NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **315895** (13) B1

(51) Int Cl[7] A 61 K 38/17

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19941377	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1992.10.16, PCT/US92/08918
(22) Inng. dag	1994.04.15	(85) Videreføringsdag	1994.04.15
(24) Løpedag	1992.10.16	(30) Prioritet	1991.10.17, US, 778510
(41) Alm. tilgj.	1994.06.10		
(45) Meddelt dato	2003.11.10		

(71) Patenthaver The Regents of the University of California,
300 Lakeside Drive, 22nd Floor, Oakland, CA 94612-3350, US

(72) Oppfinner Wen-Hwa Lee, San Antonio, TX 78233, US
Eva Y. H. P. Lee, San Antonio, TX 78233, US
David W. Goodrich, San Antonio, TX 78245, US
Nang-Ping Wang, Seattle, WA 98115, US

(74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) Benevnelse **Farmasøytisk preparat for kontroll av cellesyklusutvikling, fremstilling av dette for regulering av cellesyklusutvikling i en celle som mangler et funksjonelt retinoblastomtumorsuppressorprotein, samt fremgangsmåte for kontroll av cellesyklusutvikling i en celle, in vitro, der cellen mangler et funksjonelt retinoblastomtumorsuppressorgen**

(56) Anførte publikasjoner WO 91/09114, EP 0440744
Lee et al., 1987, Nature, vol. 329, s. 642-645

(57) Sammendrag

Fremgangsmåte for kontroll av cellesyklusutvikling, inkludert innføring av interfasedelen av det cellesyklusregulerende preparat i en celle som skal kontrolleres. Preparatet er utvalgt fra et protein og et fragment av proteinet, for å endre cellesyklusutviklingen under opprettholdelse av cellens levedyktighet. Proteinfragmentene er funnet å besitte de uventede og overraskende karakteristiske egenskaper ved å være oppløselig i lave konsentrasjoner av glyserol, hvilket derved forhøyer deres verdi ved farmasøytiske anvendelser.

Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse angår farmasøytisk preparat for kontroll av cellesyklusutvikling, samt anvendelse av dette for regulering av cellesyklusutvikling i en celle som mangler et funksjonelt retinoblastomtumorsuppressorprotein, samt fremgangsmåte for kontroll av cellesyklusutvikling i en celle, *in vitro*, der cellen mangler et funksjonelt retinoblastom-tumorsuppressorgen.

Det er vel anerkjent at ved utvikling av høyere organismer, slik som dyr og mennesker, er ordnet cellesyklus-utvikling en kritisk faktor. På grunn av en slik utvikling, foregår ordnet og systematisk celledifferensiering, slik at det til slutt fra en enkelt udifferensiert celle utvikles en ytterst strukturert organisme med mange forskjellige spesialiserte vev. Generelt er fysiologisk normal cellesyklu-sutvikling meget viktig for organismen, ikke kun under de tidligere vekststadier, men gjennom hele organismens levetid. Selv etter at organismen er fullt utviklet, er således normal syklusutvikling et meget viktig aspekt ved helse. Dette kan f.eks. klart ses ved betydningen av riktig celleregulering i de bloddannende organer og forplantningsorganer.

Under bestemte omstendigheter svikter normal celleut-vikling, ofte med katastrofale virkninger for organismen. En slik svikt observeres f.eks. ved de forskjellige former for kreft, hvor, på grunn av en uhindret og ukontrollert utvikling av celler gjennom cellesyklusen, fra fullføringen av mitosen gjennom interfasen og tilbake til mitosen, tumorgenese i mange tilfeller blir en livstruende hendelse. En begrensning av ukontrollert cellesyklusutvikling blir således noen ganger forsøkt i en bestrebelse på å behandle eller kontrollere den tumorgeniske tilstand.

Under foreliggende betingelser hvor tumorgenese er utviklet, anvendes drastiske behandlingsformer, slik som strå-lingsterapi og kjemoterapi. Begge disse behandlingsmåter er meget kostbare, og i noen tilfeller meget skadelige for organismen. Kjemoterapi kan f.eks. forårsake pasientens død, og når kjemoterapi er vellykket ved kontrollering av tumor-genese, kan den ha skadelige virkninger på kroppen i lang tid.

En slik skadelig virkning kan føre til for tidlige hjerteproblemer hos pasienten. Selv om konvensjonelle terapeutiske metoder, slik som stråling og kjemoterapi, således tjener et nyttig formål ved å ødelegge visse ukontrollerte celler, gir de også uønskede virkninger ved å ødelegge nyttige celler og svekke organsystemer.

I betraktning av det foregående ville det være ytterst ønskelig å ha til rådighet teknikker og preparater for regulering av uønsket celleutvikling, slik som i tumorgenese, under opprettholdelse av cellenes levedyktighet. I tillegg ville det dessuten være ytterst ønskelig hvis slike teknikker og preparater gir små eller ingen bivirkninger på cellene, og stanser utviklingen av tumorgenese uten å forårsake irreversible endringer på det cellulære nivå.

Lee et al., Nature 329:642 - 645, 1987, viser at human retinoblastomdisposisjonsgen (Rb) koder for et forsfoprotein på 928 aminosyrer med en tilsynelatende molekylvekt på 110 - 114 kDa. Rb-ekspresjon er til stede i ikke-tumorceller, men er rapportert å være udetekterbare i retinoblastomcellelinjer som er testet. Biokjemisk fraksjonering og immunofluorescens indikerer at majoriteten av RB-protein, kalt $p110^{RB}$, er lokalisert i kjernen. Andre bevis indikerer at $p110^{RB}$ er et DNA-bindende protein, hvilket foreslår muligheten av at dette protein kan være involvert i regulering av ekspresjon av andre gener.

EP 0440 744 beskriver at $p110^{RB}$ virker som suppressor på tumorgenese, slik som tilstedeværelsen av retinoplastom. Dette gen kan anvendes som en diagnostisk markør for genetisk screening av cancer, og preparater inneholdende $p110^{RB}$ anvendes ved genterapi for forebyggelse og behandling av cancere der Rb-ekspresjon er fraværende.

WO 91/09114 viser at den biologiske aktivitet til $p110^{RB}$ avhenger av dets fosforyleringsstatus, som varierer under cellesyklus. Selv om $p110^{RB}$ syntetisere gjennom cellesyklus, er den underfosforylert under G_0- og G_1-fasene, men er fosforylert i flere seter ved G_1/S-grensen og under S-fase. Fosforylering inaktiverer $p110^{RB}$ effektivt som en inhibitor av celleproliferasjon. Således har kjemikalier som har evnen til å inhibere $p110^{RB}$-fosforylering vært anvendt som

midler for å hemme vekten av celler der RB-genet uttrykkes.

En betydelig fordel ved slike nye teknikker og preparater, i tilfellet med tumorgenese, ville være muligheten for å regulere uønsket celleproliferasjon i tilstrekkelig tid til at andre kreftbehandlingsprosedyrer kunne anvendes. Anvendelse av slike teknikker kunne således redusere eller eliminere de ødeleggende virkninger av konvensjonelle strålings- og kjemoterapeutiske behandlinger, mens tumorgenesen ble stanset. Pasienten ville således bevare styrke og energi, slik at konvensjonelle teknikker som kirurgi, kunne benyttes mer trygt.

Det er et mål med foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et farmasøytisk preparat for kontroll av cellesyklusutvikling, kjennetegnet ved at det omfatter et karboksyterminalt, biologisk aktivt fragment av $p110^{RB}$ på 56 kiloDalton.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer også anvendelse av et karboksyterminalt, biologisk aktivt fragment av $p110^{RB}$ på 56 kiloDalton ved fremstilling av et farmasøytisk preparat for regulering av cellesyklusutvikling i en celle som mangler et funksjonelt retinoblastomtumorsuppressorprotein, ved introduksjon av dette inn i cellen som skal kontrolleres under interfase av cellesyklus.

Foreliggende oppfinnelse omfatter videre fremgangsmåte for kontroll av cellesyklusutvikling i en celle, *in vitro*, der cellen mangler et funksjonelt retinoblastomtumorsuppressorgen, kjennetegnet ved at den omfatter introduksjon, *in vitro*, av et C-terminalt, biologisk aktivt fragment av $p110^{RB}$ på 56 kDa til cellen som kontrolleres, under G-delen av cellesyklus.

Oppfinnelsen omfatter også farmasøytisk preparat, anvendelse og fremgangsmåte der fragmentet omfatter aminosyre fra 379 til aminosyre 928 av aminosyresekvensen angitt i figur 8.

En fordel ved foreliggende oppfinnelse er at cellesyklusutvikling kan stanses reversibelt på en passende og trygg måte uten å krenke organismen. Således kan f.eks. tumorgenese kontrolleres.

En ytterligere fordel ved foreliggende oppfinnelse er at preparatet anvendt for cellesyklusutviklingskontroll er

forholdsvis billig og lett tilgjengelig.

En ytterligere fordel ved foreliggende oppfinnelse er det faktum at preparatet anvendt heri har få eller ingen toksiske virkninger på friske celler og kan anvendes i forbindelse med andre kreftbehandlingsmetoder.

En ytterligere fordel ved foreliggende oppfinnelse er det faktum at preparatene og teknikkene er forenelige for anvendelse sammen med de regulatoriske systemer og fysiologisk forenelige med andre metoder og utstyr for regulering av visse av kroppens fysiologiske prosesser, slik som blodcelleproduksjon og kjønnscelleproduksjon.

Kort beskrivelse av figurene

De ovennevnte og andre mål og trekk ved foreliggende oppfinnelse, og måten for å oppnå disse vil fremgå, og selve foreliggende oppfinnelse, vil best forstås med referanse til den følgende beskrivelse av utførelsesformene ifølge foreliggende oppfinnelse i forbindelse med de medfølgende figurer, hvori:

fig. 1 avbilder SDS-PAGE-analyse av konsentrasjonen og renheten av proteinpreparater anvendt for mikroinjeksjon;

fig. 2A-F er mikrofotografier som avbilder mikroinjeksjon og immunfarging av merkede Saos-2-celler;

fig. 3 viser grafisk prosentmengden av merkede celler inntil 4 dager etter injeksjon;

fig. 4 viser grafisk prosentmengden av merkede celler som en funksjon av $p56^{RB}$-konsentrasjon;

fig. 5 viser grafisk virkningen hos celler når $p56^{RB}$ injiseres i S-fasen;

fig. 6A viser grafisk cellesyklusstansens avhengighet av tidsperioden for injeksjon av $p56^{RB}$;

fig. 6B viser grafisk tiden for inntreden av S-fase i Saos-2-celler etter opphevelse av stans i mitose med nocodazol;

fig. 6C viser grafisk Saos-2-celler samtidig injisert med $p56^{RB}$ og R eller G etter opphevelse av behandling med nocodazol;

fig. 7 er sammensatt av figurene 7A, 7B, 7C og 7D, og viser nukleotidsekvensen av retinoblastomagenet og aminosyre-

sekvensen for RB-proteinet;

fig. 8 viser aminosyresekvensen for RB-proteinet;

fig. 9 viser nukleotidsekvensen av retinoblastomagenet og aminosyresekvensen for RB-genproduktet, og viser i tillegg $p56^{RB}$-delen av RB-proteinet; og

fig. 10 viser grafisk forskjellige stadier av cellesyklusen og status for RB-protein-punktet i cellesyklusen.

Beste måte for utøvelse av foreliggende oppfinnelse

Det er generell viten at, etter at mitosen av en somatisk celle er fullført, ved slutten av telofasen, går cellen inn i en interfase som, avhengig av forskjellige faktorer, kan være av kort varighet eller vare i en lang tidsperiode. Etter f.eks. celledifferensiering og utvikling av nervevev, kan således nervecellene ha en meget lang interfase. Konvensjonelt kan cellulær interfase betraktes som inneholdende tre stadier: G1, hvori cellevekst foregår uten DNA-replikasjon, S-fase, hvori DNA-replikasjon foregår, og G2, hvori DNA-replikasjon er fullført og cellene gjør seg klar til deling. Som beskrevet i nærmere detalj i det etterfølgende, har visse genproteinprodukter, eller fragmenter derav, kapasitet til å kontrollere utvikling gjennom cellesyklusen ved reversibelt å stanse utviklingen ved G1. Ifølge foreliggende oppfinnelse er cellesykluskontrollerende preparater innført i celler under interfasestadiet av deres cellesykluser for å forårsake en reversibel endring av cellesyklusutviklingen under opprettholdelse av cellenes levedyktighet. Etter en viss tid, når preparatene i tilstrekkelig grad er nedbrutt i cellene, er cellesyklusen observert å gjenopprettes i cellen og utvikle seg mot de etterfølgende interfasestadier.

Med hensyn til patologiske tilstander i en organisme, slik som tumorgenese, foreligger det en manifestasjon av uønsket cellesyklusakselerasjon i noen celler. Som mer fullstendig diskutert i det etterfølgende, ble kreftsuppressorgenproteinprodukter, slik som RB-proteinet eller et fragment derav, anvendt for å stanse Saos-2 osteosarcoma-celler i G1-stadiet av interfase. Det er funnet at administrering av proteinet til cellene ikke hadde noen toksisk virkning på cellene og var reversibel.

I eksemplene beskrevet i det etterfølgende ble de følgende eksperimentprosedyrer fulgt.

Celledyrkning

Saos-2-celler, en osteosarcoma-cellelinje, ble erholdt fra American Type Culture Collection. SR-40, som stabilt uttrykker eksogent vild-type-RB-protein, ble avledet fra Saos-2-ved hjelp av enkelt-cellekloning etter infeksjon med et retrovirus som bærer RB-genet. Huang, H.-J. S., Yee, J.-K., Shew, J.-Y., Chen, P.-L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E.Y.-H.P. og Lee, W.-H. (1988) Science 242, 1563-1566. Nyrecellelinjer CV-1 og COS-7 fra afrikansk grønn ape ble også erholdt fra American Type Culture Collection. COS-7 ble avledet fra CV-1 ved transformasjon med en opprinnelses-defekt SV-40. Gluzman, Y. (1981) Cell 23, 175-182. Alle celler ble dyrket i Dulbecco's modifiserte Eagle's medium pluss 10% kalvefosterserum som anbefalt.

