

Production et caractérisation de la prohormone convertase 1/3

Par

Nadia Rabah

**Division de médecine expérimentale
Faculté de médecine
Université McGill
Montréal, Québec**

**Thèse présentée au département d'études graduées et postdoctorales de l'université
McGill en vue de l'obtention du grade de Docteur en philosophie (Ph.D.)**

Avril 2007

©Nadia Rabah, 2007



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-38632-3
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-38632-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

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

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

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

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Faculté de médecine
Division de médecine expérimentale
Université McGill

Cette thèse intitulée :

Production et caractérisation de la prohormone convertase 1/3

présentée par :

Nadia Rabah

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Claire Dubois
Dr. Nabil Seidah
Dr. André De Lean
Dr. Puttaswamy Manjunath
Dr. Gaétan Thibault (Examineur interne)
Dr. Pierre D'Amour (Examineur externe)
Dr. Jacques Hurtubise (Représentant du doyen)
Dr. Andrew Mouland (Représentant de la faculté de médecine)

À Vadim

'Tant qu'il n'y a pas d'explication scientifique, inutile de s'inquiéter.'

Bob and Doug McKenzie: Great White North

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Claude Lazure, mon superviseur de thèse, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. J'aimerais lui exprimer toute ma gratitude pour ces années de formation riches en échanges scientifiques et en acquisition du savoir. Il a toujours su me donner des conseils judicieux et m'épauler dans l'orientation de mon projet de recherche. Il est certain que mes compétences en mécanique ainsi que mes connaissances des marques de voitures italiennes se sont nettement améliorées à son contact tout au long de ces années. J'aimerais, par ailleurs, le remercier pour sa grande humanité de laquelle j'ai tiré un enseignement bien au-delà de la science. Son calme et sa sérénité font de son laboratoire un environnement exceptionnel où chacun peut s'épanouir.

Je voudrais remercier Danie Gauthier, notre technicienne de laboratoire. Merci Danie pour ton aide technique, ta gentillesse ainsi que ta joie de vivre. Tu es une collègue de travail formidable. Te côtoyer a été un immense plaisir. Tu as changé ma vision de 'Saturne' pour toujours.

J'aimerais remercier Daniel Gauthier, mon collègue de laboratoire, pour son soutien, son agréable compagnie, son amabilité ainsi que ses récits de films d'horreur 'série B'.

Je tiens également à remercier Michèle Villemure et Karen Lee que j'ai pu croiser lors de mon séjour au laboratoire.

J'aimerais remercier les membres de mon comité de thèse, Dr. Robert Day, Dr. David Lohnes ainsi que le Dr. Hugh Bennett, qui m'ont suivi pendant ces années.

Je voudrais remercier Dominique Besso et Marylin Linhares, de la division de médecine expérimentale, pour leur gentillesse, leur disponibilité ainsi que leurs conseils pratiques.

Je tiens à remercier le Dr. Nabil Seidah ainsi que les membres de son laboratoire pour les conseils techniques, les échanges scientifiques ainsi que les moments agréables passés autour de la table à café. Merci à Brigitte Mary, Annik Prat, Edwidge Marcinkiewicz, Anna Roubtsova, Ann Chamberland, Josée Hamelin, Luise Wickham, Maya Mammabassi, Antonella Pasquato, Philomena Pullikotil, Marie-Claude Asselin, Mike Ponamarev. Je tiens également à remercier Nadia Nour, Éric Bergeron, Annie Lemieux, Isabelle Ganache, Danie Gauthier et Daniel Gauthier pour les soirées peuplées de rires et de discussions animées.

J'aimerais remercier le Dr. Gaétan Thibault d'avoir mis à ma disposition le matériel nécessaire pour effectuer les expériences d'iodation. Je voudrais par la même occasion remercier ses techniciens, Patrick Couture et Geneviève Lapalme, pour leurs conseils pratiques.

Je voudrais remercier le Dr. Timothy Reudelhuber ainsi que les membres de son laboratoire pour leur implication dans le projet de caractérisation du domaine C.T.

Je tiens à remercier le Dr. Robert Ménard ainsi que Paule Lachance pour leur aide dans les analyses de cinétique enzymatique et l'utilisation du logiciel 'GraFit'.

Merci au personnel du centre de documentation, Martine Lauzier, Claudia Jones et Nicole Campeau, pour leur aide considérable.

J'aimerais remercier toutes les personnes que j'ai croisées durant mon passage à l'IRCM et avec qui j'ai développé des liens d'amitié. Merci à Geneviève Rodier et à Philippe Coulombe pour leur gentillesse et leur qualité d'hôtes exceptionnels. Merci à Saloua Saidane pour les agréables soirées passées en sa compagnie ainsi que pour son imminent talent de baby-sitter. Merci également à Ben Turgeon et à Mathieu Ferron.

J'aimerais remercier tous ceux qui ont contribué à ce que mes années de thèse soient des plus agréables. Merci à Anna Bobyрева, Yanie Porlier, Nassima Bekhechi, Nicola

Urbani, Éliane Ubalijoro, Karim (Sergei) Agoune, Marc Balestra, Anissa Amroun, Marie-Claude Guay, Natalia Chatilova, Carine Discazeaux, Caroline Phemius, Karim Kerdel, Amel Fortas, Emilie Viel et Alexandre Lebedev.

I would like to thank Nasha Nassoury for her friendship, her kindness and her contagious smile.

J'aimerais remercier tout particulièrement Leila Boukhari et Ludovic Mottini pour leur grande et sincère amitié. Pour toutes les aventures incroyables garnies de cuisses de poulet à la Havane ou finissant en remorqueuse au fin fond du Québec. Merci pour les inoubliables soirées Sarajevo, Karaoké, et occasion de toutes sortes.

J'aimerais remercier Mourad et Annaig pour leur soutien à distance durant toutes ces années. Merci pour les moments à vélo et les soirées 'guitare' inoubliables passées des deux cotés de l'océan.

Merci à mes parents pour qui toutes les pages de cette thèse ne seraient pas suffisantes pour exprimer ma gratitude. Merci pour votre appui inconditionnel. Merci pour votre éducation et votre enseignement de la vie qui ont contribué au développement de mon esprit critique. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis.

Finalement, merci aux hommes de ma vie, Romain et Vadim. Merci à toi Romain qui m'a soutenu durant toutes ces années. Merci pour ton amour, tes encouragements ainsi que ton sens critique. Merci d'exister, tu es une source d'inspiration inépuisable. Tu as mis de la magie dans ma vie une soirée d'été au café 'Sarajevo'. La magie s'est par la suite transformée en explosion d'étoiles qui a changé à jamais le cours de ma vie.

ABSTRACT

Biopeptides are synthesised as large pro-protein precursors that have to undergo proteolytic cleavage at positively charged amino acids (Lys and Arg) in order to become active. This cleavage is mediated by a family of subtilin/kexin related calcium dependent serine endoproteinasases named prohormone convertases. The present thesis focuses on the endocrine member of the family named PC1/3. PC1/3 is expressed in the regulated secretory pathway of endocrine and neuroendocrine cells, where it was shown to activate various peptide hormones such as proopiometanocortin (POMC), pro-insulin and pro-glucagon. PC1/3 is synthesized as a large precursor containing a signal peptide, a propeptide, a catalytic domain, a P domain and a C-terminal domain. The activation of the enzyme requires the sequential removal of the signal peptide, the propeptide and ultimately the C-terminal domain.

The structural characterisation of the enzyme is compromised by the difficulty in producing a sufficient amount of recombinant PC1/3. In this thesis it is clearly demonstrated that the production of PC1/3 using Baculovirus technology can be greatly improved by modifying the expression vector in insect cells (*Spodoptera frugiperda*). In addition, the intracoelemic injection of insect larvae (*Tricoplusia ni*) with the Baculovirus encoding the recombinant PC1/3 is shown to be a very efficient method for the production of a large amount of prohormone convertases.

It was previously demonstrated that the propeptide is essential for the folding of the enzyme and act as a tight binding inhibitor of the enzyme until the latter reaches the appropriate compartment for substrate cleavage. To assess the role of certain residues within the propeptide in the inhibition of the cognate enzyme, a mutational analysis by alanine scan was conducted. The results demonstrate that the substitution of a single amino acid can affect markedly the inhibition behavior, potency and selectivity of the propeptide towards the enzyme. Moreover, this mutational analysis allowed the first experimental mapping of the sequence involved in propeptide degradation once its function is achieved.

However, PC1/3 also possesses a C-terminal domain which must also be cleaved to allow the full activation of the enzyme. Previous studies showed that this domain is implicated in the sorting of the enzyme to secretory granules. In addition, over expression experiments showed that the C-terminal domain can inhibit the cleavage of certain substrates by PC1/3. The results, presented here, suggest that the CT-peptide acts as a non-essential activator of PC1/3, *in vitro*, which adds a supplementary level of complexity to the activation process of the enzyme.

Finally, based upon our results, it can be proposed that PC1/3 is a very complex enzyme capable of controlling its enzymatic activity through the coordinate action of its various domains. This exceptional mode of self-regulation is unique among all protease families.

RÉSUMÉ

Les peptides biologiquement actifs sont synthétisés sous forme de précurseurs, qui doivent être clivés à des sites d'acides aminés basiques (de type Arg ou Lys) afin de générer des entités actives. Ce type de clivage est médié par une famille d'enzyme dites convertases. Les convertases sont des sérine endoprotéases, calcium dépendantes, reliées à la famille des subtilisine/ kexine. La présente thèse porte sur l'étude de l'un des membres de cette famille à savoir la protéine convertase 1/3 (PC1/3). La PC1/3 est présente au niveau des granules de sécrétion des tissus endocriniens et neuroendocriniens. Elle est impliquée dans la maturation de peptides hormonaux et de neuropeptides tels que le pro-glucagon, la pro-insuline et la proopiomélanocortine (POMC). L'enzyme est elle-même produite sous forme de précurseur composé d'un peptide signal, d'une prorégion, d'un domaine catalytique, d'un domaine P ainsi que d'un domaine C-terminal. L'activation de PC1/3 requière le clivage séquentiel du peptide signal, de la prorégion et ultimement du domaine C-terminal.

Les petites quantités d'enzyme recombinante obtenues par les méthodes classiques de production limitent de façon importante la caractérisation structurale de PC1/3. Les résultats présentés dans cette thèse démontrent clairement que la production de PC1/3, via la technologie du virus Baculo, peut être améliorée de façon importante en modifiant le vecteur d'expression dans les cellules d'insectes (*Spodoptera frugiperda*). De plus, l'injection intracoelomique de larves d'insectes (*Tricoplusia ni*) avec un baculovirus codant pour PC1/3 représente une méthode alternative peu coûteuse et très efficace de production des protéines convertases.

Par ailleurs, il a été démontré lors d'études antérieures que la prorégion est impliquée dans le repliement mais également dans l'inhibition de l'enzyme jusqu'à ce que cette dernière atteigne le compartiment adéquat pour le clivage de substrats. Afin d'investiguer le rôle de certains résidus de la prorégion dans l'inhibition de PC1/3, une analyse mutationnelle de substitution individuelle en alanine a été menée. Les résultats révèlent que la substitution individuelle d'un acide aminé au sein de la prorégion affecte de façon

importante le comportement inhibiteur, la force d'inhibition mais également la sélectivité de la prorégion vis-à-vis de l'enzyme parentale. De plus, la mutagenèse effectuée sur la prorégion de PC1/3 a permis de définir pour la première fois la séquence permettant la dégradation de la prorégion, une fois sa fonction inhibitrice achevée.

Cependant, PC1/3 possède également un domaine C-terminal qui doit être clivé afin de permettre la pleine activation de l'enzyme. Des études préalables ont révélé que ce domaine est impliqué dans le ciblage de PC1/3 vers les granules de sécrétion. De plus, des études de surexpression ont montré que le domaine C-terminal pouvait diminuer, et par conséquent inhiber, le clivage de substrats par PC1/3. La caractérisation de l'effet enzymatique engendré par le domaine C-terminal, décrite dans le présent manuscrit, démontre que, conjointement et/ou contrairement à ce qui a été antérieurement postulé, le domaine C-terminal agit en tant qu'activateur non-essentiel de PC1/3, *in vitro*. L'activation de PC1/3 par son domaine C-terminal ajoute un niveau de complexité au processus de régulation de l'enzyme.

Finalement, la caractérisation de PC1/3, décrite ici, nous permet de postuler que PC1/3 est une enzyme unique dont la régulation implique des interactions ainsi que des actions coordonnées entre ses différents domaines.

Préface

Cette thèse de doctorat est présentée au département d'études graduées et postdoctorales de l'université McGill. La dissertation est sous forme de manuscrits présentés au niveau des chapitres II, III et IV. La réalisation de ces manuscrits a été possible grâce à la participation des différents co-auteurs dont les noms sont mentionnés ici. Leur contribution a été grandement appréciée et est détaillée au début de chaque chapitre.

Le premier manuscrit intitulé **'Improved PC1/3 production through recombinant expression in insect cells and larvae'** a été produit par Nadia Rabah, Daniel. J. Gauthier, Dany Gauthier et Claude Lazure. L'article a été publié dans le journal 'Protein Expression and Purification' 2004 Oct; 37(2):377-84.

Le second manuscrit intitulé **'Single amino acid substitution in the PC1/3 propeptide can induce significant modifications of its inhibitory profile toward its cognate enzyme.'** a été produit par Nadia Rabah, Dany Gauthier, Brian. C. Wilkes, Daniel. J. Gauthier et Claude Lazure. L'article a été publié dans 'Journal of Biological Chemistry' 2006 Mar 17;281(11):7556-67.

Le troisième manuscrit intitulé **'The COOH-terminal region of the prohormone convertase 1/3 exerts a bimodal regulation of the enzyme activity in vitro'** a été produit par Nadia Rabah, Dany Gauthier, Jimmy. D. Dikeakos, Timothy. L. Reudelhuber et Claude Lazure. L'article a été soumis au FEBS Journal et est présentement en révision.

Table des matières

Remerciements	<i>ii</i>
Abstract.....	<i>v</i>
Résumé.....	<i>vii</i>
Préface.....	<i>ix</i>
Table des matières.....	<i>viii</i>
Listes des figures.....	<i>xiii</i>
Liste des tableaux.....	<i>xv</i>
Liste des abréviations.....	<i>xvi</i>
Chapitre I : Revue de la littérature.....	1
Introduction.....	2
1. Historique des convertases.....	5
2. Maturation des précurseurs protéiques.....	8
2.1. Modification post-traductionnelle impliquant l'addition d'un groupement.....	9
2.2. Modification post-traductionnelle impliquant l'hydrolyse de liens peptidiques.....	11
2.2.1. Réaction de clivage des convertases.....	11
2.2.1.1. Action des carboxypeptidases.....	14
2.2.1.2. Amidation.....	15
2.2.2. Autres voies de clivage protéolytique.....	16
3. Cheminement des protéines dans la voie sécrétoire.....	17
3.1. Propriétés physico-chimiques des voies sécrétoires.....	19
3.2. Ségrégation des protéines dans la voie de sécrétion régulée.....	19
4. Distribution tissulaire et localisation intracellulaire des convertases.....	20
5. Mutagenèse et fonction biologique des convertases.....	21
5.1. Convertases de la voie constitutive.....	26
5.2. Convertases de la voie régulée.....	26
5.2.1. PC5.....	27
5.2.2. PC2.....	27

5.2.3. PC1/3.....	29
6. Structure moléculaire de PC1/3.....	32
6.1. Peptide signal.....	33
6.2. La prorégion.....	33
6.3. Le domaine catalytique.....	40
6.4. Le domaine P.....	43
6.5. Le domaine C-terminal.....	44
7. Régulation de PC1/3.....	46
7.1. Régulation du gène.....	46
7.2. Au niveau protéique.....	47
7.2.1. Maturation du zymogène.....	47
7.2.2. Régulation par une protéine endogène 'ProSAAS'.....	48
8. Spécificité enzymatique de PC1/3.....	50
9. Inhibition de PC1/3.....	51
9.1. Intérêt thérapeutique des convertases.....	51
9.1.1. Infection bactérienne.....	51
9.1.2. Infection virale.....	52
9.1.3. Cancer.....	52
9.1.4. Neuro-dégénérescence.....	53
9.2. Rappel sur les mécanismes d'inhibition.....	54
9.2.1. Inhibiteurs compétitifs.....	55
9.2.2. Inhibiteurs non-compétitifs.....	55
9.2.3. Inhibition à liaison lente et à forte affinité (slow tight binding inhibition).....	55
9.3. Revue de l'inhibition de PC1/3.....	56
9.3.1. Inhibiteurs endogènes.....	56
9.3.2. Inhibiteurs peptidiques.....	57
9.3.3. Inhibiteurs à base protéique modifiés.....	59
9.3.4. Inhibiteurs non peptidiques.....	60
10. Conclusion.....	60

Chapitre II : Article 1.....	61
Abstract.....	64
1. Introduction.....	65
2. Materials and Methods.....	66
3. Results and Discussion.....	70
4. Acknowledgments.....	74
5. Legends to Figures.....	76
Chapitre III: Article II.....	83
Abstract.....	87
1. Introduction.....	88
2. Materials and Methods.....	91
3. Results	95
4. Discussion.....	101
5. Footnotes.....	108
6. Legends to Figures.....	108
Chapitre IV: Article III.....	119
Abstract.....	122
1. Introduction.....	123
2. Results and Discussion.....	124
3. Experimental Procedures.....	132
4. Acknowledgments.....	135
5. Legends to Figures.....	135
Chapitre V:Discussion générale.....	143
1. Production de PC1/3.....	144
2. Caractérisation de PC1/3.....	149
3. Conclusion et contribution aux nouvelles connaissances.....	171
Références.....	172
Annexes.....	I

Liste des figures

Chapitre I	1
Figure 1 : Triade catalytique d'une sérine protéase.	2
Figure 2 : Arbre phylogénétique de la famille des subtilases.	4
Figure 3 : Synthèse et maturation de l'insuline dans les cellules B des îlots de Langerhans du pancréas humain.	7
Figure 4 : Maturation de la POMC par PC1/3 et PC2 au niveau de l'hypophyse.	8
Figure 5: Schéma représentatif des sous-sites impliqués dans l'interaction entre une enzyme et son substrat.	12
Figure 6: Maturation d'un précurseur inactif au niveau d'acides aminés basiques dans la voie de sécrétion régulée.	15
Figure 7: Schéma représentatif de la réaction d'amidation par la PAM.	16
Figure 8 : Voies de sécrétion régulée et constitutive.	18
Figure 9 : Schéma représentant la redondance de clivage avec ordre de préférence entre PC1/3, PC2, et PC5A.	23
Figure 10 : Interaction entre la PC2 et 7B2 au niveau de la voie régulée.	29
Figure 11 : Effets de la stimulation des récepteurs à mélanocortine.	31
Figure 12: Représentation schématique des domaines composant les sept convertases.	33
Figure 13 : Maturation de la subtilisine.	34
Figure 14 : Séquence de la prorégion de la subtilisine (BNP) mettant en évidence les deux motifs hydrophobes N1 et N2.	35
Figure 15 : Mécanisme d'auto-activation de la Furine au niveau de la voie de sécrétion.	38
Figure 16 : A. Séquence et structure en solution de la prorégion de PC1/3.	39
Figure 17 : Mécanisme catalytique d'une sérine protéase.	41
Figure 18 : Structure de la Furine en présence de l'inhibiteur decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone (dec-RVKR-cmk).	43
Figure 19 : Maturation du précurseur endocrinien ProSAAS au niveau de sites d'acides aminés basiques.	49
Figure 20 : Représentation schématique de sous-sites enzymatiques au niveau du site actif.	50

Chapitre II	61
Figure 1: Scheme for the construction of gp67-PC1/3 and gp67-PC1/3- Δ C vectors.	78
Figure 2: Production of PC1/3 in insect cells.	79
Figure 3: PC1/3 Activity in the medium of SF9 cells.	80
Figure 4: PC1/3 enzymatic activity in larvae following infection with varying amounts of viruses.	81
Figure 5: Immunodetection of PC1/3 in larvae extract.	82
Chapitre III	83
Figure 1: Alignment of mammalian convertase propeptide sequences and PC1/3 mutagenesis sites.	112
Figure 2: Representative purification and characterization of bacterially produced M2- proPC1/3.	113
Figure 3: Effects of the mutated propeptides on the enzymatic activity of mPC1/3 and hfurin	114
Figure 4: Differences in inhibition behavior of propeptide mutants M2, M9, and M10 towards mPC1/3	115
Figure 5: Dixon's plot representations of the inhibition of hfurin by the propeptide mutants M9 and M10	116
Figure 6: Cleavage of the propeptide mutants by mPC1/3 and hfurin	117
Figure 7: Molecular modeling of mPC1/3 propeptide	118
Chapitre IV	119
Figure 1: Purified CT-peptide is able to modulate in vitro the enzymatic activity of mPC1/3.	137
Figure 2: Graphic representations of the inhibition of mPC1/3 by the CT-peptide.	138
Figure 3: The CT-peptide is able to increase the release of product by PC1/3.	139
Figure 4: The CT-peptide is able to activate mPC1/3 at near neutral pH.	140
Figure 5: The CT-peptide is cleaved by hfurin but not by mPC1/3.	141
Figure 6: The CT-peptide can act together with the propeptide to modify the enzymatic activity of mPC1/3.	142
Chapitre V	143
Figure 1 : Structure secondaire de la prorégion de PC1/3 avec positionnement des résidus S53, K61 et R62 avec leurs chaînes latérales	153

Figure 2 : Modélisation de l'interaction entre la prorégion de PC1/3 et la Furine (domaine catalytique et domaine P).	156
Figure 3 : Différents conformères représentant l'interaction entre la prorégion de PC1/3 et le reste de l'enzyme.	157
Figure 4 : Représentation schématique de l'interaction entre une enzyme, son substrat (S) et un activateur (A).	164
Figure 5 : Représentation schématique de PC1/3 mettant en évidence les sites de clivages potentiels, reconnus par les convertases, présents au niveau du domaine C.T.	165
Figure 6 : Prédiction de la structure secondaire du domaine C.T de PC1/3.	167
Figure 7 : Modèle de maturation de PC1/3 au niveau de la voie de sécrétion.	170

Liste des tableaux

Chapitre I	1
Tableau I : Répartition des gènes des cinq classes de protéases	3
Tableau II : Classification de quelques précurseurs protéiques en fonction du motif de clivage reconnu par les prohormones convertases	13
Tableau III : Distribution tissulaire et localisation intracellulaire des convertases.	21
Tableau IV : Phénotypes des souris K.O pour les différentes convertases.	24
Tableau V : Préférences en terme de substrat pour PC1/3	51
Chapitre II	61
TABLE 1: Summary of PC1/3 purification from insect larvae	75
Chapitre III	83
Table 1: Oligonucleotides used for PC1/3 propeptide mutagenesis.	110
Table 2: Inhibition Parameters of the various proPC1/3 mutant peptides towards mPC1/3 and hfurin.	111

Abréviations utilisées

α 1-PDX : Antitrypsin Portland
 β -LPH : Lipotropin beta hormone
 γ -LPH : Lipotropin gamma hormone
 α -MSH : α Melanotropin stimulating hormone
ACE: Angiotensin converting enzyme
ACTH : Adenocorticotropic hormone
ADAM: A desintegrin and Metalloprotease
APP : Amyloid precursor protein
BACE: β -secretase
BSP: Bromosulphophtalein
BSPI-2: Sérine protease d'orge de type 2
CART : Cocaïne amphetamin regulated transcript
CLIP : Corticotropin like intermediate lobe peptide
CPE/D/H: Carboxypeptidase E/D/H
CRH: Corticotropin-releasing hormone
CT: C-terminal
EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein
FSH : Follicle stimulating hormone
GH: Growth hormone
GHRH: Growth-hormone-releasing hormone
HA: Hemagglutinin A
IGF : Insulin Growth Factor
IMC : Chaperone intramoléculaire
JP: peptide de junction
KO: Knockout
LH : Luteinizing hormone
MCxR: Melanocortin x receptor
mL: millilitre
 μ M: micromolaire

nM: nanomolaire

NPY : Neuropeptide hypothalamique Y

NT: peptide N-terminal

N-TIMP-3 : N-terminal domain form of tissue inhibitor of metalloproteinases 3

PACE4: Paired basic amino acid cleaving enzyme

PAM: Peptidyl-glycine α -amidating mono-oxygenase

PAL: Peptidyl-glycine α -amidating mono-lyase

PBGD : Porphobilinogen deaminase

PC : Protéine convertase

PHM : Peptidyl-glycine α -hydroxylating mono-oxygenase

PKC: Protein Kinase C

Pro-PP : pro-polypeptide pancréatique

POMC : Pro-opiomelanocortin

PS : Peptide signal

RE : Réticulum endoplasmique

Subtilisine BPN[®] : Bacterial Protease Novo

SPC : Subtilisin protein convertase

TACE : Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme

TGF- β : Transforming growth factor β

Chapitre I :

Revue de la littérature

Introduction

Les protéases, également appelées peptidases, sont des enzymes protéolytiques catalysant l'hydrolyse des liens peptidiques. Elles sont indispensables dans de nombreux processus biologiques fondamentaux tels que l'ovulation, la fertilisation, l'embryogenèse, la régulation du cycle cellulaire, la migration cellulaire, le remodelage tissulaire, la réponse immunitaire, la prolifération ainsi que dans la mort cellulaire. (Barrett et al., 1998; Hooper, 2002). Elles sont classées en deux grands groupes : (1) Les exopeptidases, qui sont des peptidases agissant sur les extrémités NH_2 et COOH terminales des protéines (2) Les endopeptidases, qui agissent sur les liens peptidiques internes de la molécule. À ce jour, 500 à 600 protéases ont été identifiées chez l'humain et la souris ce qui représente environ 2% du génome (MEROPS, 2007; Tyndall et al., 2005). Cette diversification est le fruit d'adaptation aux variations environnementales favorisées par la duplication génique, la recombinaison, le besoin de sélection ainsi que la capacité mutationnelle des protéines ancestrales (Glasner et al., 2006).

Il existe cinq grandes classes de protéases chez les eucaryotes: cystéine, sérine, thréonine, aspartique et métallo protéases. La division en classe repose sur le mécanisme réactionnel de l'acide aminé ou de l'atome métallique engagé dans l'hydrolyse du lien peptidique. Ainsi, les protéases à aspartate et les métallo protéases vont utiliser l'eau comme nucléophile pour attaquer la liaison peptidique du substrat. Dans les autres cas l'attaque nucléophile est assurée par la fonction SH ou OH de l'acide aminé du site actif qui leur confère leur nom, cystéine, sérine ou thréonine (Figure 1) (Puate et al., 2003).

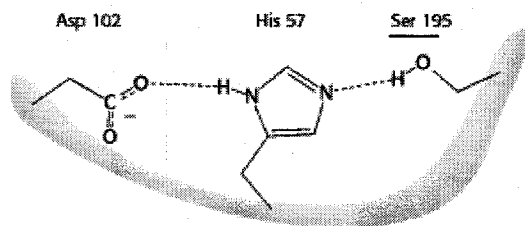


Figure 1 : Triade catalytique d'une sérine protéase. Figure tirée de : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=stryer.figgrp.1180>

Les différentes classes sont divisées en clans sur la base de leur similarité dans le repliement tridimensionnel de leur domaine catalytique. Les clans sont ensuite séparés en familles sur la base de l'appartenance à un ancêtre commun par homologie de la séquence primaire en acides aminés. Les familles sont ultimement subdivisées en sous-familles sur la base des processus physiologiques dans lesquels les protéases sont impliquées (MEROPS, 2007; Tyndall et al., 2005). Le groupe des sérines protéases est l'un des groupes les plus diversifiés. En effet, il compte 227 membres sur 628 chez la souris et 176 sur 553 chez l'humain, soit 41% et 31% de l'ensemble des protéases, respectivement, voir Tableau I (Puente et al., 2003).

Tableau I : Répartition des gènes des cinq classes de protéases (adapté de Puente et al., 2003).

<i>Espèce</i>	<i>Nombre total des protéases</i>	<i>Nombre par classe catalytique</i>				
		Aspartate	Cystéine	Métallo	Sérine	Thréonine
Human	553	21	143	186	176	27
Souris	628	27	153	197	227	24
Orthologues	514	21	127	176	166	24
Spécifiques à l'humain	35	0	15	8	9	3
Spécifique à la souris	85	5	25	12	43	0

Les subtilases représentent une des grandes familles des sérines protéases et peuvent être divisées en plusieurs sous-familles : [1] sous-famille des subtilisines (vraies subtilisines, subtilisines alcalines et intracellulaires); [2] sous-familles des thermitases (subtilisines qui fonctionnent sous des conditions extrêmes); [3] protéinases K (subtilisines présentes dans les microorganismes tels que levures et bactéries à gram-négatif); [4] sous-famille des peptidases lantibiotiques (substances antimicrobiennes de

type bactériocines produites par les lactobacilles); [5] sous-familles des pyrolysines (comprend des subtilisines bactériennes, végétales, les tripeptidases ainsi que les thermolysines); [6] kexin (subtilisines des levures ainsi que leur équivalents fonctionnels dans les organismes superieurs dites proprotéines convertases) (Bogacheva, 1999; Siezen and Leunissen, 1997) (Figure2).

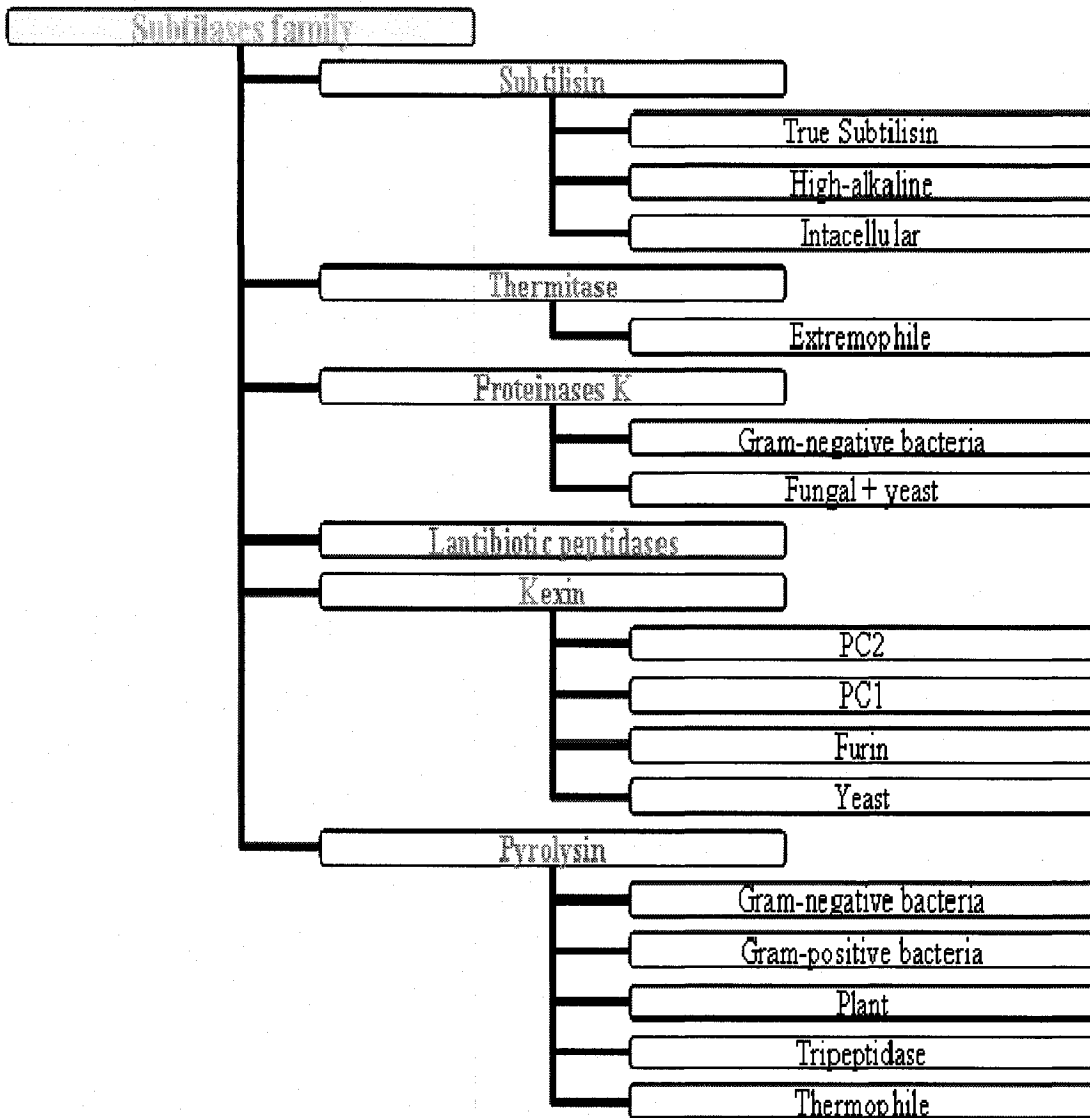


Figure 2 : Arbre phylogénétique de la famille des subtilases (Adapté de Siezen *et al* 1997).

Les proprotéines convertases (PC) sont des endopeptidases calcium dépendantes qui assurent une protéolyse de précurseurs biologiquement inactifs. En effet, afin d'assurer la régulation et la diversification des molécules biologiquement actives, celles-ci sont souvent produites sous une forme inactive de haut poids moléculaire qui en étant clivées à des sites spécifiques génèrent des peptides actifs. Un tel processus s'observe dans le cas, par exemple, des hormones, des neuropeptides, des facteurs de croissance, de certains récepteurs, des molécules d'adhésion, de nombreuses glycoprotéines virales ainsi que des toxines bactériennes. Ainsi, les PC catalysent des réactions de protéolyse hautement sélectives, limitées et spécifiques car elles assurent l'hydrolyse des substrats au niveau de sites contenant un ou plusieurs acides aminés basiques. Chez les mammifères, sept membres de la famille ont été identifiés à ce jour à savoir : La Furine (SPC1), PC2 (SPC2), PC1/3 (SPC3), PC4 (SPC4), PC5/6 (SPC5), PACE4, PC7.

1. Historique des convertases

L'étude des protéines convertases a commencé avec la découverte vers la fin des années 70 de la mutation dans le gène *Kex2* de la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui conduisait à la perte du caractère toxique chez les souches mutées. En effet, la toxicité chez la levure est associée à la capacité de sécréter une toxine dite 'tueuse' (Killer toxin) qui est néfaste pour les souches qui en sont dépourvues. La présence du gène de la toxine Killer, non seulement, rend les levures toxiques mais, en plus, les protège contre la toxicité émanant d'autres souches. Les souches mutantes pour *Kex2* sécrètent de la toxine Killer inactive mais sont toujours résistantes à la toxicité (Wickner, 1976). Par ailleurs, en 1984, Julius et ses collègues ont montré que les souches déficientes en *Kex2* ne pouvaient pas se reproduire de façon sexuée. En effet, elles ne possèdent pas de facteur de conjugaison alpha (alpha-mating factor) actif, du à une absence de maturation du précurseur de ce dernier à des sites d'acides aminés basiques (Julius et al., 1984).

Peu de temps après, il a été démontré que la Kexine était une sérine protéase, calcium dépendante, de la famille des subtilisines (Mizuno et al., 1988) et qu'elle était capable de cliver *in vitro* la pro-albumine ainsi que la pro-opiomélanocortine (POMC), des

précurseurs hormonaux de mammifères (Bathurst et al., 1987; Thomas et al., 1988). Suite à ces découvertes, des études d'homologie de séquences ont permis d'identifier l'homologue mammalien de *Kex2* : le gène de la Furine (*fur*). Il doit son nom (*fur*) à *c-fes/fps upstream region* à cause de sa proximité avec le proto-oncogène *c-fes/fsp*. La Furine a été considérée comme étant un récepteur pendant quelques années du fait de la présence dans sa structure d'un domaine transmembranaire ainsi que d'une région riche en cystéines (Roebroek et al., 1986; Van De Ven et al., 1990). Les membres de la famille des mamifères ont été identifiés peu de temps après.

Leur découverte a permis de répondre à de nombreuses questions restées en suspens pendant plus de deux décennies. En effet, antérieurement aux études chez la levure, deux groupes travaillant sur les mammifères ont démontré que les peptides hormonaux tels que l'insuline et l'hormone gammalipotrope (γ -LPH) étaient issus de prohormones, précurseurs de haut poids moléculaire clivés à des sites d'acides aminés basiques (Steiner et al., 1967; Chretien and Li, 1967). Cependant, les enzymes responsables de ces clivages restaient introuvables. L'identification des convertases a permis de résoudre ce mystère car les deux enzymes impliquées n'étaient nulles autres que PC1/3 et PC2 (Davidson et al., 1988). Ces deux enzymes sont spécifiques des tissus endocriniens et neuroendocriniens. Leur action coordonnée assure la protéolyse de la pro-insuline permettant l'excision du peptide C, dont le rôle est d'assurer le repliement tridimensionnel de la molécule (Figure 3); mais également de la POMC, précurseur de nombreux peptides hormonaux du système nerveux central (Figure 4). Cette thèse est consacrée à l'étude la PC1/3 et ne comportera qu'un survol des autres convertases.

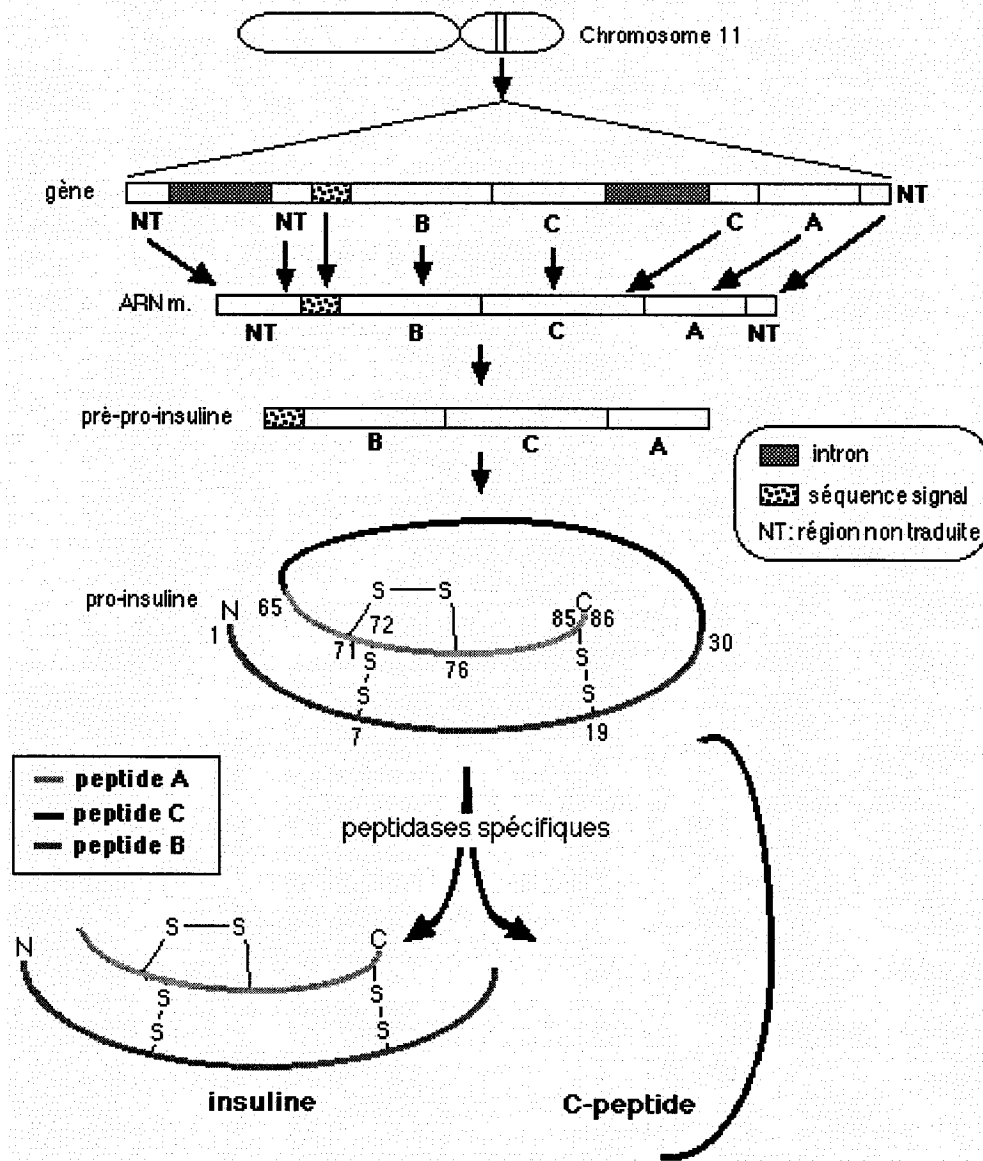


Figure 3 : Synthèse et maturation de l'insuline dans les cellules B des îlots de Langerhans du pancréas humain. La PC1/3 coupe préférentiellement le lien entre le peptide A et C alors que la PC2 préfère couper le lien entre le peptide B et C. (<http://perso.orange.fr/sciences-et-enseignement/Pages/insuline.html>)

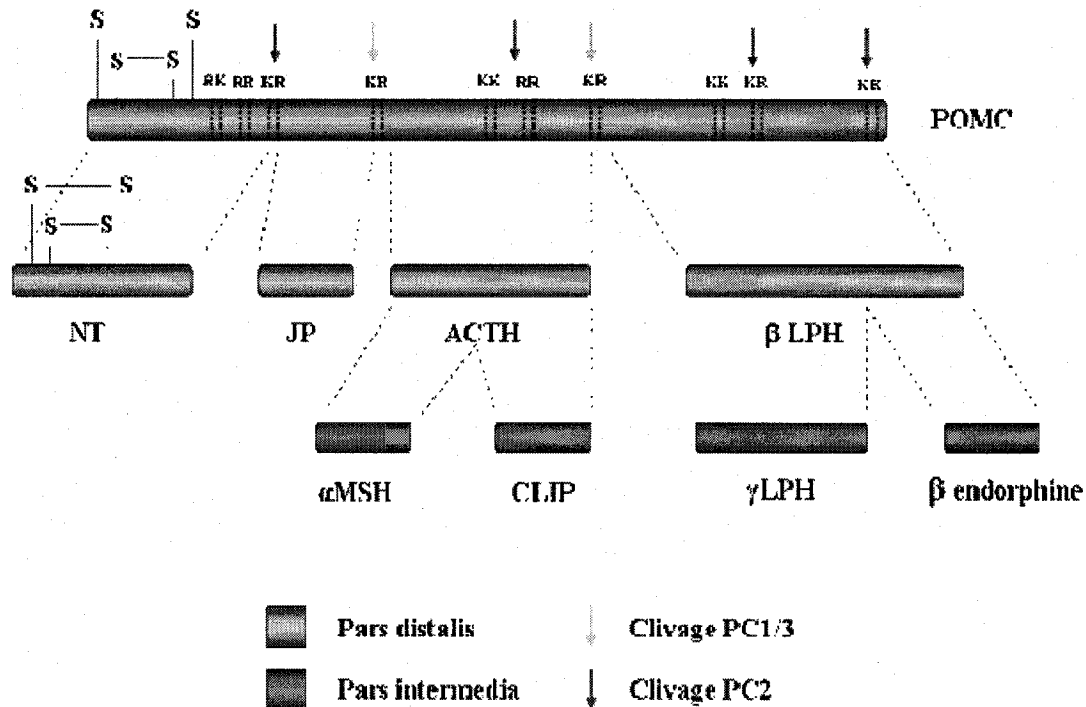


Figure 4 : Maturation de la POMC par PC1/3 et PC2 au niveau de l'hypophyse. NT : peptide N-terminal; JP : peptide de jonction; ACTH : corticotropine; β LPH : hormone betalipotrope; αMSH : hormone de stimulation mélanocytaire; CLIP : Corticotropin-Like Intermediate Lobe Peptide; γ LPH : hormone gammalipotrope.

2. Maturation des précurseurs protéiques

La maturation des précurseurs protéiques fait partie des processus de modification post-traductionnelle. Les modifications post-traductionnelles peuvent être de deux types: (i) réversible, lorsqu'il s'agit de l'addition covalente d'un ou de plusieurs groupements chimiques au niveau de sites particuliers ou (ii) non réversible, lorsqu'il s'agit, par exemple, de protéolyse. Les modifications post-traductionnelles peuvent avoir plusieurs buts. D'une part, elles permettent la diversification du protéome, ensemble des protéines d'un organisme. D'autre part, ces modifications vont permettre d'accroître ou de changer la spécificité des protéines en question. Dans le cas ultime, elles peuvent conduire à

l'activation, l'inactivation, l'augmentation de la demi-vie ou encore à la dégradation des protéines assurant ainsi une fonction de régulation (Walsh, 2006).

2.1. Modification post-traductionnelle impliquant l'addition d'un groupement

Tel que cité plus haut les modifications post-traductionnelles impliquant l'addition de groupements tels que l'acétylation, la phosphorylation, la glycosylation ou la sulfatation peuvent changer drastiquement la spécificité ainsi que la fonction d'une protéine. Les acides aminés présentant des sites sujets à des modifications post-traductionnelles sont nombreux. Ainsi, pour fin d'illustrations, seuls quelques exemples touchant le système hormonal seront discutés.

L'acétylation, qui se traduit par l'ajout d'un court groupement ($\text{CH}_3\text{-CO-}$), par une acétyltransférase, au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine, peut s'avérer indispensable dans le cas de la POMC. En effet, l'hydrolyse de la POMC par les PC PC1/3 et PC2 conduit à la génération de neuropeptides actifs de deux catégories différentes, les endorphines et les mélanocortines (Figure 4). Ces deux groupes de peptides vont avoir des effets antagonistes, les endorphines, par exemple, stimule la prise alimentaire alors que les mélanocortines l'inhibe. Il a été montré que l'acétylation des différents peptides issus de la POMC se produit au niveau des granules de sécrétion et conduit à l'accentuation ou au contraire à la diminution de l'effet des peptides acétylés. Ce phénomène permet ainsi de basculer de l'effet mélanotrope à un effet endorphotrope (Wilkinson, 2006). De plus, les endorphines se fixent, normalement, sur les récepteurs opioïdes pour médier un effet analgésique. Des expériences ont montré que la forme acétylée de la β -endorphine perd l'affinité pour les récepteurs opioïdes qui n'a donc plus de fonction analgésique (Akil et al., 1981). De la même manière, il a été montré que les formes acétylée et désacétylée de l' α MSH ont des potentiels différents. En effet, l'injection de la forme acétylée de l' α MSH mais pas de la désacétylée à des rats conduit à une diminution drastique de la prise alimentaire et du gain de poids (Guo et al., 2004).

La sulfatation, qui se traduit par l'ajout d'un groupement sulfuryl ($-\text{SO}_3^-$) au niveau de résidus tyrosines par une sulfuryltransférase, est une modification réversible. Elle s'effectue au niveau du réseau trans-golgien et permet d'augmenter la charge négative de la protéine. La sulfatation est très importante dans le cas de la gastrine, par exemple. La maturation de la pro-gastrine conduit à la génération de plusieurs peptides actifs de différentes tailles (gastrine 52, 34, 17, 14 et 6, les chiffres indiquent la longueur des peptides), qui sont impliqués dans la stimulation de la sécrétion de l'acide gastrique. La sulfatation semble avoir un effet que sur les peptides de petite taille. En effet, la gastrine 6 peut se trouver sous deux formes : sulfatée et non sulfatée. Il a été montré que la forme sulfatée de la gastrine 6 résiste mieux à l'élimination métabolique, ce qui lui permet d'avoir une action prolongée (Palnaes et al., 2000).

La phosphorylation est un processus réversible qui correspond à l'ajout d'un groupement phosphate ($-\text{PO}_3^-$) sur une sérine, une thréonine ou une tyrosine. Il a été montré, récemment, que la phosphorylation est très importante lors de la maturation de la protéine du précurseur amyloïdogénique (APP). En effet, l'APP est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que le transport axonal, la régulation transcriptionnelle et la croissance cellulaire. La maturation du précurseur implique une glycosylation ainsi qu'un clivage protéolytique assuré par des enzymes dites α , β et γ secrétases. La fonction de cargo axonal est assurée par le précurseur et non les formes maturées de l'APP. Ainsi, afin d'éviter la maturation de toutes les molécules d'APP produites, une portion du précurseur est phosphorylée. La phosphorylation le protège contre le clivage protéolytique et lui permet de mener sa fonction (Collin et al., 2005).

La glycosylation consiste en l'ajout de façon covalente d'une chaîne saccharidique. Elle peut s'effectuer au niveau du réticulum endoplasmique sur l'azote d'une asparagine (N-glycosylation) ou encore dans le complexe de *Golgi* sur la fonction hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine (O-glycosylation). La glycosylation affecte grandement les propriétés d'une protéine. En effet, l'acquisition de carbohydrates rend les protéines plus hydrophiles, affecte leur structure secondaire et peut favoriser leur repliement. La présence de sucres permet de stabiliser et d'accroître ainsi la demi-vie de la protéine mais

également de diriger la protéine vers sa destination cellulaire finale (Walsh, 2006; Walsh and Jefferis, 2006). L'activité des hormones gonadotropes, tel que l'hormone folliculostimulante (FSH) ou encore l'hormone lutéinisante (LH), est strictement dépendante de la glycosylation. Ces deux hormones doivent être N- et O-glycosylées pour achever leur repliement final, leur assemblage en sous-unités, leur sécrétion, leur activation et finalement leur élimination métabolique après avoir médier leur action (Ulloa-Aguirre et al., 2001).

2.2. Modification post-traductionnelle impliquant l'hydrolyse de liens peptidiques

L'hydrolyse des liens peptidiques est un processus irréversible qui peut avoir plusieurs conséquences. D'une part, la protéolyse peut s'effectuer dans un but biosynthétique afin de générer des peptides actifs, tel que décrit pour l'insuline et la POMC plus haut. D'autre part, la protéolyse peut avoir un but de dégradation où les protéines sont clivées au niveau de plusieurs sites afin de générer des petits peptides inactifs. Ce phénomène s'applique aux enzymes digestives telles que la trypsine ou encore la chymotrypsine mais également aux enzymes lysosomales et protéasomales, impliquées dans la séquestration et la dégradation de protéines (Walsh, 2006). Par ailleurs, la protéolyse peut représenter une étape importante dans certains processus physiologiques tels que la réaction acrosomale, qui permet la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule (Ye and Fortini, 2000), ou encore dans le processus de défense immunitaire, où la cascade protéolytique menée par les caspases, protéines impliquées dans la dégradation du contenu cellulaire, peut conduire à l'apoptose éliminant ainsi les cellules infectées (Lamkanfi et al., 2007). Les paragraphes qui suivent se consacrent à la voie biosynthétique de la protéolyse menée par les prohormones convertases.

2.2.1. Réaction de clivage des convertases

Le clivage de précurseurs par les convertases est un processus très spécifique car il se produit dans la voie de sécrétion et ceci au niveau de l'extrémité C-terminale d'une

arginine ou d'une lysine. Ces résidus occupent donc la position P1 tel que défini dans la nomenclature de Schechter et Berger (1967) (Schechter and Berger, 1967b), ils représentent le résidu se trouvant en N-terminal de la liaison peptidique à hydrolyser. Les résidus en amont sont définis comme P2, P3, P4 etc. ; les résidus en aval de la position P1 sont définis comme P1', P2', P3' etc (Figure 5). Les études de surexpression des différentes convertases ainsi que la mutagenèse dirigée ont permis d'établir une séquence de clivage typique K/R-X_n-K/R↓ où ↓ correspond au site d'hydrolyse après le résidu P1, X peut être n'importe quel acide aminé et n=0, 2, 4 ou 6. Par conséquent, les convertases exhibent une préférence pour des résidus basiques occupant les positions P2, P4 et P6 (Bergeron et al., 2000).

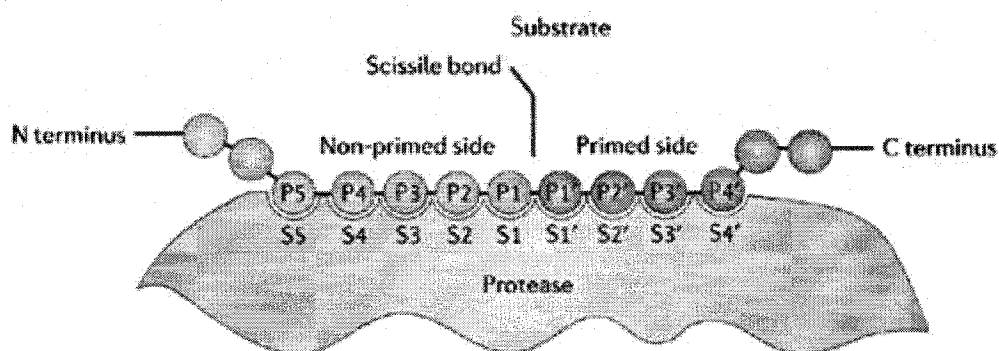


Figure 5: Schéma représentatif des sous-sites impliqués dans l'interaction entre une enzyme et son substrat (Modifié de Turk 2006).

L'analyse des précurseurs possédant des sites de clivage potentiels pour les convertases a permis de définir au moins quatre types de motifs de clivage, voir Tableau II. Le type I correspond aux substrats clivés à un site Arg-X-(Lys/Arg)-Arg↓-X-X et regroupe de nombreux facteurs de croissance, des récepteurs ainsi que des toxines bactériennes et des glycoprotéines virales. Le type II correspond au clivage suivant un binôme d'acides aminés basiques (Arg/Lys)-(Lys/Arg) ↓ qui peut être précédé par des acides aminés basiques en P4 et/ou P6. Ceci est souvent le cas des précurseurs hormonaux. Le type III représente les précurseurs clivés à des sites contenant un seul acide aminé basique (Arg) ↓. C'est souvent le cas des peptides hormonaux tels que pro-dynorphine et la pro-somatostatine ou encore des facteurs de croissance de type insuline

(IGF I et II). Finalement, le type IV inclut les précurseurs possédant un ou deux résidus basiques en P1' et/ou P2' ce groupe inclut certaines pro-hormones telles que le pro-glucagon et le pro-polypeptide pancréatique (pro-PP) (Seidah and Chretien, 1999).

