

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**ProQuest Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

RECHERCHE DES INHIBITEURS DE LA PROTÉASE ADÉNOVIRALE

Par Angélique RUZINDANA UMUNYANA

Département de Microbiologie et d'Infectiologie

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

***Philosophiae Doctor*** (Ph.D.) en Microbiologie

Copyright 08 Juillet 2002



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**385 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**385, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

0-612-74274-1

**Canada**

# **TABLE DES MATIÈRES**

Table des matières.....	I
Liste des articles.....	IV
Liste des figures et des tableaux.....	V
Liste des abréviations.....	VII
Résumé.....	VIII
I. INTRODUCTION.....	1
A. Les adénovirus.....	1
B. La protéase adénovirale.....	6
B.1. Généralités.....	6
B.2. Propriétés.....	8
B.3. Site actif.....	11
B.4. Mécanisme d'activation.....	15
B.5. Spécificité de substrat.....	23
B.6. Fonctions.....	25

C. Les cystéines protéases et leurs inhibiteurs.....	29
D. Les inhibiteurs de l'adenain.....	34
E. Projet.....	39
<b>II. ARTICLES.....</b>	<b>43</b>
ARTICLE I : Préambule.....	43
ARTICLE II : Préambule.....	50
ARTICLE III : Préambule.....	58
ARTICLE IV : Préambule.....	71
<b>III. DISCUSSION.....</b>	<b>96</b>
A. CIBLE 1 : Site actif.....	96
A.1. Candidats inhibiteurs I : Les inhibiteurs de la papaïne.....	99
A.2. Candidats inhibiteurs II : Les serpins.....	104
A.3. Candidats inhibiteurs III : Les cystatins.....	110
B. CIBLE 2 : Sites de liaison de l'ADN.....	116
C. CIBLE 3 : Site de liaison du cofacteur pVIc.....	118

<b>IV. CONCLUSIONS.....</b>	<b>125</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>129</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>130</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>152</b>

## **LISTE DES ARTICLES**

1. Ruzindana-Umunyana, A., Sircar, S., Schick, C., Silverman, G.A. et Weber, J.M.

Adenovirus endopeptidase hydrolyses human squamous cell carcinoma antigens *in vitro* but not *ex vivo*. *Virology* 268 (1), 141-146, 2000 Mar 1.

2. Ruzindana-Umunyana, A., Sircar, S. et Weber, J.M.

The effect of mutant peptide cofactors on adenovirus protease activity and virus infection. *Virology* 270 (1), 173-179, 2000 Apr 25.

3. Ruzindana-Umunyana, A. et Weber, J.M.

Interactions of human lacrimal and salivary cystatins with adenovirus endopeptidase. *Antiviral Research* 51, 203-214, 2001.

4. Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L. et Weber, J.M.

Substrate specificity of adenovirus protease.  
*Virus Research. In press.*

En annexe :

- Sircar, S., Ruzindana-Umunyana, A., Neugebauer, W. et Weber, J.M.

Adenovirus endopeptidase and papain are inhibited by the same agents. *Antiviral Research* 40, 45-51, 1998.

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1.	Modèle d'une particule de l'adénovirus de type 2.....	4
Figure 2.	Schéma du cycle de réplication des adénovirus.....	5
Figure 3.	Pénétration et décapsidation des adénovirus : type sauvage, type mutant thermosensible ts1 (défaut d'encapsidation de l'adenain) et l'adénovirus dont les molécules d'adenain sont inhibées chimiquement.....	9
Figure 4.	Structure secondaire du complexe adenain-pVIc.....	13
Figure 5.	Superposition des résidus des sites catalytiques de l'adenain et de la papaïne.....	14
Figure 6.	Les deux cavités de liaison du cofacteur pVIc sur l'adenain.....	16
Figure 7.	Carte de distribution de charges positives et négatives sur la surface du complexe adenain-pVIc.....	21
Figure 8.	Représentation de la structure secondaire du complexe Adenain-pVIc : site actif, site d'attachement du peptide stimulateur pVIc et sites de liaison de l'ADN.....	22
Figure 9.	Régulation du cycle de réplication des adénovirus par le mécanisme d'activation de l'adenain.....	28
Figure 10.	Vue de la poche de spécificité de l'adenain.....	98
Figure 11.	Interactions TNFN-adenain versus interactions TNFN-papaïne.....	102



<b>Figure 12. Mécanisme d'interaction entre SCCA1 et une cystéine protéase, la cathépsine L (catL).....</b>	<b>109</b>
<b>Figure 13. Modèle d'inhibition de la papaïne par la cystatin du blanc de l'oeuf de poulet (CEW).....</b>	<b>112</b>
<b>Figure 14. Dimérisation de la cystatin humaine de type C (hCC).....</b>	<b>114</b>
<b>Figure 15. Vue de surface de l'adenain type sauvage et l'adenain mutante.....</b>	<b>117</b>
<b>Figure 16. Structure du peptide pVIc lié à l'adenain.....</b>	<b>119</b>
<b>Figure 17. Distance entre la liaison disulfure pVIc-Adenain et la Cys122 de la triade catalytique.....</b>	<b>121</b>

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES**

**AdV : adénovirus**

**Ad2, Ad5, etc. : adénovirus de sérotype 2, adénovirus de sérotype 5, etc.**

**Adwt : adénovirus de type sauvage**

**Adts1 : adénovirus mutant thermosensible, déficient à 39°C.**

**Adenain : protéase adénovirale**

**AVP : Adenovirus protease**

**VI : Protéine mature de la capsidie assurant le lien entre les protéines du core et de la capsidie.**

Cette protéine provient du double clivage de la protéine précurseure pVI. Le premier clivage en C-terminal aboutit à la formation du cofacteur pVIc tandis que le second clivage en N-terminal complète la maturation de la protéine VI.

**pVIc : cofacteur de l'adenain, dérivé du clivage en C-terminal de la protéine précurseure pVI**

**Séquence : GVQSLKRRRCF**

**pVIc-S : peptide dérivé du pVIc dont la Cys10 est remplacée par une Ser**

**Séquence : GVQSLKRRRSF**

**SCCA : Squamous Cell Carcinoma Antigen**

**RSL : Reactive Site Loop**

**DTT : Dithiothreitol**

**NEM : N-ethylmaleimide**

## RÉSUMÉ

La cystéine protéase encodée par les adénovirus humains est requise pour la synthèse de particules virales infectieuses. En effet, la protéase adénovirale, aussi nommée AVP ou adenain, permet la libération des virions de l'endosome vers le cytoplasme, participe aux événements de décapsidation, est responsable de l'infectiosité des virions par des clivages de maturation et facilite la libération des virions de la cellule infectée par le biais du clivage des cytokératines. À ce titre, l'adenain est indispensable à la propagation du virus et représente la cible idéale pour le développement d'agents antiadénoviraux efficaces. L'identification d'inhibiteurs sélectifs de l'adenain constituait le but majeur de notre recherche. Quelques inhibiteurs classiques de cystéine protéases tels que l'iodoacétamide, la dithiodipyridine et le parachloromercuribenzoate se sont avérés des inhibiteurs efficaces de l'adenain mais ils ne sont pas suffisamment sélectifs pour être utilisés comme agents inhibiteurs en clinique. Bien que la structure tridimensionnelle de l'adenain ait été résolue depuis 1996, aucun inhibiteur sélectif et irréversible de cet enzyme n'a encore été mis sur le marché. Diverses méthodes de développement des inhibiteurs de cystéines protéases ont été mises en oeuvre dont notamment celles impliquant des réactions entre le résidu cystéine nucléophile du site actif de l'adenain et diverses drogues étudiées. Dans notre recherche, nous avons ciblé davantage des inhibiteurs de source naturelle avec pour objectif de bloquer des sites sensibles de l'adenain. Pour son activité, cet enzyme utilise une triade catalytique Cys/His/Glu (Asp) mais l'activité optimale est obtenue en présence de deux cofacteurs, le pVIc et l'ADN. Le site actif et les sites de liaison de ces cofacteurs constituent ainsi les sites sensibles qu'il est possible de cibler pour inhiber l'activité enzymatique.

Les inhibiteurs de la papaïne, dont la structure atomique du site actif est identique à celle de l'adenain, ont fait l'objet de nombreuses recherches. Nous avons choisi certains inhibiteurs efficaces de la papaïne pour les tester sur l'activité de l'adenain. Ces candidats inhibiteurs inhibent également l'adenain *in vitro* et *ex vivo*. Les serpins et les cystatins exprimées dans des sites de prédilection des infections adénovirales, ont été purifiées puis testées sur l'activité de l'adenain. Les mécanismes d'inhibition sont variables dans les deux systèmes utilisés, *in vitro* et *ex vivo*. Des peptides dérivés de la séquence du peptide stimulateur pVIc ont été testés sur l'activité enzymatique *in vitro* et *ex vivo*. Le peptide de type sauvage pVIc et les peptides mutants inhibent l'adenain ce qui confirme l'hypothèse selon laquelle une stimulation prématurée de l'adenain est nuisible à l'infection adénovirale. Dans notre recherche, nous avons décidé de réexaminer la spécificité de substrat de l'adenain pour plusieurs raisons, ce qui a permis de caractériser davantage son mécanisme d'action. Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'implication de l'adenain dans le processus de décapsulation tout en apportant des évidences supplémentaires sur la capacité des enzymes à reconnaître une structure plutôt qu'une séquence. Cette étude de la spécificité de substrat aura un impact certain dans le design des inhibiteurs sélectifs de l'adenain.

**Mots-clés :** Adénovirus type 2, Endoprotéase adénovirale, Inhibiteurs des protéases virales. Inhibiteurs de cystéine protéases, Thérapie antivirale.

**Keys-words :** Adenovirus type 2, Adenoviral endoprotease, Suppression of viral replication. Inhibition of viral protease, cysteine protease inhibitors.

# **I. INTRODUCTION**

## **A. Les adénovirus**

Il existe une centaine de membres des adénovirus dans la nature. Les adénovirus forment un large groupe de virus à l'origine de pathologies variées chez les vertébrés. Ces virus sont associés aux infections des tissus adénoïdes et lymphoïdes. Certains types spécifiques sont les agents étiologiques d'un large genre d'infection comme les cystites hémorragiques et les gastroentérites infantiles. Les adénovirus (AdV) humains comprennent environ une cinquantaine de sérotypes et infectent les cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures et inférieures, les voies gastrointestinales et urinaires et causent des kératoconjunctivites dans l'appareil visuel. Ces virus peuvent causer des maladies dans d'autres organes tels que le pancréas ou le système nerveux central causant des méningoencéphalites (Kelsey, 1978; Niemann et al., 1993). Ces 51 sérotypes humains sont classés en 6 sous-groupes de A à F, sur la base de diverses propriétés, dont notamment la composition chimique de leur ADN. Le sous-groupe C comprend l'adénovirus de type 2 (Ad2) et un sérotype très proche, l'adénovirus 5 (Ad5). Chez l'enfant, où les infections respiratoires à adénovirus sont fréquentes, le nombre de sérotypes en cause est limité : 50 à 70 % des adénovirus endémiques sont causés par les sérotypes 1,2,5 et 6 tandis que 30% des adénovirus épidémiques sont dus aux sérotypes 3,7,14 et 21 (Kajon et Wadell, 1995). Chez l'immunodéprimé (Hierholzer, 1992; Hierholzer et al., 1993), les infections à adénovirus sont liées à de multiples sérotypes, soit des adénovirus latents réactivés (1,2,5,6), soit des sérotypes rarement décelés en pathologie courante (11,31,35,etc.).

Des épidémies de kératoconjunctivites dues aux adénovirus de groupe D (sérotypes 8,19,37) sont courantes dans les services d'ophtalmologie, ces virus résistants pouvant persister sur les appareils et les doigts des examinateurs. Les manifestations cliniques les plus graves sont observées dans les services de néonatalogie. Wesley et al. (1993) ont rapporté une épidémie survenue dans une unité de pneumologie pédiatrique, à Durban en Afrique du Sud. Sur une période de 8 mois, 12% des infections adénovirales étaient d'origine nosocomiale et correspondaient à des adénovirus de type 7, avec un taux de mortalité de 91%. Tous ces enfants étaient intubés. La transmission était manuportée par le personnel manipulant les sécrétions contaminées.

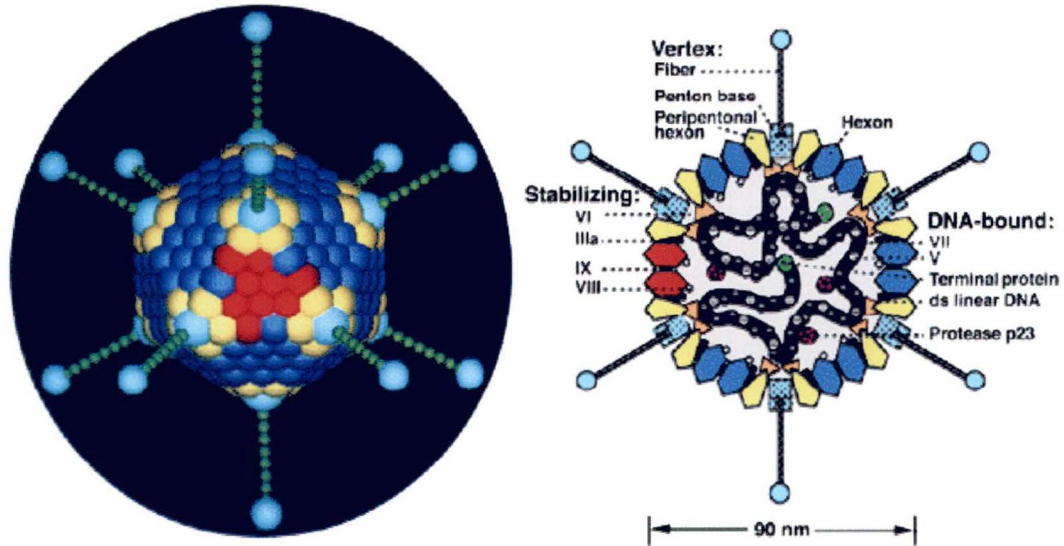
Les adénovirus pénètrent également dans les cellules des tissus lymphoïdes occasionnant des infections latentes au niveau de la gorge qui peuvent émerger de façon sporadique sous forme de maladies respiratoires parfois graves et même mortelles chez des sujets à risque. Les adénovirus humains inoculés à différentes espèces de rongeurs causent des tumeurs. Chez les hamsters, les Ad12, 18 et 31 sont hautement oncogéniques. L'adénovirus de type 9 cause des fibroadénomes et des sarcomes mammaires chez les rats (Javier et al., 1992). Les gènes adénoviraux responsables de l'oncogénèse sont les gènes E1A et E1B. Jusqu'à tout récemment, les infections adénovirales n'avaient pas été reliées de façon convaincante à la carcinogénèse humaine puisque que l'examen des néoplasmes humains ne permettait pas la détection de génome adénoviral (Shenk, 1996). Un rapport récent (Nevels et al., 2001) a démontré la possibilité selon laquelle les infections adénovirales peuvent contribuer au développement de certaines tumeurs chez l'humain à travers un mécanisme de mutagénèse de type "hit-and run". Ce mécanisme expliquerait l'origine virale de tumeurs qui

ne présentent pourtant pas des gènes et des protéines viraux. Ces résultats suscitent des implications de sécurité dans l'utilisation des vecteurs adénoviraux oncolytiques actuellement testés dans les essais cliniques pour la thérapie des cancers humains (Heise et al., 1997) puisqu'ils comportent les gènes E1A et E4. Toutes ces considérations soulignent l'importance du développement des médicaments anti-AdV, efficaces dans le traitement des conjonctivites adénovirales ou d'autres pathologies infectieuses systémiques causés par des adénovirus. Or, aucun traitement approuvé par la FDA n'est disponible sur le marché actuellement pour traiter les diverses infections adénovirales. La plupart des recherches effectuées sur les adénovirus ont porté sur l'adénovirus de sérotype 2 (Ad2). La figure 1 est une représentation schématique d'une particule de l'Ad2.

L'adénovirus de sérotype 2 qui nous intéresse particulièrement infecte les cellules par endocytose via un récepteur, ce mécanisme impliquant la fibre virale d'une part et un récepteur cellulaire ubiquiste d'autre part (figure 2). Ce récepteur cellulaire a été identifié aussi bien chez les adénovirus et les virus coxsackie, d'où l'appellation CAR pour Coxsackie Adenovirus Receptor. Par ailleurs, des facteurs cellulaires, les intégrines reconnaissent le motif RGD sur la base de penton et ces interactions participent dans le processus d'internalisation du virus. Le virus internalisé subit une décapsidation favorisée par le pH acide de l'endosome ainsi que le contact ultérieur direct avec le cytosol (Greber et al., 1994). Les virus partiellement décapsidés sont transportés vers la membrane nucléaire à l'aide de microtubules. À cette étape, les complexes ADN-protéines basiques seraient libérés du reste de la capsidie pour entrer dans le noyau à travers les pores nucléaires (Greber et al., 1997). Ensuite les protéines associées au génome viral seraient remplacées par des histones cellulaires

donnant ainsi le signal du début de la transcription virale.

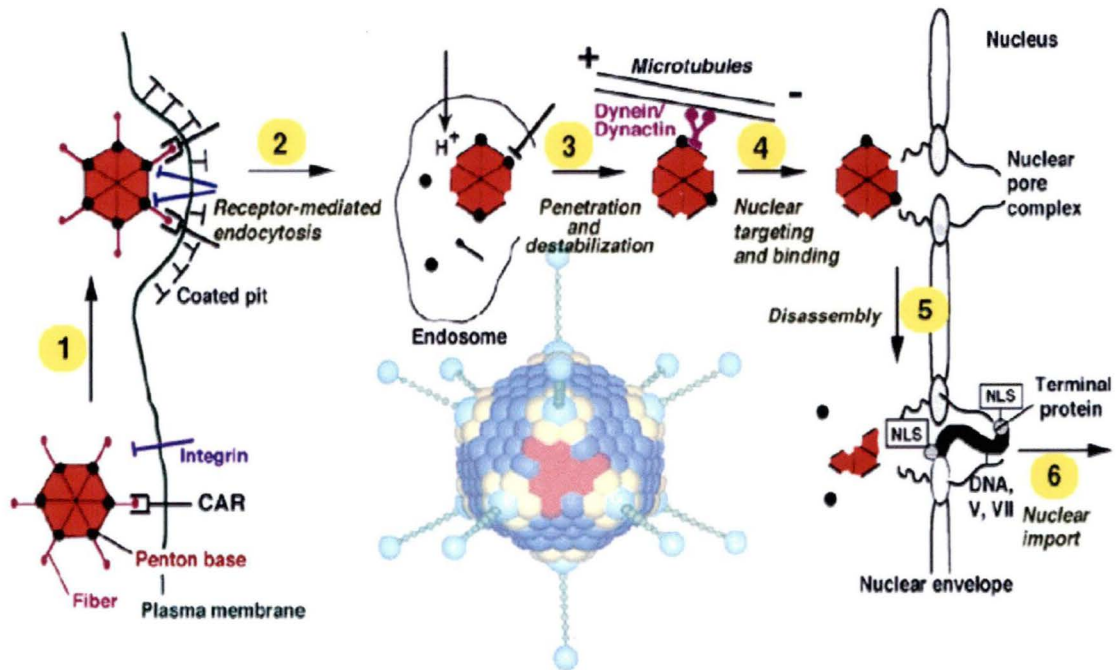
## Adenovirus Type 2



(Tiré de Greber, 1998).

**Figure 1 : Modèle d'une particule d'adénovirus de sérotype 2. L'architecture des interactions entre les protéines structurales et les protéines du core à l'intérieur du virion est schématisée. L'hexon (II), la base de penton (III), la fibre (IV) et les protéines associées à l'hexon (IIIa, VI, VIII et IX) forment la capside. Les protéines du core V et VII sont associées à l'ADN viral. La protéine terminale TP est liée de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ADN viral.**





(Tiré de Greber et al., 1994).

**Figure 2 : Cycle de réplication de l'adénovirus : attachement (1), internalisation par endocytose (2), sortie de l'endosome pH-dépendante (3), transport vers le noyau via les microtubules (4), décapsidation (5), intégration dans le noyau de la cellule hôte (6).**

**L'attachement du virus sauvage à la membrane cellulaire (via les interactions entre les bases de pentons et les intégrines) et le milieu acide dans le cytoplasme ou dans l'endosome (H<sup>+</sup>) sont des facteurs qui stimulent l'activité de l'adenain. Cette dernière ainsi activée va dégrader la protéine VI et décapsider le virion. L'ADN viral ainsi libéré sera importé dans le noyau de la cellule hôte à travers les pores nucléaires.**

Le génome viral n'est pas intégré dans celui de la cellule hôte. les deux brins sont codants et la réplication du génome s'effectue dans le noyau de la cellule à l'aide de la protéine précurseur terminale, pTP. Cette protéine sert d'amorce à la polymérase virale et assure la réplication de l'ADN viral. La transcription et l'expression des protéines virales se fait en deux phases, une phase précoce et une phase tardive. Les protéines précoces E1A, E1B, E2, E3 et E4 sont responsables du ralentissement des fonctions cellulaires au profit de la survie du virus. La phase tardive correspond à la synthèse des protéines structurales du virus codées dans les régions L1 à L5 ainsi que des protéines non structurales telles que la protéine d'encapsulation de l'ADN viral (L1 52/55 kDa) ou la 100K codée par la région L4. La protéase adénovirale, l'adenain nécessaire à l'infectiosité des virions est codée par la région tardive L3. L'assemblage des différentes constituantes du virus a lieu dans le noyau, la lyse cellulaire résultante de l'infection se produit environ 44 à 48 heures après l'infection.

## B. La protéase adénovirale

### B.1. Généralités

Les cystéines protéases sont impliquées dans une grande variété de processus physiologiques normaux ou anormaux tels que l'embryogenèse (Cho et al., 1999), la mort cellulaire programmée (Zech et al., 1999; Earnshaw et al., 1999), la virulence ou la réplication de plusieurs virus, bactéries et parasites (Saura et al., 1999), pour n'en citer que ces quelques exemples. La cystéine protéase encodée par les adénovirus (adenain ou AVP) est indispensable à la production de particules virales infectieuses (Weber, J., 1976; Kräusslich

et Wimmer, 1988). Les adénovirus sont impliqués dans une grande variété de pathologies chez l'humain et les animaux domestiques et sont actuellement l'objet de nombreuses recherches en tant que vecteurs de transfert de gènes (Horwitz, 1996; Qualikene et al., 2000; Wickham, 2000; Doronin et al., 2001).

L'adenain clive plusieurs protéines précurseurs en des produits viraux matures et est le régulateur majeur de l'infection virale tant au niveau du déshabillage du virus tôt dans l'infection qu'au niveau de la maturation et de la libération des virions de la cellule infectée (Cotten et Weber, 1995; Greber, 1998). L'orchestration de ces événements dépend de l'activation de l'enzyme dans l'endosome durant la décapsidation et plus tard par un peptide provenant d'un des substrats de l'adenain dans le virus assemblé. Ces propriétés et d'autres font de l'adenain une cible de choix pour une intervention thérapeutique. L'identification et le développement d'inhibiteurs de l'adenain s'avèrent importants étant donné les effets néfastes des infections adénovirales survenant dans la population humaine et chez les animaux domestiques. Plus d'une centaine de sérotypes ont été identifiés mais peu de recherches (De Clercq, 1993a, 1993b, 2000; Cornish et al., 1995; Sircar et al., 1996, 1998; Mentel et al., 1997, Mentel et Wegner, 2000; Romanowski et al., 2001; Pang et al., 2001; Arnold et al., 2002) ont abouti à la découverte de vaccins ou de drogues spécifiques et efficaces pour lutter contre les infections adénovirales. Quelques vaccins sont disponibles pour l'usage limité de recrues militaires et ils sont dirigés contre le Syndrome de Détresse Respiratoire chez l'Adulte. Ces vaccins ne sont pas autorisés pour les civils. Il s'agit des sérotypes Ad4, Ad7 et parfois Ad21 qui sont empaquetés dans des capsules entériques de façon à éviter l'épithélium respiratoire et ces virus vont se répliquer uniquement après avoir atteint

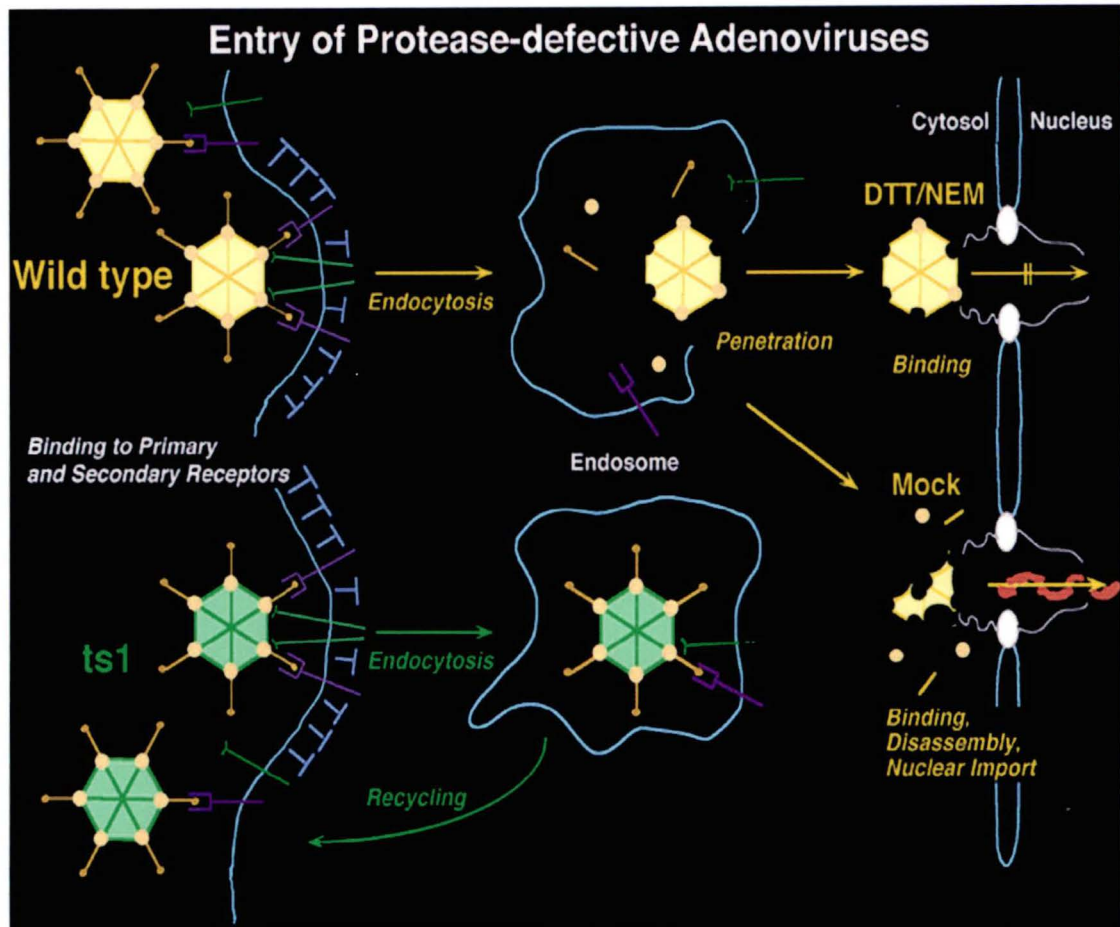
l'intestin, ce qui occasionne une infection asymptomatique de l'intestin. Ces souches sont mises en culture dans les fibroblastes des embryons humains. Malgré leur succès dans la prévention des pneumonies dans l'armée, ces vaccins ne sont pas autorisés pour l'usage infantile par précaution, pour éviter les risques causés par la non atténuation de ces virus et leur potentiel oncogénique.

Des vaccins ont été aussi mis en culture dans des cellules primaires de singe qui comportaient le virus SV40. Le génome de SV40 peut s'intégrer dans la région précoce E3 de l'adénovirus. Des adénovirus recombinants contenant l'antigène tumorigénique grand T de SV40 ont été isolés. Cette approche a été ainsi abandonnée.

## B.2. Propriétés

L'adénovirus humain de sérotype 2 encode une protéase dont l'activité est essentielle à la synthèse de virus infectieux (Anderson et al., 1973, Anderson, 1990; Weber, 1976). Elle est encodée dans la région génomique L3 du brin r et est responsable de la conversion de la procapside en une particule mature infectieuse (Webster et Kemp, 1993; Anderson, 1990; Weber, 1995; Weber, 1999; Weber, 2002a). Les propriétés d'un virus mutant thermosensible (Ad2ts1) indiquent que l'une des fonctions de cette protéase, après l'assemblage du virus, est le clivage de sept protéines précurseurs majeurs pour les convertir en protéines matures présentes dans les virus de type sauvage (Hannan et al., 1983; Mirza et Weber, 1979, 1980). Dans les cellules infectées par le mutant thermosensible Ad2ts1 à 39°C, on observe une accumulation des précurseurs non clivés pIIIa, pVI, pVII, pVIII, pTP, pMu ce qui engendre

des virions non infectieux. La protéine tardive L1-52/55K demeure également immature.



(Tiré de Greber et al., 1996).

**Figure 3 : Pénétration et décapsidation des adénovirus : type sauvage, des adénovirus dont la protéase est inactivée par DTT/NEM ou des adénovirus dépourvus de protéase (mutant thermosensible ts1). Les étapes d'attachement et de pénétration surviennent avec une efficacité et une cinétique similaires dans les trois contextes. Contrairement au virus de type sauvage et au virus dont les molécules de protéases sont inactivées par DTT/NEM, le virus mutant ts1 conserve ses fibres et reste dans l'endosome. Le virus dont les protéases sont inactivées n'est pas décapsidé (VI n'est pas dégradée) et ne peut pas libérer son ADN pour l'importer dans le noyau de la cellule hôte.**

La mutation ts1 est située sur le gène L3 23K codant l'adenain (Weber, 1976) et correspond au changement d'une proline en leucine à la position 137 (Yeh-Kai et al., 1983). L'adenain est encapsidée dans les virions de type sauvage et non pas dans les particules ts1 (Rancourt et al., 1995). La figure 3 offre une vue schématique du cycle de réplication des adénovirus dans trois contextes : le virus sauvage (Mock), le virus mutant et le virus dont les molécules de protéase sont inactivées chimiquement. Le virus sauvage pénètre dans la cellule hôte par endocytose, est libéré de l'endosome, sera déshabillé avant d'exporter son ADN dans le noyau de la cellule hôte. Dans le cas où l'adenain est inactivée chimiquement par le DTT/NEM (dithiothreitol/N-éthylmaléimide), le virus progresse jusqu'au complexe nucléaire mais ne peut pas dissocier sa capsid. Dans le cas du virus mutant ts1, dépourvu d'une adenain fonctionnelle, les virions produits à température restrictive de 39°C présentent une capsid immature formée de protéines précurseures. Cet Ad2ts1 reste sous forme d'endosome et il va subir un mécanisme de recyclage inutile vers la membrane plasmique.

On dénombre environ 70 molécules de cette protéase, l'adenain, par virion (Brown et al., 1996) et ces molécules clivent à 3300 sites pour rendre une particule virale infectieuse. L'adenain encapsidée peut être isolée en rompant des virions purifiés (Tremblay et al., 1983; Webster et al., 1989a, 1989b). Le gène L3 23K a été cloné dans divers vecteurs et exprimé dans *Escherichia coli* ou dans des cellules d'insectes infectées par baculovirus (Houde et Weber, 1990; Anderson, 1990; Mangel et al., 1993; Tihanyi et al., 1993; Webster et al., 1993; Weber et Tihanyi, 1994; Keyvani-Amineh et al., 1995). La protéine résultante de 204 acides aminés a été purifiée.

L'adenain est une protéine très basique avec un point isoélectrique de 10.2, composée

d'une chaîne unique de 201 à 214 acides aminés selon le sérotype, contenant huit résidus cystéines sans ponts disulfures. On ne connaît pas de modifications post-traductionnelles de l'adenain (Tihanyi et al., 1993; Weber et Tihanyi, 1994). L'activité spécifique de l'adenain est de  $12.9 \text{ nmol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et est stable jusqu'à  $45^\circ\text{C}$  (Weber et Tihanyi, 1994). L'adenain complexée au cofacteur pVIc a une  $K_m$  de 5mM et son activité est optimale à pH 8 à  $45^\circ\text{C}$  en présence de 1mM de composants thiols et de polymères chargés négativement. Du fait de la grande tendance du groupement thiol à l'oxydation, l'environnement de l'adenain devrait contenir un composé réducteur. Le glutathione sert d'agent activateur dans les expériences sur des cellules tandis que l'addition de mercaptoéthanol ou de dithiothreitol est conseillée dans les expériences *in vitro*. L'activité enzymatique peut être complètement abolie avec de faibles concentrations d'agents réducteurs et un excès d'agents alkylants tels que l'iodoacétamide ou le N-éthyl-maléimide (Tihanyi et al., 1993).

Des expériences de mutagenèse extensive ont démontré que les cystéine 104 et 122 sont critiques pour l'activité protéolytique (Grierson et al., 1994; Rancourt et al., 1994, 1996; Jones et al., 1996). Les rôles de la Cys104 de l'adenain et de la Cys10 du pVIc ont fait l'objet de nombreuses recherches (Mangel et al., 1993, 1996, 1997; Cabrita et al., 1997; Ruzindana-Umunyana et al., 2000b; McGrath et al., 2001b).

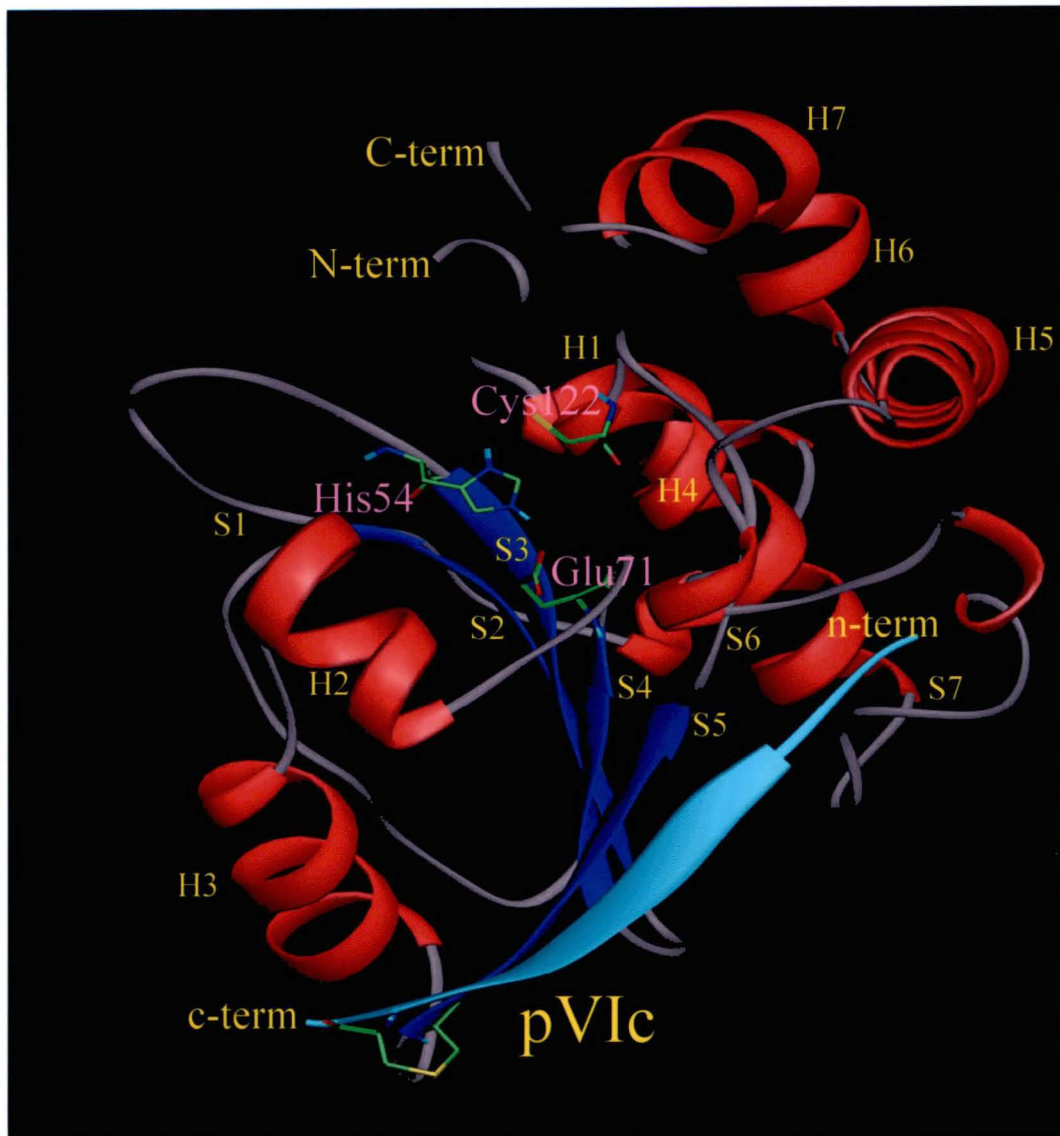
### B.3. Le site actif

Des études biochimiques d'inhibition, des expériences de mutagenèse dirigée et la résolution de la structure cristallographique de l'adenain ont permis de caractériser le mécanisme catalytique de l'adenain impliquant la triade Cys122-His54-Glu/Asp71 (Cornish

et al., 1995; Ding et al., 1996; Rancourt et al., 1996). La figure 4 décrit les résidus impliqués dans la catalyse. Le troisième résidu de la triade catalytique est l'acide glutamique dans le cas de l'adenain de l'Ad2 mais pour plusieurs autres sérotypes, c'est l'acide aspartique qui est le troisième partenaire du site actif.

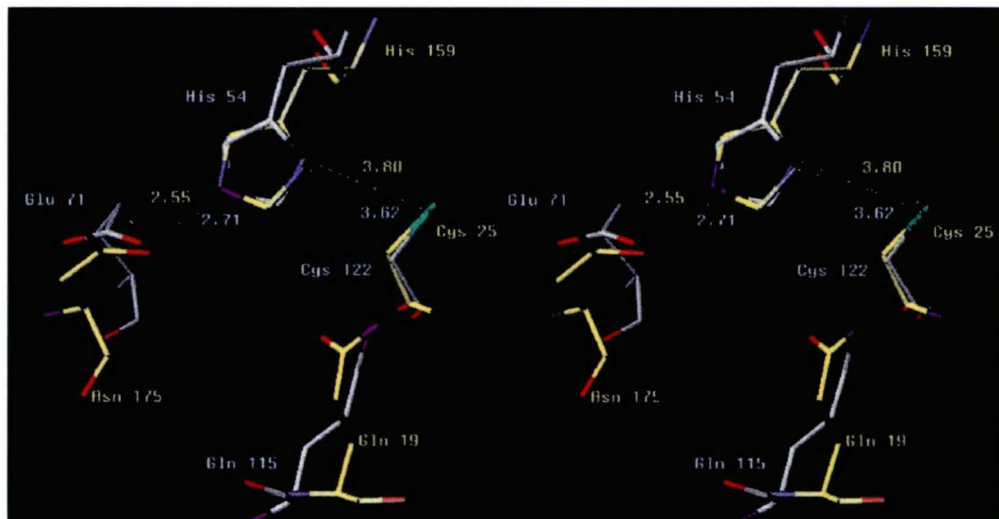
Des similitudes structurales existent entre la papaïne et le complexe adenain-pVIc. Une hélice et quelques feuillets  $\beta$  de la région centrale de la papaïne sont localisées dans la même position que dans le complexe adenain-pVIc. Lorsque ces régions sont superposées (figure 5), il apparaît clairement que la disposition géométrique de la triade de résidus catalytiques de l'adenain (H54, E/D71, C122) est identique à celle de la papaïne (H159, N175, C25). Les résidus nucléophiles Cys25 de la papaïne et Cys122 de l'adenain se superposent, les résidus His159 et Asn175 de la papaïne se superposent aux résidus His54 et Glu71 de l'adenain. Par ailleurs, les résidus Gln115 de l'adenain et Gln19 de la papaïne qui participent dans la formation de l'orifice oxyanion sont localisés de façon similaire. Cet orifice oxyanion aurait pour rôle la stabilisation du site catalytique (Brocklehurst et al., 1998). Malgré cette similitude de localisation des résidus constituant les sites catalytiques des deux enzymes, l'ordre séquentiel de ces résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique est différent. Pour l'adenain, la triade impliquée est l'His54, Glu71 et Cys122 alors que pour la papaïne les résidus sont dans l'ordre Cys25, His159 et Asn175. Ces deux enzymes représentent un exemple d'évolution convergente vers un site actif stable et utile mais n'appartiennent pas à la même classe de cystéines protéases (Barrett et Rawlings, 2001).





**Figure 4 : Structure secondaire du polypeptide constituant l'adenain, les extremités N et C terminales sont montrées, les hélices  $\alpha$  sont numérotées de H1 à H7, les feuillets  $\beta$  de S1 à S7. Le peptide pVIc coloré en bleu clair constitue un feuillet additionnel. Les chaînes latérales sont montrées uniquement pour les résidus du site actif Cys 122, His 54 et Glu 71. La figure est générée par le programme Visualizer dans INSIGHT II.**

L'adenain possède une faible homologie de séquence avec les membres de la famille de cystéine protéases de type SUMO-1, présentes dans une grande variété d'organismes, depuis le Virus ASF (African Swine Fever) jusqu'à l'homme (Li et Hochstrasser, 1999; Andres et al., 2001). Une revue de Barrett et Rawlings (2001) classe l'adenain dans le clan CE, classification basée sur les similitudes des sites catalytiques et sur la spécificité de substrat de différentes protéases, dont les Ubl (ubiquitin like proteins) de divers organismes et les protéases YopJ (*Yersinia outer protein*) de la bactérie *Yersinia pestis*.



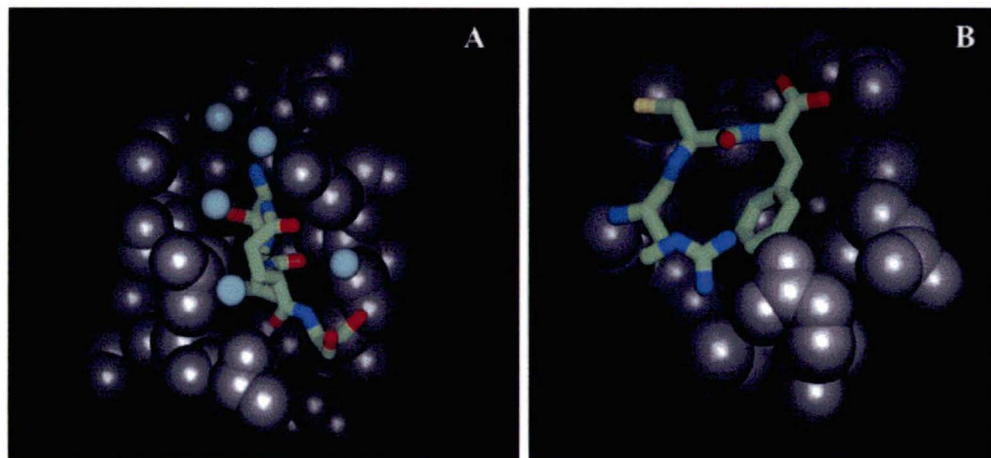
(Tiré de Ding et al., 1996).

**Figure 5 : Superposition des résidus des sites actifs de l'adenain complexée avec pVic et de la papaïne. Les résidus impliqués dans la catalyse par la papaïne sont montrés après l'alignement de la papaïne de façon à faire correspondre ces résidus avec leurs équivalents de l'adenain. Les résidus des sites actifs et les distances des liens (en Å) sont coloriés en jaune pour la papaïne et en magenta pour l'adenain. La figure a été générée en utilisant le programme O.**

#### B.4. Mécanisme d'activation

L'adenain recombinante a une faible activité basale ce qui a amené la recherche des cofacteurs. Ainsi, il a été constaté que l'activité de l'adenain provenant de bactéries recombinantes peut être stimulée par l'addition de lysats issus de cellules infectées par le virus mutant ts1, ce qui confirmait la nécessité de cofacteurs pour une activité maximale (Mangel et al., 1993). Le premier cofacteur identifié fut le peptide de onze acides aminés dérivé du clivage en C-terminal de la protéine précurseure pVI en protéine VI (Mangel et al., 1993, 1996; Webster et al., 1993). Sa séquence est GVQSLKRRRCF. Les quatre acides aminés précédant pVIc dans la protéine précurseure pVI constituent une partie d'un site de clivage consensus de l'adenain, ce qui implique que l'adenain peut cliver son propre cofacteur. Par des essais biochimiques et à partir de la structure cristallographique de l'adenain liée au peptide stimulateur, pVIc, il a été découvert que ce peptide activateur contient un résidu cystéine (C10) critique en position 2 à partir du C-terminus, résidu qui est engagé dans un pont disulfure avec la cystéine 104 de l'adenain (Ding et al., 1996; Jones et al., 1996). L'addition de pVIc augmente la constante de spécificité  $k_{cat}/K_m$  et donc la vitesse d'hydrolyse du substrat par un facteur de 1130 fois par rapport à l'activité de l'adenain seule (McGrath et al., 1996a, 1996b, 2001b). Le rôle de pVIc consisterait à rapprocher deux régions habituellement distantes de l'adenain de façon à favoriser la formation de la paire d'ions catalytiques constitués par l'His54 et la Cys122. La formation d'un pont disulfure entre l'adenain et le pVIc occasionnerait un changement de conformation qui résulte en une stimulation de l'activité protéolytique (Jones et al., 1996). Plus tard, Cabrita et al. (1997) ont apporté plus d'informations sur le changement de conformation causé par le peptide pVIc et

par des variantes tronquées de ce peptide. Ils ont conclu que le changement de conformation induit par l'addition de pVIc à l'adenain résulte de sa liaison en deux sites importants. Ces liaisons impliquent les deux extrémités du peptide qui sont nécessaires à l'activation maximale de l'adenain. Dans le laboratoire du Dr Weber, nous avons démontré que l'activation maximale de l'adenain n'est pas atteinte avec des peptides mutants dérivés du cofacteur même si nous avons constaté une liaison et une stimulation partielles variables selon les peptides mutants (Ruzindana-Umunyana et al., 2000b).



(Tiré de Baniecki et al., 2001).

**Figure 6 : Les deux cavités de liaison du pVIc sur l'adenain. En (A), structure du site de liaison sur l'adenain des résidus Gly1' et Val2' de pVIc. Les résidus d'adenain sont décrits sous forme de sphères CPK. Les molécules d'eau sont les sphères cyanure. Les résidus 1' à 3' du pVIc sont montrés sous le format "stick" avec les atomes de carbone en vert, les atomes d'azote en bleu et les atomes d'oxygène en rouge. En (B), structure du site de liaison sur l'adenain des résidus 9' à 11' du pVIc. Les couleurs utilisées dans les deux panneaux sont identiques. Le pont S-S est représenté par une barre jaune.**

La figure 6 montre les sites importants dans la complexation Adénain-pVIc. Des résultats obtenus par McGrath et al., 2001b, suggèrent que malgré l'importance de la Cys10 du pVIc dans la liaison de ce cofacteur à l'adénain, la formation du pont disulfure entre l'adénain et le pVIc ne serait pas absolument requise pour l'activation maximale de l'adénain par pVIc. McGrath et al., 2002, ont démontré que la liaison disulfure entre l'adénain et le peptide pVIc est physiologiquement importante puisque dans la particule virale, l'adénain est liée au pVIc via un pont disulfure. C'est la première évidence expérimentale d'une interaction entre l'adénain et l'un de ses cofacteurs *in vivo*. Les interactions entre l'adénain et ses cofacteurs ont été jusqu'à maintenant découvertes et caractérisées *in vitro*.

Le second activateur identifié est l'ADN qui stimulerait l'activité enzymatique ou stabiliserait l'enzyme (Mangel et al., 1997; McGrath et al., 1996a, 1996b, 2001a). L'activation de l'adénain par l'ADN n'est pas spécifique de la séquence de l'acide nucléique. Divers polymères ont été substitués à l'ADN et testés à titre de cofacteurs (Mangel et al., 1993). Non seulement l'ADN de la T7 remplace l'ADN de l'Ad2 comme agent stimulateur mais également des ADN monobrin linéaires, des ADN monobrin ou doubles brins circulaires, des ARN de transfert et même l'acide glutamique peuvent stimuler l'activité enzymatique. Ces résultats confirmaient le fait que le cofacteur requis était essentiellement un polymère porteur d'une densité élevée en charges négatives. Des unités monomériques issues de polymères de densité élevée en charge négative tels que les déoxyribonucléosides monophosphates ne pouvaient pas remplacer l'ADN de l'Ad2. Le polyanion majeur avec une densité élevée en charges négatives dans la particule virale est bien entendu l'ADN viral. Dans une publication récente, McGrath et al. (2001a) ont présenté des résultats des études menées sur des

interactions entre l'adenain, le pVIc, les complexes adenain-pVIc d'une part avec différents ADN d'autre part. Des liaisons ont été examinées et quantifiées et il en ressortait que les complexes Adenain-pVIc se liaient à l'ADN et que ces liaisons s'accompagnaient d'une activation enzymatique.

L'adenain et le complexe adenain-pVIc se lie à l'ADN avec des valeurs de  $K_d$  physiologiquement intéressantes, à savoir 63 et 4.6 nM respectivement. L'augmentation de la  $k_{cat}/K_m$  pour un complexe adenain-AdDNA est de 110 fois par rapport à l'adenain seule tandis que cette augmentation est de 34100 fois pour le complexe adenain-pVIc-AdDNA (McGrath et al., 2001a).

L'activité de l'adenain des virions de type sauvage est accrue en présence d'agents réducteurs ce qui suggère qu'à l'intérieur du virion l'enzyme est inactive probablement par la présence de liens disulfures (Webster et al., 1993). L'adenain recombinante activée par son cofacteur pVIc est cependant inactivée par de faibles concentrations d'agents réducteurs. Ceci pourrait suggérer que les agents réducteurs inhibent le mécanisme d'activation mais stimule l'activité enzymatique.

