

Session 2011

Filière : 2^{ème} concours

ENS de Lyon

Epreuve de Biologie-Biochimie

Durée : 3 heures

Ce livret comprend 11 pages numérotées de 1 à 11

Cette épreuve comporte 3 parties dont les thématiques sont reliées mais qui peuvent être traitées de façon indépendante. Les temps prévisionnels qu'il est suggéré de consacrer à chacune des parties, et qui serviront de base à l'élaboration du barème, sont indiqués ci-dessous :

- Partie I. Le cycle de HIV-1 (30 min)
- Partie II. Fonctions de la protéine Tat d'HIV-1 (1h30)
- Partie III. Fonctions de la protéine Rev d'HIV-1 (1h)

Toute réponse devra être justifiée, même brièvement.

L'usage de tout document et de calculatrice est interdit

Partie II. Fonctions de la protéine Tat

(1h30)

A. Tat et expression virale

1. Action de Tat sur l'expression virale

En dehors des protéines de structure et des enzymes virales, l'existence de protéines "accessoires" a été mise en évidence chez HIV-1. Parmi elles, la protéine Tat (Transactivation factor) a rapidement été pressentie comme jouant un rôle dans l'expression virale. Afin de comprendre son action, un plasmide bactérien a été construit (pLTR-CAT), dans lequel la région LTR (Long Terminal Repeat, voir figure 2) du virus a été placée en amont d'un gène codant pour une enzyme (CAT), dont l'activité peut être facilement quantifiée. La région LTR, présente à l'extrémité 5' de l'ADN proviral, est composée de trois régions : U3, contenant des séquences promotrices, R marquant le site de début de la transcription, et U5 (voir figure 3).

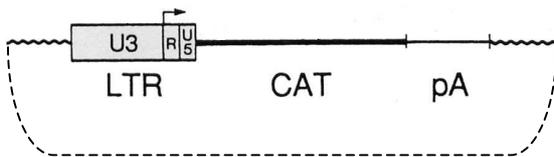


Figure 3 : carte de la construction réalisée dans le plasmide pLTR-CAT.

LTR : Long Terminal Repeat de HIV-1

CAT : séquence codante de l'enzyme utilisée

pA : signal de polyadénylation

La flèche indique le site de démarrage de la transcription. Les lignes ondulées et les pointillés représentent le reste du plasmide, qui est circulaire.

Ce plasmide a été introduit dans des cellules humaines en culture (technique de transfection) par ailleurs capables de synthétiser ou non la protéine Tat. La mesure de l'activité CAT donne les résultats suivants :

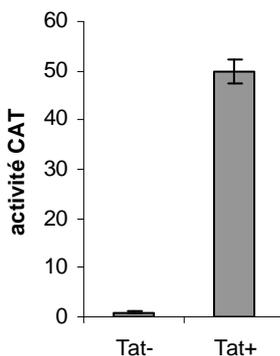


Figure 4 : mesure d'activité CAT

Des cellules en culture, exprimant la protéine Tat du HIV-1 (Tat+) ou non (Tat-) ont été transfectées avec le plasmide pLTR-CAT. Deux jours après transfection, les protéines ont été extraites des cellules, et l'activité CAT a été mesurée. L'activité est représentée sur le graphique en unités arbitraires.

Question 2

Quel est l'effet de la présence de la protéine Tat sur l'activité CAT dans ce modèle ?
Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour l'expliquer ?

Parallèlement à cette mesure, les ARN messagers des cellules transfectées ont été extraits et analysés (technique du Northern blot). Les résultats suivants ont été obtenus :