Tableau II : Classification de quelques précurseurs protéiques en fonction du motif de clivage reconnu par les prohormones convertases (adapté de Seidah et Chrétien 1999).

Précurseur

Motif de clivage

Type I

P6 P5 P4 P3 P2 P1 ↓ P1' P2'
X X R X K/R R ↓ X X

(h) Pro-βNGF (Nerve Growth Factor)	Thr His Arg Ser Lys Arg ↓ Ser Ser
(h) Pro-BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor)	Ser Met Arg Val Arg Arg ↓ His Ser
(h) Pro-NT-3 (Neurotrophine 3)	Thr Ser Arg Arg Lys Arg ↓ Tyr Ala
(h) Pro-TGF β (Transforming Growth Factor beta)	Ser Ser Arg His Lys Arg ↓ Ala Leu
(h) Précurseur du récepteur à insuline	Pro Ser Arg Lys Arg Arg ↓ Ser Leu
Antigène protecteur (PA) de <i>B. Anthracis</i>	Asn Ser Arg Lys Lys Arg ↓ Ser Thr
Toxine diphtérique (DT)	Gly Asn Arg Val Arg Arg ↓ Ser Val
HIV gp 160	Val Gln Arg Glu Lys Arg ↓ Ala Ala

Type II

P6 P5 P4 P3 P2 P1 ↓ P1' P2'
X X X X K/R K/R ↓ X X

(m) POMC (JP/ ACTH)	Pro Arg Glu Gly Lys Arg ↓ Ser Thr
(ACTH/ β LPH)	Pro Leu Glu Phe Lys Arg ↓ Glu Leu
(αMSH/ CLIP)	Pro Val Gly Lys Lys Arg ↓ Arg Pro
(γLPH/ β End)	Pro Pro Lys Asp Lys Arg ↓ Tyr Gly
(h) Pro-Insuline (peptide B/ peptide C)	Thr Pro Lys Thr Arg Arg ↓ Glu Ala
(peptide C/ peptide A)	Gly Ser Leu Gln Lys Arg ↓ Gly Ile
(h) Pro-Enképhaline	Gly Gly Phe Met Lys Lys ↓ Asp Ala
(r) Pro-Dynorphine	Arg Lys Gln Ala Lys Arg ↓ Tyr Gly

Type III

	P8 P7 P6 P5 P4 P3 P2 P1 ↓ P1' P2'
	(B) X (B) X (B) X X R ↓ X X
(r) Pro-Dynorphine (C-peptide)	Arg Gln Phe Lys Val Val Thr Arg ↓ Ser Gln
(h) Pro-ANF (Peptide auriculaire natriurétique)	Arg Ala Leu Leu Thr Ala Pro Arg ↓ Ser Leu
(h) Pro-Somatostatine	Glu Met Arg Leu Glu Leu Gln Arg ↓ Ser Ala
(m) Pro-IGF-I (Insulin-Like Growth Factor I)	Leu Lys Pro Thr Lys Ala Ala Arg ↓ Ser Ile
(h) Pro-IGF-II (Insulin-Like Growth Factor II)	Ala Thr Pro Ala Lys Ser Glu Arg ↓ Asp Val

Type IV

	P8 P7 P6 P5 P4 P3 P2 P1 ↓ P1' P2'
	(B) X (B) X (B) X (B) K/R ↓ X K/R
(r) Pro-Glucagon	Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg ↓ Asn Arg
(r) Pro-Gastrine	Phe Ile Ala Asp Leu Ser Lys Lys ↓ Gln Arg
(h) Pro polypeptide pancréatique	Tyr Arg Pro Arg Tyr Gly Lys Arg ↓ His Lys
(r) Pro-Mullerian Inhibiting Substance	Glu Gly Arg Gly Arg Ala Gly Arg ↓ Ser Lys

2.2.1.1. Action des carboxypeptidases

Une fois le clivage effectué le substrat est pris en charge par d'autres types d'enzymes. Tout d'abord le ou les résidus basiques exposés en C-terminal du peptide clivé vont être enlevés par des carboxypeptidases spécifiques (Figure 6, voie 3). Ce sont des métallocarboxypeptidases qui possèdent une affinité pour les acides aminés basiques (Lys, Arg et His). Dans la voie de sécrétion régulée c'est la carboxypeptidase E ou H (CPE, CPH) qui assure cette fonction. Il a été démontré que celle-ci est acheminée spécifiquement vers les granules où elle complète la maturation des précurseurs endocriniens. Au niveau de la voie constitutive, il s'agit plutôt la carboxypeptidase D (CPD), puisqu'elle colocalise qu'avec les marqueurs golgiens et ne semble pas être présente plus tard dans les granules. La CPD a été découverte grâce à la souris Knockout (KO) de la CPE, chez laquelle malgré l'absence de cette dernière une certaine activité des peptides maturés a été détectée (Fricker et al., 1991; Fricker, 2005; Dong et al., 1999).

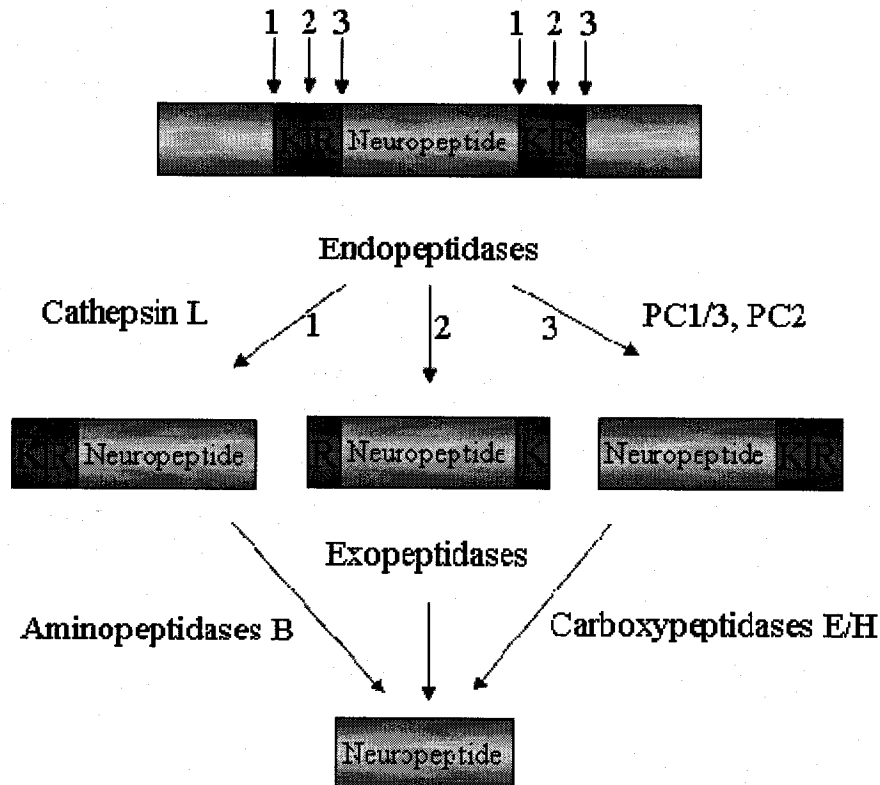


Figure 6: Maturation d'un précurseur inactif au niveau d'acides aminés basiques dans la voie de sécrétion régulée (Adapté de Hwang 2007).

2.2.1.2. Amidation

Suite à l'action des carboxypeptidases les peptides en voie de maturation et possédant une glycine à leur extrémité C-terminale sont amidés par la peptidyl-glycine- α -amidating mono-oxygenase (PAM). La PAM est une protéine multifonctionnelle, localisée dans les granules de sécrétion, qui possède deux activités enzymatiques dans la même molécule. Le domaine N-terminal, ou PHM pour peptidyl-glycine- α -hydroxylating mono-oxygenase, catalyse l'hydroxylation monooxygénique et permet l'oxydation du carbone α de la glycine. Le domaine C-terminal, appelé PAL pour peptidyl-glycine- α -amidating lyase, possède une activité lyase qui va permettre de cliver l'intermédiaire hydroxylé pour libérer le peptide α -amidé et le glyoxylate (Figure 7) (Ouafik et al., 1992; Kolhekar

et al., 1997). L'amidation de la glycine en C-terminal est cruciale pour certains peptides neuroendocriniens tels que l'ocytocine, la vasopressine, la gastrine calcitonine ou encore la cholécystokinine. En l'absence du groupement amide, ces neuropeptides vont demeurer biologiquement inactifs (Eipper et al., 1993).

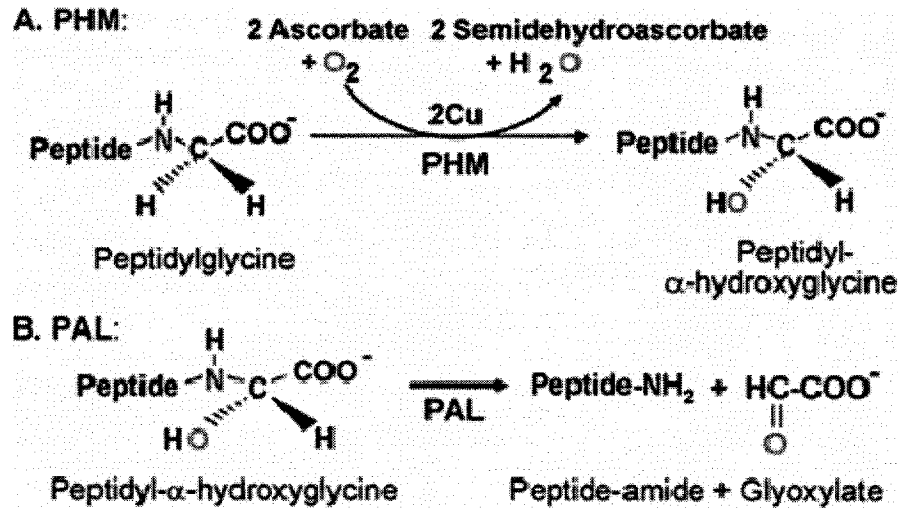


Figure 7: Schéma représentatif de la réaction d'amidation par la PAM (Modifié de De 2006) (De et al., 2006).

2.2.2. Autres voies de clivage protéolytique

Les convertases ne sont pas les seules enzymes protéolytiques impliquées dans la biosynthèse de peptides actifs. En effet, la génération de neuropeptides biologiquement actifs à partir de précurseurs peut être également attribuée à certaines cystéines protéases. Des études sur les souris déficientes en cathepsine L ont montré que ces animaux avaient un taux réduit de Met-Enképhaline. L'enképhaline fait partie des endorphines et agit sur les récepteurs opiacés pour mener un effet analgésique. Le précurseur de l'enképhaline dit pro-Enképhaline génère par protéolyse la méthionine (Met) Enképhaline, la leucine (Leu) Enképhaline, la Met-Enképhaline arginine-glycine-leucine et la Met-Enképhaline arginine-phénylalanine. Il a été montré, par la suite, que la cathépsine L, une cystéine protéase, peut conduire à la génération de la Met-enképhaline à partir de la pro-enképhaline par clivage du précurseur au niveau de l'extrémité N-terminale de résidus

basiques. Le clivage par la cathepsine L génère des peptides avec une extension en N-terminal d'un résidu Lys ou Arg qui est ensuite enlevé par l'action de l'aminopeptidase B (Figure 6, voie 1) (Yasothornsrikul et al., 2003; Hook et al., 2004; Hwang et al., 2007). Ces découvertes ouvrent la porte à la possibilité de générer des neuropeptides actifs de différentes manières qui peuvent être tissu ou organelle spécifiques. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour déterminer de quelle façon les cellules favorisent une voie ou l'autre (Figure 6), si les deux coexistent en même temps et si d'autres enzymes pourraient être également impliquées dans ce processus (Figure 6, voie 2).

Par ailleurs, il est à noter que certains précurseurs peuvent subir des clivages additionnels à des sites non basiques. Ainsi, certaines formes d' α MSH acétylées possèdent un ou deux résidus N-terminal en moins par rapport au peptide original. De plus, lors de la maturation de la chromogranine B, un neuropeptide présent au niveau des vésicules de sécrétion, ce précurseur subit un clivage entre deux résidus tryptophane adjacents. D'autres précurseurs vont subir des clivages à des résidus aromatiques, aliphatiques ou encore acides (Fricker, 2005). Néanmoins, des découvertes récentes suggèrent que le clivage de peptides au niveau intracellulaire serait assuré par l'enzyme de conversion de l'endothéline 2 ou encore les carboxypeptidases A5 et A6 qui sont présentes dans les granules de sécrétion et clivent leur substrats au niveau de résidus aliphatiques ou aromatiques (Wei et al., 2002; Fontenele-Neto et al., 2005). Pour les peptides ayant besoin d'être clivés à l'extérieur de la cellule, la protéolyse serait assurée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou encore des aminopeptidases extracellulaires. Les clivages extracellulaires permettent souvent la modification de l'affinité d'un peptide vis-à-vis de son récepteur (Fricker, 2005).

3. Cheminement des protéines dans la voie sécrétoire

Les protéines destinées à la sécrétion sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (R.E), où elles sont repliées et glycosylées à certains sites. Par la suite, elles sont transportées du R.E vers le complexe de *Golgi* par un réseau vésiculaire, où

elles vont subir d'autres modifications post-traductionnelles (voir plus haut). Les glycoprotéines ainsi formées quittent l'appareil de *Golgi* par le réseau trans-golgien. Un grand nombre de protéines solubles seront alors sécrétées par la voie de sécrétion dite constitutive, où l'acheminement des protéines vers la membrane se fait de façon continue. D'autres protéines vont être détournées vers des vésicules de sécrétion où elles seront concentrées et stockées jusqu'à ce qu'un signal extracellulaire stimule leur sécrétion, cette voie est dite régulée ou contrôlée (Figure 8).

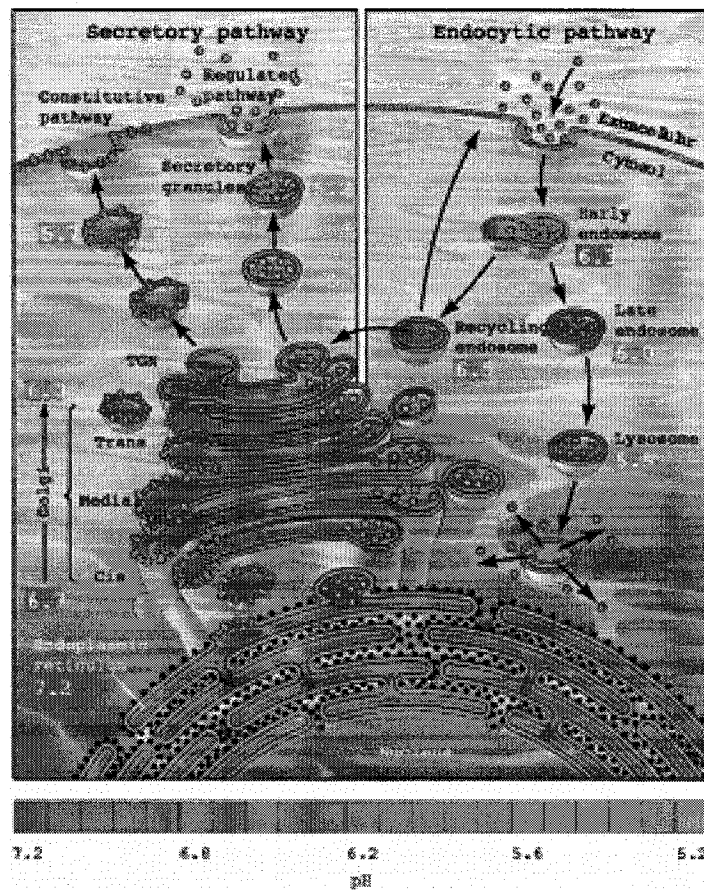


Figure 8 : Voies de sécrétion régulée et constitutive (Modifié de Paroutis 2004). Il est à noter que la division nette des organelles est montrée ici pour des fins purement didactiques. En réalité, les organelles d'une cellule ne sont pas aussi clairement séparées mais forment plutôt un continuum d'invaginations partant de la membrane plasmique (Desjardins, 2003).

3.1. Propriétés physico-chimiques des voies de sécrétion

Le transit des protéines vers les voies de sécrétion est très finement contrôlé. Chaque protéine peut présenter des signaux structuraux (séquence en acides aminés) de reconnaissance qui lui permettront d'atteindre sa destination finale qui peut être le noyau, le R.E, les mitochondries, les lysosomes ou encore les granules de sécrétion (Storrie, 2005). En plus de la présence de signaux structuraux, le cheminement et le ciblage des protéines dans la voie de sécrétion dépend de la modulation de l'interaction entre ces signaux spécifiques et leurs récepteurs par modification de leur protonation. Ainsi, les variations de pH entre les différents compartiments cellulaires (Figure 8) sont cruciales pour le ciblage, la progression et la maturation des protéines dans les voies de sécrétion (Paroutis et al., 2004). Une altération forcée de pH au niveau des voies de sécrétion conduit à une absence d'acquisition de modifications post-traductionnelles, un dérèglement dans le tri ainsi que dans le ciblage des protéines et ultimement à une désorganisation des organelles (Puri et al., 2002).

3.2. Ségrégation des protéines dans la voie de sécrétion régulée

Le processus qui permet la ségrégation des protéines sécrétées entre les voies constitutive et régulée reste très controversé. En effet, la ségrégation des protéines peut différer d'un type cellulaire à un autre et peut même s'effectuer de plusieurs manières dans une même cellule. À ce jour, les différentes études conduites dans ce domaine ont mené à l'émergence de trois mécanismes de ségrégation (Kuiper and Martens, 2000; Dikeakos and Reudelhuber, 2007) : (i) Ségrégation par attachement ou association à la membrane de la vésicule en formation. Ce type de ciblage se fait grâce à la présence de domaines transmembranaires au niveau de la protéine en question ou d'hélices amphipatiques pouvant s'associer aux composants lipidiques de la membrane des vésicules en bourgeonnement. La PAM, la CPE, la PC1/3 ainsi que la PC2 peuvent emprunter ce genre de mécanisme (Assadi et al., 2004; Bell-Parikh et al., 2001; Blazquez et al., 2001; Dhanvantari et al., 2002; Dikeakos et al., 2007; Jutras et al., 2000). (ii) Ségrégation par interaction avec une protéine possédant un signal d'attachement ou

d'association aux membranes. En effet, il a été montré que la POMC, par exemple, s'associe à la CPE via une boucle N-terminale hydrophobe. Cette interaction lui permet d'être retenue dans les granules (Loh et al., 2002). (iii) Ségrégation par agrégation ou rétention, où les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée s'agrègent pour former un centre dense et être, ainsi, retenue dans la vésicule. Au fur et mesure que le centre dense se forme, les protéines destinées à la voie constitutive bourgeonnent dans des petites vésicules vers la membrane plasmique. Ce type de ciblage s'opère dans le cas de la Chromogranine A, principal constituant des vésicules de sécrétion des cellules endocriniennes et neuroendocriniennes dont la fonction n'est pas encore clairement définie (Jain et al., 2002).

4. Distribution tissulaire et localisation intracellulaire des convertases

La distribution tissulaire des convertases a été tout d'abord investiguée par hybridation *in situ*. Cette technique a permis de dresser un diagramme transcriptionnel des différentes convertases qui ne correspondait pas forcément avec le réel portrait d'expression protéique. Plus tard, des expériences d'immuno-histochimie ainsi que d'immunofluorescence ont permis de dresser le profil d'expression des convertases (Day et al., 1992; Seidah et al., 1992; Marcinkiewicz et al., 1993; Marcinkiewicz et al., 1994; Johnson et al., 1994; Keller et al., 1995; Seidah et al., 1996; Farhadi et al., 1997; Rancourt and Rancourt, 1997; Dong et al., 1997). Ainsi, la Furine, la PACE4 ainsi que la PC7 sont distribuées de façon ubiquitaire dans l'organisme. Les autres convertases sont exprimées de façon plus spécifique. La PC4, par exemple, est présente seulement au niveau des cellules germinales. Il en est de même pour ce qui est de la localisation intracellulaire. Certaines convertases vont être retrouvées au niveau d'organelles spécifiques telles que PC1/3, PC2 et PC5A, présentes dans les granules de sécrétion, alors que d'autres vont circuler entre différents compartiments et la surface cellulaire tel qu'il a été montré pour la Furine. Le Tableau III résume la répartition des différentes convertases dans l'organisme ainsi que leur localisation cellulaire (Taylor et al., 2003).

Tableau III : Distribution tissulaire et localisation intracellulaire des convertases

<i>Convertase</i>	<i>Distribution tissulaire</i>	<i>Localisation cellulaire</i>
Furine	Ubiquitaire	Réseau Golgien, système endosomal, surface cellulaire.
PC1/3	Tissus endocriniens / neuroendocriniens	Voie de sécrétion régulée. Granules de sécrétion.
PC2	Tissus endocriniens / neuroendocriniens	Voie de sécrétion régulée. Granules de sécrétion.
PACE4	Restreinte	Réseau Golgien, surface cellulaire
PC4	Cellules germinales	Inconnue
PC5A	Restreinte	Réseau Golgien, granules de sécrétion
PC5B	Restreinte	Réseau Golgien, système endosomal, surface cellulaire.
PC7	Ubiquitaire	Réseau Golgien, système endosomal, surface cellulaire.

5. Mutagenèse et fonction biologique des convertases

Comme la génération de souris modifiées génétiquement pour les gènes des convertases est un phénomène assez récent, l'attribution des fonctions biologiques ainsi que l'identification des substrats clivés par ces dernières ont été menées *in vitro* lors d'expériences de surexpression. Malheureusement, ce genre d'expériences n'est pas toujours un reflet de la réalité. En effet, en raison de la similarité du site de clivage au niveau des différents substrats, ces derniers peuvent être clivés de façon non sélective par plusieurs convertases, même si dans l'organisme le substrat en question et la convertase ne colocalisent pas forcément dans les mêmes cellules (Dong et al., 1997; Jackson et al., 2003). De plus, de nombreuses expériences de clivage ont été menées sur des enzymes provenant souvent de préparations de pureté variable ce qui peut facilement biaiser les

résultats comme il a été montré, récemment, pour la sérine protéase S1P (Human site 1 protease), impliquée dans le métabolisme du cholestérol (Bodvard et al., 2007).

Néanmoins, l'avenue des technologies de répression génique, des souris K.O ainsi que la découverte d'individus et de cellules naturellement déficientes pour certaines convertases (mutants humains pour la PC1/3, décrit plus bas dans cette section, et les cellules déficientes pour la Furine telles que les cellules LoVo ou RPE40 (Takahashi et al., 1995; Spence et al., 1995) ont permis d'affiner les spécificités en terme de substrat pour de nombreuses convertases. Le Tableau IV résume les phénotypes des souris K.O pour les différents membres de la famille. Il apparaît clairement, à partir des informations rapportées dans ce tableau, que la suppression de certaines convertases induit un phénotype plus dramatique que certaines autres.

Ainsi l'absence de convertases telles que la Furine, PC1/3 (Souris A), PACE4 et PC5 va conduire à la létalité embryonnaire (Tableau IV), ce qui souligne l'importance de ces convertases dans le développement. Ces résultats ont permis, par ailleurs, de confirmer la spécificité de ces convertases vis-à-vis de certains substrats. Ainsi, l'absence de rotation axiale chez les embryons (*fur*^{-/-}) (Tableau IV) reflète une carence dans la maturation de certains membres de la famille des facteurs de croissance transformant β (TGF- β) tels que Nodal et Lefty-2, directement impliqués dans la rotation axiale embryonnaire (Constam and Robertson, 2000b) mais également de TGF- β 1 ainsi que les protéines morphogéniques osseuses (BMP), impliquées dans le développement et la spécification des lignées cardiaques. De plus, il a été montré que la Furine clive le récepteur Notch afin qu'il puisse médier son action. Notch est impliqué dans la stimulation de la communication inter-cellulaire et la différenciation cellulaire lors du développement, l'absence de la Furine va donc avoir un effet néfaste sur ces deux processus (Thomas, 2002).

Par ailleurs, la survie de certaines souris K.O (Tableau IV) suggère la possibilité de redondance de clivage entre les différents membres de la famille, qui peut compenser pour l'absence d'une convertase donnée. En effet, de nombreuses études ont souligné la

possibilité d'une redondance de clivage entre PC1/3, PC2 et PC5 pour un certain nombre de précurseurs tels que de la sermoréline (GHRH), la neurotensine, la cholécystokinine et la CART (cocaine amphetamine regulated transcript), qui donne lieu à des peptides fortement anorexogènes (Cain et al., 2001; Villeneuve et al., 2000a; Stein et al., 2006a; Dey et al., 2004; Dey et al., 2003; Eggelkraut-Gottanka and Beck-Sickinger, 2004a; Stein et al., 2006b). Bien que cette redondance est possible, elle va être partielle et spécifique à certains sites, tel qu'il a été montré récemment pour la pro-CART (Figure 9)(Stein et al., 2006a; Stein et al., 2006b). La redondance de clivage entre les différentes convertases pourrait expliquer la survie des K.O de PC1/3 et PC2.

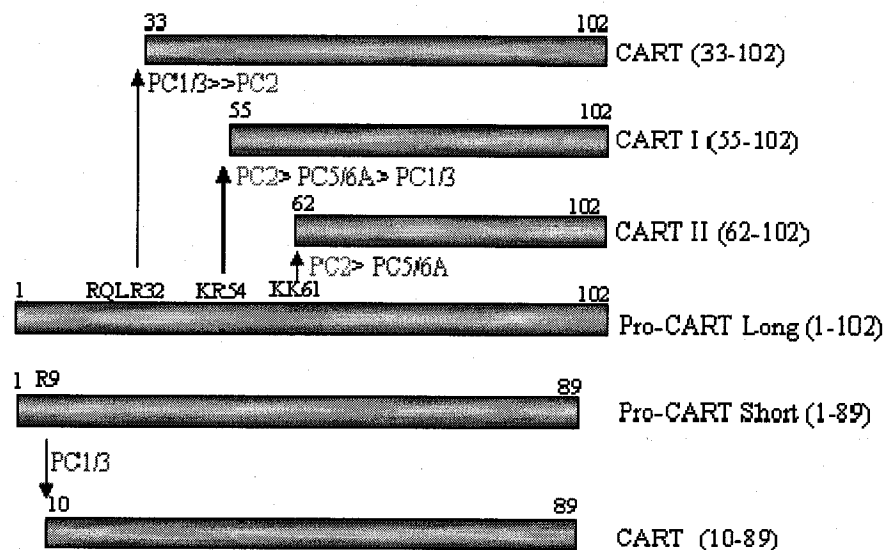


Figure 9 : Schéma représentant la redondance de clivage avec ordre de préférence entre PC1/3, PC2, et PC5A (Modifié de Stein 2006). La pro-CART existe sous deux formes, longue et courte, différant par l'extension d'acides aminés en C-terminal. Ces précurseurs peuvent être clivés à différents sites d'acides aminés basiques afin de générer des peptides actifs de tailles et de fonctions différentes.

Finalement, il est important de mentionner que pour une même convertase l'inactivation du gène peut conduire à des phénotypes différents, ce qui peut être expliqué par la stratégie employée lors de la génération des souris K.O. Le meilleur exemple de

cette discordance au niveau des phénotypes est reflété par les différents modèles de déficience en PC1/3. En effet, dans le cas des souris A et B, par exemple, (Tableau IV) le gène a été inactivé de deux façons différentes. Le groupe de Seidah a supprimé une région génomique de plus de 15kb comprenant le domaine catalytique, ce qui a eu pour conséquence que les souris obtenues n'étaient pas viables et mourraient *in utero*. Par contre, Zhou 2002 et ses collègues (Zhu et al., 2002b) ont supprimé une région inférieure à 1kb comprenant le signal peptide et des éléments du promoteur en amont. Les souris générées par ce groupe sont parfaitement viables bien que présentant de nombreuses anomalies (voir Tableau IV).

Tableau IV : Phénotypes des souris K.O pour les différentes convertases

<i>Convertase</i>	<i>Mutation</i>	<i>Phénotype</i>	<i>Référence</i>
Furine	Troncation par introduction d'un codon stop au niveau de l'exon4.	Mort embryonnaire vers e10.5. Absence de rotation axiale. Carence hémodynamique. Vascularisation anormale.	(Roebroek et al., 1998)
PC1/3Humain A	1 ^{er} allèle : Troncation dans le domaine catalytique. 2eme allèle : Mutation ponctuelle dans le domaine P G593R.	Hypogonadisme hypogonadotrophe. Aménorrhée. Stérilité. Perturbation dans la maturation de précurseurs hormonaux (POMC, proinsuline, proglucagon). Obésité. Diarrhée.	(Jackson et al., 1997; Jackson et al., 2003)
PC1/3Humain B	1 ^{er} allèle : Troncation dans le domaine catalytique. 2eme allèle : Délétion de l'Alanine 213 près de l'His 208 du site actif.	Malformation de l'intestin grêle. Diarrhée. Dérèglement dans la maturation de précurseurs hormonaux. Décès.	(Jackson et al., 2003)
PC1/3Souris A	Délétion des exons 3-7	Létalité embryonnaire.	(Seidah and Chretien, 1999; Villeneuve et al., 2000b)

PC1/3Souris B	Délétion du premier exon et de quelques éléments transcriptionnels.	Nanisme. Mortalité pré et postnatale. Diarrhée. Absence de maturation de nombreux précurseurs hormonaux (proGHRH, POMC, proinsuline, proglucagon)	(Zhu et al., 2002b)
PC1/3Souris C	Mutation ponctuelle dans le domaine catalytique N222D	Obésité. Réduction dans la maturation des précurseurs hormonaux (POMC, proinsuline). Intolérance au glucose. Hyperphagie. Diminution de la fécondité.	(Lloyd et al., 2006)
PC2	Inactivation du domaine catalytique par délétion de l'exon 3.	Hypoglycémie. Hyperproinsulinémie. Léger retard de croissance. Présence de peptides endocriniens défectueux.	(Furuta et al., 1997)
PACE4	Inactivation du domaine catalytique.	Déformation cranio-faciale Létalité embryonnaire vers e 13.5-15.5. Malformations cardiaques.	(Constam and Robertson, 2000a)
PC4	Délétion des exons 3-6	Fertilité réduite.	(Mbikay et al., 1997)
PC5A/B	Inactivation du domaine catalytique par délétion d'un fragment de 4.5kb contenant l'exon 4	Mort embryonnaire vers e4.5-7.5.	(Essalmani et al., 2006)
PC5B	Non décrite	Mort embryonnaire vers e10.5-11.5.	(Taylor et al., 2003)
PC7	Non décrite	Absence d'anomalie. Phénotype normal.	(Taylor et al., 2003)

5.1. Convertases de la voie constitutive

Les convertases de la voie constitutive, la Furine, PC5B, PC7 et PACE4 sont réparties de façon ubiquitaire dans l'organisme. Elles vont et viennent d'un compartiment cellulaire à un autre et leur suppression conduit généralement à la létalité embryonnaire (Tableau IV). La létalité embryonnaire provoquée par la déficience de ces convertases est en accord avec leur implication proposée dans la maturation de récepteurs, de facteurs de croissance, de molécules d'adhésion ainsi que de glycoprotéines de surface, tous transitant par la voie constitutive (Taylor et al., 2003). De plus, comme ces protéases se retrouvent à la surface cellulaire et sont internalisées au niveau des endosomes, elles sont impliquées dans le clivage de nombreuses toxines bactériennes et protéines virales. Ce clivage étant indispensable à l'activation des toxines ainsi qu'à la fusion et à l'internalisation des particules virales (voir plus bas, section 9.1).

Il est à noter que le K.O de PC7 est parfaitement viable et apparemment sans anomalies majeures (Tableau IV), ceci est probablement dû à une redondance de clivage de substrats entre les différentes convertases de la voie constitutive. Il a déjà été montré qu'une redondance entre PC7 et la Furine dans le clivage du précurseur de la glycoprotéine de surface du virus leucémique bovin était possible (Zarkik et al., 1997). Néanmoins, des études biochimiques approfondies seront nécessaires pour déterminer la capacité des convertases constitutives à compenser pour l'absence de PC7 *in vivo*. Étant donné le grand nombre d'études réalisées sur les convertases de la voie constitutive et dans le but d'alléger le texte, les lecteurs sont priés, s'ils le désirent, de consulter les références suivantes, (Bergeron et al., 2000; Taylor et al., 2003; Thomas, 2002; Stawowy and Fleck, 2005; Bassi et al., 2005b), pour de plus amples informations sur ces convertases.

5.2. Convertases de la voie régulée

Les convertases se retrouvant dans les granules de sécrétion requièrent un environnement chimique plus acide. Elles vont assurer la maturation de peptides

hormonaux ainsi que de neuropeptides qui seront sécrétés de la cellule à la suite d'une stimulation.

5.2.1. PC5

Le gène de la PC5 (*pcsk5*) code pour deux isoformes générés par épissage alternatif (Lusson et al., 1993). Les deux diffèrent par la présence ou non d'un domaine transmembranaire permettant le ciblage de la forme PC5B à la surface cellulaire. La forme PC5A, quant à elle, contient un signal de ciblage vers les granules mais peut également se retrouver dans la voie constitutive (Xiang et al., 2000; De Bie, et al., 1996) et est ultimement sécrétée à l'extérieur de la cellule (Nour et al., 2005). Différentes expériences *in vitro* et *ex vivo* sur des souris et des primates ont mis en évidence l'importance de cet enzyme lors de l'implantation, la décidualisation embryonnaire ainsi que dans la croissance neuronale par maturation de la molécule d'adhésion neuronale L1 (Wong et al., 2002; Kalus et al., 2003; Nie et al., 2005; Okada et al., 2005). Bien que les deux formes soient exprimées de façon ubiquitaire dans l'organisme, des études récentes montrent que leur profil d'expression diffère d'un organe à l'autre. La PC5A serait majoritaire dans la plupart des organes excepté les poumons et l'intestin, où la PC5B serait prédominante. Il est donc probable qu'elles aient des fonctions bien distinctes (Essalmani et al., 2006). La létalité des souris déficientes pour PC5 souligne son importance lors du développement mais, malheureusement, ne permet pas de dresser un tableau de substrats spécifiques à cette dernière. Il en est de même pour les autres convertases qui ont été mutées de la même manière, soit par délétion d'un fragment génomique contenant un ou de plusieurs exons. De plus, les deux modèles KO pour PC5 montrent une discordance au niveau du jour embryonnaire auquel l'absence de l'enzyme devient critique (Taylor et al., 2003; Essalmani et al., 2006).

5.2.2. PC2

La PC2 est une convertase du système endocrinien bien unique. Contrairement aux autres membres de la famille, elle contient un Asp au lieu d'une Asn en dehors de la

triade catalytique. De plus, sa maturation ainsi que son fonctionnement nécessite la présence du polypeptide neuroendocrinien 7B2. L'absence de ce dernier va entraver le transport ainsi que l'activation de PC2 (Braks and Martens, 1994). Cependant, une étude a montré que le 7B2 stabilise la PC2 une fois repliée pour faciliter son fonctionnement mais n'intervient pas dans les processus précoces de repliement (Muller et al., 2000). D'après les données disponibles sur les deux protéines, le modèle d'interaction entre les deux se résume comme suit : la PC2 seule est instable et est retenue dans le R.E. Sa liaison à la 7B2 lui permet de transiter vers les granules de sécrétion et l'interaction entre les deux molécules est calcium et pH dépendante. Lorsque le complexe arrive dans le réseau trans-golgien le 7B2 est clivé par la Furine mais reste associée à PC2 dont elle inhibe l'activité. Une fois dans les granules de sécrétion, l'acidité de l'environnement va permettre l'activation de l'enzyme et la dégradation de la 7B2 (Figure 10) (Muller et al., 2000; Mbikay et al., 2001).

La PC2 agit de concert avec son partenaire endocrinien PC1/3 pour générer de nombreux peptides actifs comme, par exemple, à partir de la POMC tel qu'illustré dans la Figure 4. L'inactivation de PC2, tel que mentionné dans le Tableau IV, génère des souris viables comportant certaines anomalies. Ces anomalies touchent la maturation de l'insuline, du glucagon, de la somatostatine, de l'énképhaline, de la neurotensine et de la dynorphine (Berman et al., 2000; Furuta et al., 1997; Furuta et al., 2001; Johanning et al., 1998; Villeneuve et al., 2000a; Winsky-Sommerer et al., 2003). L'analyse détaillée des sites clivés au niveau des précurseurs de ces hormones indiquent que PC1/3, ou une autre enzyme à activité convertase, peut compenser l'absence de certains clivages effectués par PC2 mais ne peut la remplacer complètement. Par exemple, la pro-somatostatine est maturée en peptide SS-14 chez les souris contrôle. Les souris PC2 $-/-$, quant à elles, vont produire essentiellement de la somatostatine sous la forme SS-28. Ainsi, la coupure au niveau de l'Arg 64 se fait normalement, alors que celle au niveau du site Lys-Arg 78 ne se produit pas et est de ce fait propre à PC2 (Furuta et al., 1997).

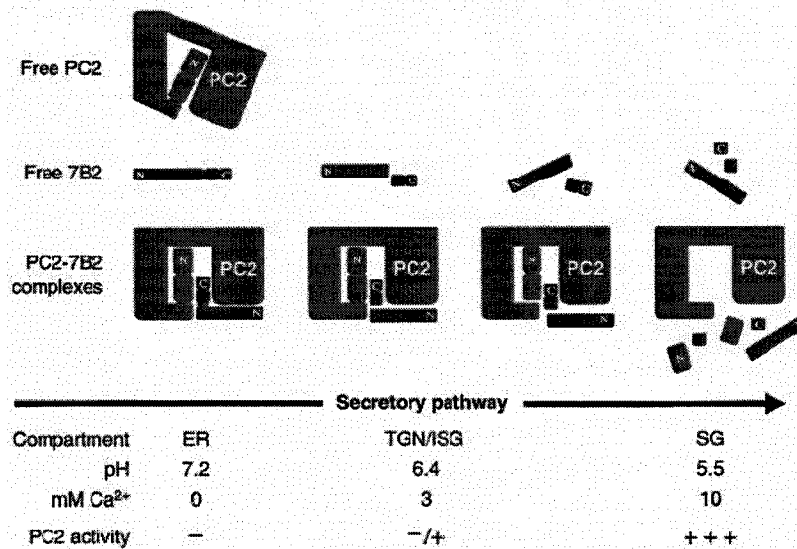


Figure 10 : Interaction entre la PC2 et 7B2 au niveau de la voie régulée (reproduit de Mbikay et al., 2001).

5.2.3. PC1/3

Avec cinq modèles animaux de mutation touchant PC1/3, cette enzyme est la convertase pour laquelle le plus de données *in vivo* sont disponibles. Tous les modèles ont confirmé, sans équivoque, le rôle de PC1/3 dans la maturation de peptides intestinaux et hypothalamiques (Tableau IV). En effet, ils présentent tous une défaillance dans la maturation de la pro-insuline, du pro-glucagon et de la POMC (Jackson et al., 1997; Jackson et al., 2003; Lloyd et al., 2006; Zhu et al., 2002b; Zhu et al., 2002a; Ugleholdt et al., 2004). Par ailleurs, la souris B (Zhu et al., 2002b) présente un retard de croissance et une réduction du taux de sermoréline (GHRH) en circulation (Tableau IV), suggérant que PC1/3 serait impliquée dans sa maturation. Ce résultat a été appuyé par des études de surexpression où PC1/3 s'est révélée être la convertase la plus efficace pour cliver le site présent en C-terminal du GHRH afin de générer ainsi le peptide actif (Dey et al., 2003). La pro-GHRH est maturée au niveau de l'hypothalamus puis acheminée vers l'hypophyse où elle contrôle la synthèse et la sécrétion de l'hormone de croissance (GH) au niveau des cellules somatotropes. Ce phénotype n'étant pas présent chez les mutants humains, une différence dans les réseaux endocriniens entre l'homme et la souris a été suggérée.

Récemment, une nouvelle souris mutante pour PC1/3 a été reportée (souris C). Tout comme les mutants humains, et contrairement à la souris B, elle ne souffre pas de nanisme. Ainsi, lors de la génération de la souris B, la suppression d'éléments transcriptionnels dont la nature n'est pas connue pourrait être responsable du retard de croissance dû à la carence en GHRH.

Il est à noter que le phénotype du nouveau modèle de déficience de PC1/3 chez la souris (souris C, Tableau IV) ressemble beaucoup au modèle humain A. En effet, en plus de présenter des perturbations dans la maturation de certains précurseurs hormonaux (Tableau IV), la souris C est obèse. Ce résultat vient confirmer le rôle de PC1/3 dans le comportement alimentaire et le contrôle de l'appétit. L'implication de PC1/3 dans la prise alimentaire s'explique par la participation de celle-ci dans la maturation de peptides endocriniens impliqués dans le contrôle et la régulation du comportement alimentaire tels que la CART, le neuropeptide hypothalamique Y (NPY), l'hormone intestinale cholécystokinine ou encore les peptides issus de la POMC (Cain et al., 2001; Stein et al., 2006a; Stein et al., 2006b; Brakch et al., 1997; Pritchard et al., 2002). De plus, de nombreuses études *in vitro* et *ex-vivo* ont souligné l'importance de PC1/3 dans la pigmentation, la stéroïdogénèse, la régulation thermique, le contrôle de l'appétit, la maturation sexuelle ainsi que le développement fœtal (Castro and Morrison, 1997; Chen et al., 1997; Ciesla, 2001; Clark et al., 1993a; Fehm et al., 2001; Jegou et al., 2000; Robbins et al., 1993; Taylor et al., 2003). La plupart de ces fonctions sont également reliées à l'action des peptides issus de la POMC.

La POMC est exprimée dans l'hypothalamus, l'hypophyse, la peau et au niveau du système immunitaire. Chez les mammifères, la POMC est maturée de façon tissu spécifique. Au niveau du lobe postérieur de l'hypophyse (pars distalis) les cellules sont dites corticotropes car elles produisent les peptides adrenocorticotropes (ACTH related peptides). Au niveau des mélanotropes de la pars intermedia ce sont les peptides mélanocytaires qui sont produits majoritairement (Tanaka, 2003), voir Figure 4. Sous l'action de PC1/3, la POMC génère de nombreux peptides parmi lesquels l'ACTH et α MSH. Ces peptides agissent sur les récepteurs à mélanocortine. Il existe cinq types de

récepteurs (MC1R, MC2R, MC3R, MC4R, MC5R). Le type 1, MC1R, est présent au niveau de la peau où il joue un rôle crucial dans la pigmentation, sa stimulation conduit à la production de l'eumélanine, pigment noir de la peau (Figure 11). Le type 2, MC2R est exprimé dans les surrénales, où son activation par l'ACTH conduit à la production de cortisol. Le MC5R est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme. Il serait impliqué dans la thermorégulation et la différenciation des sébocytes (Zhang et al., 2006). Les MC3R et MC4R sont spécifiques au système nerveux central. Le MC4R est impliqué dans l'obésité, la prise alimentaire, le contrôle de l'appétit et le stockage d'énergie. Le rôle du MC3R n'est pas très bien défini. Certaines études suggèrent qu'il serait impliqué dans des mécanismes de retrorégulation au niveau de l'hypothalamus (Pritchard et al., 2002).

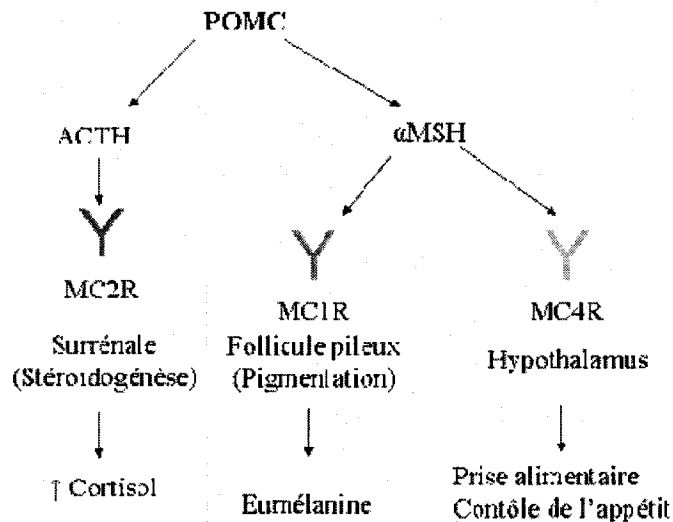


Figure 11 : Effets de la stimulation des récepteurs à mélanocortine. (Adapté de Clément 2000).

L'implication des peptides issus de la POMC dans la régulation du poids a été validée par la découverte d'individus obèses présentant des mutations au niveau du gène ou de la séquence du promoteur de la POMC (Farooqi and O'Rahilly, 2004). De plus, des études ont montré l'étroite relation entre la voie des mélanocortines et la voie de la leptine. La leptine est une hormone produite par les adipocytes qui contrôle le bilan énergétique et la prise alimentaire. Des mutations au niveau du gène de la leptine ou de son récepteur

conduisent à un phénotype obèse chez la souris et l'humain (Farooqi and O'Rahilly, 2004; Clement, 2000). La production de la leptine est stimulée par les glucocorticoides et l'insuline. L'insuline est issue de la maturation de la pro-insuline par PC1/3 et PC2. Les glucocorticoides sont produits au niveau des glandes surrénales suite à l'action de l'ACTH. La leptine va inhiber la prise alimentaire en stimulant la production de peptides anoréxogènes tels que l' α MSH et la CART ou encore en inhibant la transcription de gènes codant pour des peptides favorisant la prise alimentaire tel que le NPY créant ainsi une boucle de contrôle hypothalamo-hypophyso-surrénalienne (Annexe 1) (Norman et al., 2003).

Comme il vient d'être décrit, la PC1/3 a un rôle d'importance vital dans de nombreux mécanismes de contrôle, rôle qui semble, d'ailleurs, confirmé par sa distribution dans toutes les espèces animales. En effet, PC1/3 est une enzyme assez ancienne sur le plan phylogénétique puisque des homologues très conservés de cette enzyme ont été retrouvés chez l'hydre (Chan et al., 1992) ainsi que chez le mollusque gastéropode 'Aplysie Californienne' (Gorham et al., 1996). Chez cette dernière l'homologue de PC1/3 serait responsable de la maturation du précurseur d'une hormone produite à la maturation sexuelle (egg-laying hormone) au niveau de la glande atriale (Gorham et al., 1996).

6. Structure moléculaire de PC1/3

Les convertases possèdent plusieurs domaines. Certains sont très conservés entre les membres de la famille et d'autres différents d'une enzyme à l'autre conférant ainsi des caractéristiques uniques à chaque convertase. La Figure 12 représente les différents domaines structuraux composant les convertases. Les convertases, comme la plupart des protéases biologiquement actives, sont synthétisées sous forme de précurseur appelé zymogène qui doit subir un certain nombre de clivages afin de devenir actif.

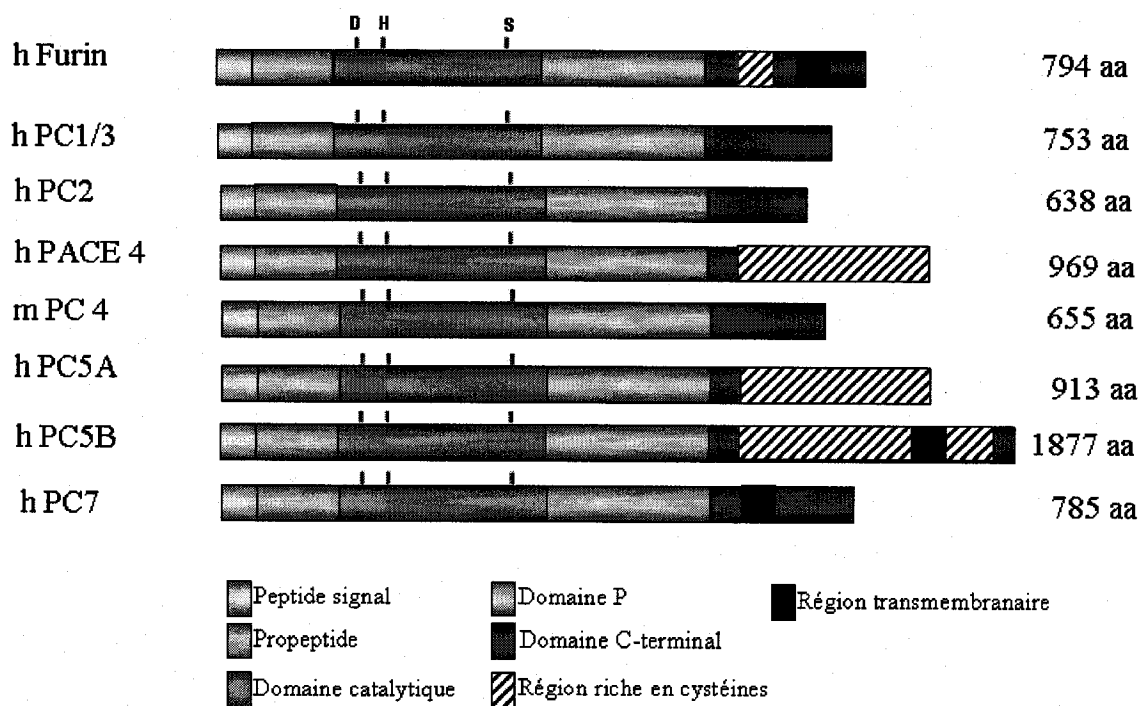


Figure 12: Représentation schématique des domaines composant les sept convertases (adapté de Taylor et al., 2003).

6.1. Peptide signal

Le peptide signal (PS) est un domaine situé à l'extrémité N-terminale de la molécule qui contient une forte proportion de résidus hydrophobes. Il est indispensable pour l'acheminement de la protéine dans la voie de sécrétion et, tel que démontré pour la subtilisine, est clivé par une signal peptidase après sa translocation à travers la membrane du RE (Nielsen et al., 1999).

6.2. La prorégion

Le peptide signal est suivi par la prorégion (appelée également propeptide, prodomaine ou encore prosegment). L'alignement des séquences en acides aminés des prorégions des sept convertases, tel qu'il sera décrit dans le chapitre III, fait ressortir plusieurs faits saillants. Tout d'abord, la séquence en C-terminale en contact avec le

domaine catalytique est très conservée et riche en acides aminés basiques (voir la Figure 16 plus bas). La composition en acides aminés de la portion N-terminale de la prorégion est plutôt variable. La prorégion de PC1/3 est composée de 83 acides aminés et joue deux rôles très importants, celui de chaperone intramoléculaire (IMC) et d'inhibiteur de l'enzyme. La fonction de chaperone moléculaire de la prorégion a été surtout étudiée chez la subtilisine bactérienne. En effet, son interaction étroite avec le site actif lui permet de stabiliser ce dernier et de l'assister dans sa maturation afin qu'il puisse adopter un repliement tri-dimensionnel adéquat. En l'absence de la prorégion, la protéase se retrouve dans un état intermédiaire compact, inactif et métastable (Eder et al., 1993). L'ajout de la prorégion en *trans* permet à l'enzyme de vaincre la barrière énergétique de l'état de transition et d'acquies ainsi une forme active (Eder et al., 1993; Baker et al., 1992) (Figure 13). Le mécanisme décrit ici s'applique également pour les prorégions des autres classes de protéases produites également sous forme du zymogène (Khan and James, 1998; Lazure, 2002).

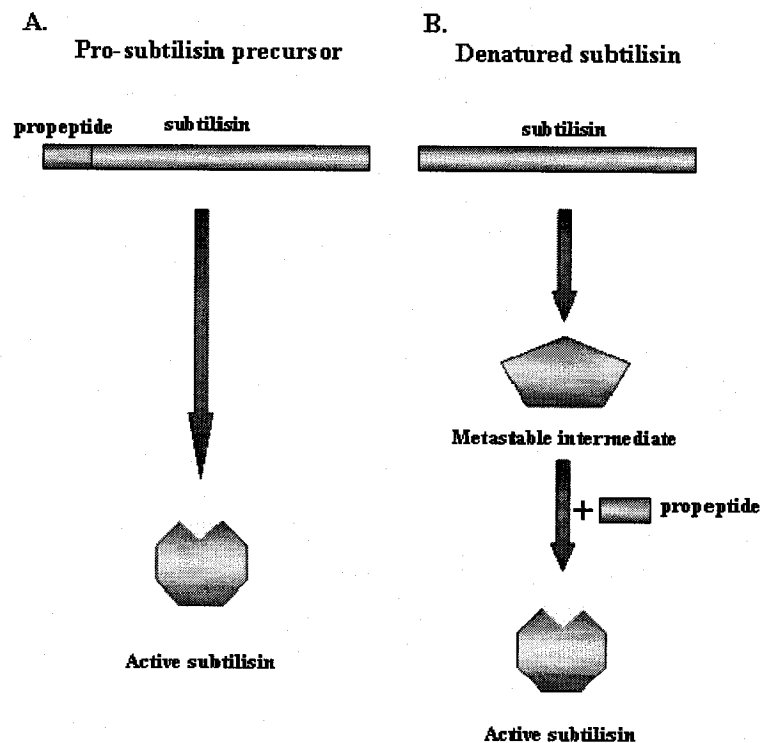


Figure 13 : Maturation de la subtilisine. A. En présence de la prorégion. B. Subtilisine dénaturée et repliée sans prorégion. L'ajout de la prorégion en *trans* permet la formation d'une enzyme active (Modifié de Takagi et Takahashi 2003).