Toutes ces observations ont conduit à un modèle de régulation de l'activation de l'adenain par ses deux cofacteurs. L'adenain est synthétisée sous forme relativement inactive. La  $K_m$  pour l'hydrolyse du substrat fluorogénique (Leu-Arg-Gly-Gly-NH)<sub>2</sub>-rhodamine était 95 μM et la  $k_{cat}$  était estimée à  $2 \times 10^{-3} s^{-1}$ . Si l'adenain était synthétisée sous forme active, elle cliverait probablement les protéines précurseurs des virions avant l'assemblage ce qui empêcherait la formation de virus matures infectieux. En accord avec cette hypothèse, l'addition de pVIc exogène au cours de l'infection entraîne une diminution considérable du

rendement viral (Rancourt et al., 1995; Ruzindana-Umunyana et al., 2000b; Baniecki et al., 2001).

L'adenain se lie probablement à l'ADN viral avant d'entrer dans les capsides vides immatures et demeure dans cet état lié durant la maturation de la particule virale. Cette liaison entre l'adenain et l'ADN viral dans les capsides vides est favorisée puisque la valeur du  $K_d$  (63nM) du complexe adenain-ADN double brin 12mer (GACGACTAGGAT) est suffisamment faible (McGrath et al., 2001a). Dans le virion naissant, l'ADN viral est positionné près du C-terminus de la protéine pVI. Cette protéine pVI est une protéine de liaison à l'ADN (Russell et Precious, 1982) et serait ainsi facilement clivée par l'adenain partiellement activée par sa liaison avec l'ADN viral. Comparées aux valeurs obtenues avec l'adenain seule, la  $K_m$  diminue de 10 fois et la  $k_{cat}$  augmente de 11 fois pour le complexe adenain-ADN. Ainsi, le complexe adenain-ADN peut cliver pVI au site de clivage consensus précédant la séquence de pVIc (IVGL-GVQSLKRRRCF, le clivage se produisant au niveau du -). Le pVIc formé peut alors se lier soit à l'ADN viral ( $K_d$  apparent est de 693 nM) soit aux molécules d'adenain en solution ( $K_d$  est de 4400 nM) ou de façon plus probable au complexe adenain-ADN qui l'a libéré; la  $K_d$  estimée est alors de 90 nM (Baniecki et al., 2001). Une fois que le pVIc est lié à l'adenain, la cystéine C10' du pVIc va former un lien disulfure avec la cystéine C104 de l'adenain (Ding et al., 1996). À partir de ce moment l'adenain est définitivement activée. En comparant les valeurs obtenues avec l'adenain seule, la  $K_m$  a diminué de 28 fois et la  $k_{cat}$  augmenté de 1209 fois pour le complexe pVIc-adenain-ADN.

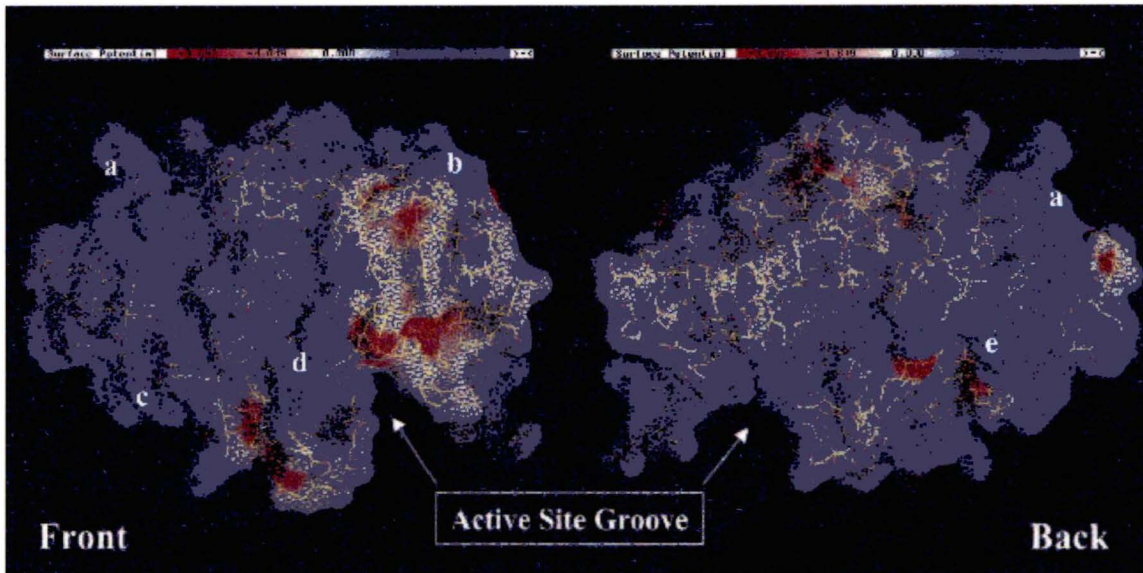
Comment 70 molécules d'adenain activées liées à l'ADN dans le virion (Brown et al., 1996) peuvent occasionner 3300 clivages pour rendre la particule virale infectieuse?

Pour que ceci soit possible, il faut que soit l'adenain soit son substrat se déplace à l'intérieur des virions naissants. Il se peut que l'adenain se déplace le long de l'ADN viral cherchant des sites de clivage sur les protéines précurseurs à la manière de l'holoenzyme RNA polymérase chez *Escherichia coli* qui se déplace le long de l'ADN à la recherche d'un promoteur. Le complexe adenain-pVIc et la RNA polymérase présentent tous deux une affinité considérable et non séquence spécifique pour l'ADN. Les valeurs  $K_d$  obtenues avec des paires de bases de nucléotides sont de 60 nM et 100 nM pour le complexe adenain-pVIc et la RNA polymérase respectivement (Hinkle et Chamberlin, 1972). Dans le cas de l'adenain, il se peut que l'ADN viral sert d'échaffaudage sur lequel s'érigent les 3300 sites de clivage qui doivent être clivés. Les 70 complexes adenain-pVIc peuvent alors se déplacer le long de l'ADN viral selon une diffusion à une dimension, utilisant l'ADN comme fil conducteur dans le clivage des protéines précurseurs. En utilisant l'ADN viral comme fil conducteur, l'adenain pourrait alors rapidement (via une diffusion unidimensionnelle) et efficacement (par l'alignement des sites de clivage près de l'ADN et par le déplacement le long de l'ADN) procéder à la maturation des nombreuses protéines précurseurs des virions.

La surface moléculaire du complexe adenain-pVIc (figure 7) possède quatre blocs de charge positive dans une région allant de 45 à 65 Å<sup>2</sup>, et ces régions seraient les sites de liaison à l'ADN (McGrath et al., 2001a). Un des compartiments est issu de la proximité des résidus Lys37, Lys65, Arg63 et His36; un autre correspond aux résidus His131, His181, Arg180, Arg186 et Arg193. Le troisième compartiment possède les résidus Arg93, Arg94 et Arg108. Le dernier bloc comprend les résidus Arg168, Arg169, His200 et Lys202 (figure 8). La plus courte distance entre ces blocs (~24 Å) est comparable à la formation d'un seul tour d'un

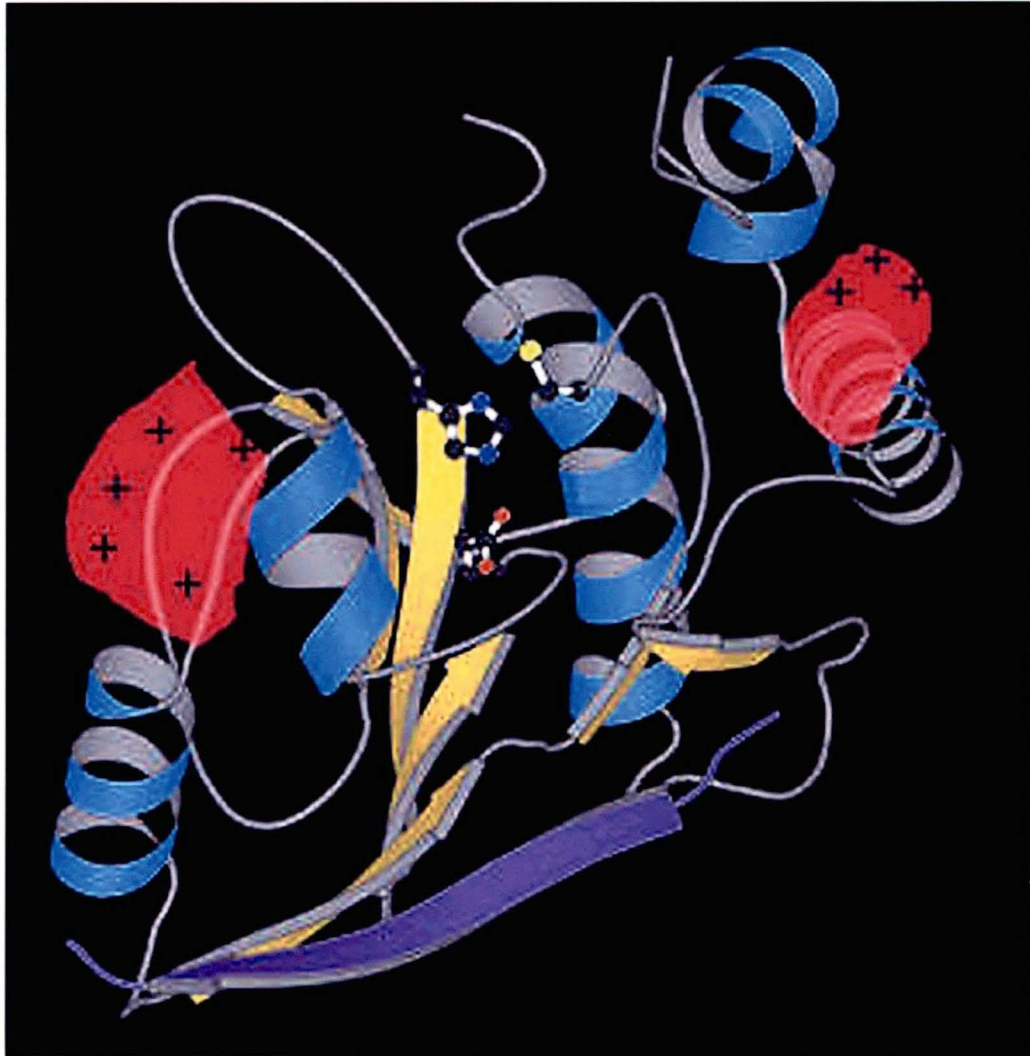


ADN double brin hélicoïdal. Des structures cristallines résolues par diffraction au rayons X d'un complexe Adenain-pVIc-ADN ne sont pas encore disponibles.



(Tiré de McGrath et al., 2001a).

**Figure 7 : Carte du potentiel de charge montrant la distribution des charges positives et négatives sur la surface du complexe adenain-pVIc. Les cinq blocs de charges positives (en bleu) sont étiquetés de a à e, la flèche indique la position de la cavité du site actif. Les aires colorées en rouge indiquent les régions de charges négatives. Les vues arrière et avant sont indiquées. La figure a été générée en utilisant le programme GRASP.**



(Tiré de [http : //www.bnl.gov/bnlweb/pubaf/pr/2001/bnlpr120401.htm](http://www.bnl.gov/bnlweb/pubaf/pr/2001/bnlpr120401.htm))

**Figure 8 : Représentation de la structure secondaire de l'adenain. Le site actif est localisé dans la cavité en haut de la figure où se trouvent représentées sous forme "ball-and-stick" les résidus impliqués dans la catalyse. Le cofacteur pVlc est le feuillet bleu-pourpre en bas de la protéine. Les sites de liaison de l'ADN sont tapissés d'un fond rose et identifiés avec des signes "plus".**

### B.5. Spécificité de substrat

Deux motifs consensus de clivage de l'adenain ont été identifiés par l'analyse des protéines précurseurs clivés durant l'infection virale et par l'usage de peptides synthétiques comme substrats. Il s'agit des séquences suivantes : (M,I,L)XGX-G ou (M,I,L)XGG-X, la liaison rompue étant indiquée par un - (Webster et al., 1989a,b). Des séquences alors connues, X semblait pouvoir être n'importe quel acide aminé (Weber, 1995). Par la suite, il a été démontré que la séquence consensus de type XGX-G est hydrolysée plus rapidement que la séquence XGG-X (Diouri et al., 1996). Une seule exception à ces séquences consensus était alors observée dans la séquence de la protéine pTP de l'adénovirus humain 4 au moment de la maturation de pTP en TP mature via l'espèce intermédiaire iTP, impliquant une séquence QRGF-G où un résidu Gln occupe la position P<sub>1</sub> (Webster et al., 1997). Plus récemment, Benko et Harrach (communication personnelle) ont séquencé les protéines codées par les atadenovirus. Ils ont constaté une particularité au niveau de la protéine pVII qui est clivée par l'adenain à un site (M,I,L) RAT-G pour devenir la protéine mature VII (Thomson et al., 2002).

Li et Hochstrasser (1999) ont observé des homologies de séquences entre différents membres d'un groupe de cystéines protéases incluant les protéases de la fièvre virale African Swine, du virus vaccinia, du virus fowlpox, de la *Chlamydia* et des protéases de type Ubl (ubiquitin-like) de différents organismes. La levure *Saccharomyces Cerevisiae* encode aussi une protéase apparentée, SMT4 qui a un rôle dans la condensation des chromosomes (Strunnikov et al., 2001). Leurs résidus catalytiques sont aussi conservés et ils clivent leurs protéines précurseurs respectives au niveau des sites consensus similaires ou proches des

sites de clivage Gly-Gly-X (Lopez-Otin et al., 1989; Lee et Hurby, 1994). Les similitudes observées au niveau de leurs séquences, dans leurs sites catalytiques et dans les sites de clivage de leurs substrats suggèrent que ces protéases sont apparentées. L'adenain partage également une faible homologie de séquence avec des membres de la famille des cystéines protéases SUMO-1 présentes dans des organismes divers (Andres et al., 2001). Dans une revue sur l'évolution des cystéine protéases, Barrett et Rawlings (2001) ont classé l'adenain dans un sous-groupe CE regroupant les protéases Ubl et les protéases de *Yersinia pestis* appartenant à la famille YopJ.

Alors que la catalyse se produit de préférence au niveau des deux sites consensus, certains sites consensus ne sont pas clivés, probablement à cause de leur inaccessibilité inhérente à la structure de la protéine étudiée. Par contre, des clivages ont été observés ailleurs que sur un site consensus. Durant la décapsidation du virus, Greber et al. (1993, 1996) ont rapporté la protéolyse de la protéine mature VI de la capsid. Or la protéine VI ne contient aucun site de clivage et les résultats suggéraient que l'enzyme pourrait être responsable de ce phénomène. Des protéines non virales sont aussi clivées par l'adenain. Les protéines SCCA1 et SCCA2 codées par l'antigène du carcinome cellulaire squameux qui fonctionnent comme des serpins sont ainsi clivées en l'absence de sites de clivage consensus mais plutôt au niveau d'une boucle exposée à la surface de ces protéines, le Reactive Site Loop, RSL (Ruzindana-Umunyana et al., 2000a). Les kininogènes appartenant à la famille des cystatins sont clivés sans pour autant comporter un site de clivage consensus (Ruzindana-Umunyana et Weber, 2001).

Au cours de notre recherche, nous avons examiné les séquences des deux types de

sites de clivage consensus de toutes les protéines virales précurseurs disponibles dans les banques de données, en retenant surtout les quatre résidus situés de chaque côté du site clivable. Nous avons aussi étudié la digestion *in vitro* par l'adenain de plusieurs protéines virales dont les protéines de la capsid, la protéine VI et l'hexon, les protéines du core V et VII et la protéine non-structurale 100K. Notre but était de mieux comprendre les propriétés entourant la spécificité de substrat de l'adenain, de les relier éventuellement à des événements se produisant au cours du cycle de réplication de l'adénovirus. Par ailleurs l'identification d'inhibiteurs spécifiques de l'adenain passe bien évidemment par la connaissance détaillée de sa spécificité de substrat.

Des protéines cellulaires qui contiennent des sites de clivage de l'adenain peuvent être digérées par l'adenain *in vitro* comme c'est le cas de la fibrinogène, certaines serpins, le GST et la protéase de baculovirus. D'autres protéines non virales sont clivées par l'adenain à condition d'exposer leur site par dénaturation. Il s'agit par exemple de l'actine, l'ovalbumin, la VP1 (Infectious Pancreatic Necrosis Virus) et les cystatins (Houde et Weber, 1990; Tihanyi et al., 1993; Keyvani-Amineh et al., 1995; Ruzindana-Umunyana et al., 2000a; Ruzindana-Umunyana et Weber, 2001).

## **B.6. Fonctions**

Étant donné que le mécanisme d'assemblage des adénovirus dans toute sa complexité dépend essentiellement de l'orchestration de l'activation de l'adenain, il est possible que la protéolyse de la procapsid soit contrôlée de façon temporelle. Le prérequis minimal de la maturation est l'assemblage de la capsid comme cela est indiqué par les mutants déficients

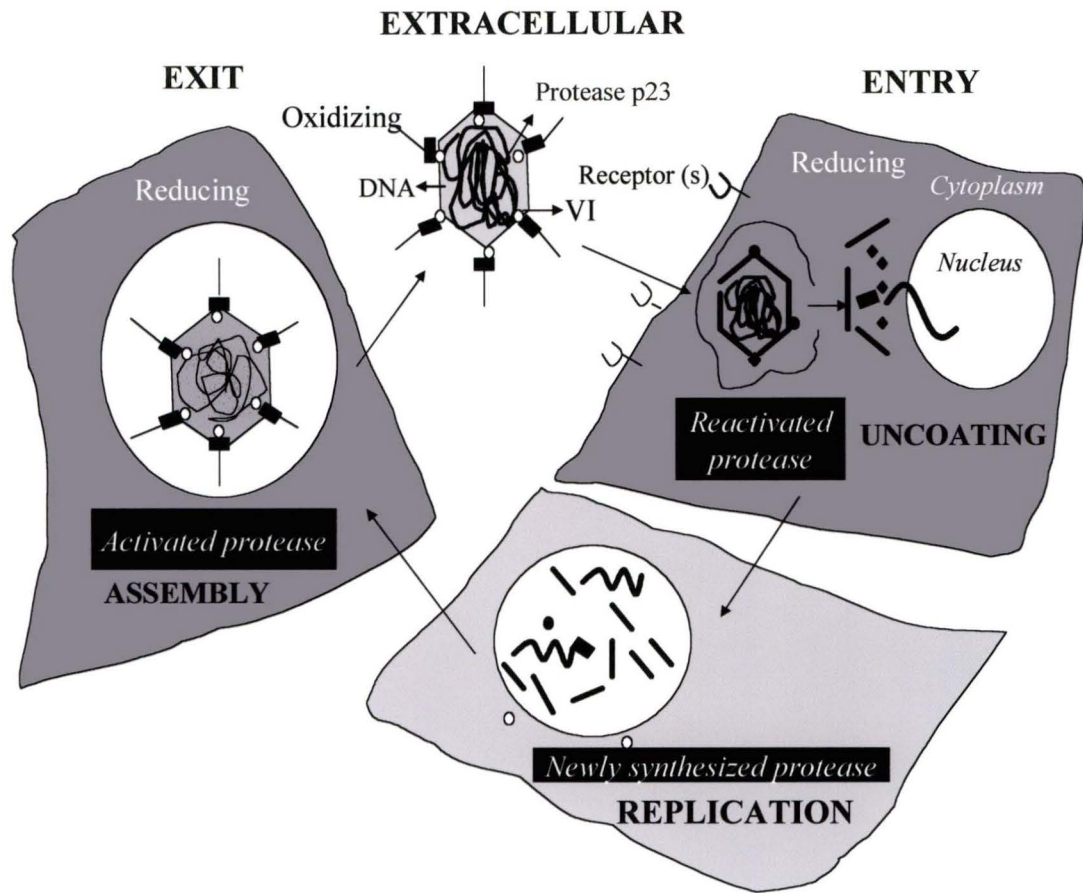
au niveau de l'assemblage (D'Halluin, 1995). Le second prérequis de la maturation est l'encapsidation adéquate de l'adenain dans les virions naissants. De par son point isoélectrique basique, l'adenain co-purifie avec les cores viraux et est associée de façon non spécifique avec l'ADN (Weber, 1995). Il est possible que l'adenain entre dans la capsid, en association avec l'ADN viral sous forme de complexe avec les protéines V et VII. Une fois à l'intérieur de la capsid, l'adenain correctement repliée de type sauvage mais non l'adenain de la forme mutante ts1, pourrait interagir avec la protéine pVI (Rancourt et al., 1995). Cette interaction conduirait directement ou indirectement au double clivage au N- et C-terminus de pVI et à la production du peptide stimulateur pVIc.

Il est intéressant de remarquer que pVIc contient quatre acides aminés basiques (R ou K) qui peuvent servir d'élément déterminant de la liaison de la protéine précurseur pVI mais pas de la protéine mature VI à l'ADN du core. Ce fait peut être une partie du changement de conformation qui permet à la protéine mature VI de s'associer de façon stable à l'hexon. En accord avec ce scénario, des expériences d'hybridation ont permis de détecter une interaction entre l'hexon et la protéine mature VI mais non avec la protéine précurseur pVI (Matthews et Russell, 1994; Matthews et Russell, 1995). L'adenain peut alors s'engager dans la maturation de toutes les protéines de la capsid comportant un site de clivage consensus jusqu'à l'émergence de virion mature. L'activité protéolytique diminue dès que les virions entrent dans des conditions oxydantes, c'est-à-dire dans le milieu extracellulaire.

Il est clair que l'assemblage et le déshabillage d'une capsid aussi complexe que celle d'adénovirus dépendent de plusieurs facteurs viraux et cellulaires. Un régulateur commun à l'assemblage et au désassemblage est la cystéine protéase encodée par le virus (figure 9).

Cette protéase, p23, AVP ou adenain, mène la plus grande part de son intervention dans la particule virale. L'adenain subit deux activations temporelles. La première activation survient tard dans l'assemblage grâce à l'un de ses propres substrats. La seconde activation a lieu tôt dans la décapsidation par le double effet d'attachement de la capsid aux intégrines et le milieu réducteur du cytoplasme. L'élucidation des différences détaillées entre les mécanismes d'assemblage et de désassemblage des adénovirus sera essentielle pour le succès de l'usage thérapeutique soit des particules virales complètes soit de particules dérivées.

L'adenain est également requise pour le clivage des cytokératines 18 et 7 et le réarrangement morphologique du système des cytokératines (Chen et al., 1993). Ces clivages des protéines cellulaires par l'adenain affectent l'intégrité de la cellule infectée. La dépolymérisation de la structure du cytosquelette qui en découle affaiblit les barrières membranaires de la cellule infectée, ce qui favorise la lyse cellulaire et accélère la libération des virions naissants. Toutes les protéines virales digérées par l'adenain sont situées soit à l'intérieur du virion ou seulement en partie localisées dans les virions. Il s'agit des protéines de la capsid associées à l'hexon, pIIIa, pVI et pVIII, les protéines du core, pVII et pX, la pTP associée à l'ADN viral et la protéine impliquée dans l'encapsidation du génome viral, la L1-52K/55K. L'ordre des 3300 clivages effectués par l'adenain est encore assez mal connu et leur relation avec l'assemblage du virus reste à être précisée. Puisque l'assemblage se produit en l'absence de l'adenain (cas du mutant ts1), il a été suggéré que c'est l'événement d'assemblage qui conduit à l'activation de l'adenain et à la cascade des processus protéolytiques de maturation par l'adenain.



(Adapté de Greber, 1998)

**Figure 9 : Régulation du cycle de réplication des adénovirus par le mécanisme d'activation de l'adenain. L'adenain subit deux activations temporaires : la première survient tôt dans l'infection suite à l'attachement de la capsidie à la cellule hôte et au milieu réducteur du cytoplasme et de l'endosome. La deuxième activation se produit tard dans l'infection après la génération du cofacteur pVIc dans la capsidie nouvellement assemblée.**



Une nouvelle fonction vient d'être rapportée pour l'adenain (Balakirev et al., 2002). D'après ce groupe, l'adenain possède des propriétés de déubiquitination, ce qui laisse croire que les voies de signalisation de l'ubiquitin sont importantes au cours de l'infection. Par ailleurs, cette propriété de déubiquitination que l'adenain partage avec d'autres protéases telles que les protéases du virus ASFV (*African Swine Fever Virus*) et du virus Vaccinia, reflète l'acquisition d'un avantage viral sur les processus cellulaires. D'autres investigations permettront d'élucider les implications de cette nouvelle propriété de façon plus précise.

### C. Les cystéine protéases et leurs inhibiteurs

Les enzymes protéolytiques qui dépendent d'un résidu cystéine pour leur activité ont évolué à partir d'au moins sept origines, chacune ayant produit un groupe de cystéine peptidases avec des structures et des propriétés distinctes. Dans une récente revue, Barrett et Rawlings (2001) ont expliqué que les topologies moléculaires caractéristiques des peptidases de chaque lignée ne peuvent pas être assimilées uniquement à leurs structures tridimensionnelles mais aussi de façon plus large à leurs structures secondaires. Le clan CA regroupe des cystéine protéases des familles de la papaïne (C1), de la calpaïne (C2), de la streptopaïne (C10) et des peptidases ubiquitin-spécifiques (C12, C19). Plusieurs familles de cystéine endopeptidases virales font également partie de cette classe. Le clan CD inclut des familles de la clostripaïne (C11), la gingipaïne R (C25), la legumaïne (C13), la caspase-1 (C14) et la séparine (C50). Ces enzymes ont des spécificités dominées par les interactions entre le résidu P1 du substrat et le site S1 correspondant de l'enzyme. Le clan CE comprend des familles de l'adenain (C5) des adénovirus, la protéase Ulp1 présente dans les organismes

eucaryotes (C48) et les protéases bactériennes YopJ (C55). Le clan CF est représenté uniquement par la pyroglutamyl peptidase I (C15). Les picornaïnes (C3) dans le clan PA ont probablement évolué à partir des sérine peptidases qui forment encore la majorité des enzymes de cette classe. En guise de conclusion de leur étude, Barrett et Rawlings (2001) ont suggéré que même si la plupart des cystéine protéases sont tributaires de la dyade catalytique Cys/His pour leur activité, il est intéressant de relever les différences importantes qu'elles ont hérité de leurs ancêtres, protéases, éloignées.

Pendant longtemps, la famille C5 de l'adenain était la seule représentante du clan CE, mais en 1999, la famille C48 fut découverte, d'abord chez *Saccharomyces* (Li et Hochstrasser, 1999) et puis chez les mammifères (Suzuki et al., 1999). Ulp1 est une molécule plus complexe que l'adenain mais l'homologie est claire au niveau de la structure secondaire spécialement autour des résidus catalytiques même si les deux protéines ne comportent que 19% d'homologie de séquence. La spécificité distincte de l'adenain est connue depuis longtemps, cet enzyme clivant après une séquence Gly-Gly. Il est intéressant de remarquer que la Ulp1 (C48) chez la levure a une spécificité plutôt similaire en favorisant des résidus glycine aux positions P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub>. Les résultats disponibles indiquent que l'enzyme YopJ et ses homologues de la famille C55 ont une spécificité de substrat similaire. Ainsi il y a ici une preuve de la conservation d'un aspect de la spécificité de substrat au niveau de chaque clan. Malgré les différences observées parfois au sein d'un même clan, les similitudes des modes d'interaction avec les substrats et par voie de conséquence avec les inhibiteurs, sont parfois suffisamment conservées pour amener une application pratique en cas de reconnaissance de l'appartenance à un clan établi (Babe et Craik, 1997).

D'après une revue de Veber et Thompson (2000) cinq catégories distinctes d'inhibiteurs de cystéine protéases peuvent être dégagées sur la base de leur important potentiel inhibiteur.

La catégorie I d'inhibiteurs agissent seulement par une liaison non covalente basée surtout sinon uniquement sur la reconnaissance de certains éléments de l'enzyme par le substrat. Ils peuvent également utiliser ce qui est appelé "les états de transition" mimétiques ou des interactions basées sur le mécanisme catalytique. Cette catégorie présente une grande probabilité d'inhibition sélective. Il est à supposer que cela résulte également en une faible probabilité d'occurrence des effets secondaires dus à l'inhibition des enzymes apparentées.

La catégorie II regroupe les inhibiteurs qui n'ont pas de réactivité intrinsèque à l'égard des groupements fonctionnels des protéines mais agissent quand même par formation d'un lien covalent et réversible avec un élément de l'enzyme. L'élément ciblé fait souvent partie de la machinerie catalytique. L'avantage de cette catégorie d'inhibiteurs est réalisé si le groupement formant le lien avec l'inhibiteur est beaucoup plus réactif envers l'inhibiteur que ne le sont les autres groupements fonctionnels présents sur l'enzyme. Le groupement thiol des cystéine protéases est un bon exemple de cette réactivité unique. L'addition d'un thiol sur un carbonyle est plus efficace que l'addition d'un groupement hydroxyl au même carbonyle. En effet cette dernière réaction procède avec une vitesse cent fois moins élevée ce qui correspond à une augmentation d'énergie d'environ 12.54 kJ/mol. Ainsi l'addition d'un groupement carbonyle comme composante d'un inhibiteur de cystéine protéase devrait conférer un avantage sélectif par rapport aux sérine protéases. Par contre il serait désavantageux pour une inhibition sélective d'une sérine protéase.

La catégorie III est constituée par des inhibiteurs qui reposent le plus sur la réactivité chimique intrinsèque pour la formation d'une liaison covalente réversible avec un élément de l'enzyme. Il s'agit également le plus souvent d'un élément de la machinerie catalytique. La différence entre ces inhibiteurs et ceux de la catégorie II n'est pas facile à définir. Cependant, ces inhibiteurs de la catégorie III sont les plus susceptibles de réagir avec des agents non dérivés de l'enzyme tels que l'eau ou d'autres nucléophiles provenant des solvants. Historiquement, ces inhibiteurs de la catégorie III ont été les plus faciles à développer en se basant sur la connaissance de la structure du substrat. La réactivité générale du groupement fonctionnel ("warhead") tend à faire surgir des inconvénients à cause de la non-sélectivité de ces inhibiteurs, spécialement vis-à-vis des enzymes apparentées.

La catégorie IV regroupe des inhibiteurs qui forment une liaison covalente irréversible avec l'enzyme ou une liaison covalente requérant une réaction chimique telle que l'hydrolyse pour régénérer l'activité de l'enzyme. Cette liaison est aussi souvent réalisée avec un élément de la machinerie catalytique. L'élément réactif de l'inhibiteur de cette catégorie ne présente pas de réactivité intrinsèque à l'égard du groupement dérivé de l'enzyme. Il forme la liaison uniquement en collaboration avec des interactions non covalentes de l'inhibiteur avec des sites de liaison sur l'enzyme qui sont communément impliqués dans la reconnaissance du substrat. Ce type d'inhibition a été considéré comme "quiescente" et correspond à une idée d'un substrat suicide. Cette inhibition qui repose sur une réaction impliquant une reconnaissance de substrat offre un niveau de sélectivité cinétique qui peut être tout à fait large. Dans tous les cas, l'irréversibilité implique que même lorsque la réaction directe est très lente, l'inactivation est toujours complète.

La catégorie V comprend des inhibiteurs qui forment une liaison covalente irréversible avec l'enzyme, mais qui tendent à reposer davantage sur un groupement intrinsèque réactif. La différence entre les inhibiteurs des catégories IV et V n'est pas facile à déterminer. Cependant les époxydes et les halométhyl cétones tombent clairement dans la catégorie V. Ces inhibiteurs de la catégorie V sont plus susceptibles d'occasionner une spécificité moins bien définie puisqu'ils peuvent réagir avec des cibles qui ne sont pas mécanistiquement reliées à la cible visée.

Pour être des outils biologiques efficaces, les inhibiteurs de protéases doivent être non seulement puissants mais aussi très sélectifs dans la liaison avec une protéase particulière. Comme médicaments potentiels, les inhibiteurs de protéases doivent en outre présenter des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques appropriées. Des indices sur la façon dont les protéases hautement sélectives reconnaissent de petites molécules inhibitrices proviennent des peptides substrats de ces protéases. Bien que les peptides présentent une large gamme de propriétés biologiques, leur usage comme médicament est cependant souvent compromis par leur instabilité, leur faible biodisponibilité et leurs profils pharmacologiques peu efficaces. Pour être des médicaments efficaces, les inhibiteurs de protéases devraient avoir un caractère peptidique minimal, une grande stabilité pour contrer les dégradations protéolytiques non spécifiques, une bonne perméabilité membranaire, de longues durées de vie dans le sang et dans les cellules, une faible susceptibilité à l'élimination, une grande sélectivité pour la protéase ciblée et un bon niveau de biodisponibilité (préférentiellement par voie orale). Ces propriétés requièrent habituellement des composés de petit poids moléculaire, inférieur ou égal à 1000 Da (Kim et al., 1995).

Des inhibiteurs de protéases ont été traditionnellement développés en partant d'un criblage de produits naturels pour en tirer le principe actif avec une optimisation ou bien par des méthodes empiriques basées sur les substrats (West et Fairlie, 1995). Ces dernières méthodes impliquent la troncation des substrats polypeptidiques vers des peptides courts (inférieurs à 10 acides aminés), le remplacement du lien amide clivable par un isostère non clivable et l'optimisation du potentiel inhibiteur par des modifications de structure (méthodes essai-erreur) qui progressivement diminuent la nature peptidique de la molécule.

Le plus grand problème dans la conception des inhibiteurs de cystéine protéases est leur similitude avec les sérine protéases en ce qui concerne leur affinité pour les substrats. leurs mécanismes protéolytiques et plus particulièrement la nécessité commune aux deux types de protéases, d'avoir un isostère électrophile qui réagit de façon sélective et de préférence réversible avec le nucléophile catalytique (thiol de la cystéine versus hydroxyl de la sérine). Comme pour les sérine protéases, les cystéine protéases ont tendance à avoir des sites actifs étroits, exposés aux solvants et qui peuvent accommoder des segments courts des boucles ou des feuillets du substrat/inhibiteur. C'est le cas des inhibiteurs endogènes tels que les cystatins.

#### D. Les inhibiteurs de l'adenain

Mis à part les inhibiteurs classiques de cystéine protéases qui ont été testés sur l'adenain (Sircar et al., 1996; 1998), il faut mentionner les essais impliquant des analogues de nucléosides dont le HPMPA [(S)-9-(3-Hydroxy-2-phosphonylmethoxy-propyl)adenine] qui inhibent la réplication du génome viral (Hui et al., 1994; Baniecki et al., 2001). Le HPMPA induit une diminution substantielle de la synthèse des particules virales infectieuses lorsqu'il

est ajouté soit au moment de l'infection adénovirale soit 12 heures après l'infection. Après 16 heures d'infection, l'addition du HPMPA n'a qu'un effet négligeable sur la production de virus infectieux.

Des recherches récentes ont rapporté que la cidofovir-HPMPC- (Kodama et al. 1996; Romanowski et Gordon, 2000; Romanowski et al., 2001) et la zalcitabine-ddc- (Mentel et al., 1997; Mentel et Wegner, 2000) sont des inhibiteurs efficaces de la réplication adénovirale. Ces agents, le HPMPA et la ddc, ont été utilisés pour le traitement clinique d'autres infections virales à savoir les infections aux cytomégalovirus et au HIV respectivement. Cependant ces agents n'ont pas été utilisés pour le traitement clinique des infections adénovirales, à l'exception de certains cas où le HPMPA a été utilisé sous forme de gouttes ophtalmologiques dans le traitement des kératoconjunctivites adénovirales (Gordon et al., 1996; De Oliveira et al., 1996; Hillenkamp et al., 2001).

NMSO3 (sodium [2,2-bis(docosyloxymethyl)propyl-5-acetoamido-3,5-dideoxyl-4,7,8,9-tetra-O-(sodium-oxysulfonyl)-D-glycero-a-D-galacto-2-nonulopyranosid]onate. est un autre agent, chimiquement synthétisé, qui possède une activité antivirale contre le virus respiratoire syncytial. Le mécanisme du NMSO3 contre ces infections consiste en une inhibition de l'adsorption et de la pénétration virales (Kimura et al., 2000; Shigeta, 2000). Cet agent est non toxique, à large spectre puisqu'il inhibe également le HIV (M. Terada, résultats non encore publiés), le virus de l'influenza de type A (Kimura et al., 2000) et le rotavirus (K. Takahashi, résultats non publiés). Les résultats de Kaneko et al. (2001) montrent que le NMSO3 inhibent également les infections adénovirales en empêchant l'adsorption virale sur les cellules. Un fait intéressant est que cet agent contient un acide sialique qui est utilisé par

certains virus comme récepteur cellulaire (Arnberg et al., 2000a, 2000b). NMSO3 pourrait ainsi interférer avec l'attachement de l'adénovirus par compétition avec les récepteurs cellulaires pour les particules virales. Cependant le mécanisme détaillé de l'inhibition de l'adsorption adénovirale requiert encore des investigations pour être clarifiée.

La 6-azacytidine possède une activité contre les adénovirus de type 1,2 et 5 (Alexeeva et al., 2001). Ce composé inhibe la synthèse de l'ADN et des protéines adénoviraux. Par ailleurs, par son activité antiherpétique et anti-influenza démontrée lors d'infections virales des souris, la 6-AC est une drogue prometteuse dans les stratégies antivirales avec un large spectre d'activité.

La lactoferrin, LF, protéine présente dans le lait maternel humain et bovin, inhibe la réplication adénovirale lorsqu'elle est ajoutée avant ou durant l'étape de l'adsorption virale (Arnold et al., 2002). La LF empêche la réplication virale lorsqu'elle est maintenue dans le milieu d'infection pendant toute la durée du cycle de réplication virale et son action se produit pendant la phase précoce.

La résolution de la structure tridimensionnelle de l'adenain permet la conception de molécules-médicaments dont la structure épouse parfaitement celle de l'adenain, un peu à l'image d'une clé qui se couple à la serrure d'une porte pour l'ouvrir. À l'aide de logiciels puissants tels que LUDI, EUDOC, DOCKING (Insight II), il est possible de dessiner, modéliser et ensuite fabriquer des molécules parfaitement adaptées pour interagir avec le site actif de l'adenain. C'est ainsi que dans le cadre de la recherche des inhibiteurs sélectifs et irréversibles de l'adenain, Pang et al. (2001) ont découvert un nouveau composé en utilisant une approche basée sur la modélisation par ordinateur des interactions optimales entre une



banque de composés chimiques et l'adenain. Le composé présentant les meilleures caractéristiques (énergie de liaison et  $K_d$  les plus basses) est optimisé en le modifiant de telle sorte qu'une liaison réversible est convertie en liaison irréversible entre ce composé et l'adenain.

Depuis quelques années, les traitements contre les infections virales impliquent une combinaison de plusieurs médicaments dirigés dans la plupart des cas contre des cibles différentes situées sur des protéines différentes. Les succès cliniques de cette thérapie combinée sont indéniables. Au cours de l'infection à HIV-1, la dynamique de la réplication virale est très rapide. On estime actuellement que, dans le seul compartiment plasmatique, environ dix milliards de virus sont renouvelés quotidiennement. Or les thérapeutiques antirétrovirales aujourd'hui disponibles n'inhibent que partiellement, d'un facteur de 10 à 100 environ, cette réplication virale. Par ailleurs, la transcriptase inverse est une enzyme dépourvue de système de réparation et son taux d'erreur est de 0.3 à 2 mutations par génome à chaque cycle de réplication virale (Pelletier et Wain-Hobson, 1996; Drake, 1993). Ces différents paramètres créent les conditions idéales de sélection de mutants résistants. Ces mutations préexistent à l'instauration de la thérapeutique et seront sélectionnées sous l'influence du traitement (Richman, 1995; Larder, 1995). Ainsi, le virus devient résistant en peu de temps aux différents médicaments dirigés contre la reverse transcriptase, la protéase et l'intégrase, puisque les mutations conduisant à cette résistance sont indépendantes les unes et des autres (Tantillo et al., 1994; Erice et Balfour, 1994; Johnson, 1995). Cependant, le scénario serait-il différent si ces mutations n'étaient pas indépendantes les unes des autres? Si les mutations n'étaient pas indépendantes les unes des autres, quel coût serait exigé au virus

pour résister aux médicaments? En d'autres termes, une thérapie combinée serait efficace si les mutations conduisant à la résistance ne sont pas inoffensives mais plutôt confèrent quelques désavantages au virus. Si le coût de la résistance est trop élevé pour le virus, alors la résistance ne se produirait pas. Pour imposer un tel coût au virus lors des traitements cliniques des infections virales, Mangel et al. (2001) ont proposé une nouvelle forme de thérapie combinatoire. Ils envisagent l'utilisation de trois drogues dirigées contre trois cibles différentes sur une même protéine codée par le virus. Si les fonctions physiologiques de ces trois cibles différentes ne sont pas indépendantes chacune par rapport aux autres, alors une mutation à un site pourrait perturber les fonctions physiologiques aux autres sites. Cette thérapie combinée est destinée à réduire la probabilité du virus à devenir résistant aux trois drogues à un niveau inférieur à la réciproque du nombre total des virus variants présents chez l'individu.

Mangel et al.(2001) ont présenté le modèle d'un système qui permettrait de tester l'efficacité de cette nouvelle forme de trithérapie. L'adenain comporte un site actif et deux sites de liaison des cofacteurs pVIc et ADN. Les fonctions du site actif dépendent de la liaison des deux cofacteurs à des sites bien précis de l'adenain. En concevant des agents ciblant chacun des trois sites, il serait possible alors d'inhiber l'infection adénovirale sans risque de résistance du virus. En effet, l'hypothèse de base est que l'on s'attend à un coût élevé pour le virus pour développer une résistance à trois inhibiteurs. Le coût augmente lorsque les mutations entraînant la résistance ne sont pas indépendantes. De par les études de la biochimie et de la structure de l'adenain, il est clair que le site actif et les sites de liaison des deux cofacteurs ne sont pas des domaines indépendants. Le cofacteur pVIc, qui exerce un contrôle

puissant sur la vitesse de la catalyse se lie sur l'adenain à un site assez éloigné des résidus impliqués dans la catalyse. L'élément nucléophile du site actif, la Cys122, se situe à 32 Å de la Cys104 qui forme un pont disulfure avec le pVIc. Cependant la liaison de ce cofacteur à l'adenain augmente la vitesse d'hydrolyse d'un substrat de 350 fois. Par ailleurs, la liaison de l'ADN à l'adenain élève la vitesse d'hydrolyse du substrat. Ainsi est-il raisonnable de penser qu'une mutation à un site qui rend l'adenain résistante à une drogue pourrait perturber les fonctions physiologiques des autres sites. Et le coût associé à cette mutation serait suffisamment élevée pour empêcher l'apparition de la résistance des trois médicaments dirigés contre trois cibles différentes sur une même protéine.

#### E. Projet

Depuis quelques années, dans le laboratoire du Dr Weber, les recherches sont essentiellement tournées vers l'identification d'inhibiteurs spécifiques de la protéase d'adénovirus. L'adenain constitue en effet une cible idéale pour une thérapie antiadénovirale pour plusieurs raisons. Étant donné le grand nombre de sérotypes infectant l'humain et les animaux domestiques, la vaccination est ardue. Puisque l'adenain et son mécanisme catalytique sont parfaitement conservés dans tous les sérotypes, des inhibiteurs effectifs de l'adenain de l'Ad2 vont être efficaces sur tous les autres sérotypes. Par ailleurs ils pourront être testés sur différents modèles animaux qui sont infectés par les adénovirus, des souris aux singes en passant par les poulets ou les chiens. La vaccination est non seulement ardue du fait du grand nombre de sérotypes, mais aussi elle est économiquement injustifiée puisque les infections adénovirales ne constituent pas un problème de santé publique majeur. Cependant

ces infections peuvent être extrêmement graves parfois mortelles chez les sujets immunodéprimés et les enfants. L'identification de médicaments est donc la meilleure solution.

Mon projet consistait à apporter ma contribution à cette recherche tout en continuant la caractérisation de l'adenain tant au niveau de l'amélioration de la technique de purification qu'au niveau de sa spécificité de substrat. Nous avons pu améliorer la technique de purification telle que décrite par Keyvani-Amineh et al.(1995) et nous purifions actuellement une enzyme recombinante sans queue protéine A, de grande pureté, stable et dont l'activité est appréciable, ce qui facilite grandement nos essais enzymatiques et nos tests d'inhibition. Les candidats inhibiteurs que nous avons proposés et testés ont démontré une efficacité et des mécanismes variables. Les cibles visées impliquaient les sites essentiels à l'activité de l'adenain dont notamment le site actif et le site d'attachement du peptide stimulateur. Dans le cadre de cette recherche d'inhibiteurs, nous avons réexaminé la spécificité de substrat de l'adenain dans le but de la caractériser davantage (quatrième article).

Les premiers candidats inhibiteurs testés furent les inhibiteurs de la papaine (article en annexe). Pour le choix des autres candidats inhibiteurs, nous avons pris en considération le fait qu'il existe des mécanismes de résistance innés et non-spécifiques. Ces mécanismes servent de barrières aux attaques des agents pathogènes et plus particulièrement permettent le ralentissement de la multiplication des virus au site d'infection et cela avant même le déclenchement de la réponse immunitaire spécifique (Dianzani et Baron, 1996). Ces défenses non spécifiques n'englobent pas les agents qui sont produits suite à une infection, comme par exemple des interférons ou des cytokines, puisqu'ils ne sont pas innés. Les défenses innées incluent une série de barrières, des molécules pré-existantes qui ont une activité antivirale ou

antibactérienne. Des études ont démontré que la plupart des infections virales sont initialement contrôlées par des mécanismes de défense précoces non spécifiques qui permettent de juguler la multiplication virale initiale à des niveaux contrôlables. Ces défenses initient quelque peu la guérison qui va être complétée ensuite par une combinaison de ces défenses précoces non spécifiques et des réponses immunitaires subséquentes spécifiques au virus. Des fluides et des tissus normaux de différents organismes présentent des activités inhibitrices contre des virus isolés, des groupes de virus ou encore un large spectre de virus (Singh et Baron, 2000; Singh et al., 2001).

Durant ces dernières années, des molécules présentes dans le corps et possédant une activité antivirale étendue à plusieurs virus ont été mieux caractérisées et sont parfois considérées comme des défenses efficaces contre les infections virales (Baron et al., 2000a, 2000b). Par exemple, il existe de nombreux inhibiteurs du HIV dans la salive (Crombie et al. 1998; Shugars, 1999; Baron et al., 1999; 2000). Il reste à déterminer lequel des inhibiteurs salivaires découverts est responsable de la protection par la salive contre des leucocytes infectées par HIV. Les inhibiteurs salivaires incluent entre autres les anticorps spécifiques au HIV-1, la lysozyme, les peroxydases, les cystatins, la lactoferrin, les défensins, les mucins, les histatins, les RNases, les peptides riches en Proline, l'amylase, la slatherin, la thrombospondin-1 (Lee-Huang et al., 1999). Parmi ces inhibiteurs salivaires, les cystatins sont des inhibiteurs de cystéine protéases. Nous avons choisi d'examiner l'effet des serpins (premier article) et des cystatins (troisième article) comme candidats inhibiteurs protéiques endogènes potentiels des infections adénovirales. Les serpins étudiées sont exprimés dans les voies respiratoires qu'infectent les adénovirus de sérotypes 2 et 5. Par ailleurs les serpins choisies inhibent la

papaïne, ce qui les prédisposait à être de bons inhibiteurs de l'adenain. Les cystatins que nous avons purifiées sont présentes dans les liquides biologiques correspondant à deux sites d'entrée des adénovirus, à savoir les larmes et la salive. Par ailleurs des études antérieures avaient démontré l'inhibition efficace de la papaïne et d'autres cystéines protéases par certains membres de la famille des cystatins. Par ailleurs des cystatins comportent des séquences de clivage consensus de l'adenain et à ce titre pouvaient se comporter comme des inhibiteurs compétitifs de cet enzyme. Le site d'attachement du pVIc a été pris comme cible et les résultats obtenus sont l'objet du deuxième article.

## **II. ARTICLES**

### **ARTICLE I**

Ruzindana-Umunyana A., Sircar, S., Schick, C., Silverman, G.A and Weber, J.M. (2000).

Adenovirus Endopeptidase Hydrolyses Human Squamous Cell Carcinoma Antigens *in vitro* but not *ex vivo*. *Virology* 268 (1), 141-146.

#### ***Préambule***

Dans ce manuscrit, nous rapportons les résultats obtenus avec des serpins comme candidats inhibiteurs potentiels de l'adenain. Les serpins recombinantes testées sont deux protéines isoformes codées par l'antigène du carcinome squameux humain, SCCA1 et SCCA2.

Dans cet article, ma contribution a été la réalisation des expériences *in vitro* :

1. Tests d'inhibition de l'activité de l'adenain par une serpin, SCCA1, avec comme substrat la rhodamine R110 et comme contrôle négatif, l'ovalbumine, une serpin non inhibitrice (fig. 1).
2. Tests de clivage spécifique des serpins recombinantes par la protéase recombinante (fig. 2) et contrôle du non clivage par la protéase mutante (fig.3).
3. Mesure du niveau d'expression du gène SCCA1 suite à l'infection (fig.4)

## Adenovirus Endopeptidase Hydrolyses Human Squamous Cell Carcinoma Antigens *in Vitro* but not *ex Vivo*

A. Ruzindana-Umunyana,\* S. Sircar,\* C. Schick,† G. A. Silverman,† and J. M. Weber\*

\*Department of Microbiology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4; and †Department of Pediatrics, Harvard Medical School, Children's Hospital, Boston, Massachusetts 02115

Received September 17, 1999; returned to author for revision November 29, 1999; accepted December 13, 1999

The serpins SCCA1 and SCCA2 are highly expressed in the epithelium of the conducting airways, a common site of infection by group C adenoviruses, such as human adenovirus type 2 (Ad2). Based on the common location we examined a possible interaction between them. *In vitro* experiments with recombinant proteins showed that SCCA1 inhibited the viral protease in a dose-dependent manner. Both serpins were cleaved in a manner consistent with hydrolysis within their reactive site loop, without the formation of an SDS-resistant complex, as in the case of papain. Infection of SCCA1-expressing cells did not result in the cleavage of SCCA1, nor was the yield of infectious virus affected as compared to SCCA1-negative parental cells. This may be due to differential localization, the serpin being cytoplasmic and viral protease being nuclear. Surprisingly, however, virus infection, which tends to inhibit host protein synthesis, caused a significant increase in SCCA1 expression well into the late phase of infection. © 2000 Academic Press

**Key Words:** adenovirus type 2; protease; cysteine; serpins.

### INTRODUCTION

Adenoviruses encode a cysteine endopeptidase which cleaves several viral proteins in the course of virus assembly and maturation (Weber, 1995). The enzyme is specific for substrate sequences containing a Gly in the P1 or P1' position, a second Gly in the P2 position and Met, Ile, or Leu in the P4 position. Other than viral proteins the enzyme also cleaves cytokeratins K7 and K18, resulting in depolymerization and accelerating cell lysis (Chen *et al.*, 1993). Although the crystal structure of the enzyme is unique, the architecture of the active site closely resembles that of papain (Ding *et al.*, 1996).