Synkronisering av celler

Celler ble synkronisert ved G1/s-grensen ved utelatelse av isoleucin i 36 timer, etterfulgt av inkubasjon i komplett medium supplert med enten aphidicholin eller hydroksyurea (begge fra Sigma) i ytterligere henholdsvis 12 eller 16 timer. Heintz, H.H. og Hamlin, J.L. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4083-4087. Celler ble frigjort fra G1/S-sperren ved vasking tre ganger med fosfatbufret saltløsning (PBS), og gjenopprettelse av næringstilførsel med komplett medium. Metafase-stansede celler ble innsamlet etter en 8-12 timers behandling med 0,04 µg/ml nocodazol (Sigma) som beskrevet tidligere. Zieve, G.W., Turnbull, D., Mullins, J.M. og McIntosh, J.R. (1980) Nocodazole Exp. Cell Res. 126, 397-405. For å øke utbyttet av mitotiske celler, ble cellene først stanset ved G1/S-grensen ved hjelp av en 12 timers behandling av aphidicholin. Seks timer etter fjerningen av aphidicholin ble nocodazol tilsatt til mediet. Mitotiske celler ble innsamlet ved forsiktig vask og omrøring og ble deretter utspredt på nytt på 35 mm skåler. Seks timer etter utspredning ble de ufestede celler vasket bort, og celler ble injisert ved forskjellige tidspunkter deretter.

Proteinfremstilling

p56^{RB} er den C-terminale halvpart av RB-proteinet og inneholder begge områder som er essensielle for SV40-T-antigenbinding. Dette protein produseres i *E.coli* fra et T7 RNA polymeraseekspresjonssystem. Huang, S., Lee, W.-H. og Lee, E.Y.-H.P. (1991) Nature 350, 160-162. p110^{RB} produseres i insektceller ved hjelp av den rekombinante baculovirus-teknikk. Wang, N.P., Qian, Y., Chung, A.E., Lee, W.-H. og Lee, E.Y.-H.P. (1990b) Cell Growth & Differ. L, 429-437. Begge proteiner ble renset til homogenitet ved konvensjonell kromatografi. Histon-H1 og kanin-antigeit-IgG ble innkjøpt fra henholdsvis Boehringer Mannheim og Vector Laboratories. Antistoffer 0,495, 0,47 og R2 ble konsentrert i mikroinjeksjonsbuffer til en tilnærmet konsentrasjon på 1 mg/ml. T-antigenet og p53-peptidene var en gave fra Nicholas Lin. Disse antistoffer er beskrevet i Huang, S., Wang, N.-P., Tseng, B.Y., Lee, W.-H. og Lee, E.Y.-H.P. (1990) EMBO J.9, 1815-1822. T-peptidet omfatter aminosyrer 101-118 og ble oppløst i mikroinjeksjonsbuffer ved en 1 mM eller 5mM. Ludlow, J.W., deCaprio, J.A., Huang, C.-M., Lee, W.-H., Paucha, E. og Livingston, D.M. (1989) Cell. 56, 57-65. Det mutante T-peptid inneholder en substitusjon fra lysin til asparaginsyre og ble anvendt ved 5 mM. Ludlow, J.W., deCaprio, J.A., Huang, C.-M., Lee, W.-H., Paucha, E. og Livingston, D.M. (1989) Cell. 56, 57-65. p53-peptidet ble oppløst i mikroinjeksjonsbuffer ved 5 mM. Proteinpreparatene, med unntak av det komplette RB-protein, ble konsentrert i en injeksjonsbuffer inneholdende 20 mM tris, pH 7,4; 0,1 mM EDTA; 10 mM KCl; 1 mM 2-merkaptoetanol og 2% glyserol, ved anvendelse av en Centricon 30 mikrokonsentrator (Amicon). p110^{RB} ble oppbevart i en buffer inneholdende 10% glyserol for å redusere aggregering.

Proteinpreparater ble analysert ved SDS-PAGE ved anvendelse av standard teknikker. Injeksjoner ble utført direkte i celler dyrket på 35 mm kulturskåler ved anvendelse en Eppendorf mikromanipulator og mikroinjektor med femtotip-kapillærmikropipetter. Injeksjonstrykk ble typisk satt mellom 50-100 hPa med en injeksjonstid på 0,3-0,5 sekunder. Det ble beregnet at proteinpreparatene ble fortynnet ca. 20 til 50 ganger ved injeksjon. Med et antatt typisk cellevolum på 50-100 pikoliter

og en $p56^{RB}$-konsentrasjon på 0,5-1 mg pr. ml, ble ca. 5-50 millioner molekyler injisert pr. celle.

Etter injeksjon ble dyrkningsmediet supplert med BrdU (Amersham) ifølge produsentens anbefalinger. Etter den passende merkingsperiode ble mediet fjernet og cellene ble vasket tre ganger med PBS. Cellene ble deretter fiksert ved inkubasjon med iskald, absolutt metanol i 30 minutter. Etter rehydrering ved vask med PBS ble prøver inkubert med et muse-monoklonalt antistoff mot BrdU (Amersham) i én time ved romtemperatur. Etter vask tre ganger med PBS ble et fluoresceinkonjugert anti-mus-antistoff (Amersham) tilsatt og inkubasjonen ble fortsatt i ytterligere 1 time ved romtemperatur. Antimus-antistoffet ble fjernet ved vask tre ganger med PBS, og prøvene ble inkubert med Texas Red-konjugert streptavidin (Amersham). Streptavidinet bundet til det biotinylerte RαG ble injisert sammen med alle proteinpreparater og tjente således som en cytoplasmatisk markør for injiserte celler. Etter en siste vask ble det tilsatt en oppløsning sammensatt av like volumer glyserol og PBS og prøvene ble dekket med et dekkglass. Prøver ble undersøkt under ett fluorescensmikroskop med Texas Red- og Fluorescein-filtere.

De følgende eksempler viser forsøksresultatene oppnådd etter innføring av genproduktproteiner i tumorcellelinjer. Kapasiteten av proteinene, eller fragmenter derav, til å stanse cellesyklusutvikling i G1 er demonstrert. I tillegg demonstrerer eksemplene at virkningen av blokkeringen kun forekommer når proteinet administreres under G-fasen, og at den blokkerte cellesyklusutvikling kan oppheves ved hjelp av SV40 T-antigen.

I visse spesifikke eksempler ble RB-genproduktet anvendt for å stanse cellesyklusutviklingen, hvori en Saos-2-osteosarcoma-cellelinje ble behandlet med RB-proteinet eller et fragment derav. Det ble oppdaget at cellesyklusutviklingen ble stanset i G1 og at denne utvikling er reversibel.

I de følgende eksempler, når det refereres til retinoblastomagenet, er dette tilsiktet å angi genet med nukleotidsekvensen avbildet i fig. 7 og 9. Når det refereres til RB-proteinet ($p110^{RB}$), er dette ment å angi proteinet med aminosyresekvensen avbildet i fig. 7, 8 og 9. Med referanse til

fig. 8 illustrerer dette det trunkerte proteinfragment $p56^{RB}$. I tillegg er $p56^{RB}$-fragmentet avbildet i fig. 9 med startpunkt ved pil A og sluttpunkt ved pil B. Med ytterligere referanse til fig. 9 er det C-terminale peptid illustrert, med startpunkt ved aminosyre 917 (pil C) og sluttpunkt ved aminosyre 928 (pil B).

Énbokstavsforkortelser i figurene for aminosyrerestene er: A, alanin; C, cystein; D, asparaginsyre; E, glutaminsyre; F, fenylalanin; G, glycin; H, histidin; I, isoleucin; K, lysin; L, leucin; M, metionin; N, asparagin; P, prolin; Q, glutamin; R, arginin; S, serin; T, treonin; V, valin; W, tryptofan; og Y, tyrosin.

Eksempel I

Innføring av RB-proteiner i humane osteosarcoma-Saos-2-celler ved mikroinjeksjon.

Med referanse til fig. 1 vises konsentrasjonen og renheten av proteinpreparater anvendt ved mikroinjeksjonsteknikkene beskrevet nedenfor. Proteinpreparatene anvendt for mikroinjeksjon ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE. Felt 1: $p110^{RB}$ fra insektceller infisert med rekombinant RB-baculovirus; felt 2: biotinylert kanin-anti-geit-antistoff; felt 3: anti-RB 0,495-antistoff; felt 4; anti-RB R2-antistoff; felt 5; anti-RB 0,47-antistoff; felt 6: histon-H1; felt 7: $p56^{RB}$ fra E. coli. Én mikroliter av hver prøve ble applisert på en 15% akrylamidgel. Gelen ble farget med Coomassie brilliantblått. Posisjonene for molekylvektsstandarder, i kiloDalton, er indikert.

To former av RB-protein ble fremstilt for mikroinjeksjonseksperimentene. Vild-type $p110^{RB}$, både hypofosforylerte og ufosforylerte former, ble renset til nesten homogenitet fra baculovirusinfiserte insektceller. Ved konsentrasjoner opp til 1 mg/ml aggregerte imidlertid proteinet til en form som ikke kunne injiseres. For delvis å avhjelpe dette problem ble $p110^{RB}$ renset, lagret og injisert i buffere inneholdende 10% glyserol. Et ufosforylert, aminotrunkert 56 kDa RB-protein ($p56^{RB}$), inneholdende et intakt T-antigen-bindingsdomene, ble uttrykt i E. coli og renset til nesten homogenitet. Fordi $p56^{RB}$ kunne konsentreres til 1 mg/ml og injiseres i en standardbuf-

fer inneholdende 2% glyserol, ble dette protein anvendt i de fleste av de etterfølgende eksperimenter.

Human osteosarcomacellelinje Saos-2 ble valgt som mottagende cellelinje. Denne cellelinje manglet ekspresjon av vild-type $p110^{RB}$, men inneholdt et cytoplasmatisk, karboksytrunkert 95 kDa protein som ikke kan binde T-antigen. Saos-2-celler reagerte på eksogen ekspresjon av RB, innført ved retrovirusformidlet genoverføring, ved en innledende økning av cellestørrelse og tap av tumorgenesitet i nakenmus. Det ble således fastslått at disse celler kan være spesielt sensitive overfor injeksjon av RB-protein.

Fig. 2 viser resultatene fra immunfarging av Saos-2-celler. Mikroinjeksjon av Saos-2-celler ble utført som beskrevet heri. Felt A viser Saos-2-celler injisert med $p56^{RB}$, umiddelbart fiksert og indirekte immunfarget for RB-protein ved anvendelse av et anti-RB-kanin-antistoff og et Texas Red-konjugert anti-kanin-antistoff. Felt B viser uinjiserte Saos-2-celler merket med BrdU i 4 timer, fiksert og så immunfarget med et fluoresceinkonjugert anti-BrdU-antistoff. Felt C og D viser et enkeltområde av synkroniserte Saos-2-celler, samtidig injisert i tidlig G1-fase med $p56^{RB}$ og et biotinylert kanin-anti-geit-antistoff (RαG), inkubert med BrdU i 24 timer og så fiksert. Felt C viser immunfargingen av RαG med Texas Red-konjugert streptavidin, som viser cytoplasma av injiserte celler. Felt D viser immunfarging av BrdU med et fluorescein-konjugert anti-BrdU-antistoff, som bevis for DNA-syntese. Felt E og F er et annet enkeltfelt av Saos-2-celler som ble synkronisert i tidlig G1-fase, injisert med kun RαG, merket med BrdU og så fiksert på lignende måte som feltene C og D. Felt E viser immunfarging av RαG med Texas Red-konjugert streptavidin, og felt F viser immunfarging av BrdU med et fluoresceinkonjugert anti-BrdU-antistoff.

For å bestemme hvorvidt proteinene kunne flyttes til kjernen, ble subkonfluerende, asynkront voksende Saos-2-celler cytoplasmatisk mikroinjisert med $p56^{RB}$ eller $p110^{RB}$ og fiksert 5 til 15 minutter senere. Cellene ble deretter immunfarget med kanin-anti-RB-antistoff 0,47 og et Texas Red-konjugert anti-kanin-antistoff. Farging ble hovedsakelig observert i kjernen (fig.2A), selv om det ble observert noe farging i cytoplasmaet

i noen injiserte celler. Både $p110^{RB}$- og $p56^{RB}$-proteiner var i stand til å transporteres til kjernen innen 15 minutter.

For etterfølgende eksperimenter ble celler typisk samtidig injisert med et RB-protein og et biotinylert, polyklonalt kanin-anti-geit-antistoff (RαG) som tjente som en cytoplasmatisk markør for injiserte celler. Det ble beregnet at 5-50 millioner molekyler av RB-protein ble injisert pr. celle. Antallet endogene RB-proteinmolekyler pr. celle ble beregnet til å være ca. 1 million. Det injiserte protein representerte således minst et 5 til 50 gangers overskudd i forhold til endogene nivåer. Etter injeksjon ble cellene inkubert i dyrkningsmedia inneholdende bromdeoksyuridin (BrdU). Celler som utviklet seg gjennom S-fasen under merkingsperioden vil inkorporere BrdU i sitt DNA. Etter fiksering ble cellene immunfarget for BrdU med et fluoresceinkonjugert antistoff, for RαG med Texas Red-konjugert streptavidin (fig. 2). Prosentdelen av injiserte celler som inkorporerte BrdU kunne bestemmes under et fluorescensmikroskop som fraksjonen av Texas Red-positive celler som også var fluorescein-positive.

BrdU-inkorporering i RB-injiserte, asynkront voksende celler var kun ubetydelig lavere enn for uinjiserte celler eller celler injisert med RαG alene i en fire timers merkingsperiode (Tabell 1). Disse resultater indikerte at de anvendte RB-proteinpreparater ikke var generelt toksiske for celler, som bestemt ved deres fortsatte levedyktighet, DNA-inkorporering og celleadherens.