Des études d'analyse mutationnelle de la prorégion, chez la subtilisine bactérienne, ont montré que l'acquisition de la structure active finale est fortement dépendante de la séquence primaire de la prorégion. Ainsi, l'introduction de mutations ponctuelles peut affecter le repliement tridimensionnel de l'enzyme et conduire à la production d'une protéase inactive ou présentant des caractéristiques enzymatiques différentes. Ce phénomène a conduit au concept de la 'mémoire protéique' selon lequel la structure d'une protéase est dictée par la séquence de sa chaperone (Shinde et al., 1997). De plus, les mutations affectant l'activité de l'enzyme parentale touchent essentiellement des régions hydrophobes, qui, chez la subtilisine, forment deux motifs dits N1 et N2 (Figure 14). L'implication de régions hydrophobes dans le processus de maturation de l'enzyme implique que le repliement de la protéase passe par une interaction étroite entre la prorégion et le reste de la molécule. Ce contact étroit se fait plutôt *via* des interactions hydrophobes que électrostatiques (Takagi and Takahashi, 2003). L'importance des interactions hydrophobes dans le contact entre l'enzyme et la prorégion a été également mise en évidence dans le cas de la Kéxine (Lesage et al., 2003).

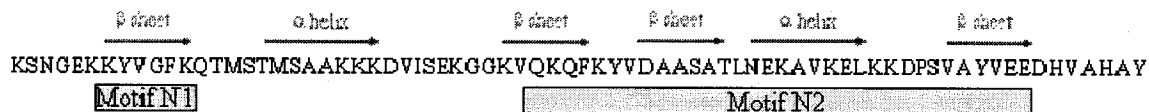


Figure 14 : Séquence de la prorégion de la subtilisine BPN' (Bacterial Protease Novo) mettant en évidence les deux motifs hydrophobes N1 et N2. (Adapté de Takagi et Takahashi 2003).

Le concept de mémoire protéique a été vérifié dans le cas des convertases. En effet, des expériences visant à échanger les prorégions de PC1/3 et PC2 ont permis de constater que les enzymes produites avaient des caractéristiques physico-chimiques modifiées. La protéine de fusion Prorégion (PC2)- PC1/3 se comporte plus comme PC2 que PC1/3 en terme de maturation et de la sensibilité au pH (Scougall et al., 1998). D'autres expériences visant à étudier des chimères entre PC1/3, PC2 et la Furine ont établi que

seules les chimères contenant la prorégion de la Furine pouvaient donner des enzymes fonctionnelles, c'est-à-dire catalytiquement actives (Zhou et al., 1995).

Les expériences de dénaturation et de renaturation associées aux études mutationnelles menées sur la subtilisine ont permis de diviser le processus de maturation de la pro-subtilisine en quatre étapes : (i) repliement de la protéase assuré par la prorégion, (ii) clivage de la prorégion par un mécanisme auto-catalytique au niveau de la jonction prorégion-domaine catalytique, (iii) modification de la conformation spatiale de la protéase assurée par la prorégion menant à la dissociation de celle-ci de l'enzyme parentale, (iv) dégradation de la prorégion, ce qui rend le processus de maturation irréversible (Fu et al., 2000). La participation de la prorégion au repliement de l'enzyme la classe dans les prorégions de type I. Shinde et Inouye ont divisé les prorégions des protéases en deux grands groupes, celles qui jouent le rôle d'une chaperone sont dites de type I et celles qui assurent d'autres fonctions sont dites de type II (Shinde and Inouye, 2000). En effet, les prorégions de certaines protéases vont être plutôt impliquées dans l'oligomérisation, c'est-à-dire l'assemblage en plusieurs sous-unités, le ciblage intracellulaire ou encore l'association aux composants membranaires afin de permettre l'acheminement de la pro-protéase vers la voie de sécrétion (Lazure, 2002).

La fonction d'inhibition de la protéase assurée par la prorégion permet de réguler l'activité de l'enzyme. En effet, les enzymes protéolytiques sont toutes produites sous forme de zymogène inactif afin d'éviter toute dégradation excessive de protéines dans la cellule. L'interaction entre la prorégion et la protéase conduit à l'obstruction stérique du site actif, ce qui empêche l'accès de celui-ci aux substrats (Khan and James, 1998; Sohl et al., 1997). L'inhibition exercée par la prorégion de la subtilisine est de type compétitif, à liaison lente et à forte affinité (voir section 9), ce qui appuie le concept selon lequel l'interaction entre l'enzyme et la prorégion se fait au niveau du site actif mais également ailleurs dans la molécule tel que mentionné dans les paragraphes précédents (Li et al., 1995). Le rôle inhibiteur de la prorégion a été montré pour la Kéxine, la Furine, PC1/3, PC5 et PC7 (Boudreault et al., 1998a; Fugere et al., 2002; Lesage et al., 2001; Nour et al., 2003; Zhong et al., 1999). L'inhibition est assurée par la portion C-terminale de la

prorégion, composée d'acides aminés basiques (Figure 16). Ces résidus basiques interagissent avec le site actif pour lui permettre de se replier de manière à reconnaître des motifs de clivage contenant des acides aminés chargés positivement. De plus, comme ces résidus sont organisés en motif de clivage reconnu par les convertases, ils peuvent donc compétitionner avec le substrat pour le site actif jusqu'à ce que l'enzyme atteigne son compartiment cible. La prorégion est alors clivée de la même façon qu'un substrat au niveau de ces résidus. La substitution des résidus basiques en C-terminal de la prorégion abolie l'effet inhibiteur de la prorégion, l'empêche d'être reconnu comme substrat et prévient l'activation et la progression de l'enzyme dans la voie de sécrétion (Anderson et al., 1997; Goodman and Gorman, 1994; Powner and Davey, 1998).

L'étude du rôle de la prorégion dans l'activation de l'enzyme dans la famille des convertases a été surtout menée sur la Furine. En effet, des expériences de mutagenèse conduisant à la suppression de la prorégion ou à la substitution de certains résidus ont conduit à l'élucidation de son mécanisme d'activation qui pourrait s'appliquer aux autres membres de la famille. La pro-Furine une fois produite est inactive. Elle est transloquée au niveau du R.E grâce à la présence du PS où sa prorégion va l'assister dans le repliement correct du site actif. Dès que le site actif est replié, la prorégion va être clivée par un mécanisme intramoléculaire autocatalytique au niveau de la jonction prorégion-domaine catalytique (Arg 107). Ce clivage est indispensable pour la progression de l'enzyme dans les voies de sécrétion car la mutation de l'Arg 107 conduit à la rétention de l'enzyme dans le R.E (Anderson et al., 1997; Anderson et al., 2002; Creemers et al., 1993; Leduc et al., 1992). L'importance du clivage auto-catalytique dans la progression des convertases dans la voie de sécrétion a été également démontré dans le cas de PC1/3 et PC2 (Goodman and Gorman, 1994; Matthews et al., 1994).

Par ailleurs, après ce clivage la prorégion demeure associée au reste de la molécule afin d'assurer l'inhibition de l'enzyme. Ceci permet une régulation spatio-temporelle de l'activité enzymatique afin d'éviter la maturation précoce de substrats (Anderson et al., 1997; Anderson et al., 2002; Boudreault et al., 1998a; Fugere et al., 2002; Lesage et al., 2001; Nour et al., 2003; Zhong et al., 1999). Lorsque l'enzyme atteint le compartiment

cible, qui, dans le cas de la Furine, enzyme de la voie constitutive, est le réseau trans-golgien ou encore les endosomes, la diminution du pH au niveau de ces structures favorise le clivage de la prorégion à un site interne (Arg75) et la dissociation du complexe enzyme-inhibiteur. Le Furine devient alors active et procède au clivage de ses substrats (Anderson et al., 2002) (Figure 15).

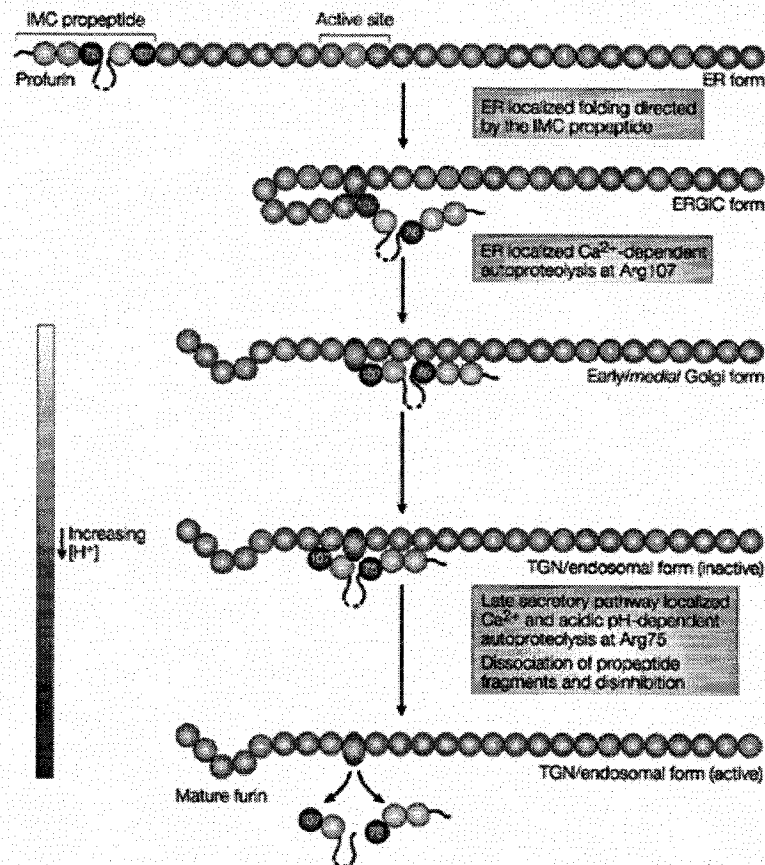


Figure 15 : Mécanisme d'auto-activation de la Furine au niveau de la voie de sécrétion (modifié de Thomas., 2002).

La structure en solution de la prorégion de PC1/3 a été élucidée par l'équipe de Tangrea et al (2001) (Tangrea et al., 2001). L'étude a démontré pour la première fois que la prorégion d'une convertase pouvait acquérir une structure en absence du reste de l'enzyme. De plus, malgré l'absence de similarité de séquence, la structure secondaire de

la prorégion de PC1/3 ressemblait beaucoup à celle de la subtilisine bactérienne (Gallagher et al., 1995). Le domaine est composé de quatre feuillets β anti-parallèles et de deux hélices α organisés comme suit β - α - β - β - α - β (Figure 16). Des expériences antérieures visant à déterminer la structure des prorégions de la Furine et de PC7 avaient conclu que la première ne se repliait pas en absence du domaine catalytique et la seconde était composée essentiellement d'hélices (Bhattacharjya et al., 2000b; Bhattacharjya et al., 2000a).

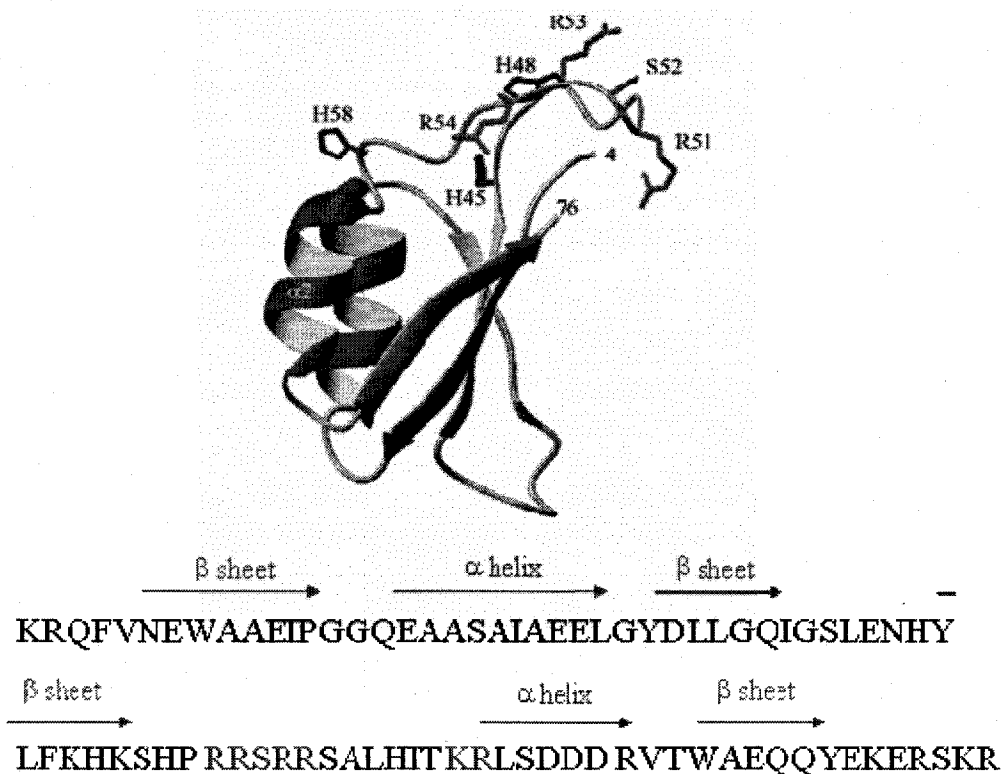


Figure 16 : Séquence et structure en solution de la prorégion de PC1/3 (Adapté de Tangera 2001). Résidus en bleu : sites d'acides aminés basiques représentant le deuxième (RRSRR) et le troisième (KR) sites potentiels de clivage reconnus par les convertases.

Finalement, il est à noter que d'autres rôles, en plus de celui de chaperone et d'inhibiteur, ont été attribués aux prorégions des convertases. En effet, Jan et ses collègues (Jan et al., 1998) ont démontré que la portion C-terminale de la prorégion de PC2 agit comme un signal d'agrégation membranaire favorisant la ségrégation de la

protéine vers la voie de sécrétion. Par ailleurs, récemment, une fonction de translocalisation nucléaire a été attribuée à la prorégion de PC1/3. En effet, des expériences sur l'implication de la PC1/3 dans la fertilisation et les premiers stades de développement embryonnaire ont mis en évidence l'importance de l'intégrité de la prorégion dans la translocation de l'enzyme vers le noyau où elle jouerait un rôle important dans la maturation de certains précurseurs hormonaux requis lors de la formation du zygote (St Germain et al., 2005).

6.3. Le domaine catalytique

Le domaine catalytique est le plus conservé entre les différentes convertases. Il contient tel que mentionné plus haut la triade Asp, His et Ser mais possède également un résidu Asn, Asp dans le cas de PC2, qui assure la stabilité de la charge négative se formant sur le carbonyl au niveau de l'oxyanion, lors de l'état de transition (Figure 17). Le mécanisme de coupure est dit de type ping-pong, c'est-à-dire qu'il se déroule en deux étapes. La première consiste à polariser la liaison par la sérine sous forme d'alcoolate ; la coupure est alors effective, le peptide C-terminal est relargué dans le milieu alors que le peptide N-terminal acyle la sérine. Dans un deuxième lieu, l'eau, agissant comme substrat, coupe la liaison acyle pour libérer le second peptide et l'enzyme régénérée. Ainsi chaque acide aminé de la triade catalytique va avoir un rôle bien précis. La sérine agit en tant que nucléophile et attaque le groupement carbonyle du lien à hydrolyser. L'histidine, accepte l'hydrogène de la sérine afin de polariser cette dernière et lui permettre de mener l'attaque. L'acide aspartique, quand à lui, établit une liaison hydrogène avec l'His afin d'accroître son électro-négativité et lui permettre d'accueillir l'hydrogène de la sérine (Siezen and Leunissen, 1997).

Il est à noter que l'acide aspartique n'est pas absolument nécessaire dans cette réaction. En effet, il existe des enzymes dont le fonctionnement dépend d'une dyade, c'est-à-dire de la présence de deux acides aminés fonctionnels, l'His et la Ser. Ce mécanisme s'opère dans le cas de signal peptidases (Tjalsma et al., 2000) ou encore

d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides gras telle que la Malonyl CoA acyle transférase (Dreier et al., 2001).

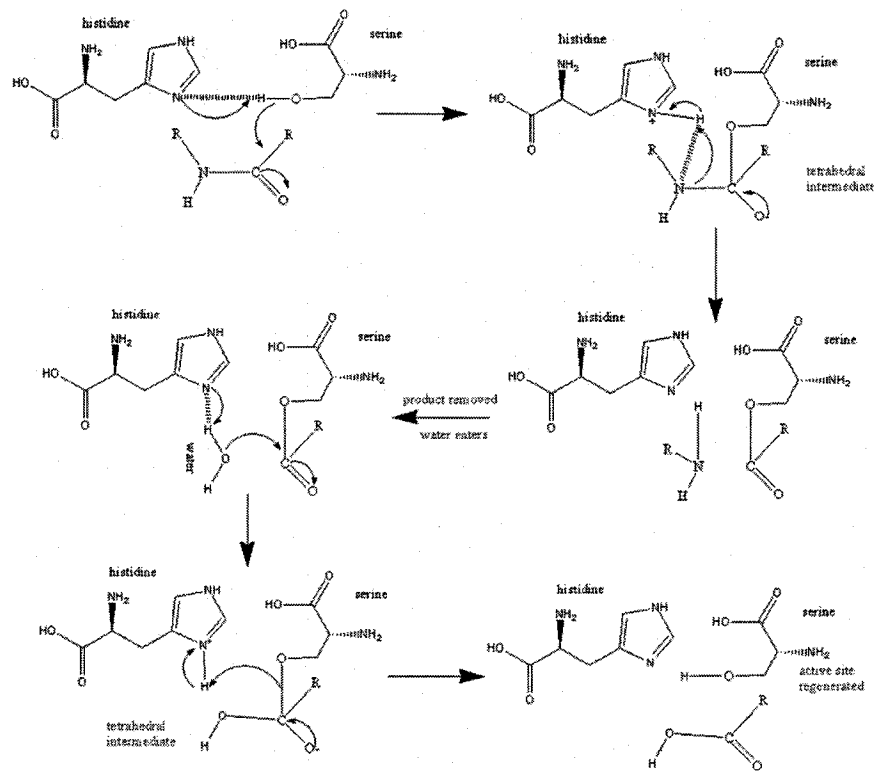


Figure 17 : Mécanisme catalytique d'une sérine protéase.
<http://www.esi.umontreal.ca/~keillorj/PDF/CHM6330/Modeles.pdf>

Un grand nombre de mutants au niveau du domaine catalytique ont été générés pour les différentes subtilisines. Cette approche a permis de confirmer l'importance des résidus de la triade catalytique pour le fonctionnement mais également le repliement de l'enzyme. Ceci a permis, par ailleurs, d'identifier les résidus pouvant conduire à une modification des caractéristiques physico-chimiques et de la spécificité de l'enzyme (Creemers et al., 1993; DeSantis and Jones, 1999; Kacprzak et al., 2005; Rockwell and Fuller, 1998; Rozan et al., 2004; Stratton et al., 2001).

Pour PC1/3, la substitution de la Ser ou de l'His du site actif conduit à la production d'une enzyme inactive, incapable de cliver sa prorégion (Goodman and Gorman, 1994;

Zhou et al., 1995). Le remplacement de l'Asn stabilisant l'oxyanion par un Asp conduit à la production d'une enzyme nécessitant un pH plus acide pour la maturation, ce qui est en accord avec les exigences en terme de pH acide de PC2 (Scougall et al., 1998). Les mutations effectuées au niveau de résidus hydrophobes de l'extrémité C-terminale du domaine catalytique ont trois effets: (i) certains mutants continuent à être normalement transportés et sécrétés hors de la cellule (ii) le deuxième groupe de mutants (V292Y, T328D, L351E et Q408Y) est retenu au niveau du RE (iii) le troisième groupe de mutants (L410R, V412S, F441K) conduit au déclenchement du processus apoptotique, suggérant que les résidus des deux derniers groupes de mutants jouent un rôle structurel important et sont indispensables pour le repliement correct de la molécule (Scougall et al., 1998; Ueda et al., 2003). Ce rôle pourrait rendre compte de la création d'une interface hydrophobe interagissant avec le domaine P lors du repliement.

Récemment, les structures moléculaires des domaines catalytiques de la Kex2 ainsi que de la Furine ont été résolues. Ceci a permis de constater leur similarité avec la structure de la subtilisine. En effet, le domaine est organisé en structure sphérique de huit feuillets beta flanqués par cinq hélices adjacentes, deux hélices périphériques et deux boucles en forme d'épingles à cheveux (Figure 18). La différence majeure avec les subtilisines bactériennes provient de la présence de boucles additionnelles autour du site actif et à coté du domaine P (voir section 6.4) servant, probablement, comme sites de liaison pour le calcium. Ce qui explique l'importance de cet ion pour le fonctionnement des convertases eucaryotes et la reconnaissance du substrat (Henrich et al., 2003; Holyoak et al., 2003; Holyoak et al., 2004; Scougall et al., 1998).

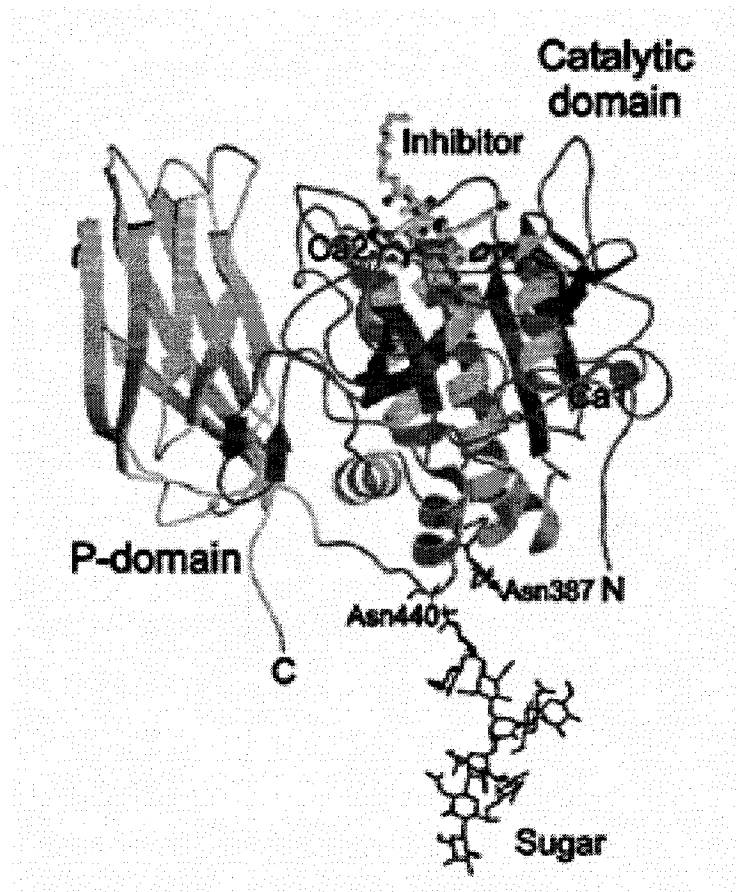


Figure 18 : Structure de la Furine en présence de l'inhibiteur decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chloromethylketone (dec-RVKR-cmk) (adapté de Henrich et al., 2003).

6.4. Le domaine P

Le domaine P, également appelé domaine Homo B, se trouve en C-terminal du domaine catalytique. Il est assez bien conservé entre les convertases. Les études de modélisation ont tout d'abord suggéré qu'il est composé essentiellement de feuillets beta interagissant étroitement avec le domaine catalytique, ce qui permet d'accroître la stabilité de ce dernier (Zhou et al., 1998). Des études de mutagenèse ont permis, par la suite, de constater que l'intégrité de ce domaine est requise pour la progression de l'enzyme dans la voie de sécrétion et ont mis en évidence l'importance de ce domaine pour la sensibilité de l'enzyme au pH et au calcium (Gluschankof and Fuller, 1994; Lusson et al., 1997; Scougall et al., 1998; Ueda et al., 2003; Zhou et al., 1998). La

validité de ce modèle a été confirmée par la cristallographie mettant en évidence l'existence de poches hydrophobes favorisant la liaison du substrat, des ions calcium ainsi que d'éventuels autres ligands (Henrich et al., 2003; Holyoak et al., 2003; Holyoak et al., 2004; Scougall et al., 1998).

Le domaine P contient une séquence RGD (Arg, Gly, Asp) assez conservée entre les convertases. Plusieurs fonctions ont été attribuées aux protéines possédant ce genre de motif incluant l'adhésion cellulaire, l'agrégation plaquettaire, la régulation de la pression sanguine ainsi que la fonction immunitaire (Zachariah et al., 2001). L'altération de cette séquence dans PC1/3, par substitution de l'Arg en Ala ou de l'Asp en Glu, a souligné son importance dans le processus de ciblage et de transport intracellulaire dans des expériences de surexpression utilisant le virus de la vaccine (Lusson et al., 1997; Rovere et al., 1999). Il est à noter que les études de cristallographie (Henrich et al., 2003) ont révélé que ces trois résidus, chez la Furine, n'étaient pas alignés de sorte à former un motif RGD fonctionnel, ce qui exclut leur participation aux rôles mentionnés plus haut.

Par ailleurs, une analyse mutationnelle des résidus potentiellement impliqués dans l'interaction entre le domaine catalytique et le domaine P de PC1/3 a été faite. Cette étude a montré que (i) le domaine P pouvait se replier indépendamment du reste de la molécule (ii) les résidus conservés présent dans la portion C-terminale du domaine sont cruciaux pour le repliement, l'activation autocatalytique mais également la sécrétion de l'enzyme (Jackson et al., 1997; Siezen and Leunissen, 1997; Ueda et al., 2003).

6.5. Le domaine C-terminal

La composition du domaine C-terminal (C.T) est très variable (Figure 12). Dans la Furine, la PACE 4 et la PC5A le domaine C.T contient des segments riches en cystéines permettant l'attachement de la protéine à la membrane et facilitant ainsi l'ancrage en surface (Nour et al., 2005). De plus, dans le cas de la Furine, la PC5B, la PC7 et la Kexine, ce domaine présente un motif transmembranaire facilitant le tri et le recyclage de la protéine (Brenner and Fuller, 1992; Teuchert et al., 1999a; Teuchert et al., 1999b;

Xiang et al., 2000). Par opposition, PC1/3, PC2 et PC4 ne possèdent pas ce genre de motif. Ces trois convertases sont solubles et leur extrémité contient une queue riche en Ser/ Thr. Curieusement, dans le cas de PC1/3, une étude a suggéré l'existence d'un domaine transmembranaire entre les résidus 619 à 638, permettant à l'enzyme de s'ancrer aux radeaux lipidiques (lipid rafts) de la membrane des granules de sécrétion (Arnaoutova et al., 2003). Cette étude fut rapidement contredite par Stettler et ses collègues qui ont démontré que du fait du manque de segments hydrophobes au niveau de la séquence en question, l'enzyme ne peut pas traverser le centre hydrophobe de la membrane. Ainsi, le ciblage de PC1/3 serait assuré par l'association périphérique de l'enzyme aux différents composants membranaires (Stettler et al., 2005). Une autre étude, plus récente, a confirmé l'importance de la séquence située entre les résidus 619-638 dans le ciblage de l'enzyme vers les granules (Lou et al., 2007). Il n'est toujours pas clairement établi si des séquences spécifiques au niveau du domaine C.T de PC1/3 sont responsables pour cette interaction. Une étude visant à muter les différents sites d'acides aminés basiques présents au niveau de C.T a démontré l'importance du binôme Arg-Arg 618 dans le triage et l'acheminement de l'enzyme vers la voie régulée (Bernard et al., 2003).

Par ailleurs, Jutras et ses collègues ont attribué ce rôle à l'hélice amphipatique présente à l'extrémité du domaine C.T lors d'expériences de surexpression dans les cellules GH4, cellules somatotropes possédant des granules de sécrétion mais n'exprimant pas PC1/3 de façon endogène (Jutras et al., 2000). En effet, ce groupe a montré que lors de l'expression de protéines chimériques contenant le fragment Fc des immunoglobulines associé à différentes portions du domaine C.T de PC1/3, seuls les chimères contenant l'hélice amphipatique étaient ciblées vers les granules de sécrétion. De plus, des études de surexpression de l'hélice C-terminale de PC1/3 avec la rénine, protéine impliquée dans la régulation de la pression sanguine, ont montré que l'hélice C-terminale de PC1/3 facilitait le ciblage de la rénine vers les granules de sécrétion. Cette augmentation de l'efficacité de ciblage peut s'opérer en *cis*, lorsque celle-ci est exprimée sous forme de protéine chimérique associé à l'hélice de PC1/3, mais également en *trans*, lorsque les deux protéines sont exprimées séparément (Lacombe et al., 2005). Une

analyse détaillée de la capacité des hélices amphipatiques à promouvoir le ciblage vers la voie de sécrétion a montré que c'était le regroupement de résidus hydrophobes au niveau de l'hélice qui assurait cette fonction (Dikeakos et al., 2007). Par contre, d'autres groupes ont montré que la forme tronquée en C-terminal de la PC1/3 pouvait atteindre les granules de sécrétion mais également pouvait s'associer de façon efficace aux composants lipidiques membranaires des cellules AtT20, exprimant PC1/3 de façon endogène, suggérant que d'autres éléments structuraux étaient impliqués dans le ciblage de l'enzyme vers la voie de sécrétion régulée (Blazquez et al., 2001; Zhou et al., 1995).

7. Régulation de PC1/3

7.1. Régulation du gène

Au niveau génétique l'expression de PC1/3 est sous le contrôle de nombreux éléments tels que le facteur de libération de la corticotropine (CRH), les glucocorticoïdes, la leptine ou encore la mélatonine, hormone du sommeil qui gère les rythmes circadiens (Ciesla, 2001; Bloomquist et al., 1991; Sanchez et al., 2004; Nilaweera et al., 2003). De plus, il a été montré que PC1/3 était sous le contrôle de l'hormone thyroïdienne (Li et al., 2001). Par ailleurs, son promoteur contient, également, des éléments de réponse à l'AMP cyclique et peut être régulé par d'autres seconds messagers tels que la protéine kinase C (PKC) et le calcium (Udupi et al., 1998; Dhanvantari et al., 2001). Finalement, étant présente au niveau de la voie de sécrétion régulée, l'expression de PC1/3 est sous le contrôle de secrétagogues. Ainsi, il a été montré que la stimulation de la sécrétion au niveau d'une lignée cellulaire pancréatique humaine en utilisant divers secrétagogues, tels que les phorbol ester, le 8-bromo-cAMP ou encore l'ionophore du calcium A23187, conduit à une augmentation du niveau d'ARNm de PC1/3 (Udupi et al., 1995; Dhanvantari et al., 2001).

7.2. Au niveau protéique

7.2.1. Maturation du zymogène

Une fois la protéine synthétisée d'autres moyens de régulation entrent en jeu. Comme n'importe quelle protéine la PC1/3 va subir les modifications post-traductionnelles, tel que décrit au début du chapitre. La PC1/3 possède trois sites potentiels de N-glycosylation et est sulfatée lors de son passage au niveau du réseau trans-golgien. Les expériences visant à altérer ces processus ont conduit à la production d'une enzyme inactive incapable de progresser dans la voie de sécrétion (Benjannet et al., 1993; Boudreault et al., 1998b).

La dernière étape de régulation du zymogène est son auto-activation. En effet, de même que n'importe quel précurseur la PC1/3 va subir un certain nombre de clivages au niveau de résidus basiques conduisant à la production d'une enzyme active. Ainsi, le premier domaine à être clivé est la prorégion (Benjannet et al., 1992). Ce clivage se produit au niveau de la séquence Arg80-Ser-Lys-Arg83 libérant l'enzyme de 87kDa et la prorégion qui va continuer d'agir comme inhibiteur, tel que cité plus haut, afin d'éviter une maturation indue des substrats et permettre à l'enzyme d'atteindre le compartiment cible où l'activation des précurseurs doit avoir lieu (Benjannet et al., 1992; Benjannet et al., 1993; Boudreault et al., 1998b; Lindberg, 1994; Zhou and Lindberg, 1993). Une fois que l'objectif spatio-temporel est atteint la prorégion est dégradée. Ceci a été clairement démontré pour la Kéxine, la Furine et la PC2. Cette dégradation se traduit par un clivage à un site basique interne présent dans toutes les convertases, excepté PC7. Pour la Furine le site interne de clivage représente un motif contenant une Arg en P6 (-Arg-Gly-Val-Thr-Lys-Arg51) (Anderson et al., 1997). Le site de clivage interne de PC2 contient un motif avec une Arg en P4 (Arg-Lys-Lys-Arg56) (Muller et al., 2000). La Kéxine, quant à elle, présente un motif avec un acide aminé basique en P2 (Lys-Arg63) (Powner and Davey, 1998). Pour ce qui est de PC1/3, bien que la dégradation de la prorégion fut observée (Boudreault et al., 1998a), le site exact de clivage n'a jamais été cartographié jusqu'à la présente étude. Dans la séquence de l'enzyme, la prorégion contient deux sites

de clivage internes potentiels donnant lieu à trois motifs possibles (Figure 16) Arg-Arg-Ser-Arg53, Arg-Ser-Arg-Arg54 et Lys-Arg67. Le second et dernier clivage se produit au niveau du domaine C.T libérant ainsi l'enzyme de 66kDa pleinement active. Ce clivage touche les résidus Arg-Arg618 et se fait de façon auto-catalytique au niveau des granules de sécrétion (Bernard et al., 2003; Lindberg, 1994; Vindrola and Lindberg, 1992; Zhou and Mains, 1994; Zhou et al., 1995).

Les deux formes de PC1/3, soit 87 et 66 kDa, possèdent des caractéristiques très différentes. La première préfère un pH plutôt neutre (entre 7 et 8) ainsi qu'une concentration faible en calcium pour fonctionner, conditions prévalentes tôt dans la voie de sécrétion. La seconde, préfère les pH acides (entre 5 et 6) et une concentration élevée en calcium, conditions présentes au niveau des granules de sécrétion. Les deux formes démontrent des différences en terme de substrats et de la sensibilité à certains inhibiteurs (Boudreault et al., 1998b; Coates and Birch, 1997; Zhou and Lindberg, 1994), ce qui suggère qu'elles auraient toutes les deux des fonctions biologiques distinctes *in vivo*.

7.2.2. Régulation par une protéine endogène 'ProSAAS'

En plus de la prorégion, une autre molécule a été proposée comme responsable de la régulation de l'activité enzymatique de PC1/3 de manière endogène. En effet, l'étude de souris déficientes en carboxypeptidase E (Cpe^{fat}/Cpe^{fat}), incapables de supprimer les résidus basiques suite à la coupure des convertases (voir plus haut) a permis de découvrir un nouveau précurseur endocrinien, dit proSAAS, pouvant être mûri à plusieurs sites d'acides aminés basiques pour générer des peptides sécrétés *via* la voie régulée (Figure 19) (Fricker et al., 2000). Sa caractérisation a montré, qu'au niveau de sa portion C-terminale, le proSAAS contenait un hexapeptide (Leu-Leu-Arg-Val-Lys-Arg) pouvant inhiber très fortement PC1/3 *in vitro* (Cameron et al., 2000). Cependant, Fortenberry et ses collègues ont montré que l'absence de l'hexapeptide n'abroge par l'inhibition de PC1/3 par le proSAAS *in vitro* (Fortenberry et al., 2002). Du fait de sa similarité avec le peptide endocrinien 7B2, une fonction de régulateur endogène pour PC1/3 lui a été attribué (Fricker et al., 2000; Basak et al., 2001; Qian et al., 2000; Cameron et al., 2000).

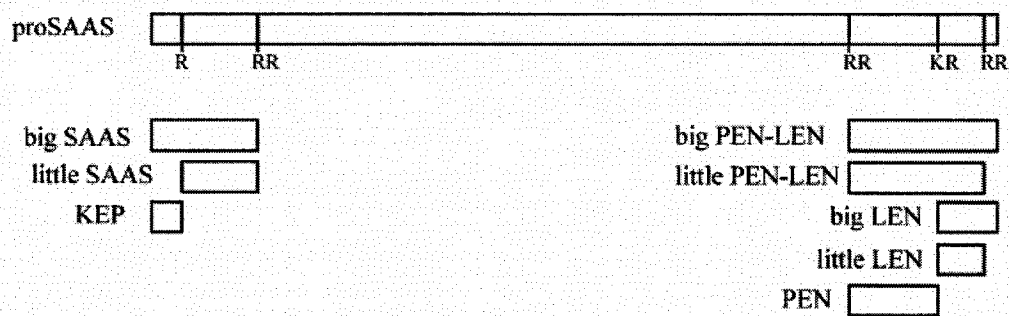


Figure 19 : Maturation du précurseur endocrinien ProSAAS au niveau de sites d'acides aminés basiques (reproduit de Wei et al., 2004).

L'étude de la colocalisation, par hybridation *in situ* et immunohistochimie, de PC1/3 et du proSAAS a été menée par différents groupes. Bien que, les deux colocalisent dans un grand nombre de tissus tels que l'hypothalamus, l'hypophyse et les surrénales, la distribution du proSAAS est beaucoup plus répandue que celle de la PC1/3, suggérant que ses fonctions endocriniennes ne s'arrêtent pas à la seule régulation de PC1/3 (Feng et al., 2001; Lanoue and Day, 2001). De plus, au niveau de l'intestin, dans les couches internes de l'iléum, où PC1/3 est fortement exprimée, le proSAAS n'a pas été détecté, suggérant que le proSAAS ne régulerait pas l'activité de PC1/3 dans tous les tissus (Lanoue and Day, 2001). Par ailleurs, dans des études plus récentes, il a été démontré que contrairement au 7B2, requis pour l'activation de la PC2, aucun effet d'activation n'a été observé dans le cas de PC1/3 avec les différents peptides issus du proSAAS (Fortenberry et al., 2002).

Dernièrement, des souris proSAAS transgéniques ont été générées. Les souris exprimant le transgène proSAAS présente une légère obésité comparé aux contrôles mais curieusement le niveau des neuropeptides maturés par PC1/3 n'est pas modifié, suggérant une fonction de régulation du poids par les peptides issus de proSAAS indépendante de PC1/3. De plus, la diminution de l'activité de PC1/3 est observée uniquement lorsque le le transgène proSAAS est exprimé dans des souris *Cpe^{fat}/Cpe^{fat}* (Wei et al., 2004). Ces résultats soulèvent encore une fois une controverse quant au rôle de régulation du proSAAS vis-à-vis de PC1/3.

8. Spécificité enzymatique de PC1/3

La spécificité d'une enzyme envers un substrat dépend des résidus entourant le site de clivage. Ceux-ci vont former une séquence de reconnaissance organisée le plus souvent en coudes beta ou encore en boucles omega pour faciliter l'accessibilité à l'enzyme (Brakch et al., 2000). La Figure 20 montre une représentation schématique de l'interaction entre la séquence de reconnaissance du substrat et les poches du site actif de l'enzyme.

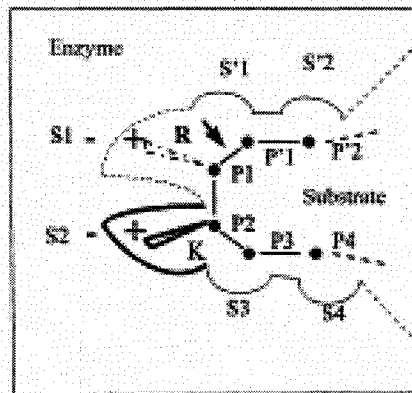


Figure 20 : Représentation schématique de sous-sites enzymatiques au niveau du site actif (reproduit de Brakch et al., 2000).

La spécificité des convertases vis-à-vis de leurs substrats a été établie par l'étude de la maturation de différents précurseurs dans des expériences de surexpression utilisant des cellules déficientes en certaines convertases, de co-surexpression d'une enzyme et de substrats potentiels ou en incubant des enzyme recombinantes avec des précurseurs potentiels ou des substrats fluorogènes contenant des sites de reconnaissance pour les convertases. Le Tableau V résume les données obtenues pour les préférences de PC1/3 en terme de motifs de clivage. La disponibilité des modèles animaux et humains, cités plus haut, ont permis de confirmer ou d'infirmer la spécificité des convertases pour certains sites (Cameron.A et al., 2001; Jean et al., 1995; Lazure et al., 1998; Ledgerwood et al., 1996).

Tableau V : Préférences en terme de substrat pour PC1/3 (adapté de Cameron et al., 2000).

<i>Position</i>	<i>Préférence</i>
P6	Arg
P5	Pas de préférence
P4	L'Arg est préférée mais cela dépend des substrats. Pas de résidu à petite chaîne latérale.
P3	N'importe quel résidu excepté une Cys.
P2	Arg ou Lys. L'Arg est préférée
P1	Arg ou Lys. L'Arg est préférée
P1'	Les acides aminés à petite chaîne latérale sont préférés. Pas de résidu aliphatique. Les résidus aromatiques peuvent être tolérés. Pas de Pro.
P2'	Les acides aminés à petite chaîne latérale sont préférés. Pas de résidus chargés. Pas de Cys. La Pro n'est pas favorable au clivage.

9. Inhibition de PC1/3

9.1. Intérêt thérapeutique des convertases

En plus de leur rôle dans le bon déroulement des processus biologiques, de multiples études ont souligné l'importance des convertases dans un grand nombre de processus pathologiques.

9.1.1. Infection bactérienne

Certaines convertases sont impliquées dans l'activation de nombreuses toxines bactériennes. Cette activation peut se faire de trois façons différentes : (i) par le clivage

de précurseurs conduisant à la formation de différentes sous-unités, ceci est le cas de l'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* (Sarac et al., 2002) et de la toxine diphtérique (Tsuneoka et al., 1993) (ii) par le clivage de sous-unités déjà assemblées permettant leur activation et leur polymérisation en pore membranaire et la translocation de la toxine dans le cytoplasme, ceci est le cas de la toxine de l'Anthrax (iii) par l'activation directe de toxines qui vont s'associer en pores et créer des flux ioniques importants conduisant à la lyse cellulaire (Gordon et al., 1997).

9.1.2. Infection virale

Les protéines de fusion des nombreux virus sont produites sous forme de proprotéines qui doivent être clivées par les convertases afin de s'organiser en deux sous-unités reliées par des ponts disulfures. La première sous-unité reconnaît les récepteurs membranaires. La deuxième sous-unité va promouvoir l'internalisation dans la cellule hôte par l'interaction avec la membrane. Ce processus s'applique dans le cas de la protéine gp160 de l'enveloppe du HIV, de l'hémagglutinine A (HA) du virus de l'influenza, du précurseur Fo du morbillivirus (virus de la rougeole) ainsi que de la GP1-GP2 protéine spike du virus Ebola. Ces protéines vont présenter des sites contenant des motifs reconnus par les convertases et peuvent être clivées par la Furine, la PACE4, la PC5 et la PC7 avec différentes efficacités (Taylor et al., 2003; Moulard and Decroly, 2000; Decroly et al., 1996; Miranda et al., 1996; Maisner et al., 2000; Volchkov et al., 1998).

9.1.3. Cancer

De nombreuses études ont démontré l'association des convertases avec la pathologie du cancer. PC1/3 et PC2, par exemple, sont surexprimés dans certaines métastases colorectales (Tzimas et al., 2005) et dans des carcinomes des petites cellules pulmonaires (Clark et al., 1993b). Par ailleurs, Furine, PACE4, PC7 et PC 1/3 sont fortement exprimées dans le cancer du sein (Cheng et al., 1997). La présence des convertases non-endocriniennes en grande quantité est détectée au niveau du cancer du colon ainsi que dans les tumeurs de la tête et du cou. L'expression des convertases est souvent associée à

la prolifération cellulaire et au processus métastatique impliquant le remodelage de la matrice extracellulaire et la réduction de l'adhésion cellulaire. Cette participation au processus métastatique pourrait s'expliquer par l'implication des convertases dans l'activation de métalloprotéases de la matrice extracellulaire, la modification de la capacité de signalisation des intégrines et l'activation de facteurs de croissance tels que le TGF β (Bassi et al., 2005a). Par ailleurs, il est à noter que PC1/3 est surexprimée dans certains cancers du poumon à caractère endocrinien. La surproduction d'hormones dans ce type de cancer conduit au syndrome de Cushing, une maladie endocrinienne due à un surplus de production de l'ACTH où le patient succombe suite à la surproduction d'hormone stéroïdes (Shomali and Hussain, 2000).

9.1.4. Neurodégénérescence

L'implication des convertases dans les pathologies neurodégénératives est souvent indirecte et touche la formation de plaques amyloïdogéniques. Les plaques amyloïdogéniques sont issues du clivage protéolytique du précurseur amyloïde par l'action coordonnée de deux enzymes, les α et β sécrétases. L' α sécrétase serait une métalloprotéase de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease). Les protéines de la famille ADAM possèdent une activité protéolytique couplée à une fonction adhésive. Cette double fonction leur permet de participer à de nombreux processus biologiques tels que l'adhésion, la migration cellulaire ainsi que le clivage protéolytique de cytokines et de facteurs de croissance. La β sécrétase, appelée également BACE (β site amyloid precursor protein cleaving enzyme) est une aspartyl-protéase. Ces deux enzymes seraient responsables du délestage 'ectodomain shedding' de la protéine. Par ailleurs, en absence de pathologie, une troisième enzyme, γ sécrétase, assure la protéolyse intramembranaire qui permet la libération du fragment C-terminal. Ce dernier joue un rôle important dans la signalisation intracellulaire. Les trois enzymes décrites ci-dessus seraient activées par la Furine et par la PC7 (Lopez-Perez et al., 1999; Creemers et al., 2001; Benjannet et al., 2001).

Finalement, ces informations indiquent que les convertases pourraient être une cible thérapeutique intéressante. Leur inhibition pourrait aider à réduire certains processus pathologiques. Le principal problème qui reste à résoudre c'est celui de cibler spécifiquement un membre de la famille, puisque les sept possèdent des caractéristiques physico-chimiques très similaires. De plus, étant donné leur importance dans de nombreux processus biologiques normaux, il faudrait peser l'apport bénéfique issu de leur inhibition *versus* les désagréments que ça pourrait engendrer. Différentes études sur l'utilisation thérapeutique des convertases ont été rapportées. Par exemple, l'introduction d'un site de clivage reconnu par la Furine dans l'insuline serait prometteur dans le traitement du diabète de type I, du à une insuffisance d'insuline, par thérapie génique (Burkhardt et al., 2005). Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs contre la Furine, augmenterait l'espérance de vie de souris infectées par *Pseudomonas aeruginosa* (Sarac et al., 2002). De plus, il a été montré que la prorégion de la Furine pouvait être utilisée comme inhibiteur ectopique servant à réduire la tumorigénicité, la prolifération ainsi que l'invasivité de cellules issues de carcinomes humain (Lopez et al., 2005). Quoiqu'il en soit, le seul moyen d'arriver à générer des outils thérapeutiques spécifiques passe par l'élucidation et la compréhension du fonctionnement de chaque convertase.

9.2. Rappel sur les mécanismes d'inhibition

Les enzymes sont des molécules très stables, qui peuvent rester actives très longtemps dans la cellule. Afin d'éviter une hydrolyse en continu de substrats leur action doit être fortement contrôlée. En plus, des mécanismes de contrôle de leur synthèse et activation, les enzymes peuvent être régulées par des entités extérieures. Ces modulateurs de l'activité enzymatique vont agir soit en facilitant la réaction de catalyse, ils sont dits : activateurs, ou encore en réprimant l'action de l'enzyme, ils sont alors appelés : inhibiteurs. Les modulateurs enzymatiques interagissent de façon étroite avec l'enzyme. Cette interaction peut être de différents types (Dixon.M and Webb.E.C, 1979).

9.2.1. Inhibiteurs compétitifs

L'inhibition compétitive se produit lorsque deux composés (le substrat 'S' et l'inhibiteur 'I') présentent une configuration tridimensionnelle très similaire leur permettant à tous les deux d'accéder au site actif. L'inhibiteur va ainsi occuper le site de catalyse, normalement utilisé par le substrat, et en compétitionnant avec ce dernier va empêcher la libération du produit P.

9.2.2. Inhibiteurs non-compétitifs

L'inhibition non-compétitive se produit lorsque deux composés (S et I) non analogues, c'est-à-dire qui ne sont pas spatialement identiques, peuvent se lier à l'enzyme de façon indépendante. Le substrat interagit avec le site actif pour donner le produit. Par contre, la liaison de l'inhibiteur à un site en dehors du site actif va empêcher la liaison du substrat.

9.2.3. Inhibition à liaison lente et à forte affinité (*slow tight binding inhibition*)

L'inhibition à liaison lente et à forte affinité se produit lorsque l'équilibre enzyme-inhibiteur est lent à atteindre du à une modification lente de l'inhibiteur en espèce active. Cette liaison peut être de forte affinité lorsque l'inhibiteur est difficile à séparer de l'enzyme. Ceci se produit souvent quand l'inhibiteur peut se fixer à plusieurs sites sur l'enzyme en plus du site actif. Cette liaison va soit prévenir la liaison directe du substrat et sera dite de type A, soit provoquer un changement conformationnel qui masquera l'accessibilité au site actif (Type B). Dans les deux cas, l'inhibition conduit à la formation d'un complexe enzyme-inhibiteur stable qui est enzymatiquement inactif.

Dans ce type d'inhibition la formation du produit P dépend de plusieurs facteurs, comme il apparaît dans l'équation qui suit :

$$[P] = v_s t + (v_i - v_s) / k [1 - e^{-kt}]$$

Où P est le produit, v_i la vitesse initiale de réaction, v_s la vitesse de l'état stationnaire, t est le temps et k la constante d'inhibition apparentale (Cha, 1975).

9.3. Revue de l'inhibition de PC1/3

Les études d'inhibition ont été menées essentiellement *in vitro* en utilisant de l'enzyme recombinante. Ces études ont permis d'établir les résidus importants pour l'inhibition. Les inhibiteurs de PC1/3 sont nombreux et peuvent être classés en différents groupes (Cameron.A et al., 2001; Fugere and Day, 2002).

9.3.1. Inhibiteurs endogènes

9.3.1.1. La prorégion

Tel que cité plus haut, la prorégion de PC1/3 agit en tant qu'inhibiteur de l'enzyme afin de contrôler son activité. Cette inhibition est assurée par la portion C-terminale de la prorégion qui présente un motif RXKR↓ appelé premier site de clivage (Figure 16). La prorégion est un inhibiteur à liaison lente et à affinité forte, elle inhibe PC1/3 avec un K_i de 6 nM (Boudreault et al., 1998a). Malheureusement, la prorégion n'est pas très spécifique envers la convertase car elle inhibe presque au même niveau la Furine (10 nM). Il est de même pour les prorégions des autres convertases. En effet, Fugère et ses collègues 2000 (Fugere et al., 2002) ont démontré que les prorégions de toutes les convertases inhibent efficacement la Furine, PC5 et PC7.

9.3.1.2. Le proSAAS

Le peptide endocrinien proSAAS (Figure 13) contient un peptide de 8 à 12 acides aminés (VLGALLRVKR244LE) capable d'inhiber PC1/3 spécifiquement à une concentration avoisinant le nM (Qian et al., 2000). Une caractérisation plus détaillée de la séquence inhibitrice a montré que (i) plus le peptide était long, moins bonne était sa capacité d'inhiber PC1/3 (ii) les résidus en P1, P2 et P4 étaient cruciaux pour l'inhibition

(iii) les résidus en P3, P5, P6 et P1' étaient responsables de la sélectivité envers l'enzyme (Basak et al., 2001). Cependant, une étude de Fugère et Day (Fugere and Day, 2002) a révélé que l'hexapeptide inhibiteur **LLRVKR** pouvait inhiber, dans le μM , Furine ainsi que PC2 et, dans le nM, PC5 ainsi que PC7. Ce qui soulève encore une fois un doute sur la spécificité de proSAAS envers PC1/3.

9.3.1.3. Le domaine C.T

Des expériences de surexpression, dans les cellules GH4 et CHO, visant à investiguer la maturation de la pro-rénine par différentes formes de PC1/3 ont montré que la présence du domaine C.T conduit à une diminution de la conversion de la pro-rénine en rénine. Ainsi, la co-expression de la prorénine avec la forme tronquée de PC1/3 (1-618), ne comportant pas de domaine C.T, conduit à la production de trois fois plus de rénine active comparé au contrôle ou la pro-rénine est co-exprimée avec la PC1/3 pleine longueur. Par ailleurs, la surexpression du domaine C.T de PC1/3 en *trans* conduit à une baisse de maturation de la prorénine en rénine par la PC1/3 tronquée (1-618) au niveau de la voie de sécrétion constitutive des deux types cellulaires. Ces résultats ont suggéré que le C.T pouvait avoir un rôle inhibiteur vis-à-vis de PC1/3 (Jutras et al., 1997), bien qu'aucune étude *in vitro* visant à caractériser cette inhibition n'ait été réalisée.

9.3.2. Inhibiteurs peptidiques

9.3.2.1. Inhibiteurs basés sur la prorégion

Un grand nombre d'études visant à exploiter le potentiel inhibiteur de la prorégion afin de générer des inhibiteurs puissants ont été menées. Ces études ont montré que les peptides dérivés de la prorégion pouvaient être divisés en deux catégories (i) les peptides issus de la portion N-terminale ou de la séquence interne de la prorégion, contenant le second site potentiel de clivage, étaient de très faibles inhibiteurs (ii) les peptides générés à partir de la portion C-terminale de la prorégion, premier site de clivage, sont très puissants. Ils présentent en général un K_i de l'ordre du nM mais ne sont pas sélectifs

envers leur enzyme d'origine car ils agissent de la même manière sur les autres convertases (Basak et al., 1998; Basak and Lazure, 2003; Boudreault et al., 1998a; Fugere et al., 2002; Lazure et al., 1998; Nour et al., 2003; Zhong et al., 1999).

9.3.2.2. Analogues peptidiques

Les analogues peptidiques sont des peptides de 10 à 20 acides aminés basés sur la séquence de la jonction entre la prorégion et le domaine catalytique qui contiennent des modifications en N-terminal (N-alcylation ou addition d'un groupement hydrophobe) et des acides aminés non naturels (ornithine ou citrulline) en P1 ou P1'. Ces peptides se sont avérés de très faibles inhibiteurs contre PC1/3 (Basak et al., 1994; Basak et al., 1995).

9.3.2.3. Inhibiteurs dérivés de bibliothèques combinatoires

Le criblage de bibliothèques combinatoires avec des peptides contenant un binôme Lys-Arg en P2 et P1 et des acides aminés variables aux autres positions a permis de générer des hexapeptides à potentiel inhibiteur variable. Ces études ont montré que la meilleure option en terme d'inhibition pour PC1/3 était la présence d'une Leu en P6, une Val en P3 et une Arg en P4 (Apletalina et al., 1998; Cameron.A et al., 2001). Encore une fois, ces peptides, bien que présentant des degrés d'inhibition différents pour les différentes convertases n'étaient pas très sélectifs.