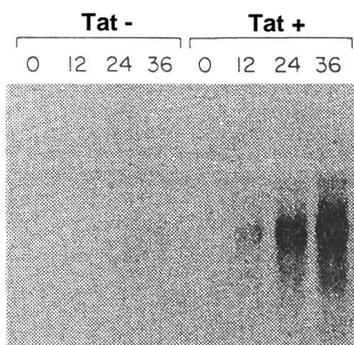


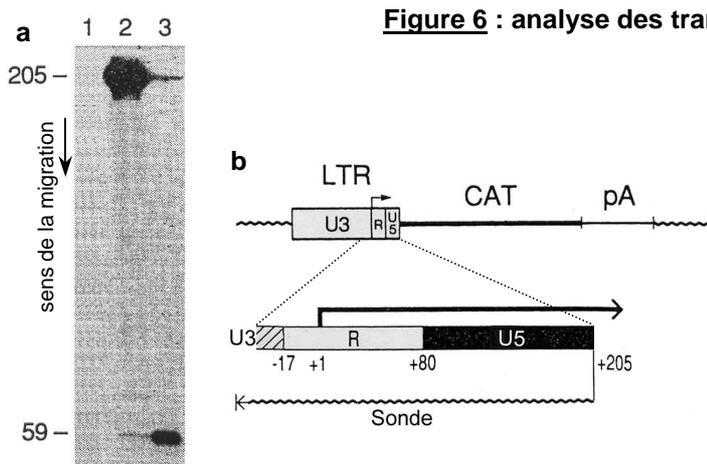
Figure 5 : analyse des ARN messagers

Les ARN messagers des cellules transfectées par le plasmide pLTR-CAT, et exprimant (partie de droite) ou non (partie de gauche) la protéine Tat ont été extraits et séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel d'agarose. Ils ont ensuite été transférés sur une membrane, puis incubés en présence d'une "sonde" d'ADN radioactif simple brin reconnaissant spécifiquement la séquence CAT. Après lavages et séchage, la radioactivité est détectée par exposition de la membrane à un film radio (un signal noir apparaît au contact de la radioactivité). Les chiffres indiqués correspondent au temps (en minutes) entre la transfection et la récolte des ARNm.

Question 3

Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous privilégier par rapport à celles formulées dans la question 2 ?

Afin de mieux comprendre le rôle de Tat, une analyse plus fine des événements se déroulant au niveau du LTR a été réalisée. L'expérience précédente a été répétée, mais en extrayant non pas les ARN messagers des cellules transfectées, mais les ARN nucléaires totaux. Afin de se focaliser sur l'extrémité 5' de ces ARN, ceux-ci ont été hybridés à une sonde d'ADN simple brin radioactif, de séquence complémentaire à celle des régions R et U5 du LTR d'HIV-1. L'ensemble a alors été soumis à une digestion par la RNase A, une enzyme dégradant tous les ARN simple brins mais respectant les ARN double-brins. Les ARN ont enfin été déposés sur gel d'électrophorèse, et séparés selon leur taille. La radioactivité a enfin été détectée par exposition du gel à un film radio. Les résultats suivants ont été obtenus :



- a. Les ARN nucléaires totaux de cellules non transfectées (piste 1), transfectées par le plasmide pLTR-CAT (pistes 2 et 3) et exprimant la protéine Tat (piste 2) ou ne l'exprimant pas (piste 3) ont été hybridés à une sonde d'ARN simple brin radioactif, puis soumis à une digestion par la RNase A et enfin séparés selon leur taille par migration sur gel d'électrophorèse. La taille des fragments est indiquée sur la gauche en nombre de nucléotides.
- b. Représentation schématique de la région LTR avec la position de la sonde utilisée pour la protection à la RNase.

Question 4

Représentez très succinctement sur un schéma les différentes étapes de l'expérience.

A quoi correspond l'ARN le plus grand mis en évidence dans la piste 2 ?

Comment pouvez-vous interpréter la présence de l'ARN de petite taille observé dans la piste 3 ?

Pourquoi ne pouvait-on pas observer ces deux types d'ARN dans l'expérience décrite dans la figure 5 ?

Question 5

A quelle étape de l'expression virale la protéine Tat semble-t-elle principalement exercer son effet ?
Quelle(s) hypothèse(s) pourriez-vous formuler pour l'expliquer ?

2. Rôle de la séquence TAR

Des expériences de délétion ont montré que la région permettant l'action de la protéine Tat au niveau du LTR d'HIV-1 était située dans la région R, entre les nucléotides +1 et +59. Cette région a été nommée TAR (Tat Responsive Region).