Eksempel II

RB-proteiner injisert i tidlig G1-blokkeringsinkorporering av BrdU

Fordi det kun ble observert en liten virkning på BrdU-inkorporering ved injeksjon av RB-protein, kan cellene muligens kun være sensitive overfor RB-protein ved et spesielt punkt i cellesyklusen. Virkningen på RB-protein kunne lettere observeres ved injeksjon av synkroniserte celler ved dette punkt. Celler ble synkronisert ved behandling med nocodazol som stanser celler i mitosen, behandlingen ble deretter opphevet og cellene ble inkubert i ytterligere 6 timer, ved

hvilket tidspunkt ikke-adherente celler ble fjernet og de resterende celler ble injisert. Etter inkubasjon i 24 timer i nærvær av BrdU ble cellene fiksert og farget for BrdU og RαG. Minst 80-90% av uinjiserte celler kunne farges for BrdU. Celler injisert med $p56^{RB}$ ble imidlertid nesten fullstendig forhindret fra å utvikle seg gjennom G1- og inn i S-fasen i løpet av merkingsperioden. Det refereres i denne henseende til tabell 2 og figurer 2C og 2D. Lignende inhibering ble observert ved injeksjon med $p110^{RB}$. I motsetning til dette var 60-70% av cellene injisert med histon og RαG, eller RαG alene, i stand til å gå inn i S-fasen under merkingsperioden (fig. 2E og 2F). Selv om $p110^{RB}$ inhiberte BrdU-inkorporering under disse betingelser, var resultatene noe variable. Over tid hadde $p110^{RB}$-preparatene en tendens til å aggregere, hvilket førte til at injeksjon ble vanskeliggjort. I forhold til preparater av $p110^{RB}$, var $p56^{RB}$-aktivitet meget ensartet.

For å utvide denne observasjon til celler som allerede uttrykte vild-type $p110^{RB}$, ble $p56^{RB}$ injisert i cellelinje SR-40, som var avledet fra Saos-2 og ga stabil ekspresjon av $p110^{RB}$. Virkningen av RB-proteininjeksjon ved tidlig G1-fase på synkroniserte SR-40-celler, var identiske med virkningen på Saos-2-celler (tabell 2); meget få celler injisert med $p56^{RB}$ kom inn i S-fasen i løpet av merkingsperioden på 24 timer. Tilstedeværelsen av endogent vild-type $p110^{RB}$ forstyrret ikke virkningen av $p56^{RB}$ på cellesyklus-utvikling.

For å bestemme varigheten av $p56^{RB}$-blokkeringen av inntreden i S-fasen, ble merkingsperioden i nærvær av BrdU utvidet fra én dag til 2 eller 4 dager. Fig. 3 viser grafisk antallet injiserte Saos-2-celler som inkorporerte BrdU under merkingsperioden. Saos-2-celler ble samtidig injisert med $p56^{RB}$ og RαG 6-7 timer etter opphør av nocodazolbehandling. Etter injeksjon ble cellene inkubert i medium supplert med BrdU i de angitte antall dager før fiksering og farging. Prosentverdien indikerer antall injiserte celler som inkorporerte BrdU under merkingsperioden. Verdiene representerer minst 100 injiserte celler. Inhibering av cellesyklusutvikling ble fremdeles observert etter 2 dagers inkubasjon med BrdU før fiksering og farging. Fire dager etter injeksjon var imidlertid 80% av

$p56^{RB}$-injiserte celler i stand til å inkorporere BrdU. Disse observasjoner indikerte at blokkeringen av cellesyklus-utvikling med RB-protein var reversibel og varte mellom 2 og 4 dager.

Doseavhengigheten av $p56^{RB}$-effekten ble også målt. Fortynnede alikvoter av $p56^{RB}$ ble injisert i synkront voksende celler i tidlig G1-fase. Fig. 4 viser grafisk cellesyklus-stansens avhengighet av dosen av $p56^{RB}$. Saos-2-celler ble samtidig injisert 6-8 timer etter opphør av nocodazol-behandling med de angitte konsentrasjoner av $p56^{RB}$ og 1 mg/ml RαG. Etter 24 timers inkubasjon i vekstmedium med BrdU ble cellene fiksert og farget for BrdU og RαG. Histogrammet indikerer prosentdelen av injiserte celler som inkorporerte BrdU. Hver verdi representerer minst 150 injiserte celler. Som vist i fig. 4 reduserte en 5 gangers fortynning av $p56^{RB}$ fra den opprinnelige konsentrasjon den inhibitoriske aktivitet, mens alikvoter fortynnet opptil to ganger fremdeles bibeholdt den inhibitoriske effekt. Blokkeringen av inntreden i S-fasen av $p56^{RB}$ var derfor avhengig av mengden av injisert protein. Tersklene for blokkering av BrdU-inkorporering var mellom 0,2 og 0,5 mg/ml injisert $p56^{RB}$.

For å demonstrere at inhiberingen av inntreden i S-fasen ble forårsaket av RB-proteinet, ble det forsøkt å hindre blokkeringen med reagenser som bandt seg spesifikt til $p56^{RB}$. $p56^{RB}$ ble blandet med oppløsninger av 1 mg/ml kanin-polyklonale antistoffer 0,495, 0,47, eller R2 (fig. 1). Disse antistoffer ble frembragt mot éntydige RB-fusjonsproteiner og gjenkjente $p56^{RB}$ på Western-blots (31, 49, 56). Injeksjon av blandingen av $p56^{RB}$ og 0,495 førte til BrdU-inkorporering i ca. 30% av injiserte celler, sammenlignet med en nesten total mangel på inkorporering i celler injisert med $p56^{RB}$ alene (tabell 2). Celler som ble samtidig injisert med $p56^{RB}$ og antistoff 0,47, inkorporerte BrdU i en størrelsesorden på ca. 16%. Samtidig injeksjon av $p56^{RB}$ og antistoff R2 oppviste også en redusert inhibitorisk aktivitet, selv om virkningen ikke var så dramatisk som med antistoffer 0,47 eller 0,495. Fordi antistoffer som binder RB-protein reduserte den inhibitoriske virkning av $p56^{RB}$, skyldtes blokkeringen av BrdU-inkorporering spesifikt RB-proteinet.

Eksempel III

BrdU-inkorporering inhiberes ikke av $p56^{RB}$ dersom dette injiseres i S-fasen

Mangelen på BrdU-inkorporering observert etter injeksjon av RB-protein i tidlig G1-fase, kunne forklares ved inhibering av DNA-syntese. For å teste dette ble Saos-2-celler stanset i tidlig S-fase ved behandling med aphidicholin, etterfulgt av injeksjon med $p56^{RB}$. Som vist grafisk i fig. 5, inhiberes ikke BrdU-inkorporering av $p56^{RB}$ dersom dette injiseres i S-fasen. Saos-2-celler ble stanset ved G1/S ved behandling med hydroksyurea eller aphidicholin og ble deretter injisert.

Etter injeksjon ble den inhiberende virkning på cellene opphevet og de ble inkubert med BrdU i 6-8 timer (hydroksyurea) eller 4-6 timer (aphidicholin), ved hvilket tidspunkt cellene ble fiksert og farget. Cellene ble også stanset i mitosen ved behandling med nocodazol. Etter opphevelse av virkningen ble cellene innsamlet og injisert ca. 6 timer senere. Etter injeksjon ble cellene inkubert med BrdU i 24 timer og deretter fiksert og farget.

De anvendte proteinpreparater for injeksjon er indikert. Prosentandelen av injiserte celler som viste farge for BrdU etter den respektive merkingsperiode, er vist. Etter injeksjon ble aphidicholinbehandlingen av cellene stanset, og cellene ble inkubert med BrdU i 4-6 timer, fiksert og immunfarget for BrdU og RαG som beskrevet. I motsetning til celler injisert i tidlig G1, ga ca. 60% av $p56^{RB}$-injiserte, aphidicholin-inhiberte celler, positiv farging for BrdU-inkorporering. Prosentandelen av celler som kom inn i S-fasen, og intensiteten av BrdU-farging, var lignende som for celler injisert med histon og RαG, eller RαG alene. Som en kontroll av en eventuell forsinkelsesperiode for funksjonen av RB-proteinet etter injeksjon, ble aphidicholin-stansede celler injisert med $p56^{RB}$ inkubert i ytterligere 6 timer før opphevelse av aphidicholinbehandlingen og merking med BrdU. Til tross for en noe lavere BrdU-fargingsintensitet, hvilket antageligvis skyldtes den forlengede inkubasjon med selve aphidicholin, var prosentdelen av $p56^{RB}$-injiserte celler som

inkorporerte BrdU sammenlignbar med celler injisert med RαG alene.

Lignende eksperimenter ble utført ved å stanse celler med hydroksyurea i stedet for aphidicholin. Hydroksyurea stanser celler nær G1/S-grensen ved et punkt forskjellig fra det tilsvarende for aphidicholin. Saos-2-celler ble stanset ved G1/S ved behandling med hydroksyurea, og cellene ble deretter injisert med $p56^{RB}$. Etter injeksjon ble behandling av cellene med hydroksyurea stanset, og cellene ble merket i 6-8 timer med BrdU. Injeksjon av $p56^{RB}$ hadde heller ikke her noen påviselig inhibitorisk virkning på BrdU-inkorporering (fig. 5). Prosentdelen av celler som syntetiserer DNA, var den samme enten det ble injisert med $p56^{RB}$ og RαG, histon og RαG, eller RαG alene.

Resultatene var overensstemmende med observasjoner av asynkront voksende celler injisert med RB-protein, og tydet på at DNA-syntese per se ikke ble blokkert i vesentlig grad av $p56^{RB}$. Inhibering av DNA-syntese kunne derfor ikke forklare den fullstendige mangel på BrdU-inkorporering observert ved injeksjon av $p56^{RB}$ i synkroniserte celler i tidlig G1-fase.

Eksempel IV

RB-protein blokkerer utvikling gjennom G1-fasen ved et spesifikt punkt

Gitt resultatene av de ovenfor angitte eksperimenter, må årsaken til den inhibitoriske virkning av $p56^{RB}$ være en blokkering i utviklingen gjennom G1-fasen. For å definere posisjonen av denne stans i G1-fasen, ble det først utført en nøyaktig kalibrering av tiden for inntreden av S-fasen i cellesyklus for Saos-2-celler. Fig. 6A, 6B og 6C viser grafisk cellesyklusstansens avhengighet av tidsperioden for injeksjon av $p56^{RB}$. Med hensyn til fig. 6A, ble Saos-2-celler stanset i mitosen ved behandling med nocodazol. Etter opphevelse av behandlingen ble celle inkubert i det angitte antall timer i nærvær av BrdU og deretter fiksert og farget med et anti-BrdU-antistoff. Histogrammet indikerer prosentdelen av tellede celler som viste positiv farge for BrdU. Hver verdi representerer minst 200 celler.

Som vist i fig. 6A begynte uinjiserte celler å vise

farge for BrdU ca. 20 timer etter opphevelse av behandlingen. Etter 30 timer hadde praktisk talt 80-90% av cellene inkorporert BrdU. Basert på dette ble det deretter utført et tidseksperiment, hvori nocodazolbehandlede celler ble injisert med $p56^{RB}$ ved forskjellige tidspunkter etter opphør av behandlingen. Fig. 6B viser tiden for inntreden av S-fase i Saos-2-celler, i timer, etter avslutning av den mitose-inhiberende nocodazolbehandling. Varigheten av G1-fasen er ca. 22-24 timer. Varigheten av S-fasen er ca. 7-8 timer. Varigheten av G2-fasen er ikke nøyaktig bestemt. Pilene indikerer de angitte tidspunkter for injeksjon i eksperimentet beskrevet i 6C.

Med hensyn til fig. 6C, ble Saos-2-celler injisert sammen med 1 mg/ml $p56^{RB}$ og RαG ved de indikerte tidspunkter, i timer, etter avslutning av nocodazolbehandlingen. Inkubasjonen ble fortsatt etter injeksjon av BrdU i vekstmediet inntil 30 timer etter den opprinnelige avslutning av nocodazol-behandlingen. Etter merking med BrdU ble cellene fiksert og farget for BrdU og RαG. Histogrammet viser prosentdelen av $p56^{RB}$-injiserte celler som inkorporerte BrdU. Hver verdi representerer minst 200 injiserte celler.

Meget få celler kom inn i S-fasen 30 timer etter avslutning av behandlingen dersom de ble injisert med $p56^{RB}$ 5-10 timer etter avslutning av nocodazolbehandlingen (fig. 6C). Et betydelig antall celler inkorporerte BrdU dersom de ble injisert med $p56^{RB}$ 14-16 timer etter avslutning av behandling med nocodazol. Dersom de ble injisert 17-19 timer etter avslutning av behandlingen, hadde $p56^{RB}$ ingen påviselig inhibitorisk virkning på inntreden i S-fasen.

Gitt at S-fasen inntrådte mellom 22 og 24 timer etter avslutning av behandlingen med nocodazol, antyder resultatene at cellene ble motstandsdyktige mot den inhibitoriske virkning av injisert RB-protein ca. 6-10 timer før G1/S-overgangen. Dette bekreftet oppfatningen av at den inhibitoriske virkning av RB-protein på cellesyklus skyldtes en blokkering i utviklingen gjennom G1-fasen, i stedet for en blokkering av selve DNA-syntesen. Observasjonene impliserte dessuten at RB kan virke på et spesifikt, forholdsvis tidlig tidspunkt i G1-fasen.

Eksempel V

SV40-T-antigen opphever den $p56^{RB}$-blokkerte cellesyklusutvikling

Som en test på hypotesen om at SV40-T-antigenet kan funksjonelt inaktivere RB-proteinet ved binding, ble det utført en sammenligning mellom virkningen av $p56^{RB}$-injeksjon på G1-utviklingen i nærvær eller fravær av T-antigen. En 1 mM T-peptidoppløsning som var i stand til å binde seg til $p56^{RB}$, ble blandet med et like stort volum av $p56^{RB}$ og injisert i synkroniserte celler i tidlig G1-fase. Ved denne konsentrasjon forelå peptidet i 100 til 200 gangers molart overskudd i forhold til RB-proteinet. Ca. 28% av de synkroniserte celler injisert med $p56^{RB}$/T-peptidblandingen inntrådte i S-fasen under merkingsperioden (tabell 3). Dersom T-peptidkonsentrasjonen ble økt til 5 mM, eller et 500 til 1000 gangers molart overskudd, kunne tilnærmet 70% av injiserte celler inkorporere BrdU. I motsetning til dette inntrådte nesten ingen av cellene i S-fasen etter injeksjon med $p56^{RB}$ og et 100 til 1000 gangers molart overskudd av et karboksyterminalt p53-peptid som ikke bandt $p56^{RB}$.