9.3.2.4. Chlorométhanes

Les chlorométhanes sont des inhibiteurs très puissants (nM) de toutes les convertases. Ils agissent de façon compétitive et forment un lien covalent avec l'His du site actif. L'acétylation en N-terminal d'un octapeptide-chlorométhane a permis de générer un inhibiteur irréversible très puissant contre PC1/3 et Furine (Jean et al., 1995). Malheureusement, la toxicité de ce genre de composés limite son utilisation qu'à des fins de recherche fondamentale.

9.3.3. Inhibiteurs à base protéique modifiés

9.3.3.1. Antitrypsin Portland

Antitrypsin Portland ou α 1-PDX a été généré à partir de serpins, qui sont des inhibiteurs naturels de sérines protéases (SERine Proteinase INhibitor), par modification de la séquence en motif reconnu par la Furine (LEAIMPS359 $\rightarrow$ LERIMRS). Cet inhibiteur, très puissant contre la Furine (K_i 1.4 nM), inhibe efficacement PC1/3 *in vitro* (K_i 206 nM) (Jean et al., 1998). Par contre, il s'est révélé complètement inefficace contre cette dernière *in cellulo* (Benjannet et al., 1997).

9.3.3.2. Troisième domaine ovomucoïde de dinde (Turkey Ovomucoid Third Domain)

Basé sur le même principe que le précédent, cet inhibiteur de sérines protéases a été modifié pour présenter un motif reconnu par les convertases (KPACTLE $\rightarrow$ KPRCKRE). Ceci a conduit à la génération d'un faible inhibiteur contre Furine (Lu et al., 1993) et PC1/3 (Cameron.A et al., 2001).

9.3.3.3. Inhibiteurs de sérine protéase d'orge

La génération de petits peptides cycliques à partir de la boucle inhibitrice de l'inhibiteur de la sérine protéase d'orge de type 2 (BSPI-2) a permis de générer des inhibiteurs dans le bas μ M pour PC1/3. Ces inhibiteurs sont parfaitement réversibles et, encore une fois, ne présentent pas une forte discrimination entre PC1/3 et Furine. Cependant, l'introduction d'un lien aminométhylène non-scissile augmente sa spécificité pour la Furine (Villemure et al., 2003).

9.3.4. Inhibiteurs non peptidiques

Le criblage de bibliothèques de molécules chimiques ainsi que des agents actifs de plantes médicinales a permis d'établir que les diterpènes de la famille labdane, issus de la plante *Andrographolide paniculata*, ainsi que leurs dérivés succinoyl esters inhibent, avec des K_i allant μM au nM , la Furine, la PC1/3 et la PC7 (Basak et al., 1999, Jiao et al 2006).

10. Conclusion

Finalement, les études menées sur PC1/3 ainsi que sur les autres convertases ont permis de répondre à de nombreuses interrogations concernant le fonctionnement de cette famille d'enzyme. Néanmoins, il reste beaucoup à découvrir quant au rôle précis de chaque domaine et l'importance des variations présentes au niveau des domaines non conservés phylogénétiquement. Ceci étant primordial pour l'utilisation des convertases dans un but thérapeutique. La thèse, présentée ici, vise à caractériser la PC1/3 afin de mieux comprendre son fonctionnement et par ce fait le mode d'action des différents domaines de l'enzyme. L'étude présentée dans cette thèse touche la pro-région ainsi que le domaine C.T. De plus, afin d'atteindre l'objectif fixé il a fallu trouver un moyen pour améliorer la production de l'enzyme recombinante, jusqu'ici peu efficace.

Chapitre II: Article 1.

IMPROVED PC1/3 PRODUCTION THROUGH RECOMBINANT EXPRESSION IN INSECT CELLS AND LARVAE

Objectif de l'étude

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur la production de la prohormone PC1/3 dans un nouveau système. La caractérisation chimique et biophysique de l'enzyme est principalement limitée par la production d'une quantité suffisante de PC1/3 recombinante. À ce jour, différents systèmes d'expression ont été développés dans les cellules de mammifères et d'insectes. Ces systèmes, bien que adéquats pour la production de PC1/3, ne fournissent pas des quantités satisfaisantes pour la caractérisation structurale de l'enzyme. Dans le présent manuscrit, je démontre que la modification du vecteur d'expression dans les cellules d'insecte peut conduire à une augmentation de 125% de la production de PC1/3. De plus, je rapporte l'utilisation d'un nouveau système d'expression dans les larves d'insecte *Tricoplusia ni*. Cette nouvelle méthode simple et peu coûteuse conduit à la production de 30 ug de PC1/3 par larve et est également efficace pour la production de PC7, un autre membre de la famille des convertases.

Contribution des auteurs

Nadia Rabah: L'article représente le volet 'production de PC1/3' de mon projet de doctorat. J'ai conçu les constructions des vecteurs modifiés. J'ai produit, amplifié et titré les virus Baculo contenant les différentes constructions. J'ai mis en place la culture cellulaire et la culture des larves d'insectes dans le laboratoire. J'ai effectué l'infection des cellules et des larves d'insectes. J'ai mené toutes les analyses enzymatiques et biochimiques présentées dans cet article. J'ai écrit l'intégrité de l'article qui a ensuite été corrigé par mon directeur de thèse.

Daniel. J. Gauthier: Daniel a participé à l'entretien des larves dans le laboratoire.

Dany Gauthier: Dany a participé à la purification de l'enzyme recombinante obtenue suite à l'infection des larves d'insectes.

Dr.Claude Lazure: Directeur du laboratoire. Unité de recherche structure et métabolisme des neuropeptides à IRCM. Superviseur de la thèse présentée ici.

ABSTRACT

Protein convertase 1/3 is a serine endoproteinase present in the regulated secretory pathway of endocrine and neuroendocrine cells. It is responsible for the processing of numerous prohormones and proneuropeptides into their biologically active moieties, often following cleavage at pairs of basic residues. The determination of its three-dimensional structure, as well as the understanding of its enzymatic properties would greatly benefit from the production and availability of large amounts of recombinant enzyme. We report herein improvements in the production of PC1/3 by expressing recombinant mutated forms in both insect cells (*Spodoptera frugiperda*, Sf9 cells) and larvae (*Trichoplusia ni* commonly referred to as cabbage looper). On one hand, we deleted the last 135 COOH-terminal residues of mPC1/3 and on the other hand, we replaced the signal peptide of mPC1/3 by the viral glycoprotein gp67 signal peptide. These modifications were shown to improve markedly (up to 125%) the secretion into the Sf9 cells medium and the amount of enzymatic activity recovered when compared to the original vector. Moreover, intracoelemic injection of the vectors into insect larvae led to the production and purification of enzymatically active enzyme at a level of 30 µg/larva in the case of mPC1/3 and to the production of high amount of another enzymatically active convertase, PC7. The optimal viral titer for infection of larvae was determined to be 10⁶ pfu/ml. Taking into account the purification protocol combined with the ease and efficiency of using larvae, it should now be possible to meet the needs for biochemical and structural studies.

Key Words: convertase; PC1/3, SPC3, enzyme expression; insect system.

1. Introduction

Proprotein convertases (PCs)² are serine endoproteinases structurally and functionally related to the bacterial subtilisin and the yeast kexin super-family. They are involved in the processing of numerous proproteins, prohormones and proneuropeptides in the constitutive and in the regulated secretory pathways. Hence, they are implicated in various biological processes such as complement activation, angiogenesis, pathogen infections, and tissue remodeling [reviewed in (Taylor et al., 2003)]. Proprotein convertase 1/3 (PC1/3, also known as PC1 or SPC3), is present and is enzymatically active initially in the Golgi network as an 87 kDa form and then as a COOH-terminally truncated form of 66 kDa in the secretory granules of endocrine and neuroendocrine cells. It cleaves COOH-terminal to pairs of positively charged amino acids in various protein precursors such as proinsulin, proglucagon and proopiomelanocortin. These peptides act in turn through specific receptors implicated, for example, in skin pigmentation, adrenal steroidogenesis, thermoregulation, feeding behavior and obesity (Castro and Morrison, 1997; Clark et al., 1993a; Robbins et al., 1993; Chen et al., 1997; Zhu et al., 2002a; Boutin and Froguel, 2001). In humans, PC1/3 deficiency leads to an early onset obesity, hyperproinsulinemia, a mild adrenal cortical deficiency and hypogonadotrophic hypogonadism leading to sterility (Jackson et al., 1997). Moreover, PC1/3 mRNA and protein levels are up-regulated in certain types of lung cancer often leading to associated Cushing's syndrome, due to the increase in ectopic adrenocorticotropin (ACTH) production (Bertagna, 1994). The difficulties encountered in producing sufficient amount of active PC1/3 has precluded its three dimensional structure determination as well as prevented the detailed analysis of the various domains composing its structure.

The expression of recombinant PC1/3 has been carried out by different groups in various mammalian expression systems and this led to the production of an active enzyme in various state of purity and often in a limited quantity (10-13). So far, the most efficient system for PC1/3 production consists of the use of baculovirus/insect cell expression system. In this system, the virus allows a high level of expression of the recombinant gene whereas the insect cells provide the required machinery for post-translational modifications (O'Rahilly et al., 1992). In our hands, this system has enabled production of purified enzymatically active enzyme at a level of 1mg/L of medium (Boudreault et al., 1998b). However, the major limitation arising from the use of infected Sf9 insect cells by a baculovirus coding for the recombinant preproPC1/3 resides in the intracellular accumulation of the majority of the

produced enzyme in inclusion bodies (representing circa 50mg/L of medium). Though this enzyme can be recovered from these entities, it remains completely enzymatically inactive due essentially to the use of drastic conditions in order to render it soluble and the inability to refold it correctly (Lazure *et al.* unpublished data). In order to circumvent this problem, two major modifications of the baculovirus:PC1/3 expression vector were carried out. Firstly, the last 135 residues composing the COOH-terminal tail of PC1/3 including a putative amphipathic helix was deleted and thus represents the naturally occurring 66 kDa form. This was done based upon results implying that the sorting of PC1/3 to the regulated secretory pathway (absent in Sf9 cells) could be accomplished through this helix (15) following interactions with cellular lipid components (16). Secondly, the signal peptide sequence (SP) of proPC1/3, enabling transfer of the nascent protein into the endoplasmic reticulum lumen and ultimately to the secretory pathway, was replaced altogether by the sequence of the signal peptide of the viral glycoprotein gp67 (Fig. 1). The gp67 is a glycoprotein of the viral envelope, required for the penetration of the insect virus into the cells by adsorptive endocytosis. Once the cell is infected, a large amount of the gp67 protein is produced and incorporated to viral peplomers (Whitford et al., 1989). This was done in view of our previous result indicating that the material present in inclusion bodies is heterogeneous and contains a significant amount of uncleaved preproenzyme as well as proenzyme (18) hinting that, possibly, the mammalian signal peptide was not recognized by the endogenous signal peptidase very well.

Finally, in an effort to optimize and maximize the production of PC1/3, infection of both insect cells (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) and insect larvae (*Trichoplusia ni*) was carried out using baculoviruses encoding four recombinant preproPC1/3 constructs. This report describes the results obtained while monitoring the effects of the modified expression vectors upon production in insect cells and in insect larvae.

2. Materials and Methods

Cells and larvae: *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells were purchased from GIBCO/Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada) and propagated in SF-900 II serum free medium, supplemented with 1.25 µg/ml of gentamicin sulfate (Biowhittaker, Walkersville, MD, USA). *Trichoplusia ni* larvae were a generous gift from Peter M. Ebling (Natural Resources Canada - Canadian Forest Service, Sault Ste. Marie, Ontario, Canada). Larvae were grown, using a

day/night cycle of 16h/8h, to the fifth instar stage at room temperature in small cups containing moist lepidopteran artificial diet. To prevent overcrowding and to allow larvae to reach the various developmental stages in synchrony, larvae were either distributed in cups or kept in cold (4°C) for a few days.

Construction of baculovirus expression vectors: The baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) vectors (pVL1392 and pAcGP67A) and the BaculoGold DNA were purchased from Pharmingen (San Diego, CA, USA) and manipulated according to the manufacturer's protocol. In order to generate the pVL-1392 full-length PC1/3 (pVL-PC1/3) and COOH-truncated PC1/3₆₁₈ (pVL-PC1/3-ΔC), the murine cDNAs for either form were cloned into the EcoR1 and Sma1 sites, using previously described methods (Sambrook and Russell, 2001). The COOH-terminally truncated form represents the first 618 amino acids of the proenzyme and was generated by PCR using the following oligonucleotide primers:

5'-GGATCCCAAGAGGCAGTTTGTTAATGAATGG-3'

and

5'-GCGGCCGCCTAGTCATTCTGGACTGTATTGTAGGA-3'.

The cloning of the recombinant PC1/3 forms into the pAGP67A vector was done as follows. Firstly, the cDNA for each form was cloned into the EcoRI and BglII sites of the vector generating (gp67/SP-PC1/3) and the (gp67/SP-PC1/3-ΔC), vectors that contain PC1/3 constructs preceded by both gp67 and native PC1/3 signal peptides. Secondly, a PCR-generated fragment containing the proregion and part of the catalytic domain was produced using the following oligonucleotide primers:

5'-GGATCCCAAGAGGCAGTTTGTTAATGAATGG-3'

and

5'-CGTTAAAATCATAGCTAGCCTCTGGATCATAATTGGC-3'.

The first one encompasses the first oligonucleotides of the proregion preceded by the BamH1 site. The second one corresponds to an internal Nhe1 site naturally occurring in the catalytic domain. This PCR fragment was used to replace the original signal peptide sequence preceded by a BamH1 site, present in the vector, creating gp67-PC1/3 and gp67-PC1/3-ΔC constructs respectively (Fig.1). All the enzymes used for the cloning were purchased from Invitrogen (Burlington, Ontario, Canada).

Baculovirus infections of insect cells and larvae: The baculovirus recombinant vectors were co-transfected with BaculoGold DNA into insect Sf9 cells and amplified several times at a m.o.i. of less than 1. Viral titers were estimated by the end-point dilution assay, in a 96 wells culture dish, as described (O'Rahilly et al., 1992). Since the BaculoGold DNA contains a lethal deletion and does not code for viable virus, the BaculoGold recombinants are greater than 99% of the total virus population and plaque purification is not routinely required.

Sf9 cells were infected at a m.o.i. of 20 in 15 ml of medium for 1 h. Then, the cells were diluted to a final concentration of 3×10^6 cells/ml. The medium was harvested after 36 h of incubation at 27°C in a temperature-controlled incubator under constant but gentle agitation (model Innova 4230, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) (Boudreault et al., 1998b).

The insect larvae were first grown at room temperature and on artificial diet to the fifth instar larval stage, characterized by a less than 2 mm head measurement and a 2 cm total body length. At this stage, the larvae were chilled on ice for 10min and 20µL of the viral solution at 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 pfu/ml were injected into the hemocoel using a syringe fitted with a 30.5 gauge needle. The larvae were then transferred individually (5 larvae for each viral solution) into plastic cups containing the artificial diet. After three days, at which time discoloration and appearance of darkened skin areas were readily apparent in infected larvae, 10 µL of hemolymph was taken from each larva and larvae were afterwards immediately frozen at -80°C.

Purification of PC1/3 from insect larvae: Frozen larvae, infected with the pVL-PC1/3 virus at 10^6 pfu/ml corresponding to the highest enzymatically active preparation as previously determined, were added to the extraction buffer (10mM sodium acetate, pH 6.4 containing 2mM EDTA, 8mM benzamidine, 10mM 6-aminocaproic acid and 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and homogenized on ice. The homogenate was clarified through centrifugation at 15 000g for 30 min at 4°C and the material in the supernatant assayed immediately for enzymatic activity. All purification steps were then carried out at 4°C as described in (Boudreault et al., 1998b). Briefly, the total proteins in the supernatant are precipitated overnight with 30% of polyethyleneglycol 4000 (PEG-4000, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, Ontario, Canada) under constant moderate rotation. The precipitate is

centrifuged for 30 min at 8 000g then is resuspended in 25mM sodium acetate, pH 6.0, (buffer 1). The insoluble material is removed by centrifugation at 27 000g for 15 min and the supernatant incubated 1 h, under gentle agitation, with 8 ml of concanavalin A-Sepharose (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada) previously equilibrated in buffer 1 containing 1mM CaCl₂. The resulting suspension is poured into a column and is washed with 10 volumes of buffer 1 prior to eluting the adsorbed proteins with 250mM α -methylglucopyranoside. The eluted material is then passed through a 5 ml hydroxylapatite column (Bio-Rad, Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). The column is washed with 5 volumes of buffer 1 and the adsorbed proteins are eluted with 50mM sodium acetate, pH 6.0 containing 250mM K₂HPO₄, pH 6.0. The proteins are then precipitated overnight at 4°C after adding solid ammonium sulfate to 90% saturation (603g/L). After a 30 min centrifugation at 15 000g, the pellet is dissolved in 1 ml of 50mM Bis-Tris, pH6, containing 50mM NaCl, filtered and applied to a Superose-12 column (Amersham Biosciences) operated at a constant 0.5 ml/min flow rate through an Äkta FPLC (Amersham Biosciences) at 4°C. The elution was constantly monitored using UV-absorbency at 280 nm as well as conductivity; fractions of 0.5 ml were automatically collected and assayed for enzymatic activity.

PC1/3 enzymatic activity: Enzymatic assays were performed at room temperature in a final volume of 100 μ L in black 96 wells flat bottomed plates (Corning Inc. Life Sciences, Acton, MA, USA) using 100 μ M of the fluorogenic substrate pGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA (Peptides International, Louisville, KY, USA). The final assay conditions were 100mM sodium acetate buffer, pH 6.0, with 10mM CaCl₂. The fluorescence of the 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) released was measured using an excitation and an emission wavelength of 370 and 460 nm, respectively, using a SpectraMax Gemini EM spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, Ca, USA). The amount of AMC released was calculated from a standard curve. Protein content was determined by the colorimetric method of Bradford using bovine serum albumin (BSA) as standard protein.

Western blotting: Gel electrophoreses were performed on 1.5mm thick 10% SDS polyacrylamide gels. For each viral construct, 10 μ g of proteins, as determined using the Bradford protein assay, were loaded. Proteins were transferred overnight onto an Immobilon-P membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) at 20V and at 4°C. The membrane was incubated 1 h at room temperature in 5% (w/v) skim milk diluted in TBS buffer (20mM Tris, pH 7.6, 137mM NaCl) containing 0.1% Tween 20 (v/v) and then for 1.5 h in the same buffer

containing either the polyclonal PC1/3 NH₂-terminal-directed antibody (#7690) at a final dilution of 1/10 000 or the polyclonal PC1/3 COOH-terminal directed antibody (#9212) at the same dilution (10). The membrane was washed 2x5 min and 1x15 min with the TBS-Tween buffer and incubated 1 h with goat anti-rabbit IgGs coupled to horseradish peroxidase (Chemicon International, Temecula, CA, USA) at a final dilution of 1/5 000 in milk solution. The immunoreactive proteins were revealed by ECL plus detection (Amersham Biosciences) and the resulting chemiluminescence recorded using a Kodak X-ray film.

3. Results and Discussion

Enhanced production of PC1/3 in Sf9 cells: Immunoreactive PC1/3 was easily detected in the medium of Sf9 cells infected with all the baculovirus constructs (Fig.2). The secretion into the medium of the shorter COOH-terminal truncated PC1/3 coded for by either the pVL or the gp67 vectors is enhanced (up to 125%) when compared to the secretion of the full length recombinant enzyme (Fig. 2). In mammalian cells, PC1/3 is synthesized as a large precursor that undergoes proteolytic processing of its signal peptide, its proregion and ultimately part of its COOH-terminal tail, to generate the enzymatically active form. The cleavage of the signal peptide occurs early in the endoplasmic reticulum and generates the zymogen proPC1/3. This form, once glycosylated and sulfated moves to the Golgi apparatus where the cleavage of the proregion occurs, at the amino acid sequence RSKR₁₀₉ in an autocatalytic fashion (Goodman and Gorman, 1994). The resulting 87 kDa active form is then further processed in the secretory granules, at the arginine₆₁₈, to the 66 kDa mature form. The two enzymatically active forms cleave various PC1/3 substrates in the appropriate cellular compartments (Boudreault et al., 1998a; Bergeron et al., 2000).

The baculovirus encoded recombinant enzyme however is produced in two enzymatically active forms differing from the mammalian forms by their respective apparent molecular weights being 85 kDa and 71 kDa respectively (10). Various studies suggested that the COOH-terminal region of PC1/3 is implicated in the sorting of the enzyme to the regulated secretory pathway. Indeed, it was previously shown that, as a consequence of its removal, the protein is directed to the constitutive pathway of secretion and can no longer interact with lipid rafts (Blazquez et al., 2001). Given that Sf9 cells do not possess a defined regulated secretory pathway, our results could nevertheless indicate that truncation of the COOH-terminal tail of PC1/3 minimizes interaction of the recombinant protein with lipid

components. Indeed, secretion of the COOH-terminal truncated form, (pVL-PC1/3- Δ C and gp67-PC1/3- Δ C) irrespective of the signal peptide used is enhanced from Sf9 cells when compared to the full-length enzyme (pVL-PC1/3 and gp67-PC1/3). Furthermore, we noticed not only an increase in the amount of immunoreactive material but also an increase in enzymatic activity in the medium. The PC1/3 enzymatic activity, as assayed in the medium of infected cells is 100% and 62.5% higher in the Δ C constructs than the activity measured with the full-length enzyme for pVL and gp67 vectors respectively (pVL-PC1/3 and gp67-PC1/3) (Fig.3). However, as observed previously (Boudreault et al., 1998a), it should be mentioned that the COOH-terminally truncated enzyme is less stable in the medium and, hence, it necessitates harvesting the medium at shorter post-infection times and immediate purification.

The substitution of PC1/3 native SP by the viral glycoprotein signal peptide gp67 enhanced more than 2 times the secretion of the full-length and truncated enzymes (Fig. 2). The PC1/3 activity is higher following infection with the full length (gp67-PC1/3) and truncated (gp67-PC1/3- Δ C) enzymes harboring the gp67 signal peptide than with the native prePC1/3 signal sequence (pVL-PC1/3 vector). Moreover, as shown in Fig. 3, the enzymatic activities of pVL-PC1/3- Δ C and gp67-PC1/3- Δ C are not significantly different indicating possibly that the effect of the gp67 signal peptide insertion is not additive to the contribution of the truncation. However, the enzymatic activities of either truncated forms could very well be underestimated due to their previously reported decreased stability at acidic pHs (Boudreault et al., 1998a).

Nevertheless, it appears that, in our case, the substitution of native mammalian signal peptide for an insect signal peptide sequence was beneficial in terms of amount of protein secreted as well as enzymatic activity recovered in the medium. Indeed, numerous examples demonstrated that substituting signal peptides can exhibit both beneficial and deleterious effects. For example, the SP from honeybee prepromellitin seems to be very efficient for the secretion of the plant cysteine proteinase zymogen, propapain, (Tessier et al., 1991) though the same SP failed to enhance the secretion of the human tissue plasminogen activator (h t-PA) (Jarvis et al., 1993) and completely prevented the secretion of β -galactosidase (Tessier et al., 1991). However, the production and secretion of HIV-1 gp120 is markedly improved using the SP coding regions derived from two baculovirus proteins, an ecdysteroid UDP

glucosyltransferase and the envelope glycoprotein gp67 (Murphy et al., 1993). Such observations were also made in other expression systems as well. For example, the native signal sequence of the α -factor, a yeast peptide pheromone, was used beneficially to increase the secretion of recombinant proteins from yeast *Pichia pastoris* (Koganesawa et al., 2001). Similarly, in *Saccharomyces cerevisiae*, a high level of secretion for human alpha-1-antitrypsin is obtained using a signal sequence derived from inulinase of *Kluyveromyces marxianus* (Kang et al., 1996). Bacterial alkaline protease signal peptide was also exploited to increase production and secretion of proinsulin in *Bacillus subtilis* (Olmos-Soto and Contreras-Flores, 2003).

Finally, selective mutations of the signal peptide sequences in both eukaryote and prokaryote expression systems, revealed that done in the vicinity of or at the cleavage site, these changes are recognized by the signal peptidase and could enhance the secretion efficiency (Ravn et al., 2003)). In the context of the present study, it is our conclusion that the viral gp67 SP is able to increase significantly PC1/3 secretion into the medium though further studies are necessary to demonstrate without ambiguity that its secretion was previously limited by its own signal peptide.

Expression of PC1/3 in insect larvae: The use of insect larvae was previously shown to be a powerful and low cost tool for the production of various recombinant proteins such as hepatitis E virus capsid protein (Sehgal et al., 2003), goldfish growth hormone I (Lin et al., 1997) and adenosine deaminase (Medin et al., 1990). In the last case, 8-9 mg of homogeneous enzyme was obtained from 22 larvae. The method was also shown to be successful for the production of membrane proteins such as the cardiac sodium-calcium exchanger (NCX1) yielding 2 μ g of NCX1/larva (Hale et al., 2002). Herein, *Trichoplusia ni* larvae were infected with the four baculovirus constructs coding for preproPC1/3 at the fifth instar stage and harvested 3 days after injection. The enzymatic activity as well as the content of produced PC1/3 was monitored in total extracts as well as in the hemolymph of the infected larvae. To test if the enzymatic activity of PC1/3 produced in the larvae was dependent on the number of the viral particles, varying amounts of viruses were used (from 10^4 to 10^7 pfu/ml). The optimal amount of the virus was found to be 10^6 pfu/ml (Fig. 4) for both pVL-PC1/3 and gp67-PC1/3. Similar results were obtained for the two PC1/3 COOH-terminal truncated forms (pVL-PC1/3- Δ C and gp67-PC1/3- Δ C) both in larvae extract and in

the hemolymph (data not shown). We can notice that the control larvae, infected with the wild type baculovirus, have an endogenous convertase-like activity significantly lower than that observed with the recombinant viruses. This enzymatic activity could very well be related to *Trichoplusia ni* endogenous furin in a manner reminiscent to the previously identified endogenous *Spodoptera frugiperda* furin (Cieplik et al, 1998). Furthermore, in larvae, the enzymatic activity obtained with the pVL virus is 2 fold higher than the one obtained with the gp67 virus and this is contrary to what we observed while using Sf9 cells. This could be due to the fact that the gp67 SP peptide may be recognized differently in Sf9 cells (of insect ovarian origin) and in the various infected cells of the larvae. Alternatively, slower production or processing as observed in Sf9 cell culture might be an advantage once applied to a whole insect organism. In all cases, the activity tends to decrease at 10^7 pfu/ml of virus probably because the high amounts of viruses become toxic to the larvae resulting in increased cell death or because the endogenous protein machinery becomes saturated.

To further document the feasibility of using insect larvae, we investigated whether our previously described purification protocol (Boudreault et al., 1998a) could be adapted. The results obtained are summarized in Table 1; which lists the purification steps, the protein quantity, the volume and the enzymatic activity present in each fraction. Briefly, the proteins in the crude extract were precipitated with 30% (W/V) of polyethylene glycol then applied to a concanavalin A-Sepharose column. These combined steps allowed the elimination of more than 90% of the total proteins and resulted in a 10-fold increase in the specific activity of our enzyme. In addition, this chromatographic step is able to eliminate the green color of the original larvae extract, which potentially could interfere with the colorimetric protein assay. The total PC1/3 activity, after the first column, increased two times probably due to conversion of the 85 kDa form into the mature 71 kDa form as evidenced by the appearance of the 71kDa form in the concanavalin-A fraction (Fig. 5 sample 3). The two last steps allowed further purifying of the enzyme as indicated by the 18 fold and 50 fold increase of the specific activity following purification on the hydroxylapatite and the Superose columns respectively. It is worth mentioning that, in contrast to the Sf9 cells whereby both 85kDa and 71kDa are present at harvesting, only the 85kDa form appears to be present in the larvae homogenates though, as can be seen herein, it will convert itself in the 71kDa form. If needs be, this conversion can be prevented by conducting the purification using buffers at pH 8.0 or higher, by including 10mM of EDTA in the buffers or by incubating in the presence of

100nM of the bacterially produced (data not shown) PC1/3 propeptide known to inhibit in a potent manner PC1/3 (Boudreault et al., 1998b).

In conclusion, we report that the COOH-terminal truncation of PC1/3 and the substitution of the mammalian signal peptide by an insect signal peptide were beneficial and improved secretion of both active forms of the enzyme into the Sf9 cells medium. The production of PC1/3 by this method is relatively straightforward and though, requiring specialized tissue culture equipment, can easily be managed at a low scale level but would likely need significant modifications to be adapted at the level of, for example, a bioreactor. Thus, we further investigated the production of PC1/3 in *Trichoplusia ni* larvae. We conservatively estimate, that in our hands this system allows the production of at least 30 µg of purified enzyme/larva. Considering that larvae are commercially available, easily kept, maintained and are ready to infect within 10 days following reception, this approach is certainly worth pursuing in terms of increasing production of the enzyme. Furthermore, we have tested this approach for the production of another member of the convertase family, a COOH-truncated form of PC7, a convertase normally broadly distributed and located at the surface of plasma membranes of neuronal cells (Rabah et al., 2001). The presence of PC7 in the infected larvae was detected using polyclonal PC7 specific antibodies. Furthermore, a very high amount of PC7 enzymatic activity was easily and directly detected in the crude larval homogenate, and this activity was fully inhibited by proteinase inhibitors such as EDTA and CuSO₄ at 10 and 1mM, respectively (data not shown) (Rabah et al., 2001). In conclusion, modifications in the vectors and the hosts have enabled improvements in the production of enzymatically active PC1/3 and this should enable further studies including determination of its three-dimensional structure and determination of the roles of its various domains to be pursued.

4. Acknowledgments

We would like to thank M. Peter Ebling (Canadian Forest Services) for the generous gift of insect larvae and Dr J. S. Munzer (IRCM) for the PC7 baculovirus construct. This study was supported through a Canadian Institute for Health Research (CIHR) grant (MT-14766). In addition, DJG and NR are supported through CIHR and NSERC studentships respectively.

TABLE 1
Summary of PC1/3 purification from insect larvae^a

Purification Step	Total Volume ml	Total protein Mg	% Yield Protein	Enzymatic Activity $\mu\text{M}/\text{h}/\text{ml}$	Total Enzymatic Activity $\mu\text{M}/\text{h}$ ($\times 10^6$)	Specific Enzymatic Activity $\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}$	Specific Enzymatic Activity Fold Increase
Crude Extract	13.5	192.5	100.00	777.4	0.105	54.5	-
PEG precipitation	50.0	82.5	42.90	207.6	0.104	125.8	2.3
Concanavalin A	50.0	40.0	20.80	420.0	0.200	525.0	9.6
Hydroxylapatite	28.8	5.8	3.00	196.4	0.060	982.1	18.0
Superose	1.5	0.15	0.08	225.8	0.004	2667.0	48.9

Note:

^a: Five insect larvae infected at 10^6 pfu using pVL-PC1/3.

5. Legends to Figures:

Figure 1: *Scheme for the construction of gp67-PC1/3 and gp67-PC1/3-ΔC vectors.*

The murine cDNAs corresponding to the full length PC1/3 and the COOH-truncated form, PC1/3-ΔC, were ligated directly into the EcoR1 and BglII sites of the pAcGP67 vector yielding respectively the gp67/SP-PC1/3 and the gp67/SP-PC1/3-ΔC vectors. A PCR product indicated (1) and containing the proregion and a part of the catalytic domain, was generated. The native signal peptide (SP) was then removed, as indicated (2), by substituting the fragment containing the native signal peptide, the proregion and part of the catalytic domain with the PCR product yielding the desired (3) gp67-PC1/3 and gp67-PC1/3-ΔC vectors respectively (see Materials and Methods for more details).

Figure 2: *Production of PC1/3 in insect cells.*

The insect Sf9 cells were infected with the baculovirus coding for recombinant PC1/3 at a m.o.i. of 20. After 36 h post infection, the cell culture medium was collected and an aliquot corresponding to 10 μg of proteins was analyzed on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Following transfer of the separated proteins onto a PVDF membrane, the detection of PC1/3 was accomplished using an anti-NH₂-terminal PC1/3 antibody (#7690) and the immunocomplex was detected by ECL plus.

Figure 3: *PC1/3 Activity in the medium of Sf9 cells.*

Cells were grown at 27°C in Sf 900-II serum-free medium. The infection was carried out at a density of 3×10^6 cells/ml with baculoviruses containing the four mPC1/3 constructs at a m.o.i. of 20 as described in the Materials and Methods section. After 36 h of incubation, PC1/3 enzymatic activity in the medium of infected cells was measured using the fluorogenic substrate, pGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA, at a final concentration of 100 μM. The reaction mixture consisted in 50mM sodium acetate (pH 6.0), 10mM CaCl₂, in a final volume of 100 μl. The released fluorescence was measured with a spectrofluorometer at room temperature. Each data point is the mean value derived from assays done in duplicate of two separate infections.

Figure 4: *PC1/3 enzymatic activity in larvae following infection with varying amounts of viruses.*

Larvae were infected at 10^4 , 10^5 , 10^6 , and 10^7 pfu/ml of each virus. Three days after the injection, PC1/3 enzymatic activity was measured using the fluorogenic substrate, pGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA, at a final concentration of 100 μM. The released fluorescence was measured at room temperature and each data point is the mean value derived from assays done in triplicate. The infection of larvae with various PC1/3 baculoviruses was carried out three times.

Figure 5: *Immunodetection of PC1/3 in larvae extract.*

An aliquot corresponding to 1 μg of proteins following each step of purification was analyzed on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Following transfer of the separated proteins to a PVDF

membrane, the immunoreactive forms of PC1/3 were detected using an anti-NH₂-terminal (bottom panel) and an anti COOH-terminal (top panel) PC1/3 antibody and the immunocomplexes detected by ECL plus. Lanes: 1, Crude extract from pVL-PC1/3 infected larvae; 2, PEG precipitation step; 3, Concanavalin-A fraction; 4, Hydroxylapatite fraction; 5, Superose fraction; 6, Wild-type baculovirus infected larvae extract.

Figure 1

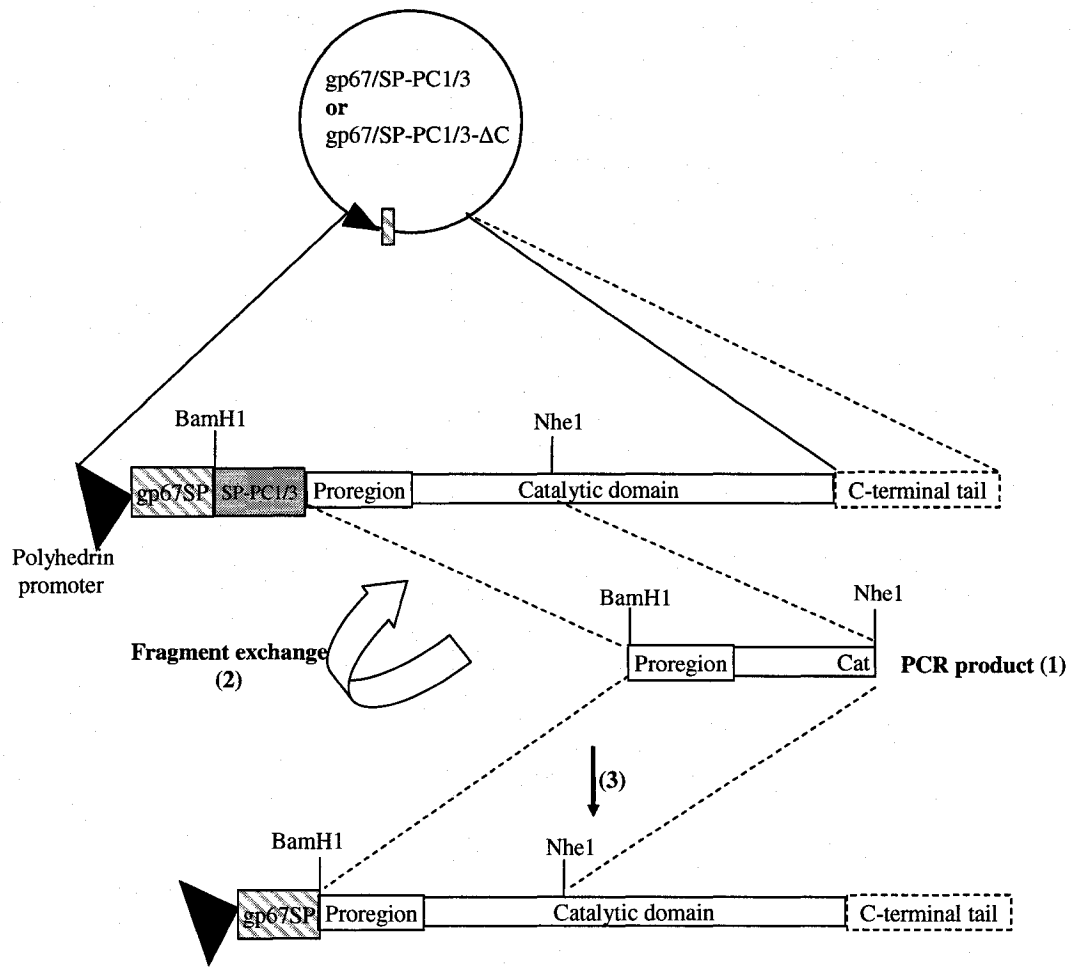


Figure 2

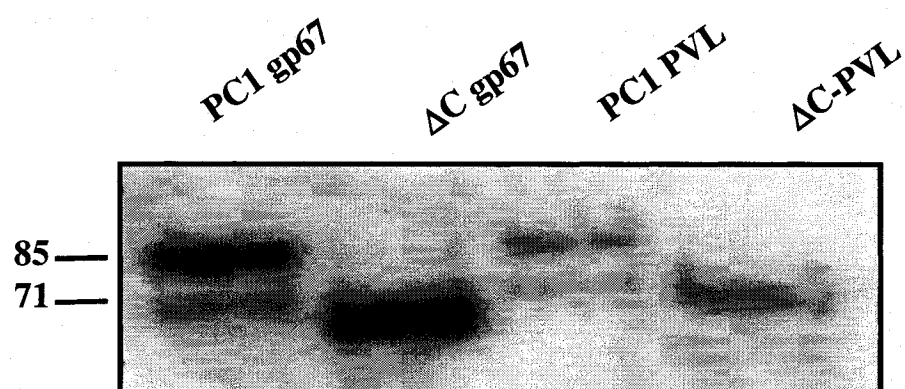


Figure 3

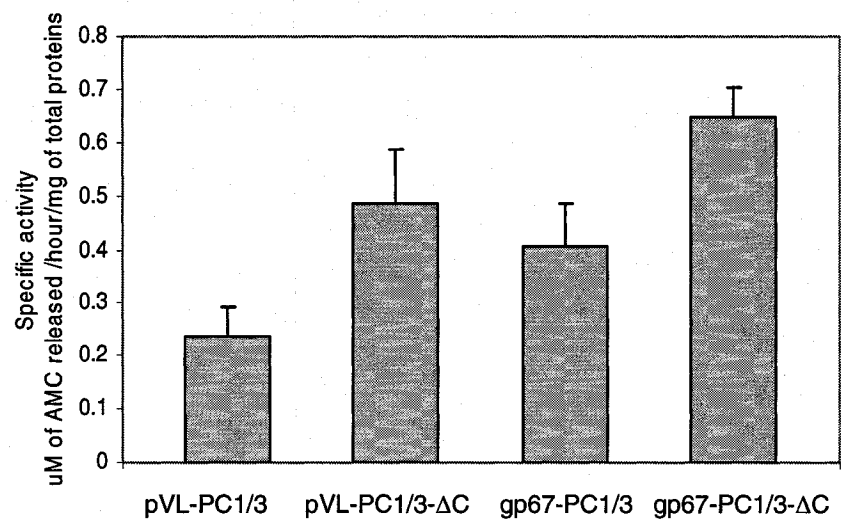


Figure 4

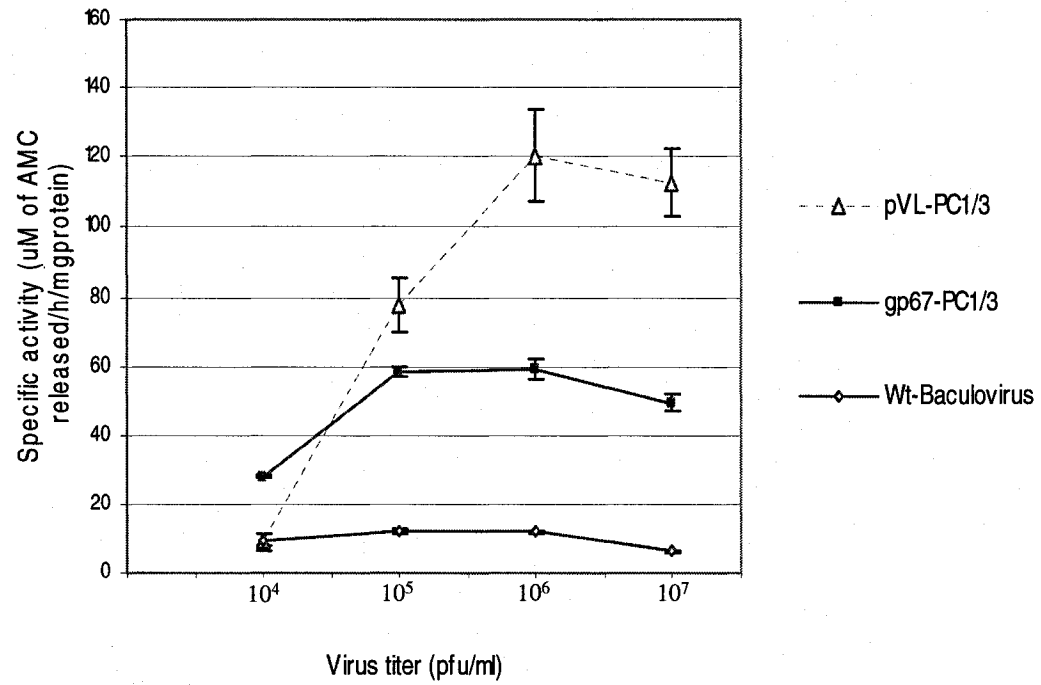
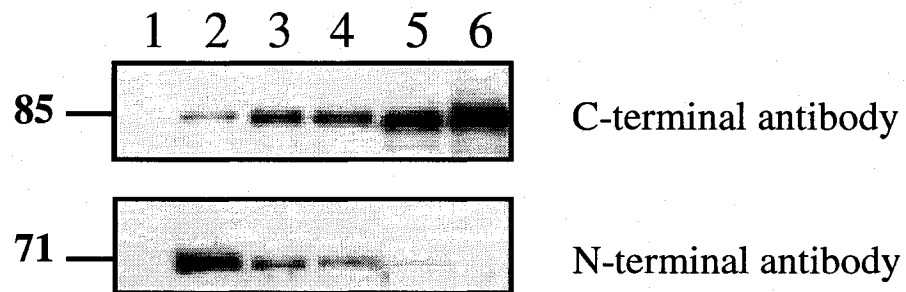


Figure 5



Chapitre III: Article II.

SINGLE AMINO ACID SUBSTITUTION IN THE PC1/3 PROPEPTIDE CAN INDUCE SIGNIFICANT MODIFICATIONS OF ITS INHIBITORY PROFILE TOWARD ITS COGNATE ENZYME

Objectif de l'étude

Le travail présenté dans ce manuscrit porte sur l'investigation du rôle de certains résidus de la prorégion de PC1/3 dans l'interaction et l'inhibition de l'enzyme. Ainsi une étude mutationnelle par substitution individuelle en alanine a été menée sur deux sites potentiels de clivage interne, reconnus par les convertases, (RRSRR54) et (KR62) ainsi qu'une région conservée entre espèces mais spécifique à PC1/3 (DDD67). Les mutants générés présentent différents comportements et potentiels inhibiteurs vis-à-vis de PC1/3 et de la Furine, une autre convertase. Les données présentées ici démontrent pour la première fois que la substitution d'un seul acide aminé peut conférer une certaine spécificité envers les différentes convertases et compenser, ainsi, pour le manque de sélectivité d'inhibition de la prorégion. Par ailleurs, ce manuscrit montre, pour la première fois, des évidences expérimentales permettant de cartographier avec exactitude le site de dégradation interne de la prorégion de PC1/3. De plus, les résultats indiquent que, contrairement à ce qui a été antérieurement postulé, les convertases peuvent discriminer entre différents substrats *in vitro*, puisque le troisième site de clivage interne n'est pas reconnu par PC1/3 alors qu'il est facilement clivable par la Furine.

Contribution des auteurs

Nadia Rabah : L'article porte sur la caractérisation de la prorégion de PC1/3. J'ai conçu les constructions des différents mutants. J'ai produit l'enzyme recombinante. J'ai produit et purifié tous les peptides de prorégion présentés dans cet article. J'ai mené toutes les analyses enzymatiques et biochimiques présentées dans cet article. J'ai analysé les données cinétiques. J'ai écrit l'intégrité de l'article qui a ensuite été corrigé par mon directeur de thèse.

Dany Gauthier : Dany a participé à la purification de l'enzyme recombinante obtenue suite à l'infection des cellules ainsi que des larves d'insectes. Dany a également mené les expériences d'hydrolyse acide permettant de déterminer la concentration des différents peptides.

Dr. Brian. C. Wilkes : Unité de recherche en biologie chimique et des polypeptides à l'IRCM. Le Dr. Wilkes a contribué à l'article en modélisant les interactions entre la prorégion et l'enzyme.

Daniel. J. Gauthier : Daniel a soumis des échantillons des différentes prorégions à la spectrométrie de masse.

Dr.Claude Lazure: Directeur du laboratoire. Unité de recherche structure et métabolisme des neuropeptides à IRCM. Superviseur de la thèse présentée ici.

ABSTRACT

The proprotein convertase PC1/3 is synthesized as a large precursor that undergoes proteolytic processing of the signal peptide, the propeptide and ultimately the COOH-terminal tail, to generate the mature form. The propeptide is essential for protease folding and although cleaved by an autocatalytic process, it remains associated with the mature form acting as an auto-inhibitor of PC1/3. To further assess the role of certain residues in its interaction with its cognate enzyme, we performed an alanine scan on two PC1/3 propeptide potential cleavable sites (RRSRR₅₄ and KR₆₂) and an acidic region DDD₆₇ conserved among species. Upon incubation with PC1/3, the ensuing peptides exhibit equal inhibitory potency, lower potency or higher potency than the WT propeptide. The K_i values calculated varied between 0.15 and 16.5 nM. All but one mutant exhibited a tight binding behavior. In order to examine the specificity of mutants, we studied their reactivity towards furin, a closely related convertase. The mutation of certain residues also affects the inhibition behavior toward furin yielding propeptides exhibiting K_i ranging from 0.2 to 24 nM. Mutant propeptides exhibited against each enzyme either different mode of inhibition, enhanced selectivity in the order of 40 fold for one enzyme or high potency with no discrimination. Hence, we demonstrate through single amino acid substitution that it is feasible to modify the inhibitory behavior of propeptides towards convertases in such a way as to increase or decrease their potency, modify their inhibitory mechanisms as well as increase their selectivity.

1. Introduction

One of the most common ways used by cells to diversify the pool of their biologically active molecules is accomplished through protein processing. Indeed, numerous secreted proteins are synthesized first as an inactive precursor, which is rendered biologically active upon cleavage at clusters of basic residues. Members of a family of proteins named proprotein convertases (PCs)¹ primarily perform this cleavage. To date, seven members were described: furin, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6 and PC7/PC8/LPC. Some of them are ubiquitously expressed such as furin, PACE4 and PC7 whereas others exhibit a more restricted expression pattern such as PC1/3 and PC2, which are solely present in endocrine and neuroendocrine tissues, and PC4, which is expressed only in germ cells. However, all of them belong to the larger family of serine proteases and are structurally related to bacterial subtilisin and yeast kexin (reviewed in ref. (Bergeron et al., 2000)). In terms of biological activities, numerous transfection experiments using recombinant enzymes and substrates, generation of knock-out animals as well as human cases of convertase deficiency pointed out the importance of convertases in crucial biological processes such as patterning during embryogenesis, angiogenesis, prohormone processing, tissue remodeling and complement activation (Taylor et al., 2003). Furthermore, some members are also implicated in many disease states since they are able to activate various bacterial toxins and to process viral envelope glycoproteins needed for cell penetration (Thomas, 2002). For all these reasons convertases represent attractive therapeutic targets.

Structurally, they share common features such as the presence of (i) a signal peptide guiding the protein to the secretory pathway, (ii) a propeptide (alternatively called prosegment, prodomain or proregion), implicated in enzyme folding and inhibition, (iii) a catalytic domain which possesses the classical catalytic triad Asp, His and Ser residues conserved among serine proteases, (iv) a P domain which appears to regulate Ca^{++} and pH dependency of the enzyme and finally (v) a COOH-terminal tail often defining the localization in organelles and cells. Such a topological distribution of structural regions makes a convertase an efficient self-controlled molecule whereby activation of its zymogen into its active form requires sequential removal of particular segments. This characteristic is best exemplified by the complex activation of PC1/3, which requires removal of the signal peptide, removal of the propeptide and further cleavage of the COOH-terminal tail.

Amongst these excised regions, the propeptide plays a pivotal role in enabling efficient functional expression of convertases. Indeed, not only does it prevent undue and untimely activation but also it is proposed to act as an intramolecular chaperone (IMC). Well documented with degradative subtilisins, this feat relies on intimate protein-protein interactions between the propeptide and its cognate enzyme. Hence, concomitantly with the interaction of the COOH-terminus of the propeptide where the primary cleavage site is located and the catalytic site, the propeptide could provide the enzyme with a template for acquiring the correct active conformation. However, this role though firmly established with subtilisins has not been widely documented in the case of convertases with the exception of results obtained from expression of chimaeric enzymes (Creemers et al., 1995; Zhou et al., 1995) and mutagenesis of some furin and PC2 propeptide residues (Bissonnette et al., 2004; Muller et al., 2000). According to Fu *et al* (Fu et al., 2000), the convertase propeptides are best classified as type I propeptides through their role in folding and inhibition of the enzyme. Following the correct folding of the active site, an autocatalytic process leads to cleavage of the propeptide, which can remain associated with the mature form, thus acting as an auto-inhibitor (Chapman et al., 1997; Lazure, 2002). Based upon the structural relatedness of proconvertases and prosubtilisins, it is predicted that a secondary cleavage site might exist within the propeptide. Indeed, such a secondary cleavage is present in the case of profurin (Anderson et al., 1997), prokexin (Powner and Davey, 1998) proPC1/3 (Boudreault et al., 1998a) and proPC2 (Muller et al., 2000). Proteolytic cleavage at this secondary site is responsible for disassembly of the enzyme-inhibitor complex and for preventing further inhibition of the cognate enzyme by an otherwise intact propeptide. In most instances, these cleavages are sufficient to generate fully active enzyme, an exception being the activation of proPC1/3, which requires further cleavage in the COOH-terminal region.

Propeptides in the various convertases represent the first 80 to 100 residues following the signal peptide. Unlike the very well conserved catalytic and P domains, they show very little sequence conservation except in their COOH-terminal portion. They contain multiple basic residues gathered in two regions namely, the region between positions 45 to 55 and the extreme COOH-terminus (Fig. 1)². The COOH-terminally located basic cluster is strongly conserved and represents the site of the first autocatalytic cleavage. In all other convertases, with the exception of PC7, basic residues containing regions represent the site of the second cleavage leading to the degradation of the propeptide and the release of the fully

enzymatically active enzyme. *In vitro* and over-expression studies showed, that mutations or removal of the COOH-terminal basic residues abolish the production of mature enzyme and prevent inhibition of the active protease by the propeptide. Studies conducted by various groups revealed that peptides derived from the middle portion (near the second cleavage site) and the NH₂-terminal domain of the propeptide were weak inhibitors whereas peptides derived from the first cleavage site are very potent competitive inhibitors, often in the nM range (Basak and Lazure, 2003; Anderson et al., 1997; Lazure et al., 1998; Zhong et al., 1999). Moreover, it was also shown that the longer the COOH-terminally derived peptides the better was their inhibitory capacity (Anderson et al., 1997; Basak et al., 1998; Zhong et al., 1999). Fugère and colleagues (Fugere and Day, 2002; Fugere et al., 2002), reported similar results upon investigating the inhibitory potency of all convertases propeptides against furin, PC5/6 and PC7. All these studies taken together indicate that the COOH-terminal portion of the propeptides confers a strong inhibitory potency but appears not to be very discriminative towards its cognate enzyme. Conversely, the remaining NH₂-terminal part of the propeptide appears to be responsible for improved selectivity as well as ensuring the tight fit necessary to form the propeptide-enzyme complex as seen with furin and proPC1/3.

Herein we investigate the ability of certain residues within the propeptide of PC1/3 to confer specificity for its cognate protease. To do so, we performed individual alanine substitution of residues contained within two potential PC1/3 convertase cleavable clusters as well as substitution of three negatively charged residues, two of which being specific to PC1/3. We tested the generated mutants in inhibitory assays against PC1/3 and furin. Our results show that the generated mutants can be subdivided in three categories, the first one exhibiting identical inhibition properties to the wild-type propeptide, the second having a diminished inhibition and finally the third one exhibiting increased inhibition, with K_i values ranging from 0.15 to 24 nM. Some of these mutations appear to be advantageous in increasing the inhibitory potency of the propeptide whereas some others clearly can affect the mechanism of inhibition thus conferring selectivity. Finally, we confirm through mutagenesis the location of the second cleavage site in the PC1/3 propeptide.