Afin de comprendre l'effet de Tat sur la séquence TAR, des expériences de retard sur gel ont été réalisées. Pour cela, des fragments d'ADN ou d'ARN, correspondant à la séquence TAR ont été marqués radioactivement. Ces acides nucléiques ont ensuite été incubés *in vitro* avec une protéine Tat purifiée. Le contenu des différents tubes a ensuite été mis à migrer sur un gel d'électrophorèse, dans des conditions non dénaturantes. Dans ces conditions, les acides nucléiques libres migrent rapidement en bas du gel, alors que les complexes impliquant plusieurs molécules sont retardés. Après séchage la radioactivité est détectée par exposition à un film radio. Les images suivantes ont été obtenues :

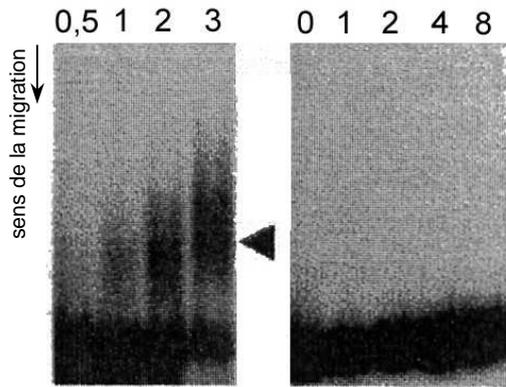


Figure 7 : retard sur gel réalisé avec l'ARN (panneau de gauche) ou l'ADN (panneau de droite) de la séquence TAR d'HIV-1. Les acides nucléiques radioactifs ont été incubés avec des quantités variables de protéine Tat purifiée (volume indiqué en haut des pistes en microlitres).

Question 6

A quoi correspond le signal indiqué par le triangle ?
 Que pouvez-vous déduire de cette expérience sur l'action de la protéine Tat ?

Question 7

En quoi ce mode d'action de la protéine Tat est-il étonnant par rapport au modèle de contrôle de l'expression génétique que vous connaissez ?

La séquence nucléotidique de TAR a été analysée. Cette région d'ARN est susceptible de présenter la structure suivante :

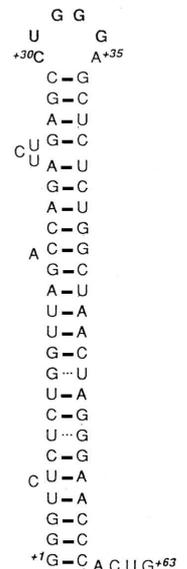


Figure 8 : structure de la région TAR de HIV-1

Question 8

Comment qualifieriez-vous ce type de structure ?
 Comment peut-elle se former ? Que représentent les traits pleins et les pointillés ?

B. Rôle de certaines protéines cellulaires sur l'expression virale

1. Le complexe p-TEFb

Des inhibiteurs de la protéine Tat ont été recherchés. Parmi les 100 000 molécules testées, toutes celles capables d'inhiber l'activité de Tat étaient déjà connues pour inhiber le complexe p-TEFb, identifié chez la Drosophile et composé de deux protéines : la cycline T et la protéine kinase cdk9 (cyclin dependent kinase 9). Les cdk sont des enzymes capables de phosphoryler certaines protéines cibles par transfert de groupement phosphate à partir de l'ATP ou du GTP. Parmi ces inhibiteurs, le DRB présente la formule suivante :

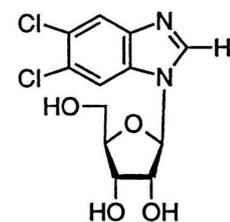


Figure 9 : formule du DRB, un inhibiteur du complexe p-TEFb

Question 9

Quelle est la nature chimique de cette molécule ?
 En quoi peut-il vous paraître logique qu'elle soit un inhibiteur de p-TEFb ?

Afin d'étudier le rôle de p-TEFb dans l'activité de Tat, des expériences de transcription *in vitro* (c'est à dire en-dehors d'un contexte cellulaire) ont été réalisées à partir de la construction pLTR-CAT, dans différentes conditions mais toujours en présence de nucléotides radioactifs. Les ARN produits ont été purifiés, déposés sur gel, et après électrophorèse la radioactivité a été révélée par exposition du gel à un film radio. Les résultats suivants ont été obtenus (les ARN de taille inférieure à 200pb sont sortis du gel lors de l'électrophorèse) :