Virkningene av injeksjon av $p56^{RB}$ på nyrecellelinjer CV-1 og COS-7 fra afrikansk grønn ape ble også sammenlignet. COS-7-celler ble valgt fordi de var avledet fra CV-1-celler ved transformasjon ved en opprinnelsesdefekt SV-40-mutant, og de uttrykte et høyt nivå av T-antigen. De kan derfor tjene som et godt system for testing av den eventuelle virkning av tilstedeværelsen av endogent T-antigen på aktiviteten av det injiserte RB-protein. Prosentdelen av synkroniserte CV-1-celler, injisert med $p56^{RB}$ i tidlig G1-fase, som inkorporerte BrdU, var minst 5 ganger lavere enn celler injisert med RαG alene (tabell 3). Synkroniserte COS-7-celler ble imidlertid ikke inhibert i det hele tatt fra å inntre i S-fasen. Disse resultater viste at tilstedeværelsen av endogent T-antigen, eller samtidig injeksjon med T-antigenpeptid, kunne nøytralisere den inhibitoriske aktivitet av RB-protein. Fagfolk kan således anvende dette system til screening av RB-proteinfragmenter for å identifisere de fragmenter som er i stand til å blokkere cellesyklusutvikling, ved å sammenligne

den prosentvise fordeling av CV-1- og COS-7-celler som inntrer i S-fasen i nærvær av RB-proteinfragmentet.

De foregående resultater tilveiebringer funksjonelt bevis som indikerer at RB-proteinet kan virke ved å inhibere utvikling gjennom cellesyklusen. Injeksjon av $p56^{RB}$ inhiberer ikke påviselig DNA-syntesen per se, men blokkerer heller utviklingen gjennom G1-fasen, fordi celler stanset med aphidicholin eller hydroksyurea ikke påvirkes. Denne inhibering av syklusutvikling er doseavhengig, skyldes ikke generell toksisitet overfor cellene, og er spesifikk for RB-proteinet fordi antistoffer som bindes spesifikt til $p56^{RB}$, kan svekke dets aktivitet. En celle i syklisk fase er sensitiv overfor RB-proteininhibering inntil ca. 6-10 timer før inntreden av DNA-replikasjon; etter denne tid vil eksogent tilsatt $p56^{RB}$ ikke lenger inhibere utvikling inn i S-fasen. Antas det at det foreligger en liten forsinkelsesperiode mellom injeksjon av $p56^{RB}$ og dets tilsynekomst i aktiv form i kjernen, kan det konkluderes med at RB-protein inhiberer utvikling til S-fasen ved et kritisk punkt i G1-fasen. Pausen i 6-10 timer før DNA-syntese kan være analog med tidsperioden etter G1-restriksjonspunktet, et punkt med irreversibel overgang til S-fasen i pattedyrcellelinjer 47.

Den definerte pause behøver ikke nøyaktig korrespondere med tidspunkt når RB-proteinet virker under normale fysiologiske betingelser. Den tid det tar for at injisert $p110^{RB}$ eller $p56^{RB}$ fremtrer i en aktiv konfigurasjon og/eller beliggenhet, er ikke klarlagt. RB-proteiner blir imidlertid transportert til kjernen innen 15 minutter etter cytoplasmatisk injeksjon, og fortsatt inkubasjon av $p56^{RB}$-injiserte celler med aphidicholin i flere timer før avslutning av behandlingen og merking, reduserer ikke prosentandelen av celler som inkorporerer BrdU. Disse observasjoner antyder at den tid det tar for at RB-proteinet skal bli funksjonelt etter injeksjon, kan være kort.

Overgangen fra en aktiv form av $p110^{RB}$ til en inaktiv form, er antatt å foregå ved G1/S-grensen, fordi proteinet undergår omfattende fosforylering ved dette punkt. På grunn av det ovenfor angitte er det imidlertid definert en tidligere tidsperiode som synes å være kritisk for $p56^{RB}$-aktivitet. RB

kan således være involvert i en regulatorisk avgjørelse som cellen gjør ved et punkt ca. 6-10 timer før G1/S-overgangen. RB-proteinet kan fosforyleres på mange forskjellige seter, både in vivo og in vitro, men allikevel fremgår det ikke klart hvilke fosforyleringsseter som er viktige for RB-funksjonen. Meget små økninger i fosforylering av $p110^{RB}$ under G1-fasen kan være ansvarlig for cellens overgang fra en RB-reaktiv til en ikke-reaktiv tilstand. Noe fosforylering av $p110^{RB}$ er observert i G1-fasen, selv om dette kan være årsaken av ufullstendig synkroniserte celler.

Den karboksyterminale del av RB på 56 kiloDalton er tilstrekkelig til å inhibere utvikling gjennom G1-fasen. Dette indikerer at den karboksyterminale halvpart av $p110^{RB}$ faktisk er et funksjonelt domene i betraktning av dens virkning på cellesyklusen. To biokjemiske aktiviteter er tillagt den karboksyterminale halvpart av $p110^{RB}$, DNA-binding og proteinbinding. Basert på dagens viten er sekvens-spesifisiteten av RB-binding til DNA lav; selv om RB binder seg med litt høyere affinitet til DNA med høyt G/C-innhold, er ingen spesiell sekvens utpreget foretrukket. På den annen side er det observert spesifisitet ved binding av RB til proteiner. Transformasjonsproteinene fra flere DNA-transformerende viruser, så vel som en delmengde av cellulære proteiner, binder seg til det samme domene av $p110^{RB}$ og kan derfor konkurrere med hverandre med hensyn til RB-proteinbinding. Dette område er hvor hoveddelen av naturlig forekommende inaktiveringsmutasjoner av RB er lokalisert. Det synes således sannsynlig at RB-proteinets blokkering av utvikling av G1-fasen er avhengig av spesifikke protein-protein-interaksjoner.

Blanding av $p56^{RB}$ med et T-antigen-avledet peptid som kan binde $p56^{RB}$, eliminerer dets inhibitoriske konsekvenser. Samtidig injeksjon av $p56^{RB}$ med et T-peptid inneholdende en enkel aminosyresubstitusjon i et 500 til 1000 gangers molart overskudd kan også i noen grad svekke blokkeringen av celle-syklusutviklingen. Selv om aminosyresubstitusjonen svekker peptidets affinitet for RB-protein in vitro, kan allikevel dette mutante T-peptid binde $p56^{RB}$ in vivo når det er til stede i et overveldende molart overskudd. I motsetning til dette ga injeksjon av et totalt irrelevant $p56^{RB}$-peptid ingen virkning

på den inhibitoriske aktivitet av RB-proteinet, hvilket således dokumenterte spesifisiteten av den observerte interaksjon mellom RB-protein og T-antigen-peptid. CV-1-celler injisert i tidlig G1 med $p56^{RB}$ stanses før S-fasen, mens derimot COS-7-celler som uttrykker høye nivåer av T-antigen, ikke stanses. Disse observasjoner sett under ett indikerer at T-antigen-binding ikke har funksjonelle konsekvenser for RB-protein. Fordi det injiserte $p56^{RB}$ er ufosforylert, er testresultatene overensstemmende med hypotesen at den aktive form av RB-proteinet, med hensyn til dets inhibering av celleproliferasjon, foreligger i den ufosforylerte form. Transformasjonsproteinene til noen DNA-tumorviruser, inkludert SV40-T-antigen og adenovirus E1A, kan således fremme celle-vekst, i det minste delvis, ved binding og inaktivering av underfosforylert $p110^{RB}$. Udødeliggjøringen av celler og den induserte progresjon fra hvilefasen ved ekspresjon av disse transformasjonsproteiner, er fenotyper overensstemmende med deregulering av cellesyklusen.

Gitt at den karboksyterminale halvpart av $p110^{RB}$ er biologisk aktiv, gjenstår spørsmålet med hensyn til funksjonen av den aminoterminale halvpart av proteinet. Sekvenser innen dette område kan være påkrevet for den riktige fosforylering av $p110^{RB}$. I museceller blir polypeptider lignende $p56^{RB}$ ikke hyperfosforylert. Flere konsensus-seter for cdc2/MPF-kinasen er også til stede innen dette område. Det følger at den aminoterminale halvpart av $p110^{RB}$ kan inneholde et regulatorisk domene som kan modulere RB-funksjonen. Opphør av $p56^{RB}$-blokkering av G1-utvikling foregår ikke før 3-4 dager etter injeksjon; denne lengre oppholdsperiode kan skyldes cellens manglende evne til å regulere RB-protein på en normal måte, eller den forholdsvis store mengde injisert RB-protein. En sammenligning mellom aktiviteten i denne undersøkelse av forskjellige RB-proteiner og mutasjoner i fosforyleringsseter, ville medvirke til å løse dette spørsmål. Dersom $p56^{RB}$ er regelmessig aktivt, ville mutasjoner som danner slike polypeptider forventes å inhibere celleproliferasjon, og således plassere celler i en selektivt ugunstig stilling. Dette kan forklare mangelen på naturlig forekommende mutanter i den aminoterminale halvpart av RB.

Resultatene beskrevet heri indikerer at RB deltar i kontroll av cellesyklusutvikling ved å virke ved et kontroll-punkt i G1-fasen. Dette punkt er betydelig tidligere enn den observerte hyperfosforylering av $p110^{RB}$ når celler inntrer i S-fasen. Det er således rimelig å foreslå en modell som både inkorporerer testresultatene og andre kjente egenskaper for $p110^{RB}$ (fig. 10). Fordi RB er vist å være forbundet med flere cellulære proteiner, og proteinbindingsdomenene hos RB er tilstrekkelige til å blokkere cellesyklusutvikling, er det meget mulig at bindingen av cellulære proteiner er kritisk for den observerte RB-funksjon. Modellen antyder at RB deltar i reguleringen av cellesyklus ved å utskille cellulære proteiner som er vitale for DNA-syntese og/eller syklusutvikling ved en spesiell tidsperiode under G1-fasen. Inaktivering av $p110^{RB}$ ved mutasjon, ved fosforylering ved nøkkelseter, eller ved binding med transformasjonsproteiner, antas å frigi disse cellulære proteiner og tillate dem å tilveiebringe funksjoner som er nødvendige for fortsettelse av cellesyklusen. Når først cellene fortsetter cellesyklusen ved å frigi disse proteiner, kan $p110^{RB}$ ikke lenger effektivt inhibere deres funksjon, og derfor oppheves blokkeringen av cellesyklusutviklingen.

Subnukleær lokalisering av RB kan være avgjørende for dets evne til å utskille andre proteiner i en inaktiv form. RB-protein utskilles sammen med cellulære replikasjonsproteiner på seter for herpesvirus-DNA-replikasjon ved infeksjon, en situasjon hvor normal regulering av cellesyklusen er ødelagt. I G1 er den underfosforylerte form av $p110^{RB}$ tett forbundet med en spesiell kjernelokalitet. Renset $p110^{RB}$ har også en tendens til å polymerisere, hvilket kanskje forklarer vanskeligheten ved å opprettholde dets oppløselighet ved høye konsentrasjoner, og det har begrenset homologi med en bestemt klasse av intermediære filament-proteiner. Disse observasjoner antyder at $p110^{RB}$ kan bidra til noe av kjernens strukturelle komponenter, og at assosiasjon av $p110^{RB}$ med denne komponent er nødvendig for dens inhibering av cellesyklusutvikling. Hyperfosforyleringen ville antageligvis frigjøre $p110^{RB}$ fra dets subnukleære lokalisering og tillate RB å tilveiebringe en annen funksjon, eller tilbakebringe dets evne til å utskille andre proteiner under den etterfølgende

cellesyklus. Modellen forutsier at regulering av RB-aktivitet kan oppnås ved å spesifisere dets nukleære lokalisering og/eller de cellulære proteiner det binder seg til.

Den biologiske konsekvens av fullstendig tap av RB-funksjon er dannelse av retinoblastoma og muligens noen andre tumorer. Implisering av RB i cellesyklusen tilveiebringer en måte for å forklare dette fenomen. RB kan virke til å stanse utviklingen gjennom G1-fasen inntil cellen mottar riktige signaler for å fortsette cellesyklusen. Tap av RB-funksjon kan således bidra til tumorgenese i forskjellige vev ved å tillate ukontrollert celleproliferasjon.

I betraktning av det ovenstående fremgår det at RB-genproduktet er et nukleært fosfoprotein som undergår endringer i fosforyleringsstatus synkront med cellesyklus. For å teste hvorvidt RB regulerer cellesyklusutvikling, ble rensede RB-proteiner, enten komplette eller en trunkert form inneholdende T-antigenbindingsområde, injisert i celler, og virkningen på inntreden i S-fase ble bestemt. Synkroniserte celler injisert i G1 på et tidlig stadium med ethvert av proteinene forhindres fra utvikling inn i S-fasen. Denne effekt motvirkes ved samtidig injeksjon med antistoffer mot RB. Injeksjon av RB-protein i celler som er stanset ved B1/S-grensen, eller 6-10 timer før slutten av G1, har ingen virkning på BrdU-inkorporering, noe som antyder at RB-protein tydeligvis ikke forstyrrer DNA-syntese i S-fasen. Disse resultater tilveiebringer direkte bevis for at RB kan regulere celleproliferasjon ved å begrense cellesyklusutvikling ved et spesielt punkt i G1, og resultatene tilveiebringer også en biologisk analysebestemmelse for aktiviteten av RB-protein. Samtidig injeksjon av RB-protein og et T-antigenpeptid, eller injeksjon i celler som uttrykker T-antigen, forhindrer ikke cellene fra å utvikle seg inn i S-fasen. Dette eksperiment underbygger hypotesen om at T-antigen-binding har funksjonelle konsekvenser for RB-protein.

Tabell 1

Mikroinjeksjon av asynkront voksende celler

Protein-prøve	Totalt antall injiserte celler[a]	Totalt antall BrdU-fargede celler[b]	% injiserte celler som inntrer i S-fasen
$p110^{RB}$	1094	416	38
$p56^{RB}$	1315	408	31
RαG	1725	707	41
Histon	106	42	40
Uinjisert			41

[a] Det totale antall injiserte celler (Texas Red-positive) tellet fra minst fem uavhengige eksperimenter, med unntak av histoninjeksjon som representerer et eksperiment.

[b] Antall injiserte celler som inkorporerte BrdU, vist ved ensartet farging med et fluorescein-bundet anti-BrdU-antistoff. Cellene ble inkubert i vekstmedium med BrdU i 4 timer før farging.

