are common sites for mutations. *EMBO J.* 9, 1147-1155.

Huang, H.-J. S., Yee, J.-K., Shew, J.-Y., Chen, P.-L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E. Y.-J. P., et Lee, W.-H. (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the Rb gene in human cancer cells. *Science* 242, 1563-1568.

Huang, P. S., Patrick, D. R., Edwards, G., Goodhart, P. J., Huber, H. E., Miles, L., Garsky, V. M., Oliff, A., et Heimbrook, D. C. (1993). Protein domains governing interactions between E2F, the retinoblastoma gene product, and human papillomavirus type 16 E7 protein. *Mol. Cell. Biol.* 13, 953-960.

Huang, S., Wang, N., Tseng, B. Y., Lee, E., et Lee, E. H. (1990). Two distinct and frequently mutated regions of retinoblastoma protein are required for binding to SV40 T antigen. *EMBO J.* 9, 1815-1822.

Hunter, T., M., H., et Eckhart, W. (1978). Translation of polyoma virus T-antigen *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 5917-5921.

Hussussian, C. J., Struewing, J. P., Goldstein, A. M., Higgins, P. A. T., Ally, D. S., Sheahan, M. D., Clark, W. H., Jr., Tucker, M. A., et Dracopoli, N. C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genet.* 8, 15-21.

Hutchinson, M., Hunter, T., et Eckhart, W. (1978). Characterization of T antigens in polyoma-infected and transformed cells. *Cell* 15, 65-77.

Ide, T., Tsuji, Y., Nakashima, T., et Ishibashi, S. (1984). Progress of aging in human diploid cells transformed with a tsA mutant of simian virus 40. *Exp. Cell Res.* 150, 321-328.

Ikeda, M. A., et Nevins, J. R. (1993). Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7029-7035.

Imai, Y., Matsushima, Y., Sugimura, T., et Tereda, M. (1991). Purification and characterization of human papillomavirus type 16 E7 protein with preferential binding capacity to the underphosphorylated form of retinoblastoma gene product. *J. Virol.* 65, 4966-4972.

Ito, Y., Spurr, N., et Dulbecco, R. (1977). Characterization of polyoma virus T-antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1259-1263.

Jacks, T., Fazeli, A., Schmidt, E., Bronson, R. T., Goodell, M., et Weinberg, R. A. (1992). Effects of an RB mutation in the mouse. *Nature* 359, 295-300.

Jans, D. A., Ackermann, M. J., Bischoff, J. R., Beach, D. H., et Peters, R. (1991). p34cdc2-mediated phosphorylation at T124 inhibits nuclear import of SV40 T antigen proteins. *J. Cell Biol.* 115, 1203-1212.

Jans, D. A., et Jans, P. (1994). Negative charge at the casein kinase II site flanking the nuclear localization signal of the SV40 large T-antigen is mechanistically important for enhanced nuclear import. *Oncogene* 9, 2961-2968.

Jat, P. S., et Sharp, P. (1986). Large T antigen of simian virus 40 and polyomavirus efficiently establish primary fibroblasts. *J. Virol.* 59, 746-750.

Jen, J., Harper, J. W., Bigner, S. H., Bigner, D. D., Papadaopoulos, N., Markowitz, S., Willson, J. K. V., Kinzler, K. W., et Vogelstein, B. (1994). Deletion of p15 and p16 genes in brain tumors. *Cancer Res.* 54, 6353-6358.

Jewers, R. J., Hildebrandt, P., Ludlow, J. W., Kell, B., et McCance, D. J. (1992). Regions of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein required for immortalization of human keratinocytes. *J. Virol.* 66, 1329-1335.

Jiang, W., Kahan, S., Tomita, N., Zhang, Y., Lu, S., et Weinstein, B. (1992). Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res.* 52, 2980-2983.

Johnson, D. G., Schwarz, J. K., Cress, W. D., et Nevins, J. R. (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365, 349-352.

Johnson, D. H., Cress, D. W., Jakoi, L., et Nevins, J. R. (1994). Oncogenic capacity of the E2F-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 12823-12827.

Kaelin, W. G. J., Ewen, M. E., et Livingston, D. M. (1990). Definition of the minimal simian virus 40 large T antigen- and adenovirus E1A-binding domain in the retinoblastoma gene product. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3761-3769.

Kaelin, W. G. J., Krek, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blanar, M. A., Livingston, D. M., et Flemington, E. K. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 70, 351-364.