High-molecular-weight serine proteinase inhibitors (serpins) regulate a diverse set of intracellular and extracellular processes such as complement activation, fibrinolysis, coagulation, cellular differentiation, tumor suppression, apoptosis, and cell migration (Gettins *et al.*, 1996; Wright, 1996). The ov-serpins are a subset of the serpin superfamily and are characterized by their high degree of homology to chicken ovalbumin, the lack of N- and C-terminal extensions, the absence of a signal peptide, and a Ser rather than an Asn residue at the penultimate position. Recently two new ov-serpins, SCCA1 and SCCA2, have been identified (Schneider *et al.*, 1995). Although no target proteases have been identified for these serpins, SCCA1 binds with a 1:1 stoichiometry and at second-order rate constants of  $>10^5$ /M/s with several papain-like cysteine proteinases (cathepsins S, K, L, and papain itself). SCCA1 and SCCA2 are

92% identical, but differ significantly at their reactive site loops. SCCA1 inhibits papain-like cysteine proteases and SCCA2 inhibits chymotrypsin-like serine proteases.

SCCA1 was found to be highly expressed in the epithelium of the conducting airways, a common site of infection by the group C adenoviruses, particularly human adenovirus type 2 (Ad2). Based on the common location and the target specificity is it possible that this serpin is an endogenous inhibitor of the Ad2 protease (AVP)? Here we report the results of *in vitro* experiments using recombinant proteins, which suggest that rAVP may cleave these serpins in their reactive site loop, resulting in reduced enzyme activity. In *ex vivo* experiments, SCCA1 expression was increased by virus infection but the serpin was not cleaved nor was virus production affected.

### RESULTS AND DISCUSSION

#### Effect of serpins on adenovirus protease

In preliminary experiments purified, recombinant fusion proteins of serpins rGST-SCCA1 (1  $\mu$ g) or rGST-SCCA2 (1  $\mu$ g) were added to the adenovirus protease (0.5  $\mu$ g rAVP) assay reaction using the fluorescent peptide substrate R110. No significant change in enzyme activity was observed. The experiments were repeated using the viral protein pVII substrate assay, and again enzyme activity remained essentially unaffected (results not shown). Similar results were obtained with ovalbumin, a noninhibitory serpin. Because ovalbumin contains



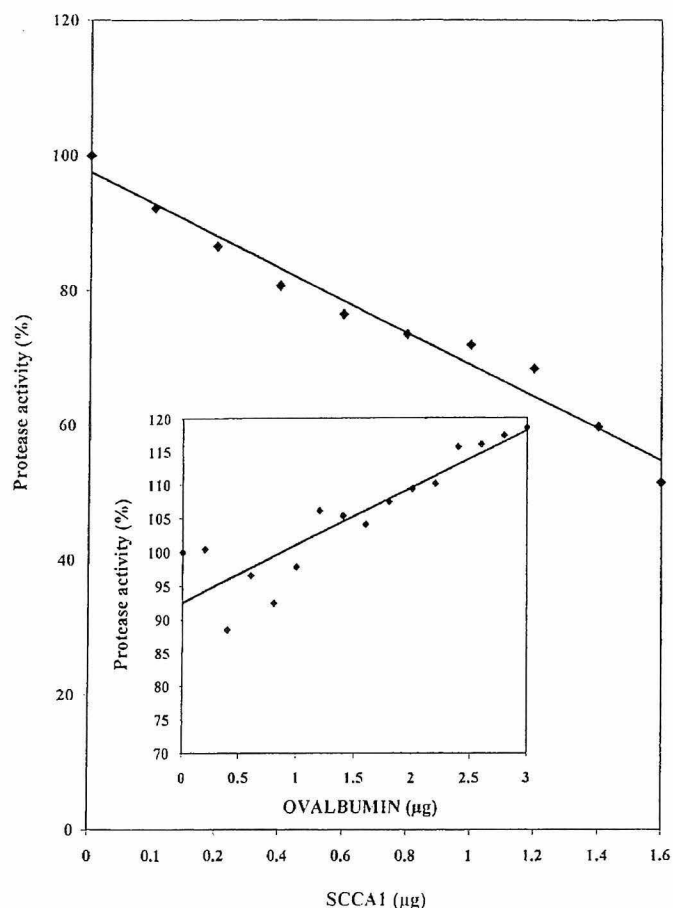


FIG. 1. Effect of rSCCA1 on protease activity. rAVP (0.5 µg) was preincubated for 30 min with different amounts of rSCCA1 before the addition of R110 substrate and further incubation for 2 h. The fluorescence units of the cleaved substrate is expressed in percentage as the mean of six independent determinations. (Inset) A similar experiment with ovalbumin as control.

an AVP consensus cleavage site, denatured ovalbumin can, however, act as a competitive inhibitor at ovalbumin/substrate ratios of greater than 10. It is possible that the GST fusion partner interferes with the activity of the serpins or that the protease has a much greater affinity for the R110 protease substrate than the serpins. For these reasons the experiments were repeated with rSCCA1 using a prior incubation with protease for 30 min before the addition of the R110 substrate. Under these conditions we observed a dose dependent decrease in enzyme activity as the ratio of serpin to enzyme was increased (Fig. 1). A ratio of 1 mol of serpin to 1 mol of enzyme gave 30% inhibition. This is comparable to the inhibition of papain by egg white cystatin, an industry standard for efficient enzyme inhibition by a protein inhibitor (Barrett, 1981). The observed inhibition is unlikely to be nonspecific because in a similar experiment ovalbumin did not show any inhibitory activity, but instead moderately stimulated protease activity, possibly by stabilizing or buffering the enzyme (Fig. 1, inset).

### Serpins may be cleaved by adenovirus protease

So far only two cellular proteins, cytokeratins K7 and K18, have been shown to be digested by AVP in the course of infection (Chen *et al.*, 1993). Digestion occurred at the single AVP site present in both cytokeratins. Neither SCCA serpins contain AVP consensus cleavage sites. Could the SCCA serpins be substrates for AVP within their reactive site loop (RSL)? The results summarized in Fig. 2 show that, indeed, both rGST-SCCA1 and rGST-SCCA2 were digested by AVP. Although a variety of digestion conditions were explored, the degree of digestion was variable in extent, but not site, and never complete. rGST contains an AVP site (MLGG) at residue 84. This site was digested relatively inefficiently in rGST alone (Fig. 2, lanes j, k) when compared to the rapid appearance of the largest and dominant digestion product in rGST-SCCA1 and rGST-SCCA2 (band "a" in lanes d-e and g-h). An analysis of all the digestion products suggests that the primary cleavage takes place at the serpin RSL generating band "a" consisting of approximately 578 residues. When serpins act as substrates, limited proteolysis of the RSL occurs, with the primary sites of cleavage being within a domain of approximately 11 residues, from P<sub>10</sub> to P'<sub>1</sub>, where the P<sub>1</sub> position represents the cleavage site for the normal target protease (Gettins *et al.*, 1996). Consequently, in this case the exact size of band "a" is not known.

To verify the cleavage in the serpin RSL we digested the rGST-SCCA1 fusion protein with thrombin followed by digestion with rAVP. Thrombin digestion yielded the expected fragments of 390 (band "d") and 226 (band "f") residues and AVP digestion generated the expected subfragment of approximately 352 (band "e") residues (Fig. 2, lanes l, m) due to presumed digestion in the RSL. Finally, we purified rSCCA1 after thrombin digestion of the fusion protein and subjected this pure rSCCA1 to rAVP digestion. The conversion of band "d" to band "e" (lanes o, p) supports the contention of digestion of rSCCA1 in the RSL region by rAVP.

As evident from Fig. 2, no higher molecular weight bands, representing SDS and heat-stable complexes such as the SCCA1-chymotrypsin complex, were detected after hydrolysis of the rSCCA serpins (Nawata *et al.*, 1995). Papain apparently also fails to form such a complex after cleaving SCCA1 (Nawata *et al.*, 1997).

Although rAVP was relatively pure, it remains possible that some or all of the observed cleavages were due to a contaminating protease which copurified with rAVP. Consequently a series of control experiments were carried out to examine this possibility. The following control experiments argue against this possibility: (a) most of the visible contaminants were 10 kDa or less, whereas proteases tend to be at least 20 kDa or larger in size, (b) rAVP only cleaved the known substrate proteins in a

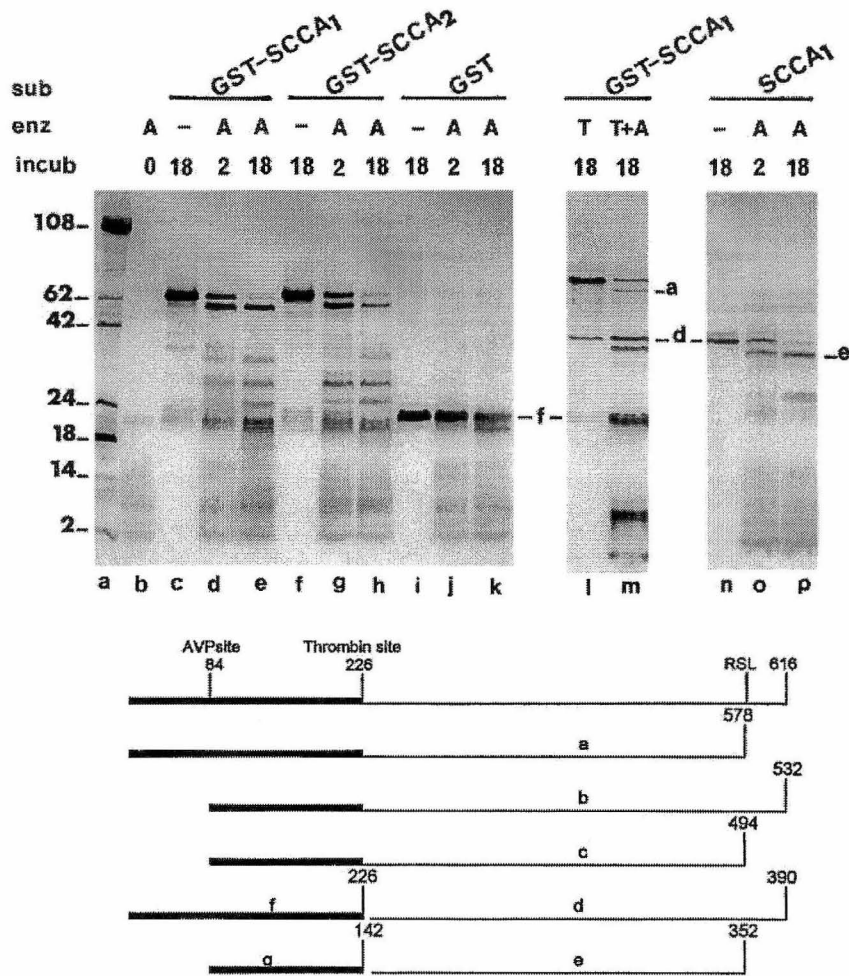


FIG. 2. Specific cleavage of recombinant serpins SCCA1 and SCCA2 by adenovirus protease. A 12% polyacrylamide-SDS gel stained with silver. GST-SCCA fusion proteins, GST, and purified SCCA1 substrates (sub; 1  $\mu$ g) were incubated (incub) with AVP enzyme (A; 0.02  $\mu$ g) or thrombin (T) for 0, 2, or 18 h as indicated. The reactions were stopped by boiling in SDS-lysing solution. Lane a contains adenovirus type 2 as marker proteins labeled in kDa. The cleavages are interpreted schematically in the lower figure as fragments a-g. The thick line designates the GST portion of the fusion proteins and the thin line the serpin portion. The numbers indicate native or postcleavage C-terminal residues.

mixture of viral and cellular proteins, (c) cleavage activity was only inhibited by cysteine protease-specific inhibitors and not by serine protease-specific inhibitors, (d) a mutant rAVP (C104G/C122G with 0 activity; Rancourt *et al.*, 1996) purified identically did not show any cleavage activity (Fig. 3). It might also be argued that a contaminating proteolytic activity present in the recombinant serpins is responsible for some of the observed cleavages. Overstained gels of self-incubated rSCCA1 showed no changes, thus arguing against this possibility. We therefore suggest that rAVP is responsible for the digestion of rSCCA1 and rGST-SCCA2 in their RSL.

**The effect of virus infection on SCCA1 expression and vice versa**

Virus infection generally suppresses host protein synthesis. Here we wish to test if this holds true for SCCA1 and more particularly whether SCCA1 is potentially cleaved by the viral protease during infection. The results

clearly show that SCCA1 is not suppressed in the recombinant cell line, but increased significantly during infection under a variety of conditions (Figs. 4A-4C). SCCA1 expression remained unchanged in cells mock-infected for 2 or 3 days (results not shown). There was no evi-

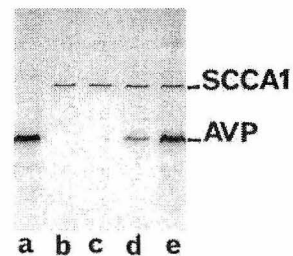


FIG. 3. Mutant protease does not cleave SCCA1. rSCCA1 (0.5  $\mu$ g) was incubated for 18 h with 0, 0.02, 0.2, and 1  $\mu$ g (lanes b-e, respectively) of a mutant rAVP purified identically to the wild type enzyme and the reaction mixtures separated by SDS-PAGE and stained with silver. Lane "a" contained 1  $\mu$ g of rAVP only.

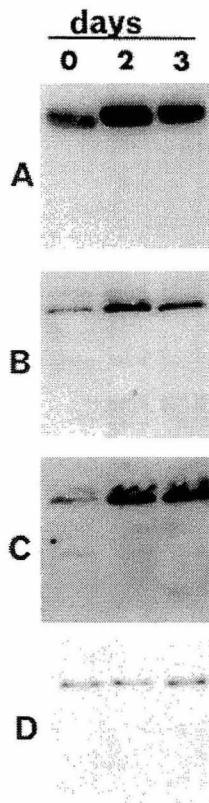


FIG. 4. Immunoblot of SCCA1 expression in adenovirus infected cells. MDA-435/S1-3 cells were infected with 5 (A) or 50 (B and C) PFU/cell for 0, 2, or 3 days at 37°C (A and B) or 39°C (C). SKGIIIa cells were infected for 0, 2, or 3 days at 37°C with 50 PFU/cell at 37°C (D). Cell lysates were subjected to SDS-PAGE, blotted, and reacted with anti-SCCA1 serum followed by  $^{125}\text{I}$ -labeled protein A.

dence of SCCA1 cleavage under any of these conditions. Lack of cleavage may be due to compartmentalization in that SCCA1 is in the cytoplasm and active protease within virus particles. Increased SCCA1 expression during virus infection could be due to several mechanisms including an increased half-life or increased gene expression or both. In an attempt to study this problem we also looked at the effect of infection on the expression of the endogenous SCCA1 gene in SKGIIIa cells. The results did not show any change in the expression of SCCA1 during the course of virus infection (Fig. 4D). The increased SCCA1 expression subsequent to infection of the MDA-435/S1-3 cell line may therefore be due to stimulation of the artificial promoter (EF-1 $\alpha$ ) in this transformed cell line.

A possible effect of the serpins on the course of virus infection was also examined. SCCA1 expression did not have any noticeable effect on the synthesis of infectious virus (Table 1). Virus titers of the parental MDA-MB-435 cell line, which does not express SCCA1, and the SCCA1-expressing transformed derivative cell line MDA-435/S1-3 were the same. The absence of any correlation between SCCA1 expression and ability to support virus replication also extended to such other human cancer cell lines as Hep2, MCF7, and SKGIIIa. The low virus titers in these cell lines, relative to the Hep2 cell line, prompted us to verify the efficiency of infection by estimating the production of the major capsid protein hexon. This showed some variability among the cell lines, but did not affect the conclusion with regard to the indepen-

TABLE 1  
Effect of SCCA1 on Virus Infection

Cell line	Infection (days)	SCCA1 expression <sup>a</sup>	Titer $\times 10^5$ (PFU/ml)	Hexon expression <sup>b</sup> (%)	Colony formation assay <sup>c</sup> (%)
HEP2	0	—	0	0	3.6
	2	—	8600	50	<0.03
	3	—	67000	100	<0.03
MDA-MB-435S	0	—	0	0	4.5
	2	—	8	0	<0.05
	3	—	16	8	
MDA-435/S1-3	0	+	0	0	9
	2	+++	4	2	<0.05
	3	++	16	40	<0.05
MCF 7	0	—	0		
	2	—	530		
	3	—	270		
SKGIIIa	0	+	0	0	5.8
	1	+	0.003		<0.05
	2	+	0.8		<0.05
	3	+	3	40	
	4	+	3	50	
	5	+	7	60	

<sup>a</sup> Relative expression estimated from Western blots.

<sup>b</sup> Hexon expression estimated from SDS-PAGE of cell lysates stained with Coomassie blue.

<sup>c</sup> Cells were infected with 10 PFU/cell for the indicated times, plated, and colonies counted 2 weeks later.

dence of virus production from serpin expression. The efficiency of infection was also verified by colony formation assay, based on the observation that infected cells fail to attach and divide (Table 1). In agreement with virus and hexon production, the data suggest that more than 99% of the cells of each cell line tested were infected by virus. In summary, these experiments are in agreement therefore, with the foregoing conclusion that the viral protease does not encounter and inhibit or cleave SCCA1.

## MATERIALS AND METHODS

### Enzyme and assays

Recombinant adenovirus type 2 protease (rAVP; EC3.4.22.-) was purified by chromatography from an *Escherichia coli* expression system (pLPV) as described before (Keyvani-Amineh *et al.*, 1995). This enzyme has 14 foreign amino acids fused to the N-terminus. This fusion peptide has no detectable effect on the properties of the enzyme, as determined by comparison with rAVP without this extension or enzyme isolated from virus particles. Enzyme activity was measured with a fluorescent peptide substrate, R110, purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR), essentially as described before (Diouri *et al.*, 1995). The reaction mixture contained TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA), 40  $\mu$ M pVlc (oxidized enzyme activating peptide GVQSLKRRRCF), 3.3  $\mu$ M R110, and 1  $\mu$ g of rAVP, unless otherwise indicated, in a total volume of 300  $\mu$ l. Incubation was at 37°C for 18 h and the fluorescence was measured. In the case of protein substrates (SCCA1, etc.), unless otherwise indicated, the reaction mixture contained 1  $\mu$ g substrate, 0.02  $\mu$ g rAVP in a total volume of 60  $\mu$ l. The latter reactions were stopped by boiling in lysing solution.

Qualitative assays were done as described before with substrates of ts1-infected cell lysates labeled with [<sup>35</sup>S]methionine at the nonpermissive temperature (39°C) at 24 h p.i. as a source of viral precursor proteins, particularly PVII (Keyvani-Amineh *et al.*, 1995). Endogenous protease activity was inactivated by boiling this substrate for 2 min. Enzyme activity is assessed from the conversion of PVII to VII visualized on autoradiograms of SDS-PAGE separations.

Thrombin was from Sigma and used as per the manufacturer's instructions (0.01 Units/ $\mu$ g substrate).

### Serpins

Recombinant human SCCA1 and SCCA2 were purified as GST-fusion proteins as described previously (Schick *et al.*, 1997). Recombinant SCCA1 was also purified from yeast (generously supplied by P. Pemberton). Purity of these proteins was determined by SDS-PAGE and visualized by silver staining. Protein concentration was de-

termined by the Bradford assay (Bio-Rad). Ovalbumin (crystallized, grade VII) was purchased from Sigma.

### Cells and virus

Hep2, a human epidermoid carcinoma of the larynx, MCF7, a human breast adenocarcinoma, and MDA-MB-435S, a human breast ductal adenocarcinoma, cell lines were obtained from ATCC (Rockville, MD). The MDA-435/S1-3 cell line is a recombinant cell line obtained by transforming the MDA-MB-435S line with a plasmid carrying the SCCA1 cDNA under the control of the EF-1 $\alpha$  promoter and a hygromycin B resistance gene. SKGIIIa is a carcinoma cell line derived from the cervix which expresses both SCCA1 and SCCA2. All cell lines were cultured in DMEM medium and 10% fetal calf serum. The MDA-435/S1-3 cell line was grown in the presence of 500  $\mu$ g/ml hygromycin B (Gibco). Human adenovirus type 2 (Ad2) was grown in HEp2 cells and titered by either plaque formation or end-point dilution in HEp2 cells. All experiments were done at an m.o.i. of 10 PFU/cell.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT4164) to J.M.W. and from the National Institutes of Health (HD28475 and HG00143) to G.A.S. We thank Lise Imbeault for technical assistance. A.R.U. was the recipient of a predoctoral scholarship from the Programme Canadien de Bourses de la Francophonie.

## REFERENCES

- Barrett, A. J. (1981). Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods in Enzymology* **80**, 771-778.
- Chen, P. H., Ornelles, D. A., and Shenk, T. (1993). The adenovirus L3 23-kilodalton protease cleaves the amino-terminal head domain from cyokeratin 18 and disrupts the cyokeratin network of HeLa cells. *J. Virol.* **67**, 3507-3514.
- Cornish, J. A., Murray, H., Kemp, G. D., and Gani, D. (1995). Specific inhibitors of the adenovirus type 2 proteinase based on substrate-like tetrapeptide nitriles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 25-30.
- Cotten, M., and Weber, J. M. (1995). The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology* **213**, 494-502.
- Ding, J., McGrath, W. J., Sweet, R. M., and Mangel, W. F. (1996). Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *EMBO J.* **15**, 1778-1783.
- Diouri, M., Geoghegan, K. F., and Weber, J. M. (1995). Functional characterization of the adenovirus proteinase using fluorogenic substrates. *Peptide Lett.* **6**, 363-370.
- Diouri, M., Keyvani-Amineh, H., Geoghegan, K. F., and Weber, J. M. (1996). Cleavage efficiency by adenovirus protease is site-dependent. *J. Biol. Chem.* **271**, 32511-32514.
- Gettins, P. G. W., Patston, P. A., and Olson, S. T. (1996). In "Serpins: Structure, Function and Biology." Landes, Austin, TX.
- Greber, U. F., Webster, P., Weber, J., and Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *EMBO J.* **15**, 1766-1777.
- Grierson, A. W., Nicholson, R., Talbot, P., Webster, A., and Kemp, G. D. (1994). *J. Gen. Virol.* **75**, 2761-2764.
- Huntington, J. A., Fan, F., Karlsson, K. E., Deinum, J., Lawrence, D. A., and Gettins, P. G. W. (1997). Serpin conformational change in ovalbu-

- min: Enhanced reactive center loop insertion through Hinge region-mutations. *Biochemistry* **36**, 5432–5440.
- Keyvani-Amineh, H., Diouri, M., Guillemette, J. G., and Weber, J. M. (1995). Electrophoretic and spectral characterization of wild type and mutant adenovirus protease. *J. Biol. Chem.* **270**, 23250–23253.
- Mangel, W. F., McGrath, W. J., Toledo, D. L., and Anderson, C. W. (1993). Viral DNA and a viral peptide can act as cofactors of adenovirus virion proteinase activity. *Nature* **361**, 274–275.
- Nawata, S., Tsunaga, N., Numa, F., Tanaka, T., Nakamura, K., and Kato, H. (1995). Serine protease inhibitor activity of recombinant squamous cell carcinoma antigen towards chymotrypsin, as demonstrated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* **16**(6), 1027–1030.
- Nawata, S., Kanamura, K., Tanaka, T., Numa, F., Suminami, Y., Tsunaga, N., Kakegawa, H., Katunuma, N., and Kato, H. (1997). Electrophoretic analysis of the “cross-class” interaction between novel inhibitory serpin, squamous cell carcinoma antigen-1 and cysteine proteinases. *Electrophoresis* **18**(5), 784–789.
- Mangel, W. F., Toledo, D. L., Jianzhong, D., Sweet, R. M., and McGrath, W. J. (1997). Temporal and spatial control of the adenovirus proteinase by both a peptide and the viral DNA. *Trends Biochem. Sci.* **22**(10), 393–398.
- Rancourt, C., Keyvani-Amineh, H., Diouri, M., and Weber, J. M. (1996). Mutagenesis of conserved residues of the adenovirus protease. *Virology* **224**, 561–563.
- Rancourt, C., Tihanyi, K., Bourbonnière, M., and Weber, J. M. (1994). Identification of active-site residues of the adenovirus endopeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 844–847.
- Schick, C., Kamachi, Y., Bartuski, A. J., Cataltepe, S., Schechter, N. M., Pemberton, P. A., and Silverman, G. A. (1997). Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J. Biol. Chem.* **272**, 1849–1855.
- Schneider, S. S., Schick, C., Fish, K. E., Miller, E., Pena, J. C., Treter, S. D., Hui, S. M., and Silverman, G. A. (1995). A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 3147–3151.
- Sheng, S., Truong, B., Fredrickson, D., Wu, R., Pardee, A. B., and Sager, R. (1998). Tissue-type plasminogen activator is a target of the tumor suppressor gene maspin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 499–504.
- Sircar, S., Keyvani-Amineh, H., and Weber, J. M. (1996). Inhibition of adenovirus infection with protease inhibitors. *Antiviral Res.* **30**, 147–153.
- Weber, J. M. (1995). The adenovirus endopeptidase and its role in virus infection. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**/1, 227–235.
- Webster, A., Hay, R. T., and Kemp, G. (1993). The adenovirus protease is activated by a virus-coded disulphide-linked peptide. *Cell* **72**, 97–104.
- Webster, A., Leith, I. R., and Hay, R. T. (1994). Activation of adenovirus-coded protease and processing of preterminal protein. *J. Virol.* **68**, 7292–7300.
- Webster, A., Leith, I. R., Nicholson, J., Hounsell, J., and Hay, R. T. (1997). Role of preterminal protein in adenovirus replication. *J. Virol.* **71**, 6381–6389.
- Wright, H. T. (1984). Ovalbumin is an elastase substrate. *J. Biol. Chem.* **259**, 14335–14336.
- Wright, H. T. (1996). The structural puzzle of how serpin serine proteinase inhibitors work. *BioEssays* **18**, 453–464.

## ARTICLE II

Ruzindana-Umunyana, A., Sircar, S. and Weber, J.M..(2000).

The Effect of Mutant Peptide Cofactors on Adenovirus Protease Activity and Virus infection. *Virology* 270 (1), 173-179.

### *Préambule*

Ce second manuscrit décrit les résultats obtenus en ciblant le mécanisme d'activation de l'adenain à des fins d'inhibition de l'activité enzymatique et de l'infection adénovirale. Dans cet article, j'ai réalisé les tests d'inhibition de l'activité enzymatique par les différents peptides mutants dérivés du cofacteur pVIc. Deux types de substrats sont utilisés : le peptide synthétique fluorescent R110 (figures 1 et 2) et les protéines virales précurseurs issues d'une infection de cellules à 39°C avec le virus mutant ts1 (figure 3). La Table 1 qui résume les résultats des figures 1 et 3 est issue de mon travail. J'ai également produit les résultats de la figure 4 qui rapporte les effets des peptides mutants sur le spectre de fluorescence de la protéase.

## The Effect of Mutant Peptide Cofactors on Adenovirus Protease Activity and Virus Infection

Angelique Ruzindana-Umunyana, Sucheta Sircar, and Joseph M. Weber<sup>1</sup>

*Departement de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculte de Medecine, Universite de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec J1H 5N4, Canada*

*Received December 3, 1999; returned to author for revision January 4, 2000; accepted February 15, 2000*

Adenoviruses encode a cysteine protease, adenain, required for uncoating and virion maturation. Adenain activity is regulated by an 11-amino-acid peptide cofactor thiol-bonded distal to the active site. Structural and experimental data suggest that the peptide might stabilize adenain in an optimal conformation for enzyme activity by bridging two noncontiguous regions of the molecule. The sequence requirements for this mechanism were examined both *in vitro* and *ex vivo* by means of mutant peptides and databank analysis. The results of *in vitro* experiments suggested that activation is not an all or nothing mechanism. With the exception of the smallest peptide, the mutant peptides bound to adenain, activated it, and competed with the wild-type peptide, but all of this occurred with reduced efficiency. When added to the medium of infected cells, most of the peptides inhibited infectious virus production to varying degrees in a dose-dependent manner and in accordance with their *in vitro* activity on adenain. We interpret this inhibition to be due to unscheduled adenain activation. Examination of the activation peptide sequences from 19 adenovirus serotypes revealed a limited number of conserved sequence features. These features were in agreement with the experimental data. We conclude that binding and activation of adenain by pVIc may be reversible and this reversibility may be an integral aspect of the *in vivo* regulation of enzyme activity in the course of virus assembly. The peptide cofactor binding domain is therefore a potential target for the development of anti-adenoviral agents. © 2000 Academic Press

**Key Words:** adenovirus type 2; cysteine protease; peptide inhibitors.

### INTRODUCTION

Aside from very simple viruses, most viruses encode at least one virus-specific endopeptidase (Krausslich and Wimmer, 1988; Babe and Craik, 1997; Patick and Potts, 1998). In addition to fragmentation of polyproteins of RNA viruses, these proteases may be responsible for the suppression of host protein synthesis, the regulation of virus assembly, and cell lysis, in both RNA and DNA viruses. The adenovirus endopeptidase (AVP or adenain) appears to be involved in several of these functions (Weber, 1995, 1999). AVP is required for entry into host cells (Cotten and Weber, 1995; Greber *et al.*, 1996) and for the synthesis of infectious virus (Weber, 1976; Rancourt *et al.*, 1995). The integral enzyme is packaged into virions, possibly in association with the viral DNA via four large clusters of positive charge (Ding *et al.*, 1996). The ts1 mutation (P137L) of human adenovirus type 2 (Ad2) prevents encapsidation of AVP, resulting in unprocessed immature virions that fail to uncoat in a subsequent infection cycle (Mirza and Weber, 1979; Miles *et al.*, 1980). All of the seven viral precursor proteins are at least partially disposed internally in the virion; however, the order of cleavages and their relationship to virus assembly remain unclear (Stewart and Burnett, 1995). It may be inferred that the basal activity of the enzyme is

somehow blocked until after encapsidation when AVP makes contact with the pVI capsid protein. Cleavage of the C-terminal 11 residues of pVI results in the attachment of this peptide (referred to as pVIc) to AVP and gaining of full enzyme activity (Mangel *et al.*, 1993; Webster *et al.*, 1993).

AVP is a single-chain protein of 201–214 amino acids, depending on the virus serotype. It is a very basic protein (*pI* 10.2) without disulfide bonds or any known post-translational modifications (Tihanyi *et al.*, 1993; Weber and Tihanyi, 1994). The active site triad is composed of H54, E71 (or D71 in many serotypes), and C122, in a spatial disposition identical to that of the active site triad of papain (Ding *et al.*, 1996; Weber, 1999). Weak sequence similarities to AVP have recently been detected in the disposition of the active site residues in a diverse and widespread group of cysteine proteases including African swine fever virus, vaccinia virus, fowlpox virus, and the Ubl-specific proteases of yeast and *Chlamydia* (Li and Hochstrasser, 1999). Furthermore, most of these proteases hydrolyze precursors at consensus sites that match or are closely related to Gly-Gly-X (Lopez-Otin *et al.*, 1989; Lee and Hruby, 1994).

The atomic structure of the Ad2 protease (rAVP) complexed with this 11-residue peptide cofactor by means of a disulfide bond between C10' and C104 raises some interesting questions (Ding *et al.*, 1996). Binding is far from the active site pocket but it appears to cause a shift in conformation as measured by increased tryptophan

<sup>1</sup>To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (819) 564-5326. E-mail: [j.weber@courrier.usherb.ca](mailto:j.weber@courrier.usherb.ca).



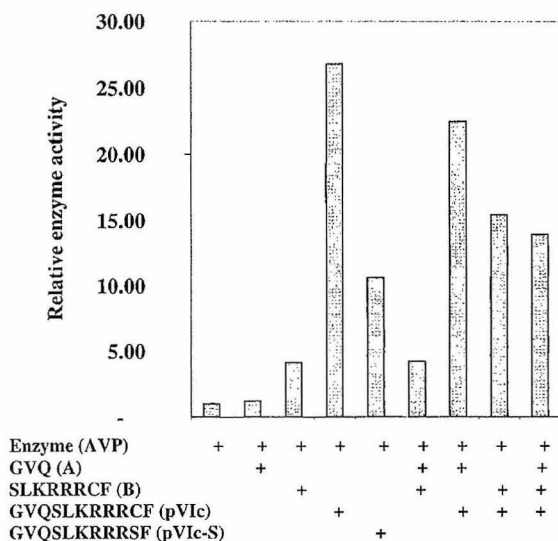


FIG. 1. The effect of truncated activating peptides on protease activity *in vitro*. The reaction mixtures contained 1  $\mu\text{g}$  of rAVP, 3.3  $\mu\text{M}$  R110 fluorescent peptide substrate, and a 40  $\mu\text{M}$  concentration of the indicated peptides. Reactions were incubated overnight. The fluorescence units of the cleaved substrate represent the mean of seven experiments done on two batches of enzymes and are normalized such that the protease activity in the absence of activating peptides is 1 (first column). Experimental variation was less than 5%.

fluorescence (Jones *et al.*, 1996; Diouri *et al.*, 1996). This may be a result of bringing together two noncontiguous regions of AVP by the binding of residues 1'–3' (GVQ) to  $\beta$ -strand S7 and the binding of residues 4'–11' (SLKRRRCF) to  $\beta$ -strand S5 (Ding *et al.*, 1996). In this communication we address this mechanism of enzyme activation both *in vitro* and *ex vivo* by attempting to determine the relative importance of the disulfide bond and the two contact points between enzyme and activating peptide.

## RESULTS

### Enzyme activation by mutant peptides

The crystal structure of AVP with its activating peptide (pVIc) showed that the first three residues (GVQ) of pVIc bind strongly on or near  $\beta$ -strand S7, while residues 4'–10' interact with  $\beta$ -strand S5, thus bridging two noncontiguous regions of AVP (Ding *et al.*, 1996). This, it was proposed, could alter the conformation of the active site and increase the  $k_{\text{cat}}$ . To study the activation mechanism and to test this proposal, two peptides were prepared, GVQ and SLKRRRCF, corresponding to the human Ad2 pVIc sequence, and tested for their effect on AVP activity. Figure 1 shows that the basal activity of the enzyme was unaffected by GVQ, was tripled by SLKRRRCF, and was increased 25-fold by the full-length pVIc. Clearly, the second peptide exerted a reproducible and significant stimulating effect on enzyme activity. Adding a mixture of the two peptides did not result in complementation, as the level of enzyme activity remained the same as with

the second peptide alone. When either peptide was added individually or together to the enzyme reaction in the presence of full-length pVIc, enzyme activity was reduced in comparison to adding pVIc alone. The simplest interpretation of this effect would be competition for the binding sites on the enzyme by the truncated peptides. These results also suggest that for maximum enzyme activity the pVIc residues must be present in a contiguous peptide.

The pVIc residue C10' forms a disulfide bond with C104 of AVP. To test the importance of this bond to enzyme activation, pVIc was compared with a peptide in which C10' was replaced by Ser (pVIcS). The results show 50% less enzyme activity with the mutant peptide (Figs. 1 and 2). Therefore, at least *in vitro*, the absence of the thiol bond did not abolish activation completely.

All of the above experiments were carried out with a synthetic peptide substrate. To minimize potential artifacts we repeated these experiments using as substrate disrupted ts1 virions that contain all of the viral precursor proteins. These virions do not contain AVP, but as a precaution this substrate was heat-inactivated. Figure 3 shows the results of a typical experiment. Focusing on the cleavage of the major core protein pVII to VII, the results clearly confirm those obtained with the synthetic peptide substrate. For easy comparison, all of the results are summarized in Table 1. It should be noted that for technical reasons the virus protein substrate assay is not as sensitive as the synthetic peptide substrate assay. Furthermore, no differences were noted between the different N-terminal and C-terminal forms of the peptides. In addition, as all of the peptides were soluble in water, the differences in activities cannot be attributed to differences in peptide solubilities.

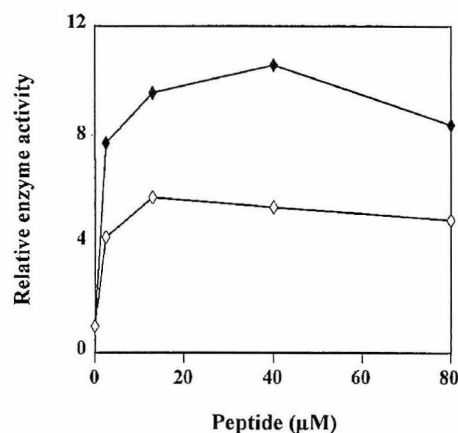


FIG. 2. The effect of pVIc ( $\blacklozenge$ ) and pVIc-S ( $\diamond$ ) on protease activity *in vitro*. The reaction mixtures contained 1  $\mu\text{g}$  of rAVP, 3.3  $\mu\text{M}$  R110 fluorescent peptide substrate, and different concentrations of peptides ranging from 2.5 to 80  $\mu\text{M}$ . Reactions were incubated for 4 h. The fluorescence units of the cleaved substrate represent the mean of six experiments done on two batches of enzyme and are normalized such that the basic protease activity is 1. The variation was less than 5%.



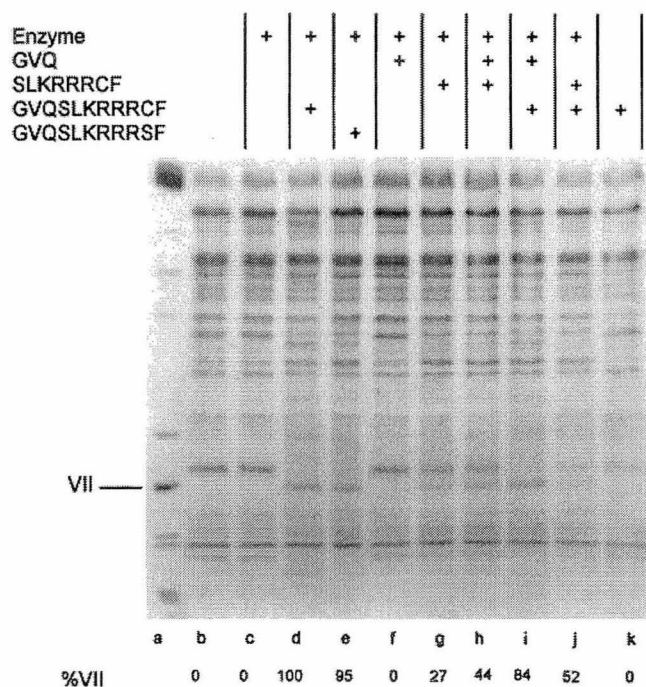


FIG. 3. The effects of peptides A, B, pVlc, and pVlc-S on the digestion of adenovirus proteins by rAVP. The reaction mixtures contain  $^{35}\text{S}$ -labeled ts1 proteins (10  $\mu\text{g}$  of protein pVII), 0.5  $\mu\text{g}$  of AVP, and with or without 40  $\mu\text{M}$  peptides. Reactions were incubated at 37°C for 18 h, stopped by boiling in lysing solution, subjected to SDS-PAGE, and autoradiographed. The extent of cleavage of pVII (% VII) was evaluated by densitometry. Lane a, [ $^{35}\text{S}$ ]Met-labeled Ad2 marker virus; lane k, substrate incubated with pELF as a control.

### Some peptides induce a conformational change in AVP

It has been shown that the binding of pVlc to AVP increases tryptophan fluorescence, suggesting a confor-

TABLE 1

The Effect of Peptides on Enzyme Activity: Comparison of the Normalized Results Obtained with Two AVP Substrates

Peptides	Relative enzyme activity (%)	
	R110 peptide substrate	pVII substrate (% VII)
—	8	0
GVQ	8	0
SLKRRRCF	12	47
GVQSLKRRRCF	100	100
GVQSLKRRRSF	41	72
GVQ + SLKRRRCF	12	44
GVQ + GVQSLKRRRCF	85	91
SLKRRRCF + GVQSLKRRRCF	55	45
GVQ + SLKRRRCF + GVQSLKRRRCF	52	30

Note. These data are derived from experiments described in the legends to Figs. 1 and 3, and the values shown are the means of seven (R110 substrate) and three (pVII substrate) experiments, respectively. Variation from the mean did not exceed 5%.

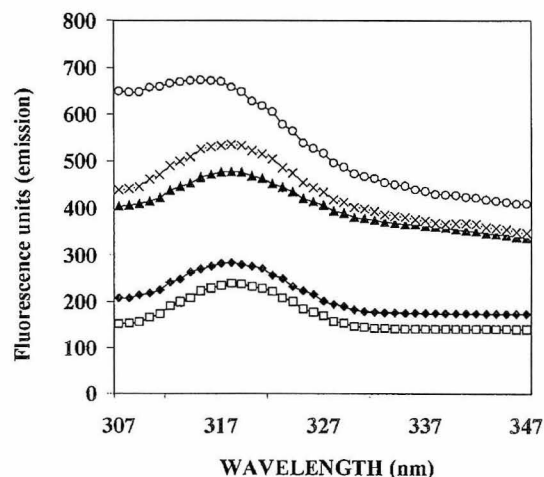


FIG. 4. The effect of peptides on the fluorescence of the protease. Tryptophan fluorescence emission spectra were measured from 300 to 350 nm with excitation at 280 nm using a Hitachi F2000 spectrometer. 40 pmol of rAVP alone ( $\square$ ) and in the presence of 40  $\mu\text{M}$  peptides GVQ ( $\blacklozenge$ ), SLKRRRCF ( $\blacktriangle$ ), GVQSLKRRRSF ( $\times$ ), and GVQSLKRRRCF ( $\circ$ ).

mational change that enhances enzyme activity (Jones *et al.*, 1996; Diouri *et al.*, 1996). A multiple alignment of 17 AVP sequences shows two partly conserved tryptophan residues at positions 60 and 136 and a strictly conserved tryptophan at position 55, adjacent to the active site histidine H54. Figure 4 shows the fluorescence emission spectrum of AVP alone and AVP in the presence of the different forms of the pVlc peptides. Peptide A had very little effect, but peptides B and pVlcS significantly increased tryptophan fluorescence, although remaining less than that induced by pVlc. This suggests that peptides B and pVlcS may still bind to AVP, though less efficiently; this would be in agreement with the partial stimulation of enzyme activity observed above.

### The effect of peptides on virus growth

We have previously shown that the addition of pVlc to the culture medium inhibits virus growth (Rancourt *et al.*, 1995). The nature of the results led us to suggest that pVlc activated AVP prematurely, that is, prior to encapsidation, thereby disturbing virus assembly. This experiment was repeated here with peptides A, B, and pVlcS (Fig. 5). Consistent with the *in vitro* results above, peptide A had no discernible effect on virus growth, while peptides B and pVlcS caused a dose-dependent reduction in the yield of infectious virus, attaining a reduction of up to two orders of magnitude at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  peptide. Therefore, both the truncated pVlc (peptide B) and the serine substituted pVlcS peptide retained some of the biological activity of pVlc with respect to the inhibition of virus growth.

If virus growth was inhibited by the unscheduled or premature activation or improper activation of the viral protease, then one measurable consequence could be the reduced conversion of core protein pVII to VII. To test

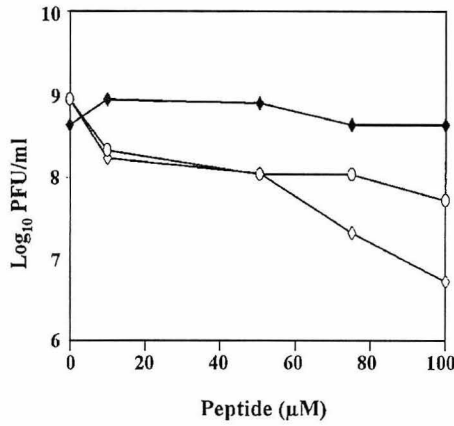


FIG. 5. The effect of peptides on infectious virus synthesis. HEp2 cells were infected with Ad2 and exposed to different concentrations of peptides in the medium. At 48 h postinfection the virus yield was titrated. GVQ peptide (◆); SLKRRRCF peptide (◇); GVQSLKRRRSF (○).

this, infected cells were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]Met and chased in the presence of different concentrations of peptide A (control) or B in the culture medium. The cell lysates were subjected to SDS-PAGE followed by autoradiography and the proportion of cleavage product was determined. The results bear out the prediction (Fig. 6). However, reduced virus growth and precursor cleavage could also be due to nonspecific toxicity by peptide B. To examine this possibility the cell lysates from an identical experiment were used to purify virions. The total particle yield, as measured by optical density of the purified virion bands at 1.34 g/ml, was the same regardless of the presence of peptide B, showing the absence of toxic effects as far as virion assembly was concerned. To examine the state of maturity of these viruses, the material was subjected to SDS-PAGE and stained with silver (Fig. 7). The quantitatively similar viral protein pat-

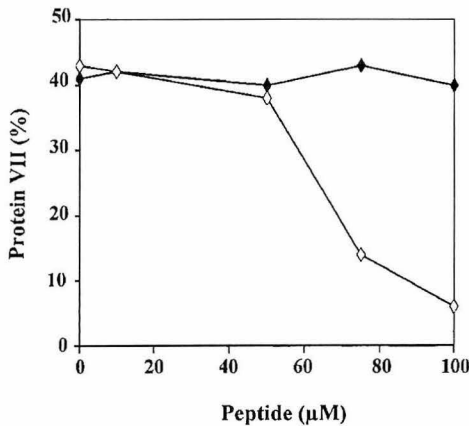


FIG. 6. The effect of peptides GVQ (◆) or SLKRRRCF (◇) on the cleavage of virus protein PVII in infected cells. HEp2 cells were infected with Ad2, pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine at 23–24 h, and then chased in the presence of different concentrations of the peptides for 18 h. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE and autoradiographed and the percentage of protein VII, relative to its precursor, was determined by densitometry.

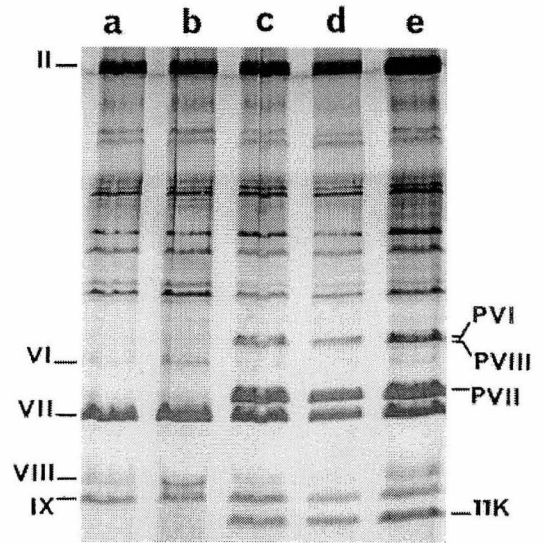


FIG. 7. The effect of peptide SLKRRRCF on virion maturation. HEp2 cells were infected with Ad2 and at 18 h after infection different concentrations of the peptide were added to the medium. At 48 h postinfection the virions were purified, subjected to SDS-PAGE, and stained with silver. Lane a, no peptide; lane b, 10 µM; lane c, 100 µM; lane d, 125 µM; lane e, 150 µM.

terns confirm the above assertion that the yield of virus particles was unaffected. Peptide B concentrations of 50 µM and above inhibited precursor processing as shown by the presence of precursors PVI, PVIII, PVII, and 11K (Fig. 7). Indeed the effect of peptide B resembles the ts1 phenotype when approaching the restrictive temperature (Weber, 1976; Rancourt *et al.*, 1995). These results are consistent with the specific disturbance of normal AVP functioning by peptide B, presumably by the improper activation of the enzyme.

All of the above experiments were conducted with both C-terminal forms of the peptides, that is, the acetyl-peptide-amide and acetyl-peptide-hydroxyl forms. These minor differences in peptide structure had no observable effect on the data.

DISCUSSION

The experiments described here confirm and extend previous reports on the stimulation of adenovirus protease (adenain) activity by the pVIc peptide. Following up on the suggestion by Ding *et al.* (1996) that the crystal structure of adenain shows two contact points between the enzyme and pVIc, we tested the importance of the contiguity of the pVIc peptide. The basal activity of adenain was unaffected by the N-terminal GVQ peptide, but it was stimulated 3-fold by the C-terminal SLKRRRCF fragment of pVIc compared to a 25-fold stimulation by full-length pVIc. Furthermore, the larger peptide fragment was measurably inhibitory on pVIc stimulation of adenain activity. Similar results were obtained whether the substrate was peptide or viral precursor proteins. These

to adenain and that this binding is sufficient to partly mimic the effect of pVlc. Surprisingly, the replacement of C10' by serine (pVlcS) reduced adenain activity by only half.

The present *in vitro* results are generally in agreement with those reported by Cabrita *et al.* (1997), although these authors observed neither binding nor activity by the serine substituted peptide (pVlcS). The discrepancy could be due to experimental differences, particularly differences in the measurement of enzyme activity. It should be noted that we obtained our results with the pVlcS peptide from their laboratory and that a locally produced pVlcS peptide gave identical results. Another factor that might explain the differences between our adenain activity results and those of Cabrita *et al.* (1997) is the enzyme to peptide ratio. In our experiments we used either a varying ratio (Fig. 2) or a 1:100 ratio, while in the report by Cabrita *et al.* (1997) a ratio of 1:370 was used. In our experience, such high enzyme to peptide ratios resulted in suboptimal stimulation of adenain activity.