Tabell 2

Mikroinjeksjon av synkront voksende celler i tidlig G1

Celle-linje	Protein	Antall injiserte celler[a]	Antall BrdU-fargede celler[b]	% injiserte celler som inntrer i S-fasen
Saos-2				
	$p110^{RB}$	256	8	3
	RαG[c]	270	173	64
	$p56^{RB}$	388	12	3
	RαG	295	202	68
	Histon	595	333	56
	Uinjisert			
	$p56^{RBd}$	247	10	4
	$p56^{RBd}$ + 0,495	80	24	30
	$p56^{RB}$ + 0,47	596	95	16
	$p56^{RB}$d + R2	712	43	6
SR-40				
	$p56^{RB}$	89	3	3
	Histon	201	105	52
	RαG	134	74	55

[a] Det totale antall injiserte celler (Texas Red-positive) tellet fra minst tre uavhengige eksperimenter.

[b] Antall injiserte celler som inkorporerte BrdU, vist ved ensartet farging med et fluorescein-bundet anti-BrdU-antistoff. Celler ble inkubert i vekstmedium med BrdU i 24 timer etter injeksjon og før farging.

[c] Injeksjoner ble utført i en buffer inneholdende 10% glyserol.

[d] $p56^{RB}$ ble injisert i en konsentrasjon på ca. 0,3-0,5 mg/ml, i stedet for 1 mg/ml, i disse eksperimenter.

Tabell 3

SV40-T-antigen opphever blokkeringen av utvikling til G1 med $p56^{RB}$

Celle-linje	Protein[a]	Antall injiserte celler[b]	Antall BrdU-fargede celler[c]	% injiserte celler som inntrer i S-fasen
Saos-2				
	$p56^{RB}$	247	10	4
	$p56^{RB}$ + T	724	203	28
	$p56^{RB}$ + p53	727	7	1
CV-1				
	$p56^{RB}$	459	46	10
	Histon	471	259	55
	RαG	332	176	53
COS-7				
	$p56^{RB}$	257	224	87
	Histon	191	159	83

[a] Alle proteiner ble injisert i konsentrasjoner på ca. 1 mg/ml, med unntak av $p56^{RB}$ i Saos-2-celler som ble injisert ved ca. 0,3-0,5 mg/ml.

[b] Cellelinjer mikroinjiseres 6-8 timer etter opphør av nocodazolbehandling. Det totale antall injiserte celler (Texas

Red-positive) er angitt.

[c] Celler ble inkubert i vekstmedium med BrdU i 24 timer etter injeksjon og før farging.

Patentkrav

1. Farmasøytisk preparat for kontroll av cellesyklusutvikling, karakterisert ved at det omfatter et karboksyterminalt, biologisk aktivt fragment av $p110^{RB}$ på 56 kiloDalton.

2. Farmasøytisk preparat ifølge krav 1, karakterisert ved at fragmentet omfatter aminosyre fra 379 til aminosyre 928 av aminosyresekvensen angitt i figur 8.

3. Anvendelse av et karboksyterminalt, biologisk aktivt fragment av $p110^{RB}$ på 56 kiloDalton ved fremstilling av et farmasøytisk preparat for regulering av cellesyklusutvikling i en celle som mangler et funksjonelt retinoblastomtumor-suppressorprotein, ved introduksjon av dette inn i cellen som skal kontrolleres under interfase av cellesyklus.

4. Anvendelse ifølge krav 3,hvori fragmentet omfatter aminosyre 379 til aminosyre 928 av aminosyresekvensen angitt i figur 8.

5. Anvendelse ifølge krav 3, hvori det farmasøytiske preparat introduseres inn i cellen under G1-delen av cellesyklus.

6. Anvendelse ifølge krav 3, hvori det farmasøytiske preparat introduseres inn i cellen mellom ca. 6 og ca. 10 timer før G1/S-overgangen.

7. Fremgangsmåte for kontroll av cellesyklusutvikling i en celle, *in vitro*, der cellen mangler et funksjonelt retinoblastomtumorsuppressorgen, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter introduksjon, *in vitro*, av et C-terminalt, biologisk aktivt fragment av $p110^{RB}$ på 56 kDa til cellen som kontrolleres, under G-delen av cellesyklus.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at det C-terminale fragment omfatter aminosyrene fra 379 til 928 som vist i figur 8.

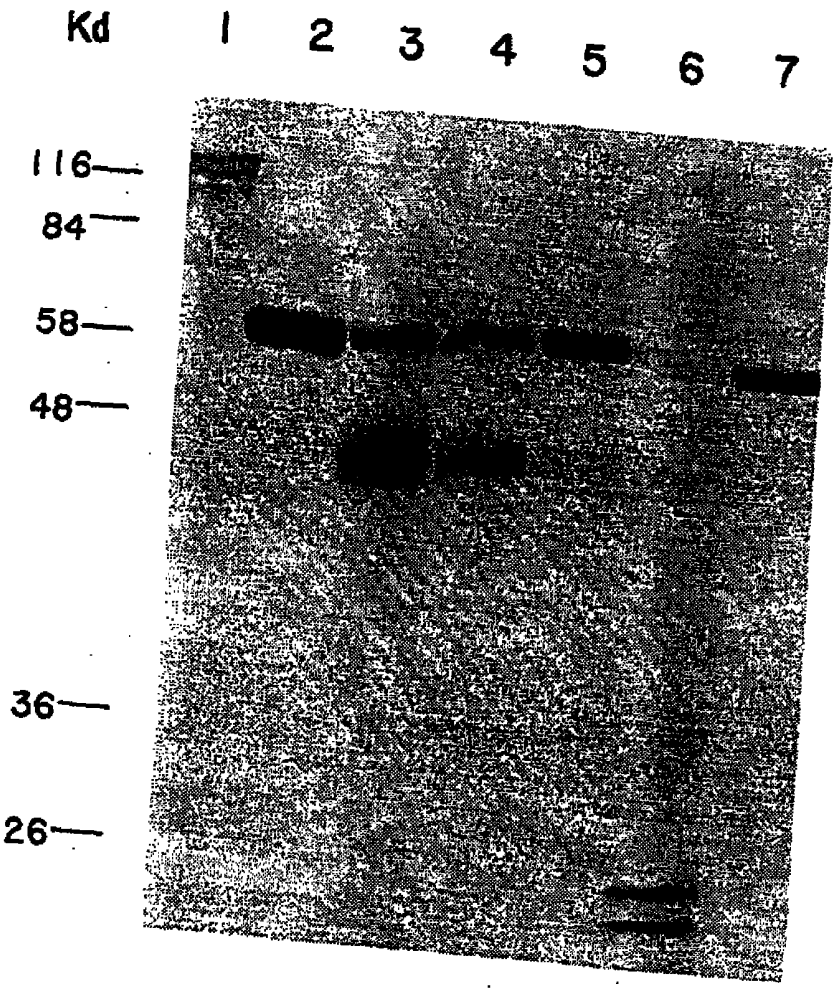


FIG. 1



FIG. 2A



FIG. 2B

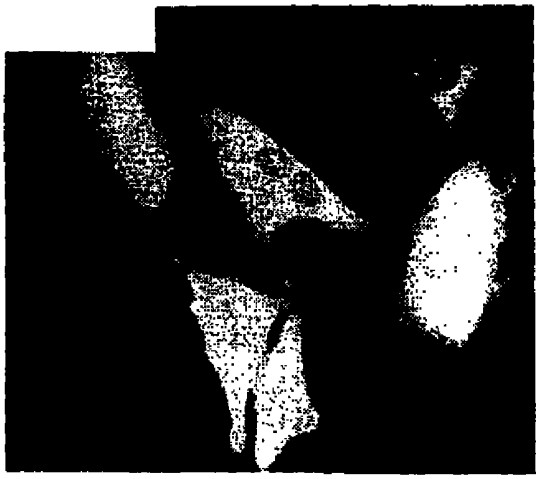


FIG. 2C

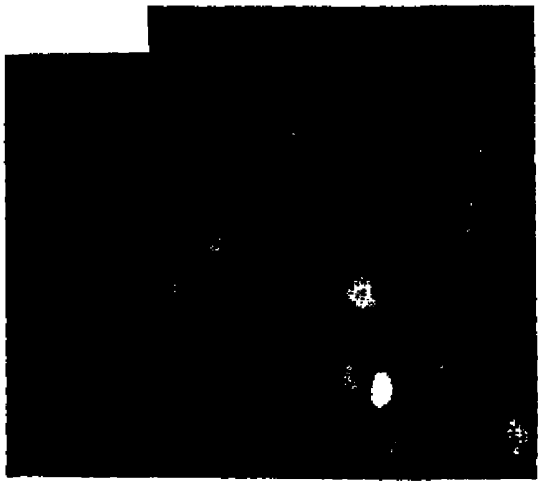


FIG. 2D



FIG. 2E



FIG. 2F

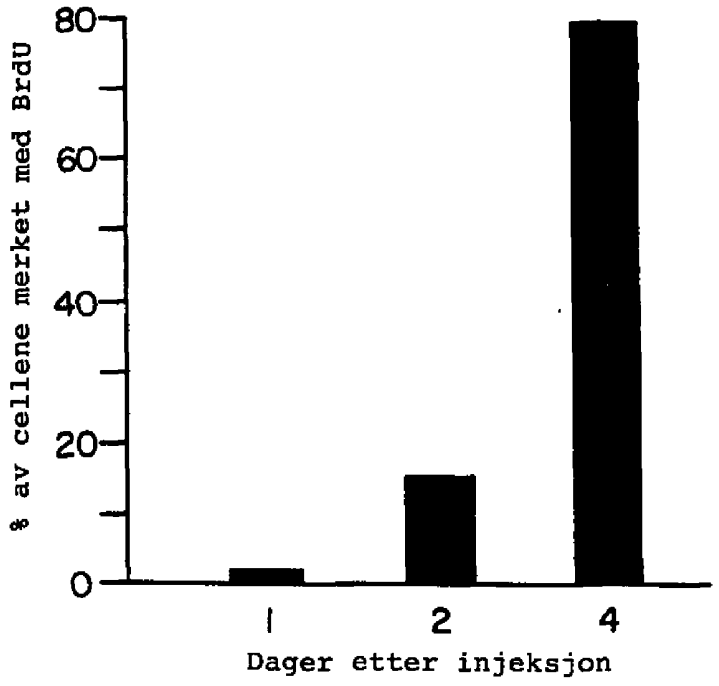

80
60
40
20
0
% av cellene merket med BrdU
1
2
4
Dager etter injeksjon

FIG. 3

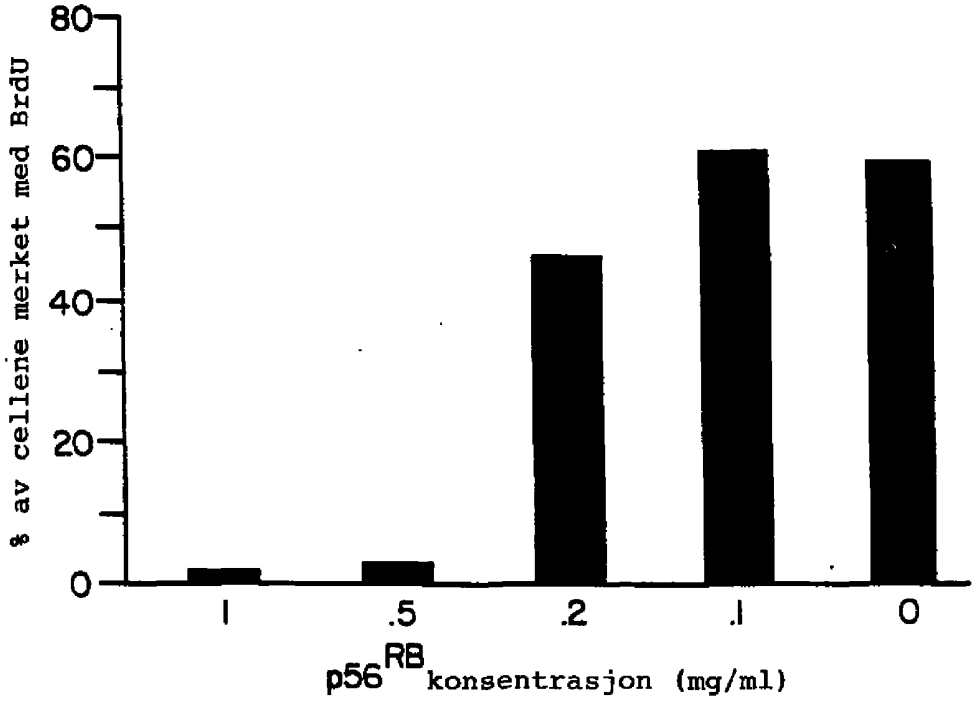

80
60
40
20
0
% av cellene merket med BrdU
1
.5
.2
.1
0
p56RB konsentrasjon (mg/ml)