2. Materials and Methods

Expression and Purification of Recombinant mPC1/3 and hfurin - Recombinant murine PC1/3 is produced using the baculovirus expression system in Sf9 insect cells and whole larva as recently described (Rabah et al., 2004). Modifications to the original recombinant virus described in (Boudreault et al., 1998b) include substitution of the signal peptide of mPC1/3 by the one of the viral glycoprotein 67 (gp67) in order to enhance the secretion of the recombinant enzyme into the medium of *Spodoptera frugiperda* cells. Once expressed, the enzyme is recovered and purified as previously described (Boudreault et al., 1998b; Rabah et al., 2004). The recombinant soluble (COOH-terminus truncated) hfurin is obtained from the medium of Sf9 insect cells (Boudreault et al., 1998a). The enzymatic activity of each recombinant convertase is assayed routinely by fluorometric assays using a fluorogenic substrate (Jean et al., 1993).

Cloning, Mutagenesis, Expression and Purification of Recombinant mPC1/3 propeptides - All the enzymes used for cloning as well as all oligonucleotide primers (Table I) used in mutagenesis were purchased from Invitrogen (Burlington, Ont., Canada). The bacterial expression vector pET24b (+) (Novagen, Wisconsin, USA) was modified as previously described (Nour et al., 2003). The cDNA corresponding to the wild-type (WT) mPC1/3 propeptide was amplified by PCR using the NAD000 and NAD001 primer nucleotides (listed in Table I) and ligated into the vector between the BamH1 and Not1 sites. Similarly, the propeptide mutants were generated by site-directed mutagenesis using the Stratagene Quick-Change-Site-Directed-Mutagenesis kit, as described in the manufacturer's protocol. All propeptide cDNA sequences were verified by DNA sequencing. In addition to the 83 residues of mPC1/3 propeptide, the expression construct contains two extensions at the NH₂- and COOH-termini, MASMTGGQQMGRDP and SVQMAAALEHHHHHH, respectively, in order to facilitate cloning and purification. Each mPC1/3 propeptide, was expressed as a 112-residue His-tagged polypeptide in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) (Novagen) following induction by the addition of 1mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside for 4 hours at 37°C. Following this period, the cells were harvested through centrifugation.

Propeptide Purification and Chemical Characterization - The bacterial cells were lysed by repeated sonications in the presence of 100 μ g/mL of lysozyme and the resulting suspension

was loaded onto a Ni²⁺-Sepharose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Following extensive washings of the column, the propeptide was eluted using 1 M imidazole. The eluate was dialyzed against 0.1% acetic acid and the proteins subsequently further purified on an analytical Vydac-C₄ RP-HPLC column (25 x 0.46 cm; The Separation Group, Hesperia, CA) using a Varian 9010/9050 chromatography system. The aqueous phase consisted of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) (v/v) in water and the elution was carried out first isocratically at 10% organic phase (acetonitrile containing 0.1% TFA) followed by a 1%/min linear gradient of organic phase to 65% with a flow rate of 1 mL/min. The elution was monitored by measuring absorbency at 225 nm. Typically, all propeptides eluted between 40 to 43% of the organic phase. A specific polyclonal antibody was obtained in rabbits following repeated immunizations using the complete WT-mPC1/3 propeptide (as described above) bacterially produced and purified; according to procedures developed at the Sheldon Biotechnology Center (McGill, Montreal, Canada). Hence, RP-HPLC-fractions were analyzed for propeptide content using this antibody through dot blotting. The content of individual immunoreactive fractions was analyzed by SDS-PAGE followed by coloration and Western blotting and subsequently pooled and kept at -20°C. Routinely, starting with a 1L culture, approximately 5-10 mg of each propeptide can be recovered following purification.

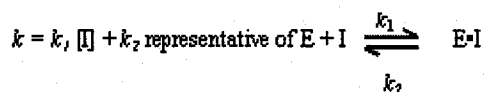
The peptide purity and concentration were determined for each mutant by quantitative amino acid analysis following 18-24h hydrolysis in the presence of 5.7N HCL *in vacuo* at 110°C on a Beckman autoanalyzer (Model 6300) with a postcolumn ninhydrin detection system coupled to a Varian DS604 integrator/plotter. The NH₂-terminal amino acid sequence, corresponding to ASMTGGQQMGRDPKQRFVNE(W)AAEI (the underlined sequence indicates the NH₂-terminus of the mature mPC1/3) was determined through automated Edman degradation using an Applied Biosystems Procise 494cLC sequencer (Foster City, CA, USA). Molecular mass determination and mass spectral analysis were done on a Voyager DE-Pro MALDI-TOF instrument (PerSeptive Biosystems, Cambridge, MA, USA); the propeptide in 0.1% TFA was mixed with a freshly prepared solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, 10 mg/mL) in 50% (v/v) acetonitrile-0.3% TFA and 1 μ L deposited on the sample plate. Alternatively, a sample corresponding to 0.3 μ g of each propeptide was directly injected unto a Zorbax SB-C₁₈ column (0.3 x 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) connected to a μ -Liquid chromatograph coupled to a QSTAR-XL hybrid LC/MS/MS Mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The

data generated were analyzed with the AnalystTM-QS V1.1 software (Applied Biosystems/MDS-Sciex).

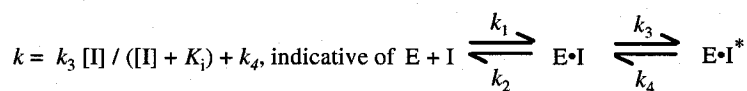
Enzymatic Assays and Kinetic analysis - All enzymatic assays of recombinant mPC1/3 and hfurin were performed using initial rate determinations at room temperature on a SpectraMax Gemini EM spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The assays were done in a final volume of 100 μ L in black-96-well flat bottomed plates (Corning Life Sciences, Acton, MA, USA) using 100 μ M of the fluorogenic substrate pGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA (Peptides International, Louisville, KY, USA). For mPC1/3, the buffer consisted of 100 mM sodium acetate at pH 6.0 containing 10 mM CaCl_2 . Prior to use, the purified recombinant enzyme was incubated in the presence of Ca^{++} for approximately 6 h or until the release of AMC was determined as linear, in order to allow conversion into the fully active 71 kDa form. For hfurin, the final assay conditions were 100mM Tris/HCl buffer, pH 7.0, with 1mM CaCl_2 . The fluorescence of the released 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) was measured using an excitation and an emission wavelength of 370 nm and 460 nm, respectively. All the assays were started by the addition of the enzyme (corresponding to an activity measured as 15 μ M AMC-released/h) and the data points collected every 30 sec. The evaluation of the various inhibition parameters was done as previously described (Fox et al., 1992). Briefly, the progress curves obtained for the inhibition of mPC1/3 by its propeptide has been shown to follow a tight-binding character and hence, can be defined by the following equation (Cha, 1975):

$$[P] = v_s t + (v_i - v_s) / k [1 - e^{-kt}]$$

Where P is the product formed (AMC released), v_i is the initial velocity, v_s is the steady-state velocity, t is the time and k is the apparent rate constant for inhibition. Progress curves are submitted to nonlinear regression curve analysis using the software Grafit 4 (Erithacus Software, Horley, Surrey, UK) which allows the determination of the individual parameters v_i , v_s and k for each curve. The obtained k values are then plotted against inhibitor concentrations. However, competitive tight-binding inhibitors can display two different behaviors. The first one corresponds to a single-step process (Mechanism A) whereby the enzyme and the inhibitor combine to form a stable complex. In this case the plot k vs. $[I]$ is linear and best described by:



where $K_i = k_2 / k_1$. The second one (Mechanism B) is a two steps process whereby the enzyme-inhibitor complex ($E \cdot I$) undergoes a conformational change. In this case, the plot k vs. $[I]$ saturates with increased amounts of inhibitor deviating from a straight line and the K_i value can be determined following non-linear regression analysis through curve-fitting using the following equation:



In the case of classical competitive inhibition, the various kinetic parameters are evaluated using the Enzyme Kinetic V1.0 module (SigmaPlot 2000 for Windows V6.1; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). In most cases, the computed results were in close agreement with the equations exhibiting overall fit exceeding 0.990.

Propeptide Iodination and Cleavage by recombinant mPC1/3 and hfurin - The purified mutant and WT propeptides were chemically labeled with radioactive iodine. For this purpose, 2.5 μ g of each propeptide was dried then resuspended in 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.4. After the addition of 250 μ Ci of $[Na^{125}I]$ (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc, Canada), the reaction was started by the addition of 50 μ g of chloramine-T in phosphate buffer. The reaction was stopped with 100 μ g of sodium metabisulfite. The volume of the reaction was made up to 1 mL with 0.1% TFA (v/v) in water and the sample passed through a Sep-Pak C₁₈ cartridge (Millipore, Billerica, MA, USA) as described in the manufacturer's protocol. The iodinated peptide was recovered by elution with 60% acetonitrile (v/v) in 0.1% TFA-water and the radioactivity present in the elution fractions was determined using an automatic Gamma Counter (LKB-Wallac model 1272). The cleavage reaction was carried out in a total volume of 100 μ L containing 2.5×10^5 cpm of radiolabeled propeptide (approximately 2 nM, based on protein content), the sodium acetate buffer specific for each enzyme as above described and the respective enzyme preparation (50 μ M AMC-released/h). After a 30 min incubation period, the reaction was stopped with 10 μ L of glacial acetic acid. The sample was dried, reconstituted and boiled in Laemmli's buffer and

its content analyzed by electrophoresis on a 15% SDS-polyacrylamide gel. The separated peptides were subsequently electro-transferred overnight onto an Immobilon-P membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). The radioactivity on the membrane was measured using a Storm model 860 Imaging system (Amersham Biosciences) with PhosphorImager capability and using the ImageQuant TL software.

Model building and modeling of mPC1/3, hfurin and the various mPC1/3 propeptides - The model of the catalytic domain of mPC1/3 was built upon the atomic coordinates obtained from the crystal structure of the proprotein convertase furin (Henrich et al., 2003) available using the accession code 1P8J in the Brookhaven Protein Data Bank (PDB). Based on the extensive amino acid sequence alignment previously reported (Siezen et al., 1994; Siezen and Leunissen, 1997), the furin sequence was mutated into the mPC1/3 sequence one amino acid at a time. The backbone dihedral angles and the side chains of each amino acid were adjusted until an acceptable low-energy conformation was obtained. Similarly, each mutant propeptide was modeled using the atomic coordinates derived from the NMR solution structure of the mPC1/3 (Tangrea et al., 2001; Tangrea et al., 2002) also deposited in the PDB under the accession number 1KN6. The variation of Gibbs free energy was computed following 1000 steps of structure minimization. All calculations were carried out using SYBYL V6.91 software (Tripos Associates, St Louis, MO, USA) on an IBM-PC platform as described previously (Villemure et al., 2003).

3. Results

Production of recombinant propeptides - Since the major caveat in inhibiting convertases by their propeptides points to the lack of specificity due to the redundancy of the inhibitory COOH-terminal region, we tried to identify some other residues that might confer increasing specificity without modification of the inhibition properties. Furthermore, we and others have previously shown that synthetic peptides of various lengths did not exhibit any significant selectivity (Basak et al., 1998; Basak and Lazure, 2003; Fugere et al., 2002) nor did the isolated propeptides when assayed against a variety of convertases (Fugere et al., 2002). However, single amino acid substitutions were shown to exhibit a profound effect on both inhibition and activation of convertases. Indeed, single amino acid substitution in the furin propeptide rendered the activation process inoperative and thus yielded no enzymatically active furin (Bissonnette et al., 2004). However, the propeptide being presented in a *cis*

fashion, *i.e.* being part of the zymogen, this study could not address the specificity aspect between convertases. The sequence alignment of the convertases propeptides shows very weak sequence similarities between the seven members of the family, except at the extreme COOH-terminal portion (Fig1A). Nevertheless, the similarity of certain key residues in the propeptide of mPC1/3 and prosubtilisin, the secondary structure might be conserved. Analysis of the secondary structures of PC's propeptides by CD measurements appears to agree with such an assumption (Fugere et al., 2002). We therefore speculated that certain structural features of the propeptide could be modified as to confer increased specificity. To test our hypothesis, we carried out site-directed mutagenesis of 10 individual residues located in two convertase potential cleavable sites (R₅₀RSRR₅₄ and K₆₁R₆₂) and in an acidic region (D₆₅DD₆₇) uniquely conserved among species thus disrupting the α 2 helix (Fig 1B). Alanine residues, chosen because of their least structurally disrupting effect (Weiss et al., 2000), replaced these residues and the resultant mutant propeptides expressed in *E. coli* BL21 cells, since the propeptide structure does not reveal any potential sites of glycosylation or sulfatation. In addition, as mentioned in the Methods section, our propeptide was elongated at both the NH₂ and the COOH termini in order to help in cloning and purification. The added sequence had no observable detrimental effect in inhibition properties. The propeptides were first purified from bacterial extracts using classical His-affinity chromatography and then further purified by HPLC and immunoreactive fractions were pooled together (Representative data are shown in Fig 2). Each propeptide was analyzed by mass spectrometry and its molecular mass was found to be within one Dalton of the computed mass: for example, WT propeptide's mass is 12 733.34 (average). This expression system allows us to obtain about 5 to 10mg of each purified propeptide mutant per liter of culture.

Effect of the propeptide mutations upon mPC1/3 and hfurin activity - We assessed the inhibitory potency and selectivity of the generated mutants through processing of a small fluorogenic substrate pERTKR-MCA by recombinant mPC1/3 and hfurin. We determined the IC₅₀ value of the inhibition of the WT propeptide against mPC1/3 and hfurin as being around 20 nM (data not shown). Using this concentration, each mutant, numbered M1 to M10, was assayed against enzymatically active mPC1/3 (Fig. 3A) and hfurin (Fig 3B). The results indicate that, irrespective of the enzymes, the generated mutants belong to three categories namely, mutants exhibiting lower, higher or equal inhibitory potency to the WT propeptide (Fig 3).

In the case of mPC1/3, it is readily seen that M1, M2, M5 and M10 are better inhibitors than the WT (Fig 3A). Interestingly, the first three mutants correspond to the substitution of arginine residues in the RRSRR sequence and hence were expected to play a role in the interaction with the enzyme. On the other hand, the last one contains a mutation of an aspartate residue at position 67 not likely to interact either with the active site or with the enzyme. The computed K_i values (see below) also confirm this result, as they are 6 to 30 times more potent than the WT (Table 2). Even more intriguing is the fact that the M9 mutation corresponding to an Ala for Asp at position 66 results in a significant diminution of inhibition contrary to an identical substitution at position 65 in M8. The mutation of the S₅₂ and R₅₃ (M3, M4), present in the second potential cleavable site, to alanine also had opposite effects, in terms of inhibition, but much less than the other substitutions in this cluster. Finally the substitution at the other potential cleavable site K₆₁ and R₆₂ (M6, M7) had very little effect on the inhibition of the active enzyme. It is noteworthy to mention that again, substitutions in the $\alpha 2$ helix where the three aspartate residues are located, led to the most significant changes in inhibition properties hinting that this region, while not likely to interact with the active site, does play an important role in the interaction of the propeptide with the enzyme (see discussion).

When we tested the same mutants on a baculovirus preparation of hfurin, a similar but different scenario appeared. First, the mutations induce either an increase or a decrease in the inhibitory potency of the PC1/3 propeptide toward hfurin (Fig 3B). In marked contrast to mPC1/3, most of the mutants generated are more potent than the WT. Thus, all substitutions in the second cleavage site namely mutants M1, M2, M3, M5, and to a much lesser extent, M4 proved beneficial in terms of hfurin inhibition (Table 2). It is worth noting in Fig. 3B that the inhibition afforded by M3, although competitive (see below), appears to diminish with time. Indeed, hfurin appears to recover enzymatic activity hinting that M3 is rapidly cleaved by the enzyme thus neutralizing its inhibition. Substitution of the two amino acids occupying the third putative cleavage site led to mixed results, as M6 (K₆₁A) appeared to have minimal effect whereas M7 (R₆₂A) yielded a much improved inhibitor. Finally, similarly to what we observed with mPC1/3, mutations of the three aspartate residues led to significant changes in inhibition profile. Indeed, substitution at position 66 (M9), diminishes significantly the inhibitory potency of this mutant. On the other hand, the mutants M8 and M10 are potent inhibitors of hfurin. Most interestingly and irrespective of their mode of inhibition (see below), two inhibitors (M7 and M8) revealed a much improved selectivity as, solely in terms

of K_i , they are 40 times more potent towards hfuin than mPC1/3. On the other hand, M10, also a very potent inhibitor of either enzyme, displays no selectivity whatsoever as it inhibits hfuin and mPC1/3 with the same K_i .

In an attempt to relate the effect of the mutation upon the structure of each propeptide, we decided to model each mutant on the solution structure of proPC1/3 as previously determined (Tangrea et al., 2001; Tangrea et al., 2002). This was accomplished by computing the change in free energy resulting from each mutation. As presented in Table 2, no clear correlation is readily apparent. However, those mutants found to have the strongest effect (as seen by an increase in free energy) are M7, M8 and M9, mutants that displayed significant modifications in inhibition properties as compared to the WT. Interestingly, these mutants correspond to substitution at amino acids not residing in the major cleavage sites nor thought to interact with the active site.

Mechanism of inhibition of PC1/3 propeptide mutants toward mPC1/3 and hfuin – Synthetic inhibitory peptides against convertases, engineered from the COOH-terminal part, presented a competitive pattern of inhibition supporting the fact that this portion of the propeptide interacts directly with the active site (Basak and Lazure, 2003; Fugere et al., 2002). Upon elongating these peptides towards the NH₂-terminus, a change in inhibitory behavior was observed since the initial competitive inhibition changed with the length of the peptide to mixed-inhibition and even non-competitive inhibition (Basak and Lazure, 2003). In the case of the propeptide of the closely related Kex2p enzyme, the propeptide behaved as a mixed inhibitor (Lesage et al., 2001). When we tested the complete propeptides against various convertases, we and others found that most of them behaved as tight binding inhibitors of their cognate enzyme (Boudreault et al., 1998a; Muller et al., 2000). Overall, these results indicate that sites other than the extreme COOH-terminus on the propeptide play important roles in regulating enzyme activity by interacting with the enzyme outside of the active site cleft.

In order to better document the nature of the inhibition mechanism, we performed on-line assays using fixed concentrations of enzyme and substrates but varying amounts of each mutant. Mutants M3 and M9 displayed inhibition curves typical of purely competitive behavior (Fig. 4A), confirmed by further analysis through linear regression of data plotted using classical representation (data not shown). On the other hand, all the other mutants

exhibited inhibition curves more characteristic of slow tight-binding inhibition and identical to the curve observed with the WT-propeptide (Boudreault et al., 1998a). However, slow tight-binding inhibition can fit a one or a two-step mechanism depending upon the pathway used to form the stable inhibitory complex (Fox et al., 1992). In the single-step process herein referred to as mechanism A, the inhibitor binds tightly to the enzyme without inducing any conformational change. By contrast, mechanism B is best explained by first initial tight binding to the enzyme (step 1) followed by a conformational change (step 2) leading to enhancement of the stability of enzyme-inhibitor complex. In order to differentiate between these two mechanisms, it is best to measure observed K_{obs} at different inhibitor concentrations. Using the progress curves shown in Fig. 4B and 4D, a plot of K_{obs} as a function of inhibitor concentrations yields a straight line in the case of a single step inhibition mechanism (Fig. 4C) or an hyperbolic curve for two-step inhibition (Fig. 4E). Illustrated for the mutant M10, similar curves are obtained for the other mutants with the exception of mutant M2 whose inhibition followed the two-step mechanism. As indicated in Table 2, the computed K_i values ranged from 150 pM up to 16.5 nM when assayed against mPC1/3. The computed K_i for the WT-propeptide (4.4 nM) was in good agreement with the one measured originally (6 nM) (13).

In the present study, the slow tight-binding kinetic though still present was much less apparent though the tight-binding characteristic of the various propeptides with the exception of M9 was clearly observed. A K_i value for inhibition of furin by WT-PC1/3 propeptide was computed as 1.1 ± 0.3 nM, a value well in agreement with the value previously reported of 1.6 nM (Fugere et al., 2002). Indeed as shown, in Fig. 5B for the mutant M10, the velocity does not decrease in linear fashion with the inhibitor concentration as would be expected if the enzymatic activity is nullified by the formation of an inactive inhibitor-enzyme complex. This behavior is not observed in the case of M9 as the decrease in velocity was related to the inhibitor concentration in linear fashion. In the case of M9, further analysis demonstrated its full competitive inhibition (Fig. 5A) yielding a K_i of 24 nM (Table 2). The K_i values of the other inhibitors were computed through non-linear regression according to a tight-binding model (Cha, 1975). It is important to note that the M3 mutant (S₅₂A) exhibits a competitive inhibition profile toward PC1/3 but is a tight binding inhibitor of hfurin and is the only one to do so.

Cleavage of Propeptide mutants by mPC1/3 and hFurin – It is well established that the propeptides of convertases, just like the ones of the yeast Kex2p (Gluschankof and Fuller, 1994) and the related subtilisins (Ikemura and Inouye, 1988; Lazure, 2002; Power et al., 1986) are cleaved at the primary cleavage site through an intramolecular process. However, in order to release the full enzymatic activity and prevent further inhibition by the bound propeptide, further internal cleavages are necessary if not mandatory. Whereas this internal cleavage appears essential for furin (Anderson et al., 1997) and PC1/3 (Boudreault et al., 1998a), internal cleavage of the PC2 propeptide is not obligatory for full activation of PC2 (Muller et al., 2000). In order to assess whether the enzyme is still capable of cleaving the mutant propeptides and whether this cleavage can be related to inhibitor potency, we decided to incubate the different mutants with an excess of PC1/3 or furin. To follow the extent of cleavage, the propeptide mutants were labeled with I¹²⁵, since three tyrosine residues are conveniently present at positions 28, 41 and 76 within the propeptide sequence.

Our results confirm that native WT propeptide is cleaved by PC1/3 generating a lower molecular weight band with an apparent mass of around 7.5 kDa (the computed mass of fragment -13 to 54 is 7 481 Da) corresponding to cleavage at the internal site originally reported (Boudreault et al., 1998a). However, as seen in Fig. 6A, all mutations of the arginine residues occupying position 50 (M1), 51(M2), 53 (M4) or 54 (M5) proved detrimental to efficient cleavage in that region. Considering that the preferred cleavage site in substrates of PC1/3 is recognized as being one whereby arginine residues are occupying (just as for furin) position P₁ and P₄³, mutation at any position within that sequence would be expected to perturb the cleavage. This confirms our prior identification of the identity of the PC1/3 propeptide internal cleavage site as being R₅₀RSRR₅₄ in agreement with the convertase recognition motif RXXR. Furthermore, it seems that the mutations found in M2 and M5 have a more pronounced effect on inhibition than M1 and M4 hinting that the former might be the favored motif. On the other hand, cleavage at the other potential site namely KR₆₂ could not be detected contrary to what has been observed with a similarly located pair of basic residues in the mPC2 propeptide sequence cleaved by mPC2 (Muller et al., 2000).

The PC1/3 WT-propeptide is cleaved by hFurin in an identical fashion to what we observed with PC1/3 yielding a single band of apparent molecular weight of 7.5 kDa. However, in certain samples, we observed an additional band exhibiting an apparent molecular weight of 8.5 kDa as indicated in Fig. 6B. Interestingly, mutations of the R₅₁ as

well as the R₅₄ yields exclusively the band of 8.5 kDa indicating that furin is not able to cleave the identical motif formed by R₅₀ and R₅₃. In this situation, hFurin prefers to cleave at the other possible site namely the KR₆₂ yielding a fragment of computed mass of 8 387 Da (-13 to 62). Indeed, whenever the sequence R₅₁XXR₅₄ is present, one can see the appearance of this band though in the case of the WT and M3 it is faint. As mentioned previously in conjunction with Fig. 3B, M3 though a potent inhibitor appears to be very rapidly cleaved possibly explaining the absence of the 8.5 kDa band. More surprising, however, is the observation that mutating either K₆₁ or R₆₂ fails to completely abolish cleavage at that site though it can be seen clearly impaired. The latter mutation if it does not influence strongly on cleavage, does lead to a 2.6 fold increase in K_i when compared to M6 and more importantly to a considerable increase in specificity over PC1/3.

4. Discussion

The activation of subtilisin and subtilisin-like serine proteases is a multistep process requiring that the propeptides play a dual role. First, as an intramolecular chaperone, it is assisting the folding of the catalytic domain. This feat is accomplished by lowering the transition state energy allowing the conversion of a collapsed metastable intermediate to a native enzyme (Eder et al., 1993). The importance of this role was first revealed for prosubtilisin and pro- α -lytic protease (reviewed in Ref. (Lazure, 2002)) and further results led to proposal of the concept of "protein memory" (Shinde et al., 1997). In this context, an identical protein sequence can give rise to different conformations through the folding with a mutated chaperone. Application of this concept through propeptide engineering led to the production of new proteases exhibiting altered stability, substrate specificity and activity (Takagi and Takahashi, 2003). Second, as an inhibitor of its cognate enzyme, the propeptide prevents undue activation both in terms of location and time in such a way as to allow full enzymatic activity until the active enzyme is needed and properly located. However, it is worth noting that these two functions are not absolutely linked as in the case of subtilisin E (Marie-Claire et al., 2001). The latter study actually prompted us to initiate the present study. Indeed, the introduction of point mutations in the peptidase-propeptide interface seriously compromised the propeptide inhibition potential when added *in trans* without affecting its folding capacity of the propeptide. Hence, using the proPC1/3 as a model, we wanted to know whether by substituting certain amino acids, we could modify the inhibitory potency, the inhibitory mechanism and the selectivity of the propeptide.

This objective also resulted from the previously reported difficulties in developing synthetic peptides of various sizes based upon the propeptide sequences, which could prove potent and selective. Thus, small peptides mimicking the COOH-terminal portion of the propeptide were synthesized and their properties assayed. Even though these peptides could be made into very potent inhibitors in the nM range, they are mostly competitive and nonselective which restrict their use to structural characterization of the enzymes. Such peptides have been synthesized and assayed with numerous PCs including furin, PC1/3, PC5/6 and PC7 (Basak and Lazure, 2003; Bhattacharjya et al., 2000b; Fugere et al., 2002). As mentioned above, there exists in the propeptide sequence a second potential cleavable site known to be important for the activation and the secretion of PC5/6, PC2 and furin. In PC1/3, mutations in the second cleavable region (RSRR₅₄ to SSGR₅₄) had no effect on PC1/3 processing in *Xenopus* egg system (Shennan et al., 1995). When synthetic peptides derived from the second cleavable site were tested against PC1/3, PC7 and furin, they were found to be either non-inhibitory or generally weak inhibitors, exhibiting K_i in the μ M range. In any case, no synthetic peptide was able to duplicate mechanistically the inhibition generated by the complete propeptide when presented *in trans*.

Indeed, the inhibition afforded by the propeptide leads to the formation of a stable complex as previously shown with various convertases. This is explained by important interactions between the propeptide and sites close or remote of the convertase active site as visualized in the crystal structure of the propeptide of subtilisin BPN', E and α -lytic protease in complex with their cognate enzyme (Gallagher et al., 1995; Jain et al., 1998; Sauter et al., 1998). Similar though distinct contacts were also inferred in the case of the convertase propeptides with their cognate enzymes following the determination of the NMR solution structure of proPC1/3 (Tangrea et al., 2002). Nevertheless, the entire propeptides independent of the way they are presented to the enzyme be it in *cis* or in *trans*, lack selectivity as many convertase propeptides inhibit their own protease and also other related convertases with variable potency. Conversely, swapping of the propeptide has been shown, in certain cases (for example, PC1/3 and furin), to yield enzymatically active proteinases (Zhou et al., 1995). Hence, it can be proposed that selectivity might not be derived from the basic architecture of the propeptide which is reported to be composed of four-stranded antiparallel β -sheets and two α -helices, but more so by the localized interactions of certain residues at the interface of the propeptide-enzyme complex. Thus we tried herein by site directed mutagenesis to explore

the possibility of modulating the extent of the interactions between the propeptide and its enzyme. To do so, ten mutants were generated and their interactions with two enzymatically active convertases determined.

In summary, this study demonstrates that modifying a single amino acid within the structure of propeptide can have profound effect on its reactivity. Indeed, when compared to the native propeptide (WT), single residue mutation yielded propeptides:

- (i) With different inhibition mechanism depending on the enzyme assayed (M3)
- (ii) Which are weaker and displaying different mechanisms with both enzymes (M9)
- (iii) With identical inhibition mechanism but with enhanced selectivity (M7, M8)
- (iv) Which are very potent but not at all selective (M1, M2, M5 and M10).

The mutation of the arginine R₅₀ (M1), R₅₁ (M2) or R₅₄ (M5) in the RRSRR sequence all led to very potent inhibitors with K_i in the low pM range for both enzymes. This validates the previous assumption that this sequence represents the site of the secondary cleavage of the propeptide for PC1/3. This site contains two possible RXXR motifs, R₅₀RSR₅₃ and R₅₁SRR₅₄. As illustrated in Fig. 6, mutations at positions 50, 51, 53 and 54 severely impair the cleavage by PC1/3 hinting that PC1/3 can use either recognition site. On the other hand, furin appears more selective as only the mutations at position 51 or 54 have an effect on cleavage. This obviously confirms the reported strong preference for substrates having both P₁ and P₄ residues as basic amino acids. However, in the context of the PC1/3 propeptide sequence, it thus seems that furin prefers much more the R₅₁SRR₅₄ site than the R₅₀RSR₅₃ even though both display the minimal furin recognition motif namely RXXR. Interestingly, the crystal structure of furin revealed that in contrast to the yeast convertase Kex2, the former does not exhibit the strong requirement of the latter for a basic amino acid at the P₂ position (Holyoak et al., 2004; Rockwell and Thorner, 2004; Siezen et al., 1994). Nevertheless, our results using either enzyme favor a sequence containing basic residues at positions P₁, P₂ and P₄. This observation is also consistent with our previous results using Barley serine proteinase inhibitor 2 (BSPI-2)-derived cyclic peptides. In that study, we noticed an additive favorable effect in terms of substrate recognition when basic residues occupy positions P₂ and P₄ (Villemure et al., 2003). The mutation of these residues, especially the arginine occupying position 54, severely impairs the cleavage of the propeptide and thus could contribute to an increase in inhibitor potency. This observation is especially true with PC1/3 as M5 exhibits a K_i of 0.2 nM, this could reasonably be explained by the fact that the enzyme, due to lack of

cleavage, cannot dissociate from the propeptide. In the case of furin, the consequence of mutations in this region is not as significant and this might be due to the presence of another furin sensitive site in the propeptide (see below). Finally, the M1 mutant (R₅₀) if one considers the Arg₅₄ as the P₁ position corresponds to a P₅ substitution and is a very potent inhibitor of both enzymes but only furin can cleave it efficiently. The S₅ site in furin offers a negatively charged environment (E₂₃₃/D₂₃₅) in complete agreement with its preference for positively charged P₅ side-chain; substitution by a small neutral residue such as alanine thus appears not detrimental. On the other hand, substitutions by acidic residues are much less tolerated at that position (Jean et al., 1995; Stieneke-Grober et al., 1992). The inability of PC1/3 to cleave this mutant is difficult to rationalize as the S₅ site in PC1/3 is less negatively charged than found otherwise in other convertases such as furin, PACE4, PC5/6 and PC7. Hence, substituting the arginine at this position by an alanine should not be expected to prevent the cleavage by PC1/3 unless the arginine side chain plays an as yet undetermined role in the propeptide structure or in the propeptide-enzyme complex. However, it could also be that, in this particular instance, the arginine residue is essential for the interaction with E₂₅₁ and with N₂₄₄, both residues being present in PC1/3 S₅. In the solution structure of PC1/3 propeptide this residue resides in a solvent accessible loop located between the third β -sheet segment and the second α -helix (Tangrea et al., 2002). Another plausible explanation might be that by introducing an alanine residue, one decreases the high concentration of positively charged residues in the loop and in turn, this prevents complete dissociation of the enzyme-inhibitor complex.

The mutation of the S₅₂ (M3) rendered the propeptide purely competitive towards PC1/3 whereas it did not change inhibitor's behavior against furin. This observation is interesting as, in view of possible therapeutic applications, a tight-binding inhibitor forming a stable complex is largely preferred to the high concentration of a competitive inhibitor required to abolish the activity. Essentially, this serine residue appears to play an important role in stabilizing or promoting the enzyme-propeptide complex. The replacement of this polar residue by an alanine could abolish some important weak interactions. Both enzymes cleave this mutant efficiently and this is in agreement with biochemical and structural data reported for furin and PC1/3. Actually, the substrate-binding site S3 in furin is highly permissive, as the X-ray structure does not reveal a discrete binding pocket (Holyoak et al., 2004). However, we have shown that one way to affect substrate recognition and cleavage by furin was to introduce at P₃ an acidic residue such as Glu (Jean et al., 1995). Based on the now available

structure, this is explained by unfavorable contact with the Glu₂₃₃, which though occupying the S₅ cleft, is surface located and can possibly interact with a P₃ residue (Rockwell and Thorner, 2004). In PC1/3, a neutral Asn residue replaces this Glu residue; hence, it is not surprising that the only substitution reported to compromise PC1/3 substrate cleavage efficiency at this position is a Pro residue (Jean et al., 1995; Lazure et al., 1998).

The basic amino acid pair, KR₆₂, a possible convertase cleavable site present in PC1/3 propeptide and although containing P₁ and P₂ basic motifs, is not cleaved by PC1/3. However, substituting either one or the other leads to the propeptide being amongst the weakest in this series towards PC1/3. Being located in the second α -helix segment, their replacement by a small neutral residue could potentially have an impact on the integrity of this helical segment. As previously mentioned, a similarly located pair of basic residues in the pro-mPC2 sequence is recognized and cleaved by mPC2 (Muller et al., 2000). This pair of basic residues is also recognized as a substrate by furin in the context of the proPC1/3 sequence. Interestingly, in the profurin sequence, a typical furin recognition sequence, namely RHSR, is similarly located. Moreover, the substitution of the R₆₂ residue leads to an increase in propeptide inhibitory force against furin suggesting at first sight that this residue is interacting elsewhere with the enzyme to emphasize the contact. Alternatively, the degradation of the propeptide by furin requires the cleavage at that site, in addition to the second cleavage. The ability of furin to cleave M7 (R₆₂A) at two positions, namely at the RSRR and at the KA site, complicates the interpretation. Indeed, one is left wondering whether furin itself can cleave on the COOH-terminal to a Lys residue. Obviously, looking at the results of the cleavage experiment of mutants M6 and M7, furin would be able to cleave after both K₆₁ and R₆₂ as either mutant yields two lower molecular weight peptides. Interestingly, as observed with M2 and M5 mutation that removes either of the arginines occupying P₄ or P₁, furin can utilize efficiently this basic pair to cleave the PC1/3 propeptide.

Nevertheless, furin cleavage at a pair of basic residues flanked by a P₄ hydrophobic residue instead of the usual basic residue as well as cleavage on the COOH-terminal side of Lys represents two uncommon and rarely seen types of cleavage. Indeed, concerning the former, we and others have shown that hydrophobic interactions at the S₄-P₄ interface can contribute positively to the efficiency of cleavage by furin (Jean et al., 1995; Krysan et al., 1999).

Furthermore, such pair of basic residues can be found in a number of natural substrates including one in the furin propeptide itself at the second cleavage site (Anderson et al., 1997) although in these instances, it is not followed at P₁' by an hydrophobic aliphatic residue, a feature less favorable to furin cleavage (Brennan and Nakayama, 1994b; Nakayama, 1997). Concerning the latter, namely the cleavage COOH-terminal to a Lys residue, the M7 cleavage pattern indicates that it is certainly not a favored one although it is nonetheless happening. Indeed, there are very few examples of hormones or neuropeptides being processed at a Lys residue (for example, progastrin, proenkephalin, proTRH and prosomatostatin) and even less shown conclusively to be cleaved by furin (Eggelkraut-Gottanka and Beck-Sickinger, 2004b; Seidah and Chretien, 1999). Actually, synthetic peptides mimicking the cleavage site of proalbumin were used to demonstrate that introduction of a P₁ Lys residue abolishes processing (Brennan and Nakayama, 1994a). On the other hand, other studies have indicated that, despite a diminished efficiency, furin can adequately perform such cleavage, the unfavorable replacement of P₁ Arg by Lys likely compensated by surrounding residues (Krysan et al., 1999; Rockwell and Thorner, 2004; Fugere et al., 2002; Rockwell et al., 2002). Finally, though the KR sequence is not recognized by PC1/3 in terms of internal cleavage site, mutating of the R₆₂ decreases significantly its inhibitory potency rendering M7 the worst inhibitor of PC1/3 in the series. On the other hand, for furin, M7 ranks amongst the best inhibitors.

Individual mutation of the three Asp residues located in the $\alpha 2$ helix exhibited significant and unique properties. A clear relationship between the levels of perturbation introduced in the propeptide structure by the various mutations was not established with the inhibitory potency (see Table 2). However, the three weakest inhibitors of PC1/3 correspond to M7, M8 and M9 and these mutations appear to be the most perturbing in terms of conformational stability. It is worth mentioning that these mutations were introduced at sites remote from the primary reactive site and unlikely to play a role in the formation of the enzyme-inhibitor complex. Similarly to the parallel drawn between the M2 and M5 mutants in terms of cleavage by PC1/3 or furin, a similar one can be identified here between M7 and M9, the latter exhibiting a more profound effect as M9 is not able to form a tight complex with PC1/3. As shown in Fig. 7, examination of the proPC1/3 solution structure reveals that the Arg₆₂ (mutated in M7) and the Asp₆₆ (mutated in M9) are not only deeply buried within the structure but more importantly can interact through hydrogen bonding. Indeed, it can be seen that the Asp backbone atoms as well as those in the side chain can participate in six hydrogen

bonds. Hence, mutating the Arg₆₂ leads to the loss of two of these bonds but the Asp residue is still able to link with the Arg₆₈. However, mutating this Asp will remove all those interactions except those arising from the main chain atom, a condition likely to lead to severe conformational perturbations. Interestingly, whereas this modification is detrimental in terms of inhibiting proPC1/3 (mechanistically as well as in potency), the M7 mutant is a better inhibitor of hFurin and exhibiting an increased selectivity. Clearly, even buried deeply in the structure and hence unlikely to actively participate in the molecular interactions between the enzyme and the propeptide, the Asp₆₆ appears very important in terms of the global folding of the propeptide. The Furin propeptide possesses the equivalent Arg₆₂ and Asp₆₆ but not the Arg₆₈ and it would thus be expected considering that PC propeptides are proposed to share similar structure (Fugere et al., 2002; Tangrea et al., 2002) that mutations in Furin propeptide at these positions could have significant effects. Considering that the side chain of Asp₆₆ is pointing inwards and is involved in hydrogen bonding, it can be safely assumed that it serves as an anchor point for this short helix and hence the two other Asp are likely to point outwards and be solvent accessible. Mutating these two residues is thus likely to perturb locally the α -helix but more importantly to decrease the negative surface potential. Interestingly, this does not have the same effect on PC1/3 and on Furin since M10 is the strongest inhibitor of either enzyme whereas M8 is a much stronger inhibitor of hFurin than of PC1/3.

In conclusion, this study highlighted the fact that using the PC1/3 propeptide as a model structure, one can introduce small changes in the primary sequence which will affect its global structure, its sensitivity to proteolysis and its inhibitor potency as well as mechanism.

5. Footnotes

We thank Dr. Bernard F. Gibbs (MDS-Pharma Services, Montréal, Québec, Canada) for granting us access to Mass Spectrometer used in this study and for his expertise. We also thank Dr. Robert Ménard (Biotechnology Research Institute, NRC, Montréal, Québec, Canada) for helping us during statistical analysis of the data. Nadia Rabah and Daniel J. Gauthier are recipients of a Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) studentship award and are registered at the Division of Experimental Medicine of McGill University.

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

¹ The abbreviations used are: AMC, 7-amino-4-methylcoumarin; ESI, electron-spray ionization; hfurin, human furin; IMC, intramolecular chaperone; LC/MS/MS, liquid chromatography coupled tandem mass spectrometer; LPC, lymphoma proprotein convertase; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight; MCA, 4-methylcoumaryl-7-amide; PACE, paired basic amino acid cleaving enzyme; PC(s), proprotein convertase(s); mPC1/3, murine proprotein convertase 1/3; RP-HPLC, reverse-phase high performance liquid chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Sf, *Spodoptera frugiperda*; TFA, trifluoroacetic acid; TRH, thyrotropin releasing hormone.

² The numbering used herein corresponds to the proPC1/3 complete sequence devoid of the signal peptide. Thus, the 83 residues propeptide corresponds to residues 1 to 83. The same applies to the numbering used with other convertases.

³ The designation of the cleavage site follows the nomenclature introduced by Schechter and Berger (Schechter and Berger, 1967a) defining the cleavage site as the bond between P₁ and P₁'. Conversely, the enzyme subsites are referred to as S₁ and S₁'.

6. Figures legends

Fig. 1: *Alignment of mammalian convertase propeptide sequences and PC1/3 mutagenesis sites:* **A.** The amino acid sequences alignment of the seven mammalian convertase propeptides was performed using the CLUSTALW program. Residues in black boxes are conserved whereas those in grey boxes represent common or chemically similar amino acids. Gaps were introduced to maximize the degree of similarity. **B.** Alanine scan was performed on two potential convertase cleavable sites and a region (α_2 helix) encompassing highly conserved residues amongst PC1/3 of various species. The PC1/3 propeptide sequence is shown together with its secondary structure elements identified in the NMR solution structure (29). The various mutants used in this study and the putative sites of cleavage are indicated.

Fig. 2: *Representative purification and characterization of bacterially produced M2-proPC1/3:* **A.** Reverse-phase HPLC purification of the material recovered following extraction from bacteria and purification on a Ni²⁺-Sepharose column. **B.** Western blot analysis of an RP-HPLC purified aliquot following separation by SDS-PAGE. **C** Mass spectrum of the RP-HPLC purified material following electro-spray ionization. Following deconvolution of the spectrum showing the multiple charged ions, the average mass of the propeptide shown was 12,648.29 Daltons in complete agreement with the theoretical mass.

Fig. 3: Effects of the mutated propeptides on the enzymatic activity of mPC1/3 and hfurin: **A.** Progress curves obtained following incubation of PC1/3 with 100 μ M fluorogenic substrate (pERTKR-MCA) in the presence of a constant amount of each mutant (20 nM), an amount equivalent to the IC_{50} of the WT-propeptide. **B.** Progress curve obtained in identical manner using hfurin. Each data point is the mean value derived from assays done in duplicate of three separate experiments.

Fig. 4: Differences in inhibition behavior of propeptide mutants M2, M9, and M10 towards mPC1/3: **A.** Progress curves obtained from the inhibition of mPC1/3 by the mutant M9, the slope of the each curve was used to derive the K_i by Dixon's representation. **B.** Progress curve obtained using increasing concentrations from 0 to 100nM of mutant M10. **C.** Graphic representation of K_{obs} versus M10 concentration yielding a straight line with a correlation coefficient of 0.9808. **D.** Progress curve obtained using increasing concentrations from 0 to 100nM of mutant M2. **E.** Graphic representation of K_{obs} versus M2 concentration yielding a hyperbolic curve with a correlation coefficient of 0.9130. In all cases, data used for computation and curve fitting represent the mean value derived from duplicate assays of three separate experiments.

Fig. 5: Dixon's plot representations of the inhibition of hfurin by the propeptide mutants M9 and M10. **A.** The $1/V$ versus inhibitor concentrations plot yields curves typical of a competitive inhibitor with a K_i for M9 inhibition of hfurin of 24 ± 2 nM with a correlation coefficient of 0.972. **B.** The $1/V$ versus inhibitor concentration plot is best fitted to a tight-binding model: the computed K_i for M10 inhibition of hfurin was 0.2 ± 0.05 nM with a correlation coefficient of 0.992.

Fig. 6: Cleavage of the propeptide mutants by mPC1/3 and hfurin: **A. and B.:** Each mutant as well as the native bacterially produced propeptide were iodinated and an aliquot (2.5×10^5 cpm) incubated for 30 min with (A) enzymatically active mPC1/3 and (B) hfurin (see Material and Methods). Following acidification of the incubation mixture, the peptides in the digest were separated using a 15% SDS-PAGE transferred to an Immobilon P membrane and the radioactivity was detected through autoradiography.

Fig. 7: Molecular modeling of mPC1/3 propeptide: **A.** Representation of one possible conformer of the mPC1/3 propeptide (in purple) docked upon the crystal structure of the catalytic chain (blue) and the P domain (green) of furin. The yellow region of the propeptide represents the COOH-terminal part of the propeptide interacting with the substrate-binding region. **B.** CPK-model of the mPC1/3 propeptide based on the NMR solution structure (29) indicating the deeply buried Asp₆₆ (colored in blue). **C. and D.:** Molecular interactions and hydrogen bonds formed by the main chain and side chain atoms of Asp₆₆ with its immediate neighbors in the WT-propeptide (C) and following its replacement by an Ala residue (D). The mutation from Asp₆₆ into an Ala residue completely abolishes numerous hydrogen bonds formed by the Asp side chain atoms with the two neighboring basic residues namely Arg₆₂ and Arg₆₈.

Table 1

Oligonucleotides used for PC1/3 propeptide mutagenesis.

Name ¹	Mutation	Oligonucleotide Sequence (5' to 3')
NAD000	-	GGATCCGAAGAGGCGAGTTTGTTAATGAATGG
NAD001	-	TGCGCGCGCCATTTGAACTGAACGTTTACTTCTC
PRO1S	R ₅₀ A	CACAAAAGCCATCCTGCGAGGTCCCGAAGAAGCGC
PRO1A		GCGCTTCTTCGGGACCTCGCAGGATGGCTTTTGTG
PRO2S	R ₅₁ A	CACAAAAGCCATCCTCCGGCGTCCCGAAGAAGCGC
PRO2A		GCGCTTCTTCGGGACGCCGAGGATGGCTTTTGTG
PRO3S	S ₅₂ A	GCCATCCTCGGAGGGGCCCGAAGAAGCGC
PRO3A		GCGCTTCTTCGGGCCCTCCGAGGATGGCC
PRO4S	R ₅₃ A	GCCATCCTCGGAGGTCCGCAAGAAGCGCTCTTCATATC
PRO4A		GATATGAAGAGCGCTTCTTGCGGACCTCCGAGGATGGC
PRO5S	R ₅₄ A	CCTCGGAGGTCCCGAGCAAGCGCTCTTCATATCACTAAG
PRO5A		CTTAGTGATATGAAGAGCGCTTGCTCGGACCTCCGAGG
PRO6S	K ₆₁ A	GCGCTCTTCATATCACTGCGAGGTTATCTGATGATGATGC
PRO6A		CGATCATCATCAGATAACCTCGCAGTGATATGAAGAGCGC
PRO7S	R ₆₂ A	GCGCTCTTCATATCACTAAGGCGTTATCTGATGATGATCGTGTGACG
PRO7A		CGTCACACGATCATCATCAGATAACGCCCTTAGTGATATGAAGAGCGC
PRO8S	D ₆₅ A	CACTAAGAGGTTATCTGCTGATGATCGTGTGACGTGG
PRO8A		CCACGTCACACGATCATCAGCAGATAACCTCTTAGTG
PRO9S	D ₆₆ A	CACTAAGAGGTTATCTGATGCTGATCGTGTGACGTGG
PRO9A		CCACGTCACACGATCAGCATCAGATAACCTCTTAGTG
PRO10S	D ₆₇ A	GAGGTTATCTGATGATGCTCGTGTGACGTGGGCTGAAC
PRO10A		GTTCAGCCCACGTCACACGAGCATCATCAGATAACCTC

Note: ¹: S denotes the sense strand whereas A denotes the antisense strand.

Table 2

Inhibition Parameters of the various proPC1/3 mutant peptides towards mPC1/3 and hfurin

Mutant	Mutation	Free	Δ Energy (Kcal)	mPC1/3	Internal		Hfurin	Internal		K_i (mPC1/3)
		Energy ¹ (Kcal)		K_i (nM $\pm$ SD)	Cleavage ³ Site 2 / Site 3		K_i (nM $\pm$ SD)	Cleavage ³ Site 2 / Site 3		K_i (hfurin) ratio
WT	None	-464.9	00.0	4.4 $\pm$ 0.1	Yes	No	1.1 $\pm$ 0.3	Yes	Yes	4.0
M1	R ₅₀ A	-478.4	-13.5	0.36 $\pm$ 0.01	No	No	0.42 $\pm$ 0.08	Yes	Yes	0.9
M2	R ₅₁ A	-471.0	-6.1	0.74 $\pm$ 0.08	No	No	0.59 $\pm$ 0.09	No	Yes	1.25
M3	S ₅₂ A	-463.1	+1.8	4.00 $\pm$ 0.15 ²	Yes	No	0.5 $\pm$ 0.2	Yes	Yes	7.4
M4	R ₅₃ A	-483.5	-18.6	5.4 $\pm$ 0.1	No	No	1.1 $\pm$ 0.3	Yes	Yes	4.9
M5	R ₅₄ A	-484.6	-19.7	0.20 $\pm$ 0.06	No	No	0.7 $\pm$ 0.1	No	Yes	0.3
M6	K ₆₁ A	-449.6	+15.3	10.0 $\pm$ 0.9	Yes	No	1.1 $\pm$ 0.1	Yes	Yes	9.3
M7	R ₆₂ A	-420.2	+44.7	16.5 $\pm$ 0.2	Yes	No	0.4 $\pm$ 0.1	Yes	Yes	39.3
M8	D ₆₅ A	-432.2	+32.7	10.0 $\pm$ 0.15	Yes	No	0.26 $\pm$ 0.09	Yes	Yes	38.5
M9	D ₆₆ A	-422.5	+42.4	8.6 $\pm$ 0.6 ²	Yes	No	24 $\pm$ 2 ²	Yes	Yes	0.36
M10	D ₆₇ A	-462.6	+2.3	0.15 $\pm$ 0.08	Yes	No	0.20 $\pm$ 0.05	Yes	Yes	0.75

Notes: ¹: This value was obtained following energy minimization as described in the Materials and Methods section.

²: These K_i values were obtained using a fully competitive model whereas the others for PC1/3 were based upon a slow tight-binding model and those for hfurin were based upon a tight-binding model.

³: The site 2 is hereby defined as corresponding to the R₅₀RSRR₅₄ whereas the site 3 is defined as being the K₆₁R₆₂ pair.