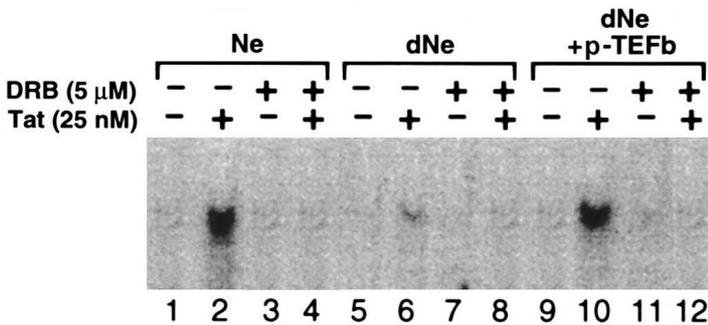


Figure 10 : analyse des ARN obtenus par transcription *in vitro* de la construction pLTR-CAT en présence de nucléotides radioactifs et d'ARN polymérase auxquels ont été rajoutés différentes molécules, indiquées en haut des pistes : Ne = extraits nucléaires de cellules en culture, préalablement passés sur une résine portant un anticorps non spécifique ; dNe = extraits nucléaires de cellules en culture, préalablement passés sur une résine portant un anticorps reconnaissant spécifiquement p-TEFb ; p-TEFb, Tat et DRB = préparations purifiées des molécules correspondantes.

Question 10

Dans cette expérience de transcription *in vitro* à partir d'un promoteur eucaryote, pourquoi est-il indispensable d'ajouter des extraits nucléaires de cellules en culture à l'ARN polymérase pour que la réaction puisse se dérouler ?
 Quel est selon vous l'effet de faire passer ces extraits nucléaires sur une résine porteuse d'un anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine donnée ?

Question 11

Analysez les résultats obtenus dans les pistes 1 à 4. Que vous confirment-ils concernant l'importance de Tat ? Concernant l'effet du DRB ?
 Analysez les résultats obtenus dans les pistes 5 à 12. Qu'en concluez-vous concernant le rôle de p-TEFb ?

Pour mieux comprendre les relations entre Tat et p-TEFb, des expériences de retard sur gel ont été réalisées comme dans la figure 7. Les résultats suivants ont été obtenus :

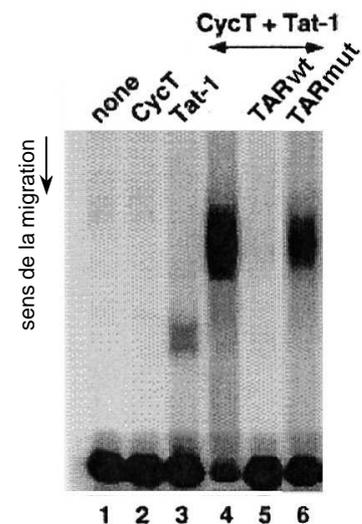


Figure 11 : retard sur gel.

Les ARN radioactifs portant la séquence TAR ont été incubés avec un tampon seul (piste 1) ou contenant de la cycline T (pistes 2, 4, 5, 6), la protéine Tat (pistes 3 à 6), des ARN TAR non radioactifs de séquence sauvage (piste 5) ou mutée (piste 6). Après dépôts sur gel, l'électrophorèse a été réalisée en conditions non dénaturantes, et la radioactivité a été détectée par exposition du gel à un film radio.

Question 12

Interprétez les résultats obtenus.
 Que vous apprend la comparaison des pistes 2, 3 et 4 ?
 Quel est l'intérêt des pistes 5 et 6 ?

2. L'ARN polymérase II

Chez les Eucaryotes l'ARN polymérase responsable de la synthèse des ARN messagers est l'ARN pol II. Elle est composée de différentes sous-unités. A l'extrémité C-terminale de la plus grande d'entre-elles, se trouve un domaine nommé CTD (Carboxy Terminal Domain) riche en sérine, tyrosine et thréonine. Il est rapidement apparu qu'il existait deux formes de l'ARN pol II en fonction de l'état de phosphorylation de ce domaine CTD. Les relations entre ces deux formes ont été étudiées dans différentes conditions *in vitro*.

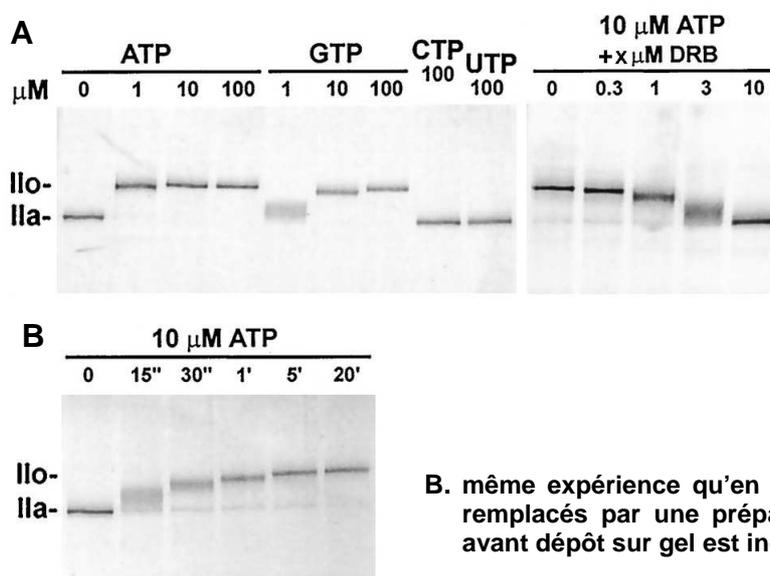


Figure 12 : phosphorylation du domaine CTD de l'ARN pol II.