Kaelin, W. G. J., Pallas, D. C., DeCaprio, J. A., Kaye, F. J., et Livingston, D. M. (1991). Identification of cellular proteins that can interact specifically with the T/E1A-binding region of the retinoblastoma gene product. *Cell* 64, 521-532.

Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., et Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-38.

Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitian, S. V., Stockert, E., Day, R. I., Johnson, B. E., et Skolnik, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264, 436-440.

Kamb, A., Shattuck-Erdens, D., Eeles, R., Liu, Q., Gruis, N. A., Ding, W., Hussey, C., Tran, T., Miki, Y., et Feldhaus, J., *et al* (1994). Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nature Genet.* 8, 23-26.

Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., et Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* 51, 6304-6311.

Kato, J., Matsuoka, M., Poliak, K., Massagué, J., et Sherr, C. J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest by an inhibitor (p27Kip) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79, 487-496.

Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S. W., Ewen, M. E., et 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, 331-342.

Khandjian, E. W., et Tremblay, S. (1992). Phosphorylation of the retinoblastoma protein is modulated in mouse kidney cells infected with polyomavirus. *Oncogene* 7, 909-917.

Kiess, M., Montgomery Gill, R. et P. A. Hamel. (1995) Expression and activity of the retinoblastoma protein (pRB0-family proteins, p107 and p130, during L6-myoblast differentiation. *Cell Growth Diff.* 6, 1287-1298.

Kiyokawa, H., Richon, V. M., Rifkind, R. A., et Marks, P. A. (1994). Suppression of cyclin-dependent kinase 4 during induced differentiation of erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7195-7203.

Klein, C. B., Conway, K., Wang, X. W., Bhrama, R. K., Lin, X., Cohen, M. D., Annab, L., Barret, J. C., et Costa, M. (1991). Senescence of nickel-transformed cells by an X chromosome: possible epigenetic control. *Science* 251, 796-799.

Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., Van Beveren, C., et Maki, R. A. (1990). The macrophage and B-cell specific transcription factor PU-1 is related to the ets oncogene. *Cell* 61, 113-124.

Knudson, A. G. J. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 820-823.

Koff, A., Cross, F., Fisher, A., Schumacher, J., Leghellec, K., Phillippe, M., et Robert, J. M. (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the cdc2 gene family. *Cell* 66, 1217-1228.

Koi, M., et Barrett, J. C. (1986). Loss of tumor-suppressive function during chemically induced neoplastic progression of Syrian hamster embryo cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5992-5996.

Kowalik, T. F., DeGregori, J., Schwarz, J. K., et Nevins, J. R. (1995). E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. *J. Virol.* 69, 2491-2500.

Kuenzel, E. A., Mulligan, J. A., Sommercorn, J., et Krebs, E. G. (1987). Substrate specificity determinants for casein kinase II as deduced from studies with synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 262, 9136-9140.

La Thangue, N. B. (1994). DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. [Review]. *Current Opinion in Cell Biology* 6, 443-450.

La Thangue, N. B. (1994). DRTF1/E2F: an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control. [Review]. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 108-114.

Lam, E. W., et Watson, R. J. (1993). An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. *EMBO J.* 12, 2705-2713.

Lammie, G., Fantl, V., Smith, R., Schuurin, E., Brookes, S., Michalides, R., Dickson, C., Arnold, A., et Peter, G. (1991). D11S287, a putative oncogene on chromosome 11q13, is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. *Oncogene* 6, 439-444.

Land, H., Parada, L. F., et Weinberg, R. A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.

Larose, A., Dyson, N., Sullivan, M., Harlow, E., et Bastin, M. (1991). Polyomavirus large T mutants affected in retinoblastoma protein binding are defective in immortalization. *J. Virol.* 65, 2308-2313.

Larose, A., St-Onge, L., et Bastin, M. (1990). Mutations in polyomavirus large T affecting immortalization of primary rat embryo fibroblasts. *Virology* 176, 98-105.

Lee, E. Y.-H. P., Hu, N., Yuan, S.-S. F., Cox, L. A., Bradley, A., Lee, W.-H., et Herrup, K. (1994). Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation and neuron differentiation. *Genes Dev.* 8, 2008-2021.

Lee, W.-H., Shew, J.-Y., Hong, F. D., Sery, T. W., Donoso, L. A., Young, L. J., Bookstein, R., et Lee, E.-H. (1987). The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 329, 642-645.

Lee, W. H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.-H., Shew, J.-Y., et Lee, E.-H. (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 235, 1394-1399.

Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S. I., et Harlow, E. (1992). Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes Dev.* 6, 1874-1885.

Lees, J. A., Buchkovich, K. J., Marshak, D. R., Anderson, C. W., et Harlow, E. (1991). The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *EMBO J.* 10, 4279-4290.

Lees, J. A., Sito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N., et Helin, K. (1993). The retinoblastoma protein binds to a family of E2F transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7813-7825.

Lew, D. J., Dulic, V., et Reeds, S. I. (1991). Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66, 1197-1206.

Li, Y., Nichols, M. A., Shay, J. W., et Xiong, Y. (1994). Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinases inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res.* 54, 6078-6082.

Lillie, J. W., Loewenstein, P. M., Green, M. R., et Green, M. (1987). Functional domains of adenovirus type 5 E1a proteins. *Cell* 50, 1091-1100.

Livingston, D. M., et Bradley, M. K. (1987). The simian virus 40 large T antigen. A lot packed into a little. *Mol. Biol. Med.* 4, 63-80.

Loeber, G., Parsons, R., et Tegtmeyer, P. (1989). The zinc finger region of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 63, 94-100.

Loeber, G., Stenger, J. E., Ray, S., Parsons, R. E., Anderson, M. E., et Tegtmeyer, P. (1991). The zinc finger of Simian virus 40 large T antigen is needed for hexamer assembly and origin melting. *J. Virol.* 65, 3167-3174.

Ludlow, J. W., DeCaprio, J. A., Huang, C. M., Lee, W. H., Paucha, E., et Livingston, D. M. (1989). SV40 large T antigen binds preferentially to an underphosphorylated member of the retinoblastoma susceptibility gene product family. *Cell* 56, 57-65.

Ludlow, J. W., Shon, J., Pipas, J. M., Livingston, D. M., et DeCaprio, J. A. (1990). The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* **60**, 387-396.

Luscher, B., Kuenzel, E. A., Krebs, E. G., et Eisenman, R. N. (1989). Myc oncoproteins are phosphorylated by casein kinase II. *EMBO J.* **8**, 1111-1119.

Mäkalä, T. P., Tassan, J.-P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J., et Weinberg, R. A. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase. *Nature* **371**, 254-257.

Mancini, M. A., Shan, B., Nickerson, J. A., Penman, S., et Lee, W. H. (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 418-422.

Manfredi, J. J., et Prives, C. (1990). Binding of p53 and p105-RB is not sufficient for oncogenic transformation by a hybrid polyomavirus-simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* **64**, 5250-5259.

Manfredi, J. J., et Prives, C. (1993). Primary rat cells expressing a hybrid polyomavirus-simian virus 40 large T antigen have altered growth properties. *J. Virol.* **67**, 4750-4759.

Marin, O., Meggio, F., Marchiaori, F., Borin, G., et Pinna, L. A. (1986). Site specificity of casein kinase-2 (TS) from rat liver cytosol. A study with model peptide substrates. *Eur. J. Biochem.* **160**, 239-244.

Martin, G. M., Sprague, C. A., et Epstein, C. J. (1970). Replicative life-span of cultured human cells: effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab. Invest.* **23**, 86-92.

Mastrangelo, I. A., Hough, P. V. C., Wall, J. S., Dodson, M., Dean, F. B., et Hurwitz, J. (1989). ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. *Nature (London)* **338**, 658-662.

Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A., et Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**, 701-713.

Mayol, X., Grana, X., Baldi, A., Sang, N., Qianjin, H., et Giordano, A. (1994). Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* 8, 2561-2566.

McCormick, A., et Campisi, J. (1991). Cellular aging and senescence. *Current Opinion in Cell Biology* 3, 230-234.

McCormick, J. J., et Maher, V. M. (1988). Towards an understanding of the malignant transformation of diploid human fibroblasts. *Mutat. Res.* 199, 273-291.

McIntyre, M. C., Frattini, M. G., Grossman, S. R., et Laimins, L. A. (1993). Human papillomavirus type 18 E7 protein requires intact Cys-X-X-Cys motifs for zinc binding, dimerization, and transformation but not for Rb binding. *J. Virol.* 67, 3142-3150.

Meggio, F., Donella-Deana, A., et Pinna, L. A. (1978). Phosphorylation of alphaS2-casein by two rat liver "casein kinases". *FEBS Lett.* 91, 216-221.