The results were also consistent with the proposed function of pVlc, namely, to bind together two minidomains of adenain, thereby stabilizing the catalytic apparatus in the optimum conformation (Ding *et al.*, 1996; Cabrita *et al.*, 1997). That this is not an all or nothing mechanism is indicated by the observation that stabilization appears to be at least partly achieved even in the absence of the N-terminal three residues or the thiol bond.

The overall sequence requirements for cleavage of the pVlc peptide from the pre-VI capsid protein and activation of adenain was also examined by alignment of the C-terminal 15 residues from current databanks (Fig. 8). Several interesting features emerge: (1) the adenain consensus cleavage site and the length of the pVlc peptide and the C10' are absolutely conserved; (2) the C-termini are aromatic residues F and Y, with a preponderance of Y; (3) the second residue is either of the two branched methyl group residues V or L; (4) the third to fifth residues are highly variable and may serve only to maintain the proper distance between the two terminal regions of pVlc (i.e., between GV or GL and CY); and (5) the string of four basic residues adjacent to C10' are not conserved in a minority of serotypes. The reduced or total absence (as in the avian hemorrhagic enteritis virus (HEV) of basic residues next to C10' was puzzling, as these positively charged residues might be expected to have a regulatory role in virus infection by destabilizing the thiol bond, thereby moderating adenain catalytic activity and keeping it in register with virus assembly and maturation. Examination of the adenain sequences between positions 103 and 108, the region in contact with pVlc, revealed the following: (1) with one exception (BAV-3), positions 103 and 109 are always basic and (2) the absence of a basic residue near C10' is compensated for in avian

Human type	2	I	V	G	L	G	V	Q	S	L	K	R	R	R	C	F			P03274
Human type	5																		P24937
Human type	12									K							Y		P35988
Human type	31									K							Y		U14563
Human type	40									K							Y		P48309
Human type	41									K							Y		P16139
Mouse type	1	M				L	P	I											P48310
Canine type	1			V		L	S	N	V										Q96686
Canine, Toronto	2			V		L	S	N	V										U77082
Bovine type	3					R	T	V									Y		AF030154
Porcine type	3(6618)					R	T	C									Y		AF083132
Equine type	1					L	H	G	V										L79955
Equine type	2					A							G						L80007
Ovine type	287	M	T	D		N	F	N	T					Y	Y				U40837
Avian type	1	L	S	T		A	T	A	T					M	Y				U46933
Avian EDSV		M		D		R	Y	G	S	Q				Y	Y				Y09598
Fowl	10	L	S	T		N	V	S	S					L	Y				U26221
Avian HEV		M	L	Q		R	F	T	S	T	N	Q			Y				AF074946
Human clinical isolate									V										AJ005537

FIG. 8. Alignment of C-terminal residues of adenovirus capsid protein pVI. Sequences are from SWISSPROT release 35 or translated from EMBL databases with corresponding accession numbers. Only the residues that diverge from the human type 2 sequence are noted. Avian egg drop syndrome virus, avian hemorrhagic enteritis virus, and the human clinical isolate are not serotyped. The arrow indicates the site of cleavage by the adenovirus protease.

HEV by a basic residue (K) in the corresponding region of adenain. It appears that between pVlc and adenain a minimum of three basic residues are required in this contact region between the two molecules.

We have previously shown that the pVlc peptide functions as an inhibitor of infectious virus production in tissue culture (Rancourt *et al.*, 1995). Here we showed that this activity is partly maintained by the mutant peptides. The inhibition of infectious virus production was dose-dependent. Surprisingly, at the highest peptide concentration, even GVQ (peptide A) showed some inhibition of virus production in some experiments. The inhibitory effect on infectious virus production did not appear to operate through toxicity on the cell, but rather through the specific inhibition of processing of the capsid precursor proteins. Because these peptides (except GVQ) retained some functionality of pVlc in stimulating adenain activity *in vitro*, and also in competing with pVlc for the binding site on the enzyme, we might speculate that the observed decrease in processing and infectious virus production in the *ex vivo* experiments was due to the disturbance of the normal schedule of adenain activation in conjunction with virion assembly. Premature activation of adenain by the peptides added to the culture medium could prevent its proper encapsidation and normal activation pathway by means of capsid protein pVI. These results therefore confirm the pVlc binding domain as a potential target for the development of anti-adenoviral agents.

Our results and those of others, combined with the sequence features detailed above, suggest that the binding and activation of adenain by pVlc may be reversible and this reversibility may be an integral aspect of the *in vivo* regulation of enzyme activity in the course of virus assembly and maturation.

## MATERIALS AND METHODS

### Virus and cells

Human Ad2 was grown and titered in monolayer cultures of HEp2 cells using Dulbecco's modified minimum essential medium (DMEM) supplemented with 2.5% calf serum. To harvest virus, infected cells were washed once in DMEM without serum and rapidly frozen and thawed four times. These cell lysates were clarified by low-speed centrifugation and titered by plaque formation or end-point dilution. Virus was purified by equilibrium density gradient centrifugation in CsCl, the visible band at 1.34 g/ml density was collected from the top, the optical density was determined, and the virus was dialyzed. The experiments in infected cells were carried out as follows: 18 h after infection, the medium was removed and the peptides were added in concentrated form in 100  $\mu$ l of DMEM for 15 min to facilitate cellular uptake, followed by the addition of 4 ml of fresh medium (per 4-cm-diameter petri dish) to achieve the final effective peptide concentration.

### Peptides

The complete pVlc peptide (GVQSLKRRRCF) and the two fragments [acetyl-GVQ-amide (A) and acetyl-SLKRRRCF-amide (B)] were synthesized by BioSynthesis, Inc. (Lewisville, TX). The peptide fragments A and B were also synthesized as acetyl-GVQ-hydroxyl and acetyl-YS-LKRRRCF-hydroxyl, respectively, by W. Neugebauer (Institute of Pharmacology). The modified pVlc peptide (pVlcS), GVQSLKRRRSF, was a generous gift from G. Kemp (University of St. Andrews, Scotland) and was also synthesized by W. Neugebauer. All peptides were dissolved in TE buffer and verified by mass spectrometry.

### Enzyme assays

Recombinant adenovirus type 2 protease was purified by chromatography from an *Escherichia coli* expression system (pLPV) as described previously (Keyvani-Amineh *et al.*, 1995). This enzyme has 14 foreign amino acids fused to the N-terminus. Activity was measured with a fluorescent peptide substrate, R110 [rhodamine 110, bis-(L-leucyl-L-arginylglycylglycine amine)tetrachloride, purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR)], essentially as described previously (Diouri *et al.*, 1995). The reaction mixture contained TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA), 1  $\mu$ g of rAVP, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 40  $\mu$ M pVlc (oxidized activating peptide GVQSLKRRRCF)

peptide or its mutated forms. The mixture was incubated for 30 min at 37°C before the addition of the substrate, R110 (3.3  $\mu$ M), in a total volume of 300  $\mu$ l. Incubation was continued for 18 h and the fluorescence was measured. The fluorescence measurements were done on a Hitachi F2000 fluorescence spectrophotometer using excitation at 498 nm and emission at 521 nm with a 1-cm path-length quartz cuvette and a bandpass of 10 nm for both excitation and emission. As demonstrated previously, this assay was linear with time and amount of protease (Diouri *et al.*, 1995).

Protease activity was also measured by the conversion of viral polypeptide pVII to VII by means of SDS-PAGE and autoradiography. Precursor protein pVII was prepared by disrupting [<sup>35</sup>S]Met-labeled ts1 virus particles produced at 39°C (Tremblay *et al.*, 1983). The reaction mixture (generally 40  $\mu$ l) contained 10  $\mu$ l substrate and 10  $\mu$ l enzyme in TE. Incubation was carried out at 37°C for 18 h.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT4164) to J.M.W. We thank Lise Imbeault for technical assistance.

## REFERENCES

- Babe, L. M., and Craik, C. S. (1997). Viral proteases: Evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell* **91**, 427-430.
- Cabrita, G., Iqbal, M., Reddy, H., and Kemp, G. (1997). Activation of the adenovirus protease requires sequence elements from both ends of the activating peptide. *J. Biol. Chem.* **272**(9), 5635-5639.
- Cotten, M., and Weber, J. M. (1995). The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology* **213**, 494-502.
- Ding, J., McGrath, W. J., Sweet, R. M., and Mangel, W. F. (1996). Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid factor. *EMBO J.* **15**, 1778-1783.
- Diouri, M., Geoghegan, K. F., and Weber, J. M. (1995). Functional characterization of the adenovirus proteinase using fluorogenic substrates. *Protein Peptide Lett.* **6**, 363-370.
- Diouri, M., Girouard, S. G., Allen, C. M., Sircar, S., Van Lier, J. E., and Weber, J. M. (1996). New stimulation ligand of adenovirus 2 protease. *Virology* **224**, 510-516.
- Greber, U. F., Webster, P., Weber, J., and Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *EMBO J.* **15**, 1766-1777.
- Jones, S. J., Iqbal, M., Grierson, A. W., and Kemp, G. (1996). Activation of the protease from human adenovirus type 2 is accompanied by a conformational change which is dependent on cysteine-104. *J. Gen. Virol.* **77**, 1821-1824.
- Keyvani-Amineh, H., Labrecque, P., Cai, F., Carstens, E. B., and Weber, J. M. (1995). Adenovirus protease expressed in insect cells cleaves adenovirus proteins, ovalbumin and baculovirus protease in the absence of activating peptide. *Virus Res.* **37**, 87-97.
- Krausslich, H.-G., and Wimmer, E. (1988). Viral proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 701-754.
- Lee, P., and Hruby, D. E. (1994). Proteolytic cleavage of vaccinia virus virion proteins. Mutational analysis of the specificity determinants. *J. Biol. Chem.* **269**, 8616-8622.
- Li, S., and Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* **398**, 246-251.
- Lopez-Otin, C., Simon-Mateo, C., Martinez, L., and Vinuela, E. (1989).

- Gly-Gly-X, a novel consensus sequence for the proteolytic processing of viral and cellular proteins. *J. Biol. Chem.* **264**, 9107–9110.
- Mangel, W. F., McGrath, W. J., Toledo, D. L., and Anderson, C. W. (1993). Viral DNA and a viral peptide can act as cofactors of adenovirus virion proteinase activity. *Nature* **361**, 274–275.
- Miles, B. D., Luftig, R. B., Weatherbee, J. A., Weihing, R. R., and Weber, J. (1980). Quantitation of the interaction between adenovirus types 2 and 5 and microtubules inside infected cells. *Virology* **105**, 265–269.
- Mirza, M. A., and Weber, J. (1979). Uncoating of adenovirus type 2. *J. Virol.* **30**, 462–471.
- Patick, A. K., and Potts, K. E. (1998). Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 614–627.
- Rancourt, C., Keyvani-Amineh, H., Sircar, S., Labrecque, P., and Weber, J. M. (1995). Proline 137 is critical for adenovirus protease encapsidation and activation but not enzyme activity. *Virology* **209**, 167–173.
- Stewart, P. L., and Burnett, R. M. (1995). Adenovirus structure by X-ray crystallography and electron microscopy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/1**, 25–38.
- Tihanyi, K., Bourbonnière, M., Houde, A., Rancourt, C., and Weber, J. M. (1993). Isolation and properties of the adenovirus type 2 proteinase. *J. Biol. Chem.* **268**(3), 1780–1785.
- Tremblay, M., Dery, C., Talbot, B., and Weber, J. M. (1983). In vitro cleavage specificity of the adenovirus type 2 proteinase. *Biochim. Biophys. Acta* **743**, 239–245.
- Weber, J. M. (1976). Genetic analysis of adenovirus type 2. III. Temperature sensitivity of processing of viral proteins. *J. Virol.* **17**, 462–471.
- Weber, J. M. (1995). The adenovirus endopeptidase and its role in virus infection. In "Molecular Repertoire of Adenoviruses," Vol. 199/1, Current Topics in Microbiology and Immunology, (W. Doerfler and P. Bohm, Eds.), pp. 227–235, Springer-Verlag, Berlin.
- Weber, J. M. (1999). Role of endopeptidase in adenovirus infection. In "Adenoviruses: From Basic Research to Gene Therapy Applications" (P. Seth, Ed.), Humana Press, Clifton, NJ.
- Weber, J. M., and Tihanyi, K. (1994). Adenovirus endopeptidases. *Methods Enzym.* **244**, 595–604.
- Webster, A., Hay, R. T., and Kemp, G. (1993). The adenovirus protease is activated by a virus-coded disulphide-linked peptide. *Cell* **72**, 97–104.

## ARTICLE III

Ruzindana-Umunyana, A. and Weber, J.M.(2001).

Interactions of Human Lacrimal and Salivary Cystatins with Adenovirus Endopeptidase. Antiviral Research 51, 203-214.

### *Préambule*

Avec ce troisième manuscrit, nous présentons les résultats relatifs aux cystatins purifiées à partir de liquides biologiques et testées sur l'activité de l'adenain. Des paramètres cinétiques de liaison sont déterminés par des expériences d'immunoprécipitations et permettent de caractériser le type de liaison se produisant entre l'adenain et les cystatins humaines. Les résultats publiés dans cet article découlent entièrement de mon travail.

# Interactions of human lacrimal and salivary cystatins with adenovirus endopeptidase

Angelique Ruzindana-Umunyana, Joseph M. Weber \*

*Departement de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculte de Medecine, Universite de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4*

Received 12 February 2001; accepted 7 May 2001

## Abstract

Over 100 serotypes of adenoviruses have been implicated in a variety of human and domesticated animal pathologies and some serotypes are widely used as gene transfer vectors. Aside from the limited use of vaccines for specific serotypes, little effort has been expended in the development of antivirals. The objective here was to study the effect of cystatins from human saliva (CS) and tears (CT), two points of viral entry, on adenain, the adenovirus type 2 encoded proteinase, which is absolutely required for infectivity. Two molecular weight species (13 and 14.5 kDa) were purified from both fluids at a yield of 5 mg/l. In vitro adenain activity was inhibited to 50% at a molar ratio of 5 CS:1 adenain and 3 CT:1 adenain. By comparison, papain was inhibited to 50% at a molar ratio of 2 CS:1 papain and 1.5 CT:1 papain. Adenain differed from papain in response to CS and chicken egg white (CEW) cystatin in being stimulated at low concentrations, and in being inhibited only at very high concentrations of cystatins. The presence of cleavage consensus sites specific to adenain in the human cystatins could drive the adenain–cystatin interaction predominantly in the substrate pathway direction. However, we found that the cystatins could only be digested after denaturation and by highly active fresh enzyme preparations. Our experiments designed to test the nature of the interaction between adenain and cystatins suggest a docking model for the adenain–human cystatin interaction, similar to that proposed for papain and CEW. At equilibrium the dissociation constant,  $K_d$ , between adenain and CT was 1.2 nM. The kinetic parameters determined here suggest a simple reversible mechanism for the inhibition of adenain by human cystatins. We conclude that the cystatins present in tears and saliva are unlikely to play a significant role in inhibiting adenovirus infections. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Adenovirus type 2; Adenain; Papain; Cystatins

## 1. Introduction

Adenoviruses are implicated in a variety of human and domesticated animal pathologies and are currently under intensive investigation as gene transfer vectors (Horwitz, 1996; Qualikene et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +1-819-564-5326; fax: +1-819-564-5392.

*E-mail address:* j.weber@courrier.usherb.ca (J.M. Weber).

2000; Wickham, 2000; Doronin et al., 2001). So far very little effort has been directed towards the development of antiviral strategies (De Clercq, 1993; Cornish et al., 1995; Sircar et al., 1996, 1998; Mentel et al., 1997). To partly fill this hiatus, the objective of the present investigation was to explore the potential inhibitory activity of the cystatins present in two biological fluids, saliva and tears which are at two common points of viral entry, towards the adenovirus endopeptidase, in comparison with the well characterized interaction between papain and chicken egg white (CEW) cystatin.

The human adenovirus 2 endopeptidase (adenain) is a 204 amino acid monomer of 24,838 Da and a member of the cysteine proteinase family (reviewed in Weber, 1999). Adenain complexed with its activating peptide has a  $K_m$  of 5 mM and its activity is optimal at pH 8 and 45 °C in the presence of 1 mM thiol compounds and positively charged polymers. The geometric disposition of the active site residues (H54, E/D71, C122) is identical to that of papain (H159, N175, C25) and so is the location of Q115 of adenain and Q19 of papain (Ding et al., 1996). In consequence some papain inhibitors also inhibit adenain (Sircar et al., 1998). The enzyme is specific for two consensus sites (M, I, L) XGG-X or (M, I, L) XGX-G, where X is any amino acid. A group of proteinases with similar substrate specificity and related structures includes the cysteine proteinases of African swine fever virus, vaccinia virus, fowlpox virus, and the Ubl-specific proteinases of yeast and Chlamydia (Lopez-Otin et al., 1989; Li and Hochstrasser, 1999). Adenovirus maturation, infectivity and uncoating are dependent on proper adenain activity, suggesting that the viral proteinase is an appropriate target for the development of antivirals.

The endogenous cysteine proteinase inhibitors represent the final level at which cysteine proteinase activity can be regulated (Rawlings and Barrett, 1994; Lah and Kos, 1998). Various endogenous cysteine proteinase inhibitors are found in body fluids and tissues of animals and plant seeds. Animal cysteine proteinase inhibitors belong to the protein superfamily, cystatins (Brzin et al., 1984). Generally, cystatins do not form a covalent bond with cysteine proteinases, but instead cover the active site cleft blocking access to the active site.

Physiological inhibitors that are specific for cysteine proteinases structurally related to papain all belong to the cystatin superfamily. Cystatins are tight binding, reversible inhibitors that may be subdivided in three main families of increasing structural complexity (Barrett, 1987; Barrett et al., 1986). Two low molecular weight cysteine proteinase inhibitors, cystatin A and cystatin B also called stefins, have been isolated from human skin, liver and granulocytes (Järvinen and Rinne, 1982; Ritonja et al., 1985). Two more low molecular weight inhibitors, cystatins S and SA, have been isolated from urine, blood serum (Brzin et al., 1984) and saliva (Isemura et al., 1984). Two high molecular weight cysteine proteinase inhibitors, also called kininogens, such as  $\alpha_2$ -macroglobulin and kininogen, have been isolated from blood plasma and urine (Sueyoshi et al., 1985; Abrahamson, 1994).

The exact mechanism of inhibition which is related to a docking model is not yet fully understood, but there is evidence that several highly conserved fragments in the molecule are involved (Bode et al., 1988; Abrahamson, 1994). One or more of these conserved cystatin fragments behave in a substrate-like manner and rapidly interact with their target enzymes (Serveau et al., 1994; Turk et al., 1998). The crystal structure of papain complexed with the cystatin from egg white revealed three contact points (Machleidt et al., 1989). First, the N-terminal region which contains Gly, an absolutely conserved residue on position 9 in the case of CEW, is directed towards the opposite and narrower part of the active site cleft of the enzyme, which includes the substrate binding regions S1–S3. This segment does not interact with Cys25 of the papain active site but partially blocks it. Second and third, two  $\beta$ -hairpin loops have the appropriate shape and size to fill the more open part of the active site of papain which represent its putative S1'–S2' subsites (Machleidt et al., 1989). The first  $\beta$ -hairpin contains the highly conserved sequence QXVXG (mainly QLSVG or QVVAG) and the second  $\beta$ -hairpin contains the absolutely conserved PW at position 103 and 104, respectively, in the case of CEW (Auerswald et al., 1992). A X-ray crystallographic analysis of human salivary cystatins was published by Ramasubbu et al. (1996) and is consis-



tent with the docking model proposed previously (Bode and Huber, 1992, 1994; Bode et al., 1990; Katunuma and Kominami, 1995).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Enzymes and assays

Recombinant adenovirus type 2 proteinase (Adenain; EC3.4.22-) was purified by chromatography from an *Escherichia coli* expression system (pLPV) as described before (Keyvani-Amineh et al., 1995). Enzyme activity was measured with a fluorescent peptide substrate, R110, (rhodamine 110, bis-(L-leucyl-L-arginylglycylglycine amine) tetrachloride, purchased from Molecular probes, Inc. (4849 Pitchford Ave., Eugene, OR 97402), essentially as described before (Diouri et al., 1995). The reaction mixture contained TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)), 40  $\mu$ M pVIc (oxidized enzyme activating peptide GVQSLKRRRCF), 3.3  $\mu$ M R110, 1  $\mu$ g of adenain in a total volume of 300  $\mu$ l. Incubation was at 37 °C for 4 h and the fluorescence was measured.

Papain was purchased from Sigma and it was used at a concentration of 2.5  $\mu$ g and the buffer/activator contained 340 mM sodium acetate, 60 mM acetic acid, 4 mM disodium EDTA, pH 5.5. On the day the buffer/activator was to be used, 8 mM cysteine was added. Incubation with papain was at 37 °C for 18 h.

In the case of protein substrates (cystatin from saliva, CS, cystatin from tears, CT, cystatin from CEW or high molecular weight kininogen (HMWK)) unless otherwise indicated, the reaction mixture contained 1  $\mu$ g substrate which was boiled or not before reaction, 0.8  $\mu$ g adenain in a total volume of 60  $\mu$ l. The latter reactions were stopped by boiling in lysing solution.

Qualitative assays were done as described before with substrates of ts1 infected cell lysates labeled with <sup>35</sup>S-methionine at the non-permissive temperature (39 °C) at 24 h p.i. as a source of viral precursor proteins, particularly pVII (Keyvani-Amineh et al., 1995). Ts1 is defective for protease activity at 39 °C, consequently providing a ready source of viral precursor proteins. This substrate

was boiled to inactivate any residual adenain. The adenain was preincubated with inhibitors (CS, CT, CEW or HMWK) before substrate addition. Enzyme activities were assessed from the conversion of viral precursor protein pVII to VII as visualized on autoradiograms of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) separations.

### 2.2. Cystatins

CEW cystatin, HMWK and papain were purchased from Sigma. Cystatins from saliva (CS) were purified essentially as described by Isemura and Saitoh (1994), Isemura et al. (1991). Briefly, human whole saliva (10 ml per tube), in the absence of stimulation, was collected from three healthy female subjects into ice cooled test tubes containing 0.5 ml of a proteinase inhibitor solution (PIS; 500  $\mu$ g pAPMSF, 25  $\mu$ g phosphoramidon, 500  $\mu$ g trasylol, 1 mg NaF, 10 mg EDTA · 2Na in 0.5 ml of 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5). Four volumes of cold methanol were added to the 60 ml of pooled saliva and the precipitates formed were removed by filtration. Methanol was removed from the filtrate by evaporation under reduced pressure at 40 °C, and the residue was lyophilized. The lyophilized material was dissolved in bidistilled water and dialyzed against 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% inhibitor solution. After removing insoluble materials by centrifugation, the supernatant was applied to a DE52 column equilibrated with the same buffer. After washing, the proteins were eluted with an incremental NaCl gradient (10; 50 mM; 0.1; 0.2; 0.5 M). Fractions were monitored by SDS-PAGE and the purest fractions were dialyzed against 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 5% inhibitor solution.

Tears from a 30-year-old healthy female donor, in the absence of stimulation, were collected using capillary tubes and processed essentially as described by Barka et al. (1991). The tears were flushed out from the tubes with sterile bidistilled water and then precipitated with methanol. The latter was removed by evaporation under reduced pressure at 40 °C. After lyophilization the material was resuspended in 100  $\mu$ l of water. A mixture (400  $\mu$ l) of methanol-acetone (50:50) was then added and the preparation was kept at -20 °C

overnight. The material was dialyzed against TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) using Spectrapor membrane tubing (m.w. cutoff 6000–8000).

Tears were also collected by the Schirmer paper strip method (absence of stimulation) from two healthy adult volunteers (Kitaoka et al., 1985). The whatman papers were dried at room temperature before extraction of the tear components with nanopure water. After lyophilization, the material was resuspended in 200  $\mu$ l of water and dialyzed as described for the salivary cystatins. In order to protect cystatins against proteolytic breakdown, we have added an inhibitor cocktail PIS (5%) in the TE dialysis buffer. As blanks, extracts of the same size filter paper strips without tears were used. The purity of all the proteins and the protein concentration were determined by SDS-PAGE and the Bradford Assay, respectively, using bovine serum albumin (BSA) as standard.

### 2.3. Immunoprecipitation

Recombinant adenain (0.7  $\mu$ g) and  $^{125}$ I-labeled CS (iodogen method) or CT (1.5  $\mu$ g) was incubated at 37 °C for 10 min, then 10  $\mu$ l of anti-adenain antibodies or control non-immune serum were added in a total volume of 100  $\mu$ l and incubated at 0 °C for 1 h. The immune complexes were precipitated with protein A bound to Sepharose CL-4B beads by rotation at 4 °C overnight. The material was pelleted by centrifugation and washed five times with equal volumes of phosphate buffer saline (PBS), the washes being combined with the initial supernatant. The radioactivity in the pellets and supernatants were counted in a LKB 1282 CompuGamma. Anti-adenain was a polyclonal rabbit serum against the pLPV-produced purified recombinant enzyme.

### 2.4. Determination of equilibrium binding parameters

The binding of cystatins to adenain were studied under conditions of ligand excess, and were monitored by counting the  $\gamma$ -radiation in the immunoprecipitates.

The dissociation constant at equilibrium ( $K_d$ ) was determined by means of a ligand ( $^{125}$ I-CT) saturation curve showing specific binding as a function of free ligand concentration by varying the ligand concentrations from 1 to 5 nmols (total volume of 100  $\mu$ l). Adenain concentration was constant at 100 pmol. Non-specific binding was subtracted from total binding. An initial estimate of the dissociation constant of  $^{125}$ I-CT was based on the equilibrium concentration of free ligand required to achieve 50% saturation of the binding sites. Scatchard analysis was performed to give a better estimate of the  $K_d$ . By plotting the ratio bound/free versus bound, the absolute value of the slope is an estimate of  $K_a$  or  $1/K_d$  while the extrapolation of the Scatchard plot to the  $x$ -axis yields an estimate of maximal specific binding of 50% of adenain receptors. The  $K_d$  was determined in the presence and in the absence of adenain cofactor pVic.  $k_{ass}$  is the association rate constant of the adenain–cystatin interaction. The dissociation rate constant,  $k_{diss}$ , was obtained by competition between radiolabeled cystatin from tears (CT) and excess unlabeled cystatins from saliva (CS). The dissociation of radiolabeled  $^{125}$ I-CT from the complex adenain– $^{125}$ I-CT, was studied by preincubation of adenain with  $^{125}$ I-CT followed by addition of unlabeled competing CS. The cold competitor should have a chemical structure distinct from that of the labeled  $^{125}$ I-CT to avoid displacement of non-specific as well as specific binding, therefore, we added excess cold CS (at least 100 times of  $^{125}$ I-CT) because CS and CT are highly similar but with different  $pI$ s. The displacement of  $^{125}$ I-CT by cold CS could occur if the binding is a simple reversible equilibrium. The dissociation constant of the complex between adenain and cystatins may be deduced from these displacement experiments when the displacing CS is in excess. The half-life corresponding to this dissociation constant was obtained for the adenain–cystatin complex.

The  $K_d$  is the dissociation constant at equilibrium and corresponds to  $k_{diss}/k_{ass}$ . The association rate constant at equilibrium or affinity constant of the binding reaction is  $K_a = 1/K_d$ . The kinetic calculations were as follows:

$$\begin{aligned}
 V_{\text{diss}} &= -\frac{d[^{125}\text{I-CT-Adenain}]}{dt} \\
 &= k[^{125}\text{I-CT-Adenain}] \Leftrightarrow \\
 &\quad -\frac{d[^{125}\text{I-CT-Adenain}]}{[^{125}\text{I-CT-Adenain}]} = k dt \quad (1)
 \end{aligned}$$

Integration from  $t = 0$  at time  $t$  gives

$$\begin{aligned}
 \ln[^{125}\text{I-CT-Adenain}]_t - \ln[^{125}\text{I-CT-Adenain}]_0 \\
 &= -kt \\
 \Leftrightarrow \frac{[\ln[^{125}\text{I-CT-Adenain}]_0 - \ln[^{125}\text{I-CT-Adenain}]_t]}{t} \\
 &= k
 \end{aligned}$$

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Cystatins from saliva and tears are weak inhibitors of adenain activity

The purified cystatins are shown in Fig. 1. The cystatins from tears (CT) resolved into two bands,

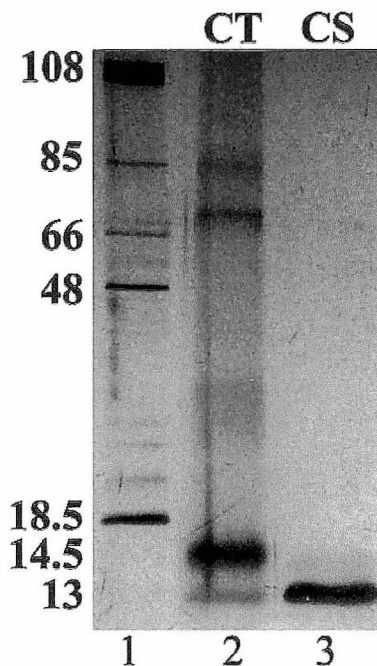


Fig. 1. Purification of human cystatins from saliva (CS) and tears (CT). SDS-PAGE (12.5%) of the purified proteins stained with silver nitrate. Samples were run in duplicate. Lane 1 contains Ad2 virus as molecular weight marker.

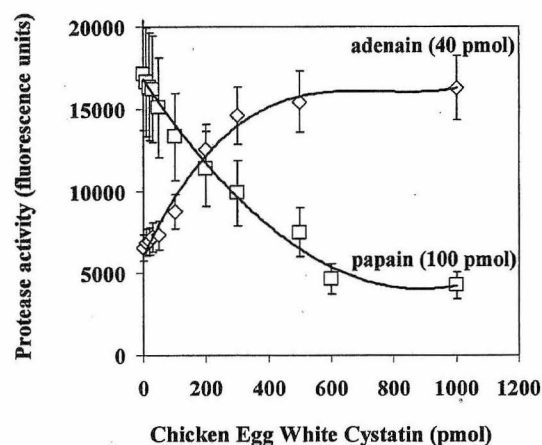


Fig. 2. The effect of egg white cystatin (CEW) on papain and adenain activity in vitro. The reaction mixtures contained 100 pmol of papain, 3.3  $\mu\text{M}$  of R110 fluorescent peptide substrate and increasing concentrations of CEW (up to 1000 pmol, i.e. a molar ratio of papain to CEW of 1:10). For adenain, the reaction mixtures contained 40 pmol of adenain, 3.3  $\mu\text{M}$  of R110 fluorescent peptide substrate and increasing concentrations of CEW (up to 1000 pmol, i.e. a molar ratio of adenain to CEW of 1:25). The fluorescence units of the cleaved substrate represent the mean of five experiments and experimental variation was less than 5%. The mean adenain and papain activity in the absence of CEW was 6334 and 17,150, respectively.

a main component of 14.5 kDa and a minor component of 13 kDa (Fig. 1, lanes 2–3). The purification from whole saliva also led to a mixture of two molecular species, the 13 kDa component being predominant (lanes 4–5). The yield of purified cystatins from both sources was around 5 mg/l. To study the effect of these cystatins on the activity of adenain we first compared the effect of CEW on adenain with the effect on papain, the latter being a well documented standard (Barrett, 1987; Lindahl et al., 1988). The reaction mixtures contained the enzymes and CEW prior to the addition of the fluorescent R110 peptide substrate. We observed a dose dependent decrease in papain activity as the ratio of CEW to papain was increased (Fig. 2). CEW did not show any inhibitory activity against adenain, but instead stimulated proteinase activity, possibly by stabilizing or buffering the enzyme. We next tested the effect of cystatins from saliva (CS) on papain and found that the enzyme was inhibited more efficiently than by CEW (Fig. 3). CS also inhibited adenain,

albeit with puzzling kinetics. The results with CT gave classical inhibition curves on both enzymes (Fig. 4). For a further comparison we also tested human kininogen, a high molecular weight cystatin. Kininogen was less efficient than either CT or CS on either enzyme (Fig. 5).

To facilitate comparison the results were expressed in terms of the molar ratio of cystatin to enzyme required to achieve 50% inhibition (Table 1). In comparison with papain, which is inhibited by all four cystatins tested, adenain was only efficiently inhibited by CT and CS. It should be noted that the cocktail of inhibitors used during the purification of CS and CT had no effect on adenain activity.

These experiments were repeated with adenain, using the tsl precursor proteins as substrate. The results (not shown) were similar to the above, confirming that CEW does not inhibit adenain and that CT is more efficient than CS.

The proteins obtained from these two biological fluids, i.e. saliva and tears, are a mixture of several cystatins which may have different affinities for the active site of the proteinase. On SDS-PAGE, the predominant band of the CS mixture had an approximate molecular weight of 13 kDa while the

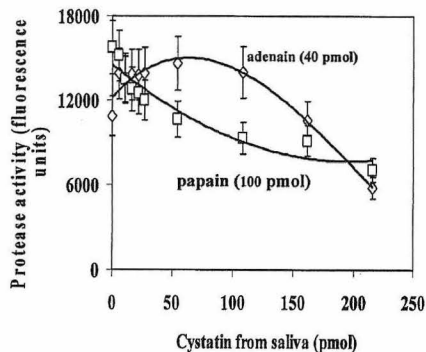


Fig. 3. The effect of salivary cystatins (CS) on papain and adenain activity in vitro. The reaction mixtures contained 100 pmol of papain, 3.3  $\mu$ M of R110 fluorescent peptide substrate and increasing concentrations of CS (up to 216 pmol, i.e. a molar ratio papain of CS of 1:2.16). For adenain, the reaction mixtures contained 40 pmol of adenain, 3.3  $\mu$ M of R110 fluorescent peptide substrate and increasing concentrations of CS (up to 216 pmol, i.e. a molar ratio of adenain to CS of 1:5). The fluorescence units of the cleaved substrate represent the mean of five experiments and experimental variation was less than 5%. The mean adenain and papain activity in the absence of CS was 10,582 and 15,740, respectively.

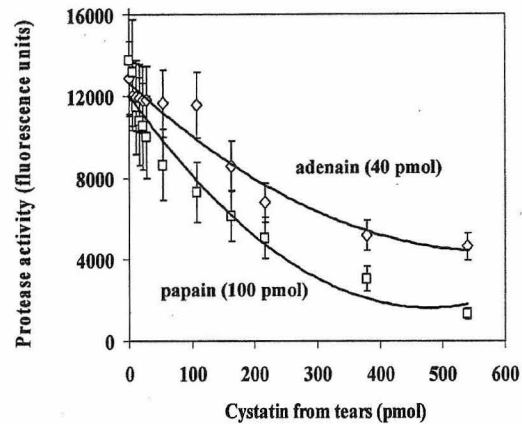


Fig. 4. The effect of cystatins from tears (CT) on papain and adenain activity in vitro. The reaction mixtures contained 100 pmol of papain, 3.3  $\mu$ M of R110 fluorescent peptide substrate and increasing concentrations of CT (up to 540 pmol, i.e. a molar ratio of papain to CT of 1:5.4). For adenain, the reaction mixtures contained 40 pmol of adenain, 3.3  $\mu$ M of R110 fluorescent peptide substrate and increasing concentrations of CT (up to 540 pmol, i.e. a molar ratio of adenain to CT of 1:16). The fluorescence units of the cleaved substrate represent the mean of five experiments and experimental variation was less than 5%. The mean adenain and papain activity in the absence of CT was 13,740 and 12,888, respectively.

predominant band of the CT mixture had an approximate molecular weight of 14.5 kDa (Fig. 1). CS and CT have been shown to contain the same cystatin variants (S, SA, SN, C, D) but in different ratios (Isemura and Saitoh, 1994; Isemura et al., 1991). We assume that the presence of the two molecular weight species in our purification is an indication of the presence of these different cystatins. Because CT was the more efficient inhibitor, the inhibition could be attributed to the higher molecular weight species, which are more abundant in CT. Another important fact to consider for the family 2 cystatins is the method of purification. These cystatins are frequently isolated in multiple isoforms of varying *pI* because of proteolytic cleavage of bonds in the N-terminal segment (Bobek et al., 1993). As noted above, we have attempted to minimize spurious proteolysis by the inclusion of a cocktail of inhibitors during the purification steps.

### 3.2. Denatured, but not native, cystatins are cleaved by adenain

The cystatins purified from saliva and tears

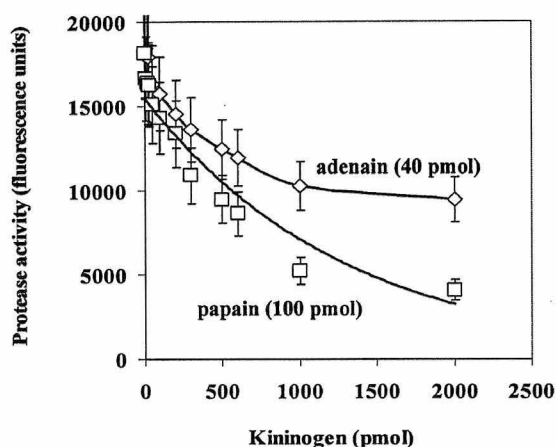


Fig. 5. The effect of HMWK on papain and adenain activity in vitro. The reaction mixtures contained 100 pmol of papain, 3.3  $\mu$ M of R110 fluorescent peptide substrate and increasing concentrations of HMWK (up to 2000 pmol, i.e. a molar ratio of papain to HMWK of 1:20). For adenain, the reaction mixtures contained 40 pmol of rAVP, 3.3  $\mu$ M of R110 fluorescent peptide substrate and increasing concentrations of CS (up to 2000 pmol, i.e. a molar ratio of adenain to HMWK of 1:50). The fluorescence units of the cleaved substrate represent the mean of five experiments and experimental variation was less than 5%. The mean adenain and papain activity in the absence of HMWK was 18,150 and 18,026, respectively.

contain adenain consensus cleavage sites while CEW and kininogen do not. CT and CS contain similar adenain consensus cleavage sites (IEGG for cystatin SA; IPGG for cystatins S and SN; LVGG for cystatin C; LAGG for cystatin D) in the N-terminal segment, which is thought to be involved in the inhibitory mechanism. Furthermore, the sequence of the first  $\beta$ -hairpin which is presumed to be involved in the inhibitory docking wedge contains a second adenain consensus cleavage site (IVGG) in the case of cystatins SA and D.

Table 1  
Moles of cystatin required for 50% inhibition of one mole of proteinase

Cystatin	Papain	Adenain
CS (salivary)	2	5
CT (lacrimal)	1.5	3
HMWK	3.5	50
CEW	4	>50

These data were calculated from Figs. 2–5.

The first site is only about ten residues from the N-terminus, and would therefore be difficult to detect upon cleavage. The second site in the hairpin is located at a position in the molecule, which upon cleavage would easily be detected as new bands by SDS-PAGE. Even extensive incubation of native CT and CS with adenain failed to show hydrolysis. Heat denaturation by boiling resulted in partial hydrolysis of CT (Fig. 6A, lanes 3–4 and 6–7) and also CS (Fig. 6B, lanes 4 and 6).

In the case of the HMWK, the cleavage of the denatured protein was much more complex. HMWK was completely degraded when the protein was incubated overnight with adenain, pVIc and  $\beta$ -mercaptoethanol (Fig. 6C, lane 12). However, after only 2 h of incubation, we detected three main cleavage products. The size of these fragments corresponded approximately to cleavages at the two cystatin motifs QVVAG (Fig. 6C, lanes 10–11). Digestion occurred only with highly active enzyme and only after denaturation of the protein. The complete digestion of the protein in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol may be due to reduction of oxidation products formed by the presence of 19 cysteines. QVVAG is not an adenain consensus cleavage site. The observed cleavage adds a second unconventional site to that previously seen in the reactive site loop of a serpin, SCCA1 (Ruzindana-Umunyana et al., 2000). Denatured cystatins could, therefore, act as competitive inhibitors of adenain. But denatured cystatins (by boiling or treatment with 1% SDS) did not show any inhibitory activity towards adenain, possibly because of low affinity for this unconventional site (data not shown). It is interesting in this regard, that denatured CEW which also does not contain any consensus sites, was also marginally hydrolyzed, but not sufficiently to act as a competitive inhibitor (data not shown). We suggest that this light cleavage might occur in QLSVG within the first hairpin, which is thought to be involved in the inhibitory mechanism with papain.

These results are in agreement with theoretical studies and predictions reported recently (Tyndall and Fairlie, 1999; Fairlie et al., 2000). This group showed that aside from sequence/composition, the inhibitor/substrate conformation also influences proteinase recognition and subsequent cleavage.

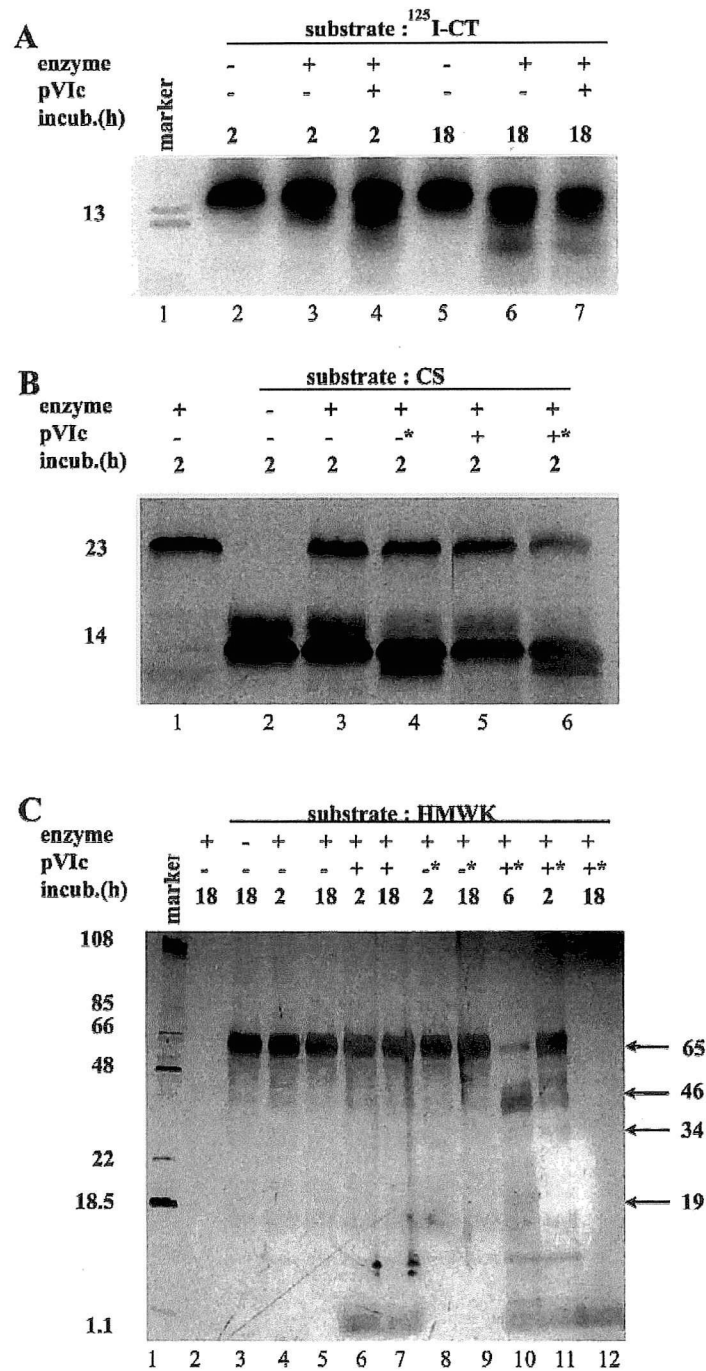


Fig. 6. The digestion of denatured cystatins by adenain. Panel A, <sup>125</sup>I-labelled cystatin from tears (CT) was incubated with 1 µg of adenain and activating peptide pVic for the indicated times, then the reaction was stopped by adding lysing solution and boiling. Samples were separated on a 15% SDS-PAGE gel, dried and autoradiographed. Panel B, salivary cystatin (CS) was incubated with 2 µg of adenain, activating peptide pVic and 1 mM β-mercaptoethanol (\*) for the indicated times, then the reaction was stopped by adding lysing solution and boiling. Samples were separated on a 15% SDS-PAGE gel and stained with silver nitrate. Panel C, HMWK was incubated with 0.15 µg of adenain, activating peptide pVic and 1 mM β-mercaptoethanol (\*) for the indicated times, then the reaction was stopped by adding lysing solution and boiling. Samples were separated on a 12.5% SDS-PAGE gel and stained with silver nitrate. The arrows denote the cleavage products of approximately 46, 34, 31 and 19 kDa.

Indeed, the binding studies for human immunodeficiency virus (HIV)-1 proteinase inhibitors/substrates showed that when these inhibitors/substrates are preorganized in an extended conformation, they have significantly higher proteinase affinity.

### 3.3. Human cystatins bind to adenain and inhibit it by a simple bimolecular reversible mechanism

In order to characterize the cystatin–adenain interaction, we performed some preliminary studies of the kinetics of association and dissociation. The concentration dependence of specific binding provides direct information about the affinity of the cystatins for adenain binding sites. We observed that specific binding was saturable thereby suggesting a finite concentration of binding sites. In the simplest case described here, an initial estimate of the dissociation constant of  $^{125}\text{I}$ -CT is provided by the equilibrium concentration of free  $^{125}\text{I}$ -CT needed to give 50% occupancy of the binding sites. The  $K_d$  evaluated from this plot was slightly above  $1 \times 10^{-9}$  M (data not shown). A better estimate of this parameter can be obtained by a Scatchard plot of the ratio of bound/free versus bound  $^{125}\text{I}$ -CT (Fig. 7A). Extrapolation of the Scatchard plot to the  $x$ -axis yields an estimate of the adenain concentration corresponding to the maximal specific binding, that is 0.24 nM. The slope provides an estimate of  $-K_a$  or  $-1/K_d$ , i.e.  $K_a = 0.8129$  and  $K_d = 1.23$  nM in the absence of the adenain cofactor pVIc (Fig. 7A). Therefore, 1.23 nM is the free  $^{125}\text{I}$ -CT concentration at 50% adenain saturation. In identical experiments, we also determined the dissociation constant at equilibrium in the presence of the adenain cofactor pVIc (Fig. 7B). The value obtained was 1.7 nM. The linearity of the kinetic profiles indicated that we are dealing with a homogeneous class of binding sites.

As shown by Eq. (1), the dissociation constant can be deduced from the displacement experiments (Fig. 8A and B). The  $k_{\text{diss}}$  is the absolute value of the inverse of the slope. The association constant  $k_{\text{ass}}$  is estimated by the ratio  $K_d/k_{\text{diss}}$ . The half-life of the complex when

$$[^{125}\text{I}\text{-CT-Adenain}]_t = \frac{1}{2}[^{125}\text{I}\text{-CT-Adenain}]_0$$

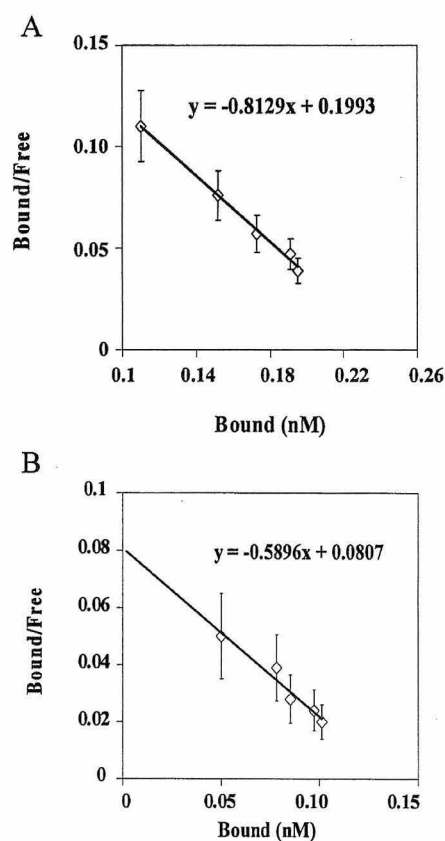


Fig. 7. Scatchard analysis of the binding of tear cystatins to adenain. The binding of 1–5 nmol of  $^{125}\text{I}$ -CT to 100 pmol of adenain was assayed by immunoprecipitation (total volume of 100  $\mu\text{l}$ ). The assays are the means of three experiments, the bars indicating the S.E.  $y$  gives the equations of the linear regressions for the calculation of  $K_a$  and  $K_d$ . Panel A shows binding in the absence of pVIc and Panel B in the presence of pVIc.

is given by  $\ln 2 = k\tau_{1/2} \Rightarrow \tau_{1/2} = \ln 2/k$ .

Table 2 shows the kinetic parameters published for chicken cystatins and four cysteine proteinases (Lindahl et al., 1988; Björk et al., 1989, 1990) as compared with the kinetic parameters of lacrimal cystatin–adenain binding determined by the present studies. The inhibition constant ( $K_i$ ) of the human cystatins towards adenain was not determined in the present studies, but the dissociation constant at equilibrium is a relevant estimate of the inhibitory efficiency of these cystatins. The  $K_a$  values provide a measure for the affinity of the cystatins to the different enzymes. The affinity between the different cysteine proteinases and cys-

tatins has been found to be highly variable (Table 2). These enzymes may use the same binding mechanism and the  $K_a$  merely reflects the differences in the nature of the interactions. Previous studies using inactivated forms of enzymes have shown different affinities for the cystatins (Björk et al., 1989). They were consistent with

interactions of considerable strength occurring between the cystatins and domains of the enzymes at some distance from the reactive cysteine residue.

The present results suggest that the interaction between adenain and human cystatins is a non-covalent reversible interaction. However, because the complex dissociates slowly it appears irreversible. A pharmacologically effective proteinase inhibitor should fulfill the following conditions, the interaction between enzyme and inhibitor must be irreversible or if reversible, the dissociation constant of the enzyme–inhibitor complex must be less than 0.1 nM in order to maintain inhibitory activity for a longer period of time. As for adenain and human cystatins, this constant is 1.23 nM, therefore we consider these inhibitors as weak ones. Furthermore, the affinity constant deduced from the Scatchard analysis suggests that the presence of the adenain cofactor pVIc reduces the binding of cystatins to adenain (Fig. 7A and B; Table 2). The uncomplexed adenain seems to have a solvent-exposed active site that could accommodate inhibitor segments of cystatin loops more easily than the complexed adenain.