A. une ARN pol II marquée radioactivement sur sa plus grande sous-unité a été obtenue, et incubée *in vitro* en présence d'un extrait nucléaire et de différentes concentrations (indiquées en haut des pistes en μM) de nucléotides ou de DRB. Après dépôt sur gel, les deux formes (Ilo et Ila) de la polymérase ont été séparées par électrophorèse et la radioactivité détectée par exposition du gel à un film radio.

B. même expérience qu'en A sauf que les extraits nucléaires ont été remplacés par une préparation de p-TEFb. Le temps d'incubation avant dépôt sur gel est indiqué en haut des pistes.

Question 13

Quelle est la forme phosphorylée de l'ARN pol II ?
 Que vous indiquent les résultats obtenus avec les différents types de nucléotides et le DRB ?
 Que pouvez-vous conclure de la partie B de la figure ?

Afin de déterminer quelle forme de l'ARN pol II est impliquée dans la production des ARNm, l'enzyme totale a été purifiée et soit déposée directement sur gel, soit utilisée pour transcrire *in vitro* un ADN modèle en présence de nucléotides radioactifs. Les réactions ont alors été soumises à l'action d'une lumière ultra-violette ayant la propriété d'établir des liaisons covalentes entre les molécules en contact au moment de l'exposition à la lumière (sans que cela modifie notablement la taille de l'ARN pol II, qui est une très grosse protéine). L'ensemble a alors été déposé sur gel et la radioactivité révélée par exposition à un film radio. Les résultats suivants ont été obtenus :

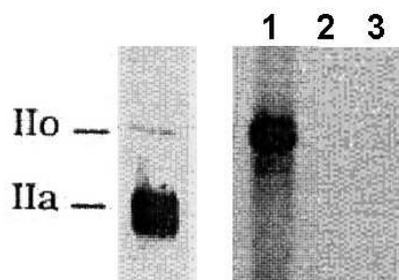


Figure 13 : UV-crosslinking entre l'ARN pol II en cours d'élongation et les ARN.

Panneau de gauche : coloration au chlorure d'argent des protéines contenues dans la préparation d'ARN polymérase II purifiée.

Panneau de droite : résultats de l'expérience d'"UV-crosslinking" réalisée avec l'ARN polymérase purifiée, en présence d'une matrice d'ADN, d'un extrait nucléaire et de nucléotides radioactifs (piste 1) auxquels ont été rajoutés un inhibiteur de l'activité ARN polymérase (piste 2), et soumis (pistes 1 et 2) ou non (piste 3) à l'action des UV.

Question 14

Sous quelle forme l'ARN pol II semble se trouver en majorité dans la cellule ?
 Sous quelle forme semble-t-elle exercer son activité ?
 Pourquoi n'observe-t-on aucun signal dans les pistes 2 et 3 ?

Question 15

En reprenant l'ensemble des données obtenues, proposez sur une figure un bilan de l'activité de la protéine Tat sur l'expression virale.

Partie III. Fonctions de la protéine Rev

(1h)

La protéine Rev est également indispensable à la réalisation du cycle de HIV-1.

A. Analyse des transcrits produits par une cellule infectée par HIV-1

Afin d'étudier l'expression virale dans un contexte global, le génome complet de HIV-1 (taille totale : 9,2 kilobases) sauvage ou muté a été inséré dans un plasmide bactérien, et celui-ci a été introduit par transfection dans des cellules en culture. Les ARN produits ont été extraits, séparés selon leur taille par migration sur un gel d'électrophorèse, puis transférés sur une membrane. La membrane a alors été incubée en présence d'une sonde d'ADN simple brin radioactif reconnaissant spécifiquement certaines régions du génome viral. Après lavage la radioactivité a été révélée par exposition de la membrane à un film radio (technique du Northern blot).