Michieli, P., Chedid, M. D. L., Pierce, J. H., Mercer, W. E., et Givol, D. (1994). Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res.* 54, 3391-3395.

Mittnacht, S., et Weinberg, R. A. (1991). G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* 65, 381-393.

Montano, X., Millikan, R., Newsome, J. M., Newsome, D. A., Ludlow, J. W., Arthur, A. K., Fanning, E., Bikel, I., et Livingston, D. M. (1990). Simian virus 40 and an aminoterminal domain of large tumor antigen share a common transforming function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7448-7452.

Moran, B., et Zerler, B. (1988). Interactions between cell growth-regulating domains in the products of the adenovirus E1A oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1756-1764.

Moran, E. (1988). A region of SV40 large T antigen can substitute for a transforming domain of the adenovirus E1A products. *Nature* 334, 168-170.

Moran, E., et Mathews, M. B. (1987). Multiple functional domains in the adenovirus E1A gene. [Review]. *Cell* 48, 177-178.

Moran, E., Zerler, B., Harrison, T. M., et Mathews, M. B. (1986). Identification of separate domains in the adenovirus E1A gene for immortalization activity and the activation of virus early genes. *Mol. Cell. Biol.* 6, 3470-3480.

Mori, T., Miura, K., Aoki, T., Nishihara, T., Mori, S., et Nakamura, Y. (1994). Frequent somatic mutation of the MTS1/CDK4I (multiple tumor suppressor/cyclin-dependent kinase 4 inhibitor) gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 54, 3396-3397.

Motokura, T., Bloom, T., Kim, G., Jüppner, H., Ruderman, J. V., Kronenberg, H. M., et Arnold, A. (1991). A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 350, 512-515.

Mudrak, I., Ogris, E., Rotheneder, H., et Wintersberger, E. (1994). Coordinated transactivation of DNA synthesis- and precursor-producing enzymes by polyomavirus large T antigen through interaction with the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1886-1892.

Mudryj, M., Devoto, S. H., Hiebert, S. W., Hunter, T., Pines, J., et Nevins, J. R. (1991). Cell cycle regulation of the E2F transcription factor involves an interaction with cyclin A. *Cell* 65, 1243-1253.

Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., et Schlegel, R. (1989). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63, 4417-4421.

Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., et Howley, P. M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8, 4099-4105.

Nevins, J. R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424-429.

Newbold, R. F. (1985). Multistep malignant transformation of mammalian cells by carcinogens: induction of immortality as a key event. *Carcinogenesis* 9, 17-28.

Ning, Y., Weber, J. G., Killary, A., Ledbetter, D. M., Smith, J. R., et Pereira-Smith, O. M. (1991). Genetic analysis of indefinite division in human cells: Identification of a human chromosome that induces senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5635-5639.

Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takbayashi, K., et Carson, D. A. (1994). Deletion of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368, 753-756.

Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., et Smith, J. R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* 211, 90-98.

Otterson, G. A., Kratzke, R. A., Coxon, A., Kim, Y. W., et Kaye, F. J. (1994). Absence of p16INK4 is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype Rb. *Oncogene* 9, 3375-3378.

Pang, J. H., et Chen, K. Y. (1994). Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *J. Cell. Physiol.* 160, 531-538.

Pang, J. H., et Chen, K. Y. (1993). A specific CCAAT-binding protein, CBP/tk, may be involved in the regulation of thymidine kinase gene expression in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *J. Biol. Chem.* 268, 2909-2916.

Pardee, A. B. (1989). G1 events and regulation of proliferation. *Science* 246, 603-608.

Peden, K. W., Srinivasan, A., Farber, J. M., et Pipas, J. M. (1989). Mutants with changes within or near a hydrophobic region of simian virus 40 large tumor antigen are defective for binding cellular protein p53. *Virology* 168, 13-21.

Peden, K. W. C., Spence, S. L., Tack, L. C., Cartwright, C. A., Srinivasan, A., et Pipas, J. M. (1990). A DNA replication-positive mutant of simian virus 40 that is defective for transformation and the production of infectious virions. *J. Virol.* **64**, 2912-2921.

Pereira-Smith, O. M., et Smith, J. R. (1988). Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6042-6046.

Peto, R., Roe, F. J. C., Lee, P. N., Levy, L., et Clack, J. (1975). Cancer and aging in mice and men. *Br. J. Cancer* **32**, 411-426.

Phelps, W. C., Münger, K., Yee, C. L., Barnes, J. A., et Howley, P. M. (1992). Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J. Virol.* **66**, 2418-2427.