We conclude that the inhibitory mechanism of human cystatins on adenain is a tightly binding, reversible mechanism near the active site and appears to be competitive with the substrate although there was no detectable cleavage of the reactive domains of cystatins, which contain two adenain consensus cleavage sites. It is interesting to compare these natural inhibitors of cysteine proteinases to another natural inhibitor we tested in a previous study, the squamous cell carcinoma antigen (SCCA1; Ruzindana-Umunyana et al., 2000). This cross-class inhibitor, SCCA1, has no adenain consensus cleavage site but its native form was nevertheless cleaved by adenain in the reactive site loop. It inhibited adenain to 50% in a competitive and irreversible manner at a molar ratio of SCCA1 to adenain of 1.6:1. In the case of human cystatins, there was limited proteolysis by adenain and the 50% inhibition was not achieved until a molar ratio of CT to adenain of 3:1. These cystatins are therefore unlikely to play a significant role in inhibiting adenovirus infections.

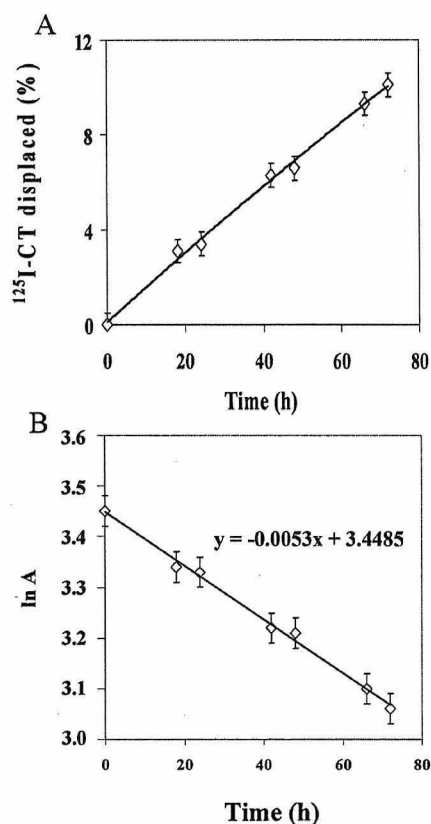


Fig. 8. Dissociation of the cystatin–adenain complex by competition with heterologous cystatin. Panel A, analysis by immunoprecipitation of the displacement of  $^{125}\text{I-CT}$  from its complex with adenain by an excess of unlabeled CS. The complex between  $^{125}\text{I-CT}$  and adenain was formed with equimolar amounts (100 pmol for both) for 15 min, and the unlabeled CS was added at a concentration of 10 nmol (total volume of 100  $\mu\text{l}$ ). The cystatin displaced from the complex by the competitor was corrected for dissociation in the absence of competitor and this value was plotted as a function of time. Each time point was repeated at least three times and the variation was less than 5%. Panel B, determination of  $k_{\text{diss}}$ /hour from the data in Panel A. Plot of  $\ln A$  vs. time. ‘A’ is the percent of labeled cystatin complexed with adenain at  $t = 0$  (in the absence of the competitor) up to  $t = 72$  h after the addition of the competitor.  $Y$  is the linear regression equation of the plot for the calculation of  $k_{\text{diss}}$  and  $k_{\text{ass}}$ .



Table 2  
Equilibrium and kinetic constants of the interaction of cystatins with five cysteine proteinases

Enzyme	$k_{\text{ass}}$ (M/s)	$k_{\text{diss}}$ (per s)	$K_{\text{d}}$ (M)	$K_{\text{a}}$ (per M)	$\tau_{1/2}$
Papain <sup>a</sup>	$9.9 \times 10^6$	$5.7 \times 10^{-7}$	$6 \times 10^{-14}$	$1.7 \times 10^{13}$	14 days
Actinidin <sup>a</sup>	$2.2 \times 10^6$	$1.1 \times 10^{-2}$	$5 \times 10^{-9}$	$2 \times 10^8$	63 s
Chymopapain <sup>a</sup>	$2.6 \times 10^6$	$2.4 \times 10^{-6}$	$9 \times 10^{-13}$	$1.1 \times 10^{12}$	3 days
Ficin <sup>a</sup>	$9.6 \times 10^6$	$4.6 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-14}$	$2 \times 10^{13}$	17 days
Adenain <sup>b</sup>	$5.4 \times 10^4$	$1.5 \times 10^{-6}$	$1.2 \times 10^{-9}$	$8.1 \times 10^8$	5 days
Adenain <sup>b</sup> + pVIc	ND	ND	$1.7 \times 10^{-9}$	$5.9 \times 10^8$	ND

$k_{\text{ass}}$  is the association rate constant (on rate) of the enzyme–cystatin interaction;  $k_{\text{diss}}$  is the dissociation rate constant (off rate) of the enzyme–cystatin complex;  $K_{\text{d}}$  is the dissociation constant at equilibrium,  $K_{\text{d}} = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}} = 1/K_{\text{a}}$ ;  $K_{\text{a}}$  is the association constant at equilibrium or affinity constant of the binding reaction (the inverse of the  $K_{\text{d}}$ );  $\tau_{1/2}$  is the half-time of the complex dissociation reaction given by  $\ln 2/K_{\text{d}}$ .

<sup>a</sup> These constants are taken from Björk et al. (1989, 1990), Olsson et al. (1999), referring to CEW.

<sup>b</sup> The constants were determined with CT.

## Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada (MT4164) to J.M. Weber. We thank Lise Imbeault for technical assistance.

## References

- Abrahamson, M., 1994. Cystatins. *Methods Enzymol.* 244, 685–700.
- Auerswald, E.A., Genenger, G., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., Engh, R.A., Fritz, H., 1992. Recombinant chicken egg white variants of the QLSVG region. *Eur. J. Biochem.* 209, 837–845.
- Barka, T., Asbell, P.A., van der Noen, H., Prasad, A., 1991. Cystatins in human tear fluid. *Curr. Eye Res.* 10 (1), 25–34.
- Barrett, A.J., 1987. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *TIBS* 12, 193–196.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Davies, M.E., Machleidt, W., Salvesen, G., Turk, V., 1986. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In: Barrett, A.J., Salvesen, G. (Eds.), *Proteinase Inhibitors*. Elsevier, Amsterdam, pp. 515–569.
- Björk, I., Alriksson, E., Ylinenjarvi, K., 1989. Kinetics of binding of chicken cystatin to papain. *Biochemistry* 28, 1568–1573.
- Björk, I., Ylinenjarvi, K., Lindahl, P., 1990. Equilibrium and kinetic studies of the interaction of chicken cystatin with four cysteine proteinases. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371, 119–124.
- Bobek, L.A., Wang, X., Levine, M.J., 1993. Efficient production of biologically active human salivary cystatins in *Escherichia coli*. *Gene* 123, 203–210.
- Bode, W., Huber, R., 1992. Natural protein proteinase-inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 204, 433–451.
- Bode, W., Huber, R., 1994. Proteinase–protein inhibitor interactions. *Fibrinolysis* 8, 161–171.
- Bode, W., Engh, E., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., Turk, V., 1988. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* 7 (8), 2593–2599.
- Bode, W., Engh, E., Musil, D., Laber, B., Stubbs, M., Huber, R., Turk, V., 1990. Mechanism of interaction of cysteine proteinases and their protein inhibitors as compared to the serine proteinase-inhibitor interaction. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371 (Suppl.), 111–118.
- Brzin, J., Popovic, T., Turk, V., Borchart, U., Machleidt, W., 1984. Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118 (1), 103–109.
- Cornish, J.A., Murray, H., Kemp, G.D., Gani, D., 1995. Specific inhibitors of the adenovirus type 2 proteinase based on substrate-like tetrapeptide nitrites. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 25–30.
- De Clercq, E., 1993. Antiviral agents: characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact. In: *Advances in Virus Research*, vol. 42. Academic Press, New York.
- Ding, J., McGrath, W.J., Sweet, R.M., Mangel, W.F., 1996. Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *EMBO J.* 15, 1778–1783.
- Diouri, M., Geoghegan, K.F., Weber, J.M., 1995. Functional characterization of the adenovirus proteinase using fluorogenic substrates. *Protein Pept. Lett.* 6, 363–370.
- Doronin, K., Kuppaswamy, M., Toth, K., Tollefson, A.E., Krajcsi, P., Krougliak, V., Wold, W.S.M., 2001. Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy. *J. Virol.* 75 (7), 3314–3324.

- Fairlie, D.P., Tyndall, J.D.A., Wong, A.K., Abbenante, G., Scanlon, M.J., March, D.R., Bergman, D.A., Chai, C.L.L., Burkett, B.A., 2000. Conformational selection of inhibitors and substrates by proteolytic enzymes: implications for drug design and polypeptide processing. *J. Med. Chem.* 43, 1271–1281.
- Horwitz, M., 1996. Adenoviruses. In: Fields, B.N., et al. (Eds.), *Virology*, vol. 2. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Isemura, S., Saitoh, E., 1994. Inhibitory activities of partially degraded salivary cystatins. *Int. J. Biochem.* 26 (6), 825–831.
- Isemura, S., Saitoh, E., Ito, S., Isemura, M., Sanada, K., 1984. Cystatin S: a cysteine proteinase inhibitor of human saliva. *J. Biochem.* 96 (4), 1311–1314.
- Isemura, S., Saitoh, E., Sanada, K., Minakata, K., 1991. Identification of full-sized forms of salivary (S-type) cystatins (cystatin SN, cystatin SA, cystatin S and two phosphorylated forms of cystatin S) in human whole saliva and determination of phosphorylation sites of cystatin S. *J. Biochem.* 110, 648–654.
- Järvinen, M., Rinne, A., 1982. Human spleen cysteine proteinase inhibitor. Purification, fractionation into isoelectric variants and some properties of the variants. *Biochim. Biophys. Acta* 708 (2), 210–217.
- Katunuma, N., Kominami, E., 1995. Structure, mechanisms and assays of cysteine proteinase inhibitors: cystatins and E-64 derivatives. *Methods Enzymol.* 251, 382–397.
- Keyvani-Amineh, H., Labrecque, P., Cai, F., Carstens, E.B., Weber, J.M., 1995. Adenovirus protease expressed in insect cells cleaves adenovirus proteins, ovalbumin and baculovirus protease in the absence of activating peptide. *Virus Res.* 37, 87–97.
- Kitaoka, M., Nakazawa, M., Hayasaka, S., 1985. Lysosomal enzymes in human tear fluid collected by filter paper strips. *Exp. Eye Res.* 41, 259–265.
- Lah, T.T., Kos, J., 1998. Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol. Chem.* 379, 125–130.
- Li, S., Hochstrasser, M., 1999. A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246–251.
- Lindahl, P., Alriksson, E., Jörnvall, H., Björk, I., 1988. Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. *Biochemistry* 27, 5074–5082.
- Lopez-Otin, C., Simon-Mateo, C., Martinez, L., Vinuela, E., 1989. Gly-Gly-X, a novel consensus sequence for the proteolytic processing of viral and cellular proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 9107–9110.
- Machleidt, W., Thiele, U., Laber, B., Assfalg-Machleidt, I., Etsler, A., Wiegand, G., Kos, J., Turk, V., Bode, W., 1989. Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. *FEBS Lett.* 243 (2), 234–238.
- Montel, R., Kinder, M., Wegner, U., von Janta-Lipinski, M., Matthes, E., 1997. Inhibitory activity of 3'-fluoro-2'-deoxythymidine and related nucleoside analogues against adenoviruses in vitro. *Antiviral Res.* 34, 113–119.
- Olsson, S.L., Ek, B., Björk, I., 1999. The affinity and kinetics of inhibition of cysteine proteinases by intact recombinant bovine cystatin C. *Biochim. Biophys. Acta* 1432, 73–81.
- Qualikene, W., Lamoureux, L., Weber, J.M., Massie, B., 2000. Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 11, 1341–1353.
- Ramasubbu, N., Weaver, T., Tseng, C.C., Bobek, L.A., Levine, M.J., 1996. Preliminary X-ray crystallographic analysis of human salivary cystatins. *Acta Crystallogr.* D52, 869–870.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1994. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244, 461–486.
- Ritonja, A., Machleidt, W., Barrett, A.J., 1985. Amino acid sequence of the intracellular cysteine proteinase inhibitor cystatin B from human liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131 (3), 1187–1192.
- Ruzindana-Umunyana, A., Sircar, S., Schick, C., Silverman, G.A., Weber, J.M., 2000. Adenovirus endopeptidase hydrolyses human squamous cell carcinoma antigens in vitro but not ex vivo. *Virology* 268, 141–146.
- Serveau, C., Juliano, L., Bernard, P., Moreau, T., Mayer, R., Gauthier, F., 1994. New substrates of papain, based on the conserved sequence of natural inhibitors of the cystatin family. *Biochimie* 76, 153–158.
- Sircar, S., Keyvani-Amineh, H., Weber, J.M., 1996. Inhibition of adenovirus infection with protease inhibitors. *Antiviral Res.* 30, 147–153.
- Sircar, S., Ruzindana-Umunyana, A., Neugebauer, W., Weber, J.M., 1998. Adenovirus endopeptidase and papain are inhibited by same agents. *Antiviral Res.* 40, 45–51.
- Sueyoshi, T., Enjyoji, K., Shimada, T., Kato, H., Iwanaga, S., Bando, Y., Kominami, E., Katunuma, N., 1985. A new function of kininogens as thiol-proteinase inhibitors: inhibition of papain and cathepsins B, H and L by bovine, rat and human plasma kininogens. *FEBS* 182 (1), 193–195.
- Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., Turk, B., 1998. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol. Chem.* 379, 137–147.
- Tyndall, J.D.A., Fairlie, D.P., 1999. Conformational homogeneity in molecular recognition by proteolytic enzymes. *J. Mol. Recognit.* 12, 363–370.
- Weber, J.M., 1999. Role of endopeptidase in adenovirus infection. In: Seth, P. (Ed.), *Adenoviruses: From Basic Research to Gene Therapy Application*. R.G. Landes Company.
- Wickham, T.J., 2000. Targeting adenovirus. *Gene Ther.* 7, 110–114.

## ARTICLE IV

Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L. and Weber, J.M. (2002).

Substrate Specificity of Adenovirus Protease. *Virus Res. In press.*

### ***Préambule***

Le quatrième manuscrit est le rapport des études réalisées sur la spécificité de substrat de l'adenain que nous comparons ensuite à la spécificité de substrat des autres protéases appartenant au même clan CE. Dans cet article, j'ai effectué la compilation de toutes les protéines précurseurs comportant des séquences de clivage consensus de la protéase adénovirale disponibles dans les banques de données. Cette compilation a donné lieu aux tableaux 1 et 2. À partir de ces données, j'ai calculé l'index hydrophatique pour chaque position de P4 à P4', ce qui donne lieu à la figure 1. J'ai réalisé les expériences de digestion de l'hexon et de la 100K (figures 3A, 3B, 4A et 4B).

# **Substrate Specificity of Adenovirus Protease**

Angelique Ruzindana-Umunyana, Lise Imbeault and Joseph M. Weber<sup>1</sup>

Département de Microbiologie et d'Infectiologie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

Short title : Adenain substrate specificity

Key words: adenovirus; adenain; protease, adenoviral

<sup>1</sup>Corresponding author: Fax : (819) 564-5392.

E-mail : j.weber@courrier.usherb.ca

## **Abstract**

The adenovirus protease, adenain is functionally required for virion uncoating and virion maturation and release from the infected cell. In addition to hydrolysis of precursor proteins at specific consensus sites, adenain has also been observed to cleave viral proteins at other sites. Here we re-examine the sequences in the consensus sites and also the phenomena of cleavage at other sites on viral proteins II, 100K, V, VI and VII. An examination of the eight residues flanking the scissile bond in 274 consensus sites from 36 different adenovirus serotypes in the DNA sequence databanks provided the following main conclusions: (1) two types of consensus sites, type 1, (M,I,L)XGX-G and type 2, (M,I,L)XGG-X, (2) the variant positions P<sub>3</sub> and P<sub>1</sub> never contained C,P,D,H,W,Y and C,P,G,M amino acids, respectively in type 1, (3) the variant positions P<sub>3</sub> and P<sub>1</sub> never contained C,D,L,W and C,P,D,Q,H,Y,W amino acids, respectively in type 2, (4) the thiol forming C residue occurred only twice within the eight residues flanking the scissile bond and that in the P<sub>4</sub> position. Six unusual serotypes had (M,L,I)XAT-G as the PVII consensus site. Adenain has been proposed to cleave protein VI at an unknown site in the course of virion uncoating. The cleavage of capsid protein VI in the absence of a consensus site is confirmed here in vitro using recombinant adenain. Virion proteins II, V and VII and the nonstructural protein 100K were also digested in vitro into discrete fragments by recombinant adenain. We conclude that adenain preferentially cleaves viral proteins at their consensus sites, but is capable, in vitro of cleavages at other discrete sites which resemble the consensus cleavage sites.

## 1. Introduction

Like many other viruses, adenoviruses encode a protease, adenain, which cleaves several precursor proteins into mature products (Weber, 1999). Adenain is a critical regulator of virus infection, with functions in virus disassembly early in infection and also in virus maturation and release from the cell (Cotten and Weber, 1995; Greber, 1998). The orchestration of these events depends on enzyme activation in the endosome during uncoating and later by a substrate peptide in the assembled virus. These and other properties make it an ideal target for therapeutic intervention. This would be desirable for a number of economically important adenovirus infections in man and domesticated animals. Studies of the substrate specificity of adenain should facilitate the identification of selective low molecular weight lead compounds that can be targeted to the active site without affecting cellular functions.

Webster *et al.*, (1989) identified the consensus sequences for cleavage by adenain as : (M,I,L)XGG-X or (M,I,L)XGX-G and from the known sequences, X appeared to be any amino acid (Weber, 1995;1999). Subsequently, Diouri *et al.*, (1996) have shown that the consensus cleavage type GX-G is hydrolyzed more rapidly than the GG-X site. A single exception to these consensus sites was observed in human Ad4 in the processing of pTP to mature TP via iTP involving the P<sub>4</sub> position in the sequence QRGF-G (Webster *et al.*, 1997). Recently Li and Hochstrasser (1999) have observed sequence similarities among the members of a large group of cysteine proteases including African swine fever virus, vaccinia virus, fowlpox virus and the Ubl-specific proteases of yeast and *Chlamydia*. *Saccharomyces cerevisiae* also encodes a related protease, SMT4, with a function in chromosome condensation (Strunnikov *et al.*, 2001). Their catalytic residues are conserved and they cleave the corresponding protein precursors at consensus sites similar or closely related to the glycine-glycine-X cleavage sites (Lopez-Otin *et al.*, 1989; Lee and Hruby, 1994). The similarities observed between their sequences, their catalytic sites and substrate cleavage sites suggest that these viral proteases are structurally related. In a recent review, Barrett and Rawlings (2001), have described the evolutionary lines of cysteine peptidases and concluded that adenain, the eukaryotic Ulp1 protease and the bacterial YopJ proteases belong to the

same clan CE. These enzymes show minor sequence similarity but their secondary structures especially around the catalytic residues and their substrate specificity are clearly similar.

While catalysis occurs preferentially at the two consensus sites, some consensus sites are not cleaved, presumably because they are inaccessible due to the structure of the protein. In contrast, cleavages have also been observed in the absence of either consensus site sequence. During virus uncoating, Greber et al., (1993; 1996) have reported on the breakdown of capsid protein VI, which does not contain cleavage sites, and their data suggested that adenain might be responsible. Nonviral proteins can also be cleaved by adenain. The squamous cell carcinoma antigens SCCA1 and SCCA2, which function as serpins, are cleaved in the absence of consensus sites (Ruzindana-Umunyana et al., 2000). The high molecular weight kininogens (HMWK) belonging to the cystatin superfamily were also shown to be cleaved by adenain under denaturing conditions at degenerate consensus sites (Ruzindana-Umunyana et al., 2001).

In the present report we examine the sequence of the two types of cleavage sites for all the viral precursor proteins currently available in the databanks with particular reference to the four amino acids on either side of the scissile bond. We also examine in vitro the digestion by adenain of several viral proteins including capsid proteins VI and hexon and the non-structural protein 100K to shed more light on the substrate specificity properties of adenain.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Viral protein substrates**

Viral proteins were produced by infecting Hep2 cells with 10PFU/cell of wild type Ad2 at 37°C and labeling with <sup>35</sup>S-Met (75 µCi in 1ml DMEM without Met) during the late viral phase at 24 hours p.i. Virus was purified by equilibrium density gradient centrifugation in CsCl, the visible band at 1.34 g/ml density was collected from the top and the virus was dialyzed against TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM) or a cocktail of 10% Glycerol, 10 mM Tris.HCl (pH7.4), 1mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O and 0.5% n-Butanol. Viral precursor proteins were

prepared from ts1 infected cells at 39°C, the virions purified and disrupted (ts1-39) as previously described (Tremblay *et al.* 1983).

Viral proteins were also prepared by electroelution. After SDS-PAGE to separate the viral proteins, the gel was stained with Coomassie brilliant blue (0.4%), the gel band of interest was excised, washed with Tris 0.3M, pH 8.9 and electroeluted into buffer (50mM Tris pH8.9, 50mM Glycine and 0.1% SDS) at 100 volts for 30 minutes from the minced gel. After removal of most of the salt and SDS by dialysis against TE, the protein was treated with the detergent adsorber gel (cat no. 1500 678) to remove remaining salts and SDS according to the manufacturer's instructions (Boehringer Mannheim).

Some proteins were also purified from the soluble pool of infected cells by column chromatography, as described before (Allen *et al.*, 1999). Ad5 protein VI purified by RP-HPLC, was provided by Michael McCaman of Berlex Biosciences (Lehmborg *et al.*, 1999).

## 2.2. Antiserum and western blotting

A rabbit polyclonal anti-VI serum prepared by immunizing with a peptide containing the sequence of residues 94-170 was provided by D.A. Matthews (Matthews and Russell, 1995). Western blotting was as follows. The SDS-PAGE gel was blotted onto a nitrocellulose membrane (Hybond C-extra), and reacted with anti-VI serum. The antigen-antibody complexes were detected with <sup>125</sup>I-labeled protein A (Amersham Pharmacia Biotech).

## 2.3. Enzyme assays

Recombinant adenovirus type 2 proteinase (Adenain; EC3.4.22.39) was purified by chromatography from an *E.coli* expression system (pLPV) as described before (Keyvani-Amineh *et al.*, 1995). The reaction mixture generally contained 0.4 µg of adenain, 40 µM pVIc, and 1 mM β-mercaptoethanol. Incubation was at 37°C overnight, and the reaction stopped by boiling in lysing solution. The cysteine protease inhibitor, parachloromercuribenzoate (PCMB), was from Sigma-Aldrich.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Amino acids flanking the scissile bond

Since the initial proposal of the adenain cleavage consensus sites a large amount of adenovirus sequence data has been deposited in the DNA data banks. This data could now be examined for the fidelity of the consensus sites in the viral precursor proteins. To identify amino acid sequence determinants in the viral substrate proteins, a data base containing 274 different processing site sequences from 36 different adenoviruses was compiled. The cleavage sites were selected by choosing those containing the sequence (M,I,L) XGX-G as type 1 site or (M,I,L) XGG-X as type 2 site, based on the confirmed cleavage sites of Ad2 proteins (Weber, 1995). The P<sub>4</sub> position of the type 1 site conformed to the consensus sequence, but with a marked preference for Leu (Table 1). However, a single exception to this has been identified in the terminal protein of human Ad4 which contains a Q (Webster et al., 1997; Table 1). The P<sub>2</sub> and P<sub>1</sub>' were invariably Gly, as expected. The P<sub>3</sub> and P<sub>1</sub> positions were variable but never contained C,P,D,H,W,Y and C,P,G,M amino acids, respectively. Notably, the thiol forming amino acid, Cys never occurred within the eight residues flanking the scissile bond.

In a group of six serotypes from bovine, ovine, duck, snake and possum, all members of the new genus atadenovirus, the precursor protein VII cleavage site was (M,L,I)XAT-G (Thomson, et al., 2002). All other cleavage sites, however, conformed with the general consensus sites (B.Harrach and M. Benko, personal communication).

For the type 2 site the P<sub>4</sub> position also conformed to the consensus sequence, but with a decided preference for Leu (Table 2). P<sub>2</sub> and P<sub>1</sub> were invariably Gly, as expected. The P<sub>3</sub> and P<sub>1</sub>' positions never contained C,D,L,W and C,P,D,Q,H,Y,W amino acids, respectively. As in the type 1 site, Cys was again absent, but for a single exception in the P<sub>4</sub>' position.

The hydrophobic profile of the two types of cleavage sites gave a characteristic signature pattern (Fig. 1). Aside from the highly hydrophobic P<sub>4</sub> position, the scissile bond appears within a weakly hydrophilic region. Based on this analysis of 36 adenovirus serotypes,



the cleavage consensus sequences are most likely conserved in all adenoviruses.

### 3.2. Digestion of protein VI

In studying uncoating, Greber *et al.*, (1993), concluded that the interactions involved in the maintenance of the integrity of extracellular virus are eliminated step by step at different stages of the cell entry pathway. On the incoming virus, the peripentonal hexons are associated with protein VI which serves to cement the inside surface of the capsid to the DNA. By means of different approaches, these proteins connecting the DNA to the inside surface of the capsid were shown to be hydrolysed during disassembly (Greber *et al.*, 1993). Integrin binding to penton base facilitates virus endocytosis and penetration and appears to induce a conformation change in the peripentonal capsid region which renders protein VI susceptible to proteolysis (Greber, 1998). Several lines of evidence support protein VI degradation, mediated by the viral cysteine protease, rather than cellular proteases. Endosomal or lysosomal proteases are unlikely mediators of protein VI degradation as monensin or leupeptin did not inhibit this proteolysis. Adenain and protein VI are both located inside the capsid and the degradation of protein VI appears to take place predominantly in the cytosol, rather than in the endosome, with a half life of about 20 min. (Greber *et al.*, 1993).

The precursor of protein VI is cleaved at the two consensus sites leaving a mature VI devoid of additional consensus cleavage sites. Here we test the hypothesis that adenain might be involved in the hydrolysis of VI during decapsidation, by attempting to digest protein VI with recombinant adenain *in vitro*. <sup>35</sup>S-Met labeled electroeluted protein VI was partly digested by adenain into four fragments (results not shown). Taking into consideration the location of the three Met residues, several degenerate consensus sequences appear as possible cleavage sites. Incomplete cleavage may be due to residual SDS and/or incomplete renaturation of protein VI. Consequently we repeated the digestion using native protein VI of Ad5 which has a nearly identical sequence. VI was almost completely digested into two main fragments of 20 kDa and 16 kDa and even further subcleaved into smaller fragments (not

shown), as revealed by western blotting with a polyclonal serum prepared against residues 94-170 (Fig. 2, lanes e-f). Examination of the sequence confirms possible cleavage at the same degenerate sites as discussed above.

Cleavage at position 54 (taking the N-terminus of the mature protein as Ala<sup>1</sup>) would give the same pattern of fragments as cleavage at position 165. As there is a Pro in the second putative cleavage site, we suggest that cleavage is more likely to occur at position LASG<sup>54</sup>-ISGV rather than at position LPGP<sup>165</sup>-SAVV. Two additional putative cleavage sites also generates similar sized fragments, namely 21 kDa if cleavage takes place at either LWSG<sup>10</sup>-IKNF or VASG<sup>194</sup>-NWQS. Cleavage at PEGR<sup>95</sup>-GEKR would give 10 kDa and 12 kDa fragments. Because only one band was visible it is possible that these two fragments comigrate. All of these sites appear to be cleaved to different degrees depending on the mode of preparation of the substrate.

Using deletion mutagenesis, Matthews and Russell (1995) identified two regions of protein VI which are critical for the interaction with hexon. The first region contains amino acid residues 48-74. The second region is the C-terminus of the intermediate cleavage product of pVI, referred to as iVI, which contains 239 amino acids after removal of pVIc from the C-terminus. The capsid proteins, including pre-VI and hexon are assembled into empty shells in the first step of virus assembly. The removal of the pVIc domain in the course of virion maturation may function to permit the new C-terminus to make closer contact with the adjacent hexon capsomer, thereby possibly stabilizing the capsid.

### 3.3. Digestion of hexon

The adenovirus capsid must be completely disassembled in the cytosol as it is too large to pass through the nuclear pores (Greber *et al.*, 1994). The maximum functional diameter of the nuclear pores is about 28 nm while the capsid diameter (without the fibers) is about 70 nm. As noted earlier, protein VI is located inside the capsid connecting the peripentonal hexons and in contact with the viral DNA. Greber *et al.*, (1993) observed the disappearance of hexon in the course of endocytosis, penetration and shedding of the fibers. They proposed

that the disappearance of the hexon may be causally associated with the dissociation of the DNA from the inside surface of the capsid. They also showed that hexon underwent lysosomal degradation in the protease deficient ts1 virus, suggesting that adenain is not required for this process. However, the lysosomal degradation could be a salvage pathway or one that operates in addition to digestions by adenain.

The Ad2 hexon protein (protein II) contains two adenain consensus sites at LGGI<sup>431</sup>-GVTD and LLGN<sup>567</sup>-GRYV, the second of these being conserved in all of 38 hexon sequences available in DNA databanks (Weber et al., 1994). To determine if these or other sites can be digested by adenain *in vitro*, labeled and heat denatured ts1-39 cell lysates, which contain the precursor proteins, were exposed to the enzyme. In addition to the expected cleavage of the precursor proteins (pVI, pVII), three new bands, originating from the degradation of hexon, appeared (results not shown). Because the complex band pattern of cell lysates made interpretation difficult, the digestion of hexon was re-examined using labeled purified wild type virions. When these virions were dialyzed against 10 mM Tris-1 mM EDTA buffer (wt-TE) and then exposed to 4M urea, followed by incubation in the presence of 0.66 M urea, most of the viral proteins disappear and the hexon protein greatly diminishes. Several new bands appear of approximately 90, 60, 40, 16 and 10 kD, of which the 90 kDa band is clearly from the hexon (Fig. 3A, lane c). As the cysteine protease inhibitor PCMB completely inhibits these digestions, we suggest that the endogenous adenain present in the virions was responsible for these cleavages (Fig. 3, lane d). Urea not only dissociates the virion but would also partially denature the viral proteins and expose potential degenerate cleavage sites. The urea induced cleavages seen in TE dialysed virions were much less apparent in virions dialysed against cocktail (Fig. 3A, lane f). This type of dialysis preserves the integrity of virions much better than TE dialysis. Trypsin cleaves the Ad2 hexon in loop *l*<sub>4</sub> at residues R818, K825, K827, R852, K877 or K 878 (Jornvall et al, 1981a, 1981b). We propose that adenain may cleave the hexon in the same region at an unknown site.

Hexon capsomers purified by HPLC were digested at quite different sites and only subsequent to heat denaturation (Fig. 3B). Fragments of 80, 60, 40 and 22 kDa appear as partial digestion products. Of these, fragments 60 and 40 were observed above and

corresponded to two consensus cleavage sites in hexon, while fragments 80 and 22 were new.

### 3.4. Digestion of 100K

The adenovirus L4-100K nonstructural protein is involved in the efficient translation of viral late mRNA species (Hayes *et al.*, 1990). Recently, Cuesta *et al.*, (2000), showed that L4-100K selectively inhibits the translation of cellular mRNAs. In the course of digestion of infected cell lysates we have frequently observed the concomitant degradation of the prominent 100K band. As the 100K protein contains no consensus cleavage sites it was of interest to investigate further its digestion by adenain. 100K was indeed digested and new bands of 81, 60, 40 and 27 kDa appeared in the presence of either the pVIc cofactor or to a lesser extent in the presence of  $\beta$ -mercaptoethanol (Fig. 4, panel A, lanes e-h). This hydrolysis was concomittant with that of the authentic precursor proteins, such as pVI and pVII, also present in the reaction mixture. Taking into account the intensity of the <sup>35</sup>S-Met signal of II, 100K and the digestion fragments, and the decrease in that of the hexon (protein II), the majority of the digestion fragments are likely to originate from the hexon. Either the 60 kDa or the 81 kDa fragment may originate from 100K, if cleavage took place at the degenerate sites of VSGD<sup>559</sup>-GLLE or QSGR<sup>736</sup>-GGFG. All of the nine Met residues are upstream of position 559, rendering the putative 177, 246 and 69 residue fragments downstream invisible.

To confirm the digestion of 100K and to discern the cleavage fragments, electroeluted <sup>35</sup>S-Met labeled 100K was digested with adenain. On this substrate only the pVIc cofactor stimulated the digestion of 100K yielding a major fragment of about 60 kDa and minor fragments of approximately 40 and 14 kDa (Fig. 4, panel B, lanes e-g). This confirms the 60 kDa fragment seen above, and the potential degenerate cleavage site at residue 559.

Considering the function of 100K during infection, and the post-encapsidation activation of adenain, it is unlikely that 100K is digested during the infection cycle. The observed cleavages discussed above have a bearing on the *in vitro* specificity of adenain but do not imply a physiological role in virus infection.

### 3.5. Digestion of V and VII

Adenovirus DNA is packaged in association with basic proteins VII and mu and also protein V. None of these mature proteins have adenain consensus sites. Protein V is part of the core and also makes contact with the penton base via protein VI (Matthews and Russell, 1995; Stewart and Burnett 1995). We therefore asked if proteins V and VII were resistant to hydrolysis by adenain *in vitro*. Surprisingly <sup>35</sup>S-Met labeled electroeluted protein V was digested by adenain into small fragments (Fig. 5, lanes d-f). Protein V contains only two putative cryptic sites, APGL<sup>212</sup>-GVQT and REGG<sup>354</sup>-RTL<sup>V</sup>, which would not be sufficient to account for the observed cleavage products.

The <sup>35</sup>S-Met labeled electroeluted major core protein VII was digested into 17 kDa and 13 kDa fragments (Fig. 5, lanes i-k). Possible sites which may account for these fragments are LAAG<sup>123</sup>-IVTV and SVSG<sup>163</sup>-LRVP. It should be noted that for both protein V and VII the digestion only occurred in the presence of activating peptide pVlc, thus confirming that the hydrolysis was due to adenain and not a contaminating enzyme.

As in the case of 100K above, these results do not imply that proteins V and VII are cleaved during virus infection in any part of the life cycle.

### 3.6. Substrate specificity of cysteine proteases of the adenain family (clan CE)

Adenain specificity was shown to be determined by P<sub>4</sub>, P<sub>2</sub> and P<sub>1</sub> or P<sub>1</sub>' residues (Webster et al., 1989). The P<sub>3</sub> position didn't appear to contribute to the specificity of recognition. The side chain of P<sub>1</sub> is oriented in a direction away from those of the critical P<sub>4</sub> and P<sub>2</sub> residues (Ding et al., 1996). When Gly occupies the P<sub>1</sub>' position (site type XGXG), any amino acid, with the apparent exception of P,C,G and M, is acceptable at P<sub>1</sub>. Moreover if another amino acid is in the P<sub>1</sub>' position (site type XGGX), there are more restrictions at P<sub>1</sub> as only Gly can occupy this position and the side chain of the P<sub>1</sub>' residue must be oriented away from the scissile bond. Some restrictions were also observed at position P<sub>1</sub>' when Gly occupies the P<sub>1</sub> position: C,P,D,Q,H,Y,W appeared to be excluded. Ding et al., (1996)

observed that the P<sub>3</sub> residue could be any amino acid because its side chain points away from the enzyme. The observations drawn from the databank sequences showed that some amino acids never occupied this position: C,P,D,H,Y,W for site type XGXG and C,D,L,W for site type XGGX.

Regions of papain, the main cysteine protease of clan CA (Barrett and Rawlings, 2001), where substrates bind can be compared to similar regions in adenain. The substrate binding sites of adenain are located to the left L- and right R- of the active site cleft. Loops coming out of the core of the R and L domains embrace the binding sites. On the left the 150-154 residues loop form the area within which P<sub>3</sub> residues attach, termed the S<sub>3</sub> binding area. The form of the S<sub>1</sub> binding site is also a loop, however it is constructed from parts of the loops embracing the S<sub>3</sub> and S<sub>2</sub>' binding sites and enclosed at the top by the conserved disulfide bridge formed between Cys104 of adenain and Cys10' of the cofactor pVIc. The S<sub>2</sub>' binding site is formed by the 122-116 loop, the reversed numbering indicating that chain 122-119 is also a part of the S<sub>1</sub> binding site and that the 118-115 residues are further away from the binding site. The top of the R domain is formed by two broad loops placed on top of each other. The upper loop 71-76 forms the base on top of which the lower loop 45-54 residues reside. The extent of the substrate binding sites on adenain can explain the broad range of amino acids accepted in the seven subsites surrounding the cleavable bond.

So far, adenain seems to be the most specific cysteine protease when compared to other cysteine proteases of the clan CE. The yeast Ulp1 favours Gly residues in both P<sub>1</sub> and P<sub>2</sub>. The bacterial YopJ and its homologues have similar specificity but the requirements are restricted to a XGGX sequence. Despite the extent of the adenain active site and the numerous amino acids implicated in its active site groove, there are more requirements in the sequence recognized and effectively cleaved by adenain. Indeed the S<sub>2</sub> (which accommodates only Gly except for adenovirus serotypes) and S<sub>1</sub> or S<sub>1</sub>' (which accommodates only Gly in the preferred sequence XGGX or XGXG respectively, except again for the adenovirus serotypes) substrate binding sites exhibit diversity and selectivity against substrate and inhibitors. This observation suggests that theoretically it should be possible to find highly specific inhibitors to adenain which have no effect on other, even related proteases (Pang et

*al.*, 2001).

### **Acknowledgements**

This research was supported by a grant (MT4164) from the Canadian Institutes of Health Research to J.M.W.

### **References**

- Allen, C.M., Sharman, W.M., La Madeleine, C., Weber, J.M., Langlois, R., Ouellet, R. and Van Lier, J.E. (1999). Photodynamic therapy : tumor targeting with adenoviral proteins. *Photochem. Photobiol.* 70, 512-523
- Barrett, A.J., and Rawlings, N.D. (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.* 382, 727-733.
- Cotten, M. and Weber, J.M. (1995). The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology* 213, 494-502.
- Cuesta, R., Xi, Q. and Schneider, R. (2000). Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *The EMBO J.* 19, 3465-3474.
- Ding, J., McGrath, W.J., Sweet, R.M. and Mangel, W.F. (1996). Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *EMBO J.* 15, 1778-1783.
- Diouri, M., Keyvani-Amineh, H., Geoghan, K.F. and Weber, J.M. (1996). Cleavage efficiency by adenovirus protease is site-dependent. *J. Biol. Chem.* 271, 32511-32514.
- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P. and Helenius, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75, 477-486.
- Greber, U.F., Singh, I. and Helenius, A. (1994). Mechanisms of virus uncoating. *Trends in Microbiology* 2, 52-56.
- Greber, U.F., Webster, P., Weber, J.M. and Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *EMBO J.* 15, 1766-1777.

- Greber, U.F. (1998). Virus assembly and disassembly : the adenovirus cysteine protease as a trigger factor. *Reviews in Medical Virology* 8. 213-222.
- Hayes, B.W., Telling, G.C., Myat, M.M., Williams, J.F. and Flint, S.J. (1990). The adenovirus L4 100K kilodalton protein is necessary for efficient translation of viral late mRNA species. *J. Virol.* 64, 2732-2742.
- Jornvall, H., Akusjarvi, G., Alestrom, P., von Bahr-Lindstrom, H., Pettersson, U., Appella, E., Fowler, A.V. and Philipson, L. (1981)a. The adenovirus hexon protein. The primary structure of the polypeptide and its correlation with the hexon gene. *J.Biol.Chem.* 256, 6181-6186.
- Jornvall, H., and von Bahr-Lindstrom, H. (1981)b. Fractionation of CNBr fragments and primary structures of peptides of the adenovirus hexon protein. *J.Biol.Chem.* 256, 6187-6198.
- Keyvani-Amineh, H., Labrecque, P., Cai, F., Carstens, E.B. and Weber, J.M. (1995). Adenovirus protease expressed in insect cells cleaves adenovirus proteins, ovalbumin and baculovirus protease in the absence of activating peptide. *Virus Res.* 37, 87-97.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Lee, P. and Hraby, D.E. (1994). Proteolytic cleavage of vaccinia virus virion proteins. Mutational analysis of specificity determinants. *J.Biol. Chem.* 269, 8616-8622.
- Lehmberg, E., Traina, J.A., Chakel, J.A., Chang, R.J., Parkman, M., McCaman, M.T., Murakami, P.K., Lahidji, V., Nelson, J.W., Hancock, W.S., Nestaas, E., Pungor, E. Jr. (1999). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the adenovirus type 5 proteome. *J. Chromatog. B, Biomed. Sci. Applic.*, 732, 411-423.
- Li, S. and Hochstrasser, M. (1999). A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-251.
- Lopez-Otin, C., Simon-Mateo, C., Martinez, L. and Vinuela, E. (1989). Gly-Gly-X, a novel consensus sequence for the proteolytic processing of viral and cellular proteins. *J.Biol.Chem.* 264, 9107-9110.
- Matthews, D.A. and Russell, W.C. (1995). Adenovirus protein-protein interactions :



- molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J.Gen.Virol.* 76, 1959-1969.
- Pang, Y.P., Xu, K., Kollmeyer, T.M., Perola, E., McGrath, W.J., Green, D.T. and Mangel, W.F., (2001). Discovery of a new inhibitor lead of adenovirus proteinase : steps toward selective, irreversible inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters* 502, 93-97.
- Ruzindana-Umunyana, A., Sircar, S., Schick, C., Silverman, G.A. and Weber, J.M. (2000). Adenovirus endopeptidase hydrolyses human squamous cell carcinoma antigens *in vitro* but not *ex vivo*. *Virology* 268, 141-146.
- Ruzindana-Umunyana, A. and Weber, J.M. (2001). Interactions of human lacrimal and salivary cystatins with adenovirus endopeptidase. *Antiviral Research* 51, 203-214.
- Stewart, P.L., and Burnett, R.M. (1995). Adenovirus structure by X-ray crystallography and electron microscopy. *Curr. Topics Micro. Imm.*(W.Doerfler and P.Bohm, Eds) 199/I, 25-38 Springer-Verlag, Berlin.
- Strunnikov, A.V., Aravind, L. and Koonin, E.V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics* 158, 95-107.
- Thomson, D., Meers, J. and Harrach, B. (2002) Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Virus Res.* 83 (1-2), 189-195.
- Tremblay, M., Dery, C., Talbot, B. and Weber, J.M. (1983) *In vitro* cleavage specificity of the adenovirus type 2 proteinase. *Biochim.Biophys.Acta*, 743, 239-245.
- Weber, J.M., Cai, F., Murali, R. and Burnett, R.M. (1994) Sequence and structural analysis of murine adenovirus type 1 hexon. *J.Gen.Virol.*, 75, 141-147.
- Weber, J.M. (1995) The adenovirus endopeptidase and its role in virus infection. In "Molecular Repertoire of Adenoviruses" Vol.199/I, *Curr. Top. Micro. Imm.*, (W.Doerfler and P.Bohm, Eds), pp.227-235, Springer-Verlag, Berlin.
- Weber, J.M. (1999) Role of endopeptidase in adenovirus infection. In "Adenoviruses : From Basic Research to gene Therapy Application" (P.Seth, Ed.), Humana Press, Clifton, NJ.

- Webster, A., Russell, S., Talbot, P., Russell, W.C. and Kemp, G.D. (1989). Characterization of the adenovirus proteinase substrate specificity. *J.Gen.Virol.* 70. 3225-3234.**
- Webster, A., Leith, I.R., Nicholson, J., Hounsell, J. and Hay, R.T. (1997) Role of preterminal protein processing in adenovirus replication. *J. Virol.*, 71, 6381-6389.**
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. and Hancock, R. (1981) Silver staining in proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118, 197-203.**

**TABLE 1****Frequency of Amino Acids in the Type 1 (XGXG) Consensus Cleavage Site of Adenain**

Amino acid	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
Cys	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser	-	10	-	15	-	11	12	15
Thr	-	12	-	29	-	6	17	6
Pro	-	-	-	-	-	1	17	2
Ala	-	16	6	6	-	8	11	5
Gly	-	15	123	-	129	7	6	11
Asn	-	1	-	12	-	4	5	8
Asp	-	-	-	5	-	-	6	5
Glu	-	1	-	2	-	3	3	9
Gln	1	8	-	3	-	-	13	1
His	-	-	-	4	-	1	3	2
Arg	-	38	-	12	-	14	16	20
Lys	-	3	-	5	-	-	11	2
Met	30	1	-	-	-	2	-	-
Ile	23	3	-	1	-	12	-	5
Leu	75	7	-	12	-	31	2	14
Val	-	13	-	6	-	25	3	9
Phe	-	1	-	11	-	2	3	13
Trp	-	-	-	1	-	1	-	-
Tyr	-	-	-	5	-	1	1	2
Absent aa		C,P,D, H,W,Y		C,P,G, M		C,D,Q, K	C,M,I, W	C,M,W

**TABLE 2****Frequency of Amino Acids in the Type 2 (XGGX) Consensus Cleavage Site of Adenain**

Amino acid	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
Cys	-	-	-	-	-	-	-	2
Ser	-	23	-	-	11	4	14	12
Thr	-	9	-	-	1	14	13	-
Pro	-	3	-	-	-	2	19	2
Ala	-	30	-	-	64	13	7	15
Gly	-	8	145	145	7	1	16	17
Asn	-	8	-	-	1	1	14	2
Asp	-	-	-	-	-	1	-	-
Glu	-	2	-	-	1	4	18	2
Gln	-	4	-	-	-	3	10	2
His	-	4	-	-	-	2	7	4
Arg	-	23	-	-	10	20	4	22
Lys	-	9	-	-	3	10	5	10
Met	37	2	-	-	3	5	-	-
Ile	6	2	-	-	2	10	3	-
Leu	102	-	-	-	10	23	9	32
Val	-	2	-	-	15	4	3	1
Phe	-	8	-	-	17	26	1	3
Trp	-	-	-	-	-	1	2	19
Tyr	-	8	-	-	-	-	1	-
Absent aa	-	C,D,L,W	-	-	C,P, D,Q H,Y W	C,Y	C,D,M	T,D,I M.Y

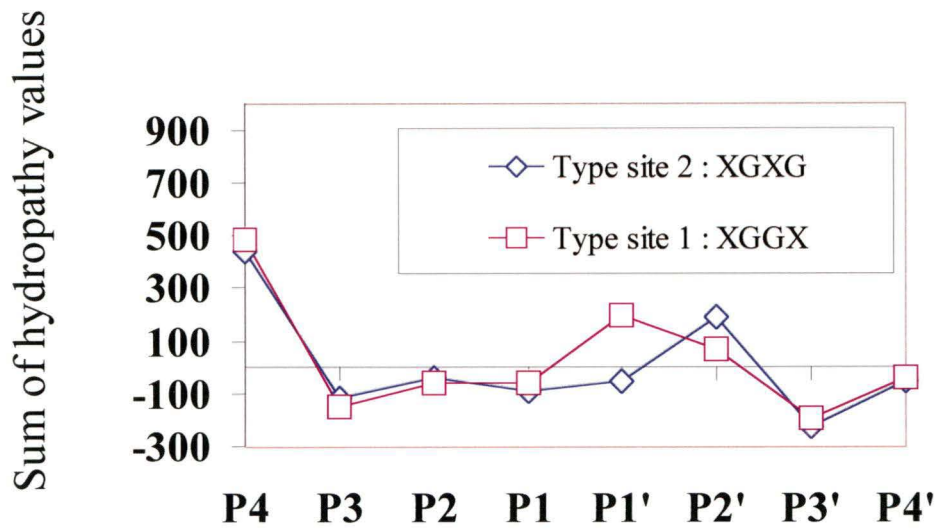


Fig.1. The sum of the hydropathy index (Kyte and Doolittle, 1982) of the amino acids found in each position for the two types of processing sites.

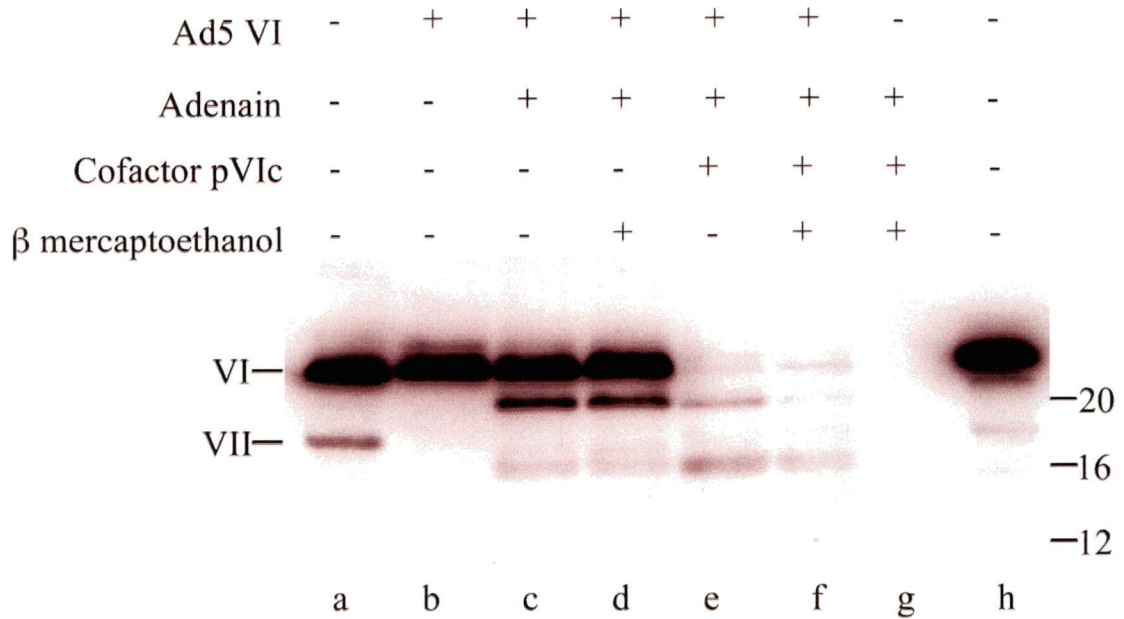


Fig.2. Cleavage of capsid protein VI by adenain. The reaction mixtures contained HPLC purified native protein VI, 0.5  $\mu$ g of adenain, and with or without 40  $\mu$ M pVIc or  $\beta$ -mercaptoethanol (1mM). Reactions were incubated at 37°C for 18h, stopped by boiling in lysing solution, subjected to SDS-PAGE, blotted, and reacted with 25 $\mu$ l of anti-VI serum followed by  $^{125}$ I-labeled protein A. Lane a,  $^{35}$ S-Met labeled Ad2 marker virus. Lane h contains the unlabeled wild type virus as control.