Les résultats suivants ont été obtenus :

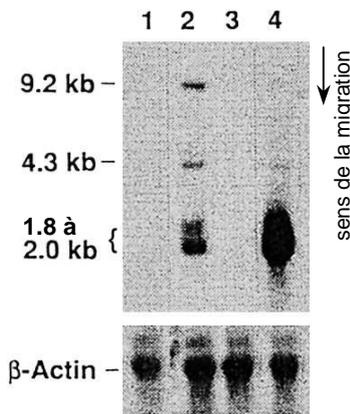


Figure 14 : analyse par Northern blot des transcrits HIV-1.

Panneau du haut : les ARN de cellules non transfectées (piste 1), transfectées par un ADN viral sauvage (piste 2), ou présentant une mutation dans la séquence codante de la protéine Tat (piste 3), ou dans celle de Rev (piste 4) ont été analysés par Northern blot à l'aide d'une sonde reconnaissant l'ensemble du génome viral. La taille des ARN correspondant aux signaux obtenus est indiquée sur la gauche du gel en kilobases (kb)

Panneau du bas : la membrane a été déshybridée, lavée et incubée avec une sonde radioactive reconnaissant cette fois l'ARN messager cellulaire de la β -actine.

Question 16 :

Quel est l'intérêt du panneau du bas ?
 Proposez une (des) hypothèse(s) permettant d'expliquer les signaux observés dans la piste 2 sachant qu'HIV-1 ne possède qu'un seul promoteur (contenu dans le LTR 5', voir figure 2).
 Que montre la piste 3 ?
 Analysez les résultats observés dans la piste 4.
 Quelle(s) hypothèse(s) pouvez-vous formuler pour l'expliquer ?

Afin de comprendre le rôle de la protéine Rev dans l'expression virale, le même type d'expériences que précédemment a été réalisé, mais en utilisant différents types de sondes radioactives. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 1 :

	séquence gag	séquence env	séquence Tat	séquence Rev	séquence RRE
bande à 9,2kb	+	+	+	+	+
bande à 4,3kb	-	+	+	+	+
signal de 1,8 à 2kb	-	-	+	+	-

Tableau 1 : résultats de l'analyse des transcrits de HIV-1 par Northern blot. Les différentes colonnes représentent l'utilisation de sondes reconnaissant spécifiquement les séquences codantes des protéines gag, env, Tat et Rev, ainsi que la séquence RRE (voir plus loin) respectivement. Les différentes lignes indiquent l'obtention (+) ou non (-) d'un signal correspondant à la taille attendue pour les différents types d'ARN.

Question 17 :

Sans tenir compte de la dernière colonne, analysez les résultats obtenus. En quoi confirment-ils votre hypothèse précédente sur l'origine des différents signaux ?

B. Rôle de la séquence RRE

Des études de mutants de HIV-1 ont montré qu'une séquence, nommée RRE pour Rev Responsive Element était essentielle à l'action de Rev. Il a été montré que la protéine Rev était capable de se fixer à la séquence RRE sous forme d'ARN.

Question 18

A l'aide du tableau 1 (y compris la dernière colonne), représentez sur un schéma les différents transcrits de HIV-1.

Question 19

Quelles sont les deux hypothèses que vous pouvez formuler concernant l'action de Rev sur ces transcrits ?

Afin de mieux comprendre l'action de Rev, un nouveau plasmide a été construit : en aval d'un promoteur ubiquitaire (conduisant à une expression quel que soit le contexte cellulaire), a été placée une séquence d'ADN composée de deux exons séparés par un intron, dans lequel la séquence RRE a été insérée (plasmide pRRE). Des cellules en culture ont été transfectées avec cette construction, ainsi qu'avec un plasmide permettant d'exprimer la protéine Rev (pRev). Les ARN produits ont été analysés par Northern blot comme précédemment à l'aide d'une sonde radioactive reconnaissant un des exons de la construction. Les résultats suivants ont été obtenus :