FIG. 4

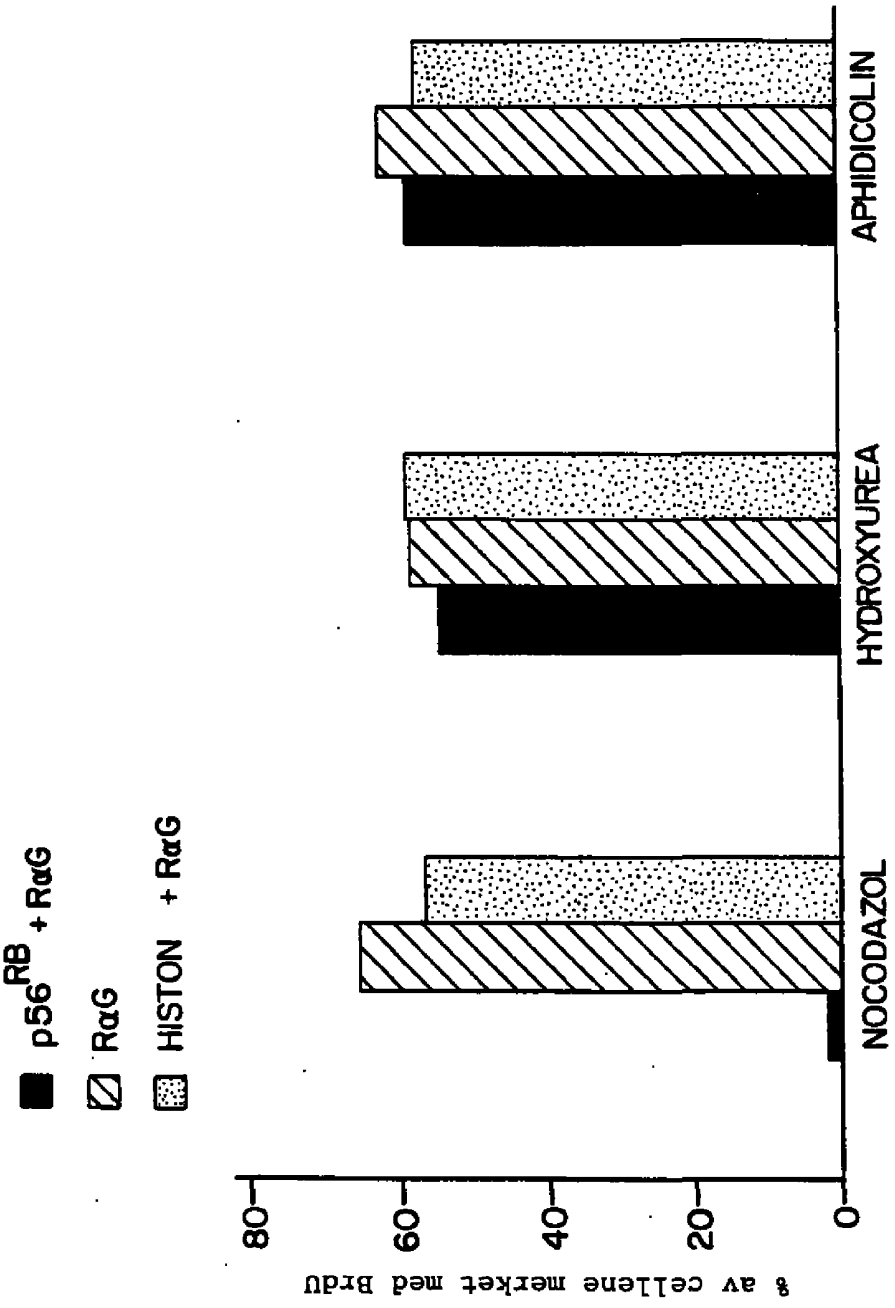

% av cellene merket med BrdU
0
20
40
60
80
NOCODAZOL
HYDROXYUREA
APHIDICOLIN
p56RB + RαG
RαG
HISTON + RαG

FIG. 5

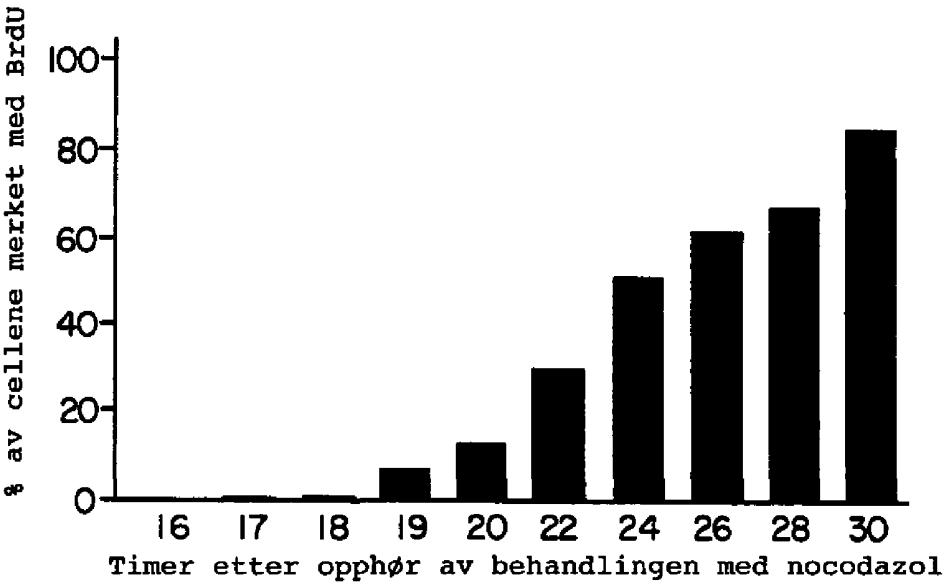


FIG. 6A

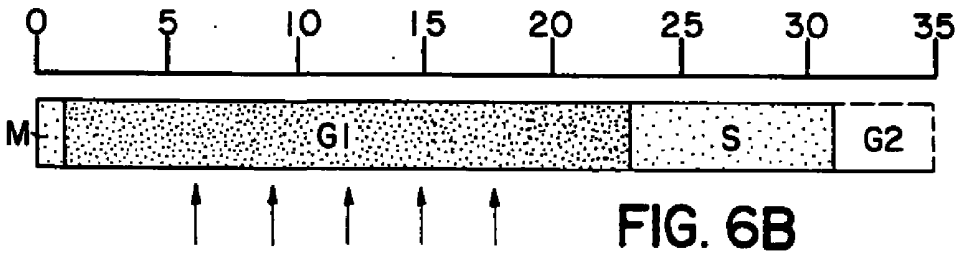


FIG. 6B

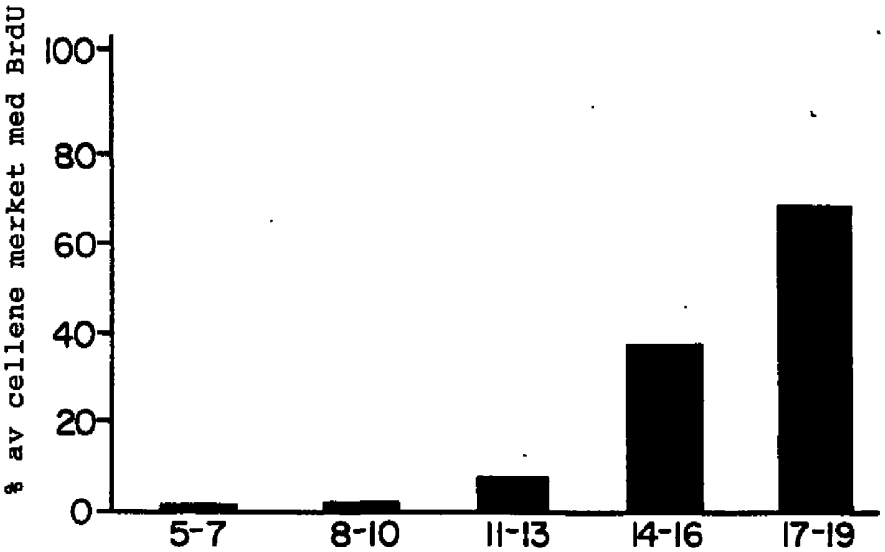


FIG. 6C

```
TTCCGGTTTTTCTCAGGGGACGTTGAAATTATTTTTGTAACGGGAGTCGGGAGAGGACGG

CCGCCGCGGAAAGGCGTCATGCCGCCCAAAACCCCCCGAAAAACGGCCGCCACCGCCGCC
                    M  P  P  K  T  P  R  K  T  A  A  T  A  A

CAGGACAGCGGCCCGGAGGACCTGCCTCTCGTCAGGCTTGAGTTTGAAGAAACAGAAGAA
 Q  D  S  G  P  E  D  L  P  L  V  R  L  E  F  E  E  T  E  E

TGGTTAACTTGGGAGAAAGTTTCATCTGTGGATGGAGTATTGGGAGGTTATATTCAAAAG
 W  L  T  W  E  K  V  S  S  V  D  G  V  L  G  G  Y  I  Q  K

TTCACTTTTACTGAGCTACAGAAAAACATAGAAATCAGTGTCCATAAATTCTTTAACTTA
 F  T  F  T  E  L  Q  K  N  I  E  I  S  V  H  K  F  F  N  L

TATGATGTATTGTTTGCACTCTTCAGCAAATTGGAAAGGACATGGGAACTTATATATTTG
 Y  D  V  L  F  A  L  F  S  K  L  E  R  T  C  E  L  I  Y  L

TGGATCACATTTTTATTAGCTAAAGGGGAAGTATTACAAATGGAAGATGATCTGGTGATT
 W  I  T  F  L  L  A  K  G  E  V  L  Q  M  E  D  D  L  V  I
```

FIG. 7A-1

```
CTCAAAGAACCATATAAAACAGCTGTTATACCCATTAATGGTTCACCTCGAACACCCAGG
 L  K  E  P  Y  K  T  A  V  I  P  I  N  G  S  P  R  T  P  R

GAAGTTCTCTGTAAAGAACATGAATGTAATATAGATGAGGTGAAAAATGTTTATTTCAAA
 E  V  L  C  K  E  H  E  C  N  I  D  E  V  K  N  V  Y  F  K

GAAAATCTTTCTAAACGATACGAAGAAATTTATCTTAAAAATAAAGATCTAGATGCAAGA
 E  N  L  S  K  R  Y  E  E  I  Y  L  K  N  K  D  L  D  A  R

AGAACACCACGAAAAAGTAACCTTGATGAAGAGGTGAATGTAATTCCTCCACACACTCCA
 R  T  P  R  K  S  N  L  D  E  E  V  N  V  I  P  P  H  T  P

CAACCTTCAGAAAATCTGATTTCCTATTTTAACAACTGCACAGTGAATCCAAAAGAAAGT
 Q  P  S  E  N  L  I  S  Y  F  N  N  C  T  V  N  P  K  E  S

GGACAGGGTTGTGTCGAAATTGGATCACAGCGATACAAACTTGGAGTTCGCTTGTATTAC
 G  Q  G  C  V  E  I  G  S  Q  R  Y  K  L  G  V  R  L  Y  Y
```

FIG. 7A-2

```
GGCGTGCCCCGCGTGCGCGCGCGTCGTCCTCCCCGGCGCTCCTCCACAGCTCGCTGGCTC  120

GCTGCCGCCGCGGAACCCCCGGCACCGCCGCCGCCGCCCCCTCCGTAGGAGGACCCAGAG  240
 A  A  A  A  E  P  P  A  P  P  P  P  P  P  P  E  E  D  P  E  (34)

CCTGATTTTACTGCATTATGTCAGAAATTAAAGATACCAGATCATGTCAGAGAGAGAGCT  360
 P  D  F  T  A  L  C  Q  K  L  K  I  P  D  H  V  R  E  R  A  (74)

AAAAAGGAACTGTGGGGAATCTGTATCTTTATTGCAGCAGTTGACCTAGATGAGATGTCG  480
 K  K  E  L  W  G  I  C  I  F  I  A  A  V  D  L  D  E  M  S  (114)

CTAAAAGAAATTGATACCAGTACCAAAGTTGATAATGCTATGTCAAGACTGTTGAAGAAG  600
 L  K  E  I  D  T  S  T  K  V  D  N  A  M  S  R  L  L  K  K  (154)

ACACAACCCAGCAGTTCGATATCTACTGAAATAAATTCTGCATTGGTGCTAAAAGTTTCT  720
 T  Q  P  S  S  S  I  S  T  E  I  N  S  A  L  V  L  K  V  S  (194)

TCATTTCAGTTAATGCTATGTGTCCTTGACTATTTTATTAAACTCTCACCTCCCATGTTG  840
 S  F  Q  L  M  L  C  V  L  D  Y  F  I  K  L  S  P  P  M  L  (234)
```

FIG. 7B-1

```
CGAGGTCAGAACAGGAGTGCACGGATAGCAAAACAACTAGAAAATGATACAAGAATTATT  960
 R  G  Q  N  R  S  A  R  I  A  K  Q  L  E  N  D  T  R  I  I  (274)

AATTTTATACCTTTTATGAATTCTCTTGGACTTGTAACATCTAATGGACTTCCAGAGGTT 1080
 N  F  I  P  F  M  N  S  L  G  L  V  T  S  N  G  L  P  E  V  (314)

TTATTTTTGGATCATGATAAAACTCTTCAGACTGATTCTATAGACAGTTTTGAAACACAG 1200
 L  F  L  D  H  D  K  T  L  Q  T  D  S  I  D  S  F  E  T  Q  (354)

GTTAGGACTGTTATGAACACTATCCAACAATTAATGATGATTTTAAATTCAGCAAGTGAT 1320
 V  R  T  V  M  N  T  I  Q  Q  L  M  M  I  L  N  S  A  S  D  (394)

ATACTGAAAAGAGTGAAGGATATAGGATACATCTTTAAAGAGAAATTTGCTAAAGCTGTG 1440
 I  L  K  R  V  K  D  I  G  Y  I  F  K  E  K  F  A  K  A  V  (434)

CGAGTAATGGAATCCATGCTTAAATCAGAAGAAGAACGATTATCCATTCAAAATTTTAGC 1360
 R  V  M  E  S  M  L  K  S  E  E  E  R  L  S  I  Q  N  F  S  (474)
```

FIG. 7B-2

```
AAACTTCTGAATGACAACATTTTTCATATGTCTTTATTGGCGTGCGCTCTTGAGGTTGTA
 K  L  L  N  D  N  I  F  H  M  S  L  L  A  C  A  L  E  V  V

CCATGGATTCTGAATGTGCTTAATTTAAAAGCCTTTGATTTTTACAAAGTGATCGAAAGT
 P  W  I  L  N  V  L  N  L  K  A  F  D  F  Y  K  V  I  E  S

CATCGAATCATGGAATCCCTTGCATGGCTCTCAGATTCACCTTTATTTGATCTTATTAAA
 H  R  I  M  E  S  L  A  W  L  S  D  S  P  L  F  D  L  I  K

CCTCTCCAGAATAATCACACTGCAGCAGATATGTATCTTTCTCCTGTAAGATCTCCAAAG
 P  L  Q  N  M  H  T  A  A  D  M  Y  L  S  P  V  R  S  P  K

GCCTTCCAGACCCAGAAGCCATTGAAATCTACCTCTCTTTCACTGTTTTATAAAAAAGTG
 A  F  Q  T  Q  K  P  L  K  S  T  S  L  S  L  F  Y  K  K  V

GAATTAGAACATATCATCTGGACCCTTTTCCAGCACACCCTGCAGAATGAGTATGAACTC
 E  L  E  H  I  I  W  T  L  F  Q  H  T  L  Q  N  E  Y  E  L
```