A

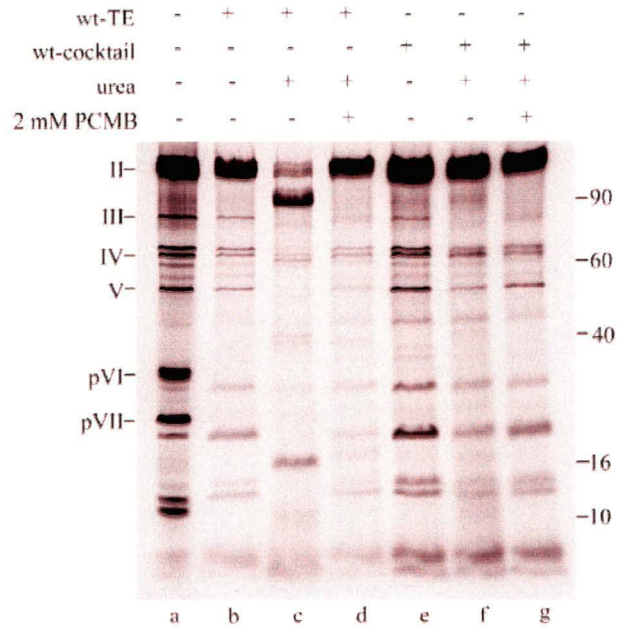


Fig.3. Cleavage of capsid protein hexon by adenain. Panel A : Effect of urea on the digestion of virion hexon by endogenous protease. CsCl gradient purified  $^{35}\text{S}$ -Met labeled Ad2 was dialyzed either with TE buffer or cocktail to preserve its structural integrity and was exposed to 4M urea for 2 hours at 4°C and then diluted to reduce urea concentration to 0.66M and incubated overnight at 37°C. Lane a,  $^{35}\text{S}$ -Met labeled Ad2 ts1 marker virus.

B

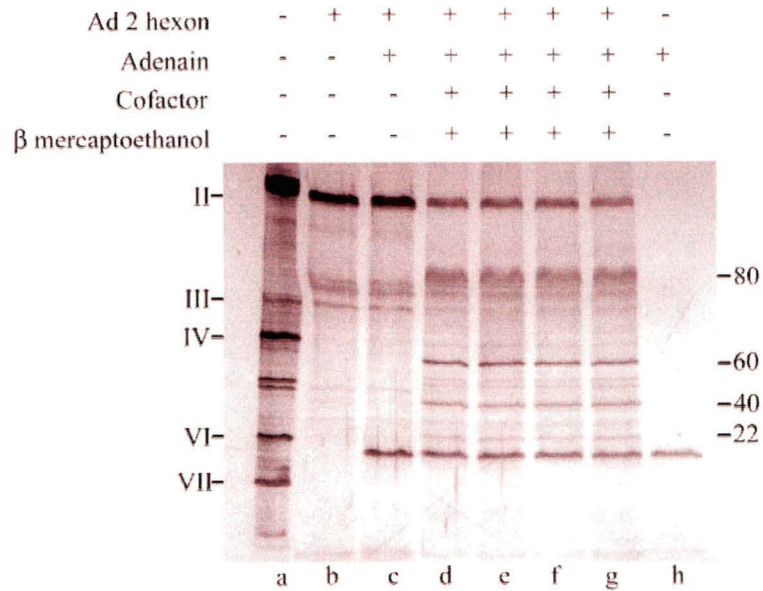


Fig.3. Panel B : Digestion of denatured hexon with recombinant adenain. The reaction mixtures contained HPLC purified heat denatured hexon, 0.5  $\mu$ g of adenain, and with or without 40  $\mu$ M pVIc or  $\beta$ -mercaptoethanol. Reactions were incubated at 37°C for 18h, stopped by boiling in lysing solution, subjected to SDS-PAGE and stained with silver nitrate (Wray et al., 1981). The  $\beta$ -mercaptoethanol concentration was varied (lane d : 100 $\mu$ M, lane e: 500 $\mu$ M and lane f : 1 mM). Lane g shows the effect when the cofactor and the  $\beta$ -mercaptoethanol are preincubated 3 hours before addition to the mixture of hexon and adenain. Lane a, Ad2 wt marker virus.



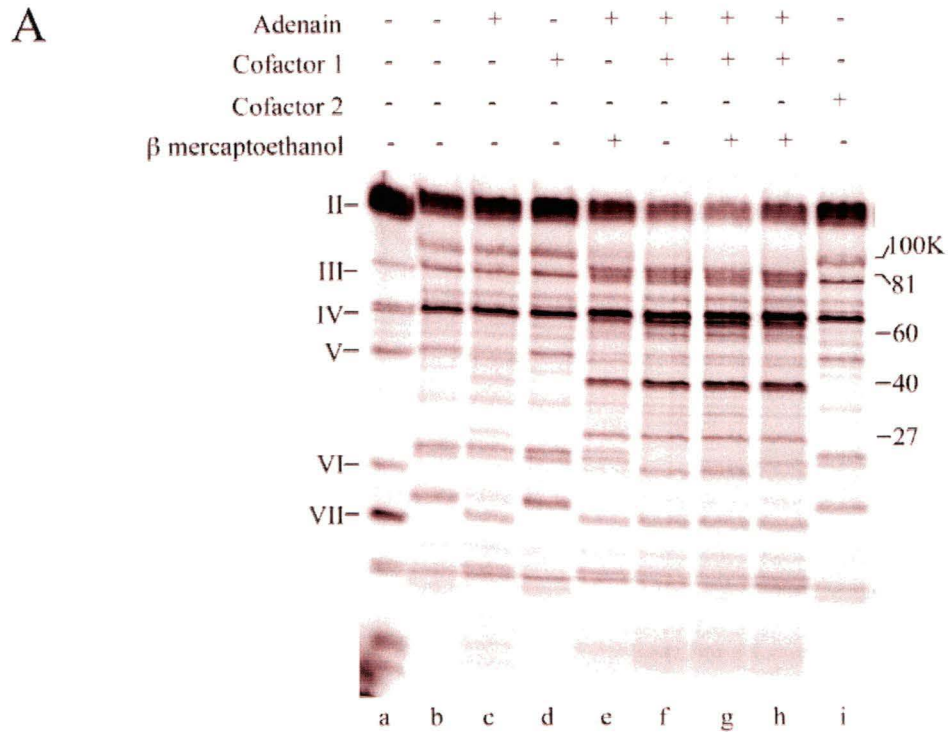


Fig.4. Digestion of 100K nonstructural protein by adenain. Panel A : the reaction mixture contained  $^{35}\text{S}$ -Met labeled Ad2 ts1-39 cell lysates boiled for 3 minutes (lane b-i), 0.4  $\mu\text{g}$  adenain, cofactor 1 (intact pVIc) or cofactor 2 (boiled pVIc, to inactivate possible contaminating proteases),  $\beta$ -mercaptoethanol. After overnight incubation, the proteins were separated by SDS-PAGE and autoradiographed. In lane h the cofactor 1 and  $\beta$ -mercaptoethanol were mixed and preincubated before adding to the substrate mixture. Lane a, labeled Ad2 wt marker virus.

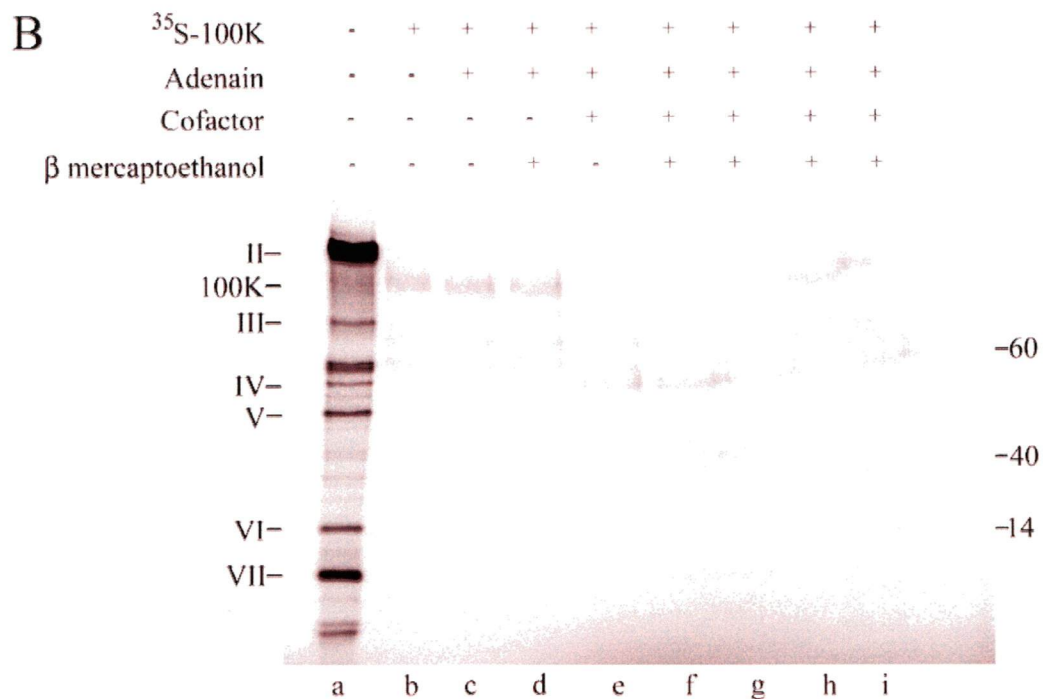


Fig. 4. Panel B : the reaction mixture contained <sup>35</sup>S-Met labeled electroeluted 100K, 0.4 μg of adenain, 40 μM pVIc, 1mM β-mercaptoethanol. Reactions were incubated at 37°C for 18h, stopped by boiling in lysing solution, subjected to SDS-PAGE, and autoradiographed. Lane a, <sup>35</sup>S-Met labeled Ad2 wt marker virus. Lane g, the reaction mixture also contained pyridine lysed Ad2 ts1-39 virus as unlabeled competitor. Lane h, intact Ad2 ts1-39 virus as unlabeled competitor. Lane i, pyridine lysed Ad2 ts1-33 virions as a partially competing control.

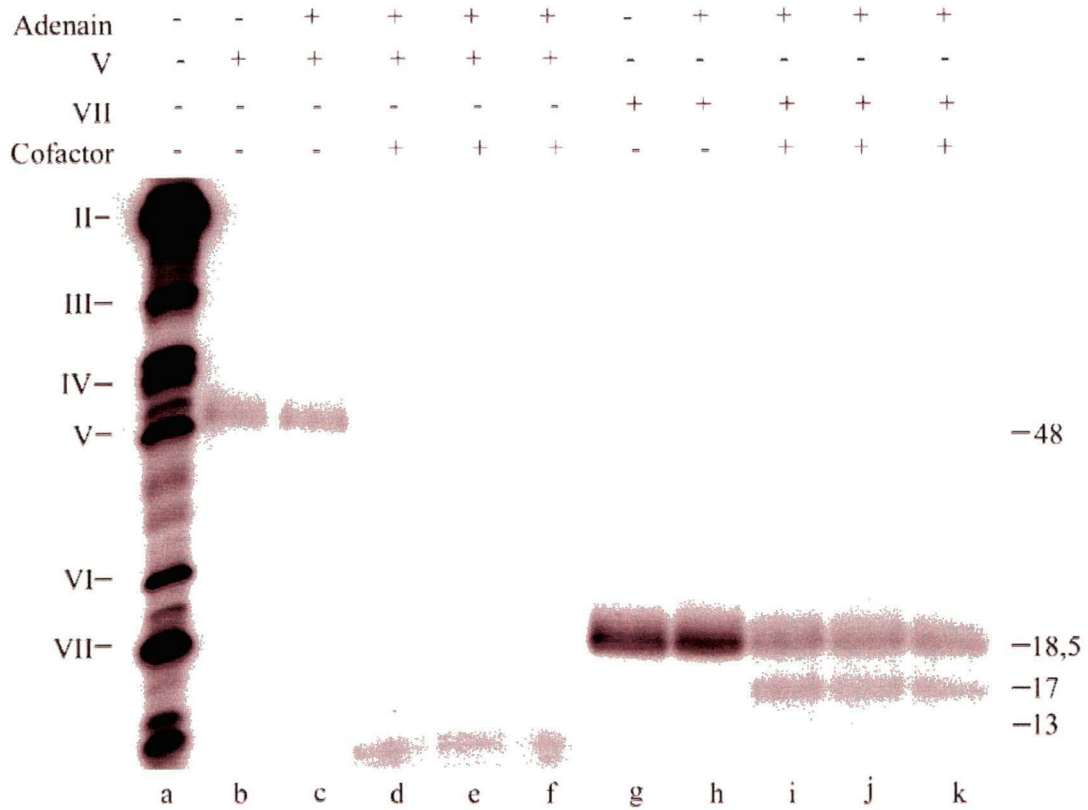


Fig.5. Digestion of core proteins V and VII by adenain. The reaction mixtures contained electroeluted  $^{35}\text{S}$ -Met labeled protein V (lanes b-f) or VII (lanes g-k) , varying amounts of adenain, and with or without  $40\ \mu\text{M}$  pVIc or  $\beta$ -mercaptoethanol ( $1\text{mM}$ ). Reactions were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 18h, stopped by boiling in lysing solution, subjected to SDS-PAGE, and autoradiographed. Lane a,  $^{35}\text{S}$ -Met labeled Ad2 marker virus; lanes c,f,h,k  $0.4\ \mu\text{g}$  of adenain; lanes d and i  $0.07\ \mu\text{g}$  of adenain; lanes e and j  $0.15\ \mu\text{g}$  of adenain.

### **III. DISCUSSION**

Les protéases encodées par des virus sont des cibles attrayantes pour le développement des thérapies antivirales. Ces enzymes sont essentielles pour la synthèse de particules infectieuses. Parmi les virus codant de telles protéases et ayant le plus d'importance médicale figurent notamment les poliovirus, les rhinovirus, les hépatites A et C, les virus influenza, les virus herpès, les virus HIV et les adénovirus (Kräusslich et Wimmer, 1988). Ces protéases ont une spécificité élevée et il est à souhaiter que des inhibiteurs aussi spécifiques peuvent constituer des agents antiviraux efficaces.

La protéase adénovirale, adenain, indispensable à la propagation virale est une cible idéale pour la mise au point d'une stratégie thérapeutique efficace contre les infections adénovirales. L'adenain utilise au moins trois sites géographiquement distincts pour une activité enzymatique optimale. Il s'agit du site actif et des sites de liaison des deux cofacteurs, pVIc et l'ADN. Ces sites ont été caractérisés de façon biochimique (Baniecki et al., 2001; McGrath et al., 2001a, 2001b) et la structure cristallographique du complexe adenain-pVIc à une résolution de 2.6 Å est connue depuis 1996 (Ding et al., 1996).

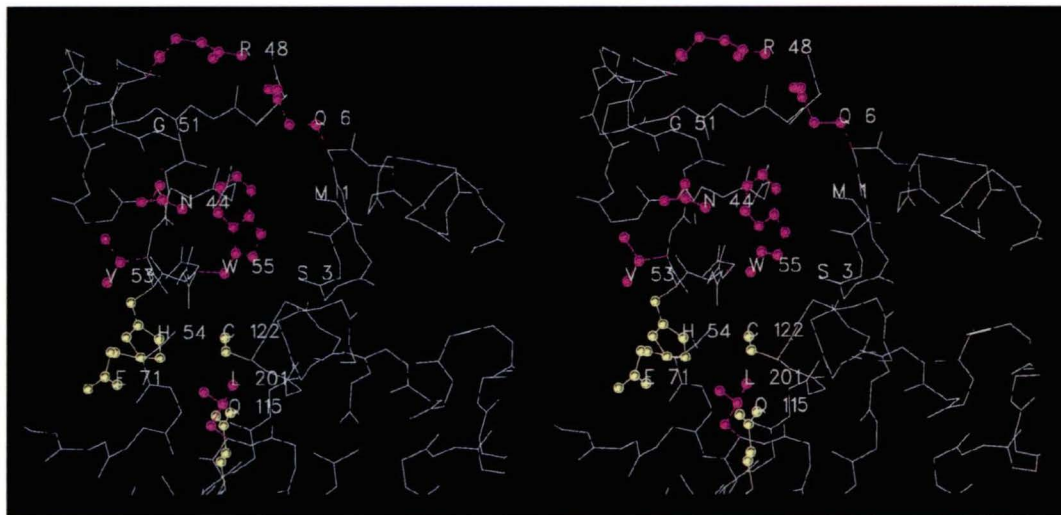
#### **A. CIBLE 1 : Le site actif**

Le site actif de l'adenain se situe à la surface de la molécule et est logé dans une longue cavité d'environ 25 Å de profondeur et 8 Å de largeur (figure 10). Le cinquième feuillet  $\beta$  allant du N terminus forme une portion d'une des parois de la cavité. Les résidus 51 à 55 forment une partie d'une autre paroi et de la base de la cavité. Le reste de la base de la

cavité est essentiellement formé par l'hélice  $\alpha$ -4. Les résidus 2 à 5 forment une autre paroi. L'azote du résidu Gly2 forme un pont H avec l'oxygène du groupement carbonyle du résidu Ala195, la chaîne latérale du Glu5 forme une paire d'ions avec la chaîne latérale du résidu Arg48, ce qui ferme effectivement la cavité. La Cys122 et l'His54 qui forment la paire d'ions impliquée dans la catalyse, sont situées respectivement sur la paroi et la base de la cavité. Le Glu71, troisième partenaire de la triade catalytique, est à l'intérieur de la molécule et la Gln115, partie intégrante de l'orifice oxyanion, fait aussi partie de la base de la cavité à l'opposé de l'His54. Contrairement à la papaïne où la cavité du site actif est continue, celle du complexe adenain-pVIc est interrompue. En effet, au milieu de la cavité, le résidu conservé Trp55 émerge de la base et participe dans les sites de liaison aux substrats, de P<sub>2</sub> à P<sub>4</sub>. La cavité est obstruée par la formation d'une paire d'ions entre les chaînes latérales des résidus Arg48 et Glu5. Il y a 7 molécules d'eau qui interagissent directement avec l'adenain. Puisque les positions de ces molécules d'eau sont connues au niveau atomique, leur mécanisme de liaison peut être incorporé dans une matrice dans le design des structures d'inhibiteurs (Lam et al., 1994).

L'adenain est à la fois différente et similaire à la papaïne et cela peut être exploité dans le design des inhibiteurs uniques à l'adenain. Par exemple, plusieurs agents de faibles poids moléculaires sont connus pour être des inhibiteurs de la papaïne. Leurs contacts avec le site actif de la papaïne sont connus puisqu'ils ont été cocrystallisés avec la papaïne et les structures de ces complexes résolues par diffraction aux rayons-X. Les régions de la papaïne où les inhibiteurs se lient sont comparables à des régions similaires de l'adenain. Ainsi des inhibiteurs de la papaïne peuvent être redessinés en tenant compte des différences dans ces régions. Par exemple, la E-64, N-[-(L-3-transcarboxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine, est un excellent

inhibiteur de la papaïne (Czaplewski et al., 1999) mais n'inhibe pas l'adenain (Sircar et al., 1996). Il serait dès lors possible de faire un nouveau design de E-64, en retenant les éléments nécessaires aux contacts similaires, en insérant des éléments requis pour des contacts propres à l'adenain de telle sorte que le composé résultant devienne un inhibiteur de l'adenain et non pas de la papaïne.



(Tiré de Ding et al., 1996).

**Figure 10 : Vue de la poche de spécificité de l'adenain. Les résidus conservés potentiellement impliqués dans les liaisons avec les substrats sont colorés. Les résidus hydrophobes de la poche sont coloriés en magenta, les résidus du site actif en jaune, les autres résidus qui pourraient interagir sont en gris.**

### A.1. Candidats inhibiteurs I : Les inhibiteurs de la papaïne

En vue de comparer leurs potentiels inhibiteurs relatifs sur les deux enzymes, la papaïne et l'adenain, deux analogues de substrats de la papaïne de type nitrile et un peptide nitrile ont été choisis (Sircar et al., 1998). La benzamidoacétonitrile, BAN, un inhibiteur compétitif puissant de la papaïne (Sluyterman et Wijdenes, 1973; Brisson et al., 1986) inhibe l'adenain de façon plus efficace comparée à l'inhibition de la papaïne par le même agent (Sircar et al., 1998). Les mêmes constatations découlent des essais d'inhibition utilisant l'acétamidonitrile (AAN) qui est également un nitrile, analogue de substrat de la papaïne et dont le mécanisme d'inhibition est réversible. Un peptide nitrile, la N-methoxy phenylalanine glycy l nitrile, MPN, forme une liaison thioimide covalente et réversible entre le groupement nitrile et le groupement sulfhydryl du site actif de la papaïne. Ce peptide se comporte comme un analogue de substrat de la papaïne et inhibe également l'adenain. Lorsque ces agents sont ajoutés dans le milieu de culture durant l'infection, leur capacité d'inhibition est plus élevée lorsque l'addition se fait tard dans l'infection soit entre 17 et 25 heures post infection. Nous avons démontré par des expériences de pulse-chase que cette inhibition est due à une inactivation de l'adenain plutôt qu'à d'autres effets non spécifiques (Sircar et al, 1998). La cytotoxicité de ces agents n'était pas négligeable, les cellules continuent à pousser à une concentration deux fois plus élevée que la concentration qui inhibe l'adenain. L'index thérapeutique (concentration cytotoxique/concentration effective inhibitrice) obtenu égale au moins 2. De ces expériences, nous avons conclu que les similitudes des sites catalytiques de la papaïne et de l'adenain entraînent des mécanismes catalytiques identiques et par voie de conséquence, ces enzymes sont inhibés par les mêmes agents.

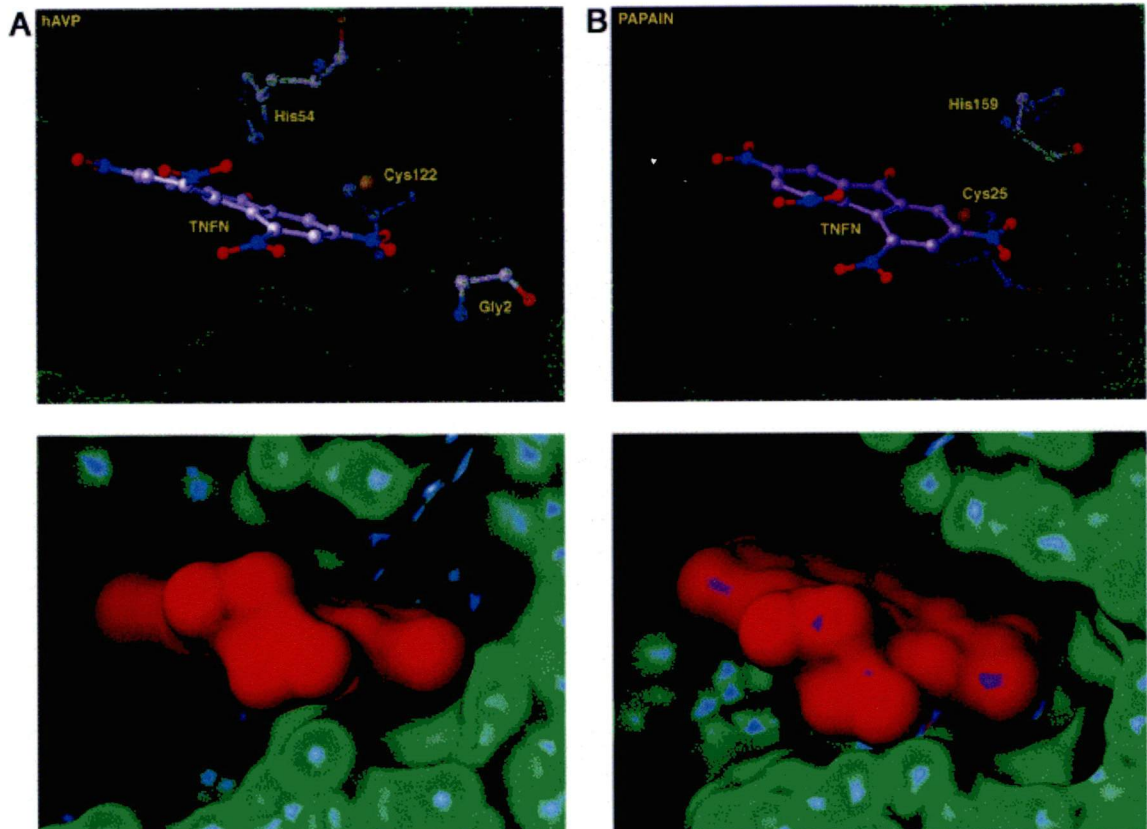
Afin d'obtenir des inhibiteurs sélectifs de l'adenain, il est nécessaire d'exploiter la grande nucléophilicité du groupement SH qui la démarque des sérine protéases au groupement OH moins nucléophile. L'existence d'un ion thiolate rend les cystéine protéases plus réactives en présence d'inhibiteurs tels que les peptidyl nitriles. La portion peptide de ces inhibiteurs est importante pour la vitesse de formation du complexe non covalent enzyme-inhibiteur, ce qui constitue la première phase réversible du mécanisme d'inhibition. Cette portion peptide est importante également pour la stabilité de ce complexe. Durant l'alkylation ou l'acylation du site actif, la phase irréversible est habituellement indépendante de cette portion peptide de l'inhibiteur. Cette étape de l'inhibition est la phase déterminante pour la vitesse et est influencée par l'électrophilicité du groupement réactif de l'inhibiteur et des propriétés du groupement "partant". Cette étape ne diffère pas de façon significative d'une protéase à une autre. Si le groupement partant peut être varié, il est possible alors de réguler la sélectivité parmi les cystéine protéases via la spécificité du site S' de l'enzyme. Quand les inhibiteurs sont utilisés dans des expériences *in vivo*, en plus du problème de sélectivité, se posent des problèmes liés à un environnement plus complexe. Puisque les cystéine protéases cellulaires existent normalement sous forme d'enzymes lysosomales ou cytoplasmiques, l'inhibiteur ne doit pas être chargé de manière à passer rapidement à travers la membrane cellulaire. Par ailleurs, la réactivité des inhibiteurs doit être suffisamment faible pour qu'ils demeurent inertes en présence de groupements thiols divers ou des groupements SH des enzymes non hydrolytiques. Puisque cette faible réactivité des inhibiteurs irréversibles est associée à une sélectivité accrue à l'égard des cystéine protéases au détriment des sérine protéases, les inhibiteurs de choix demeurent des époxydes, des diazocétones, les acyloxyméthylcétones qui sont classés comme des inhibiteurs suicide ou des "quiescent affinity labels". Cependant ces



inhibiteurs demeurent assez réactifs à l'égard de nombreux nucléophiles présents dans l'organisme, ce qui limite le développement de ces inhibiteurs irréversibles comme agents thérapeutiques. Une étude a démontré que des inhibiteurs de cystéine protéases contenant un électrophile vinyl sulfone ne sont pas réactifs en présence de thiols tels que le glutathione et peuvent être effectivement considérés comme inertes en l'absence d'une catalyse enzymatique (Palmer et al., 1995). Cependant, aucun inhibiteur irréversible porteur d'un groupement électrophile vinyl sulfone avec des profils pharmacocinétique et pharmacologique intéressants n'a encore été proposé comme agent thérapeutique.

L'inhibiteur de l'adenain proposé par Pang et al. (2001), le 2,4,5,7,-tétranitro-9-fluorenone, TNFN, a été identifié en utilisant uniquement le site actif de l'adenain d'Ad2 ce qui le rend nettement plus sélectif (figure 11). En effet ce composé agit comme un inhibiteur sélectif irréversible de l'adenain. Cette sélectivité est en partie due au fait que la liaison hydrogène entre le groupement nitro en position 2 du TNFN et l'adenain ne s'établit pas dans le cas de la papaïne comme le démontre un essai de docking (Leytus et al., 1983). Des essais d'inhibition par le TNFN doivent être menés sur d'autres cystéine protéases telles que la chymotrypsin mais aussi sur des composés comportant des groupements thiols sans être des protéases. Cela permettrait de mieux évaluer la sélectivité du TNFN. Par ailleurs, l'étude de Pang et al. (2001) démontre que d'autres modifications structurales du TNFN pourraient conduire à des analogues qui correspondent uniquement au site actif de l'adenain et l'inhibent de façon plus sélective. En consultant la banque de données des drogues MDL (San Leandro, CA, USA) de 2001, on se rend compte que 2% des drogues lancées contiennent des groupements arylnitro, ce qui indique que ces groupements ne sont pas toxiques. Proposer de tels groupements dans la conception des inhibiteurs de cystéine protéases en général et de

l'adenain en particulier est donc raisonnable.



*(Tiré de Pang et al., 2001)*

**Figure 11 : Les modèles des complexes les plus stables énergétiquement établis entre l'adenain (hAVP, human adenovirus proteinase) et le TNFN (A). En (B) TNFN-papaïne. Ces modèles sont générés par le programme EUDOC et démontrent une complémentarité étroite entre le TNFN (en rouge) et le site actif de l'enzyme (en vert).**

Des inhibiteurs contenant ces groupes arylnitro sont sélectifs puisqu'ils sont conçus de façon à ne pas correspondre aux sites actifs des autres protéases. Le risque d'une réaction entre ces composés et la cystéine du site actif d'autres protéases est nul du fait d'une faible réactivité chimique du groupement arylnitro comparativement à la réactivité chimique des composés contenant des thiols ou des analogues de l'iodoacétate. De plus, ces composés sont irréversibles puisqu'ils subissent une substitution aromatique nucléophile due à un effet de voisinage dans la cinétique chimique, cela se produisant uniquement lorsqu'ils se lient au site actif de l'enzyme ciblée. Une telle approche est nouvelle puisqu'un composé arylnitro de réactivité chimique moindre a été pour la première fois proposé pour réagir avec le résidu cystéine du site actif et ainsi provoquer une inhibition irréversible contrairement à l'usage des agents réactifs tels que les composés contenant des thiols ou des analogues d'iodoacétate (Veber et Thompson, 2000; Erlanson et al., 2000). L'importance de cette méthode de substitution nucléophile pour le design et le développement d'inhibiteurs sélectifs et irréversibles de cystéine protéases repose sur le fait que la plupart des inhibiteurs irréversibles des cystéine protéases ne sont pas sélectifs puisqu'ils sont chimiquement réactifs et petits en taille (Zech et al., 1999; Saura et al., 1999; Xian et al., 2000). Les agents alkylants communément utilisés comme l'iodoacétate ou la N-ethylmaleimide accommodent le site actif de n'importe quelle cystéine protéase et ainsi peuvent alkyler n'importe quelle cystéine protéase. Pour les mêmes raisons, l'oxyde nitrique pourra nitrosyler l'atome de soufre de n'importe quel résidu cystéine impliqué dans une catalyse. Bien que des recherches récentes aient démontré que les composés S-nitrosothiols peuvent masquer le résidu cystéine catalytique par la formation d'un pont disulfure (Xian et al., 2000; Percival et al., 1999; Mohr et al., 1999), ces composés ne peuvent pas être utilisés comme inhibiteurs sélectifs de cystéine

protéases. En effet, ces S-nitrosothiols peuvent inhiber d'autres cystéine protéases comme l'oxyde nitrique, libéré par homolyse, peut réagir avec n'importe quelle cystéine protéase.

## A.2. Candidats inhibiteurs II : Les serpins

Outre ces composés synthétisés chimiquement, nous nous sommes intéressés aux inhibiteurs de nature protéique et de préférence ceux exprimés naturellement dans les sites d'infection par les adénovirus. Nous avons également maintenu notre démarche qui consistait à tester des inhibiteurs qui inhibent déjà la papaïne. Pour toutes ces raisons et d'autres expliquées plus loin, nous avons choisi des serpins et des cystatins (Ruzindana-Umunyana et al., 2000a; Ruzindana-Umunyana et Weber, 2001).

Les serpins (serine proteinase inhibitors) constituent une superfamille de protéines d'environ 350 à 500 acides aminés, présentes chez les métazoaires, les plantes, les animaux et les virus (Hunt et Dayhoff, 1980). Les serpins représentent les protéines majeures du plasma chez les vertébrés et jouent des rôles essentiels dans la régulation de l'activité des sérine protéases impliquées dans les processus physiologiques aussi variés que la coagulation, la fibrinolyse, l'apoptose, l'inflammation, le remodelage de la matrice, l'activation du complément et la différenciation cellulaire (Gettins et al., 1996). Paradoxalement, plusieurs recherches ont démontré que certains de ces inhibiteurs naturels de sérine protéases se lient aux cystéines protéases de type papaïne et les inhibent (Potempa et al., 1994), ce qui a permis de les qualifier d'inhibiteurs "cross-class". C'est le cas de la serpin virale CrmA (Cytokine response modifier A) qui inhibe la caspase 1, une cystéine protéase (Komiyama et al., 1994). Par ailleurs, certains membres de cette superfamille ne fonctionnent plus comme inhibiteurs

de protéases mais assument d'autres rôles (Potempa et al., 1994; Silverman et al., 2001) comme dans le transport hormonal (SERPINA6), la liaison des corticostéroïdes (SERPINA7) et dans la régulation de la pression sanguine (SERPINA8).

Deux isoformes de l'antigène du carcinome squameux cellulaire, SCCA1 et SCCA2, ont été identifiés, clonés et caractérisés comme étant membres de la superfamille des serpins (Schneider et al., 1995; Schick et al., 1997, 1998). Ils présentent une grande homologie de séquence (92%) mais diffèrent de façon significative au niveau de leur site réactif. RSL (reactive site loop) et au niveau des classes de protéases qu'ils inhibent. SCCA1 inhibe les cystéines protéases de type papaïne, les cathepsins S, L, et K (Schick et al., 1998a,b) tandis que SCCA2 inhibe des sérine protéases de type chymotrypsine, la cathepsin G et la mast cell chymase (Schick et al., 1997).

Par leur localisation correspondant à un site communément utilisé par les infections adénovirales, ces serpins apparaissaient comme des candidats inhibiteurs endogènes potentiels. Ces serpins sont exprimées notamment dans les cellules épithéliales des voies respiratoires. Nous avons constaté que l'adenain recombinante les clive au niveau de leur RSL en subissant une inactivation partielle à équimolarité. Le RSL n'est pas un site de clivage consensus de l'adenain mais cette dernière reconnaît cette conformation exposée et la clive. Les serpins inhibent l'adenain selon un mécanisme de type substrat suicide semblable au mécanisme impliqué lors de l'inhibition des sérine protéases (Travis et al., 1990; Carrell et Evans, 1992). Dans ces conditions, la protéase ciblée se lie au RSL (figure 12) qui se comporte comme substrat et le site actif de l'enzyme initie l'hydrolyse peptidique. Le clivage au niveau du RSL enlève les contraintes dans la molécule de serpin qui subit alors un réarrangement conformationnel majeur caractérisé par une insertion complète de la boucle au sein d'un

feuille  $\beta$  (Carrell et Evans, 1992). Des études utilisant des sondes dansyl fluorophores pour mesurer la proximité de la serpin et de l'enzyme ont démontré que la protéase attachée de façon covalente au RSL, est transloquée sur une distance de 70Å vers le pôle opposé de la molécule de serpin (Stratikos et Gettins, 1996). Ce changement conformationnel entraîne une distorsion du site actif de la protéase (Plotnik et al., 1996) et enchaîne la serpin et l'enzyme sous forme de complexe covalent stable (Matheson et al., 1991). Les RSL jouent ainsi un rôle critique dans l'inhibition des sérine protéases par les serpins (Carrell et Evans, 1992; Huntington et al., 1997).

L'analyse du mécanisme d'inhibition de la cathépsine S par la SCCA1 a révélé que le RSL est également impliqué dans l'inhibition des cystéine protéases (Schick et al., 1998a,b). Cette découverte a été par la suite confirmée par des recherches qui ont démontré que les profils d'inhibition de SCCA1 et de SCCA2 peuvent être interchangeés en échangeant seulement les séquences de leurs RSLs. De plus, ces études suggéraient que seuls les huit résidus constituant le RSL conféraient la spécificité de l'inhibition des cystéines protéases et non pas d'autres motifs situés à l'extérieur du RSL. Par des études de mutagenèse dirigée des RSL du SCCA1 et du SCCA2 et des analyses cinétiques de leurs molécules mutantes, Luke et al. (2000) ont constaté qu'un seul résidu ne conférait pas la spécificité d'inhibition des cystéine protéases. Cependant lorsque le RSL du SCCA2 était modifié de manière à ressembler au RSL du SCCA1, des changements au niveau de 4 positions (P1, P3', P4' et P11') étaient responsables de 80% des différences dans l'activité inhibitrice des deux serpins à l'égard de la cathépsine S. De plus, la présence d'un résidu Pro à la position P3' était requise pour une inhibition efficace de la cathépsine S par le SCCA1 de type sauvage et le SCCA2 mutant. Des études de modélisation moléculaire suggéraient que ce résidu facilitait l'inhibition

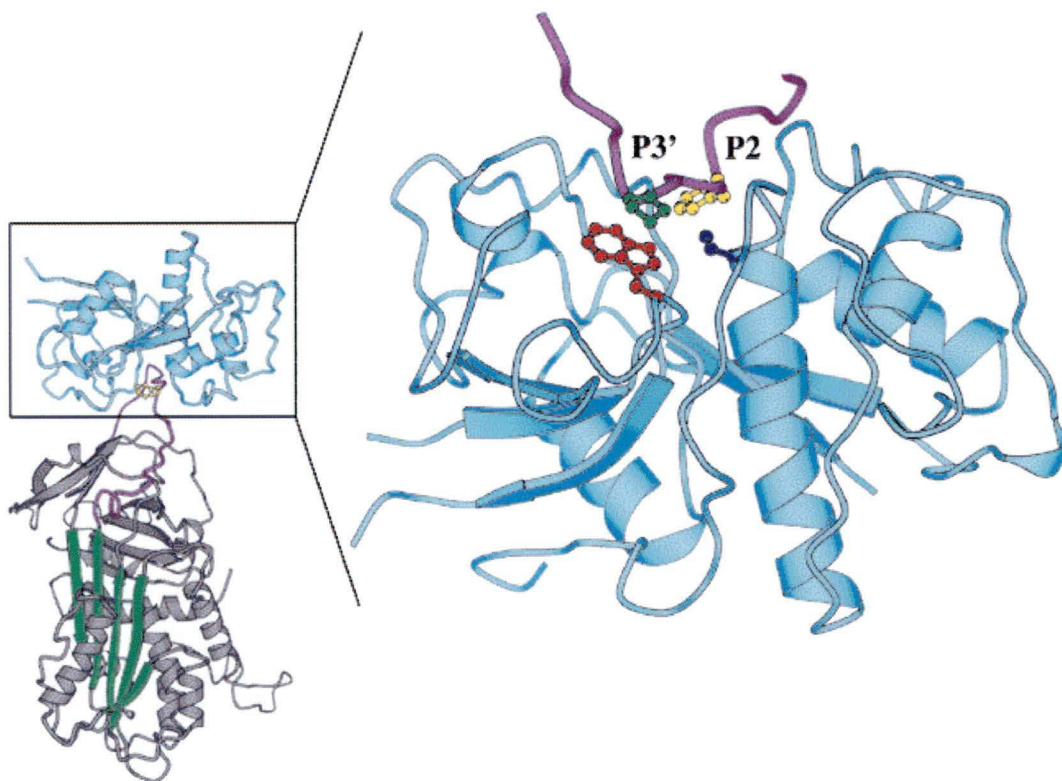
en positionnant le RSL dans le site actif de la cystéine protéase. La séquence du RSL du SCCA1 autour du site de clivage est VVGFG-SSPTS tandis que celle du RSL du SCCA2 est VVVVE-LSSPS. Le RSL du SCCA1 serait plus propice au clivage par l'adenain en tenant compte de sa séquence très similaire à un site de clivage consensus classique de l'adenain (M,I,L) XGX-G. En P4 se trouve le résidu Val hydrophobe comme les habituels résidus Met, Leu ou Ileu du site de clivage consensus. Le profil d'inhibition du SCCA1 démontre que cette serpin est plus efficace comme inhibiteur que ne l'est le SCCA2 (résultats non publiés), ce qui est en accord avec le profil de clivage de cette serpin. Par ailleurs nous n'avons pas détecté de complexe covalent résistant au SDS entre la serpin clivée ou non et l'adenain inactivée. Dans nos cas, ce complexe serait non covalent et provient d'un mécanisme d'inactivation irréversible de l'adenain.

Pour tester si le clivage des serpins et l'inhibition subséquente de l'adenain se produisent *in vivo*, nous avons infecté des lignées cellulaires exprimant SCCA1 pour vérifier si cette protéine est clivée par l'adenain. Une infection virale s'accompagne d'une suppression de la synthèse des protéines de l'hôte. Nous avons cependant constaté que l'expression de SCCA1 dans la lignée recombinante augmente durant l'infection et il n'y a aucune évidence d'un clivage de cette protéine durant l'infection. Nous avons émis l'hypothèse que cette absence de clivage serait dû à un effet de compartimentalisation puisque la serpin est synthétisée dans le cytoplasme et que les molécules de protéase active sont encapsidées dans les particules virales. L'augmentation de l'expression de SCCA1 pourrait être due à plusieurs mécanismes dont une demi-vie accrue, une augmentation de l'expression génique ou les deux. En vue d'étudier ce problème, nous avons suivi l'expression de SCCA1 durant l'infection de la lignée qui exprime naturellement cette protéine. L'expression de SCCA1 demeure

inchangée ce qui démontre que l'augmentation de l'expression de SCCA1 dans la lignée recombinante est due à une stimulation du promoteur artificiel (EF-1 $\alpha$ ). Par ailleurs, les serpins n'ont pas d'effet sur la synthèse des particules virales infectieuses. Ces résultats confirment notre hypothèse selon laquelle les molécules d'adenain ne rencontrent pas et ne clivent pas les serpins. Ces dernières n'inhibent pas non plus l'adenain *in vivo*.

En plus d'inhiber des cystéine protéases, la serpin virale CrmA (cytokine response modifier A) et la serpin humaine antichymotrypsin, ACT, inhibent des sérine protéases granzyme B et cathépsine G respectivement (Beatty et al., 1980; Quan et al., 1995). Puisque le SCCA1 est la 3<sup>ème</sup> serpin qui inhibe les cystéine protéases via un mécanisme dépendant du RSL, cette serpin devrait également être capable d'inhiber des sérine protéases. Mais à l'heure actuelle, aucune sérine protéase cible du SCCA1 n'a été identifiée.





(Tiré de Luke et al., 2000)

**Figure 12 : Modélisation moléculaire de l'interaction entre la cathepsin L et le SCCA1.**  
**À gauche : Modèle du complexe ("docking complex") entre la catL et le SCCA1.** La boucle du site réactif ( Reactive Site Loop, RSL) de la serpin est colorée en magenta, le feuillet A est en vert, le reste de la molécule est en gris. La catL est montrée en cyanure. La figure est préparée en utilisant le programme MOLSCRIPT. **À droite : La cavité du site actif de la catL avec le RSL du SCCA1 (en pourpre).** La cystéine catalytique de la catL est sous forme de "ball-and-stick" en bleu foncé, tandis que la Trp276 est en rouge. La Pro en P3' (en vert et sous forme de "ball-and stick") se rapproche de Trp276 et forme un tour serré hors du site actif de la protéase. Le résidu P2 de SCCA1 est montré en jaune sous forme de "ball-and-stick". Pour mettre en évidence l'interaction RSL-site actif, la figure est tournée à 180° horizontalement comparativement à sa position dans le panneau à gauche.

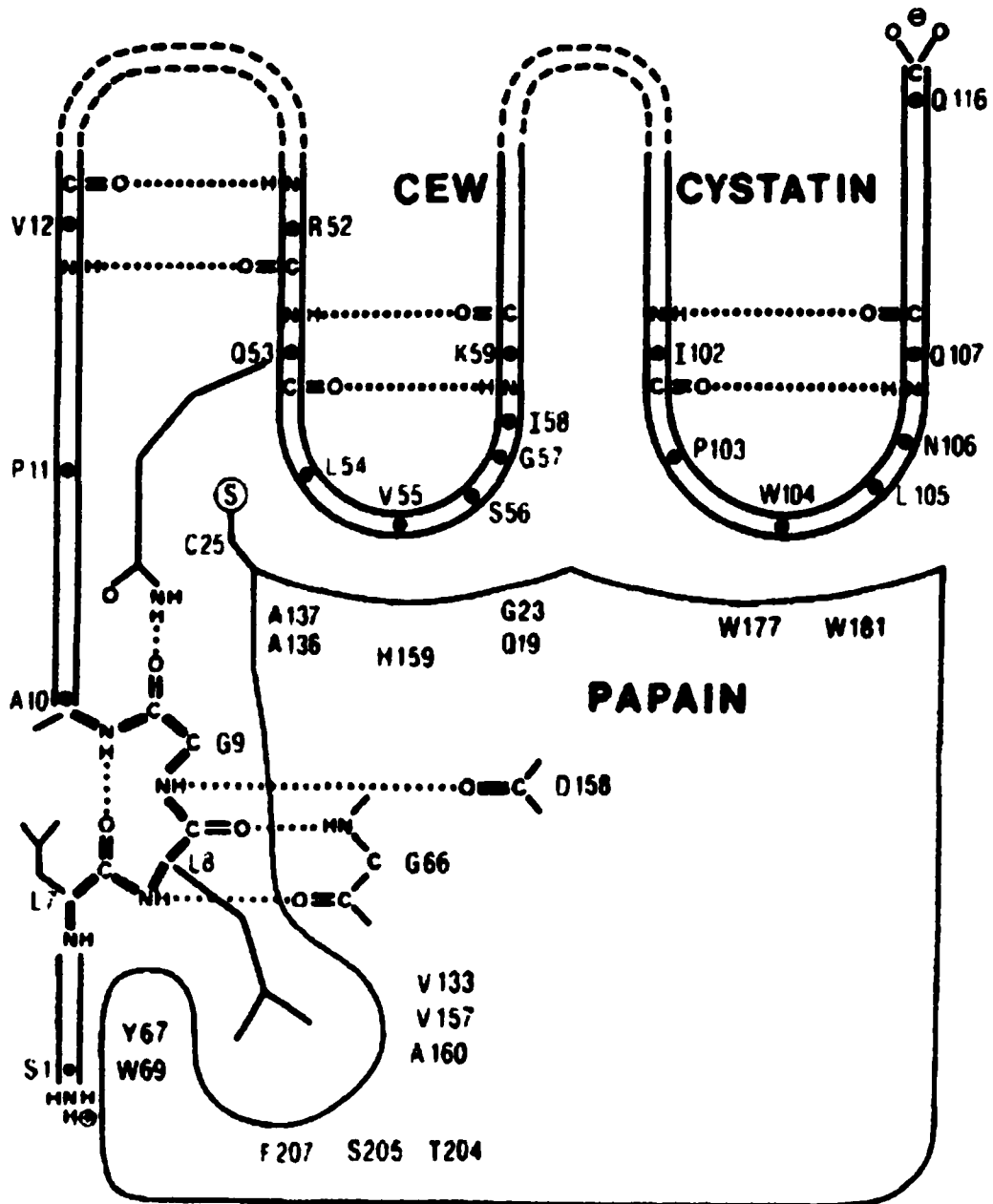
### A.3. Candidats inhibiteurs III : Les cystatins

Vers la fin des années cinquante ont été décrits pour la première fois des inhibiteurs protéiques des cystéines peptidases dans les tissus des mammifères. Ces inhibiteurs, appelés cystatins, constituent une superfamille dont les membres ont évolué à partir d'un gène ancestral commun (Barrett, 1987; Abrahamson, 1994). Les cystatins présentes dans une grande variété de tissus et de liquides biologiques humains, jouent un rôle important dans les processus normaux impliquant l'activité des cystéines protéases comme la résorption des os (Henskens et al., 1996). En plus, diverses conditions pathologiques sont reliées à une augmentation de l'activité des cystéine protéases et donc parfois à un dérèglement de l'activité des cystatins. La cystatin C est exprimée à des concentrations élevées dans l'épididyme, le canal déférent, le cerveau, le thymus, l'ovaire et la glande submaxillaire. Cette cystatin est impliquée dans une forme héréditaire d'hémorragie cérébrale caractérisée par un épaissement des parois artérielles cérébrales avec un dépôt de matériel ayant des caractéristiques de l'amyloïde (Abrahamson et Grubb, 1994; Grubb, 2000). Cette maladie est connue sous le nom d'hémorragie héréditaire cérébrale avec amyloïdose (HCHWA) ou angiopathie héréditaire amyloïde à cystatin (HCCAA). Les cystatins fonctionnent alors comme des régulateurs généraux des activités protéasiques potentiellement dangereuses tout en participant au système de défense non immunitaire de l'organisme. Les cystatins sont présentes à des concentrations relativement élevées dans de nombreux liquides biologiques tels que la salive, les larmes, le plasma séminal, le fluide cérébrospinal et le fluide synovial (Abrahamson, 1994). La figure 13 montre le mécanisme d'inhibition par les cystatins tel que proposé pour l'interaction entre la cystatin du blanc de l'oeuf (CEW) et la papaïne (Machleidt

et al., 1989).