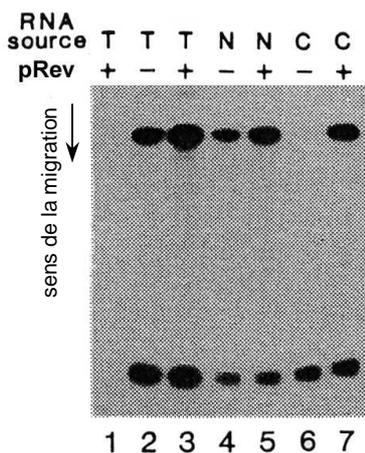


Figure 15 : les ARN totaux (T), nucléaires (N) ou cytoplasmiques (C) ont été extraits de cellules transfectées par le plasmide pRev (+) ou non (-), ainsi que par le plasmide pRRE (pistes 2 à 7). Les ARN ont été séparés selon leur taille par migration sur un gel d'électrophorèse (les plus petits migrant le plus bas), transférés sur membrane puis incubés en présence d'une sonde radioactive reconnaissant un des exons de la construction pRRE utilisée. Après lavages la radioactivité a été détectée par exposition de la membrane à un film radio.

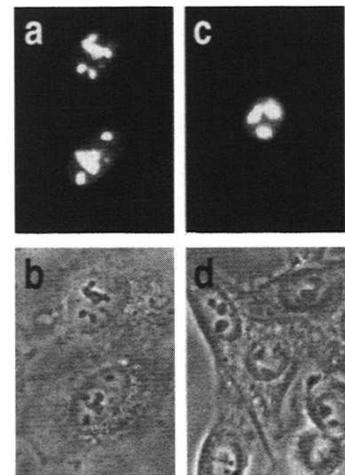
Question 20

Analysez les résultats obtenus. A quoi correspondent les deux signaux observés ? Quel semble être le rôle de la protéine Rev ?

C. Localisation de Rev

La localisation cellulaire de la protéine Rev a été étudiée. Pour cela, des cellules en culture ont été transfectées par le plasmide permettant l'expression de la protéine Rev (pRev). Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et incubées avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine Rev. Cet anticorps est couplé à un fluorochrome, c'est à dire une molécule devenant fluorescente lorsqu'elle est éclairée par une lumière ultra-violette. Les images suivantes ont été obtenues :

Figure 16 : immunofluorescence. Observation au microscope optique en lumière blanche (b et d) ou ultra-violette (a et c) de cellules transfectées par pRev et incubées en présence d'un anticorps anti-Rev couplé à un fluorochrome. L'image obtenue en a correspond aux mêmes cellules qu'en b, et l'image obtenue en c aux mêmes cellules qu'en d. Les images correspondent toutes à un grossissement x400.



Question 21

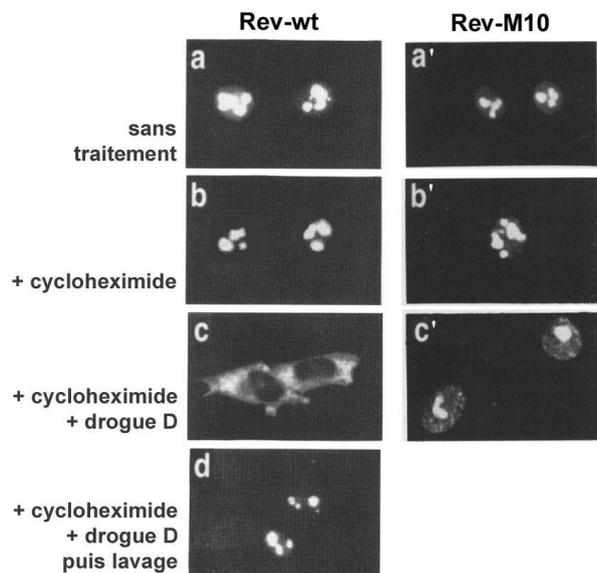
Pourquoi selon vous toutes les cellules n'apparaissent-elles pas marquées dans l'image c ?
En quoi cela peut-il être une donnée utile pour l'expérience ?

Question 22

Quelle est la localisation cellulaire de la protéine Rev ?
Est-ce la localisation attendue pour une protéine qui vient d'être synthétisée ?
Comment pourrait-on l'expliquer ?

Afin de mieux connaître les propriétés de Rev, le même type d'expérience a été réalisé, mais en soumettant ensuite les cellules à différents types de traitements : la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction protéique, et une drogue D, dont l'effet est mal connu. Par ailleurs la localisation d'un mutant de Rev, nommé M10, a été comparée à celle de la protéine sauvage (Rev-wt). Les images suivantes ont été obtenues :

Figure 17 : des cellules transfectées par pRev-wt (panneaux de gauche) ou pRev-M10 (panneaux de droite) ont été soumises 48h après la transfection à différents traitements : aucun (images a et a'), cycloheximide (images b et b'), cycloheximide à laquelle est rajoutée ensuite la drogue D (images c et c'), cycloheximide à laquelle est rajoutée ensuite la drogue D, puis élimination des deux drogues par lavage extensif des cellules (image d). Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées, incubées en présence d'un anticorps anti-Rev couplé à un fluorochrome et observées en lumière ultra-violette. Les images obtenues correspondent à un grossissement x400.