Figure 1

A

```

furin : ----QGQKIFTN---TWAVHIP--GGPAV-----ADRVAKKHGFHNLGQI--F : 37
PC1/3 : ----KRQFVN---EWAAEIP--GGPEA-----ASAI AEELGYDLLGQIGSL : 37
PC2 : ----ERPVFVN---HFLVELHK-DGEEE-----ARQVAAEHGFGVR-KLPFA : 38
PC5/6 : ----R-VYTN---HWAVKIA--GGFAE-----ADRIASKYGEINVGQIGAL : 36
PACE4 : ----RPVYTN---HWAVQVL--GGPGA-----ADRVAAAHGYLNLGQIGNI : 37
PC4 : ----QAPIYVS---SWAVRVT--KGYQE-----AERLARKFGFVNLGQIFPD : 38
PC7 : LSEAGGLDILGTGGLSWAVHLDLSLEGERKEESLTQQAADAVAQAAGLVNACRGEL : 55
           wav      G      A      A      G      g i

furin : GDYVHFWHRAVTKRSLSPH---RPRHSRLQREPOVKWLEQQVAKRRRAKR : 83
PC1/3 : ENHYLFKHKNHPRRSRRSA---FHITKRLSDDDRVTWAEQQYEKERSKR : 83
PC2 : EGLYHFIYHNGLAIAKRRRS---LHKKRQIERDPRIKMALQQEGFDRKKR : 84
PC5/6 : KDYYHFIYHSRTIKRSLVSS---RGTHSFISMEPKVEWIQQQVVKRRTKR : 82
PACE4 : DDYVHFIYHSKTFKRSLVSS---RGPHTFIRMDPKVKWLEQQVEKRRVKR : 83
PC4 : DQYFHLRIRGVAQQSLTPH---WGHRLRKKDKPKVWFEEQOTLRRRVKR : 84
PC7 : QGHYLFVQPTGHRQAMEVEAMRQQAQAEAVLARHEAVFWHSEOTLLRRAKR : 104
           y f h      l      v w qQ      R KR

```

B

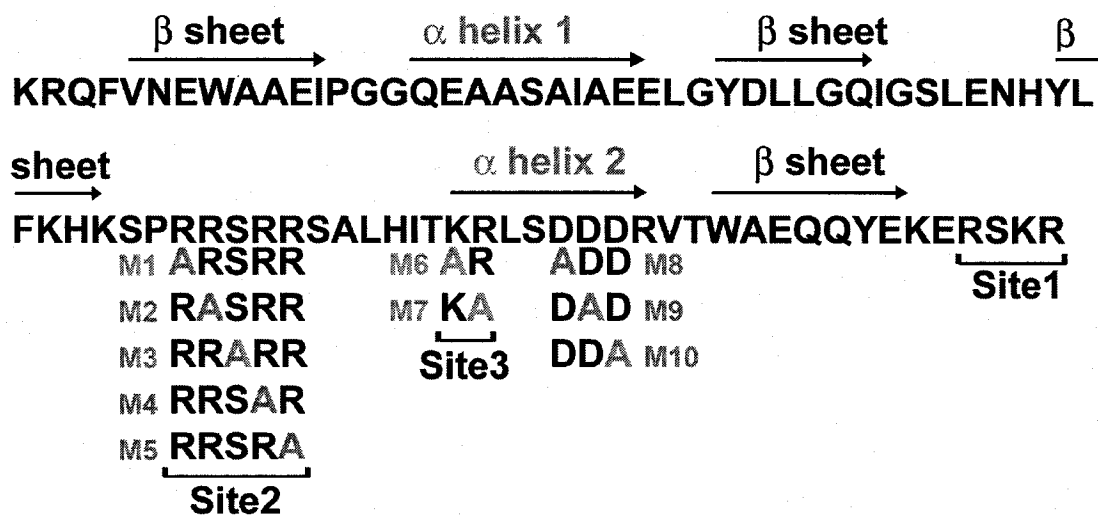


Figure 2

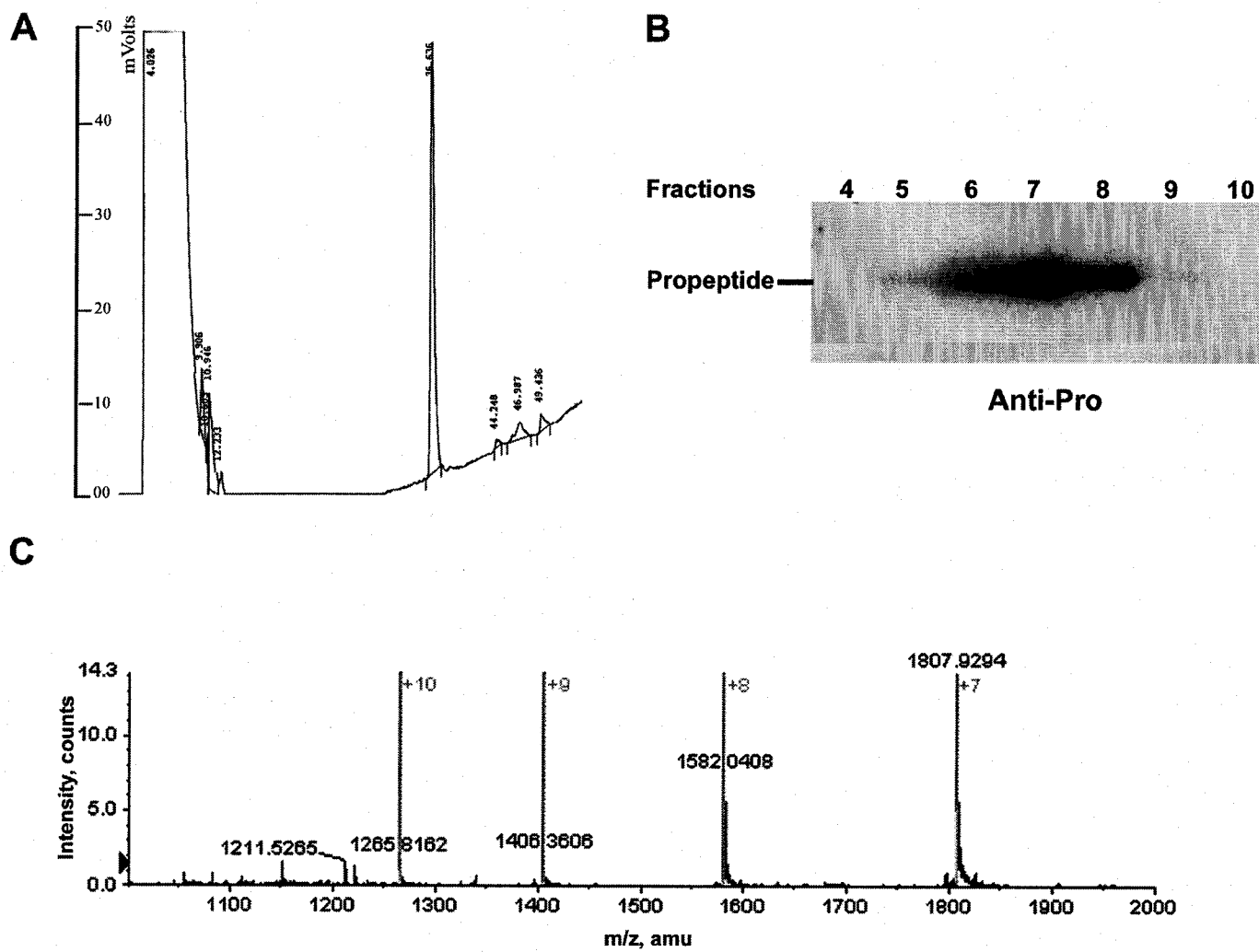


Figure 3

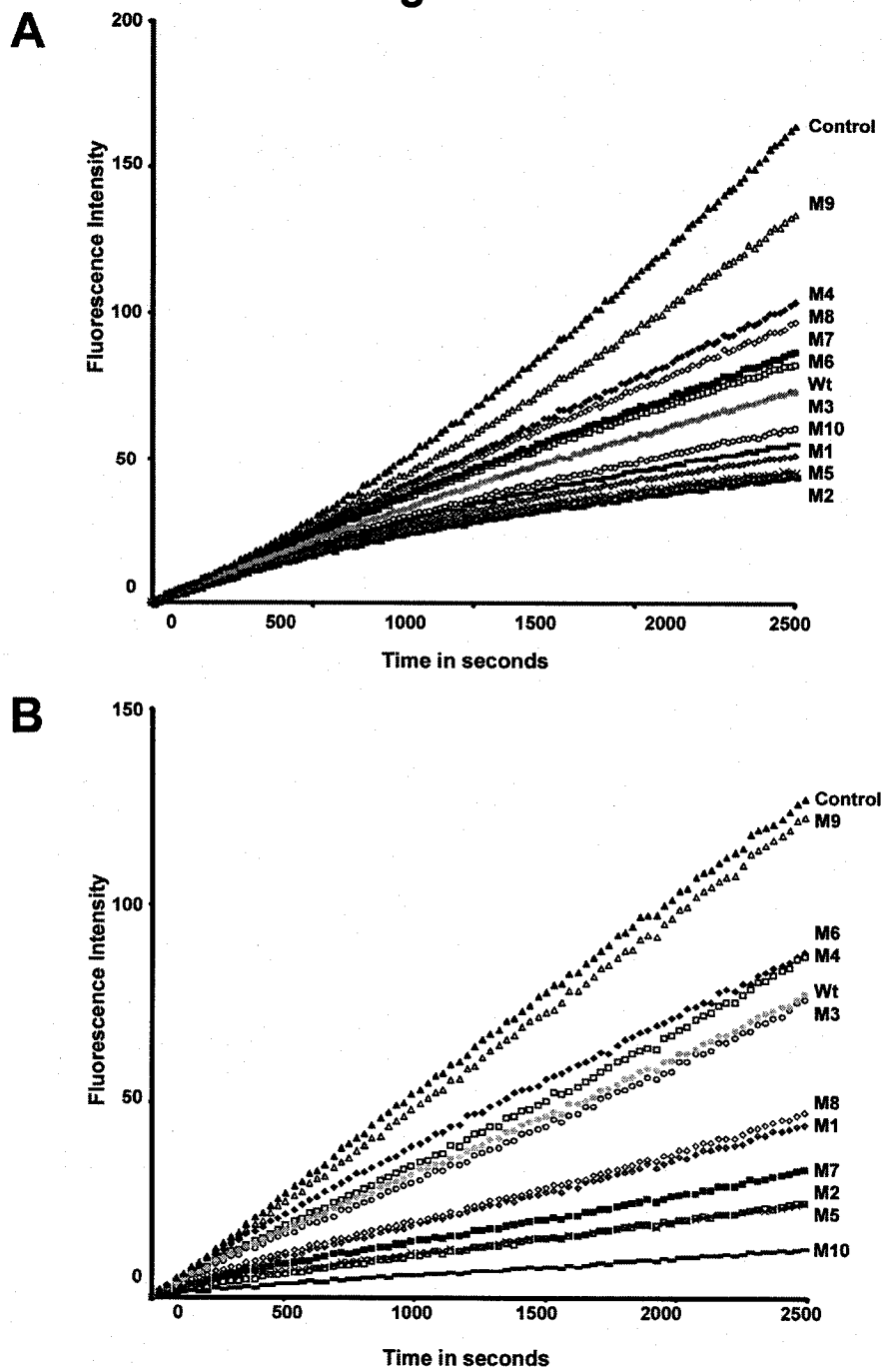


Figure 4

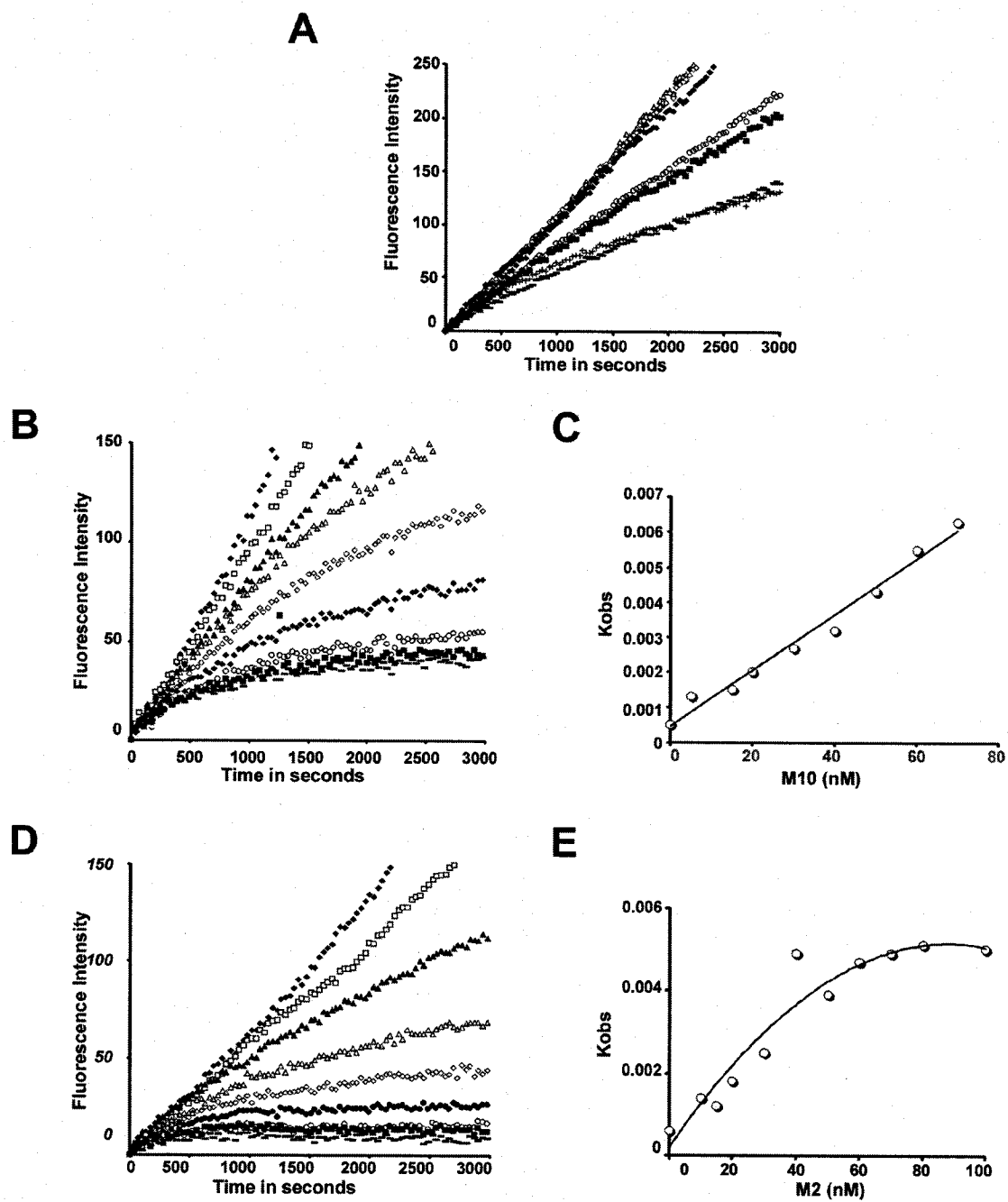
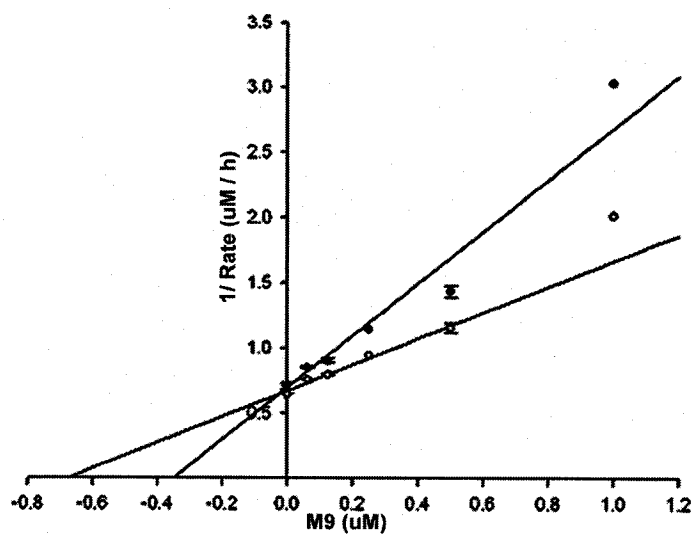


Figure 5

A



B

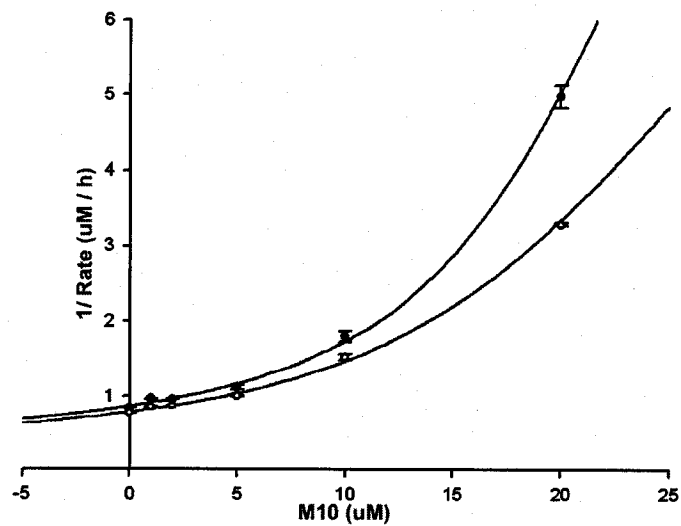


Figure 6

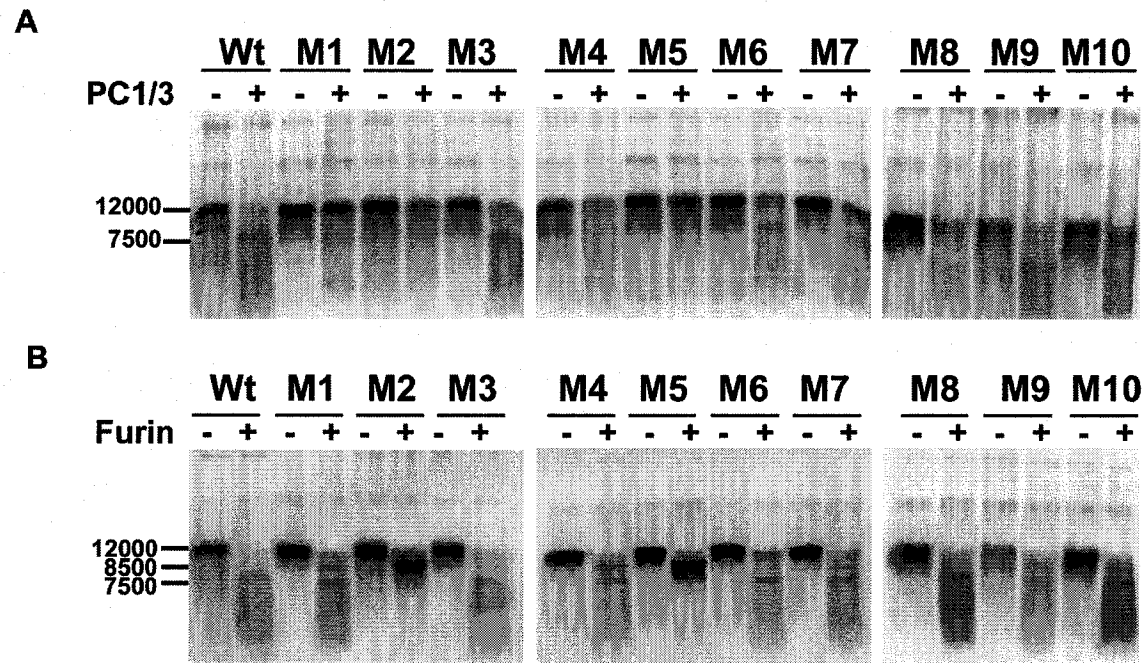
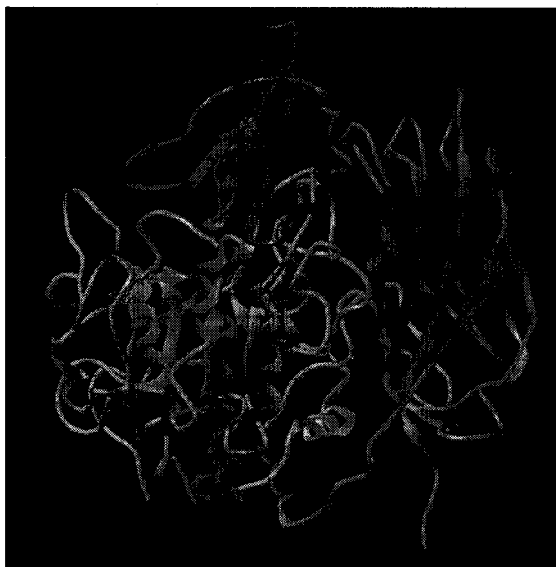
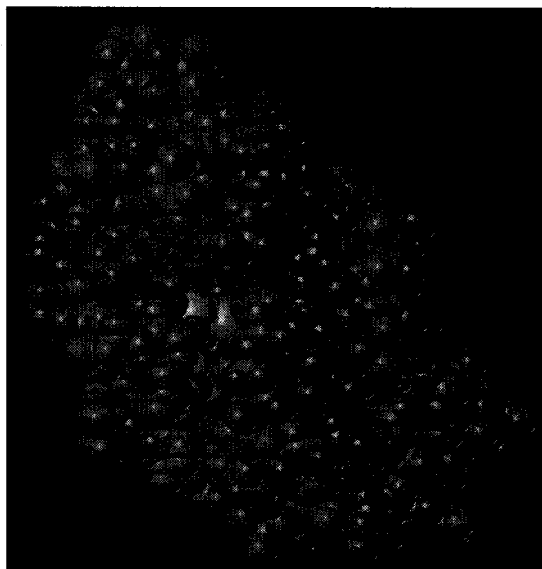


Figure 7

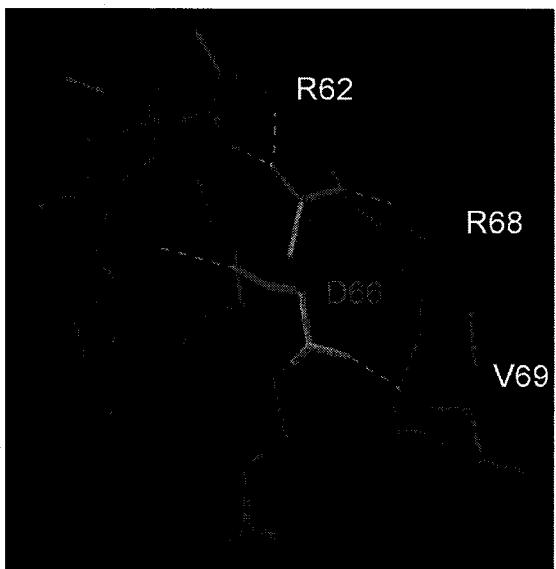
A



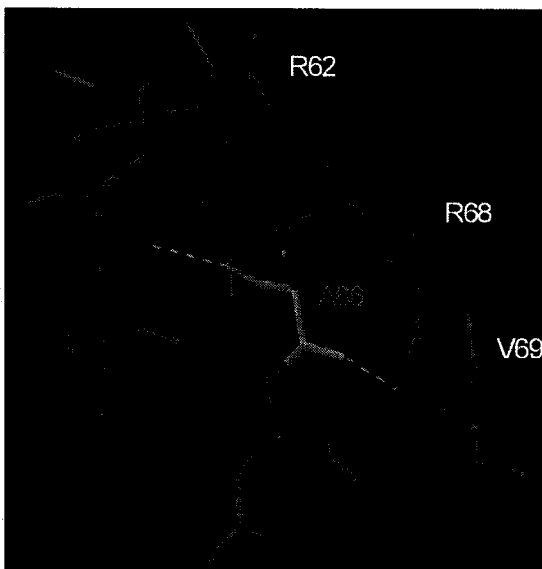
B



C



D



Chapitre IV: Article III.

THE COOH-TERMINAL REGION OF THE PROPROTEIN CONVERTASE 1/3 (PC1/3) EXERTS A BIMODAL REGULATION OF THE ENZYME ACTIVITY *IN VITRO*

Objectif de l'étude

Le présent manuscrit porte sur la caractérisation de l'effet du domaine C.T sur l'activité enzymatique de PC1/3. Ainsi, le peptide C.T recombinant a été généré et testé sous différentes conditions sur PC1/3. Les résultats présentés ici démontrent clairement que dépendamment de la concentration du C.T utilisée ainsi que de l'environnement ionique de la réaction, le C.T va avoir différents comportements vis-à-vis de PC1/3. En effet, à des concentrations μM de peptide C.T, l'activité de PC1/3 se trouve inhibée. Par contre, lorsque le C.T est présent au nM, l'activité de PC1/3 est augmentée. De plus, à des conditions de pH équivalentes à celles présentes tôt dans la voie de sécrétion, le C.T n'a aucun effet inhibiteur sur l'enzyme quelque soit sa concentration. Par ailleurs, les données présentées ici, illustrent que, contrairement à la prorégion, le C.T n'est pas clivé par l'enzyme. Ce phénomène suggère qu'une autre enzyme serait requise pour sa dégradation. Finalement, il ressort de ce manuscrit que PC1/3 est une enzyme complexe dont la régulation implique une interaction coordonnée entre ses différents domaines.

Contribution des auteurs

Nadia Rabah : L'article porte sur la caractérisation du domaine C-terminal (C.T) de PC1/3. J'ai produit et purifié le peptide C.T. J'ai produit l'enzyme recombinante. J'ai mené toutes les analyses enzymatiques et biochimiques présentées dans cet article. J'ai analysé les données cinétiques. J'ai écrit l'intégrité de l'article qui a ensuite été corrigé par mon directeur de thèse.

Dany Gauthier : Dany a participé à la purification de l'enzyme recombinante obtenue suite à l'infection des cellules ainsi que des larves d'insectes. Dany a également mené les expériences d'hydrolyse acide permettant de déterminer la concentration du peptide C.T.

Jimmy. D. Dikeakos : Unité de recherche en biochimie moléculaire de l'hypertension à l'IRCM. Jimmy a cloné le domaine C.T de PC1/3 dans le vecteur pet24.

Dr. Timothy. L. Reudelhuber : Directeur de laboratoire. Unité de recherche en biochimie moléculaire de l'hypertension à l'IRCM. Superviseur de thèse de Jimmy. D. Dikeakos.

Dr. Claude Lazure : Directeur du laboratoire. Unité de recherche structure et métabolisme des neuropeptides à IRCM. Superviseur de la thèse présentée ici.

ABSTRACT

The proprotein convertase PC1/3 preferentially cleaves its substrates in the dense core secretory granules of endocrine and neuroendocrine cells. Similarly to most proteinases synthesized first as zymogens, the proprotein convertase PC1/3 is synthesized as a larger precursor that undergoes proteolytic processing of its signal peptide and its propeptide. The NH₂-terminally located propeptide has been shown to be essential for folding and self-inhibition purposes. Furthermore, PC1/3 also possesses a COOH-terminal region (CT-peptide) which, for maximal enzymatic activity, must also be cleaved. Its role has been so far documented through transfection studies in terms of sorting and targeting of PC1/3 and chimeric proteins into secretory granules. In this study, we examined the properties of a 135 residues long purified, bacterially produced CT-peptide on the *in vitro* enzymatic activity of PC1/3. Depending on the amount of CT-peptide used, it is herein shown that the CT-peptide increases PC1/3 activity at low concentrations (nM) and decreases it at high concentrations (μM) a feature typical of an activator. Furthermore we demonstrate that, contrary to the propeptide, the CT-peptide is not further cleaved by PC1/3 though it is sensitive to hFurin activity. Based upon these results, it can be proposed that PC1/3, through its various domains, is capable of controlling its enzymatic activity in all regions of the cell it encounters. This mode of self-control is unique amongst members of all proteinases families.

¹ The abbreviations used are: AMC, 7-amino-4-methylcoumarin; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CRH, corticotropin releasing hormone; ESI, electron-spray ionization; Fc, part of the Fc fragment of a murine immunoglobulin heavy chain; hFurin, human furin; IMC, intramolecular chaperone; LC/MS/MS, liquid chromatography coupled tandem mass spectrometer; LPC, lymphoma proprotein convertase; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight; MCA, 4-methylcoumaryl-7-amide; PACE, paired basic amino acid cleaving enzyme; MSH, melanocyte stimulating hormone; PC(s), proprotein convertase(s); mPC1/3, murine proprotein convertase 1/3; POMC, pro-opiomelanocortin; RP-HPLC, reverse-phase high performance liquid chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Sf, *Spodoptera frugiperda*; TACE, tumor necrosis factor-α converting enzyme; TFA, trifluoroacetic acid; TGN, *trans* Golgi Network; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinase; TRH, thyrotropin releasing hormone.

1. Introduction

Proprotein convertases are subtilisin-like serine proteases implicated in the maturation of numerous biologically active molecules by cleaving their precursors at clusters of basic residues. These proteases act together with a number of other enzymes which will insure additional modifications such as removal of the cleaved basic residues, amidation at the COOH-terminus and acetylation at the NH₂-terminus. Seven members of the family were identified namely, furin, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6 and PC7/PC8/LPC. They all share a structural homology linking them to the subtilisin-kexin super-family. In spite of the fact that they can catalyze similar reactions they do differ by their cellular expression and intracellular localization which impart them different functions. PC1/3 and PC2 are the major endocrine members of the family. They are present in the secretory granules of endocrine and neuroendocrine cells. They act in concert allowing the maturation of hormonal precursors such as pro-insulin, pro-glucagon and pro-opiomelanocortin (POMC) (for review see (Eggelkraut-Gottanka and Beck-Sickinger, 2004b)) and thus, maintaining body homeostasis (for review see (Taylor et al., 2003)).

In order to prevent undue activation of the enzyme and uncontrolled proteolysis of hormone precursors, a tight spatial and temporal control is ensured by sorting the enzyme to an appropriate compartment. Furthermore, the control of enzyme activity is accomplished through limited proteolysis of the zymogen molecule. A role in controlling the enzymatic activity of PC1/3 has also been ascribed to a potential endogenous inhibitor, proSAAS (Fricker et al., 2000). Enzymatically active PC1/3 is generated through a series of irreversible proteolytic cleavages of the initial preproPC1/3. Following the removal of the signal peptide, an autocatalytic cleavage occurs in the early secretory pathway at the COOH-terminus of the proregion, following the sequence Arg⁸⁰-Ser-Lys-Arg⁸³² (Goodman and Gorman, 1994). However, the proregion is a potent inhibitor of PC1/3 and binds the active site with nM affinity *in vitro* resulting in the formation of a stable proregion-enzyme complex (Boudreault et al., 1998a). An additional cleavage of the proregion at Arg⁵¹-Ser-Arg-Arg⁵⁴ leads to

² The numbering used herein corresponds to the proPC1/3 complete sequence devoid of the signal peptide. Thus, the 83 residues propeptide corresponds to residues 1 to 83. The same applies to the numbering used with other convertases.

disruption of this complex and to the release of the 87 kDa form of PC1/3 encompassing positions 84 to 726 (Rabah et al., 2006). This latter form was shown to be active at near neutral pHs (pHs 7.5-8.0) (Boudreault et al., 1998b; Coates and Birch, 1998; Zhou and Lindberg, 1994). Once in its proper working environment notably requiring acidic conditions, the 87 kDa form is further processed to its fully active form namely the 66 kDa (71 kDa in the recombinant insect produced form). Appearance of an intermediate molecular form can also be observed as a 74 kDa protein. Both COOH-terminal cleavages were proposed to be accomplished in an intermolecular fashion *in vivo* (Zhou and Mains, 1994) and by the 87 kDa PC1/3 (Zhou and Lindberg, 1994) though this conversion can be significantly increased by addition of fully activated insect produced 71 kDa form³. The importance of the COOH-terminal peptide (henceforth referred to as CT-peptide) removal is illustrated through the introduction of mutations abolishing its release which not only result in preventing full zymogen activation but also leads to improper localization in the cell (Lusson et al., 1997). The CT-peptide has been attributed a variety of biological roles such as ability to interact with lipid membranes including lipid rafts as well as capacity to inhibit PC1/3 when over-expressed in a cell (Bernard et al., 2003; Blazquez et al., 2001; Boudreault et al., 1998b; Jutras et al., 2000; Lacombe et al., 2005).

While further characterizing *in vitro* the functional properties of a 135 residues CT-peptide towards its cognate enzyme, we found that the CT-peptide is able to activate PC1/3 when present at low concentration while inhibiting it at high concentration. Hence, in addition to the demonstrated role of the proregion for controlling the activation of the enzyme, it appears that the CT-peptide might be implicated in regulating the enzyme activity of the active enzyme. This new finding adds an additional level of complexity to the regulation of PC1/3.

2. Results and Discussion

It was previously reported that removal of the PC1/3 CT-peptide has a major impact on the enzymatic characteristics of PC1/3 and this concerns both the enzymatic properties such as pH optimum, proper recognition and cleavages of natural substrates as well as intrinsic

³ M. Villemure and C. Lazure, unpublished data

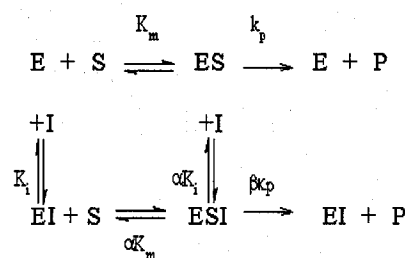
stability of the enzyme (Boudreault et al., 1998b; Zhou and Lindberg, 1994). Furthermore, it was also reported that the CT-peptide could act as a partial inhibitor of PC1/3 in the constitutive secretory pathway when overexpressed in GH4 or CHO cells (Jutras et al., 1997). This result was obtained after analysis of the enhanced conversion of human prorenin into mature renin in cells devoid of secretory granules. It was reported that, no conversion of prorenin into renin by PC1/3 could be observed in the constitutive secretory pathway of CHO cells contrary to what is observed in secretory granules containing GH4 cells. Hence, it was proposed that removal of the CT-peptide normally achieved in secretory granules was a prerequisite to PC1/3 enzyme activity in the constitutive pathway and that the CT-peptide appears to act as an inhibitor. However, the direct inhibition of PC1/3 enzymatic activity by a CT-peptide was tested *in vitro* before but no conclusive data was shown (Muller and Lindberg, 1999).

That a COOH-terminal located region could exhibit an inhibitory function represents a most interesting feature. Indeed, in the majority of known zymogens, the inhibitory function resides in the NH₂-terminal portion of the zymogen (Khan and James, 1998; Lazure, 2002). However, in some systems, removal of COOH-terminally located sequences must be proteolytically achieved in order to fully activate the zymogen. Most often in these cases, the need to remove these sequences for obtaining full activation is explained by the role of COOH-terminally located determinants in allowing proper secretion, correct folding or targeting. Nevertheless, a cooperative inhibitory interaction between NH₂- and COOH terminally located propeptides has been documented in the case of the Leucine aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* (Bzymek et al., 2004). Similarly, in the case of the Arg-gingipain (Mikolajczyk et al., 2003) and Asn-endopeptidase (Li et al., 2003), sequential removal of both NH₂- and COOH terminally located propeptides must be accomplished. It is worth noting that no inhibition constant (K_i) for any COOH-located propeptides have been reported so far. It thus appears that true inhibitory properties are solely ascribed to NH₂-terminally located domains thus rendering intriguing the possibility that PC1/3 CT-peptide might by itself possess intrinsic inhibiting properties.

Production of recombinant CT-peptide We expressed in bacteria a COOH-terminally His-tagged version of mPC1/3 CT-peptide corresponding to positions 592 to 726. Following purification using classical His-affinity chromatography and RP-HPLC, the resulting purified polypeptide was characterized by Western analysis, amino acid analysis and NH₂-terminal Edman sequencing (data not shown). Mass spectrometry showed that the isolated CT-peptide had a molecular mass within one Da of the computed mass 17635.9 (average) (data not shown). Using this approach, we obtained approximately 10 mg of purified CT-peptide per liter of bacterial culture.

Effect of the CT-peptide on mPC1/3 enzymatic activity The effect of various concentrations of the purified CT-peptide on the cleavage of the fluorogenic substrate pERTKR-MCA by enzymatically active PC1/3 was monitored over time (Figure 1). Addition of increasing amounts of CT-peptide in the micromolar range leads to progressive inhibition of PC1/3 enzymatic activity; a concentration of 10 μ M resulting in close to 50% inhibition. Notably, at CT-peptide concentrations in the nanomolar range and in otherwise identical incubation conditions, we were able to observe a significant increase in PC1/3 enzymatic activity; a concentration of 5 nM resulting in more than 10% increase. In identical conditions, we were unable to observe any activation and/or inhibition of the enzymatic activity of hfurin (data not shown).

When PC1/3 activity was examined at two different concentrations of substrate in the presence of μ M amounts of CT-peptide, it was apparent that the observed inhibition did not obey the simple definition of competitive, noncompetitive or uncompetitive type inhibition. Indeed, the results obtained suggest a mixed-type inhibitor model as illustrated by Dixon's plot (Figure 2). The best fit model (correlation coefficient of 0.9918) identifies the CT-peptide as a partial mixed inhibitor with a computed K_i value of $2.0 \pm 0.4 \mu$ M. Furthermore, the model used that best corresponded to the data has been defined by Segel (Segel, 1993) as a mixed inhibitor system C2 as shown below:



In addition to the derived K_i value, one must consider the values of two parameters taking into consideration the formation of a ternary complex factor which also contributes to the release of product, namely, α being equal to 15 ± 11 and β being equal to 0.6 ± 0.3 . In this model, the inhibitor-complex $\text{E}\cdot\text{I}$ can bind S with a 15 fold reduced affinity. Similarly, the $\text{E}\cdot\text{S}$ complex is also able to bind the inhibitor but with a K_i' of $30.0 \mu\text{M}$ (defined as αK_i). Furthermore, both the resulting complexes $\text{E}\cdot\text{S}$ and $\text{E}\cdot\text{S}\cdot\text{I}$ are able to release the product albeit for the latter at a rate *circa* 40% lower. In contrast, the NH_2 -terminally located propeptide behaves as a tight binding inhibitor exhibiting a K_i value of 4-6 nM (Boudreault et al., 1998a; Rabah et al., 2006). The CT-peptide is thus considerably weaker and its interaction with the active site of PC1/3 does not result in formation of a stable complex nor would it prevent PC1/3 to function enzymatically. This mixed-type inhibition also suggests that the CT-peptide can bind at site(s) other than the active site of the enzyme. Such a behavior was previously observed with synthetic peptides derived from the mPC1/3 propeptide (Basak and Lazure, 2003), from parathyroid related peptide and parathyroid hormone (Lazure et al., 1998) and from Barley serine proteinase inhibitor 2-derived cyclic peptides (Villemure et al., 2003).

As illustrated in Figure 1, the release of product by PC1/3 is increased upon the addition of nanomolar amount of CT-peptide, a behavior compatible with the CT-peptide being an activator. Following incubations of the enzyme with nM concentrations of CT-peptide in the presence of various concentrations of substrate, a K_a (activator constant) could be experimentally derived from a Lineweaver-Burk representation (not shown) and found to be $2.2 \pm 0.7 \text{ nM}$. Using the same model as above described, the α factor is 1.3 ± 0.2 and β is 1.5 ± 0.06 (the correlation coefficient being 0.9880). Hence, the complex $\text{E}\cdot\text{A}$ has less affinity for S than the complex $\text{E}\cdot\text{S}$ does for the activator A , thus favoring the increased release of P .

from the E•S•A than from the E•S complex. As seen in Figure 3, the CT-peptide influences the speed of reaction, since the velocity can be increased by up to 36% compared to the control value without significantly modifying the affinity of PC1/3 for the fluorogenic substrate. Furthermore, the CT-peptide having an affinity for the enzyme in the same range as the fluorogenic substrate is unlikely to directly compete with substrate at the active site.

The majority of enzymes sensitive to essential activators require often metallic ions, for example, magnesium, chloride and zinc to function (Moiseeva et al., 2005; Scott et al., 2003; Stray et al., 2004). However, others may require non-essential activators, which will increase enzymatic activity when present but without which the enzyme will still be able to process their substrates. Thus, for example, the liver 3 α hydroxysteroid dehydrogenase (Matsuura et al., 1996) and liver porphobilinogen-deaminase (Noriega et al., 1992) require an extrinsic factor which binds to particular sites of the enzyme. In the case of proprotein convertases, it has been previously shown that potassium ion is able *in vitro* to stimulate the processing of “good” substrates but not “poor” ones by Kex2 and furin at low concentrations but will inhibit the enzymatic activity of either enzyme at high concentrations (Rockwell and Fuller, 2002). Hence, it thus appears that *in vitro* the CT-peptide would function in a similar manner.

However, the pH optimum of the 87 kDa form is closer to neutral conditions (pH 7.5-8.0), conditions wherein the 66/71 kDa form is not stable and rapidly become inactive (Boudreault et al., 1998b; Zhou and Lindberg, 1994). It is possible that some removal of the CT-peptide could occur in early secretory compartments. Thus, the effect of adding the CT-peptide to active mPC1/3 was assessed but at more neutral pHs. As indicated in Figure 4, the only notable effect, namely an increase of enzymatic activity up to 50-60% and this irrespective of the amount of CT-peptide used up to 5 μ M, at pH 7.8 could be related to its capacity to activate the enzyme. Alternatively, this result could well be due strictly to a stabilizing effect induced by the formation of a complex between the 66 kDa form and the CT-peptide thus stabilizing the former. It is noteworthy that, as routinely observed with cell medium recovered from Sf9 cells expressing the recombinant mPC1/3, the presence of the 87 kDa form in excess of the 66/71 kDa facilitates isolation of the enzyme and helps in maintaining the enzymatic activity at a proper level. The observed activation could thus be the consequence of an enhanced stability of the 66 kDa form.

The CT-peptide is not cleaved by enzymatically active PC1/3 Another important feature of an enzymatic activator is that it should not be transformed during the reaction. In the case of the PC1/3 propeptide, which is implicated in the active site folding and inhibition, we showed that the enzyme, upon activation, is able to recognize it as a substrate (Boudreault et al., 1998a; Rabah et al., 2006). The site of cleavage, termed secondary cleavage site, resides at a particular site R⁵⁰RSRR⁵⁴, even if another basic site is present within the PC1/3 propeptide sequence. Using an identical approach, we incubated radiolabeled CT-peptide with enzymatically active mPC1/3 considering that the 135 residues CT-peptide contains three pairs of basic residues at positions 602/603, 627/628 and 659/660. As can be seen in Figure 5, mPC1/3 is not able to cleave the CT-peptide and thus is not able to recognize it as a substrate though, as above described, the CT-peptide is capable of binding to the enzyme. In contrast, recombinant human furin is able to cleave the mPC1/3 CT-peptide into a peptide exhibiting an apparent molecular mass of 12.5 kDa, a size which would favor cleavage COOH-terminal to the pair of Args occupying positions 627-628. This is an interesting observation since it signifies likely that the appearance of a 74 kDa mPC1/3 intermediate form in Sf9 media does not result from mPC1/3 activity but possibly could be produced by the *Spodoptera frugiperda* endogenous furin (Cieplik et al., 1998). However, it is likely that such a cleavage is not relevant *in vivo* since no evidence for COOH-terminal cleavage of PC1/3 has been obtained prior to its proper sorting into secretory granules and since furin is unlikely to encounter PC1/3 CT-peptide in the cells as either molecules are segregated away from each other early on after synthesis. However, recently, comparison of the peptidomic profile obtained from analysis of wild-type and PC2-null mice led to the identification of a decapeptide present in the PC1/3 CT-peptide. The amount of the corresponding peptide, GVEKMNVE, located at the extreme NH₂-terminus of the CT-peptide is reduced 10-fold in the extracts from two PC2-null animals (Pan et al., 2006). This suggests that PC2 could eventually be implicated in the cleavage of one or more pairs of basic residues present in the CT-peptide of PC1/3. Further studies will be needed to clarify if the cleavage is accomplished by PC2 itself or by another enzyme activated by the latter.

Can the propeptide and the CT-peptide behave synergistically and do they share an identical fate? As previously mentioned, there exist instances whereby peptides located at

the NH₂ and the COOH termini can negatively or positively cooperate in the activation of an enzyme. In the case of proPC1/3, removal of the various structural and functional domains is a sequential and coordinated event culminating in removal of the CT-peptide to release the fully active PC1/3 within the confines of the secretory granules (Zhou et al., 1995). We decided to investigate if the propeptide and the CT-peptide can act synergistically. To do so, as indicated in Figure 6, we added purified recombinant propeptide (20 nM) to the mPC1/3 enzymatic reaction. This led to a 50% reduction in enzymatic activity, which is in good agreement with our previously reported results (Boudreault et al., 1998a). In the presence of 5 nM of CT-peptide and 20 nM propeptide, this inhibition was reduced to 35%. Basically, the activation of PC1/3 enzymatic activity by 5 nM CT-peptide was the same in the presence or the absence of propeptide and is probably occurring on the uninhibited enzyme. However, when CT-peptide is added at μ M amounts, it can be seen that it does increase the inhibitory effect of the propeptide but that the effects of either molecule are not additive. Hence, high amounts of CT-peptide (μ M range) likely leads to a conformational change which will reduce substrate or propeptide accessibility to the active site.

The eventual fate of the CT-peptide which we have shown herein not to be degraded by mPC1/3 needs to be established. In the case of the propeptide, thought to be essential for protease folding and as an auto-inhibitor during the transit from the ER to the secretory granules, it is cleaved in the early secretory compartments. However, it remains associated with the mature enzyme until both reach the secretory granules compartments in order to inhibit PC1/3 enzymatic activity. This process can be readily visualized through immunocytochemistry in ATt20 cells, producing PC1/3 endogenously. Indeed, the propeptide follows PC1/3 in the mature secretory granules, co-localizes with ACTH and β -endorphin and is released in the medium upon secretagogue mediated secretion⁴. Interestingly, though the fate of the PC2 propeptide was clearly described, attempts to localize it immunologically in secretory granules were not successful (Muller et al., 2000). Unfortunately, examining the fate of the CT-peptide could not be accomplished in the same manner though it was clearly shown that a tagged Fc-CT-terminal construct co-localizes in secretory granules and is secreted upon stimulation (Lacombe et al., 2005). Hence, it can be concluded that the propeptide as well as the CT-peptide both ultimately reach the secretory granules and are

⁴ Rabah N. and Lazure C., unpublished data

secreted upon stimulation of the cells. Interestingly, it was reported previously that no enzyme activity resulting from the PC1/3 66 kDa form could be recovered from the medium of secretagogues stimulated cells (Zhou and Lindberg, 1994). This result can be attributed to the reported lability of the PC1/3 enzymatic activity at near neutral pHs but could also be due to the secretion of non-active enzyme. Nevertheless, *in vivo* implication of this *in vitro* study remains to be firmly established.

PC1/3 is able to auto-regulate its own enzymatic activity The CT-peptide is the least conserved region amongst all the members of the convertase family hinting that it is able to confer special features to its cognate enzyme. For example, it was recently shown that the cysteine-rich domain of PC5/6A was responsible for membrane tethering thus insuring cell surface anchoring (Nour et al., 2003). In other cases, the CT-peptide contains integral transmembrane motifs affecting the sorting and the recycling of furin and PC5/6B (Teuchert et al., 1999a; Teuchert et al., 1999b; Xiang et al., 2000). In the case of PC1/3, such a transmembrane sequence was postulated (Arnaoutova et al., 2003) but a recent study does not support such a proposal (Stettler et al., 2005). Nevertheless, peptide sequences present within the CT-peptide (Boudreault et al., 1998a) in combination with the propeptide (Bernard et al., 2003) could be responsible for the association of PC1/3 to peripheral membrane components and/or lipid rafts. However, based upon the results obtained in this *in vitro* study, another role for the CT-peptide, as originally proposed in overexpression experiments (Jutras et al., 1997), could also be suggested. Indeed, comparable to the role of the propeptide prior to entrance into the secretory granules compartments, the CT-peptide could play a similar role in the secretory granules first by stimulating conversion of the 87 kDa form in the more active 66 kDa through activation. Hence, after the synthesis of proPC1/3, the propeptide is cleaved off in the early secretory compartments but stays associated with the enzyme till it reaches the appropriate localization for full activity. Reaching these sites would be made possible through specific interactions mediated by the propeptide and the still tethered CT-peptide with membrane components. Upon reaching the TGN, some prohormones can be processed by the PC1/3 87 kDa though the majority of prohormone substrates will be cleaved later on in the secretory granules by the shorter 66 kDa form. The CT-peptide could help in substrate cleavages in the early secretory compartments either by stabilizing the enzyme or by weakening the inhibitory effect of the propeptide, similarly to what was shown in the

interaction of the tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) with N-TIMP-3 (Lee et al., 2002). The secretory granules environment including the high local concentrations of substrates, the Ca^{++} and the decreased pH will promote further propeptide cleavages as well as removal of the CT-peptide. This transformation could be enhanced initially by the low concentration of CT-peptide to increase the production of active 66 kDa. Accumulation of products (decreasing amounts of substrates) as well as the recognized intrinsic lability of the 66 kDa form would later contribute to a much diminished if not terminated PC1/3 enzymatic activity. This proposed mode of action must be related to the known observation that some substrates, such as POMC, need to be cleaved by PC2 in the secretory granules in a sequential manner hence requiring that one enzyme acts prior to the other. In conclusion, it appears that numerous peptide sequences within either the propeptide or the CT-peptide are able to closely interact with the catalytic and/or the P-domain at sites remote from the active site though they remain at the moment largely undefined.

3. Experimental Procedures

Expression and Purification of Recombinant mPC1/3 and hfurin Recombinant murine PC1/3 is produced using the baculovirus expression system in Sf9 insect cells (Boudreault et al., 1998b) or through intracoelemic injection in insect larvae (Rabah et al., 2004). Once expressed, the enzyme is recovered and purified as previously described (Boudreault et al., 1998b; Rabah et al., 2004). The recombinant human soluble (COOH-terminus truncated) hfurin is obtained from the medium of Sf9 insect cells (Boudreault et al., 1998a). The enzymatic activity of the recombinant convertase is assayed routinely by fluorometric assays using a fluorogenic substrate (Jean et al., 1995).

Cloning, Expression and Purification of Recombinant mPC1/3 CT-peptide The cDNA encoding the murine PC1/3 CT-peptide from positions 592 to 726 was cloned into a pe24b+ bacterial expression vector. The resulting COOH-terminally His-tagged protein was expressed in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) (Novagen) after induction with 1mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside for 4 hours at 37°C. Following this period, the cells were harvested through centrifugation. The bacterial cells were lysed by repeated sonications in the presence of 100 $\mu\text{g/mL}$ of lysozyme and the resulting suspension was filtered and

applied unto a Ni⁺⁺-Sephacrose column (GE Healthcare Bio-Sciences Inc., Baie d'Urfé, Qc, Canada). Following extensive washings of the column, the peptide was eluted using 1 M imidazole. The eluate was dialyzed against 0.1% acetic acid and the peptide further purified on an analytical Vydac-C4 RP-HPLC column (25 x 0.46 cm; The Separation Group, Hesperia, CA) using a Varian 9010/9050 chromatography system. The aqueous phase consisted of 0.1% TFA (v/v) in water and the elution was carried out first isocratically at 10% organic phase (acetonitrile containing 0.1% TFA) followed by a 1%/min linear gradient of organic phase to 65% with a flow rate of 1 mL/min. The elution was monitored by measuring absorbance at 225 nm. The content of individual RP-HPLC-fractions was analyzed by SDS-polyacrylamide electrophoresis followed by coloration and Western blotting using a previously described COOH-terminal directed polyclonal antibody (Boudreault et al., 1998b). The immunoreactive fractions were pooled and kept at -20°C. Prior to enzymatic assays, aliquots were dried down under vacuo and reconstituted in double-distilled water.

The peptide purity and concentration were determined by quantitative amino acid analysis following 18-24 h hydrolysis in the presence of 5.7 N HCL in vacuo at 110°C on a Beckman autoanalyzer (Model 6300) with a postcolumn ninhydrin detection system coupled to a Varian DS604 data station. The NH₂-terminal amino acid sequence, ASMTGGQQMGRDPGVEKMVNVVEKR (the underlined sequence indicates the NH₂-terminal portion of the mPC1/3 CT-peptide), was determined through automated Edman degradation using an Applied Biosystems Procise 494cLC sequencer (Foster City, CA, USA). Molecular mass determination and mass spectral analysis were done on a RP-HPLC purified aliquot directly injected unto a Zorbax SB-C18 column (0.3 x 250 mm; Phenomenex, Torrance, CA, USA) connected to a μ -Liquid chromatograph coupled to a QSTAR-XL hybrid LC/MS/MS Mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The data generated were analyzed with the AnalystTM-QS V1.1 software (Applied Biosystems/MDS-Sciex).

Enzymatic Assays and Kinetic analysis All enzymatic assays of recombinant mPC1/3 were carried out using initial rate determinations at room temperature on a Gemini EM spectrofluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) in black-96-well flat bottomed plates (Corning Life Sciences, Acton, MA, USA). The final assay conditions for

mPC1/3 consisted of 100 mM sodium acetate at pH 6.0 containing 10 mM CaCl₂ and 100 μ M of the fluorogenic substrate pGlu-Arg-Thr-Lys-Arg-MCA (Peptides International, Louisville, KY, USA). Prior to use, the purified recombinant enzyme was incubated in the presence of Ca⁺⁺ for approximately 6 h or until the release of AMC was determined as linear, in order to allow conversion into the fully active 71 kDa form. The fluorescence of the released 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) was monitored using an excitation and an emission wavelength of 370 nm and 460 nm, respectively. All the assays were started by the addition of the enzyme (corresponding to an activity measured as 0.5-1.5 μ M /h (AMC-released) and the data points collected every 30sec for one hour. The kinetic parameters were determined through curve fitting algorithm using the Enzyme Kinetic V1.0 module (SigmaPlot 2000 for Windows V6.1; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Each data point in the graphs is the mean value derived from at least two different experiments done in duplicate.

Iodination and Cleavage of the CT-peptide by recombinant mPC1/3 and hfurin The purified CT-peptide was chemically labeled with radioactive iodine as previously described (Rabah et al., 2006). The cleavage reaction was carried out with 2.5 x 10⁵ cpm of radiolabeled CT-peptide in sodium acetate buffer, as above described. In the case of hfurin, the reaction conditions were 100 mM Tris.HCl buffer, pH 7.0, with 1mM CaCl₂. The reaction was started by the addition of enzyme preparation corresponding to 0.5-1.5 μ M/h (AMC-released). After a 30 min incubation period, the reaction was stopped with 10 μ l of glacial acetic acid. The sample was subjected to a 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and following an overnight transfer unto an Immobilon-P membrane (Millipore, Billerica, MA, USA), the radioactivity was measured using a Storm model 860 Imaging system (GE Healthcare Bio-Sciences Inc., Baie d'Urfé, Qc, Canada) with PhosphorImager capability and ImageQuant TL software.

4. Acknowledgements

We thank Dr Bernard F. Gibbs (MDS-Pharma Services, Montréal, Québec, Canada) for granting us access to Mass Spectrometer used in this study and for his expertise. We thank M. Daniel J. Gauthier (IRCM) for critical reading and suggestions of the manuscript. Nadia Rabah is a recipient of a Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) studentship award and is registered at the Division of Experimental Medicine of McGill University.

This work was supported by a research grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-74479).

5. Figures legends

Figure 1: *Purified CT-peptide is able to modulate in vitro the enzymatic activity of mPC1/3.* Progress curves obtained following incubation of recombinant mPC1/3 with 100 μ M fluorogenic substrate (pERTKR-MCA) in the presence of increasing concentrations from 0 to 10 μ M of RP-HPLC purified CT-peptide. The control condition corresponds to incubation of the enzyme with the substrate in absence of any CT-peptide [CT-peptide] = 0.

Figure 2: *Graphic representations of the inhibition of mPC1/3 by the CT-peptide.* Dixon's plot of $1/V$ versus inhibitor concentrations. (●) [S] = 50 μ M; (○) [S] = 100 μ M. Error bars are indicative of standard deviation and curves were best-fitted as described in the materials and methods section.

Figure 3: *The CT-peptide is able to increase the release of product by PC1/3.* Representative Michaelis-Menten plots of V versus increasing fluorogenic substrate (pERTKR-MCA) in the presence of nM concentrations of RP-HPLC purified CT-peptide. (○) [A] = 0 nM, (▼) [A] = 2.5 nM, (Δ) [A] = 5 nM and (■) [A] = 10 nM. Error bars are indicative of standard deviation.

Figure 4: *The CT-peptide is able to activate mPC1/3 at near neutral pH.* A fixed amount of mPC1/3 was incubated in the presence of increasing amounts of RP-HPLC purified CT-peptide at pH 7.8 and the amount of AMC-released was determined. Error bars are indicative of standard deviation.

Figure 5: *The CT-peptide is cleaved by hfurin but not by mPC1/3.* The RP-HPLC purified CT-peptide was iodinated and an aliquot corresponding to 2.5×10^5 cpm was incubated without any enzyme (left lane), with enzymatically active mPC1/3 (middle lane) and with hfurin (right lane). The top arrow indicates the position of intact CT-peptide whereas the bottom arrow indicates the position of the fragment released upon incubation with hfurin.

Figure 6: *The CT-peptide can act together with the propeptide to modify the enzymatic activity of mPC1/3.* Enzymatically active mPC1/3 was incubated at pH 6.0 with either propeptide and CT-peptide alone or with mixture of propeptide and CT-peptide and the released AMC was measured. The propeptide was obtained as previously described (see text). Error bars are indicative of standard deviation.