FIG. 7C-1

```
AAGAATATAGACCTTAAATTCAAAATCATTGTAACAGCATACAAGGATCTTCCTCATGCT
 K  N  I  D  L  K  F  K  I  I  V  T  A  Y  K  D  L  P  H  A

TTCTATAACTCGGTCTTCATGCAGAGACTGAAAACAAATATTTTGCAGTATGCTTCCACC
 F  Y  N  S  V  F  M  Q  R  L  K  T  N  I  L  Q  Y  A  S  T

TCACCCTTACGGATTCCTGGAGGGAACATCTATATTTCACCCCTGAAGAGTCCATATAAA
 S  P  L  R  I  P  G  G  N  I  Y  I  S  P  L  K  S  P  Y  K

ATTGGTGAATCATTCGGGACTTCTGAGAAGTTCCAGAAAATAAATCAGATGGTATGTAAC
 I  G  E  S  F  G  T  S  E  K  F  Q  K  I  N  Q  M  V  C  N

CTACGCTTTGATATTGAAGGATCAGATGAAGCAGATGGAAGTAAACATCTCCCAGGAGAG
 L  R  F  D  I  E  G  S  D  E  A  D  G  S  K  H  L  P  G  E

AAAATGAATGATAGCATGGATACCTCAAACAAGGAAGAGAAATGAGGATCTCAGGACCTT
 K  M  N  D  S  M  D  T  S  N  K  E  E  K
```

FIG. 7C-2

```
ATGGCCACATATAGCAGAAGTACATCTCAGAATCTTGATTCTGGAACAGATTTGTCTTTC 1680
 M  A  T  Y  S  R  S  T  S  Q  N  L  D  S  G  T  D  L  S  F  (514)

TTTATCAAAGCAGAAGGCAACTTGACAAGAGAAATGATAAAACATTTAGAACGATGTGAA 1800
 F  I  K  A  E  G  N  L  T  R  E  M  I  K  H  L  E  R  C  E  (554)

CAATCAAAGGACCGAGAAGGACCAACTGATCACCTTGAATCTGCTTGTCCTCTTAATCTT 1920
 Q  S  K  D  R  E  G  P  T  D  H  L  E  S  A  C  P  L  N  L  (594)

AAAAAAGGTTCAACTACGCGTGTAAATTCTACTGCAAATGCAGAGACACAAGCAACCTCA 2040
 K  K  G  S  T  T  R  V  N  S  T  A  N  A  E  T  Q  A  T  S  (634)

TATCGGCTAGCCTATCTCCGGCTAAATACACTTTGTGAACGCCTTCTGTCTGAGCACCCA 2160
 Y  R  L  A  Y  L  R  L  N  T  L  C  E  R  L  L  S  E  H  P  (674)

ATGAGAGACAGGCATTTGGACCAAATTATGATGTGTTCCATGTATGGCATATGCAAAGTG 2280
 M  R  D  R  H  L  D  Q  I  M  M  C  S  M  Y  G  I  C  K  V  (714)
```

FIG. 7D-1

```
GTTCAGGAGACATTCAAACGTGTTTTGATCAAAGAAGAGGAGTATGATTCTATTATAGTA 2400
 V  Q  E  T  F  K  R  V  L  I  K  E  E  E  Y  D  S  I  I  V  (754)

AGGCCCCCTACCTTGTCACCAATACCTCACATTCCTCGAAGCCCTTACAAGTTTCCTAGT 2520
 R  P  P  T  L  S  P  I  P  H  I  P  R  S  P  Y  K  F  P  S  (794)

ATTTCAGAAGGTCTGCCAACACCAACAAAAATGACTCCAAGATCAAGAATCTTAGTATCA 2640
 I  S  E  G  L  P  T  P  T  K  M  T  P  R  S  R  I  L  V  S  (834)

AGCGACCGTGTGCTCAAAAGAAGTGCTGAAGGAAGCAACCCTCCTAAACCACTGAAAAAA 2760
 S  D  R  V  L  K  R  S  A  E  G  S  N  P  P  K  P  L  K  K  (874)

TCCAAATTTCAGCAGAAACTGGCAGAAATGACTTCTACTCGAACACGAATGCAAAAGCAG 2880
 S  K  F  Q  Q  K  L  A  E  M  T  S  T  R  T  R  M  Q  K  Q  (914)

GGTGGACACTGTGTACACCTCTGGATTCATTGTCTCTCACAGATGTGACTGTAT... to 4757
                                                              (928)
```

FIG. 7D-2

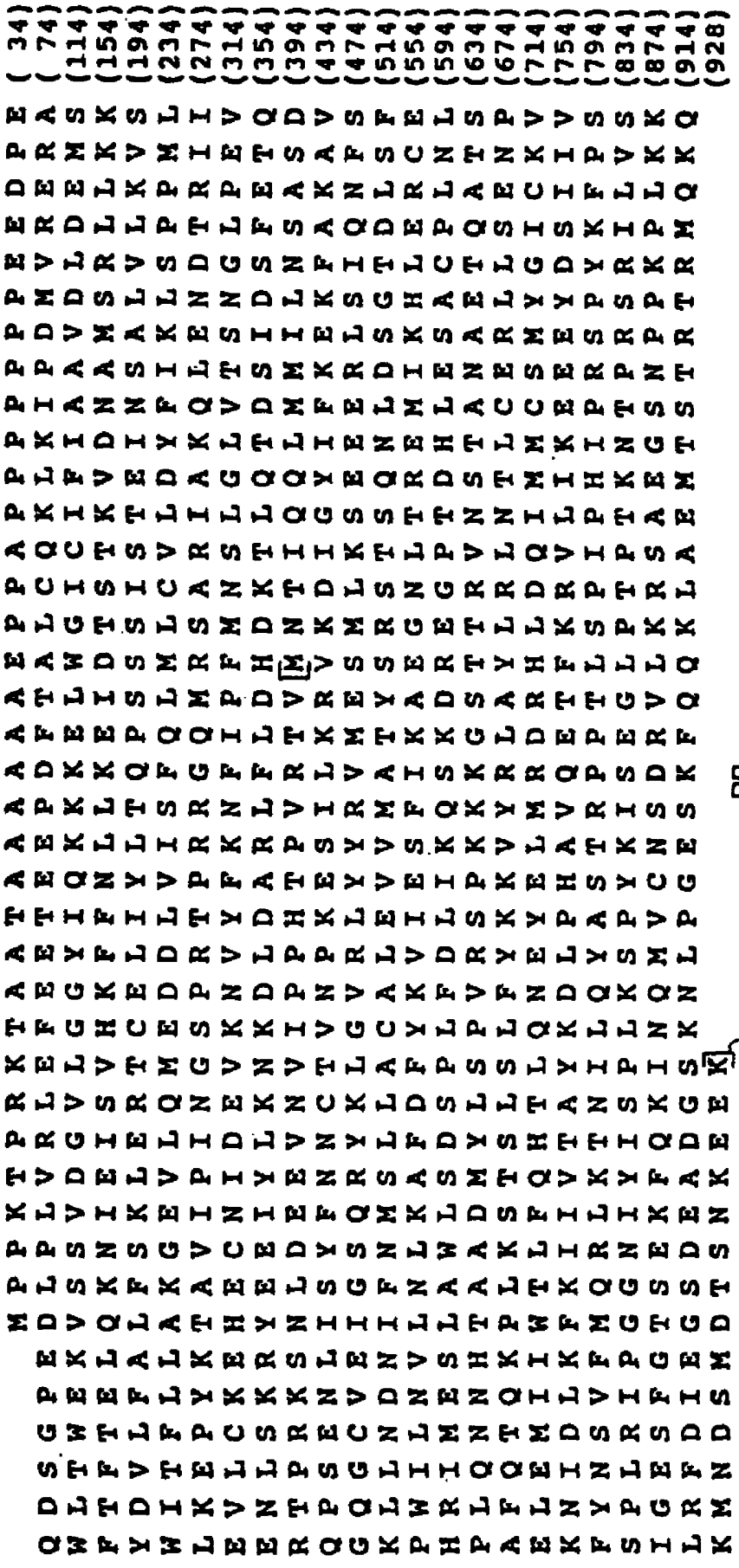

(34)
(74)
(114)
(154)
(194)
(234)
(274)
(314)
(354)
(394)
(434)
(474)
(514)
(554)
(594)
(634)
(674)
(714)
(754)
(794)
(834)
(874)
(914)
(928)
FRAGMENT (p56RB)

FIG. 8

```
TTCCGGTTTT TCTCAGGGGA CGTTGAAATT ATTTTTGTAA CGGGAGTCGG GAGAGGACGG      60

GGCGTGCCCC GCGTGCGCGC GCGTCGTCCT CCCCGGCGCT CCTCCACAGC TCGCTGGCTC     120

CCGCCGCGGA AAGGCGTC ATG CCG CCC AAA ACC CCC CGA AAA ACG GCC GCC        171
                    Met Pro Pro Lys Thr Pro Arg Lys Thr Ala Ala
                      1               5                  10

ACC GCC GCC GCT GCC GCC GCG GAA CCC CCG GCA CCG CCG CCG CCG CCC        219
Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Glu Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro
            15                  20                  25

CCT CCG TAG GAG GAC CCA GAG CAG GAC AGC GGC CCG GAG GAC CTG CCT        267
Pro Pro Glu Glu Asp Pro Glu Gln Asp Ser Gly Pro Glu Asp Leu Pro
        30                  35                  40

CTC GTC AGG CTT GAG TTT GAA GAA ACA GAA GAA CCT GAT TTT ACT GCA        315
Leu Val Arg Leu Glu Phe Glu Glu Thr Glu Glu Pro Asp Phe Thr Ala
    45                  50                  55

TTA TGT CAG AAA TTA AAG ATA CCA GAT CAT GTC AGA GAG AGA GCT TGG        363
Leu Cys Gln Lys Leu Lys Ile Pro Asp His Val Arg Glu Arg Ala Trp
60                  65                  70                  75
```

FIG. 9-I

```
TTA ACT TGG GAG AAA GTT TCA TCT GTG GAT GGA GTA TTG GGA GGT TAT      411
Leu Thr Trp Glu Lys Val Ser Ser Val Asp Gly Val Leu Gly Gly Tyr
                   80                  85                  90

ATT CAA AAG AAA AAG GAA CTG TGG GGA ATC TGT ATC TTT ATT GCA GCA      459
Ile Gln Lys Lys Lys Glu Leu Trp Gly Ile Cys Ile Phe Ile Ala Ala
               95                  100                 105

GTT GAC CTA GAT GAG ATG TCG TTC ACT TTT ACT GAG CTA CAG AAA AAC      507
Val Asp Leu Asp Glu Met Ser Phe Thr Phe Thr Glu Leu Gln Lys Asn
           110                 115                 120

ATA GAA ATC AGT GTC CAT AAA TTC TTT AAC TTA CTA AAA GAA ATT GAT      555
Ile Glu Ile Ser Val His Lys Phe Phe Asn Leu Leu Lys Glu Ile Asp
       125                 130                 135

ACC AGT ACC AAA GTT GAT AAT GCT ATG TCA AGA CTG TTG AAG AAG TAT      603
Thr Ser Thr Lys Val Asp Asn Ala Met Ser Arg Leu Leu Lys Lys Tyr
140                    145                 150                 155

GAT GTA TTG TTT GCA CTC TTC AGC AAA TTG GAA AGG ACA TGT GAA CTT      651
Asp Val Leu Phe Ala Leu Phe Ser Lys Leu Glu Arg Thr Cys Glu Leu
                   160                 165                 170
```

FIG. 9-2

```
ATA TAT TTG ACA CAA CCC AGC AGT TCG ATA TCT ACT GAA ATA AAT TCT        699
Ile Tyr Leu Thr Gln Pro Ser Ser Ser Ile Ser Thr Glu Ile Asn Ser
            175                 180                 185

GCA TTG GTG CTA AAA GTT TCT TGG ATC ACA TTT TTA TTA GCT AAA GGG        747
Ala Leu Val Leu Lys Val Ser Trp Ile Thr Phe Leu Leu Ala Lys Gly
        190                 195                 200

GAA GTA TTA CAA ATG GAA GAT GAT CTG GTG ATT TCA TTT CAG TTA ATG        795
Glu Val Leu Gln Met Glu Asp Asp Leu Val Ile Ser Phe Gln Leu Met
    205                 210                 215

CTA TGT GTC CTT GAC TAT TTT ATT AAA CTC TCA CCT CCC ATG TTG CTC        843
Leu Cys Val Leu Asp Tyr Phe Ile Lys Leu Ser Pro Pro Met Leu Leu
220                 225                 230                 235

AAA GAA CCA TAT AAA ACA GCT GTT ATA CCC ATT AAT GGT TCA CCT CGA        891
Lys Glu Pro Tyr Lys Thr Ala Val Ile Pro Ile Asn Gly Ser Pro Arg
                240                 245                 250

ACA CCC AGG CGA GGT CAG AAC AGG AGT GCA CGG ATA GCA AAA CAA CTA        939
Thr Pro Arg Arg Gly Gln Asn Arg Ser Ala Arg Ile Ala Lys Gln Leu
            255                 260                 265
```

FIG. 9-3

```
GAA AAT GAT ACA AGA ATT ATT GAA GTT CTC TGT AAA GAA CAT GAA TGT        987
Glu Asn Asp Thr Arg Ile Ile Glu Val Leu Cys Lys Glu His Glu Cys
        270                 275                 280

AAT ATA GAT GAG GTG AAA AAT GTT TAT TTC AAA AAT TTT ATA CCT TTT       1035
Asn Ile Asp Glu Val Lys Asn Val Tyr Phe Lys Asn Phe Ile Pro Phe
    285                 290                 295

ATG AAT TCT CTT GGA CTT GTA ACA TCT AAT GGA CTT CCA GAG GTT GAA       1083
Met Asn Ser Leu Gly Leu Val Thr Ser Asn Gly Leu Pro Glu Val Glu
300                 305                 310                 315

AAT CTT TCT AAA CGA TAC GAA GAA ATT TAT CTT AAA AAT AAA GAT CTA       1131
Asn Leu Ser Lys Arg Tyr Glu Glu Ile Tyr Leu Lys Asn Lys Asp Leu
                320                 325                 330

GAT GCA AGA TTA TTT TTG GAT CAT GAT AAA ACT CTT CAG ACT GAT TCT       1179
Asp Ala Arg Leu Phe Leu Asp His Asp Lys Thr Leu Gln Thr Asp Ser
            335                 340                 345

ATA GAC AGT TTT GAA ACA CAG AGA ACA CCA CGA AAA AGT AAC CTT GAT       1227
Ile Asp Ser Phe Glu Thr Gln Arg Thr Pro Arg Lys Ser Asn Leu Asp
        350                 355                 360
```