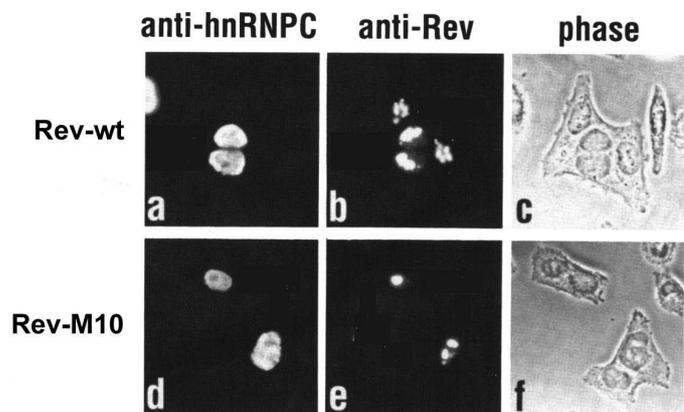
Question 23

Quel semble être l'effet de la drogue D sur la localisation cellulaire de Rev ?
Pourquoi a-t-on au préalable soumis les cellules à un traitement par la cycloheximide ?
Que cela implique-t-il au niveau de la protéine Rev ?
Quel effet semble avoir la mutation affectant la protéine Rev-M10 ?
Que vous apprend l'image d ?

Afin de savoir si ces capacités particulières de Rev peuvent être observées en absence de drogue, des cellules humaines en culture ont été transfectées par le plasmide pRev, puis fusionnées à des cellules de souris en culture (formation d'hétérocaryons). La protéine Rev, ainsi que la

protéine hnRNPC (heterogenous nuclear Ribo Nucleo Protein C), protéine spécifique des noyaux humains, ont été détectées comme préalablement par immunofluorescence. Les images suivantes ont été obtenues :

Figure 18 : des hétérocaryons formés de cellules humaines transfectées par la construction pRev-wt (panneaux du haut) ou pRev-M10 (panneaux du bas) fusionnées avec des cellules murines non transfectées ont été fixés, perméabilisés, et incubés avec des anticorps anti-hnRNPC et anti-Rev couplés à deux fluorochromes différents. Les hétérocaryons ont alors été observés en lumière blanche (c et f), en lumière ultra-violette permettant l'excitation du fluorochrome couplé à l'anticorps anti-hnRNPC (a et d) et en lumière ultra-violette permettant l'excitation du fluorochrome couplé à l'anticorps anti-Rev (b et e). Les images a, b et c représentent les mêmes hétérocaryons observés sous les trois types de lumières différentes. Il en est de même pour les images d, e et f. Les images obtenues correspondent à un grossissement x400.



Question 24 :

Représentez sur un schéma un hétérocaryon, en identifiant les différents types de noyaux.
 Que permet de conclure cette expérience ? Montrez sur votre schéma le trajet effectué par la protéine Rev.
 Que pouvez-vous en conclure sur la fonction de Rev ?

Question 25 :

En reprenant l'ensemble des résultats obtenus dans cette partie, proposez un modèle permettant d'expliquer le rôle de la protéine Rev dans le cycle viral de HIV-1.

Références bibliographiques (figures librement adaptées de :)

- Dingwall et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989), **86** : 6925-6929
 Kao SY et al., *Nature* (1987), **330** : 489-493
 Malim MH et al., *Nature* (1989), **338** : 254-257
 Mancebo HSY et al., *Genes & Dev.* (1997), **11** : 2633-2644
 Marshall NF et al., *J. Biol. Chem.* (1996), **271** : 27176-27183
 Meyer BE et al., *Genes & Dev.*(1994), **8** : 1538-1547
 Payne JM et al., *J. Biol. Chem.* (1989), **264** : 19621-19629
 Rice AP et al., *Nature* (1988), **332** : 551-553
 Sadaie MR et al., *Science* (1988), **239** : 910-913
 Wei P et al., *Cell* (1998), **92** : 451-462