Figure 1

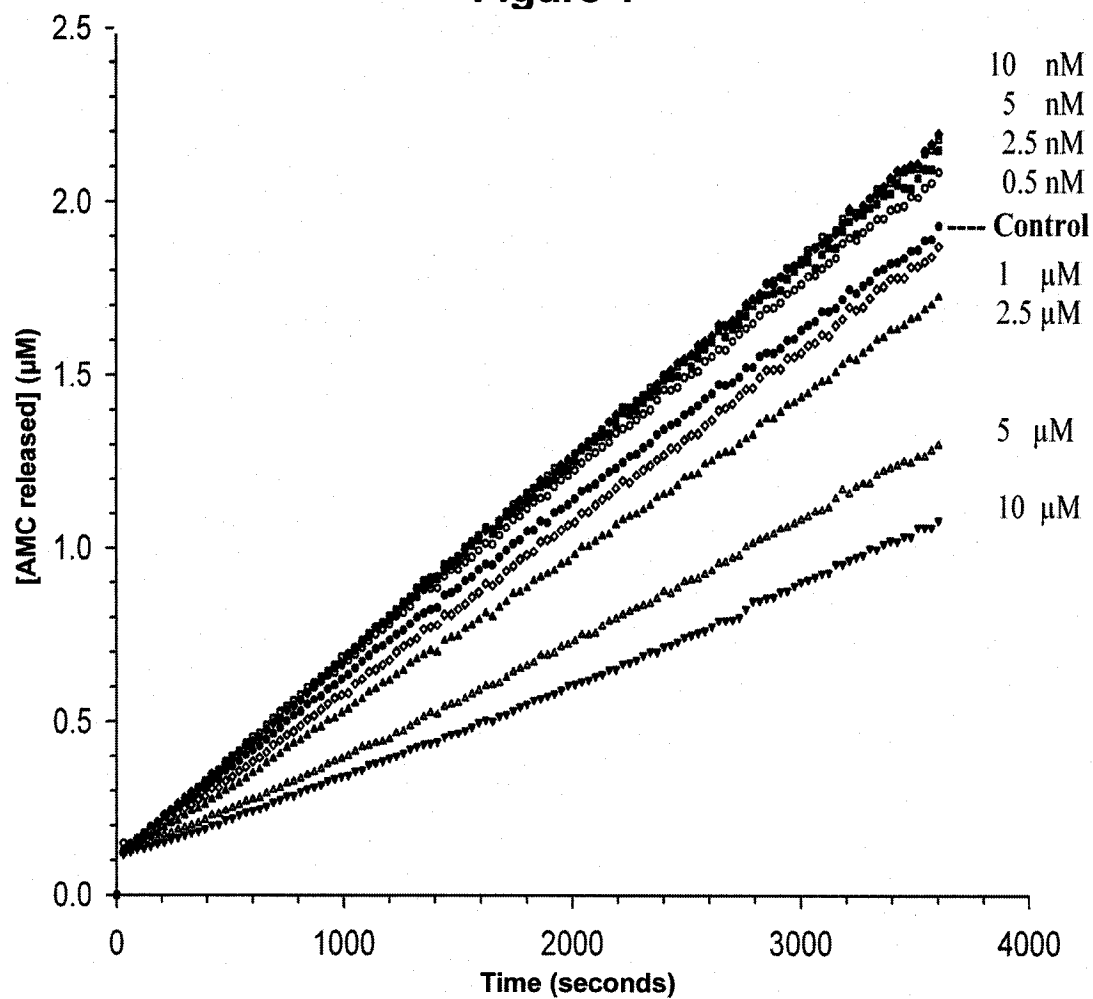


Figure 2

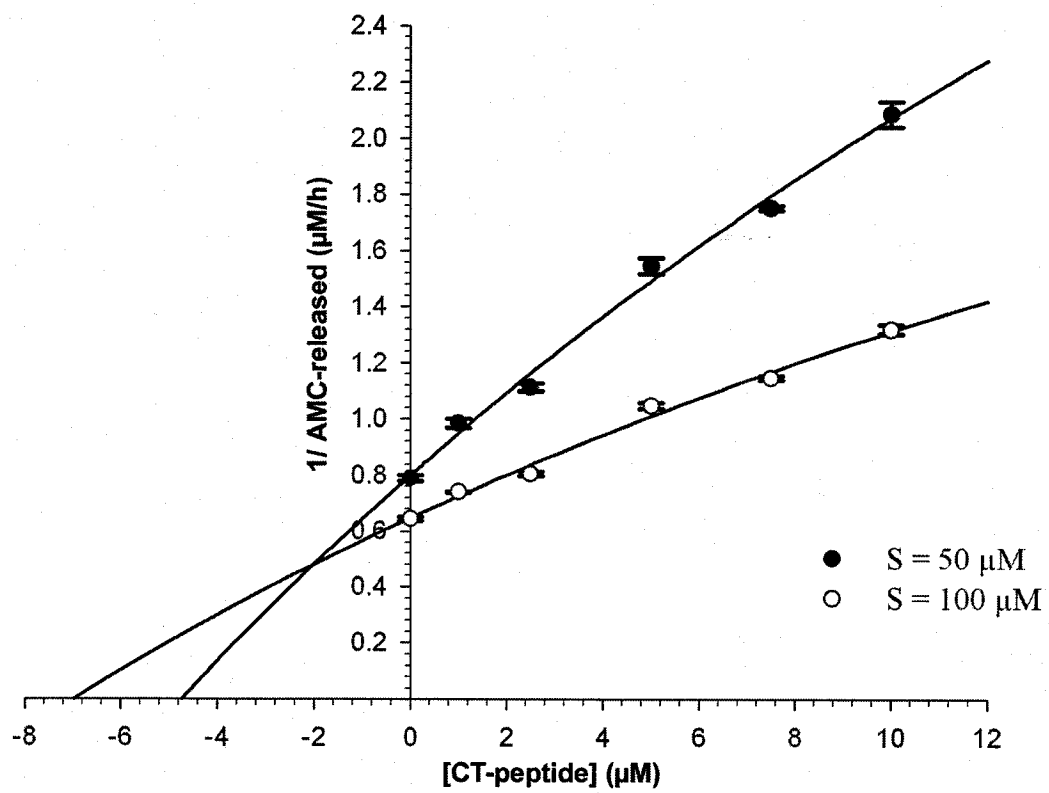


Figure 3

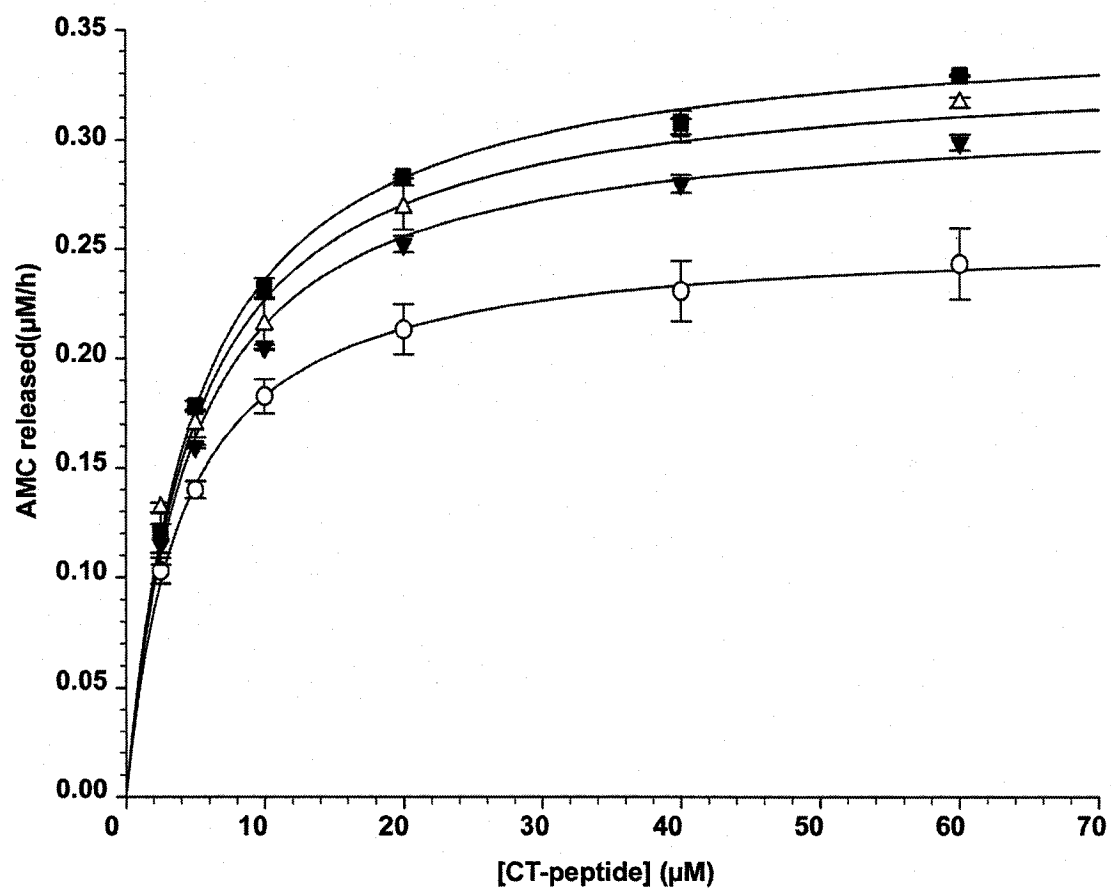


Figure 4

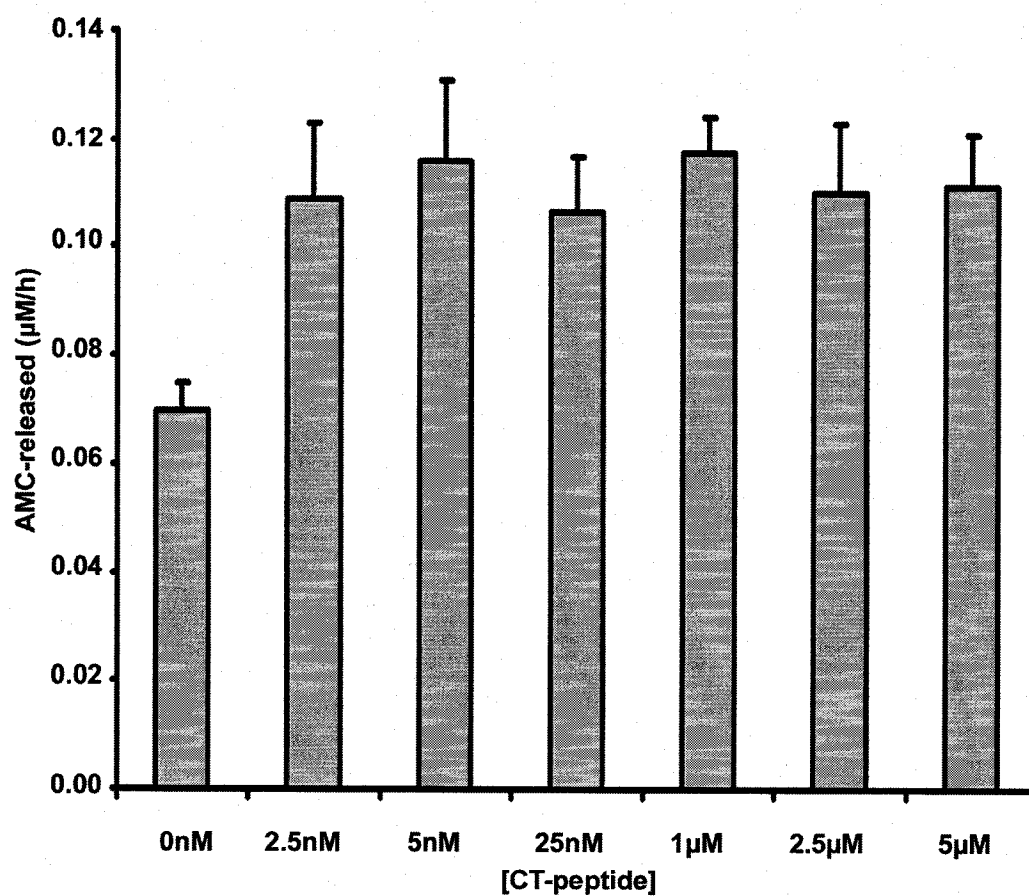


Figure 5

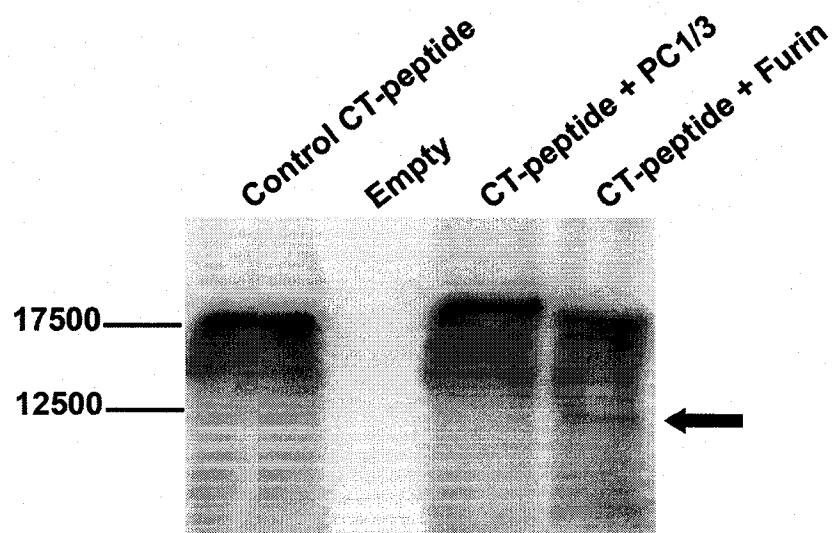
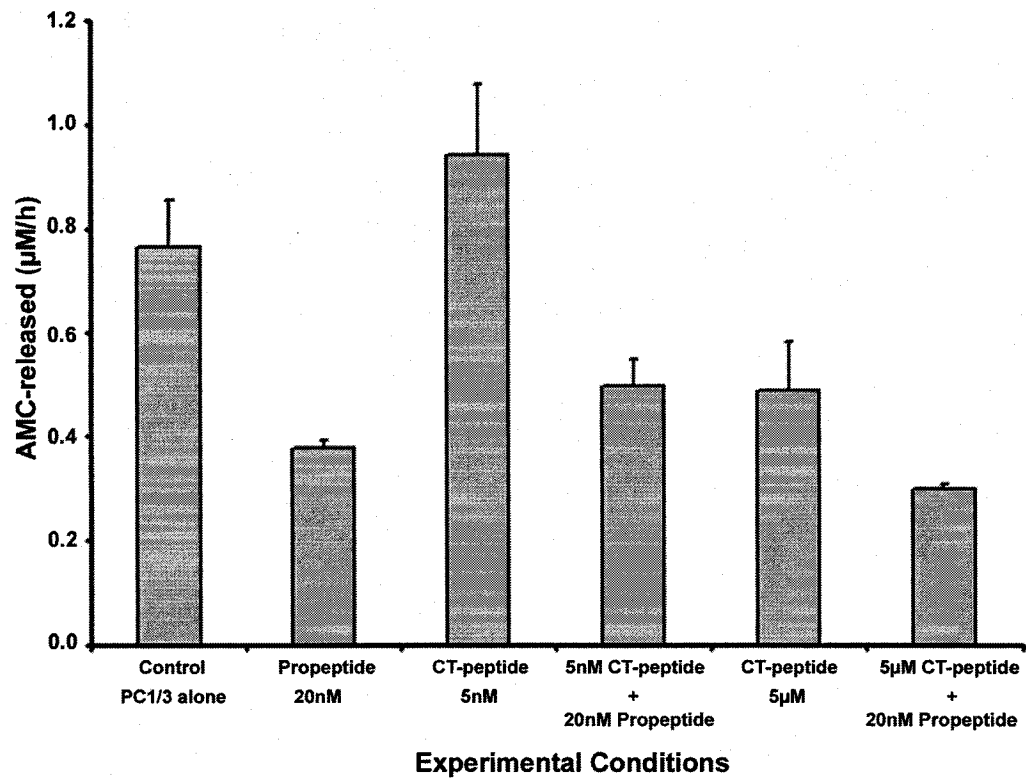


Figure 6



Chapitre V:

Discussion générale

Discussion générale

1. Production de PC1/3

Le travail présenté dans cette thèse porte sur la production ainsi que la caractérisation de la prohormone convertase 1/3. Tel que mentionné dans l'introduction, l'une des étapes limitantes à la caractérisation de l'enzyme reste sa production à large échelle pour permettre des études de détermination structurale. La production de PC1/3 a été longtemps faite dans les cellules de mammifères telles que les cellules somatotropes GH₄C₁ (Jean et al., 1993), les cellules ovariennes de hamster chinois (C.H.O) (Zhou and Lindberg, 1993) ainsi que les cellules L d'intestin de souris (Rufaut et al., 1993). L'expression était conduite le plus souvent par infection des cellules avec le virus de la vaccine codant pour l'enzyme recombinante. Ces systèmes d'expression conduisent à la production de petites quantités (microgrammes) d'enzyme. L'enzyme ainsi produite est souvent difficile à purifier car, d'une part, les quantités obtenues sont faibles et, d'autre part, l'utilisation de sérum requis pour la culture des cellules de mammifères complique les étapes de purification.

Le laboratoire du Dr. Lazure a été le premier à produire de la PC1/3 dans les cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* (SF9) suite à l'infection des cellules par un baculovirus recombinant. L'enzyme obtenue suite à l'infection des cellules SF9 par la baculovirus est récupérée du milieu sous deux formes actives de poids moléculaire de 85 et 71kDa correspondant aux formes 87 et 66kDa des cellules de mammifères décrites dans l'introduction. Cette technique permet l'obtention d'environ 1 à 1.5 mg de PC1/3 par litre de culture (Boudreault et al., 1998b) et permet de contourner l'utilisation de sérum. Bien que cette quantité soit satisfaisante pour la caractérisation enzymatique de la protéine, elle reste insuffisante pour d'éventuelles études structurales.

L'utilisation du baculovirus génétiquement modifié à des fins scientifiques est très répandue. En effet, dès le début des années 80 le baculovirus a été considéré comme un outil technologique important puisqu'il a été conçu pour être utilisé comme insecticide

mais également comme moyen de production de protéines recombinantes (Inceoglu et al., 2006; Maeda et al., 1985). L'un des avantages principaux de l'utilisation des cellules d'insecte est qu'elles possèdent, contrairement aux cellules d'organismes inférieurs (bactéries et levures), la machinerie nécessaire permettant à la protéine produite d'acquérir les modifications post-traductionnelles semblables à celles obtenues dans les cellules de mammifères.

Différentes études ont, par la suite, essayé d'améliorer la production protéique en modifiant différents facteurs tels que :

(i) Les promoteurs contrôlant l'expression de la protéine d'intérêt. Le promoteur le plus utilisé pour la production de protéine par le système du baculovirus est celui de la polyhédrine. La polyhédrine est une protéine virale exprimée tardivement au cours de l'infection. Elle est produite en très grande quantité, car elle peut représenter 50% des protéines totales de la cellule infectée, et est nécessaire pour l'infection de nouvelles cellules hôtes. Cependant, d'autres promoteurs sont maintenant disponibles tel que le p10 qui est activé tôt dans l'infection permettant ainsi la production de la protéine sur une plus longue durée. De nombreuses études visant à comparer l'efficacité de différents promoteurs ont été faites. Ainsi, il a été montré que certaines protéines vont présenter des exigences quant au promoteur utilisé pour leur expression, ceci est le cas du récepteur porcin de l'hormone lipotrope (Bozon et al., 1995) ou encore de l'hormone juvénile estérase d'insecte (Bonning and Hammock, 1995). Par contre, la production d'autres protéines telle que la glycoprotéine gp 120 du virus d'immuno-déficience-humain (HIV) n'est pas affectée par le changement de promoteur (Golden et al., 1998).

(ii) Pour les protéines sécrétées ce sont les séquences signal, médiant la sécrétion, qui ont été l'enjeu de modifications (Golden et al., 1998; Jarvis et al., 1993; Koganesawa et al., 2001). Cet aspect est discuté en détail dans la discussion du chapitre II.

(iii) La dernière mise au point touche la culture cellulaire. En effet, il existe différents types de cellules d'insecte sur le marché telles que : les cellules SF9, les cellules SF21

(un autre clone cellulaire issu de *Spodoptera frugiperda*), les cellules Schneider de *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*), ou encore les cellules High Five issues des larves d'insecte *Tricoplusia ni*. Ces différents types cellulaires peuvent donner des résultats variables quant aux quantités de protéines produites. Ainsi, une étude visant à maximiser la production du récepteur à Estrogène β a révélé que les cellules SF21 étaient les plus efficaces dans la production de la protéine comparée aux SF9 et aux High Five (Kulakosky and Klinge, 2003). De plus, il a été démontré lors de différentes études que la production protéique varie souvent en fonction de la densité des cellules infectées, des conditions de culture ainsi que des nutriments fournis (Ikonomou et al., 2003). La conclusion générale qui découle de toutes ces études est que chaque protéine possède des exigences spécifiques et que la mise au point d'un système de production efficace pour une protéine donnée passe par l'essai des différentes conditions citées ci-dessus. Dans le chapitre II je démontre clairement que la modification du vecteur d'expression (baculovirus) peut augmenter drastiquement la production de PC1/3 dans les cellules SF9.

Le choix de modifier le peptide signal de PC1/3 par un peptide signal de la protéine gp67 d'un virus d'insecte repose sur le fait que la majeure partie de l'enzyme produite (50 mg par litre) par le système Baculo reste bloquée dans les cellules et s'accumule dans des vésicules d'inclusions sous la forme de pré-pro-enzyme et de pro-enzyme (Annexe 2) (Beaudreaut et al., 1998b). Ce résultat découle probablement de la surproduction de PC1/3, qui du fait de l'inefficacité du clivage de la séquence signal originale, s'accumule sous forme de pre-pro-PC1/3. La protéine gp67 est une glycoprotéine de l'enveloppe virale nécessaire à la pénétration du virus dans la cellule hôte par endocytose. Une fois la cellule infectée, une grande quantité de la protéine gp67 est produite et sécrétée à l'extérieur afin d'être incorporée aux particules virales nouvellement formées (Whitford et al., 1989). Ce choix s'est avéré judicieux puisque la sécrétion de PC1/3 des SF9 double suite à cette modification (Figure 2, Chapitre II).

L'autre changement apporté au vecteur touche le domaine C.T. En effet, il a été montré que le C-terminal est impliqué dans l'interaction avec les composants lipidiques

et la ségrégation dans la voie de sécrétion régulée (Blazquez et al., 2001; Jutras et al., 2000). Sa délétion pourrait, ainsi, faciliter la sécrétion de la protéine tronquée par les cellules d'insectes qui ne possèdent pas de voie de sécrétion régulée (Jarvis et al., 1990). De plus, des études antérieures visant à produire la Kex2 de levure par le système du baculovirus montrent que la délétion de la queue carboxy-terminale ainsi que du domaine transmembranaire de Kex2 permet l'augmentation de l'activité sécrétée de 50 à 90% (Germain et al., 1992). Il est à noter que la production de la Furine dans ces cellules ne souffre pas de ces contraintes puisque l'enzyme est exprimée de façon continue dans le milieu et ce jusqu'à 90 h après infection (Bravo et al., 1994). La suppression du domaine C-terminal de PC1/3 permet ainsi d'augmenter de 125% la sécrétion ainsi que l'activité de PC1/3 dans le milieu (Figure 2 et Figure 3, Chapitre II). Malheureusement l'enzyme produite avec ce vecteur est beaucoup moins stable et plus difficile à conserver active, en accord avec les caractéristiques déjà mentionnées de la forme de 71kDa (Boudreault et al., 1998b). Finalement, l'effet des deux modifications, séquence signal de la protéine gp67 et la délétion du C.T, n'est pas additif en terme d'activité récupérée dans le milieu, ceci étant possiblement dû à la saturation de la machinerie cellulaire du système utilisé.

Par ailleurs, le fait de changer d'hôte d'expression, c'est-à-dire d'utiliser des larves entières de *Tricoplusia ni* (*T.ni*) (la fausse-arpenteuse du chou) (Annexe 3) conduit à l'obtention d'environ 30 µg de PC1/3 par larve. L'utilisation des larves d'insectes a permis de contourner les désavantages de la culture cellulaire à grande échelle nécessitant un bioréacteur et / ou les contraintes associées au contrôle des conditions de culture (pH, nutriments etc.). Ainsi, l'injection automatisée de 500 à 1000 larves pourrait donner une quantité suffisante pour la cristallisation de l'enzyme. Suite, à la publication de l'article, j'ai effectué une injection manuelle de plus de 150 larves en vue de produire une grande quantité de PC1/3. L'enzyme produite a été purifiée et sa séquence N-terminale en acides aminés a été déterminée. Malgré la présence d'une bande majeure sur électrophorèse SDS suite à la coloration, le matériel obtenu s'est révélé hétérogène. En effet, l'analyse du contenu protéique de cette bande a révélé la présence de deux protéines contaminantes. Ces protéines, après identification par spectrométrie de masse et

séquençage N-terminal, sont : la *Trichoplusia ni* acidic juvenil hormone-suppressible protein 1 (AJHSPI, accession P22327) (Annexe 4) et la α -arylphorin similaire à celle de l'insecte *Spodoptera Litura* (GI 5869989). Ces protéines ont des poids moléculaires semblables à celui de la PC1/3, 72.7 et 84kDa, respectivement. De plus, elles possèdent des points isoélectriques similaires, 6.09 et 6.7, respectivement, ce qui a empêché leur détection par gel lors des expériences précédentes. De plus, elles co-purifient avec notre protéine d'intérêt, ce qui suggère qu'elles présentent des propriétés physico-chimiques semblables. Des expériences visant à les séparer de la PC1/3 sont en cours de réalisation dans le laboratoire.

Les larves de *T.ni* ne sont pas les seules larves d'insectes utilisées pour la production de protéines recombinantes. En effet, l'expression des protéines d'intérêt peut se faire dans d'autres larves d'insectes telles que les *Bombyx mori* (ver à soie), les *Heliothis virescens* (la noctuelle verdoyante) ainsi que les *Lymantria dispar* (spongieuse nord-américaine). L'efficacité de production va encore une fois dépendre d'une protéine à l'autre. La majeure différence entre les différents types de larves réside dans la glycosylation de la protéine d'intérêt. En effet, une étude visant à comparer la production de la phosphatase alcaline dans différents types cellulaires et les différentes larves mentionnées plus haut a été menée par Kulakosky et ses collègues (Kulakosky et al., 1998). Cette étude a révélée des différences importantes dans le rendement de production mais également dans la structure saccharidique, surtout celles issues de N-glycosylation (voir introduction), de la protéine recombinante entre les différents systèmes.

Le système d'expression d'insecte a été utilisé avec des efficacités variables pour la production d'autres convertases telles que la Kex 2 dans les cellules SF9 (Germain et al., 1992), la Furine dans les cellules SF9, High Five et Schneider (Fugere et al., 2002; Bravo et al., 1994; Denault et al., 2000), PC2 dans les cellules SF9 (Fahnestock and Zhu, 1999), PC5A dans les cellules Schneider (Fugere et al., 2002), PC5B dans les High Five (Wang et al., 2004) et PC7 dans *T.ni* ainsi que les cellules Schneider (Fugere et al., 2002; Rabah et al., 2001). Il est à noter que l'introduction de l'ADN recombinant au niveau des cellules Schneider ne nécessite pas d'infection par un vecteur viral mais se fait par simple

transfection de plasmide, ce qui permet de générer des clones stables. La production de PC1/3 dans les cellules Schneider a été menée par Fugère et ses collègues mais l'enzyme produite a peu ou pas d'activité (Villemure et Lazure, résultats non publiés).

L'utilisation du système Baculo bien que rentable en terme de coût et de quantité de protéines produites présente un désavantage majeur à savoir la longueur des procédures de génération du virus, de la détermination de son titre après chaque amplification ainsi que de la détermination des bonnes conditions d'expression. Récemment, Philipps et ses collègues ont mis au point un nouveau système dit ultraBac, permettant de pallier à ces problèmes. Le procédé est basé sur l'expression bicistronique de la protéine d'intérêt et de la EGFP (enhanced green fluorescent protein). Cette dernière permet de suivre l'infection et de titrer au bout de deux jours seulement la solution virale. Les étapes d'amplification sont remplacées par l'ultracentrifugation permettant d'obtenir une solution très concentrée en particules virales. Le choix des meilleures conditions pour l'expression repose sur la mesure de la fluorescence et peut être ainsi fait très tôt au cours la procédure (Philipps et al., 2005). Cette méthode associée à la présence de la séquence signal de la protéine virale gp67 pourrait s'avérer utile pour la production rapide d'éventuels mutants de PC1/3 mais également pour la production à grande échelle d'autres membres de la famille des convertases.

2. Caractérisation de PC1/3

Étude mutationnelle de la prorégion de PC1/3

Étant donné l'importance de la prorégion dans la régulation de l'activité enzymatique de PC1/3, une étude visant à investiguer la nature de son interaction avec l'enzyme s'imposait. Par ailleurs, en considérant que l'élaboration d'inhibiteurs à partir de séquences conservées a conduit à une absence de sélectivité entre les différentes convertases (Basak and Lazure, 2003; Boudreault et al., 1998a; Fugere et al., 2002), il apparaissait intéressant de muter des résidus non-conservés dans un contexte de recherche d'inhibiteurs plus spécifiques. Ainsi, une étude de mutagenèse par substitution

individuelle en alanine a été conduite sur plusieurs résidus de la prorégion. Le choix des résidus à muter se base sur plusieurs constats :

(i) Les mutants M1-M5 et M6-M7 représentent le deuxième et le troisième site potentiel de clivage interne (Figure 1, Chapitre III). Lorsque les convertases atteignent le bon compartiment pour le clivage de substrats, elles utilisent le site de clivage interne pour dégrader la prorégion et se libérer de son effet inhibiteur. Au niveau de la prorégion de PC1/3 deux sites potentiels de clivage sont présents RRSRR54 et KR62. Ce qui donne trois possibilités de clivage soit : RRSR, RSRR ou KR. Bien qu'aucune étude ne l'ait démontré, la séquence RSRR est celle qui a été identifiée comme la plus probable pour assurer la dégradation de la prorégion, à cause de sa similarité avec les autres convertases. Le troisième site de clivage KR62 est spécifique aux convertases endocriniennes, à savoir PC1/3 et PC2, et fut donc exclu de cette fonction. La mutation de ces sept résidus nous permettait ainsi de cartographier avec exactitude le site de dégradation de la prorégion mais également d'investiguer le rôle du troisième site de clivage présent uniquement chez PC1/3 et PC2. De plus, si la dégradation de la prorégion est requise pour annihiler l'effet inhibiteur de celle-ci, une mutation empêchant sa destruction pourrait conduire à la création d'un inhibiteur puissant.

(ii) Les acides aspartiques que nous avons mutés se situent au niveau de l'hélice $\alpha 2$. Le mutant M9 représente la substitution d'un acide aminé très conservé. En effet, dans les prorégions de toutes les convertases, sauf pour PC7, un acide aminé acide est présent. Il est probable que ce dernier joue un rôle dans la structure du domaine. Sa substitution pourrait ainsi révéler des informations quant à son importance. Les mutants M8 et M10 représentent des remplacements de résidus spécifiques à PC1/3. En effet, les autres prorégions des convertases présentent à ces positions des résidus non polaires ou chargés positivement (Figure 1, Chapitre III). De plus, la mutation de ces deux résidus dans la prorégion de PC1/3 pourrait contribuer à confirmer ou infirmer l'hypothèse selon la quelle les résidus non conservés, entre les convertases, pourraient conférer une certaine spécificité envers leur enzyme d'origine.

La cartographie du site de clivage de la prorégion est importante car elle permet de déterminer l'emplacement de la coupure qui permet la dégradation de celle-ci. Il a été clairement établi pour la subtilisine que la maturation du zymogène passe par (i) le repliement de la molécule, assuré par l'interaction de la prorégion avec le site actif (ii) le clivage de la prorégion au niveau de sa portion C-terminale (iii) la dégradation de la prorégion ainsi clivée (Shinde and Inouye, 1995a). La mutation de la sérine du site actif en alanine ou en cystéine empêche, respectivement, le clivage ou la dégradation de la prorégion (Shinde and Inouye, 1995b; Yabuta et al., 2001). Un processus similaire opère pour la Furine, qui dégrade sa prorégion à un site interne présentant un motif reconnu par les convertases avec des résidus basiques en P1 et P6 (Anderson et al., 1997; Anderson et al., 2002), voir chapitre I. Il a déjà été démontré que la prorégion de PC1/3 était dégradée (Boudreault et al., 1998a) mais le site de clivage exact restait à déterminer.

Les mutations M1 à M7 ont permis de définir que la dégradation interne de la prorégion de PC1/3 se fait via la coupure du site RSRR54, représentant un motif reconnu par les convertases avec des résidus basiques en P1 et P4. Les expériences de clivage ont, par ailleurs, confirmé la tolérance de l'enzyme vis-à-vis des résidus en P5 pour le clivage. En effet, le mutant M1 est clivé par PC1/3 et la Furine au niveau de ces résidus (Figure 6, Chapitre III). Normalement, la PC1/3 ne présente pas de préférence pour les résidus présents au niveau du site P5 (Cameron.A et al., 2001). Par ailleurs, il a été démontré que la substitution en alanine des arginines en P5, dans le cas de petits peptides issus de la portion C-terminale des prorégions de la Furine et de PC7, conduisait à une diminution de l'affinité vis à vis de l'enzyme (Fugere et al., 2002; Stieneke-Grober et al., 1992). La préférence de ces deux enzymes pour un résidu basique en P5 s'explique par la présence d'acides aminés chargés négativement au niveau du sous-site S5 (Henrich et al., 2005). Il est tout de même possible que la coupure se produise au niveau de l'arginine 53. Contrairement à la Furine et à PC7, la PC1/3 présente un seul acide aminé acide (Asp 244) au niveau du sous-site S5 (Henrich et al., 2005), ce qui laisse supposer que l'enzyme est moins exigeante en charges positives à cet endroit. Néanmoins, les résultats présentés ici démontrent l'importance des interactions électrostatiques entre ces deux résidus. Ces interactions pourraient être impliquées dans la stabilisation des autres sous-sites du site

actif ou encore, participer avec d'autres sites à la cohésion du domaine en tant qu'entité entière. Si cette hypothèse est vraie, ceci expliquerait pourquoi PC1/3 ne présente pas de préférence au niveau du P5 lorsqu'elle est testée avec des petits peptides.

Les mutants M6 et M7 (K61 et R62) révèlent un élément intéressant en terme de clivage. En effet, ils ne sont pas clivés par PC1/3 mais peuvent être clivés par la Furine. Le site présente un motif P1-P2 et bien que cela ne soit pas le motif préféré par la Furine (Rockwell and Fuller, 2002), celle-ci arrive à le cliver. Ces deux résidus se trouvent au niveau de l'hélice $\alpha 2$ et leurs chaînes latérales pointent vers l'extérieur de la structure (Figure 1). La différence de clivage entre les deux enzymes pourrait être due au fait que K61 et R62 sont engagées dans des interactions avec un autre domaine de leur enzyme d'origine (PC1/3). Dans le cas de la Furine, ces interactions ne s'établissent pas avec la Furine ce qui les rend accessibles et donc clivables par cette dernière.

Par ailleurs, en plus de reconnaître le motif avec des résidus basiques en P1 et P2 établi par ces deux résidus, la Furine arrive à cliver à un site Lys unique lorsque l'Arg est mutée. Les sites présentant une Lys en P1 sont assez rares mais existent dans le cas de certaines prohormones telles que la pro-somatostatine (S-14) (Eggelkraut-Gottanka and Beck-Sickinger, 2004b), la pro-gastrine, la pro-enkephaline, la pro-thyrotrophine (Seidah and Chretien, 1999) ainsi que le neuropeptide endocrinien 7B2 (Martens et al., 1994). De plus, il a déjà été démontré que la Furine peut cliver un site avec une Lys en P1 mais avec une efficacité réduite (Horimoto et al., 1994). Ce type de clivage peut s'effectuer au niveau du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) afin de générer de l'IGF-I (1-67) (Duguay et al., 1997). Finalement, une étude de mutagenèse visant à investiguer l'importance des résidus P1 à P6 pour la Furine a révélé que le clivage d'une Lys en P1 bien que non favorisé peut être compensé par la présence de résidus basiques en P2 et P4 (Krysan et al., 1999). Dans le cas du troisième site de clivage de la prorégion de PC1/3, le clivage au niveau de la Lys61 implique le positionnement de l'His58 en P4, ce qui pourrait pallier à l'absence d'une Arg en P1. Toutefois, pour pouvoir confirmer cette proposition, il faudrait muter l'His58. Il est à noter qu'il a déjà été démontré qu'un résidu His ne pouvait pas compenser l'absence d'une Lys en P2, dans un motif KR pour la

Furine (Brennan and Nakayama, 1994a) et que la présence d'histidines au niveau des sites P5, P7 et P8 n'était pas favorable au clivage par cette enzyme (Basak et al., 1997).

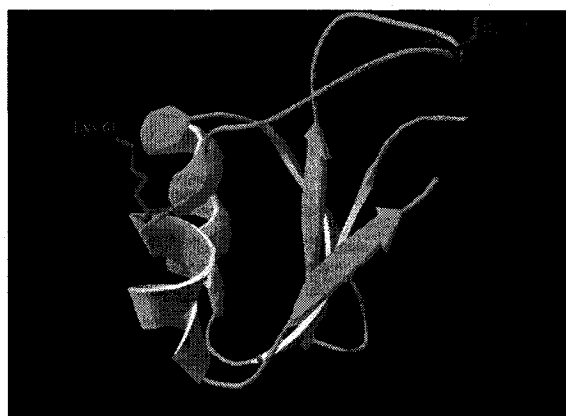


Figure 1 : Structure secondaire de la prorégion de PC1/3 avec positionnement des résidus S53, K61 et R62 avec leurs chaînes latérales (modifié de Tangréa et al., 2001).

La caractérisation enzymatique des mutants générés a permis de les classer en trois catégories dépendamment de leur potentiel inhibiteur : (i) les mutants présentant le même potentiel inhibiteur que la prorégion non mutée (Wt) (ii) les mutants ayant un potentiel inhibiteur plus fort que celui du Wt (iii) les mutants moins inhibiteurs que le Wt (Figure 3 et Tableau 2, Chapitre III). De plus, l'analyse du mode d'inhibition a permis de constater que la mutation d'un seul résidu pouvait changer de façon drastique l'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur et de ce fait créer une certaine sélectivité (Figure 4, Chapitre III). La prorégion de PC1/3 exerce normalement une inhibition lente à liaison forte (Boudreault et al., 1998a), ceci implique que des interactions s'établissant en dehors du site actif contribuent à la stabilisation du complexe enzyme-inhibiteur, tel que démontré pour la subtilisine (Jain et al., 1998).

La substitution du résidu D66 (M9) permet probablement d'abolir une de ces interactions, puisque le mutant M9 se comporte de façon purement compétitive avec PC1/3 et la Furine (Figure 4 et Figure 5, Chapitre III). Étant donné que le résidu D66 est très conservé (Figure 1, Chapitre III), ce résultat pourrait être généralisé et extrapolé aux autres convertases. Ainsi, la présence d'un résidu acide à cette position pourrait jouer un

rôle important dans l'établissement d'interactions entre la prorégion et l'enzyme dans le cas de toutes les convertases, excepté pour PC7. La modélisation de la prorégion a révélé que l'Asp 66 se trouve à l'intérieur de la structure (Figure 8, Chapitre III), suggérant ainsi que cette interaction ne serait pas directe avec les autres domaines de l'enzyme mais s'opèrerait *via* la création de liaisons faibles assurant la cohésion de la prorégion. D'après ce modèle, des liaisons hydrogènes s'établissent avec la Val69, l'Arg62 et l'Arg68. La Val69 est très conservée entre les prorégions des différentes convertases, ce qui supporte cette hypothèse. À la position équivalente au résidu 68 seules les convertases PC2, PC5 et PC4 comportent une arginine. Néanmoins, la Furine et PACE4 ont des résidus polaires à cet emplacement.

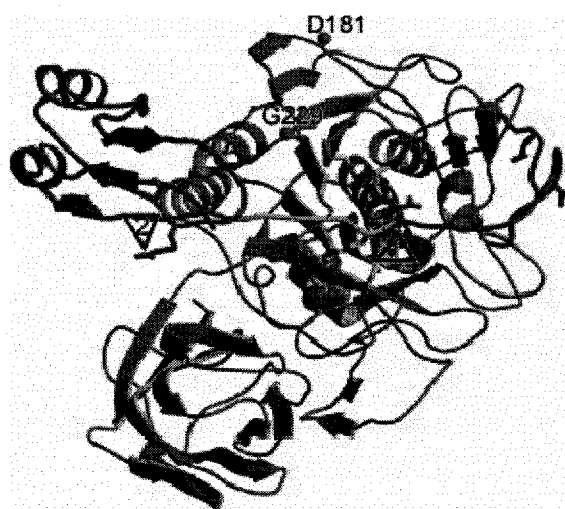
Une autre mutation fait apparaître une interaction entre la prorégion et l'enzyme en dehors du site actif c'est la S53A (M3). En effet, cette substitution conduit à la création d'un inhibiteur purement compétitif envers PC1/3 (voir section résultats, Chapitre III). La sérine est un petit résidu mais sa fonction hydroxyle peut s'engager facilement dans une liaison hydrogène. La Ser53 se trouve dans une boucle parfaitement accessible. Sa chaîne latérale pointe vers l'extérieur (Figure 1), ce qui lui permettrait d'établir un contact avec l'enzyme. Ce mutant fait apparaître un autre fait intéressant, celui d'inhiber de façon compétitive PC1/3 seulement. Ce résidu bien qu'étant conservé chez la Furine ne se trouve pas dans le second site de clivage et n'est probablement pas engagé dans une liaison importante pour la stabilisation du complexe enzyme-inhibiteur. La découverte d'une telle différence entre les deux enzymes pourrait être d'une importance capitale lors du développement d'outils thérapeutiques spécifiques. En effet, cette différence de comportement envers les deux enzymes pourrait être exploitée pour générer un inhibiteur sélectif envers la Furine, d'autant plus que ce mutant inhibe la Furine au niveau de concentrations picomolaires.

La mutation des résidus présents au niveau du deuxième site de clivage et directement impliqués dans la coupure, c'est-à-dire R50 (M1), R51 (M2) ainsi que R54 (M5), a conduit à la génération d'inhibiteurs très puissants (avec un K_i dans le picomolaire) envers PC1/3 et la Furine (Tableau 2, Chapitre III). La mutation de ces résidus abolit la

capacité des deux enzymes à dégrader la prorégion, ce qui se traduit par leur fort potentiel inhibiteur. Malheureusement, ces mutations n'apportent pas de spécificité d'inhibition entre les deux enzymes. Ainsi, ils ne représentent pas un outil pouvant être exploité au niveau thérapeutique. Une étude testant l'effet inhibiteur de peptides synthétiques issus de sites internes de clivage des prorégions de PC1/3 et de la Furine a montré que lorsque ces séquences étaient utilisées seules, en dehors du contexte de la prorégion entière, les inhibiteurs générés étaient très faibles (de l'ordre du micromolaire) (Basak and Lazure, 2003). Les résultats d'inhibition obtenus pour la substitution des résidus du troisième site de clivage ont confirmés les données de clivage décrites précédemment. En effet, le remplacement des deux résidus dans le contexte de PC1/3 diminue le potentiel inhibiteur des deux mutants (Tableau 2, Chapitre III), ce qui consolide l'hypothèse selon laquelle ces deux résidus seraient impliqués dans des interactions avec l'enzyme. Dans le contexte de la Furine, les mutants ainsi générés ont un potentiel inhibiteur égal ou beaucoup plus fort. Les mutations M6 et M7 ont conduits à la génération d'inhibiteurs très puissants, ce qui appuie la capacité de cette enzyme à cliver ce site. Lorsque la Lys61 est mutée, le motif P1-P2 n'est plus présent, le site est mal clivé et par conséquent l'inhibition exercée est plus forte.

La substitution de l'acide aspartique spécifique à PC1/3 (D65) a également révélé une différence d'organisation structurale entre les deux enzymes. En effet, le mutant M8 est un moins bon inhibiteur de PC1/3 mais agit très fortement sur la Furine (dans le picomolaire) (Tableau 2, Chapitre III). La chaîne latérale de l'Asp 65 pointe vers l'extérieur de l'hélice $\alpha 2$, ce qui lui permettrait d'établir des interactions avec un autre domaine de PC1/3. Curieusement, cette interaction est renforcée entre la prorégion de PC1/3 et la Furine lorsque ce résidu est muté. La Furine possède une arginine à cette position qui établit probablement des interactions électrostatiques avec une autre région de la molécule. La substitution en Ala annule la charge négative présente dans le cas de l'acide Asp et pourrait ainsi permettre une meilleure interaction ce qui renforcerait l'effet inhibiteur du mutant envers la Furine. Une modélisation de la prorégion de PC1/3 en contact avec le domaine catalytique de la Furine a été publiée (Henrich et al., 2005). Ce modèle ressemble à celui de la subtilisine bactérienne (Jain et al., 1998) et fait apparaître

des interactions entre le domaine catalytique et la prorégion au niveau des feuillets bêta ainsi que de la boucle contenant le site de clivage interne (Figure 2).



▽ Sites de clivage

● Sites de fixation du calcium

Figure 2 : Modélisation de l'interaction entre la prorégion de PC1/3 et la Furine (domaine catalytique et domaine P) (adapté de Henrich et al., 2005). En vert : prorégion de PC1/3; en doré : la Furine; en bleu : liaison entre la portion C-terminale de la prorégion et le site actif de la Furine.

La substitution de résidus chargés par des résidus 'alanine' permet d'éliminer les interactions ioniques créées par les chaînes latérales sans porter atteinte à l'intégrité de la structure secondaire des protéines (Cunningham and Wells, 1989). Ainsi, les résultats présentés dans cette thèse démontrent clairement que l'interaction entre les deux domaines est beaucoup plus compacte et fait intervenir, en plus de l'interface créée par les feuillets beta et la boucle $\beta 3-\alpha 2$, les deux hélices ou du moins l'hélice $\alpha 2$. La modélisation de l'interaction entre la prorégion et le reste de la molécule de PC1/3, présentée dans cette thèse, a été menée sur la base de la structure en solution de la prorégion de PC1/3 disponible (Tangrea et al., 2001; Tangrea et al., 2002) ainsi que celle de la structure du domaine catalytique et du domaine P de la Furine obtenue par cristallographie (Henrich et al., 2003). Les résidus spécifiques à PC1/3 ont été introduits par substitution de leurs équivalents dans la Furine. Les résultats de clivages et

d'inhibition des différents mutants ont permis de positionner la prorégion de manière à ce que le maximum de contacts établis par ces études soit respecté. Ainsi, une image différente de celle de Henrich et ses collègues est apparue. La figure représentant cette interaction publiée dans l'article présenté dans le chapitre III ne représente pas la seule possibilité d'interaction. En effet, tel que mentionné dans l'article, d'autres conformères sont possibles (Figure 3).

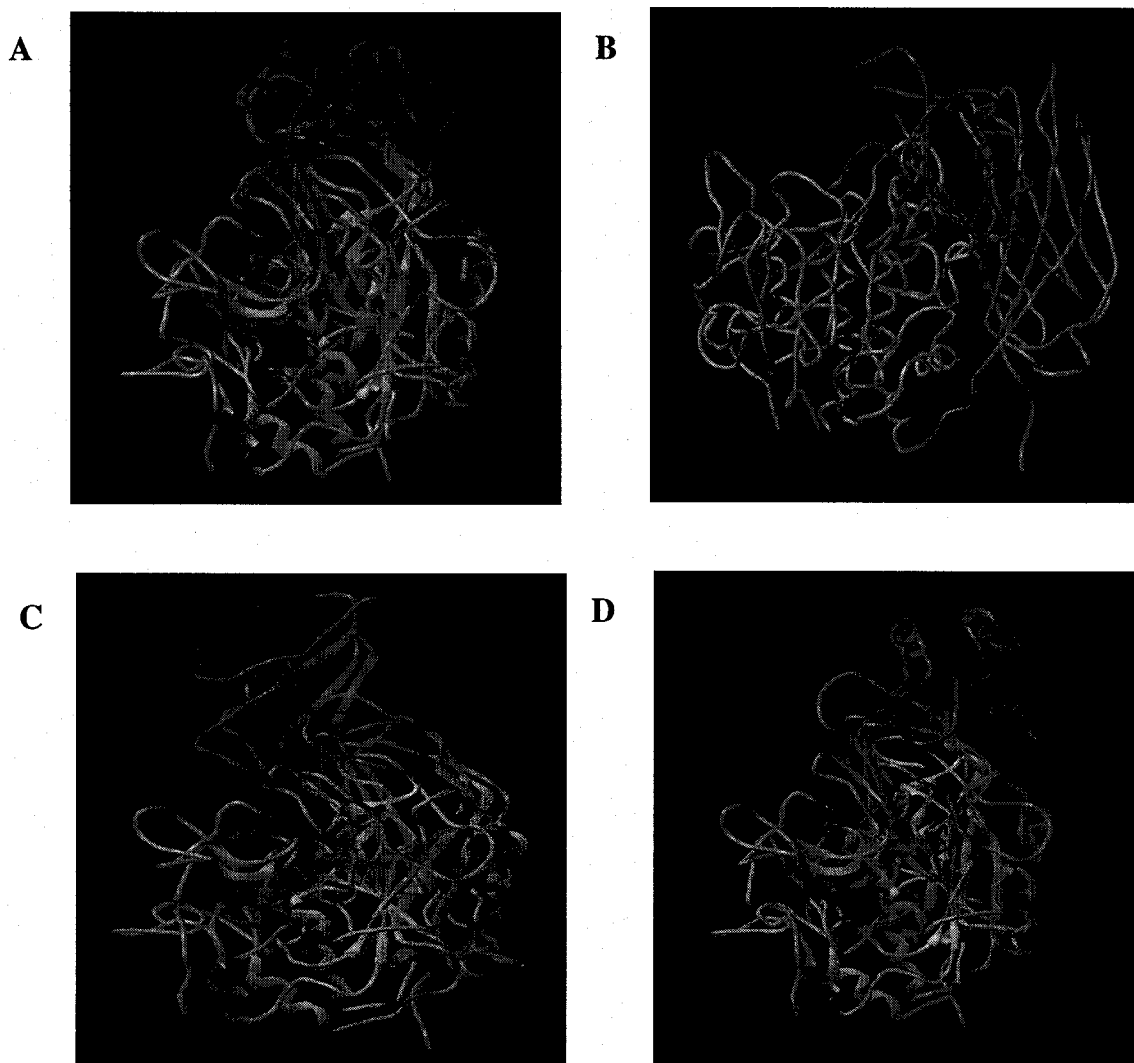


Figure 3 : Différents conformères représentant l'interaction entre la prorégion de PC1/3 et le reste de l'enzyme. A. conformère 35. B. conformère 27. C. conformère 14. D. conformère 2. En bleu : le domaine catalytique; en vert : le domaine P; en mauve : la prorégion; en jaune : la portion C-terminale de la prorégion relié au site actif. La modélisation a été effectuée par le Dr. Brian Wilkes.

Ces différents conformères permettent à des degrés variables des interactions entre la prorégion et le domaine catalytique mais également entre la prorégion et le domaine P. L'élucidation de la structure tridimensionnelle de la Furine suggère la présence éventuelle d'une poche entre ces deux domaines qui pourrait accueillir la prorégion mais également représenter un site d'ancrage au calcium (Henrich et al., 2003). Cependant, l'implication de ces nombreuses interactions sur le fonctionnement de l'enzyme reste à définir. La résolution de la structure de l'ensemble des domaines de PC1/3 permettrait de répondre à cette question.

Finalement, les résultats de mutagenèse montrent que la modification d'un seul acide aminé peut créer une sélectivité entre les convertases en terme d'inhibition, ce qui pourrait être exploité au niveau pharmaceutique. Il serait intéressant de tester les différents mutants contre les autres membres de la famille des convertases. De nombreux autres résidus spécifiques à PC1/3 sont présents dans la structure de la prorégion, par exemple K44, D29, E26, E25, E18 ainsi que E11, leur substitution en alanine pourrait révéler des informations quant à la spécificité de la prorégion envers son enzyme d'origine. D'autant plus que la majorité d'entre eux (K44, D29, E26, E25 ainsi que E18) pointent vers l'extérieur de la structure. Cette approche est également valable pour les autres convertases. L'exploitation à des fins thérapeutiques des convertases repose sur la caractérisation chimique et enzymatique des différents membres de la famille. Ainsi, la principale méthode expérimentale susceptible de conduire à la génération d'inhibiteurs spécifiques passe par la compréhension détaillée de leur fonctionnement et l'évaluation de leurs différences.

Un autre aspect important à considérer est celui de la spécificité vis-à-vis des substrats. En effet, jusqu'à présent de nombreuses questions restent en suspens quant à la spécificité des différents membres de la famille envers les substrats naturels. La génération de souris déficientes pour les convertases de façon conditionnelle, c'est-à-dire tissu-spécifique, en utilisant des promoteurs caractéristiques de chaque tissu endocrinien qui induisent l'expression de la recombinaise Cre (enzyme qui permet de cliver de façon spécifique des séquences d'ADN dite *loxP* situées de part et d'autre du gène d'intérêt

conduisant ainsi à sa délétion) de façon restrictive, permettrait d'éviter la létalité embryonnaire et de dresser un tableau de substrats endogènes pour chaque membre de la famille. Ainsi, l'établissement du dégradome de ces protéases permettrait de cibler spécifiquement les différents membres de la famille (Turk, 2006).