Phelps, W. C., Yee, C. L., Münger, K., et Howley, P. M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* **53**, 539-547.

Pilon, A. A., Desjardins, P., Hassell, J. A., et Mes-Masson, A.-M. (Soumis). Functional implications of mutations within polyomavirus large T antigen conserved region 2: Effects on pRb, p107, and p130 binding *in vitro* and immortalization activity *in vivo*.

Pines, J., et Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**, 760-763.

Pinna, L. A., Donella-Deana, A., et Meggio, F. (1979). Structural features determining the site specificity of a rat liver cAMP-independent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **87**, 114-120.

Pipas, J. M. (1992). Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. [Review]. *J. Virol.* **66**, 3979-3985.

Polyak, K., Kato, J., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massagué, J., Roberts, J. M., et Koff, A. (1994). p27Kip, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitotic signals. *Cell* **78**, 59-66.

Pomerantz, B. J., et Hassell, J. A. (1984). Polyomavirus and simian virus 40 large T antigens bind to common DNA sequences. *J. Virol.* 49, 925-937.

Prowse, K. R., et Greider, C. W. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4818-4822.

Qian, Y., Luckey, C., Horton, L., Esser, M., et Templeton, D. J. (1992). Biological function of the retinoblastoma protein requires distinct domains for hyperphosphorylation and transcription factor binding. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5363-5372.

Qin, X.-Q., Chittenden, T., Livingston, D. M., et Kaelin, W. G. (1992). Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev.* 6, 953-964.

Qin, X. G., Livingston, D. M., Kaelin, W. G. J., et Adams, P. D. (1994). Deregulated E2F-1 transcription factor expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10918-10922.

Radna, R. L., Caton, Y., Jha, K. K., Kaplan, P., Li, G., Traganos, F., et Ozer, H. L. (1989). Growth of immortal simian virus 40 tsA-transformed human fibroblasts is temperature dependant. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3093-3096.

Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R., et Cuzin, F. (1982). The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. *Nature* 300, 713-718.

Rassoulzadegan, M., Naghashfar, Z., Cowie, A., Carr, A., Grisoni, M., Kamen, R., et Cuzin, F. (1983). Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of "normal" rodent fibroblast cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4354-4358.

Raychaudhuri, P., Bagchi, S., Devoto, S. H., Kraus, V. B., Moran, E., et Nevins, J. R. (1991). Domains of the adenovirus E1A protein required for oncogenic activity are also required for dissociation of E2F transcription factor complexes. *Genes Dev.* 5, 1200-1211.

Resnick-Silverman, L., Pang, Z., Li, G., Jha, K. K., et Ozer, H. L. (1991). Retinoblastoma protein and simian virus 40-dependent immortalization of human fibroblasts. *J. Virol.* 65, 2845-2852.

Riabowol, K., Schiff, J., et Gilman, M. Z. (1992). Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 157-161.

Richardson, W. D., Roberts, B. L., et Smith, A. E. (1986). Nuclear location signals in polyoma virus large-T. *Cell* 44, 77-85.

Richter, K. H., Afshari, C. A., Annab, L. A., Burkhart, B. A., Owen, R. D., Boyd, J., et Barrett, J. C. (1991). Down-regulation of *cdc2* in senescent human and hamster cells. *Cancer Res.* 51, 6010-6013.

Rihs, H. P., Jans, D. A., Fan, H., et Peters, R. (1991). The rate of nuclear cytoplasmic protein transport is determined by the casein kinase II site flanking the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen. *EMBO J.* 10, 633-639.

Roberge, C., et Bastin, M. (1988). Site-Directed Mutagenesis of the Polyomavirus Genome: Replication- Defective Large T Mutants with Increased Immortalization Potential. *Virology* 162, 144-150.

Rose, D. W., McCabe, G., Feramisco, J. R., et Adler, M. (1992). Expression of *c-fos* and AP-1 activity in senescent human fibroblasts is not sufficient for DNA synthesis. *J. Cell Biol.* 119, 1405-1411.

Rose, P. E., et Schaffhausen, B. S. (1995). Zinc-binding and protein-protein interactions mediated by the polyomavirus large T antigen zinc finger. *J. Virol.* 69, 2842-2849.

Rowe, W. P., Huebner, R. J., et Hartley, J. W. (1961). Ecology of a mouse tumor virus. *Perspect. Virol.* 2, 177.