FIG. 9-4

```
GAA GAG GTG AAT GTA ATT CCT CCA CAC ACT CCA GTT AGG ACT GTT ATG      1275
Glu Glu Val Asn Val Ile Pro Pro His Thr Pro Val Arg Thr Val Met
    365                 370                 375

AAC ACT ATC CAA CAA TTA ATG ATG ATT TTA AAT TCA GCA AGT GAT CAA      1323
Asn Thr Ile Gln Gln Leu Met Met Ile Leu Asn Ser Ala Ser Asp Gln
380                 385                 390                 395

CCT TCA GAA AAT CTG ATT TCC TAT TTT AAC AAC TGC ACA GTG AAT CCA      1371
Pro Ser Glu Asn Leu Ile Ser Tyr Phe Asn Asn Cys Thr Val Asn Pro
                400                 405                 410

AAA GAA AGT ATA CTG AAA AGA GTG AAG GAT ATA GGA TAC ATC TTT AAA      1419
Lys Glu Ser Ile Leu Lys Arg Val Lys Asp Ile Gly Tyr Ile Phe Lys
            415                 420                 425

GAG AAA TTT GCT AAA GCT GTG GGA CAG GGT TGT GTC GAA ATT GGA TCA      1467
Glu Lys Phe Ala Lys Ala Val Gly Gln Gly Cys Val Glu Ile Gly Ser
        430                 435                 440
```

FIG. 9-5

```
CAG CGA TAC AAA CTT GGA GTT CGC TTG TAT TAC CGA GTA ATG GAA TCC      1515
Gln Arg Tyr Lys Leu Gly Val Arg Leu Tyr Tyr Arg Val Met Glu Ser
    445                 450                 455

ATG CTT AAA TCA GAA GAA GAA CGA TTA TCC ATT CAA AAT TTT AGC AAA      1563
Met Leu Lys Ser Glu Glu Glu Arg Leu Ser Ile Gln Asn Phe Ser Lys
460                 465                 470                 475

CTT CTG AAT GAC AAC ATT TTT CAT ATG TCT TTA TTG GCG TGC GCT CTT      1611
Leu Leu Asn Asp Asn Ile Phe His Met Ser Leu Leu Ala Cys Ala Leu
                480                 485                 490

GAG GTT GTA ATG GCC ACA TAT AGC AGA AGT ACA TCT CAG AAT CTT GAT      1659
Glu Val Val Met Ala Thr Tyr Ser Arg Ser Thr Ser Gln Asn Leu Asp
            495                 500                 505

TCT GGA ACA GAT TTG TCT TTC CCA TGG ATT CTG AAT GTG CTT AAT TTA      1707
Ser Gly Thr Asp Leu Ser Phe Pro Trp Ile Leu Asn Val Leu Asn Leu
        510                 515                 520
```

FIG. 9-6

```
AAA GCC TTT GAT TTT TAC AAA GTG ATC GAA AGT TTT ATC AAA GCA GAA      1755
Lys Ala Phe Asp Phe Tyr Lys Val Ile Glu Ser Phe Ile Lys Ala Glu
    525                 530                 535

GGC AAC TTG ACA AGA GAA ATG ATA AAA CAT TTA GAA CGA TGT GAA CAT      1803
Gly Asn Leu Thr Arg Glu Met Ile Lys His Leu Glu Arg Cys Glu His
540                 545                 550                 555

CGA ATC ATG GAA TCC CTT GCA TGG CTC TCA GAT TCA CCT TTA TTT GAT      1851
Arg Ile Met Glu Ser Leu Ala Trp Leu Ser Asp Ser Pro Leu Phe Asp
                560                 565                 570

CTT ATT AAA CAA TCA AAG GAC CGA GAA GGA CCA ACT GAT CAC CTT GAA      1899
Leu Ile Lys Gln Ser Lys Asp Arg Glu Gly Pro Thr Asp His Leu Glu
            575                 580                 585

TCT GCT TGT CCT CTT AAT CTT CCT CTC CAG AAT AAT CAC ACT GCA GCA      1947
Ser Ala Cys Pro Leu Asn Leu Pro Leu Gln Asn Asn His Thr Ala Ala
        590                 595                 600

GAT ATG TAT CTT TCT CCT GTA AGA TCT CCA AAG AAA AAA GGT TCA ACT      1995
Asp Met Tyr Leu Ser Pro Val Arg Ser Pro Lys Lys Lys Gly Ser Thr
    605                 610                 615
```

FIG. 9-7

```
ACG CGT GTA AAT TCT ACT GCA AAT GCA GAG ACA CAA GCA ACC TCA GCC      2043
Thr Arg Val Asn Ser Thr Ala Asn Ala Glu Thr Gln Ala Thr Ser Ala
620                 625                 630                 635

TTC CAG ACC CAG AAG CCA TTG AAA TCT ACC TCT CTT TCA CTG TTT TAT      2091
Phe Gln Thr Gln Lys Pro Leu Lys Ser Thr Ser Leu Ser Leu Phe Tyr
                640                 645                 650

AAA AAA GTG TAT CGG CTA GCC TAT CTC CGG CTA AAT ACA CTT TGT GAA      2139
Lys Lys Val Tyr Arg Leu Ala Tyr Leu Arg Leu Asn Thr Leu Cys Glu
            655                 660                 665

CGC CTT CTG TCT GAG CAC CCA GAA TTA GAA CAT ATC ATC TGG ACC CTT      2187
Arg Leu Leu Ser Glu His Pro Glu Leu Glu His Ile Ile Trp Thr Leu
        670                 675                 680

TTC CAG CAC ACC CTG CAG AAT GAG TAT GAA CTC ATG AGA GAC AGG CAT      2235
Phe Gln His Thr Leu Gln Asn Glu Tyr Glu Leu Met Arg Asp Arg His
    685                 690                 695
```

FIG. 9-8

```
TTG GAC CAA ATT ATG ATG TGT TCC ATG TAT GGC ATA TGC AAA GTG AAG      2283
Leu Asp Gln Ile Met Met Cys Ser Met Tyr Gly Ile Cys Lys Val Lys
700                 705                 710                 715

AAT ATA GAC CTT AAA TTC AAA ATC ATT GTA ACA GCA TAC AAG GAT CTT      2331
Asn Ile Asp Leu Lys Phe Lys Ile Ile Val Thr Ala Tyr Lys Asp Leu
                720                 725                 730

CCT CAT GCT GTT CAG GAG ACA TTC AAA CGT GTT TTG ATC AAA GAA GAG      2379
Pro His Ala Val Gln Glu Thr Phe Lys Arg Val Leu Ile Lys Glu Glu
            735                 740                 745

GAG TAT GAT TCT ATT ATA GTA TTC TAT AAC TCG GTC TTC ATG CAG AGA      2427
Glu Tyr Asp Ser Ile Ile Val Phe Tyr Asn Ser Val Phe Met Gln Arg
        750                 755                 760

CTG AAA ACA AAT ATT TTG CAG TAT GCT TCC ACC AGG CCC CCT ACC TTG      2475
Leu Lys Thr Asn Ile Leu Gln Tyr Ala Ser Thr Arg Pro Pro Thr Leu
    765                 770                 775
```

FIG. 9-9

```
TCA CCA ATA CCT CAC ATT CCT CGA AGC CCT TAC AAG TTT CCT AGT TCA      2523
Ser Pro Ile Pro His Ile Pro Arg Ser Pro Tyr Lys Phe Pro Ser Ser
780                 785                 790                 795

CCC TTA CGG ATT CCT GGA GGG AAC ATC TAT ATT TCA CCC CTG AAG AGT      2571
Pro Leu Arg Ile Pro Gly Gly Asn Ile Tyr Ile Ser Pro Leu Lys Ser
                800                 805                 810

CCA TAT AAA ATT TCA GAA GGT CTG CCA ACA CCA ACA AAA ATG ACT CCA      2619
Pro Tyr Lys Ile Ser Glu Gly Leu Pro Thr Pro Thr Lys Met Thr Pro
            815                 820                 825

AGA TCA AGA ATC TTA GTA TCA ATT GGT GAA TCA TTC GGG ACT TCT GAG      2667
Arg Ser Arg Ile Leu Val Ser Ile Gly Glu Ser Phe Gly Thr Ser Glu
        830                 835                 840

AAG TTC CAG AAA ATA AAT CAG ATG GTA TGT AAC AGC GAC CGT GTG CTC      2715
Lys Phe Gln Lys Ile Asn Gln Met Val Cys Asn Ser Asp Arg Val Leu
    845                 850                 855

AAA AGA AGT GCT GAA GGA AGC AAC CCT CCT AAA CCA CTG AAA AAA CTA      2763
Lys Arg Ser Ala Glu Gly Ser Asn Pro Pro Lys Pro Leu Lys Lys Leu
860                 865                 870                 875
```

FIG. 9-10

```
CGC TTT GAT ATT GAA GGA TCA GAT GAA GCA GAT GGA AGT AAA CAT CTC      2811
Arg Phe Asp Ile Glu Gly Ser Asp Glu Ala Asp Gly Ser Lys His Leu
                880                 885                 890

CCA GGA GAG TCC AAA TTT CAG CAG AAA CTG GCA GAA ATG ACT TCT ACT      2859
Pro Gly Glu Ser Lys Phe Gln Gln Lys Leu Ala Glu Met Thr Ser Thr
            895                 900                 905

CGA ACA CGA ATG CAA AAG CAG AAA ATG AAT GAT AGC ATG GAT ACC TCA      2907
Arg Thr Arg Met Gln Lys Gln Lys Met Asn Asp Ser Met Asp Thr Ser
        910                 915                 920

AAC AAG GAA GAG AAA TGAGGATCTC AGGACCTTGG TGGACACTGT GTACACCTCT      2962
Asn Lys Glu Glu Lys
    925

GGATTCATTG TCTCTCACAG ATGTGACTGT AT                                  2994
```

FIG. 9-11

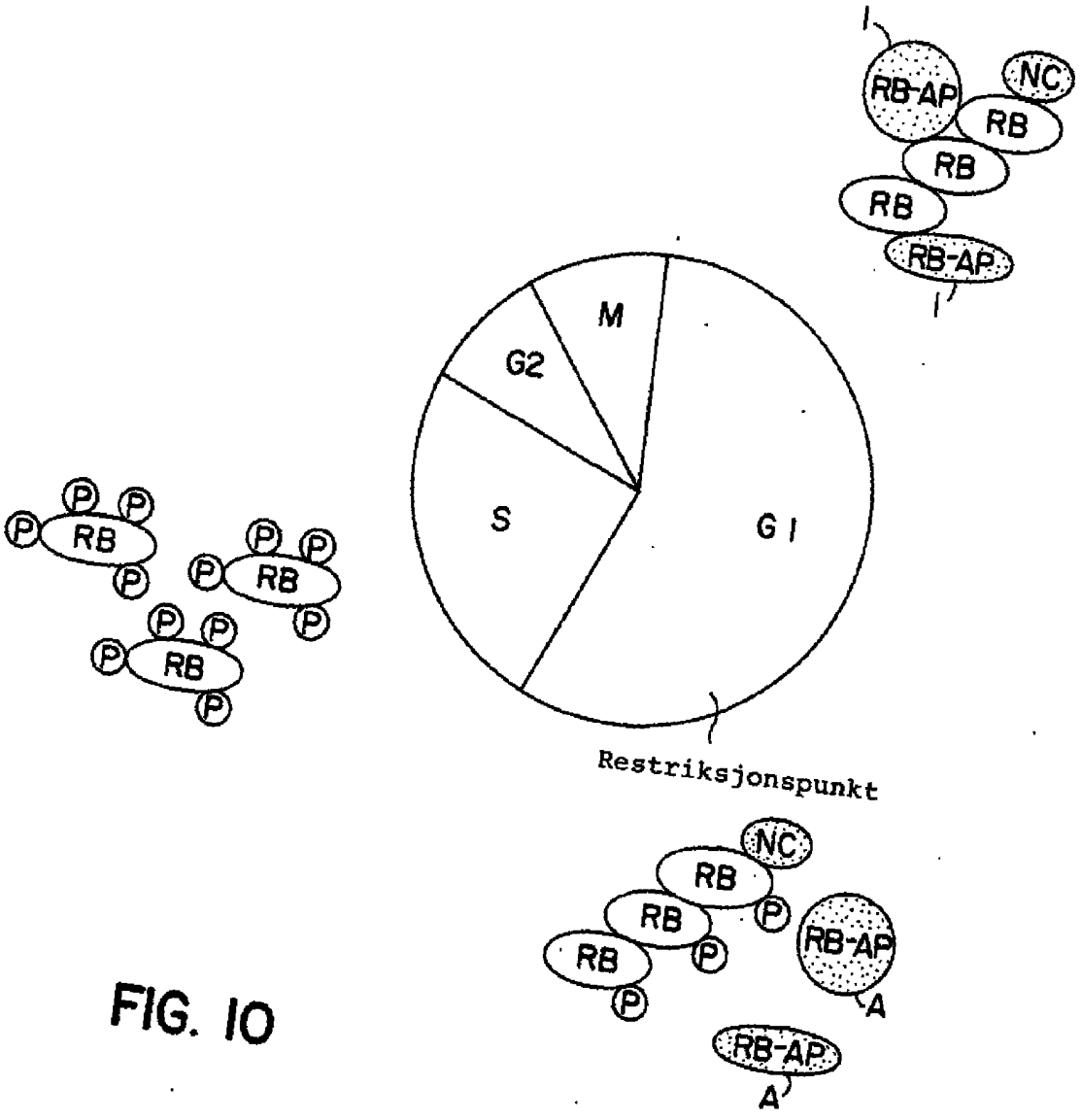

RB-AP
NC
RB
RB
RB
RB-AP
M
G2
S
G1
P
RB
Restriksjonspunkt
NC
RB
RB
RB
RB-AP
A
RB-AP
A

FIG. 10