Les cystatins constituaient un candidat inhibiteur intéressant pour l'adenain pour plusieurs raisons. Elles inhibent la papaïne et nous avons choisi celles qui sont exprimées dans les voies d'entrée des adénovirus à savoir la bouche et les yeux (Ruzindana-Umunyana et Weber, 2001). Certaines formes de cystatins contenues dans les larmes et la salive (cystatin S, SA, D) présentent des sites de clivage consensus de l'adenain, ce qui les prédispose à agir comme inhibiteurs substrats.

Nous avons constaté que les cystatins salivaires et lacrymales sont des inhibiteurs peu efficaces de l'adenain. Elles ne peuvent pas agir par un mécanisme d'inhibition compétitive puisque sous forme natives elles ne sont pas clivées par l'adenain. Par des expériences d'immunoprécipitation, nous avons démontré que les cystatins humaines se lient à l'adenain selon un mécanisme non covalent, réversible et bimoléculaire. Pour qu'un inhibiteur de protéase soit efficace au point de vue pharmacologique, l'interaction entre cet inhibiteur et l'enzyme ciblé devrait être irréversible. Mais si l'interaction est réversible, la constante de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur devrait être inférieure à 0.1 nM pour maintenir son activité inhibitrice pour une plus grande durée (Otto et Schirmeister, 1997). Dans le cas des complexes cystatins humaines-adenain, cette constante est de 1.23 nM, ce qui classe les cystatins parmi les inhibiteurs peu efficaces. Par ailleurs, les constantes d'affinité déduites à partir des analyses Scatchard démontrent que la liaison des cystatins à l'adenain non complexée est plus forte que la liaison à l'adenain complexée avec le pVlc.



(Tiré de Machleidt et al., 1989).

**Figure 13 : Schéma du modèle proposé pour l'interaction entre la cystatin du blanc de l'oeuf (CEW) et la papaïne. Les interactions intra et intermoléculaires entre le fragment de l'inhibiteur Leu 7 et Ala 10 (en bas à gauche) sont davantage détaillés.**

Ces résultats nous ont amenés à conclure que l'adenain non complexée semble exposer davantage son site actif qui peut alors accommoder les boucles inhibitrices des cystatins de façon plus aisée que l'adenain complexée au pVIc. Cette étude nous a permis de caractériser les interactions entre les cystatins et l'adenain et de conclure que les cystatins endogènes ne jouent probablement pas un rôle significatif dans l'inhibition des infections adénovirales.

Une explication à ces résultats serait la dimérisation voire même l'oligomérisation des cystatins humaines. En effet, la structure cristallographique de la cystatin humaine C (Kozak et al., 1999; Janowski et al., 2001) a révélé la manière dont cette protéine se replie de manière à former des dimères dont les deux unités monomériques sont symétriques (figure 14).

La structure secondaire des monomères est maintenue. La dimérisation se produit via un swapping tridimensionnel de domaines, mécanisme engendrant des protéines oligomériques. Les monomères ainsi associés présentent des domaines semblables à ceux de la cystatin du blanc de l'oeuf, excepté une boucle inhibitrice qui participe à la formation d'un interface ouvert du dimère. Cette structure explique la tendance de la cystatin humaine C à dimériser et suggère le mécanisme de son agrégation dans les artères du cerveau des personnes âgées présentant une amyloïde angiopathique.

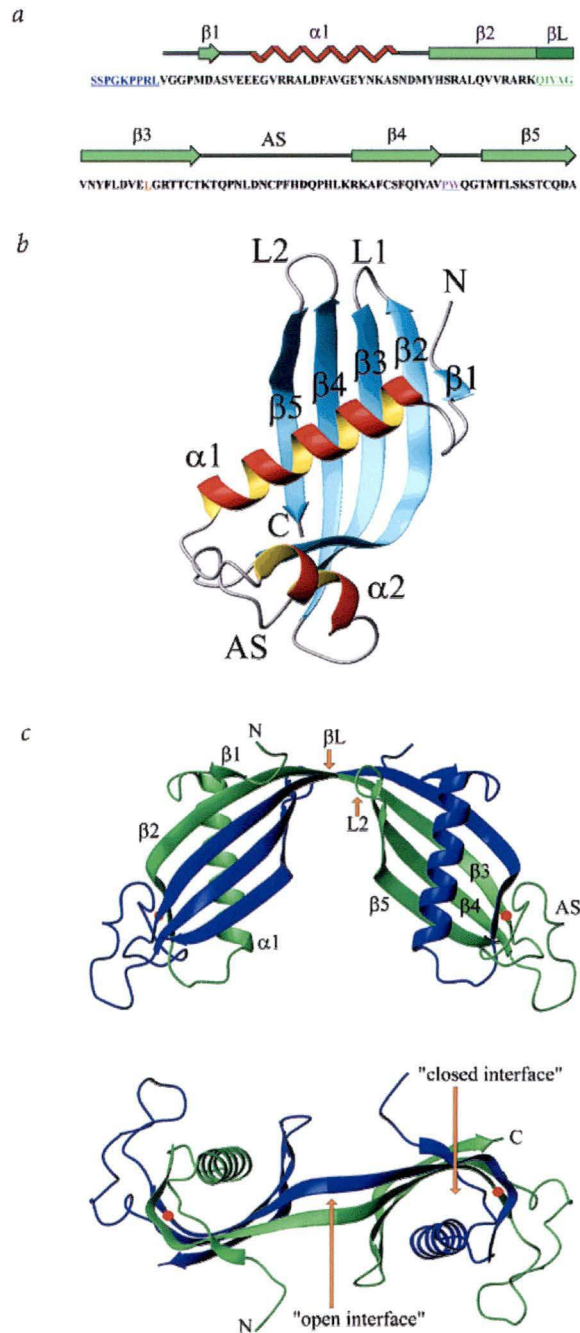
(Tiré de Janowski et al., 2001)

**Figure 14 :**  
**Les structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire de l'HCC.**

a, la séquence d'acides aminés de la cystatin humaine C, HCC, avec les éléments de la structure secondaire tels que déduits de la structure cristalline. En bleu, le fragment N-terminal, invisible par la densité électronique; en vert, le feuillet liant correspondant à la boucle L1 dans la cystatin du blanc de l'oeuf monomérique; en magenta, la boucle L2; en rouge, le site de la mutation L68Q (responsable de l'amyloïdogenèse).

b, La structure secondaire de la cystatin du blanc de l'oeuf (entrée PDB : 1CEW), définissant la topologie de cette classe de protéines.

c, le domaine croisé du dimère de la HCC dans une vue similaire à (b) d'abord et ensuite dans une orientation perpendiculaire pour mettre en évidence le feuillet  $\beta$  dans le domaine de la région du croisement ("open interface") et le site de la mutation L68Q (point rouge).



Ce mécanisme de dimérisation pourrait se produire avec d'autres cystatins humaines puisque les domaines impliqués sont assez bien conservés. Pour les oligomères de cystatins, la disparition de la boucle L1 qui participe dans le mécanisme d'inhibition des cystéine protéases engendre la perte ou l'affaiblissement de cette fonction d'inhibition (Janowski et al., 2001). Cela est en accord avec l'observation selon laquelle des dimères de cystatin humaine C n'ont pratiquement plus d'effet sur les cystéine protéases de type papaïne (Abrahamson et Grubb, 1994).

Peu après la découverte des domaines des cystatins participant à la liaison et à l'inhibition des cystéines protéases, une série d'inhibiteurs de petits poids moléculaires et dont la structure ressemble à celle de ces domaines inhibiteurs ont été synthétisés (Grubb et al., 1990). Il s'agit des peptidyl-diazométhyl cétones et des inhibiteurs de type oxirane. Avec les diazométhyl cétones, le mécanisme d'inhibition de la papaïne est irréversible et conduit à la formation d'un dérivé  $\alpha$ -thiocétone du résidu Cys25 de la papaïne (Tarnowska et al., 1992; Grzonka et al., 2001). Quant aux oxiranes, le E-64 en est un exemple d'inhibiteur très puissant et irréversible de cystéine protéases (Matsumoto et al., 1999). Cependant cet inhibiteur a peu d'effet sur l'activité de l'adenain (Sircar et al., 1996).

Il serait intéressant de se pencher sur le design et la synthèse de divers azapeptides en se basant sur la séquence des motifs de liaison des cystatins notamment les motifs qui contiennent un site de clivage consensus de l'adenain. C'est le cas de certaines cystatins qui possèdent des sites de clivage consensus au N-terminus et dans la première loop L1. Ces azapeptides pourraient se révéler des inhibiteurs très sélectifs et puissants.

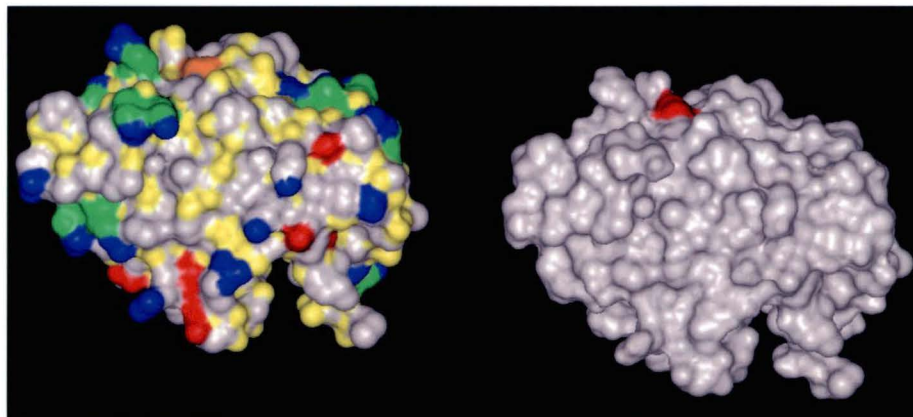
## B. CIBLE 2 : Sites de liaison de l'ADN

La structure tridimensionnelle du complexe adenain-pVlc a été déterminée avec une résolution de 2.6Å (Ding et al., 1996) et une carte de la distribution des charges sur la surface de ce complexe démontre les sites de liaison de l'ADN (McGrath et al., 2001). L'observation de la surface du complexe adenain-pVlc révèle cinq blocs de charge positive qui couvrent une surface de 45Å à 65Å. La plus courte distance entre ces compartiments est d'environ 24Å, distance comparable au diamètre de l'ADN double brin (20Å). Cela implique que certains de ces blocs pourraient interagir avec l'ADN viral, c'est-à-dire que l'ADN pourrait se lier entre deux larges blocs. La cavité du site actif se situe sur la face opposée de la molécule par rapport aux compartiments a, c et e (figure 7, page 21) et ainsi la liaison de l'ADN à ces endroits n'obstruerait pas le site actif. La résolution tridimensionnelle du complexe adenain-pVc-ADN est requise pour permettre l'identification d'agents susceptibles d'interférer avec la liaison de l'ADN.

En examinant les blocs de charge positive où se lieraient les molécules de l'ADN, nous nous sommes rendus compte que la Pro 137 est située entre deux blocs soient le compartiment Lys37-Lys65-Arg63-His36 et le compartiment formé par His131-His181-Arg180-Arg186-Arg193. Cette Pro pourrait stabiliser ces blocs et favoriser la liaison de l'ADN sur l'adenain. Comme l'adenain est encapsidée avec l'ADN viral, le changement de cette Pro en Leu pourrait amener une déstabilisation de la liaison ADN-adenain et empiéter sur l'encapsidation de l'adenain dans le cas du mutant ts1. Cette mutation d'une Pro en Leu ne semble pas à priori suffisamment importante pour expliquer les propriétés du mutant ts1, puisque ces résidus hydrophobes ne diffèrent pas de façon significative (figure 15). Mais si nous considérons



l'importance des liens ADN-adenain et le fait que lors de l'encapsidation, ces molécules devraient être nécessairement liées, la mutation P137L revêt alors une importance particulière. En interférant avec la liaison ADN-adenain, on serait en mesure de produire des virus déficients, de type ts1, pour les cycles d'infection subséquents. Keyvani-Amineh et al. (1995) avaient comparé les structures secondaires de l'adenain type sauvage et l'adenain mutante. La structure tridimensionnelle de l'adenain n'avait pas encore été résolue. Par des méthodes d'électrophorèse et des méthodes spectrales (CD), les résultats obtenus avaient démontré que ces deux enzymes ne diffèrent que par un changement de structure très subtile qui occasionne le phénotype thermosensible. Ici nous voulons apporter un élément supplémentaire faisant intervenir des interactions avec le génome viral et l'encapsidation de l'adenain.

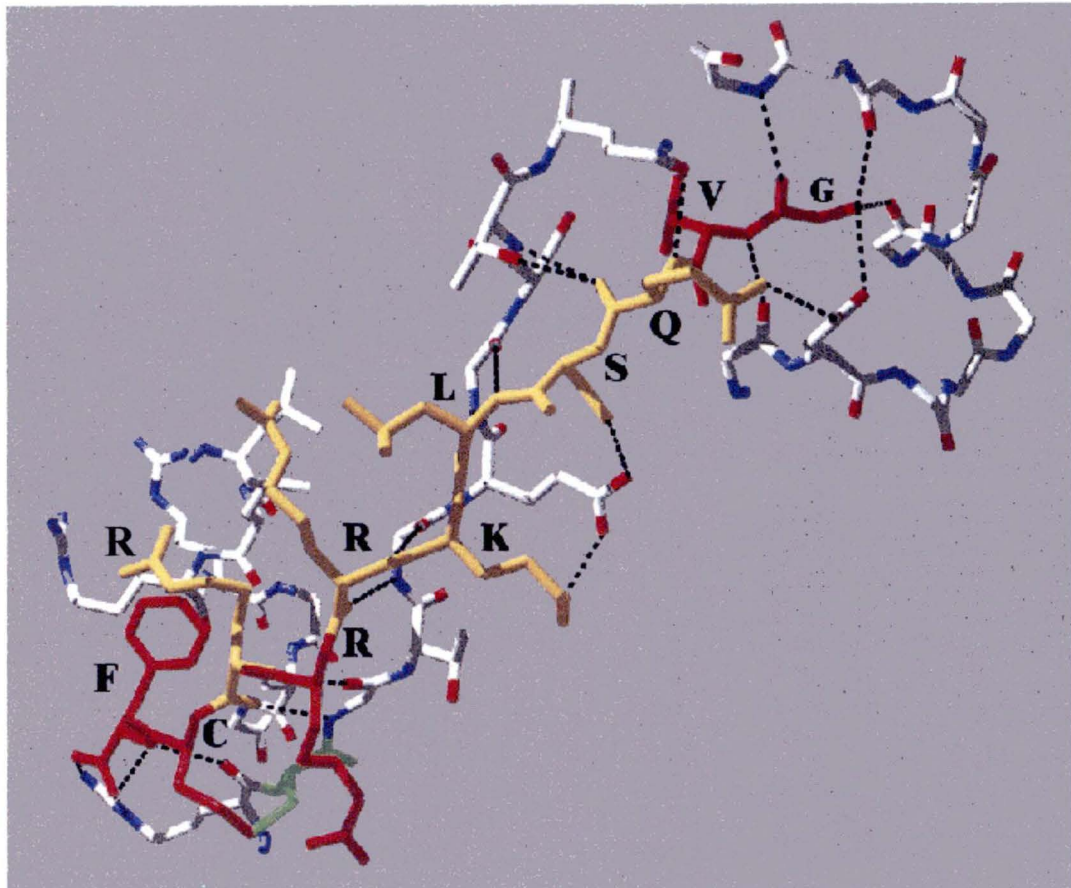


**Figure 15 : Vue de surface de l'adenain de type sauvage (à gauche, la Pro 137 est colorée en orange) et l'adenain mutante (P137L, à droite, la Leu est colorée en rouge). Le code de couleurs utilisé est le suivant : À gauche, acides aminés hydrophobes (G, A, V, L, I, P, F, W, C, M) en gris, acides aminés neutres à chaîne latérale polaire (S, T, Y, N, Q) en jaune, acides aminés chargés négativement (D, E) en rouge, acides aminés chargés positivement (R, K, H) en bleu. Les résidus en vert sont les acides aminés chargés positivement qui correspondraient aux sites de liaison de l'ADN. À droite, seule la Leu 137 est mise en évidence, le reste de la protéine est en gris.**

Par ailleurs, il a été démontré que l'activité *in vitro* de l'adenain recombinante de type sauvage est comparable à celle de l'adenain mutante (P137L) et que le phénotype de thermosensibilité n'est pas observé *in vitro* (Rancourt et al., 1995; Diouri et al., 1995). Le défaut du virus mutant est un problème de transport de l'adenain. Nous nous proposons d'étudier les liaisons de l'ADN-adenain mutante et de les comparer aux liaisons ADN-adenain de type sauvage, ce qui nous permettrait éventuellement de comprendre le phénotype observé. La figure 15 générée par le programme Visualizer (Insight II) permet de visualiser l'emplacement de la Pro137 (de couleur orange, à gauche) et la Leu137 (de couleur rouge, à droite) mais la modélisation n'a pas été effectuée pour obtenir la structure 3D réelle de l'adenain modifiée. Nous prévoyons le faire parallèlement aux manipulations au Laboratoire.

### C. CIBLE 3 : Site de liaison du cofacteur pVIc

Le site de liaison du pVIc constitue une autre place où des molécules inhibitrices peuvent se lier. Un contact extensif existe entre pVIc et l'adenain, établi notamment par liaisons hydrogène entre pVIc et la chaîne centrale de l'adenain accompagnés par d'autres liens hydrogène avec des chaînes latérales, des interactions ioniques et des interactions de Van Der Waals et enfin un pont disulfure. On compte au total 30 liaisons H (figure 16). La chaîne latérale de Val2' est enfouie dans une poche hydrophobe de l'adenain constituée par les chaînes latérales des résidus Phe70, Ser110, Val114, Met141, Met147 et Gly152. Le résidu C terminal Phe11' est aussi enfouie dans une poche hydrophobe. Cette poche est formée par les chaînes latérales des résidus Arg93, Ala96, Ile105 et l'Arg9' de pVIc. Le lien disulfure s'établit entre la Cys104 de l'adenain et la Cys10' de pVIc.



(Tiré de Baniecki et al., 2001)

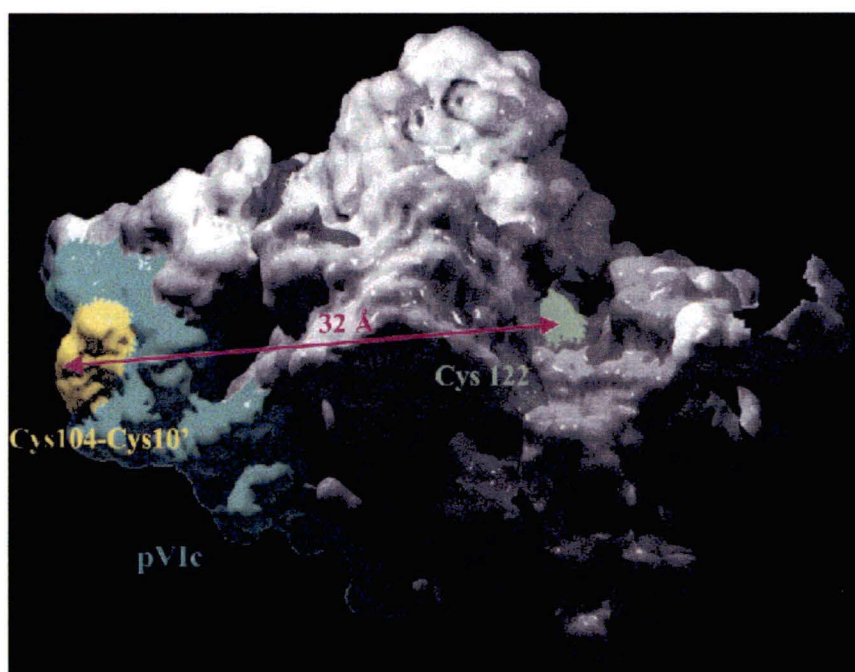
**Figure 16 : Structure du peptide pVIc lié à l'adenain. Les cinq acides aminés les plus conservés dans la séquence de pVIc (G1', V2', R8', C10' et F11') sont coloriés en rouge. Les autres acides aminés de pVIc sont en jaune. Les liaisons H sont indiquées par des traits noirs pointillés et la Cys104 de l'adenain est en vert. Pour l'adenain, les atomes de carbone sont blancs, les atomes d'azote sont bleus et les atomes d'oxygène sont rouges.**

De façon surprenante, le peptide pVIc, qui exerce un contrôle puissant sur la vitesse de la catalyse, se lie sur l'adenain à un site éloigné de la triade catalytique. La liaison disulfure entre Cys104 et Cys10' est située à 32 Å de la Cys122 (figure 17). Le résidu du pVIc le plus proche du site actif est la chaîne latérale de la Val2' qui se situe à 14.5 Å de la Cys122. Avec de si nombreux contacts connus à l'échelle atomique entre l'adenain et le pVIc, il devrait être possible de concevoir des médicaments qui imitent ces contacts ou qui ont même plus d'affinité pour l'adenain. Le squelette de pVIc interagit directement avec deux régions distinctes de l'adenain, ce qui explique la manière dont pVIc augmente la  $k_{cat}$  et la façon de concevoir des inhibiteurs potentiels. Le cofacteur pVIc agit comme un "strap" qui constitue une région allant de la Cys104 proche de l'extrémité de la molécule de l'adenain jusqu'à la fin de l'hélice 4. Une des fonctions possibles de pVIc serait de rapprocher deux régions de l'adenain (figure 4, page 13).

En effet, on observe la formation d'un feuillet  $\beta$  au niveau d'une extrémité de pVIc avec une structure centrale  $\beta$  de l'adenain et le contact extensif entre la région aminoterminal de pVIc avec des résidus proches de l'extrémité carboxy-terminale de l'hélice 4. La conséquence fonctionnelle d'un tel rapprochement de deux régions de l'adenain serait une altération de la géométrie autour de la paire d'ions Cys-His augmentant ainsi la capacité catalytique de cette paire d'ions.

L'importance des deux extrémités du peptide pVIc a été constatée par plusieurs groupes de chercheurs (Jones et al., 1996, Cabrita et al., 1997; Ruzindana-Umunyana et al., 2000b, McGrath et al., 2001b). L'importance du résidu cystéine de pVIc demeure controversée. Nos résultats (Ruzindana-Umunyana et al., 2000b) démontrent que ce résidu est important pour l'activité maximale de l'adenain puisque le mutant pVI-S dont le résidu

cystéine est remplacé par une sérine n'active qu'à moitié l'adenain. Nous en avons conclu que la formation d'un pont disulfure entre l'adenain et son cofacteur pVIc est requise pour la stimulation maximale de l'adenain. Les résultats obtenus par Baniecki et al., 2001, leur suggèrent que ce peptide n'est pas absolument requis pour la stimulation maximale de l'adenain. Toutefois ils ont constaté que la mutation du résidu cystéine du peptide en alanine entraîne une augmentation considérable du  $K_d$  du complexe adenain-pVIc et par conséquent une liaison moins puissante entre ces deux molécules.



*(Tiré de McGrath et al., 2001b)*

**Figure 17 : Vue de surface de la distance entre la liaison disulfure (établie entre la Cys 10 de pVIc et la Cys 104 de l'adenain) et la Cys 122, agent nucléophile du site actif. Pour le complexe adenain-pVIc, la surface accessible au solvant est colorée en gris, le peptide pVIc est de couleur cyanure, les cystéines libres sont colorées en vert, le pont disulfure en jaune.**

Connaissant la biologie de l'infection virale, il serait possible de réarranger la séquence des événements de telle sorte que l'infection avorte. Par exemple, il existe une hypothèse selon laquelle l'adenain est inactive après sa synthèse. Si l'adenain était active dès sa synthèse, elle procéderait aux clivages de maturation des protéines précurseurs avant l'assemblage, ce qui bloquerait l'infection. Pour cette raison, nous avons introduit pVIc dans le milieu de culture tôt au cours de l'infection, avant l'assemblage, ce qui a changé le rôle de pVc. De cofacteur de l'activité enzymatique, pVIc est devenu agent antiviral. À différents moments de l'infection des cellules Hep-2 par Ad2, nous avons ajouté pVIc au milieu et après 48 heures d'infection, nous avons mesuré le rendement viral, c'est-à-dire la quantité de particules virales infectieuses produites. Les résultats de Rancourt et al. (1996) indiquent que l'addition de pVIc après 7 heures d'infection réduit considérablement la synthèse de particules virales infectieuses. Les peptides mutants que nous avons étudiés montrent un effet similaire mais de façon moins efficace (Ruzindana-Umunyana et al., 2000b). Il est à signaler que nos résultats diffèrent de ceux de Baniecki et al. (2001). Lorsqu'ils ajoutent pVIc dans le milieu de culture des cellules Hep-2 infectées par Ad5, ils constatent aussi un effet inhibiteur sur la synthèse des particules virales infectieuses. Dans leurs expériences, cet effet est remarquable lorsque l'addition de pVIc se fait soit très tôt en même temps que le virus, soit tard après 20 heures ou plus d'infection. Ils en arrivent essentiellement aux mêmes conclusions que nous, à savoir un effet inhibiteur de pVIc sur le rendement viral. Cependant ils placent cet effet au niveau d'une infection subséquente lorsque le virus produit entre dans une nouvelle cellule accompagné par pVIc ce qui résulte en une activation prématurée. Dans notre cas, nous pensons que l'addition du cofacteur tôt dans l'infection suffit pour inhiber l'infection en cours. Nous relevons ici quelques différences dans les protocoles expérimentaux utilisés par Baniecki et al. (2001) et

par nous mêmes. La multiplicité d'infection dans le cas de Baniecki était de 0.001 tandis que nous travaillons habituellement avec une multiplicité d'infection de 10 PFU/cellule. L'addition de pVlc dans le milieu de culture se fait différemment. Baniecki et al.(2001) remplace, à différents temps, le milieu de culture par un milieu de culture contenant le pVlc. Dans notre cas, nous enlevons le milieu de culture initial, nous dissolvons le pVlc dans 100 µl de DMEM et nous ajoutons le cofacteur sous cette forme concentrée qui agit pendant 15 minutes avant de compléter le volume du milieu de culture de façon à avoir la concentration finale désirée du cofacteur. C'est peut-être cette forme concentrée de pVlc que nous laissons agir sur l'infection pendant quelques minutes qui expliquerait son effet tôt dans l'infection.

Nous pouvons conclure que puisque pVlc est un activateur naturel de l'adenain, il serait très étonnant que le virus évolue de façon à devenir résistant au pVlc tôt mais non tard dans l'infection. Deux caractéristiques du pVlc peuvent contribuer à l'efficacité de son action antivirale. Premièrement, pVlc est protégé de la dégradation qui est effectuée par le système d'élimination spécifique de l'ubiquitin. Ce mécanisme reconnaît les acides aminés situés au N-terminus dans les protéines comme signaux de la demi-vie de ces protéines (Bachmair et al., 1986). Les protéines porteuses de résidus Gly au N-terminus comme c'est le cas du peptide pVlc, ont une demi-vie supérieure à 20 heures tandis que celles porteuses d'un résidu Arg ont une demi-vie inférieure à 2 minutes. Deuxièmement, pour activer l'adenain, le peptide pVlc doit pénétrer dans le noyau. Une étude sur la translocation des peptides dans le noyau a déterminé une séquence consensus de 4 résidus nécessaire pour l'importation au noyau : Lys-(Arg/Lys)-X-(Arg/Lys) où X pourrait être une Lys, Arg, Pro, Val ou Ala (Chelsky et al., 1989). Ainsi la séquence Lys-Arg-Arg-Arg du pVlc représente un signal de localisation nucléaire.

Cette approche consistant à cibler le mécanisme d'activation de l'adenain est également utilisée pour d'autres types de virus dont notamment l'hépatite C. En effet ce virus à ARN utilise une sérine protéase NS3 pour le clivage et la maturation de protéines non structurales. Cette activité "trypsine-like" de la sérine protéase NS3 est assurée grâce à la formation d'un complexe stable entre la NS3 et la portion N-terminale d'une protéine NS4a. Des essais d'inhibition de l'activité protéolytique de la NS3 ont été réalisés en testant des peptides dérivés du cofacteur NS4a comme agents compétiteurs de la NS4a de type sauvage, avec des résultats relativement satisfaisants (Kwong et al., 1998). Cela confirme que le développement d'une stratégie antivirale efficace basée sur la réversibilité du mécanisme d'activation est possible.



## **IV. CONCLUSIONS**

La présente recherche dont l'objectif était d'identifier des inhibiteurs efficaces de l'adenain, a permis de caractériser les mécanismes d'inhibition de différents candidats inhibiteurs de cette protéase essentielle à la réplication des adénovirus. L'adenain constitue un modèle idéal pour le développement d'agent antiviral pour plusieurs raisons. Pour être totalement active, l'adenain utilise trois sites éloignés les uns des autres : le site actif et les sites de liaison de deux cofacteurs, le peptide pVIc et l'ADN viral.

1) Notre première cible fut le site actif avec comme candidats inhibiteurs des agents alkylants du résidu Cys122 qui avaient auparavant été testés avec succès sur la papaïne. En effet, la papaïne et l'adenain présentent une grande similitude au niveau de la structure secondaire du site actif et utilisent probablement un mécanisme catalytique identique. Les inhibiteurs de la papaïne devraient également inhiber l'adenain. Nous avons constaté que des analogues de substrat de type nitrile de la papaïne inhibent l'activité de l'adenain *in vitro* et *ex vivo*.

Des serpins, qui sont traditionnellement des inhibiteurs de sérine protéases et qui inactivent la papaïne selon un mécanisme "cross-class", inhibent la protéase adénovirale *in vitro*. Ces protéines, SCCA, exprimées dans les voies respiratoires, inhibent l'adenain via un mécanisme de substrat-suicide irréversible et non covalent. Cependant les serpins étudiées ne semblent pas avoir d'effet sur l'infection adénovirale et l'infection adénovirale n'a pas d'effet sur l'expression de ces protéines. Par ailleurs l'adenain ne les clive pas au cours de l'infection adénovirale.

Des cystatins purifiées à partir de liquides biologiques d'intérêt, la salive et les larmes.

ont été également testées sur l'activité enzymatique et il s'est avéré qu'elles se lient et inhibent l'adenain selon un mécanisme différent de celui des serpins. En effet les interactions entre les cystatins et l'adenain s'apparentent à des liens réversibles et non covalents, au niveau de sites adjacents au site actif de l'adenain. Bien que les cystatins portent des séquences de clivage consensus de l'adenain, elles ne se comportent pas comme des inhibiteurs substrats à l'état natif et agissent plutôt en bloquant l'accès du substrat au site actif de l'adenain.

2) Notre seconde cible fut le site d'attachement du peptide stimulateur pVIc à l'adenain. Les candidats inhibiteurs utilisés incluaient non seulement le cofacteur pVIc de type sauvage mais aussi des peptides mutants dérivés du pVIc. Ces peptides mutants correspondaient aux deux régions impliquées dans les interactions avec l'adenain, soient les séquences N- et C-terminales du pVIc de l'Ad2. Ces peptides inhibaient l'activité enzymatique *in vitro* par compétition avec le peptide pVIc pour le site d'attachement sur l'adenain. Il avait été démontré que l'ajout de pVIc dans le milieu de culture tôt au cours de l'infection entraînait une diminution du rendement viral. Nous avons démontré que des peptides inhibaient l'infection adénovirale en activant prématurément l'enzyme ce qui nuit à l'orchestration normale des événements d'assemblage et de maturation.

Dans le cadre de cette recherche d'inhibiteurs, il est évident que la connaissance de la spécificité de substrat de l'adenain est primordiale. C'est pour cette raison que nous avons réexaminé cette propriété de l'adenain à la lumière des résultats obtenus dans notre laboratoire et par d'autres groupes de recherche. Nous avons constaté que dans certaines conditions l'adenain ne clive pas des protéines virales qui contiennent des sites de clivage consensus, suggérant qu'une exposition appropriée de ces sites est importante. Par ailleurs l'adenain peut reconnaître des sites autres que les séquences déjà identifiées. Cette étude sur la spécificité

confirme la notion déjà connue de la reconnaissance de la structure versus la reconnaissance de la séquence dans les interactions protéine-protéine et peut conduire à l'identification d'inhibiteurs plus spécifiques (Tyndall et Fairlie, 1999; Fairlie et al., 2000).

La mise en place d'une trithérapie pour le traitement des infections adénovirales semble être la meilleure solution et l'adenain devrait être un bon modèle pour une thérapie combinée. La recherche des inhibiteurs de l'adenain se poursuit et nous continuons à utiliser diverses approches pour atteindre ce but. D'une part, une recherche mettant en oeuvre des programmes informatiques tels que DOCKING dans l'environnement INSIGHT II est actuellement en cours. Les composés identifiés de cette façon seront testés et utilisés pour le design d'inhibiteurs de seconde génération dont les caractéristiques sont améliorées. Une autre méthode possible serait l'utilisation de méthodes chimiques combinatoires et un criblage de grande envergure. Ces méthodes, communément appelées "high-throughput screening" permettent la synthèse de milliers de produits et l'analyse automatique de ces composés par des méthodes "high-throughput". La limite actuelle est de 100000 essais par jour. Les tests mettant en oeuvre les substrats fluorogéniques (le groupement partant étant la rhodamine) conviennent particulièrement pour les essais automatiques utilisant de petits volumes. Une combinaison des deux approches permettrait sans doute d'obtenir de bons inhibiteurs de façon plus rapide et moins onéreuse. La chimie combinatoire permet de diversifier les produits testés, ce qui offre de meilleures chances d'en identifier ceux qui pourraient être développés en médicaments. Cependant le nombre des composés possibles dépasse largement les limites d'un "high-throughput screening". Pour diminuer le nombre des candidats à tester, il faudrait procéder à un criblage virtuel de quelques composés "leader" et ces composés pourraient être évalués selon leur effet sur l'activité enzymatique. Des motifs communs à ceux qui sont

efficaces pourraient être utilisés pour le design d'une plate-forme sur laquelle se baserait une analyse chimique combinatoire. De cette façon, seuls quelques composés seraient soumis au "high-throughput screening".

Dans notre laboratoire, nous prévoyons continuer une recherche basée sur la modélisation moléculaire de quelques composés dont notamment des peptides issus des motifs des cystatins et/ou des serpins (De Clercq, E., 2000). Les composés qui démontreraient les meilleures capacités inhibitrices sans être toxiques seraient utilisés en combinaison avec le pVIc et l'EGCG (Weber et al., 2002b, *soumis*). L'effet de cette trithérapie serait évaluée sur l'infection adénovirale. Si les résultats obtenus sont encourageants, il serait possible de pousser la recherche aux modèles animaux.

Les inhibiteurs identifiés pour l'adenain pourraient être adaptés pour être applicables aux autres cystéines protéases du clan CE telle que la YopJ de la bactérie *Yersinia* ainsi que d'autres cystéine protéases apparentées comme la protéase de *Chlamydia*.

## Remerciements

Je voudrais exprimer ici ma profonde reconnaissance envers mon Directeur de Recherche et de Thèse. Dr Weber, J.M. Durant les cinq années que j'ai passées dans son Laboratoire, il n'a pas cessé de me prodiguer des conseils tant au niveau théorique que pratique, je le remercie profondément pour sa patience et son appui financier surtout dans les moments difficiles. Je suis très reconnaissante envers Mme Lise Imbeault qui m'a accompagné durant toutes ces années, son appui technique fut indispensable, son amitié et ses conseils m'ont fort encouragée, surtout dans les moments de doute. Je remercie les membres qui constituent mon jury, Drs Pierre Bourgaux, Brian Talbot et Michel Tremblay pour leur disponibilité et pour avoir accepté d'apporter les corrections nécessaires à cette thèse. Ma reconnaissance s'adresse à Cynthia Allen, Ph.D., Wesley Sharman, Ph.D., Pierre Lavigne, Ph.D., Axel Mathieu, Ph.D. pour leur immense soutien à plusieurs égards. À mon mari, mes enfants, ma soeur et mon neveu qui ont partagé avec moi les moments les plus difficiles de ces cinq dernières années, j'adresse non seulement mes remerciements mais aussi je demande pardon pour les moments d'impatience, de fatigue et de nervosité. À mes soeurs et frères éparpillés sur la planète, j'adresse un grand merci pour le réconfort que nous nous apportons mutuellement malgré les distances. À tous les membres du Département de Microbiologie, j'adresse mes remerciements pour leur solidarité et leur esprit de partage.

## **RÉFÉRENCES**

- Abrahamson, M. (1994). Cystatins. *Methods in Enzymology* 244, 685-700.
- Abrahamson, M. and Grubb, A. (1994). Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu68-Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Proc.Natl.Sci.USA.* 91, 1416-1420.
- Alexeeva, I., Dyachenko, N., Nosach, L., Zhovnovataya, V., Rybalko, S., Lozitskaya, R., Fedchuk, A., Lozitsky, V., Gridina, T., Shalamay, A., Palchikovskaja, L. and Povnitsa, O. (2001). 6-azacytidine-compound with wide spectrum of antiviral activity. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20 (4-7), 1147-1152.
- Anderson, C.W., Baum, P.R. and Gesteland, R.F. (1973). Processing of adenovirus 2-induced proteins. *J.Virol.* 12, 241-252.
- Anderson, C.W. (1990). The proteinase polypeptide of adenovirus serotype 2 virions. *Virology* 177, 259-272.
- Anderson, C.W. (1993). Expression and purification of the adenovirus proteinase polypeptide and of a synthetic proteinase substrate. *Protein Expression Purif.* 4, 8-15
- Andres, G., Alejo, A., Simon-Mateo, C. and Salas, M.L. (2001). African Swine Fever Virus protease, a new member of the SUMO-1-specific protease family. *J.Biol.Chem.* 276, 780-787.
- Arnberg, N., Edlund, K., Kidd, A.H. and Wadell, G. (2000a). Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J.Virol.* 74, 42-48.
- Arnberg, N., Kidd, A.H., Edlund, K., Olfat, F. and Wadell, G. (2000b). Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A549 cellular receptors : sialic acid versus alpha(v)

integrins. *J.Virol.* 74, 7691-7693.

Arnold, D., Di Biase, A.M., Marchetti, M., Pietrantoni, A., Valenti, P., Seganti, L. and Superti, F. (2002). Antiadenovirus activity of milk proteins : lactoferrin prevents viral infection. *Antiviral Res.* 53(2), 153-158.

Babe L.M. and Craik, C.S. (1997) Viral proteases: Evolution of diverse structural motifs to optimize function. *Cell* 91, 427-430.

Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science*, 234, 179-186.

Balakirev, M.Y., Jaquinod, M., Haas, A.L. and Chroboczek, J. (2002). Deubiquitinating function of adenovirus proteinase. *J.Virol.* 76 (12), 6323-6331.

Baniecki, M.L., McGrath, W.J., McWhirter, S.M., Li, C., Toledo, D.L., Pellicena, P., Barnard, D.L., Thorn, K.S. and Mangel, W.F. (2001). Interaction of the human adenovirus proteinase with its 11-amino acid cofactor pVlc. *Biochemistry* 40, 12349-12356.

Baron, S., Poast, J. and Cloyd, M.W. (1999). Why is HIV rarely transmitted by oral secretions? Saliva can disrupt orally shed, infected leucocytes. *Arch.Intern.Med.* 159, 303-310.

Baron, S., Poast, J., Richardson, C.J., Nguyen, D. and Cloyd, M. (2000a). Oral transmission of human immunodeficiency virus by infected seminal fluid and milk : a novel mechanism. *J.Infect.Dis.* 181, 498-504.

Baron, S., Singh, I., Chopra, A., Coppenhaver, D. and Pan, J. (2000b). Innate antiviral defenses in body fluids and tissues. *Antiviral Res.* 48, 71-89.

Barrett A.J. (1987). The cystatins : a new class of peptidase inhibitors. *TIBS* 12, 193-196.

- Barrett, A.J., and Rawlings, N.D. (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.* 382, 727-733.
- Beatty, K., Bieth, J. and Travis, J. (1980). Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized  $\alpha$ -1 proteinase inhibitor and  $\alpha$ -1 antichymotrypsin. *J.Biol.Chem.* 255, 3931-3934.
- Brisson, J.R., Carey, P.R. and Storer, A.C. (1986). Benzoylamidoacetonitrile is bound as a thioimidate in the active site of papain. *J.Biol.Chem.* 261, 9087-9089.
- Brocklehurst, K., Watts, A.B., Patel, M., Verma, C. and Thomas, E.W. (1998). Cysteine proteinases. In : *Comprehensive Biological Catalysis : A Mechanistic Reference*. Ed. Michael Sinnott, Vol I, pp.381-423. Academic Press Harcourt Brace & Company. Publishers.
- Brown, M.T., McGrath, W.J., Toledo, D.L. and Mangel, W.F. (1996). Different modes of inhibition of human adenovirus proteinase, probably a cysteine proteinase by bovine pancreatic trypsin inhibitor. *FEBS Lett.* 388, 233-237.
- Cabrita, G., Iqbal, M., Reddy, H. and Kemp, G. (1997). Activation of the adenovirus protease requires sequence elements from both ends of the activating peptide. *J.Biol.Chem* 272 (9), 5635-5639.
- Carrell, R.W. and Evans, D.L.I. (1992). Serpins : implications of a mobile reactive centre. *Curr.Opin.Biotech.*3(4), 399-407.
- Chen, P.H., Ornelles, D.A. and Shenk, T. (1993). The adenovirus L3 23-kilodalton protease cleaves the amino-terminal head domain from cytokeratin 18 and disrupts the cytokeratin network of HeLa cells. *J.Virol.* 67, 3507-3514.
- Chelsky, D., Ralph, R. and Jonak, G. (1989) Sequence requirements for synthetic peptide-



- mediated translocation to the nucleus. *Mol.Cell.Biol.* 9, 2487-2492.
- Cho, W.L., Tsao, S.M., Hays, A.R., Walter, R., Chen, J.S., Snigirevskaya, E.S. and Raikhel, A.S. (1999). Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J.Biol.Chem.* 274, 13311-13321.
- Cornish, J.A., Murray, H., Kemp, G.D. and Gani, D. (1995). Specific inhibitors of the adenovirus type 2 proteinase based on substrate-like tetrapeptide nitriles. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 5, 25-30.
- Cotten, M. and Weber, J.M. (1995). The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology* 213, 494-502.
- Crombie, R., Silverstein, R.L., MacLow, C., Pearce, S.F.A., Nachman, R.L. and Laurence, J. (1998). Identification of a CD36-related thrombospondin 1-binding domain in HIV-1 envelope glycoprotein gp120 : relationship to HIV-1-specific inhibitory factors in human saliva. *J.Exp.Med.* 187, 25-35.
- Czaplewski, C., Grzonka, Z., Jaskolski, M., Kasprzykowski, F., Kozak, M., Politowska, E. and Ciarkowski, J. (1999). Binding modes of a new epoxysuccinyl-peptide inhibitor of cysteine proteases. Where and how do cysteine proteases express their selectivity? *Biochim. Biophys.Acta* 1431, 290-305.
- De Clercq, E. (1993a). Antiviral agents : characteristic activity spectrum depending on the molecular target with which they interact. In : *Advances in Virus Research*, vol.42. Academic Press, New York.
- De Clercq, E. (1993b). Therapeutic potential of HPMPC as an antiviral drug. *Rev.Med.Virol.* 8, 261-272.

- De Clercq, E. (2000). Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medicinal Res. Reviews* 20, 323-349.
- De Jong, J.C., Wermenbol, A.G., Verweij-Uijterwaal, M.W., Slaterus, K.W., Wertheim-Van Dillen, P., Van Doornum, G.J., Khoo, S.H. and Hierholzer, J.C. (1999). Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals. including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J.Clin.Microbiol.* 37, 3940-3945.
- De Oliveira, C.B., Stevenson, D., Labree, L., McDonnel, P.J. and Trousdale, M.D. (1996). Evaluation of cidofovir (HPMPC, GS-504) against adenovirus type 5 infection in vitro and in a New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res.* 31, 165-172.
- D'Halluin, J.C. (1995). Virus assembly. In "Molecular Repertoire of Adenoviruses" Vol.199/I, *Current Topics in Microbiology and Immunology* (W.Doerfler and P.Bohm, Eds) pp. 47-66, Springer-Verlag, Berlin.
- Dianzani, F. and Baron, S. (1996). Nonspecific defenses. In : Baron, S. (Ed.). *Medical Microbiology*. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, TX, pp 631-640.
- Ding, J., McGrath, W.J., Sweet, R.M. and Mangel, W.F. (1996). Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid factor. *EMBO J.* 15, 1778-1783.
- Diouri, M., Geoghegan, K.F. & Weber, J.M. (1995). Functional characterization of the adenovirus proteinase using fluorogenic substrates. *Protein and Peptide Lett.* 6, 363-370.
- Diouri, M., Keyvani-Amineh, H., Geoghan, K.F. and Weber, J.M. (1996). Cleavage efficiency by adenovirus protease is site-dependent. *J.Biol.Chem.* 271, 51, 32511-32514.

- Doronin, K., Kuppaswamy, M., Toth, K., Tollefson, A.E., Krajesi, P., Krougliak, V., Wold, W.S.M. (2001). Tissue-specific, tumor-selective, replication-competent adenovirus vector for cancer gene therapy. *J.Virol.* 75 (7), 3314-3324.
- Drake, J.W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 4171-4175.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases : structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* 68, 383-424.
- Erice, A. and Balfour, H. (1994). Resistance of HIV1 to antiretroviral agents : a review. *Clin.Infect.Dis.* 18, 149-156.
- Erlanson, D.A., Braisted, A.C., Raphael, D.R., Randal, M., Stroud, R.M., Gordon, E.M. and Wells, J.A. (2000). Site-directed ligand discovery. *Proc.Natl.Acad.Sci.*97, 9367-9372.
- Fairlie, D.P., Tyndall, J.D.A., Wong, A.K., Abbenante, G., Scanlon, M.J., March, D.R., Bergman, D.A., Chai, C.L.L. and Burkett, B.A. (2000). Conformational selection of inhibitors and substrates by proteolytic enzymes : implications for drug design and polypeptide processing. *J. Med. Chem.* 43, 1271-1281.
- Gettins, P.G.W., Patston, P.A. and Olson, S.T. (1996). Serpins : Structure, Function and Biology. In *Molecular Biology Intelligence Unit*, p 202, R.G. Landes Company and Chapman & Hall, Austin, TX.
- Ginsberg, HS and Prince, GA (1994). The molecular basis of adenovirus pathogenesis. *Infect.Agents and Disease* 3, 1-8.
- Gordon, Y.J., Naesens, L., De Clercq, E., Maudgal, P.C. and Veckeneer, M. (1996). Treatment of adenoviral conjunctivitis with topical cidofovir. *Cornea* 15, 546.

- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P. and Helenius, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75, 477-486.
- Greber, U.F., Singh, I. and Helenius, A. (1994). Mechanisms of virus uncoating. *Trends in Microbiology* 2 (2), 52-56.
- Greber, U.F., Webster, P., Weber, J.M. and Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *EMBO J.* 15 (8), 1766-1777.
- Greber, U.F., Suomalainen, M., Stidwill, R.P., Boucke, K., Ebersold, M. and Helenius, A. (1997). The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* 16, 5998-6007.
- Greber, U.F. (1998). Virus assembly and disassembly : the adenovirus cysteine protease as a trigger factor. *Reviews in Medical Virology* 8 (4), 213-222.
- Grierson, A.W., Nicholson, R., Talbot, P., Webster, A. and Kemp, G. (1994). The protease of adenovirus serotype 2 requires cysteine residues for both activation and catalysis. *J.Gen.Virol.* 75, 2761-2764.
- Grubb, A., Abrahamson, M., Olafsson, I., Trojnar, J., Kasprzykowska, R., Kasprzykowski, F. and Grzonka, Z. (1990). Synthesis of cysteine proteinase inhibitors structurally based on the proteinase interacting N-terminal region of human cystatin C. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 371 (Suppl.) 137-144.
- Grubb, A.O. (2000). Cystatin C. Properties and use as a diagnostic marker. *Adv.Clin.Chem.* 35, 63-69.
- Grzonka, Z., Jankowska, E., Kasprzykowski, F., Kasprzykowska, R., Lankiewicz, L., Wiczak, W., Wiczczak, E., Ciarkowski, J., Drabik, P., Janowski, R., Kozak, M., Jaskolski, M

- and Grubb, A. (2001). Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica* 48(1), 1-20.
- Hannan, C., Raptis, L., Déry, C. and Weber, J.M. (1983). Biological and structural studies with adenovirus type 2 temperature-sensitive mutant defective for uncoating. *Intervirology* 19, 213-223.
- Heise, C., Sampson Johannes, A., Williams, A., Mc Cormick, F., Von Hoff and Kim. D.H. (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat.Med.* 3, 639-645.
- Henskens, M.C., Veerman, E.C.I. and Amerongen, A.V.N. (1996). Cystatins in health and disease. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 377, 71-86.
- Hierholzer, J.C. (1992). Adenovirus in the immunocompromised host. *Clin.Microbiol.Rev.* 5, 262-274.
- Hierholzer, J.C., Halonen, P.E., Dahlen, P.O. et al. (1993). Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantified by time-resolved fluoremetry. *J.Clin.Microbiol.* 31, 1886-1891.
- Hillenkamp, J., Reinhard, T., Ross, R.S., Böhringer, D., Carlsburg, O., Roggendorf, M., De Clercq, E., Godehardt, E. and Sundmacher, R. (2001). Cidofovir 0.2% with and without cyclosporin A 1% as a topical treatment of adenoviral keratoconjunctivitis. A controlled clinical pilot trial, *Arch. Ophthalmol.* 119 (10), 1487-1491.
- Hinkle, D.C. and Chamberlin, M.J. (1972). Studies of the binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to DNA. II. The kinetics of the binding reaction. *J.Mol.Biol.* 70, 187-195.