Saito, M., Helin, K., Valentine, M. B., Griffith, B. B., Willman, C. L., Harlow, E., et Look, A. T. (1995). Amplification of the E2F-1 transcription factor gene in the HEL erythroleukemia cell line. *Genomics* 25, 130-138.

Salk, D. (1982). Werner's syndrome a review of recent research with an analysis of connective tissue metabolism, growth control of cultured cells, and chromosomal aberrations. *Hum. Genet.* 62, 1-15.

Schaffhausen, B., Silver, J., et Benjamin, T. (1978). Tumor antigen(s) in cells productively infected by wild type polyoma virus and mutant NG18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 79-83.

Scheller, A., et Prives, C. (1985). Simian virus 40 and polyomavirus large tumor antigens have different requirements for high-affinity sequence-specific DNA binding. *J. Virol* 54, 532-545.

Schlegel, R., et Benjamin, T. L. (1978). Cellular alterations dependent upon the polyoma virus Hr-t function: separation of mitogenic from transforming capacities. *Cell* 14, 587-599.

Schmidt, E. E., Ichimura, K., Reifenberger, G., et Collins, V. P. (1994). CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res.* 54, 6321-6324.

Schonthal, A., Srinivas, S., et Eckhart, W. (1992). Induction of c-jun protooncogene expression and transcription factor AP-1 activity by the polyoma virus middle-sized tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4972-4976.

Serrano, M., Gomez-Lahoz, E., DePinho, R. A., Beach, D., et D., B.-S. (1995). Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* 267, 249-252.

Serrano, M., Hannon, G. J., et Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.

Seshadri, T., et Campisi, J. (1990). Repression of *c-fos* transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 247, 205-209.

Shan, B., et Lee, W. H. (1994). Deregulated expression of E2F-1 induces S-phase entry and leads to apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8166-8173.

Shan, B., Zhu, X., Chen, P. L., Durfee, T., Yang, Y., Sharp, D., et Lee, W. H. (1992). Molecular cloning of cellular genes encoding retinoblastoma-associated proteins: identification of a gene with properties of the transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5620-5631.

Shay, J. W., Pereira-Smith, O. M., et Wright, W. E. (1991). A role for both pRb and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res.* 196, 33-39.

Shay, J. W., et Wright, W. E. (1989). Quantification of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp. Cell Res.* 184, 109-118.

Shay, J. W., Wright, W. E., Brasiskyte, D., et Van Der Haegen, B. A. (1993). E6 of human papilloma virus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene* 8, 1407-1413.

Shay, J. W., Wright, W. E., et Werbin, H. (1991). Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochi. Biophys. Acta* 1072, 1-7.

Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79, 551-555.

Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065.

Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J. A., Morgan, J., Livingston, D. M., et Chittenden, T. (1992). The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell* 68, 157-166.

Singh, P., Wong, S. H., et Hong, W. (1994). Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation. *EMBO J.* 13, 3329-3338.

Slansky, J. E., Li, Y., Kaelin, W. G., et Farnham, P. J. (1993). A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1993 Nov;13(11):7201]. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1610-1618.

Slingerland, J. M., Hengst, L., Pan, C. H., Alexander, D., Stampfer, M. F., et Reed, S. I. (1994). A novel inhibitor of cyclin-cdk activity detected in transforming growth factor  $\beta$ -arrested epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3683-3694.

Smotkin, D., et Wettstein, F. O. (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J. Virol.* 61, 1686-1689.

Soeda, E., Arrand, J. R., Smolar, N., Walsh, J. E., et Griffin, B. E. (1980). Coding potential and regulatory signals of the polyoma virus genome. *Nature* 283, 445-453.

Solomon, M. J., Lee, T., et Kirschner, M. W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation. *Mol. Biol. Cell* 3, 13-27.

Sommercorn, J., Mulligan, J. A., Lozeman, F. J., et Krebs, E. G. (1987). Activation of casein kinase II in response to insulin and to epidermal growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8834-8838.

Sompayrac, L., et Danna, K. J. (1991). The amino-terminal 147 amino acids of SV40 large T antigen transform secondary rat embryo fibroblasts. *Virology* 181, 412-415.

Stein, G. H. (1985). SV40-transformed human fibroblasts: evidence for cellular aging in pre-crisis cells. *J. Cell. Physiol.* 125, 36-44.

Stein, G. H., Beeson, M., et Gordon, L. (1990). Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* 249, 666-669.

Stein, G. H., Drullinger, L. F., Robetorye, R. S., Pereira-Smith, O. M., et Smith, J. R. (1991). Senescent cells fail to express the cdc2 gene in response to mitogen stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11012-11016.

Stein, G. H., et Dulic, V. (1995). Origin of G1 arrest in senescent human fibroblasts. *BioEssays* 17, 637-543.

Stewart, S. E., Eddy, B. E., et Borgese, N. (1958). Neoplasms in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture. *J. Natl. Cancer. Inst.* 20, 1223-1244.

Storey, A., Pim, D., Murray, A., Osborn, K., Banks, L., et Crawford, L. (1988). Comparison of the *in vitro* transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J.* 7, 1815-1820.

Subramanian, T., Kuppuswamy, M., Nasr, R. J., et Chinnadurai, G. (1988). An N-terminal region of adenovirus E1a essential for cell transformation and induction of an epithelial cell growth factor. *Oncogene* 2, 105-112.

Suguwara, O., Oshimura, M., Koi, M., Anab, L. A., et Barret, J. C. (1990). Induction of cellular senescence in immortalized cells by human chromosome 1. *Science* 247, 707-710.

Sunstrom, N.-A., Acheson, N. H., et Hassell, J. A. (1991). Determination of the origin-specific DNA-binding domain of polyomavirus large T antigen. *J. Virol.* 65, 6998-7003.

Szekely, L., Jiang, W. Q., Bulic-jakus, F., Rosen, A., Ringertz, N., Klein, G., et Wiman, K. G. (1992). Cell type and differentiation dependent heterogeneity in retinoblastoma protein expression in SCID mouse fetuses. *Cell Growth Differ.* 3, 149-156.

Tack, L. C., Cartwright, C. A., Wright, J. H., Eckhart, W., Peden, K. W., Srinivasan, A., et Pipas, J. M. (1989). Properties of a simian virus 40 mutant T antigen substituted in the hydrophobic region: defective ATPase and oligomerization activities and altered phosphorylation accompany an inability to complex with cellular p53. *J. Virol.* 63, 3362-3367.

Takio, K., Kuenzel, E. A., Walsh, K. A., et Krebs, E. G. (1987). Amino acid sequence of the beta subunit of bovine lung casein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4851-4855.

Tam, S. W., Shay, J. W., et Pagano, M. (1994). Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16INK4. *Cancer Res.* 54, 5816-5820.

Tavis, J. E., Trowbridge, P. W., et Frisque, R. J. (1994). Converting the JCV T antigen Rb binding domain to that of SV40 does not alter JCV's limited transforming activity but does eliminate viral viability. *Virology* 199, 384-392.

Templeton, D. J. (1992). Nuclear binding of purified retinoblastoma gene product is determined by cell-cycle regulated phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 435-443.

Templeton, D. J., Park, S. H., Lanier, L., et Weinberg, R. A. (1991). Non-functional mutants of the retinoblastoma protein are characterized by defects in phosphorylation, viral oncoprotein association, and nuclear tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3033-3037.

Thompson, C. B., Wang, C.-Y., Ho, I.-C., Bohjanen, P. R., Petryniak, B., June, C. H., Miesfeldt, S., Zhang, L., Nabel, G. J., Karpinski, B., et Leiden, J. M. (1992). cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1043-1053.

Todaro, G., et Green, H. (1964). An assay for cellular transformation by SV40. *Virology* 23, 117-119.

Todaro, G., et Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established cell lines. *J. Cell Biol.* 17, 299-313.

Tooze, J. (1980). *Molecular biology of tumor viruses. II. DNA tumor viruses.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Toyoshima, H., et Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.

Treisman, R., Novak, U., Favaloro, J., et Kamen, R. (1981). Transformation of rat cells by an altered polyoma virus genome expressing only middle T protein. *Nature* 292, 595-600.

Tsai, L. E., Harlow, E., et Meyerson, M. (1991). Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A and adenovirus E1A-associated p33 kinase. *Nature (London)* 353, 174-177.

Tuazon, P. T., Bingham, E. W., et Traugh, J. A. (1979). Cyclic nucleotide-independent protein kinases from rabbit reticulocytes. Site-specific phosphorylation of casein variants. *Eur. J. Biochem.* **94**, 497-504.

Tyndall, C., LaMantia, G., Thacker, C. M., Favalaro, J., et Kamen, R. (1981). A region of the polyoma virus genome between the replication origin and late protein coding sequences is required in cis for both early gene expression and viral DNA replication. *Nucl. Acids Res.* **9**, 6231-6250.