- Horwitz, M. (1996). Adenoviruses. In : Fields, B.N. et al. (Eds). Virology, vol.2 Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Houde, A. and Weber, J.M. (1990). Adenovirus proteinases : comparison of amino acid sequences and expression of the cloned cDNA in Escherichia Coli. Gene 88, 269-273.
- Hui, M.B.V., Lien, E.J. and Trousdale, M.M. (1995). Inhibition of human adenoviruses by 1-(2'-hydroxy-5'-methoxybenzylidene) amino-3-hydroxyguanidine tosylate. Antiviral res. 24, 261-274.
- Hunt, L.T. and Dayhoff, M.O. (1980). A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III and alpha<sub>1</sub>-proteinase inhibitor. Biochem.Biophys.Res.Comm. 95, 864-871.
- Huntington, J.A., Fan, B., Karlsson, K.E., Deinum, J., Lawrence, D.A. and Gettins, P.G.W. (1997). Serpin conformational change in ovalbumin. Enhanced reactive center loop insertion through hinge region-mutations. Biochemistry 36, 5432-5440.
- Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A., Abrahamson, M. and Jaskolski (2001). Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. Nature Struct.Biol. 8 (4), 316-320.
- Javier, R., Raska, K. Jr. and Shenk, T. (1992). Requirement for the adenovirus type 9 E4 region production of mammary tumors. Science 257, 1267-1271.
- Johnson, V. (1995). Nucleotide reverse transcriptase inhibitors and resistance of HIV1. J.Infect.Dis. 171, S140-S149.
- Jones, S.J., Iqbal, M., Grierson, A.W. and Kemp, G. (1996). Activation of the protease from human adenovirus type 2 is accompanied by a conformational change which is dependent

- on cysteine-104. *J.Gen.Virol.* 77, 1821-1824.
- Kajon, J. and Wadell, G. (1995). Molecular epidemiology of severe and fatal adenovirus acute lower respiratory infections of children in the South cone of South America : a ten year longitudinal study. In : *Progress in Clinical Virology. Joint Meeting of the European Group for Rapid Viral Diagnosis and European Society Against Virus Diseases. Prague, 10-14 sept.* : 253.
- Kaneko, H., Kato, K., Mori, S. and Shigeta, S. (2001). Antiviral activity of NMSO3 against adenovirus *in vitro*. *Antiviral Res.* 52, 281-288.
- Kelsey, D.S. (1978). Adenovirus meningoencephalitis. *Pediatrics* 61, 291-293.
- Keyvani-Aminéh, H., Labrecque, P., Cai, F., Carstens, E.B. and Weber, J.M. (1995). Adenovirus protease expressed in insect cells cleaves adenovirus proteins, ovalbumin and baculovirus protease in the absence of activating peptide. *Virus Res.*37, 87-97.
- Kim, E.E., Baker, C.T., Dwyer, M.D., Murcko, M.A., Rao, B.G., Tung, R.D. and Navia, M.A.(1995). Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme. *J.Am.Chem.Soc.* 117, 1181-1182.
- Kimura, K., Mori, S., Tomika, K., Ohno, K., Takahashi, K., Shigeta, S. and Terada, M. (2000). Antiviral activity of NMSO3 against respiratory syncytial virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res.* 47 (1), 41-51.
- Kodama, E., Shigeta, S., Suzuki, T. and De Clercq, E. (1996). Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for anti-adenovirus screening using the MTT method. *Antiviral Res.* 31 (3), 159-164.
- Komiyama, T., Ray, C.A., Pickup, D.J., Howard, A.D., Thornberry, N.A., Peterson, E.P. and

- Salvesen, G. (1994). Inhibition of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. *J. Biol. Chem.* 269, 19331-19337.
- Kozak, M. (1999). Expression of selenomethionyl derivative and preliminary crystallographic studies of human cystatin C. *Acta Crystallogr. D* 55, 1939-1942.
- Kräusslich, H.G. and Wimmer, E. (1988). Viral proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 701-754.
- Kwong, A.D., Kim, J.L., Rao, G., Lipovsek, D. and Raybuck, S.A. (1998). Hepatitis C virus NS3/4A protease. *Antiviral Res.* 40, 1-18.
- Lam, P.Y.S., Jadhav, P.K., Eyermann, C.J., Hodge, C.N., Ru, Y., Bachelier, L.T., Meek, J.L., Otto, M.J., Rayner, M.M., Wong, Y.N., Chang, C.-H., Weber, P.C., Jackson, D.A., Sharpe, T.R. and Erickson-Viitanen, S. (1994). Rational design of potent, bioavailable, nonpeptide cyclic ureas as HIV protease inhibitors. *Science* 263, 380-384.
- Larder, B. (1995). Viral resistance and the selection of antiretroviral combinations. *J. of AIDS* 10, S28-S33.
- Lee, P. and Hurby, D.E. (1994). Proteolytic cleavage of vaccinia virus virion proteins. Mutational analysis of specificity determinants. *J. Biol. Chem.* 269, 8616-8622.
- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Sun, Y., Kung, H.F., Blithe, D.L. and Chen, H.C. (1999). Lysozyme and RNAses as anti-HIV components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (6), 2678-2681.
- Leytus, S.P., Patterson, W.L. and Mangel, W.F. (1983). New class of sensitive and selective fluorogenic substrates for serine proteinases. Amino acid and dipeptide derivatives of rhodamine. *Biochem. J.* 215, 253-260.



- Li, S. and Hochstrasser, M. (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature* 398, 246-251.
- Lopez-Otin, C., Simon-Mateo, C., Martinez, L. and Vinuela, E. (1989). Gly-Gly-X, a novel consensus sequence for the proteolytic processing of viral and cellular proteins. *J. Biol. Chem.* 264, 9107-9110.
- Luke, C., Schick, C.,Tsu, C., Whisstock, J.C., Irving, J.A., Brömme, D., Juliano, L., Shi, G.-P., Chapman, H.A. and Silverman, G.A. (2000). Simple modifications of the serpin reactive site loop convert SCCA2 into a cysteine proteinase inhibitor : a critical role for the P3' Proline in facilitating RSL cleavage. *Biochemistry* 39, 7081-7091.
- Machleidt, W., Thiele, U., Laber, B., Assfalg-Machleidt, I., Etslerl, A., Wiegand, G., Kos, J., Turk, V. and Bode, W. (1989). Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. *FEBS Lett.* 243 (2) 234-238.
- Mangel, W.F., McGrath, W.J., Toledo, D.L. and Anderson, C.W. (1993). Viral DNA and a viral peptide can act as cofactors of adenovirus virion proteinase activity. *Nature* 361, 274-275.
- Mangel, W.F., Toledo, D.L., Brown, M.T., Martin, J.H. and McGrath, W.J. (1996). Characterization of three components of human adenovirus proteinase activity in vitro. *J.Biol.Chem.* 271, 536-543.
- Mangel, W.F., Toledo, D.L., Ding, J., Sweet, R.M. and McGrath, W.J. (1997). Temporal and spatial control of adenovirus proteinase by both a peptide and the viral DNA. Elsevier Science Ltd, 393-398.
- Mangel, W.F., Brown, M.T., Baniecki, M.L., Barnard, D. and McGrath, W.J. (2001a).

- Prevention of viral drug resistance by novel combination therapy. *Curr. Opin. Invest. Drugs.* 2. 613-616.
- Mangel, W.F., McGrath, W.J., Brown, M.T., Baniecki, M.L., Barnard, D.L. and Pang, Y.P. (2001b). A new form of antiviral combination therapy predicted to prevent resistance from arising and a model system to test it. *Curr. Med. Chem.* 8, 933-939.
- Matheson, N.R., van Halbeek, H. and Travis, J. (1991). Evidence for a tetrahedral intermediate complex during serpin-proteinase interactions. *J. Biol. Chem.* 266, 13489-13491.
- Matsumoto, K., Mizoue, K., Kitamura, K., Tse, W.C., Huber, C.P. and Ishida, T. (1999). Structural basis of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers* 51, 99-107.
- Matthews, D.A. and Russell, W.C. (1994). Adenovirus protein-protein interactions : hexon and protein VI. *J. Gen. Virol.* 75, 3365-3374.
- Matthews, D.A. and Russell, W.C. (1995). Adenovirus protein-protein interactions : molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease. *J. Gen. Virol.* 76, 1959-1969.
- McGrath, W.J., Abola, A.P., Toledo, D.L., Brown, M.T., Mangel, W.F. (1996a). Characterization of human adenovirus proteinase activity in disrupted virus particles. *Virology* 217, 131-138.
- McGrath, W.J., Ding, J., Sweet, R.M. and Mangel, W.F. (1996b). Preparation and crystallization of a complex between human adenovirus serotype 2 proteinase and its 11 amino acid cofactor pVIc. *J. Struct. Biol.* 117, 77-79.
- McGrath, W.J., Baniecki, M.L., Li, C., McWhirter, S.M., Brown, M.T., Toledo, D.L. and

- Mangel, W.F. (2001a). Human adenovirus proteinase : DNA binding and stimulation of proteinase activity by DNA. *Biochemistry* 40, 13237-13245.
- McGrath, W.J., Baniecki, M.L., Peters, E., Green, D.T. and Mangel, W.F. (2001b). Roles of two conserved cysteine residues in the activation of human adenovirus proteinase. *Biochemistry* 40, 14468-14474.
- McGrath, W.J., Aherne, K.S. and Mangel, W.F. (2002). In the virion, the 11-amino-acid peptide cofactor pVIc is covalently linked to the adenovirus proteinase. *Virology* 296, 234-240.
- Mentel, R., Kinder, M., Wegner, U., Janta-Lipinski, M. And Matthes, E. (1997). Inhibitory activity of 3'-fluoro-2'-deoxythymidine and related nucleoside analogs against adenovirus in vitro. *Antiviral Res.* 34, 113-119.
- Mentel, R. And Wegner, U. (2000). Evaluation of the efficacy of 2',3'-dideoxycytidine against adenovirus infection in a mouse pneumonia model. *Antiviral Res.* 47, 79-87.
- Mirza, M.A. and Weber, J. (1979). Uncoating of adenovirus type 2. *J. Virol.* 30, 462-471.
- Mirza, M.A. and Weber, J. (1980). Infectivity and uncoating of adenovirus cores. *Intervirology* 13, 307-311.
- Mohr, S., Hallak, H., De Boitte, A., Lapetina, E.G. and Brune, B. (1999). Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* 274, 9427-9430.
- Nevels, M., Täuber, B., Spruss, T., Wolf, H. and Dobner, T. (2001). "Hit-and-run" transformation by adenovirus oncogenes. *J.Virol.* 75, 3089-3094.
- Niemann, T.H., Trigg, M.E., Winick, N. and Penick, G.D. (1993). Disseminated adenoviral

- infection presenting as acute pancreatitis. *Hum.Pathol.*24, 1145-1148.
- Otto, H.-H. and Schirmeister, T. (1997). Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem.Rev.*97, 133-171.
- Palmer, J.T., Rasnick, D., Klaus, J.L. and Brömme, D. (1995). Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J.Med.Chem.* 38, 3193-3196.
- Pang, Y.P., Xu, K., Kollmeyer, T.M., Perola, E., McGrath, W.J., Green, D.T. and Mangel, W.F. (2001). Discovery of a new inhibitor lead of adenovirus proteinase : steps toward selective, irreversible inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 502 (2), 93-97.
- Pelletier, E. and Wain-Hobson, S. (1996). AIDS is not caused by the extreme genetic variability of HIV. *J.NIH.Res.* 8, 45-49.
- Percival, M.D., Ouellet, M., Campagnolo, C., Claveau, D. and Il, C. (1999). Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors : evidence for the formation of mixed disulfides and sulfenic acid. *Biochemistry* 38, 13574-13583.
- Plotnik, M.I., Mayne, L., Schechter, N.M. and Rubin, H. (1996). Distorsion of the active site of chymotrypsin complexed with a serpin. *Biochemistry* 35, 7586-7590.
- Potempa, J., Korzus, E. and Travis, J. (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors structure, function and regulation. *J.Biol.Chem.* 269, 15957-15960.
- Qualikene, W., Lamoureux, L., Weber, J.M. and Massie, B. (2000). Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines : applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy. *Hum.Gene.Ther.* 11, 1341-1353.
- Quan, L.T., Caputo, A., Bleackley, R.C., Pickup, D.J. and Salvesen, G.S. (1995). Granzyme B is inhibited by the cowpox virus serpin cytokine response modifier A. *J.Biol.Chem.* 270,

10377-10379.

- Rancourt, C., Tihanyi, K., Bourbonnière, M. and Weber, J.M. (1994). Identification of active site residues of the adenovirus endopeptidase. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 91, 844-847.
- Rancourt, C., Keyvani-Amineh, H., Sircar, S., Labrecque, P. and Weber, J.M.(1995). Proline 137 is critical for Adenovirus protease encapsidation and activation but not enzyme activity. *Virology* 209, 167-173.
- Rancourt, C., Keyvani-Amineh, H., Diouri, M. and Weber, J.M. (1996). Mutagenesis of conserved residues of the adenovirus protease. *Virology* 224, 561-563.
- Richman, D.D. (1995). Drug resistance in relation to pathogenesis. *AIDS*. 9, S49-S53.
- Romanowski, E.G. and Gordon, Y.J. (2000). Efficacy of topical cidofovir on multiple adenoviral serotypes in the New Zealand rabbit ocular model. *Invest. Ophthalmol.Vis.Sci.* 41, 460-463.
- Romanowski, E.G., Yates, K.A. and Gordon, Y.J. (2001). Antiviral prophylaxis with twice daily topical cidofovir protects against challenge in the adenovirus type 5/New Zealand rabbit ocular model. *Antiviral Res.* 52 (3) , 275-280.
- Russell, W.C. and Precious, B. (1982). Nucleic acid-binding properties of adenovirus structural polypeptides. *J.Gen.Virol.* 63, 69-79.
- Ruzindana-Umunyana A., Sircar, S., Schick, C., Silverman, G.A. and Weber, J.M. (2000a). Adenovirus endopeptidase hydrolyses human squamous cell carcinoma antigens *in vitro* but not *ex vivo*. *Virology* 268 (1), 141-146.
- Ruzindana-Umunyana, A., Sircar, S. and Weber, J.M. (2000b). The effect of mutant peptide cofactors on adenovirus protease activity and virus infection. *Virology* 270 (1), 173-179.

- Ruzindana-Umunyana, A. and Weber, J.M. (2001). Interactions of human lacrimal and salivary cystatins with adenovirus endopeptidase. *Antiviral Res.* 51, 203-214.
- Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L. and Weber, J.M. (2002). Substrate specificity of adenovirus protease. *Virus Res.* *In press.*
- Saura, M., Zaragoza, C., McMillan, A., Quick, R.A., Hohenadl, C., Lowenstein, J.M. and Lowenstein, C.J. (1999). An antiviral mechanism of nitric oxide : inhibition of a viral protease. *Immunity* 10, 21-28.
- Schick, C., Kamachi, Y., Bartuski, A.J., Cataltepe, S., Schechter, N.M., Pemberton, P.A., and Silverman, G.A. (1997). Squamous cell carcinoma antigen 2 is a novel serpin that inhibits the chymotrypsin-like proteinases cathepsin G and mast cell chymase. *J.Biol.Chem.* 272, 1849-1855.
- Schick, C., Pemberton, P.A., Shi, G.-P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A.J., Gornstein, E.R., Brömme, D., Chapman, H.A. and Silverman, G.A. (1998a). Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsin K, L and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1 : a kinetic analysis. *Biochemistry* 37, 5258-5266.
- Schick, C., Brömme, D., Bartuski, A.J., Uemura, Y., Schechter, N.M. and Silverman, G.A. (1998b). The reactive site loop of the serpin SCCA1 is essential for cysteine proteinase inhibitor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95, 13465-13470.
- Schneider, S.S., Schick, C., Fish, K.E., Miller, E., Pena, J.C., Treter, S.D., Hui, S.M. and Silverman, G.A. (1995). A serine proteinase inhibitor locus at 18q21.3 contains a tandem duplication of the human squamous cell carcinoma antigen gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 3147-3151.

- Shenk, T. (1996). Adenoviridae : the viruses and their replication, 2111-2148. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howler, P.M. (Ed.), *Virology*, 3<sup>rd</sup> ed., vol.2. Lippincott-Raven. New York, N.Y.
- Shigeta, S. (2000). Recent progress in antiviral chemotherapy for respiratory syncytial virus infections. *Exp. Opin. Invest. Drug* 9, 221-236.
- Shugars, D.C. (1999). Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. *J. Infect. Dis.* 179, S431-S435.
- Silverman, G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G.W., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., Pemberton, P.A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G.S., Travis, J. And Whisstock, J.C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *J. Biol. Chem.* 276 (36), 33293-33296.
- Singh, I.P. and Baron, S. (2000). Innate defenses against viraemia. *Rev. Med. Virol.* 10(6), 395-403.
- Singh, I.P., Coppenhaver, D.H., Chopra, A.K. and Baron, S. (2001). Innate gastrointestinal immunity : Characterization of broadly active viral inhibitors. *Antiviral Res.* 49 (3). 157-167.
- Sircar, S., Keyvani-Aminch, H. and Weber, J.M. (1996). Inhibition of adenovirus infection with protease inhibitors. *Antiviral Res.* 30, 147-153.
- Sircar, S., Ruzindana-Umunyana, A., Neugebauer, W. and Weber, J.M. (1998). Adenovirus endopeptidase and papain are inhibited by same agents. *Antiviral Res.* 40, 45 - 51.
- Slyuterman, L.A.A. and Wijdenes, J. (1973). Benzoylamidoacetonitrile as an inhibitor of

- papain. *Biochim.Biophys.Acta* 302, 95-101.
- Stratikos, E. and Gettins, P.G. (1999). Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70Å and full insertion of the reactive center loop into  $\beta$ -sheet A. *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 4808-4813.
- Strunnikov, A.V., Aravind, L. and Koonin, E.V. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* SMT4 encodes an evolutionarily conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics* 158, 95-107.
- Suzuki, T., Ichiyama, A., Saitoh, H., Kawakami, T., Omata, M., Chung, C.H., Kimura, M., Shimbara, N. and Tanaka, K. (1999). A new 30-kDa ubiquitin-related SUMO-1 hydrolase from bovine brain. *J.Biol.Chem.* 274, 31131-31134.
- Tantillo, C., Ding, J., Jacobo-Molina, A., Nanni, R.G., Boyer, P.L., Hughes, S.H., Pauwels, R., Andries, K., Janssen, P.A. and Arnold, E. (1994). Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J.Mol.Biol.* 243, 369.
- Tarnowska, M., Oldziej, S., Liwo, A., Kania, P., Kasprzykowski, F. and Grzonka, Z. (1992). MNDO study of the mechanism of the inhibition of cysteine proteinases by diazomethyl ketones. *Eur.Biophys.J.* 21, 217-222.
- Thomson, D., Meers, J. and Harrach, B. (2002) Molecular confirmation of an adenovirus in brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*). *Virus Res.* 83 (1-2), 189-195.
- Tihanyi, K., Bourbonnière, M., Houde, A., Rancourt, C., and Weber, J.M. (1993) Isolation and properties of the adenovirus type 2 proteinase. *J. Biol. Chem.*, 268(3), 1780-1785.



- Travis, J., Guzdek, A., Potempa, J. and Watorek, W. (1990). Serpins : structure and mechanism of action. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 371, Suppl. 3-11.
- Tremblay, M., Dery, C., Talbot, B. and Weber, J.M. (1983). In vitro cleavage specificity of the adenovirus type 2 proteinase. *Biochim.Biophys.Acta* 743, 239-245.
- Tyndall, J.D.A. and Fairlie, D.P. (1999). Conformational homogeneity in molecular recognition by proteolytic enzymes. *J.Mol. Recognit.* 12, 363 - 370.
- Veber, D.F. and Thompson, S.K. (2000). The therapeutic potential of advances in cysteine protease inhibitor design. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 3(4), 362-369.
- Weber, J.M. (1976). Genetic analysis of adenovirus type 2 III. Temperature sensitivity of processing of viral proteins. *J.Virol.* 17, 462-471.
- Weber, J.M., Cai, F., Murali, R. and Burnett, R.M. (1994a). Sequence and structural analysis of murine adenovirus type 1 hexon. *J.Gen.Virol.* 75, 141-147.
- Weber, J.M. and Tihanyi, K. (1994b) Adenovirus endopeptidases. In *Proteolytic Enzymes. part D, Methods in Enzymology*, 244, 595-604.
- Weber, J.M. (1995). The adenovirus endopeptidase and its role in virus infection. In "Molecular Repertoire of Adenoviruses" Vol.199/I, *Curr. Top. Micro. Imm.*, (W.Doerfler and P.Bohm, Eds), pp.227-235, Springer-Verlag, Berlin.
- Weber, J.M. (1999). Role of endopeptidase in adenovirus infection. In "Adenoviruses : From Basic Research to gene Therapy Application" (P.Seth, Ed.), Humana Press, Clifton, NJ.
- Weber, J.M. (2002a). Adenovirus protease. In "Handbook of Proteolytic Enzymes" Second Edition, eds. Barrett, A.J. et al.

- Weber, J.M., Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L. and Sircar, S. (2002b). Inhibition of Adenovirus Protease and Infection by Green Tea Catechins. *En préparation*
- Webster, A., Russell, W.C. and Kemp, G.D. (1989a). Characterization of the adenovirus proteinase : development and use of a specific peptide assay. *J.Gen.Virol.* 70, 3215-3224.
- Webster, A., Russell, S., Talbot, P., Russell, W.C. and Kemp, G.D. (1989b). Characterization of the adenovirus proteinase : substrate specificity. *J.Gen.Virol.* 70, 3225-3234.
- Webster, A., Hay, R.T. and Kemp, G. (1993). The adenovirus protease is activated by a virus-coded disulphide-linked peptide. *Cell* 72, 97-104.
- Webster, A. and Kemp, G.D. (1993). The active adenovirus protease is the intact L3 23K protein. *J.Gen.Virol.* 74, 1415-1420.
- Webster, A., Leith, I.R., Nicholson, J., Hounsell, J. and Hay, R.T. (1997). Role of preterminal protein processing in adenovirus replication. *J. Virol.* 71, 6381-6389.
- Wesley, A.G., Pather, M. and Tait, D. (1993). Nosocomial adenovirus infection in a paediatric respiratory unit. *J.Hosp.Infect.* 25, 183-190.
- West, M.L. and Fairlie, D.P. (1995). Targeting HIV-1 protease : a test of drug-design methodologies. *Trends Pharm.Sci.* 16, 67-75.
- Wickham, T.J. (2000). Targeting adenovirus. *Gene Ther.* 7, 110-114.
- Wright, H.T. (1996). The structural puzzle of how serpin serine proteinase inhibitors work. *BioEssays* 18 (6), 453-464.
- Xian, M., Chen, X., Liu, Z., Wang, K. and Wang, P.G. (2000). Inhibition of papain by S-nitrosothiols. *J.Biol.Chem.* 275, 20467-20473.
- Yeh-Kai, L., Akusjarvi, G., Alestrom, P., Pettersson, U., Tremblay, M. and Weber, J.M.

(1983). Genetic identification of an endoproteinase encoded by the adenovirus genome. *J.Mol.Biol.* 167, 217-222.

Zech, B., Wilm, M., Van Eldik, R. And Brune, B. (1999). Mass spectrometric analysis of nitric oxide- modified caspase 3. *J.Biol.Chem.* 274, 20931-20936.

## ANNEXE

### ARTICLE V

Sircar, S., Ruzindana-Umunyana, A., Neugebauer, W. And Weber, J.M. (1998).

Adenovirus endopeptidase and papain are inhibited by the same agents. *Antiviral Research* 40, 45-51.

#### ***Préambule***

Ce manuscrit décrit les résultats obtenus en testant des candidats inhibiteurs de la papaïne sur l'activité de l'adenain dans deux systèmes différents. *in vitro* et *ex vivo*. Ma contribution a été d'effectuer des tests d'activité préliminaires sur l'enzyme recombinante en utilisant les substrats viraux et le substrat synthétique fluorogénique R110.

## Adenovirus endopeptidase and papain are inhibited by the same agents

Sucheta Sircar <sup>a</sup>, Angélique Ruzindana-Umunyana <sup>a</sup>, Witold Neugebauer <sup>b</sup>,  
Joseph M. Weber <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Que. J1H 5N4, Canada

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Sherbrooke, Que. J1H 5N4, Canada

Received 1 May 1998; accepted 19 June 1998

---

### Abstract

Adenoviruses encode a cysteine protease (AVP) which carries out highly specific cleavages on at least seven viral proteins and two cellular proteins. Virus infectivity is dependent on this function. The three-dimensional positions of the amino acids involved in catalysis display a striking similarity to those of papain, suggesting a similar catalytic mechanism. This similarity has prompted us to compare the effect of papain inhibitors on the two enzymes. AVP and papain activity was tested on a fluorescent peptide substrate as well as on metabolically labeled adenovirus (Ad2) precursor proteins. Hep2 cells infected with Ad2 were exposed to inhibitors and assayed for, (a) infectious virus, (b) in situ Ad2 protease activity, (c) physical particle production and their polypeptide composition. We found that in both substrate systems AVP was sensitive to the papain inhibitors benzamidoacetonitrile, acetamidoacetonitrile and *N*-methoxyphenylalanine glycyl nitrile, and that the degree of sensitivity was influenced by the substrate. Unlike papain, AVP was relatively insensitive to E64. In *ex vivo* tests, Hep2 cells infected with Ad2 were exposed to inhibitors and assayed for, (a) infectious virus, (b) in situ Ad2 protease activity, (c) physical particle production and their polypeptide composition. A 4-fold reduction in virus titer was obtained when the inhibitors were added between 17 and 25 h after infection. Processing of precursor proteins was also inhibited yet the production of physical particles was only reduced 2-fold. These experiments show that papain inhibitors are also capable of inhibiting the adenovirus protease both *in vitro* and *ex vivo*, thus forging a possible link between structural similarity and functionality. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Adenovirus type 2; Protease; Cysteine; Papain; Inhibitors

---

\* Corresponding author. Tel.: +1 819 5645326; fax: +1 819 5645392; e-mail: j.weber@courrier.usherb.ca

## 1. Introduction

Proteolytic processing is an essential part of the life cycle of many viruses. Adenoviruses encode a cysteine protease which carries out highly specific cleavages on at least seven viral proteins and two cellular proteins (Weber, 1995). Virus infectivity is absolutely dependent on the proteolytic function (Weber, 1976; Grierson et al., 1994; Weber, 1995; Greber et al., 1996). The enzyme is packaged into virus particles as the integral protein. The ts1 mutant of Ad2 prevents encapsidation of the otherwise active AVP, resulting in unprocessed virions at the nonpermissive temperature which fail to uncoat in a subsequent infection (Cotten and Weber, 1995; Rancourt et al., 1995). Genetic and structural data have identified the active site as His54-Glu71-Cys122 (Rancourt et al., 1994; Ding et al., 1996). Thus, AVP is a thiol protease, a classification consistent with its sensitivity to cysteine protease inhibitors and relative insensitivity to inhibitors of other classes of proteases (Webster et al., 1989; Tihanyi et al., 1993; Weber and Tihanyi, 1994).

The enzyme is stimulated by formation of a disulfide bond between Cys104 of the enzyme and Cys10' of an eleven amino acid cleavage fragment from the C-terminus of virus protein PVI (Mangel et al., 1993; Webster et al., 1993; Ding et al., 1996). Mangel and his colleagues noted a striking similarity with papain in the three-dimensional positions of the amino acids involved in catalysis, suggesting a similar catalytic mechanism (Ding et al., 1996). The substrate cleavage sites of the two enzymes are quite different: (M,I,L)XGG-X or (M,I,L)XGX-G for AVP and nonspecific for papain with preference for Arg or Lys in the P1' position. While little work has been done on inhibitors of AVP (Cornish et al., 1995; Sircar et al., 1996), there is a considerable literature on the inhibition of papain (Brisson et al., 1986; Foje and Hanzlik, 1994; Hanzlik and Liu, 1995; Turk et al., 1997). The potential similarity in the catalytic mechanism between the two enzymes has prompted us to compare the effect of papain inhibitors on the two enzymes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cells and virus

Human adenovirus type 2 (Ad2) was grown and titered in monolayer cultures of Hep2 cells using Delbecco's modified minimum essential medium (DMEM) supplemented with 2.5% calf serum. To harvest virus, infected cells were washed once in DMEM without serum and rapidly frozen thawed six times. These cell lysates were clarified by low speed centrifugation and titered. Purified virus was prepared by equilibrium density gradient centrifugation in CsCl. The visible virus band (from three 10 cm petri dishes) was collected from the top, dialysed and the optical density determined by disrupting the virions with 1% sodium dodecyl sulphate (SDS). Virion proteins were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and stained with silver.

### 2.2. Inhibitor studies

In pulse-chase experiments infected cells were labeled with 30  $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{l}$  of [ $^{35}\text{S}$ ]methionine from 23 to 24 h p.i., the isotope removed and inhibitors added directly to the cells for 15 min. followed by medium and excess methionine (chase) to achieve the indicated inhibitor concentrations. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and followed by autoradiography.

### 2.3. Inhibitors

Benzamidoacetonitrile (BAN) is a powerful competitive inhibitor ( $K_i = 0.14 \text{ mM}$ ) of papain (Sluyterman and Wijdenes, 1973). Acetamidoacetonitrile (AAN) is a reversible inhibitor of papain (Hanzlik et al., 1990). *N*-Methoxyphenylalanine glycylnitrile (MPN) is a specific substrate analog inhibitor of papain which is thought to form a reversible covalent thioimidate bond between the nitrile group and the active site sulfhydryl of papain to rationalize the potency of the inhibition ( $K_i < 10^{-3} \times K_m$ ). Stock solutions of inhibitors were prepared as follows: (a) E64 (Sigma), 5 mM in distilled water; (b) Iodoacetate (Boehringer

Mannheim), 10 mM in distilled water freshly prepared and pH adjusted to 7.5 with Tris–HCl; (c) BAN (mol. wt. 160) initially dissolved in minimal amount of DMSO then 10 mM in DMEM; (d) AAN (mol. wt. 98) also initially dissolved in minimal amount of DMSO then 10 mM in DMEM (Neugebauer et al., 1996); (e) MPN (mol. wt. 234) dissolved in minimal amount of DMSO then 5 mM in DMEM (Neugebauer et al., 1996).

#### 2.4. Enzymes and peptides

Recombinant adenovirus type 2 protease (AVP; EC3.4.22.–) was purified by affinity chromatography from an *E. coli* expression system as described before (Houde and Weber, 1990). Papain (EC 3.4.22.2; 2 × crystallized) was purchased from Sigma.

#### 2.5. Enzyme assays

Quantitative assays were carried out with a fluorescent peptide substrate, rhodamine 110, bis-(L-leucyl-L-arginylglycylglycine amide), tetrahydrochloride (R110), purchased from Molecular Probes, Inc. (4849 Pitchford Ave., Eugene, OR 97402), essentially as described before (Diouri et al., 1995). The reaction mixture contained TE buffer (10 mM Tris–HCl, pH 8, 1 mM EDTA, 40 μM pVlc (enzyme activating peptide GVQSLKR-RRCF), 5 μM R110, 1 μg of AVP or papain, in a total volume of 300 μl. Inhibitors were always added subsequent to coupling the activating peptide to the enzyme. Incubation was at 37°C for 18 h and the fluorescence was measured as before (Diouri et al., 1995).

Qualitative assays were done using ts1 infected cell lysates labelled with [<sup>35</sup>S]methionine at the nonpermissive temperature (39°C) at 24 h p.i. as a source of viral precursor proteins (Keyvani-Amineh et al., 1995). Ts1 is a mutant temperature sensitive for protease activity (Weber, 1976). Any residual protease activity was inactivated by boiling this substrate for 2 min. A 100 μl reaction mixture contained TE buffer (pH 8), 0.5 μg AVP or 0.01 μg papain, the proteins of a ts1 infected cell lysate at the nonpermissive temperature which contained 10 μg of viral precursor protein pVII

(as well as other ts1 proteins in relative proportion) and inhibitor at the indicated concentration. The reaction was incubated at 37°C for 18 h and stopped by boiling in lysing solution.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Effect of inhibitors on enzyme activity

To compare the relative potency of inhibition of the adenovirus protease (AVP) with papain, in addition to the general thiol inhibitors, iodoacetamide (IAA) and E64, two simple nitrile analogs of papain substrates, benzamido acetonitrile (BAN) and acetamido acetonitrile (AAN) and one peptide nitrile, *N*-methoxy phenylalanylo-glycyl-nitrile (MPN), were chosen. The fluorescent peptide substrate LRGG-rhodamine-GGRL (R110) employed in the enzyme assay, is specific for AVP but is also efficiently digested by papain (Table 1). For maximal activity, AVP requires the eleven amino acid pVlc peptide as cofactor. The treatment noted as pVlc raised the basal activity of the enzyme from 976 to 31 009 fluorescence units. The activated enzyme was used in the inhibition studies and this value was taken as 100% enzyme activity. We found that AVP was sensitive to each of the three nitrile inhibitors to an extent exceed-

Table 1  
Effect of papain inhibitors on adenovirus protease activity in vitro

Treatment	Relative enzyme activity <sup>a</sup>			
	AVP	(%)	Papain	(%)
–	976		8005	100
pVlc	31 009	100		
AAN	3821	12	1472	18
BAN	1585	5	1007	12
MPN	1405	4	874	11
IAA	994	3	606	7
E64	22 857	71	640	8

<sup>a</sup> The reactions contained 1 μg enzyme, 7 μM R110 fluorescent peptide substrate, 66 μM inhibitor, 40 μM pVlc. Reactions were incubated overnight and the numbers indicate fluorescence intensity. Results are from at least three determinations. Standard deviations were 9–13%.

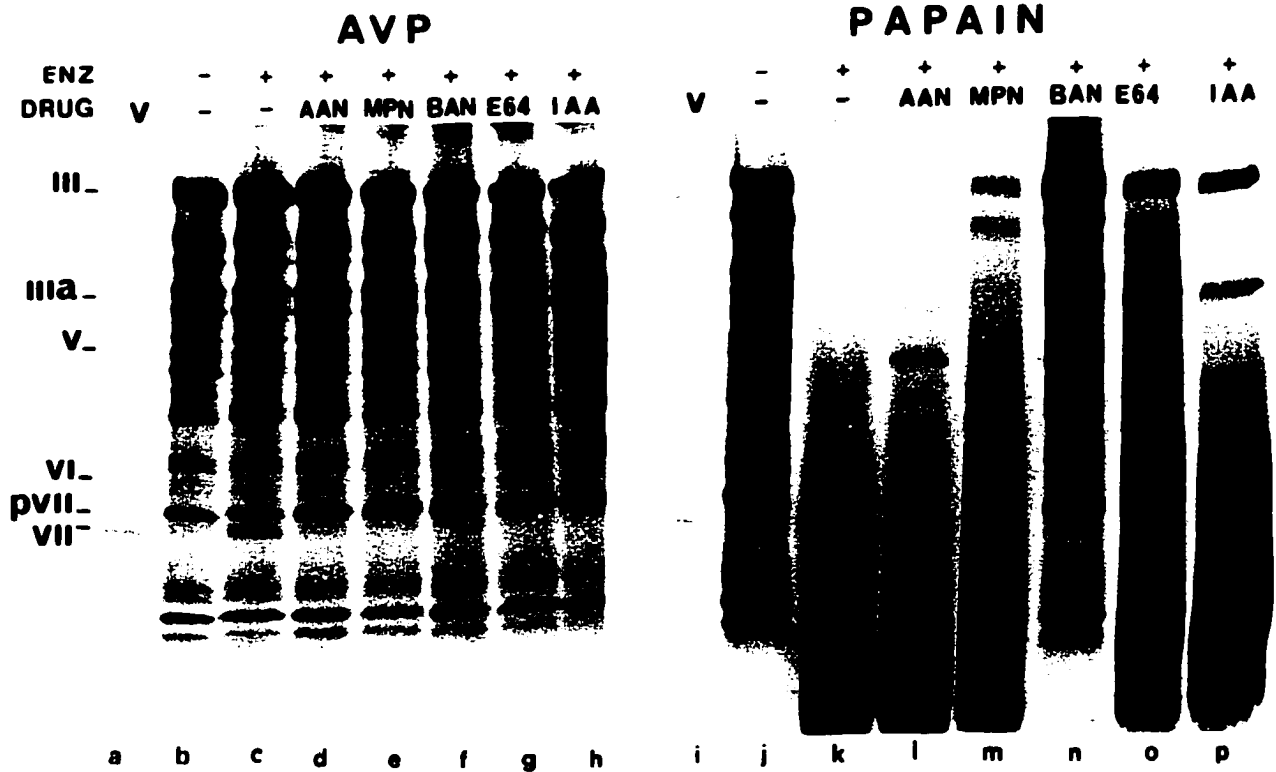


Fig. 1. The effect of inhibitors on the digestion of adenovirus proteins by AVP and papain in vitro. The reaction mixtures contained  $^{35}\text{S}$ -labeled ts1 proteins (10  $\mu\text{g}$  of protein pVII), 0.5  $\mu\text{g}$  of AVP or 0.01  $\mu\text{g}$  of papain and 50  $\mu\text{M}$  of inhibitor, as indicated on the figure. The reactions were incubated at 37°C for 18 h, then stopped by boiling in lysing solution and subjected to SDS-PAGE and autoradiographed. V,  $^{35}\text{S}$ -met labeled Ad2 marker virus.

ing that of papain. The relative insensitivity of AVP to E64, an agent which has been shown to be an excellent irreversible inhibitor of papain, has been noted before (Tihanyi et al., 1993).

The above results were obtained with an artificial peptide substrate. Because the type of substrate may influence relative cleavage efficiency, we repeated the inhibition experiments with authentic protein substrates in the form of metabolically labeled adenovirus structural proteins. Enzyme concentrations and incubation time were adjusted with each enzyme to obtain readable results. Fig. 1 shows the results of a typical experiment. The inhibition of AVP is best seen in the case of the pVII core protein which is normally cleaved to VII (Fig. 1, lane c). Papain cleaves all viral proteins to small peptides (Fig. 1, lane k). Again all of the inhibitors efficiently stopped AVP activity. This assay, however, does not lend itself to quantitative comparisons. In the case of pa-

pain, the relative efficiency of the inhibitors is easily assessed qualitatively: AAN being the least efficient, followed by MPN, IAA and E64 in increasing potency of inhibition. BAN appeared to be the most potent inhibitor in this assay (Fig. 1, lane n).

### 3.2. Effect of inhibitors on virus infection

The effect of BAN, MPN and AAN on the yield of infectious virus was tested by adding the inhibitors to the medium during virus infection. Inhibitors were added (at 50  $\mu\text{M}$  final concentration) at different times after infection to determine the optimal period of sensitivity. Infectious virus was titered 48 h after infection. A 4-fold reduction in virus titer was obtained when the inhibitors were added between 17 and 25 h after infection. This effect quickly disappeared when the inhibitors were added before or after these times.



Lower concentrations of inhibitors (1, 5, 10  $\mu\text{M}$ ) showed no detectable effect. Higher concentrations were cytotoxic.

The reduction in virus production in the presence of the inhibitors could be due to either non-specific effects or due to the inhibition of the viral protease. To distinguish between these alternatives we looked first at protease activity in infected cells and secondly, at the production of virus particles. In the first instance infected cells were pulse labeled between 23 and 24 h with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine and then chased in the presence or absence of inhibitor. Virus protein processing was examined by electrophoresis followed by autoradiography.

Examples of results obtained with BAN and MPN show that the processing of the precursors to capsid proteins VI and VII was nearly completely inhibited (Fig. 2, lanes e, j) when the concentration of inhibitors was raised to 50  $\mu\text{M}$ . The inhibition of processing was dose-dependent and BAN was the most effective, showing a 25%

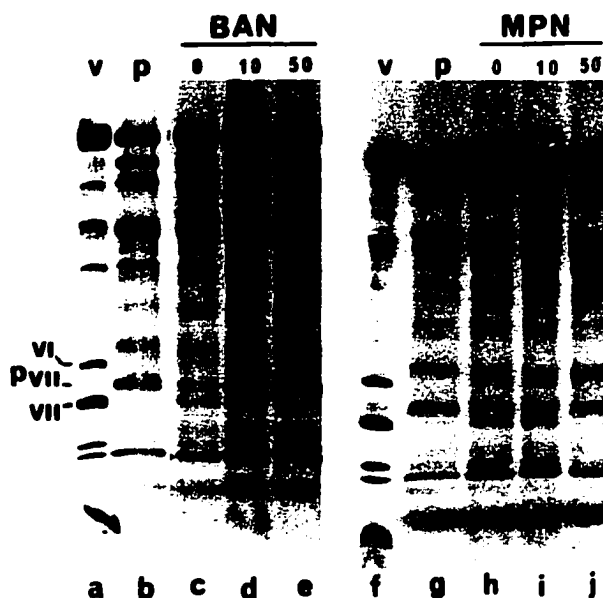


Fig. 2. Effect of BAN and MPN on the proteolytic cleavages in adenovirus infected cells. Infected cells were pulse-labeled with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine from 23 to 24 h post-infection (lanes b–e and g–j) and then chased in the presence of 0, 10 or 50  $\mu\text{M}$  BAN (lanes c–e) or MPN (lanes h–j) until 48 h. Cell lysates were prepared and the proteins separated by SDS-PAGE and autoradiographed. V, [ $^{35}\text{S}$ ]methionine labeled Ad2 marker virus

reduction in processing of PVII to VII at 10  $\mu\text{M}$ , increasing to 100% at 50  $\mu\text{M}$  (Fig. 2, lanes d, e). These results are consistent with the interpretation that the viral protease is inhibited. They, however does not rule out the possibility that the observed reduction in cleavage was due to non-specific toxicity. This possibility was addressed by the second approach which consisted in assessing the production of virus particles; the rationale being that unhealthy cells produce less virus. Inhibitors were added to infected cell cultures at 18 h after infection and the viruses were purified at 48 h after infection. The viral bands at density 1.34 g/ml were collected from the CsCl gradients and the optical density was determined. BAN at 0, 1, 50  $\mu\text{M}$  gave 2.0, 1.8, 1.0 OD<sub>260</sub> units of virus, respectively and MPN at 0, 1, 10 and 50  $\mu\text{M}$  gave 0.7, 0.7, 0.6, 0.5 OD<sub>260</sub> units of virus, respectively. These figures show a maximum 2-fold reduction in virus production, whereas the reduction in infectious virus titer was respectively 1-, 4-, 64-fold for BAN and 1-, 1-, 3-, 11-fold for MPN. Consequently we suggest that the inhibitors cause minimal toxicity, but efficiently inhibit infectious virus production by inhibiting proteolytic processing. This conclusion predicts that a certain proportion of the viruses produced in the presence of these inhibitors are noninfectious and contain up-processed precursor proteins. Fig. 3 shows stained electropherograms from one of the experiments, clearly demonstrating the presence of pVI and pVII precursor proteins at the inhibitory concentration of BAN and MPN (50  $\mu\text{M}$ ; lanes d, e and j). Drug induced toxicity was also verified on uninfected cell cultures by means of plating efficiency. The size and number of colonies remained unaffected at drug (AAN, BAN, MPN) concentrations up to 100  $\mu\text{M}$ . Taken together these experiments strongly support our contention that these papain inhibitors are also capable of efficiently inhibiting the adenovirus protease.

The structural similarity in the active sites of papain and AVP have been suggested to predict a similar catalytic mechanism (Ding et al., 1996). Here we have shown that these similari-

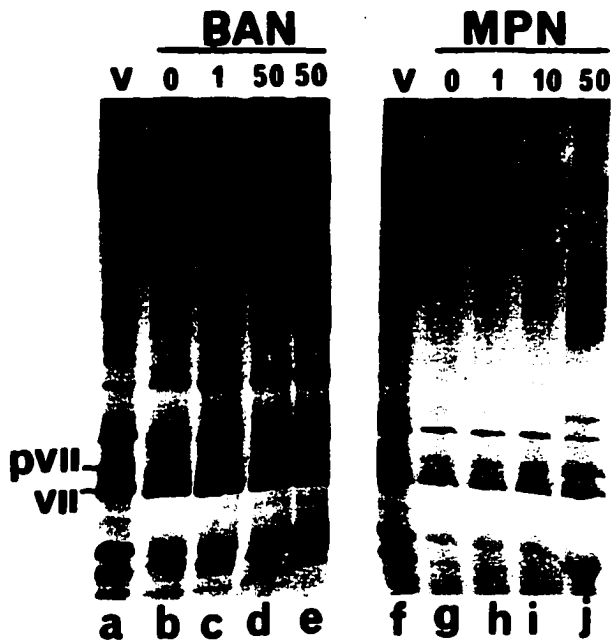


Fig. 3. Effect of BAN and MPN on virus production and maturation. BAN and MPN were added directly on infected cells for 15 min. at 18 h post-infection, then fresh culture medium was added to achieve the final concentrations indicated on the figure (0–50  $\mu$ M). 48 h after infection at 37°C the cells were harvested and the virus was purified by CsCl density gradient centrifugation and subjected to SDS-PAGE and stained with silver. The optical density of the virion band at 1.34 g/ml CsCl density was established as follows: lanes b–e, 2.0, 1.8, 1.0, 1.0, respectively, and lanes g–j, 0.7, 0.7, 0.6, 0.5, respectively. V, Ad2 virus marker.

ties between the two enzymes appear also to extend to modes of inhibition: three substrate analogues which are competitive inhibitors of papain also inhibited AVP. This knowledge should aid in the design of more powerful and specific inhibitors of AVP as therapeutic agents to control adenovirus infections.

#### Acknowledgements

This research was supported by Grant MT4164 to J.M.W. from the Medical Research Council of Canada. A.R.-U. was the recipient of a predoctoral scholarship from the Programme Canadien de Bourses de la Francophonie. We thank Lise Imbeault for technical assistance.

#### References

- Brisson, J.R., Carey, P.R., Storer, A.C., 1986. Benzoylamidoacetonitrile is bound as a thioimidate in the active site of papain. *J. Biol. Chem.* 261, 9087–9089.
- Cornish, J.A., Murray, H., Kemp, G.D., Gani, D., 1995. Specific inhibitors of the adenovirus type 2 proteinase based on substrate-like tetrapeptide nitriles. *Bioorganic and Med. Chem. Lett.* 5, 25–30.
- Cotten, M., Weber, J.M., 1995. The adenovirus protease is required for virus entry into host cells. *Virology* 213, 494–502.
- Ding, J., McGrath, W.J., Sweet, R.M., Mangel, W.F., 1996. Crystal structure of the human adenovirus proteinase with its 11 amino acid cofactor. *EMBO J.* 15, 1778–1783.
- Diouri, M., Geoghegan, K.F., Weber, J.M., 1995. Functional characterization of the adenovirus proteinase using fluorogenic substrates. *Protein Peptide Lett.* 6, 363–370.
- Foje, K.L., Hanzlik, R.P., 1994. Peptidyl thioamides as substrates and inhibitors of papain, and as probes of the kinetic significance of the oxyanion hole. *Biochim. Biophys. Acta* 1201, 447–453.
- Greber, U.F., Webster, P., Weber, J., Helenius, A., 1996. The role of the adenovirus protease in virus entry into cells. *EMBO J.* 15, 1766–1777.
- Grierson, A.W., Nicholson, R., Talbot, P., Webster, A., Kemp, G., 1994. The protease of adenovirus serotype 2 requires cysteine residues for both activation and catalysis. *J. Gen. Virol.* 75, 2761–2764.
- Hanzlik, R.P., Liu, S., 1995. Effects of ligand homologation and ligand reactivity on the apparent kinetic specificity of papain. *Biochim. Biophys. Acta* 1250, 43–48.
- Hanzlik, R.P., Zygmunt, J., Moon, J.B., 1990. Reversible covalent binding of peptide nitriles to papain. *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 62–70.
- Houde, A., Weber, J.M., 1990. Adenovirus proteinases: comparison of amino acid sequences and expression of the cloned cDNA in *Escherichia coli*. *Gene* 88, 269–273.
- Keyvani-Amineh, H., Labrecque, P., Cai, F., Carstens, E.B., Weber, J.M., 1995. Adenovirus protease expressed in insect cells cleaves adenovirus proteins, ovalbumin and baculovirus protease in the absence of activating peptide. *Virus Res.* 37, 87–97.
- Mangel, W.F., McGrath, W.J., Toledo, D.L., Anderson, C.W., 1993. Viral DNA and a viral peptide can act as cofactors of adenovirus virion proteinase activity. *Nature* 361, 274–275.
- Neugebauer, W., Pinet, E., Kim, M., Carey, P.R., 1996. Modified method of synthesis of N-substituted dithioesters of amino acids and peptides in the Pinner reaction. *Can. J. Chem.* 74, 341–343.
- Rancourt, C., Tihanyi, K., Bourbonnière, M., Weber, J.M., 1994. Identification of active-site residues of the adenovirus endopeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 844–847.
- Rancourt, C., Keyvani-Amineh, H., Sircar, S., Labrecque, P., Weber, J.M., 1995. Proline 137 is critical for Adenovirus protease encapsidation and activation but not enzyme activity. *Virology* 209, 167–173.

- Sircar, S., Keyvani-Amineh, H., Weber, J.M., 1996. Inhibition of adenovirus infection with protease inhibitors. *Antiviral Res.* 30, 147–153.
- Sluyterman, L.A.A., Wijdenes, J., 1973. Benzoylamidoacetonitrile as an inhibitor of papain. *Biochim. Biophys. Acta* 302, 95–101.
- Tihanyi, K., Bourbonniere, M., Houde, A., Rancourt, C., Weber, J.M., 1993. Isolation and properties of the adenovirus type 2 proteinase. *J. Biol. Chem.* 268, 1780–1785.
- Turk, B., Turk, V., Turk, D., 1997. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* 378, 141–150.
- Weber, J.M., 1976. Genetic analysis of adenovirus type 2. III. Temperature sensitivity of processing of viral proteins. *J. Virol.* 17, 462–471.
- Weber, J.M., 1995. The adenovirus endopeptidase and its role in virus infection. In: Doerfler, W., Bohm, P. (Eds.), *Molecular Repertoire of Adenoviruses*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199/I, 227–235.
- Weber, J.M., Tihanyi, K., 1994. Adenovirus endopeptidases. *Methods in Enzymology* 244D, 595–604.
- Webster, A., Russell, W.C., Kemp, G.D., 1989. Characterization of the adenovirus proteinase: Development and use of a specific peptide assay. *J. Gen. Virol.* 70, 3215–3223.
- Webster, A., Hay, R.T., Kemp, G., 1993. The adenovirus protease is activated by a virus-coded disulphide-linked peptide. *Cell* 72, 97–104.