Venable, M. E., Blobe, G. C., et Obeid, L. M. (1994). Identification of a defect in the phospholipase D/diacylglycerol pathway in cellular senescence. *J. Biol. Chem.* **269**, 26040-26044.

Vogel, F. (1979). Genetics of retinoblastoma. *Hum. Genet.* **52**, 1-54.

Walton, G. M., Spiess, J., et Gill, G. N. (1985). Phosphorylation of high mobility group protein 14 by casein kinase II. *J. Biol. Chem.* **260**, 4745-4750.

Wang, E. H., et Prives, C. (1991). ATP induces the assembly of polyoma large tumor antigen into hexamers. *Virology* **184**, 399-403.

Wang, E. H., et Prives, C. (1991). DNA helicase and duplex DNA fragment unwinding activities of polyoma and simian virus 40 large T antigen display similarities and differences. *J. Biol. Chem.* **266**, 12668-12675.

Wang, J. Y. J., Knudsen, E. S., et Welch, P. J. (1994). The retinoblastoma tumor suppressor protein. *Adv. Cancer Res.* **64**, 25-85.

Wang, Z. X., et Germino, F. J. (1995). Mutational analysis of the conserved region 2 site of adenovirus E1A and its effect on binding to the retinoblastoma gene product: Use of the "double-tagging" assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4631-4635.

Watanabe, S., Kanda, T., Sato, H., Furuno, A., et Yoshiike, K. (1990). Mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 functions. *J. Virol* **64**, 207-214.

Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.

Weinberg, R. A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* 254, 1138-1146.

Weintraub, S. J., Prater, C. A., et Dean, D. C. (1992). Retinoblastoma protein switches the E2F site from positive to negative element. *Nature* 358, 259-261.

Welch, P. J., et Wang, J. Y. (1995). Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. *Genes Dev.* 9, 31-46.

Welch, P. J., et Wang, J. Y. J. (1993). A C-terminal protein binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle. *Cell* 75, 779-790.

Whyte, P., Bunchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A., et Harlow, E. (1988). Association between an oncogene and an antioncogene: the adenovirus E1A protein binds to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334, 124-129.

Whyte, P., Ruley, H. E., et Harlow, E. (1988). Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.* 62, 257-265.

Whyte, P., Williamson, N. M., et Harlow, E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* 56, 67-75.

Wright, W. E., Pereira-Smith, O. M., et Shay, J. M. (1989). Reversible cellular senescence: Implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3088-3092.

Yaciuk, P., Carter, M. C., Pipas, J. M., et Moran, E. (1991). Simian virus 40 large-T antigen expresses a biological activity complementary to the p300-associated transforming function of the adenovirus E1A gene products. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2116-2124.

Yamamoto, M., Yoshida, M., Ono, K., Fujita, T., Ohtani-Fujita, N., Sakai, T., et Nikaido, T. (1994). Effect of tumor suppressors on cell cycle-regulatory genes: RB suppresses p34cdc2 expression and normal p53 suppresses cyclin A expression. *Exp. Cell Res.* 210, 94-101.

Yanishevsky, R., Mendelsohn, M. L., Mayall, B. H., et Cristofalo, V. J. (1974). Proliferative capacity and DNA content of aging human diploid cells in culture: a cytophotometric and autoradiographic analysis. *J. Cell Physiol.* 84, 165-170.

Zerler, B., Moran, B., Maruyama, K., Moomaw, J., Grodzicker, T., et Ruley, H. E. (1986). Adenovirus E1A coding sequences that enable ras and pmt oncogenes to transform cultured primary cells. *Mol. Cell. Biol.* 6, 887-899.

Zhou, X., Tarmin, L., Yin, J., Jiang, H.-Y., Suzuki, H., Rhyu, M.-G., Abraham, J., et Meltzer, S. J. (1994). The MTS1 gene is frequently mutated in primary human esophageal tumors. *Oncogene* 9, 3737-3741.

Zhu, L., van den Heuvel, S., Helin, K., Fattaey, A., Ewen, M., Livingston, D., Dyson, N., et Harlow, E. (1993). Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev.* 7, 1111-1125.

Zullo, J., Stiles, C. D., et Garcea, R. L. (1987). Regulation of *c-myc* and *c-fos* mRNA levels by polyomavirus: distinct roles for the capsid protein VP1 and the viral early proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1210-1214.

zur Hausen, H. (1991). Viruses in human cancer. *Science* 254, 1167-1173.