La fonction première de la prorégion est d'agir en tant que chaperone, c'est-à-dire d'assister le repliement tridimensionnel du site actif. Ce rôle de chaperone a été très largement investigué dans le cadre des subtilisines bactériennes et a permis d'établir un modèle selon lequel, en l'absence de la prorégion, le reste de l'enzyme forme une structure globulaire compacte et inactive (Baker et al., 1992; Eder et al., 1993). La prorégion permettrait, ainsi, de vaincre la barrière énergétique créée lors de l'état de transition et de passer d'un état métastable à un stade actif où l'enzyme est repliée (Shinde and Inouye, 1995b). Différentes études de mutagenèse ont par la suite montré que des modifications touchant la séquence de la prorégion peuvent moduler ce rôle de chaperone en l'abolissant, en l'accéléralant ou encore en conduisant à la génération d'enzyme aux caractéristiques différentes (voir section 6.2, Chapitre I) (Shinde and Inouye, 1995a; Shinde et al., 1997; Takagi and Takahashi, 2003). Parallèlement, des expériences visant à caractériser le fonctionnement et l'activation de la Furine ont révélé que l'intégrité de sa prorégion est nécessaire pour la production d'une enzyme active (Creemers et al., 1995; Leduc et al., 1992). La prorégion de la Furine, de la même manière que celle de la subtilisine, ne semble pas adopter de structure secondaire en l'absence de l'enzyme. Une étude récente a suggéré l'importance de ce phénomène dans le contrôle temporel du processus d'activation, qui permet à la prorégion de passer de la fonction de chaperone à une fonction d'inhibiteur puis de substrat (Subbian et al., 2005).

Ces résultats contrastent avec les résultats de Tangrea et ses collègues (Tangrea et al., 2001; Tangrea et al., 2002), qui ont publié la structure en solution de la prorégion de PC1/3. De plus, Fugère et ses collaborateurs (Fugere et al., 2002), ont montré par l'analyse des spectres de dichroïsme circulaire que les prorégions des sept convertases de mammifère exhibent des caractéristiques structurales communes. Par ailleurs, des expériences menées par Bhattacharjya et ses collègues ont montré que les 24 acides

aminés en C-terminal de la prorégion de PC7 adoptent une structure à hélices en solution (Bhattacharjya et al., 2000b). Les résultats de ces trois études sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude de la pro-aqualisine, un homologue thermostable de la subtilisine. En effet, ceux-ci ont montré que la prorégion de cette dernière pouvait se replier spontanément en l'absence du reste de l'enzyme (Marie-Claire et al., 2001). Très récemment, une étude sur la prosubtilisine E a, elle aussi, montré que la prorégion agit de façon 'autotomic', c'est-à-dire qu'elle possède une certaine stabilité intrinsèque qui lui permet de mener le repliement de l'enzyme mais également d'agir en tant que domaine indépendant, une fois que le repliement de la protéase est achevé, afin d'assurer son inhibition (Falzon et al., 2007). Par ailleurs, la présence d'une certaine stabilité de la prorégion en l'absence de l'enzyme a été notée dans le cas de la Furine. En effet, des études de résonance magnétique nucléaire ont révélé que même si la prorégion de la Furine n'adopte pas de structure tertiaire, elle possède néanmoins une certaine stabilité qui lui permet d'être dans un état 'semi-replié' (Bhattacharjya et al., 2000a). Cet énoncé serait en accord avec la présence dans la molécule de certains segments dotés de structure secondaire tels que détectés par les études de dichroïsme circulaire.

La signification physiologique ainsi que l'implication sur le fonctionnement des convertases de ce phénomène restent à déterminer. Des études de mutagenèse extensives sur les différents résidus de la prorégion et de leur implication sur la maturation de l'enzyme seraient à considérer. Dans le laboratoire, nous avons procédé au marquage avec des isotopes stables ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) de la prorégion Wt mais également des mutants M3 et M9, dont le mode d'inhibition devient purement compétitif. Le marquage a été mené dans le but de déterminer leur structure en solution en présence de l'enzyme. Ainsi, il serait possible de confirmer si la prorégion, en présence de l'enzyme parentale, adopte la structure publiée par Tangrea et ses collaborateurs. D'autre part, si l'interaction entre la prorégion et le reste de l'enzyme est indispensable pour l'acquisition de la structure finale de la prorégion, les mutants M3 et M9 pourraient alors avoir une structure différente du Wt en solution. Malheureusement, les résultats de ces expériences ne sont pas encore disponibles.

Les fonctions d'inhibition et de chaperone moléculaire de la prorégion ne sont pas forcément liées. En effet, l'abolition de liaisons faibles, stabilisant le complexe prorégion-subtilisine, par mutagenèse dirigée peut conduire à une diminution de l'effet inhibiteur de la prorégion sans affecter la maturation et le repliement tridimensionnel de la protéase (Fu et al., 2000). Cependant, il a déjà été montré que l'accélération de l'hydrolyse de la prorégion conduit à une inhibition ou une inactivation précoce de la protéase, qui devient alors inactive (Yabuta et al., 2001; Wang et al., 1995; Wang et al., 1998). Dans le contexte d'analyse des mutants de la prorégion de PC1/3 présentés dans cette thèse, il serait intéressant de tester si certains d'entre eux pourraient avoir un effet sur le repliement de l'enzyme. Bien que la fonction de chaperone de la prorégion s'effectue en *cis*, plusieurs études ont montré que l'addition de la prorégion en *trans* permet le repliement de protéases dénaturées ou non-repliées (Eder et al., 1993; Lesage et al., 2000), ce qui justifierait ce genre d'investigation avec nos mutants. Une étude menée sur la prorégion de la Furine (Bissonnette et al., 2004), où 17 résidus conservés ont été mutés, a permis de souligner l'importance de deux résidus (Ile 60 et His 66) présent au niveau de la poche hydrophobe, à l'interface de l'interaction avec le domaine catalytique, dans la maturation de l'enzyme. Ainsi, leur substitution en alanine conduit à la production de protéases non repliées qui sont dégradées au niveau du protéasome.

La création d'interactions hydrophobes est très importante pour le maintien de la cohésion des protéines repliées et se trouve renforcée par l'établissement de liaisons hydrogènes ailleurs dans la structure protéique (Sasakawa et al., 2002). L'importance de la formation d'interfaces hydrophobes dans l'interaction, le repliement et le fonctionnement des enzymes de la famille des subtilisines-kexines a été suggérée par plusieurs groupes. En effet, la résolution de la structure tridimensionnelle de la subtilisine bactérienne a révélé la présence de motifs hydrophobes (N1 et N2) entourés de résidus chargés (Figure 14, Chapitre I). Ces motifs, présents à l'interface de contact entre la prorégion et le domaine catalytique, seraient impliqués dans la stabilisation du complexe pendant la formation de l'état de transition lors du repliement (Gallagher et al., 1995; Jain et al., 1998; Shinde et al., 1999). Par ailleurs, la résolution de la structure en solution de la prorégion de PC1/3 a révélé le même type de motifs (Tangrea et al., 2002).

Ces surfaces hydrophobes seraient impliquées dans la stabilisation du contact entre la prorégion et l'enzyme. De plus, la présence d'histidines, potentiellement protonables, au niveau de ces surfaces permettrait d'expliquer la dépendance au pH de la dissociation du complexe enzyme / prorégion avant le clivage de cette dernière au site interne ainsi que sa dégradation, tel que démontré pour la Furine (Anderson et al., 1997; Anderson et al., 2002; Bergeron et al., 2003).

Des expériences visant à vérifier cette hypothèse ont montré que l'His 69 de la prorégion de la Furine agit comme senseur de pH et régule, ainsi, l'activation de l'enzyme au fur et à mesure que celle-ci progresse dans la voie de sécrétion (Felicangeli et al., 2006). L'His 69 est très conservée entre les différentes convertases, ce qui suggère que les autres membres de la famille pourraient fonctionner de la même manière. La mutation de l'His 45 dans la prorégion de PC1/3 permettrait de vérifier cette hypothèse. La prorégion de PC1/3 possède deux autres histidines au niveau de la boucle $\alpha 2$ - $\beta 3$ (His 48 et His 58) pouvant également jouer un rôle important lors du passage dans des compartiments cellulaires à pH acide.

Rôle du domaine C terminal (C.T) dans la régulation de PC1/3

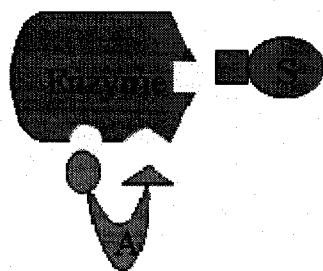
L'activation de PC1/3 pendant sa progression dans la voie de sécrétion régulée passe par le clivage séquentiel du peptide signal, de la prorégion puis du domaine C.T. Ce processus permet de contrôler l'activité enzymatique et d'éviter tout clivage précoce de substrats. Chaque domaine clivé exerce un rôle bien précis. Le peptide signal guide la protéine dans la voie de sécrétion. La prorégion permet le repliement du site actif et inhibe l'activité de l'enzyme jusqu'à ce que le compartiment adéquat soit atteint. Le domaine C.T. est celui dont le rôle est le plus ambigu et le moins bien investigué. Les premières expériences visant à caractériser PC1/3 ont montré que le clivage autocatalytique du domaine C.T conduisait à la génération d'une enzyme très active, d'une demi-vie courte (30 min) et ayant une préférence pour des pH acides (Benjannet et al., 1993; Boudreault et al., 1998b; Jean et al., 1993; Zhou and Mains, 1994). Des expériences subséquentes ont montré que la surexpression de ce domaine en *trans*

conduit à une diminution de la maturation de la prorénine au niveau de la voie de sécrétion constitutive (Jutras et al., 1997). En se basant sur ce résultat et sur le fait que le clivage du domaine C.T conduit à l'activation maximale de l'enzyme, un rôle d'inhibition de PC1/3 lui a été attribué. Comme aucune donnée enzymologique n'avait confirmé ou infirmé cette supposition, nous avons entrepris de caractériser enzymatiquement l'effet du C.T sur PC1/3.

Ainsi, un polypeptide, correspondant aux derniers 135 résidus de PC1/3, a été produit dans un système bactérien, purifié grâce à la présence d'un épitope poly-histidine puis testé contre l'enzyme. Le seul moment où une inhibition a été observée est lorsque le C.T était largement en excès (μM), en utilisant des concentrations en nM de PC1/3 (Figure 1, Chapitre IV). Dans ces conditions, le peptide C.T agit en tant qu'inhibiteur mixte partiel avec un K_i de l'ordre du μM (Figure 2, Chapitre IV). Cette inhibition mixte suggère que l'interaction entre l'enzyme et le C.T peut se faire à plusieurs sites tel qu'observé pour les petits peptides synthétiques issus de la prorégion de l'hormone parathyroïdienne ou encore de l'inhibiteur de la sérine protéase d'orge de type 2 (BSPI-2) (Basak and Lazure, 2003; Lazure et al., 1998; Nour et al., 2003; Villemure et al., 2003; Zhong et al., 1999).

Cependant, lorsque le peptide C.T est testé à des concentrations nanomolaires, celui-ci agit en tant qu'activateur, ce qui se traduit par une augmentation de la vitesse de réaction de 36% (Figure 3, Chapitre IV). Ce double comportement, c'est-à-dire l'activation de l'enzyme à des faibles concentrations et son inhibition à des concentrations fortes, est typique d'un activateur. Souvent, les activateurs vont se fixer de façon allostérique en dehors du site actif, ce qui leur évite de compétitionner avec le substrat. Lorsque la concentration d'un activateur devient trop grande, les sites de fixation de celui-ci deviennent saturés par la fixation de plusieurs molécules, ce qui empêche la médiation de l'effet activateur (Dixon.M and Webb.E.C, 1979; Moiseeva et al., 2005), voir Figure 4. De plus, la fixation de plusieurs molécules d'activateur peut conduire à une obstruction stérique du site actif.

A.



B.

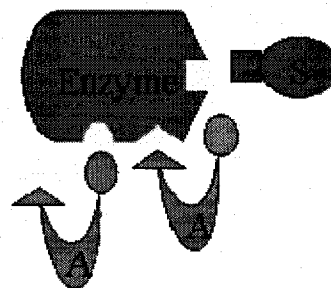


Figure 4 : Représentation schématique de l'interaction entre une enzyme, son substrat (S) et un activateur (A). A. Condition où la concentration de l'activateur est faible. B. Condition où la concentration de l'activateur est forte.

En plus de ne pas compétitionner directement avec le substrat pour le site actif, un activateur ne doit pas agir en tant que substrat, c'est-à-dire qu'il ne doit pas être transformé au cours de la réaction (Dixon.M and Webb.E.C, 1979). Ce postulat s'applique très bien dans le cas du peptide C.T avec PC1/3 puisque, contrairement à la prorégion, l'enzyme n'arrive pas à le cliver (Figure 5, Chapitre IV) malgré la présence de trois autres motifs avec des résidus basiques en P1 et P2 (Figure 5). Par ailleurs, il est important de noter que la présence du C.T atténue l'effet inhibiteur de la prorégion (Figure 6, Chapitre IV). De plus, à un pH neutre, prévalent au début de la voie de sécrétion où le domaine C.T est encore attaché à l'enzyme, le peptide C.T agit uniquement en tant qu'activateur quelque soit sa concentration (Figure 4, Chapitre IV). Toutes ces données mises ensemble poussent à croire que l'inhibition observée par Jutras et ses collègues (1997) (Jutras et al., 1997) était due à la surexpression, où les concentrations des différentes entités surexprimées ne peuvent pas être contrôlées. Ainsi, si la surexpression du peptide C.T dans les cellules est plus forte que celle de l'enzyme, le C.T ne peut plus exercer son effet activateur et agit en tant qu'inhibiteur.

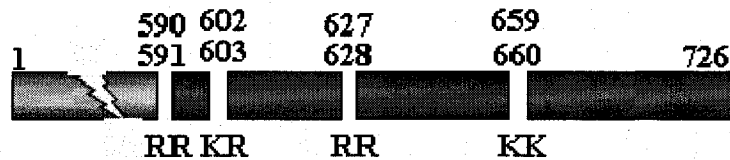


Figure 5 : Représentation schématique de PC1/3 mettant en évidence les sites de clivages potentiels, reconnus par les convertases, présents au niveau du domaine C.T. (modifié de Bernard et al., 2003).

Dans la littérature deux types d'activateurs sont décrits : les essentiels et les non essentiels. Les activateurs essentiels sont souvent des ions métalliques ou des cofacteurs en l'absence desquels les enzymes ne peuvent pas fonctionner. Un exemple d'une enzyme nécessitant un activateur ionique est l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'ACE nécessite la présence d'ions chlorure (Cl^-) pour son fonctionnement. La fixation du Cl^- va créer un pont salin entre ce dernier et un résidu chargé de l'enzyme, ceci va empêcher la formation de ponts salins internes et libérer ainsi l'accès du site actif au substrat (Moiseeva et al., 2005). La L-3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase est un autre exemple d'enzyme qui requiert des ions métalliques. En effet, son fonctionnement nécessite la fixation d'ions magnésium (Mg^{2+}), qui vont former des ponts salins avec l'enzyme mais également avec des groupements phosphates du substrat et renforcer ainsi les interactions ioniques qui stabilisent le complexe enzyme-substrat (Liao et al., 2002).

Il est à noter que dans le cas des convertases la présence des ions calcium est absolument nécessaire pour le fonctionnement de l'enzyme (Molloy et al., 1992). La résolution de la structure tridimensionnelle de la Furine et de la Kéxine a suggéré la présence de deux et trois sites de fixation pour le Ca^{+2} au niveau des deux enzymes, respectivement (Henrich et al., 2003; Holyoak et al., 2003; Holyoak et al., 2004). Une étude plus récente a révélée la position exacte de ces sites pour la Furine (Than et al., 2005). Ainsi, le premier site de fixation du Ca^{+2} , chez la Furine, est situé au niveau de l'extrémité N-terminale du domaine catalytique permettant ainsi de stabiliser la structure et d'assurer la forte liaison de la portion N-terminale au reste du domaine. Le second site est situé en dessous du sous site S1, accueillant le substrat. La fixation de l'ion à cet

emplacement, très riche en charges négatives, permettrait de stabiliser le potentiel électronégatif de ce sous site nécessaire à la détermination de la spécificité des convertases (Than et al., 2005). Par ailleurs, Rockwell et Fuller avaient prédit la présence de sites de fixation au potassium K^+ pour la Furine et la Kéxine. Cette prédiction se base sur la capacité du K^+ à activer le clivage de certains substrats pour lesquels les deux enzymes ont une forte affinité (Rockwell and Fuller, 2002). Cependant, les résultats de Than et ses collègues (Than et al., 2005) ne supportent pas cette prédiction.

Les activateurs non-essentiels, comme le peptide C.T de PC1/3, permettent d'accroître l'activité enzymatique mais leur présence n'est pas indispensable pour le fonctionnement de l'enzyme. Ce type d'activation est observé dans le cas de la sulphobromophthaléine (BSP) avec l'enzyme hépatique 3α -hydroxystéroïd dehydrogénase, qui catalyse des réactions d'oxydoréduction des 3α -hydroxystéroïdes et de certaines prostaglandines. Le BSP agit en se fixant sur des sites particuliers de l'enzyme ce qui permet d'augmenter l'activité de cette dernière mais également de moduler son pH optimum (Matsuura et al., 1996). Une autre enzyme hépatique est activée de la même manière. Il s'agit de la porphobilinogen-deaminase (PBG-D), dont la vitesse de réaction peut être augmentée de 38% en présence de l'acide folique. Cette activation est dépendante de la conformation dans laquelle se trouve la protéine (Noriega et al., 1992).

La découverte que le peptide C.T active PC1/3 ouvre la porte à de nombreuses questions quant à son véritable rôle dans le fonctionnement de l'enzyme. Le mécanisme par lequel le peptide C-terminal exerce cette régulation enzymatique reste à définir. Des études de mutagenèse sur la séquence du peptide C.T pourrait apporter des informations quant aux résidus impliqués dans l'interaction avec le reste de la molécule. La structure du domaine n'étant pas élucidée, il est difficile de s'avancer sur la contribution des différents résidus à cette interaction. La modélisation de la structure secondaire du domaine révèle une alternance d'hélices α et de segments non structurés (Figure 6). Ces différentes structures pourraient facilement participer à des interactions hydrophobes de type 'coiled-coil', entre segments non organisés, ou encore des interactions électrostatiques engagées par les résidus des hélices.

Toutes ces informations dans leur ensemble nous permettent d'établir un modèle (Figure 7) selon lequel le domaine C.T de PC1/3 agit comme activateur de l'enzyme. Son interaction avec d'autres sites de la molécule permettrait (i) de stabiliser l'enzyme (ii) de faire en sorte que son pH optimum corresponde aux conditions présentes tôt dans la voie de sécrétion, où PC1/3 doit commencer à cliver certains substrats, entre autres les précurseurs opioïdes, qui seront subséquemment clivé par PC2 (iii) d'atténuer l'effet de la prorégion encore associée à l'enzyme dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion. Lorsque l'enzyme atteint les granules, la prorégion est clivée au niveau de son site interne. L'enzyme n'a plus besoin de C.T, il est alors clivé à son tour. Le clivage du domaine C.T provoquerait un changement conformationnel de la molécule qui deviendrait plus active. Hormis son implication dans la régulation de l'activité enzymatique, le domaine C.T pourrait interagir avec les composants lipidiques membranaires *via* sa queue terminale amphipatique et promouvoir, de cette façon, la ségrégation de l'enzyme vers la voie de sécrétion régulée (Blazquez et al., 2001; Dikeakos et al., 2007; Jutras et al., 2000; Lacombe et al., 2005). D'après Shennan et ses collègues, l'interaction avec les composants lipidiques membranaires nécessite la présence de la prorégion (Blazquez et al., 2001). Nous avons des données qui supportent ce fait et qui montrent que d'une part la prorégion et le C.T peuvent co-immunoprécipiter (Annexe 5), d'autre part, nous avons des résultats d'immunofluorescence montrant que la prorégion reste associée à l'enzyme dans les granules de sécrétion (Annexe 6) et peut être sécrétée à l'extérieur de la cellule après stimulation par un secrétagogue (Annexe 7).

Cependant, ces deux résultats soulèvent une interrogation quant au devenir et au moment précis de la dégradation des deux domaines (N-et C-terminaux). De plus, si l'interaction des deux domaines est requise pour la ségrégation de l'enzyme dans les granules, les sites permettant cette interaction restent à définir. Il reste également à déterminer la séquence exacte au niveau du domaine C.T qui va permettre la dégradation de celui-ci, si dégradation il y a. Si le C.T n'est pas dégradé, il reste à définir s'il pourrait agir de façon indépendante et quelle serait, dans ce cas, sa fonction. Nos données démontrent que même si le clivage du domaine C.T se fait de façon auto-catalytique, sa

dégradation ne peut pas être attribuée à PC1/3. Une étude récente, visant à établir le profil peptidomique des souris déficientes en PC1/3 (Souris B) (Tableau III, Chapitre I) et PC2, a suggéré que PC2 pouvait cliver à l'intérieur de la séquence du domaine C.T de PC1/3 générant ainsi un décapeptide GVEKMNVVVE dont les taux sont diminués chez la souris PC2 K.O (Pan et al., 2006). D'autre part, nos résultats montrent que la Furine reconnaît le peptide C.T de PC1/3 comme substrat. Ainsi, si le domaine C.T est sécrété à l'extérieur, sa dégradation pourrait être menée par la Furine présente à la surface cellulaire.

Par ailleurs, la grande variation de séquence au niveau du domaine C.T des convertases ainsi que les nombreuses controverses entourant les résultats obtenus suite à l'étude de ce domaine rendent difficile l'extrapolation de nos résultats aux autres membres de la famille. Dans le cas de PC2, par exemple, Assadi et ses collègues ont suggéré que l'enzyme était une protéine transmembranaire dont les hélices, prédites à l'extrémité C-terminale, étaient nécessaires et suffisantes pour sa ségrégation dans les granules (Assadi et al., 2004; Creemers et al., 1996). Cependant, il a déjà été montré que la prorégion de PC2 agit comme un signal d'agrégation aux membranes qui permet à l'enzyme d'être ségrégée dans les granules mais que ce phénomène est complètement indépendant du domaine C.T (Jan 1998, Taylor 1998, Blazquez 2000), ce qui supporte la diversification de fonction du domaine C.T (Blazquez et al., 2000; Jan et al., 1998; Taylor et al., 1998) entre les convertases.

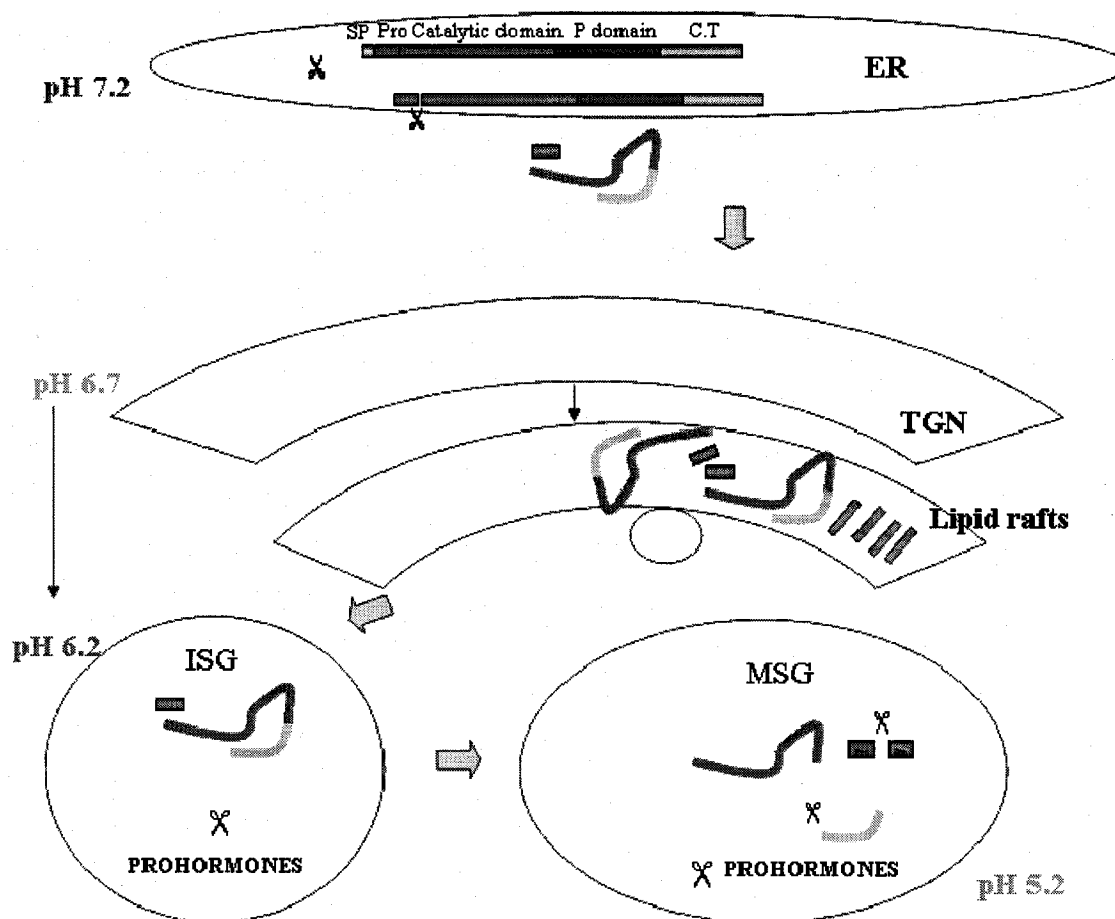


Figure 7 : Modèle de maturation de PC1/3 au niveau de la voie de sécrétion. La PC1/3 est synthétisée au niveau de R.E où elle va être repliée grâce à la participation de la prorégion et subir des modifications post-traductionnelles. La prorégion est clivée dans ce compartiment au niveau du 1^{er} site de clivage mais reste associée à l'enzyme afin d'assurer son inhibition. L'ensemble progresse vers le réseau trans-golgien où l'enzyme acquiert des modifications supplémentaires, clive certains substrats et est dirigée vers les vésicules de sécrétion. Le clivage de substrats au niveau de ces compartiments précoces est facilité par la présence du C.T. Ce dernier va, par ailleurs, permettre le ciblage de l'enzyme vers les granules en interagissant avec différents composants lipidiques membranaires. Le ciblage vers la voie régulée est facilité par la prorégion qui va assurer l'agrégation et la dimérisation des différentes molécules de PC1/3. Arrivée aux granules de sécrétion, le pH acide va favoriser la dissociation de la prorégion et le clivage de divers substrats. Au fur et mesure que les granules progressent dans la voie de sécrétion régulée elles subissent une maturation conduisant à la condensation de leur contenu et à l'acidification de leur pH. La prorégion va alors être clivée tel qu'un substrat au niveau du second site de clivage. Le C.T sera alors clivé à son tour au niveau de l'arg618, ce qui conduit à un changement conformationnel de l'enzyme. L'enzyme devient alors pleinement active et clive ses différents substrats.

3. Conclusion et contribution aux nouvelles connaissances

Finalement, nous avons démontré que la modification du vecteur et de l'hôte d'expression peut conduire à une amélioration drastique de la production de PC1/3 *in vitro*, jusqu'ici déficiente.

L'étude de mutagenèse séquentielle en alanine de résidus chargés de la prorégion de PC1/3 a permis de mettre en évidence les résidus importants pour le fonctionnement, la cohésion et l'inhibition de l'enzyme. De plus, certaines de ces mutations ont permis de créer une sélectivité entre PC1/3 et un autre membre de la famille des convertases, la Furine.

La caractérisation du domaine C.T a permis de lui attribuer un nouveau rôle dans la régulation de PC1/3, soit celui d'activer l'enzyme. Il ressort de cette thèse que PC1/3 est une enzyme complexe, dont la régulation repose sur des interactions conformationnelles entre les différents domaines de la molécule.

Ces nouveaux résultats contribuent à la compréhension du fonctionnement de PC1/3 mais également des autres membres de la famille des convertases, et pourraient à long terme être utilisés lors d'élaboration d'outils thérapeutiques visant cette famille d'enzymes.

RÉFÉRENCES

- A.J.Barrett, N.D.Rawlings, and J.F.Woessner. Handbook of proteolytic enzymes. 1998. London, Academic Press.
- Akil,H., Young,E., Watson,S.J., and Coy,D.H. (1981). Opiate binding properties of naturally occurring N- and C-terminus modified beta-endorphins. *Peptides* 2, 289-292.
- Anderson,E.D., Molloy,S.S., Jean,F., Fei,H., Shimamura,S., and Thomas,G. (2002). The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 277, 12879-12890.
- Anderson,E.D., VanSlyke,J.K., Thulin,C.D., Jean,F., and Thomas,G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J.* 16, 1508-1518.
- Apletalina,E., Appel,J., Lamango,N.S., Houghten,R.A., and Lindberg,I. (1998). Identification of inhibitors of prohormone convertases 1 and 2 using a peptide combinatorial library. *J. Biol. Chem.* 273, 26589-26595.
- Arnaoutova,I., Smith,A.M., Coates,L.C., Sharpe,J.C., Dhanvantari,S., Snell,C.R., Birch,N.P., and Loh,Y.P. (2003). The prohormone processing enzyme PC3 is a lipid raft-associated transmembrane protein. *Biochemistry* 42, 10445-10455.
- Assadi,M., Sharpe,J.C., Snell,C., and Loh,Y.P. (2004). The C-terminus of prohormone convertase 2 is sufficient and necessary for Raft association and sorting to the regulated secretory pathway. *Biochemistry* 43, 7798-7807.
- Baker,D., Silen,J.L., and Agard,D.A. (1992). Protease pro region required for folding is a potent inhibitor of the mature enzyme. *Proteins* 12, 339-344.
- Basak,A., Cooper,S., Roberge,A.G., Banik,U.K., Chretien,M., and Seidah,N.G. (1999). Inhibition of proprotein convertases-1, -7 and furin by diterpines of *Andrographis paniculata* and their succinoyl esters. *Biochem. J.* 338 (Pt 1), 107-113.
- Basak,A., Ernst,B., Brewer,D., Seidah,N.G., Munzer,J.S., Lazure,C, and Lajoie,G.A. (1997). Histidine-rich human salivary peptides are inhibitors of proprotein convertases furin and PC7 but act as substrates for PC1. *J. Pept. Res.* 49, 596-603.
- Basak, A., Gauthier, D., Seidah, N. G., and Lazure, C. *Peptides, Proc.of the XVth American Peptide Symposium* (Tam, J.P., and Koumaya, P.T.P., eds) , 676-677. 1998. kluwer Academic Publishers.
- Ref Type: Generic

Basak,A., Jean,F., Seidah,N.G., and Lazure,C. (1994). Design and synthesis of novel inhibitors of prohormone convertases. *Int. J. Pept. Protein Res.* **44**, 253-261.

Basak,A., Koch,P., Dupelle,M., Fricker,L.D., Devi,L.A., Chretien,M., and Seidah,N.G. (2001). Inhibitory specificity and potency of proSAAS-derived peptides toward proprotein convertase 1. *J. Biol. Chem.* **276**, 32720-32728.

Basak,A. and Lazure,C. (2003). Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. *Biochem. J.* **373**, 231-239.

Basak,A., Schmidt,C., Ismail,A.A., Seidah,N.G., Chretien,M., and Lazure,C. (1995). Peptidyl substrates containing unnatural amino acid at the P'1 position are potent inhibitors of prohormone convertases. *Int. J. Pept. Protein Res.* **46**, 228-237.

Bassi,D.E., Fu,J., Lopez,d.C., and Klein-Szanto,A.J. (2005a). Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol. Carcinog.* **44**, 151-161.

Bassi,D.E., Fu,J., Lopez,d.C., and Klein-Szanto,A.J. (2005b). Proprotein convertases: "master switches" in the regulation of tumor growth and progression. *Mol. Carcinog.* **44**, 151-161.

Bathurst,I.C., Brennan,S.O., Carrell,R.W., Cousens,L.S., Brake,A.J., and Barr,P.J. (1987). Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science* **235**, 348-350.

Bell-Parikh,L.C., Eipper,B.A., and Mains,R.E. (2001). Response of an integral granule membrane protein to changes in pH. *J. Biol. Chem.* **276**, 29854-29863.

Benjannet,S., Elagoz,A., Wickham,L., Mamarbachi,M., Munzer,J.S., Basak,A., Lazure,C., Cromlish,J.A., Sisodia,S., Checler,F., Chretien,M., and Seidah,N.G. (2001). Post-translational processing of beta-secretase (beta-amyloid-converting enzyme) and its ectodomain shedding. The pro- and transmembrane/cytosolic domains affect its cellular activity and amyloid-beta production. *J. Biol. Chem.* **276**, 10879-10887.

Benjannet,S., Reudelhuber,T., Mercure,C., Rondeau,N., Chretien,M., and Seidah,N.G. (1992). Proprotein conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity, and intracellular environment. Cell type-specific processing of human prorenin by the convertase PC1. *J. Biol. Chem.* **267**, 11417-11423.

Benjannet,S., Rondeau,N., Paquet,L., Boudreault,A., Lazure,C., Chretien,M., and Seidah,N.G. (1993). Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* **294** (Pt 3), 735-743.

- Benjannet,S., Savaria,D., Laslop,A., Munzer,J.S., Chretien,M., Marcinkiewicz,M., and Seidah,N.G. (1997). Alpha1-antitrypsin Portland inhibits processing of precursors mediated by proprotein convertases primarily within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 26210-26218.
- Bergeron,E., Basak,A., Decroly,E., and Seidah,N.G. (2003). Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem. J.* 373, 475-484.
- Bergeron,F., Leduc,R., and Day,R. (2000). Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J. Mol. Endocrinol.* 24, 1-22.
- Berman,Y., Mzhavia,N., Polonskaia,A., Furuta,M., Steiner,D.F., Pintar,J.E., and Devi,L.A. (2000). Defective prodynorphin processing in mice lacking prohormone convertase PC2. *J. Neurochem.* 75, 1763-1770.
- Bernard,N., Kitabgi,P., and Rovere-Jovene,C. (2003). The Arg617-Arg618 cleavage site in the C-terminal domain of PC1 plays a major role in the processing and targeting of the enzyme within the regulated secretory pathway. *J. Neurochem.* 85, 1592-1603.
- Bertagna,X. (1994). Proopiomelanocortin-derived peptides. *Endocrinol. Metab Clin. North Am.* 23, 467-485.
- Bhattacharjya,S., Xu,P., and Ni,F. (2000a). Sequence-specific 1H, 15N and 13C resonance assignments of the inhibitory prodomain of human furin. *J. Biomol. NMR* 16, 275-276.
- Bhattacharjya,S., Xu,P., Zhong,M., Chretien,M., Seidah,N.G., and Ni,F. (2000b). Inhibitory activity and structural characterization of a C-terminal peptide fragment derived from the prosegment of the proprotein convertase PC7. *Biochemistry* 39, 2868-2877.
- Bissonnette,L., Charest,G., Longpre,J.M., Lavigne,P., and Leduc,R. (2004). Identification of furin pro-region determinants involved in folding and activation. *Biochem. J.* 379, 757-763.
- Blazquez,M., Docherty,K., and Shennan,K.I. (2001). Association of prohormone convertase 3 with membrane lipid rafts. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 107-116.
- Blazquez,M., Thiele,C., Huttner,W.B., Docherty,K., and Shennan,K.I. (2000). Involvement of the membrane lipid bilayer in sorting prohormone convertase 2 into the regulated secretory pathway. *Biochem. J.* 349 Pt 3, 843-852.
- Bloomquist,B.T., Eipper,B.A., and Mains,R.E. (1991). Prohormone-converting enzymes: regulation and evaluation of function using antisense RNA. *Mol. Endocrinol.* 5, 2014-2024.

- Bodvard,K., Mohlin,J., and Knecht,W. (2007). Recombinant expression, purification, and kinetic and inhibitor characterisation of human site-1-protease. *Protein Expr. Purif.* *51*, 308-319.
- Bogacheva,A.M. (1999). Plant subtilisins. *Biochemistry (Mosc.)* *64*, 287-293.
- Bonning,B.C. and Hammock,B.D. (1995). Use of juvenile hormone esterase as a novel reporter enzyme in the baculovirus expression system. *J. Virol. Methods* *51*, 103-113.
- Boudreault,A., Gauthier,D., and Lazure,C. (1998a). Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J. Biol. Chem.* *273*, 31574-31580.
- Boudreault,A., Gauthier,D., Rondeau,N., Savaria,D., Seidah,N.G., Chretien,M., and Lazure,C. (1998b). Molecular characterization, enzymatic analysis, and purification of murine proprotein convertase-1/3 (PC1/PC3) secreted from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* *14*, 353-366.
- Boutin,P. and Froguel,P. (2001). Genetics of human obesity. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* *15*, 391-404.
- Bozon,V., Remy,J.J., Pajot-Augy,E., Couture,L., Biache,G., Severini,M., and Salesse,R. (1995). Influence of promoter and signal peptide on the expression and secretion of recombinant porcine LH extracellular domain in baculovirus/lepidopteran cells or the caterpillar system. *J. Mol. Endocrinol.* *14*, 277-284.
- Brakch,N., Rholam,M., Simonetti,M., and Cohen,P. (2000). Favourable side-chain orientation of cleavage site dibasic residues of prohormone in proteolytic processing by prohormone convertase 1/3. *Eur. J. Biochem.* *267*, 1626-1633.
- Brakch,N., Rist,B., Beck-Sickinger,A.G., Goenaga,J., Wittek,R., Burger,E., Brunner,H.R., and Grouzmann,E. (1997). Role of prohormone convertases in pro-neuropeptide Y processing: coexpression and in vitro kinetic investigations. *Biochemistry* *36*, 16309-16320.
- Braks,J.A. and Martens,G.J. (1994). 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* *78*, 263-273.
- Bravo,D.A., Gleason,J.B., Sanchez,R.I., Roth,R.A., and Fuller,R.S. (1994). Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. *J. Biol. Chem.* *269*, 25830-25837.
- Brennan,S.O. and Nakayama,K. (1994a). Cleavage of proalbumin peptides by furin reveals unexpected restrictions at the P2 and P'1 sites. *FEBS Lett.* *347*, 80-84.

Brennan,S.O. and Nakayama,K. (1994b). Cleavage of proalbumin peptides by furin reveals unexpected restrictions at the P2 and P'1 sites. *FEBS Lett.* 347, 80-84.

Brenner,C. and Fuller,R.S. (1992). Structural and enzymatic characterization of a purified prohormone-processing enzyme: secreted, soluble Kex2 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 922-926.

Burkhardt,B.R., Parker,M.J., Zhang,Y.C., Song,S., Wasserfall,C.H., and Atkinson,M.A. (2005). Glucose transporter-2 (GLUT2) promoter mediated transgenic insulin production reduces hyperglycemia in diabetic mice. *FEBS Lett.* 579, 5759-5764.

Bzymek,K.P., D'Souza,V.M., Chen,G., Campbell,H., Mitchell,A., and Holz,R.C. (2004). Function of the signal peptide and N- and C-terminal propeptides in the leucine aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*. *Protein Expr. Purif.* 37, 294-305.

Cain,B.M., Vishnuvardhan,D., and Beinfeld,M.C. (2001). Neuronal cell lines expressing PC5, but not PC1 or PC2, process Pro-CCK into glycine-extended CCK 12 and 22. *Peptides* 22, 1271-1277.

Cameron,A., Fortenberry,Y., and Lindberg,I. (2000). The SAAS granin exhibits structural and functional homology to 7B2 and contains a highly potent hexapeptide inhibitor of PC1. *FEBS Lett.* 473, 135-138.

Cameron,A., Apletalina,E.V, and Lindberg,I. The enzymology of PC1 and PC2. *The Enzymes* 3rd ed. 291-328. 2001. San Diego, Academic Press.

Castro,M.G. and Morrison,E. (1997). Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev. Neurobiol.* 11, 35-57.

Cha,S. (1975). Tight-binding inhibitors-I. Kinetic behavior. *Biochem. Pharmacol.* 24, 2177-2185.

Chan,S.J., Oliva,A.A., Jr., LaMendola,J., Grens,A., Bode,H., and Steiner,D.F. (1992). Conservation of the prohormone convertase gene family in metazoa: analysis of cDNAs encoding a PC3-like protein from hydra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 6678-6682.

Chapman,R.L., Kane,S.E., and Erickson,A.H. (1997). Abnormal glycosylation of procathepsin L due to N-terminal point mutations correlates with failure to sort to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 272, 8808-8816.

Chen,J.M., Fortunato,M., and Barrett,A.J. (2000). Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue. *Biochem. J.* 352 Pt 2, 327-334.

Chen,W., Kelly,M.A., Opitz-Araya,X., Thomas,R.E., Low,M.J., and Cone,R.D. (1997). Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell* 91, 789-798.

- Cheng,M., Watson,P.H., Paterson,J.A., Seidah,N., Chretien,M., and Shiu,R.P. (1997). Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int. J. Cancer* 71, 966-971.
- Chretien,M. and Li,C.H. (1967). Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotrophic hormone from sheep pituitary glands. *Can. J. Biochem.* 45, 1163-1174.
- Cieplik,M., Klenk,H.D., and Garten,W. (1998). Identification and characterization of *spodoptera frugiperda* furin: a thermostable subtilisin-like endopeptidase. *Biol. Chem.* 379, 1433-1440.
- Ciesla,W. (2001). Can melatonin regulate the expression of prohormone convertase 1 and 2 genes via monomeric and dimeric forms of RZR/ROR nuclear receptor, and can melatonin influence the processes of embryogenesis or carcinogenesis by disturbing the proportion of cAMP and cGMP concentrations? Theoretic model of controlled apoptosis. *Med. Hypotheses* 56, 181-193.
- Clark,A.J., McLoughlin,L., and Grossman,A. (1993a). Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. *Lancet* 341, 461-462.
- Clark,D.A., Day,R., Seidah,N., Moody,T.W., Cuttitta,F., and Davis,T.P. (1993b). Protease inhibitors suppress in vitro growth of human small cell lung cancer. *Peptides* 14, 1021-1028.
- Clement,K. (2000). [Monogenic forms of obesity: from mice to human]. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 61 Suppl 6, 39-49.
- Coates,L.C. and Birch,N.P. (1997). Posttranslational maturation of the prohormone convertase SPC3 in vitro. *J. Neurochem.* 68, 828-836.
- Coates,L.C. and Birch,N.P. (1998). Differential cleavage of provasopressin by the major molecular forms of SPC3. *J. Neurochem.* 70, 1670-1678.
- Collin,R.W., van den Hurk,W.H., and Martens,G.J. (2005). Biosynthesis and differential processing of two pools of amyloid-beta precursor protein in a physiologically inducible neuroendocrine cell. *J. Neurochem.* 94, 1015-1024.
- Constam,D.B. and Robertson,E.J. (2000a). SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev.* 14, 1146-1155.
- Constam,D.B. and Robertson,E.J. (2000b). Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/SPC1 during embryonic turning and heart looping. *Development* 127, 245-254.
- Creemers,J.W., Ines,D.D., Plets,E., Serneels,L., Taylor,N.A., Multhaup,G., Craessaerts,K., Annaert,W., and De Strooper,B. (2001). Processing of beta-secretase by furin and other members of the proprotein convertase family. *J. Biol. Chem.* 276, 4211-4217.

- Creemers,J.W., Siezen,R.J., Roebroek,A.J., Ayoubi,T.A., Huylebroeck,D., and Van De Ven,W.J. (1993). Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 268, 21826-21834.
- Creemers,J.W., Usac,E.F., Bright,N.A., Van de Loo,J.W., Jansen,E., Van De Ven,W.J., and Hutton,J.C. (1996). Identification of a transferable sorting domain for the regulated pathway in the prohormone convertase PC2. *J. Biol. Chem.* 271, 25284-25291.
- Creemers,J.W., Vey,M., Schafer,W., Ayoubi,T.A., Roebroek,A.J., Klenk,H.D., Garten,W., and Van De Ven,W.J. (1995). Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270, 2695-2702.
- Cunningham,B.C. and Wells,J.A. (1989). High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244, 1081-1085.
- Davidson, H. W, Rhodes, C. J and Hutton, J.C.1988. Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic beta cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature.* 333(6168):93-6.
- Day,R., Schafer,M.K., Watson,S.J., Chretien,M., and Seidah,N.G. (1992). Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol. Endocrinol.* 6, 485-497.
- De Bie, I, Marcinkiewicz,M., Malide,D., Lazure,C., Nakayama,K., Bendayan,M., and Seidah,N.G. (1996). The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J. Cell Biol.* 135, 1261-1275.
- De,M., Bell,J., Blackburn,N.J., Mains,R.E., and Eipper,B.A. (2006). Role for an essential tyrosine in peptide amidation. *J. Biol. Chem.* 281, 20873-20882.
- Decroly,E., Wouters,S., Di Bello,C., Lazure,C., Ruyschaert,J.M., and Seidah,N.G. (1996). Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4(+) cell lines. *J. Biol. Chem.* 271, 30442-30450.
- Denault,J.B., Lazure,C., Day,R., and Leduc,R. (2000). Comparative characterization of two forms of recombinant human SPC1 secreted from Schneider 2 cells. *Protein Expr. Purif.* 19, 113-124.
- DeSantis,G. and Jones,J.B. (1999). Probing the altered specificity and catalytic properties of mutant subtilisin chemically modified at position S156C and S166C in the S1 pocket. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 1381-1387.
- Desjardins,M. (2003). ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 280-291.

- Dey,A., Norrbom,C., Zhu,X., Stein,J., Zhang,C., Ueda,K., and Steiner,D.F. (2004). Furin and prohormone convertase 1/3 are major convertases in the processing of mouse pro-growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 145, 1961-1971.
- Dey,A., Xhu,X., Carroll,R., Turck,C.W., Stein,J., and Steiner,D.F. (2003). Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3. *J. Biol. Chem.* 278, 15007-15014.
- Dhanvantari,S., Arnaoutova,I., Snell,C.R., Steinbach,P.J., Hammond,K., Caputo,G.A., London,E., and Loh,Y.P. (2002). Carboxypeptidase E, a prohormone sorting receptor, is anchored to secretory granules via a C-terminal transmembrane insertion. *Biochemistry* 41, 52-60.
- Dhanvantari,S., Izzo,A., Jansen,E., and Brubaker,P.L. (2001). Coregulation of glucagon-like peptide-1 synthesis with proglucagon and prohormone convertase 1 gene expression in enteroendocrine GLUTag cells. *Endocrinology* 142, 37-42.
- Dikeakos,J.D., Lacombe,M.J., Mercure,C., Mireuta,M., and Reudelhuber,T.L. (2007). A hydrophobic patch in a charged alpha-helix is sufficient to target proteins to dense core secretory granules. *J. Biol. Chem.* 282, 1136-1143.
- Dikeakos,J.D. and Reudelhuber,T.L. (2007). Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J. Cell Biol.* 177, 191-196.
- Dixon.M and Webb.E.C. *Enzymes*. 1979. New York, Academic Press.
- Dong,W., Fricker,L.D., and Day,R. (1999). Carboxypeptidase D is a potential candidate to carry out redundant processing functions of carboxypeptidase E based on comparative distribution studies in the rat central nervous system. *Neuroscience* 89, 1301-1317.
- Dong,W., Seidel,B., Marcinkiewicz,M., Chretien,M., Seidah,N.G., and Day,R. (1997). Cellular localization of the prohormone convertases in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei: selective regulation of PC1 in corticotrophin-releasing hormone parvocellular neurons mediated by glucocorticoids. *J. Neurosci.* 17, 563-575.
- Dreier,J., Li,Q., and Khosla,C. (2001). Malonyl-CoA:ACP transacylase from *Streptomyces coelicolor* has two alternative catalytically active nucleophiles. *Biochemistry* 40, 12407-12411.
- Duguay,S.J., Milewski,W.M., Young,B.D., Nakayama,K., and Steiner,D.F. (1997). Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases. *J. Biol. Chem.* 272, 6663-6670.
- Eder,J., Rheinnecker,M., and Fersht,A.R. (1993). Folding of subtilisin BPN': role of the pro-sequence. *J. Mol. Biol.* 233, 293-304.

- Eggelkraut-Gottanka,R. and Beck-Sickinger,A.G. (2004b). Biosynthesis of peptide hormones derived from precursor sequences. *Curr. Med. Chem.* *11*, 2651-2665.
- Eggelkraut-Gottanka,R. and Beck-Sickinger,A.G. (2004a). Biosynthesis of peptide hormones derived from precursor sequences. *Curr. Med. Chem.* *11*, 2651-2665.
- Eipper,B.A., Milgram,S.L., Husten,E.J., Yun,H.Y., and Mains,R.E. (1993). Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: a multifunctional protein with catalytic, processing, and routing domains. *Protein Sci.* *2*, 489-497.
- Essalmani,R., Hamelin,J., Marcinkiewicz,J., Chamberland,A., Mbikay,M., Chretien,M., Seidah,N.G., and Prat,A. (2006). Deletion of the gene encoding proprotein convertase 5/6 causes early embryonic lethality in the mouse. *Mol. Cell Biol.* *26*, 354-361.
- Fahnestock,M. and Zhu,W. (1999). Expression of human prohormone convertase PC2 in a baculovirus-insect cell system. *DNA Cell Biol.* *18*, 409-417.
- Falzon,L., Patel,S., Chen,Y.J., and Inouye,M. (2007). Autotomic behavior of the propeptide in propeptide-mediated folding of prosubtilisin E. *J. Mol. Biol.* *366*, 494-503.
- Farhadi,H., Pareek,S., Day,R., Dong,W., Chretien,M., Bergeron,J.J., Seidah,N.G., and Murphy,R.A. (1997). Prohormone convertases in mouse submandibular gland: colocalization of furin and nerve growth factor. *J. Histochem. Cytochem.* *45*, 795-804.
- Farooqi,I.S. and O'Rahilly,S. (2004). Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog. Horm. Res.* *59*, 409-424.
- Fehm,H.L., Smolnik,R., Kern,W., McGregor,G.P., Bickel,U., and Born,J. (2001). The melanocortin melanocyte-stimulating hormone/adrenocorticotropin(4-10) decreases body fat in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* *86*, 1144-1148.
- Feliciangeli,S.F., Thomas,L., Scott,G.K., Subbian,E., Hung,C.H., Molloy,S.S., Jean,F., Shinde,U., and Thomas,G. (2006). Identification of a pH sensor in the furin propeptide that regulates enzyme activation. *J. Biol. Chem.* *281*, 16108-16116.
- Feng,Y., Reznik,S.E., and Fricker,L.D. (2001). Distribution of proSAAS-derived peptides in rat neuroendocrine tissues. *Neuroscience* *105*, 469-478.
- Fontenele-Neto,J.D., Kalinina,E., Feng,Y., and Fricker,L.D. (2005). Identification and distribution of mouse carboxypeptidase A-6. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *137*, 132-142.
- Fortenberry,Y., Hwang,J.R., Apletalina,E.V., and Lindberg,I. (2002). Functional characterization of ProSAAS: similarities and differences with 7B2. *J. Biol. Chem.* *277*, 5175-5186.
- Fox,T., de Miguel,E., Mort,J.S., and Storer,A.C. (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* *31*, 12571-12576.

Fricker,L.D. (2005). Neuropeptide-processing enzymes: applications for drug discovery. *AAPS. J.* 7, E449-E455.

Fricker,L.D., Das,B., Klein,R.S., Greene,D., and Jung,Y.K. (1991). Regulation of carboxypeptidase E (enkephalin convertase). *NIDA Res. Monogr* 111, 171-187.

Fricker,L.D., McKinzie,A.A., Sun,J., Curran,E., Qian,Y., Yan,L., Patterson,S.D., Courchesne,P.L., Richards,B., Levin,N., Mzhavia,N., Devi,L.A., and Douglass,J. (2000). Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J. Neurosci.* 20, 639-648.

Fu,X., Inouye,M., and Shinde,U. (2000). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. The inhibitory and chaperone functions of the subtilisin propeptide are not obligatorily linked. *J. Biol. Chem.* 275, 16871-16878.

Fugere,M. and Day,R. (2002). Inhibitors of the subtilase-like pro-protein convertases (SPCs). *Curr. Pharm. Des* 8, 549-562.

Fugere,M., Limperis,P.C., Beaulieu-Audy,V., Gagnon,F., Lavigne,P., Klarskov,K., Leduc,R., and Day,R. (2002). Inhibitory potency and specificity of subtilase-like pro-protein convertase (SPC) prodomains. *J. Biol. Chem.* 277, 7648-7656.

Furuta,M., Yano,H., Zhou,A., Rouille,Y., Holst,J.J., Carroll,R., Ravazzola,M., Orci,L., Furuta,H., and Steiner,D.F. (1997). Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6646-6651.

Furuta,M., Zhou,A., Webb,G., Carroll,R., Ravazzola,M., Orci,L., and Steiner,D.F. (2001). Severe defect in proglucagon processing in islet A-cells of prohormone convertase 2 null mice. *J. Biol. Chem.* 276, 27197-27202.

Gallagher,T., Gilliland,G., Wang,L., and Bryan,P. (1995). The prosegment-subtilisin BPN' complex: crystal structure of a specific 'foldase'. *Structure.* 3, 907-914.

Germain,D., Vernet,T., Boileau,G., and Thomas,D.Y. (1992). Expression of the *Saccharomyces cerevisiae* Kex2p endoprotease in inset cells. Evidence for a carboxy-terminal autoprocessing event. *Eur. J. Biochem.* 204, 121-126.

Glasner,M.E., Gerlt,J.A., and Babbitt,P.C. (2006). Evolution of enzyme superfamilies. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 492-497.

Gluschankof,P. and Fuller,R.S. (1994). A C-terminal domain conserved in precursor processing proteases is required for intramolecular N-terminal maturation of pro-Kex2 protease. *EMBO J.* 13, 2280-2288.

Golden,A., Austen,D.A., van Schravendijk,M.R., Sullivan,B.J., Kawasaki,E.S., and Osburne,M.S. (1998). Effect of promoters and signal sequences on the production of secreted HIV-1 gp120 protein in the baculovirus system. *Protein Expr. Purif.* 14, 8-12.

- Goodman,L.J. and Gorman,C.M. (1994). Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *201*, 795-804.
- Gordon,V.M., Rehemtulla,A., and Leppla,S.H. (1997). A role for PACE4 in the proteolytic activation of anthrax toxin protective antigen. *Infect. Immun.* *65*, 3370-3375.
- Gorham,E.L., Nagle,G.T., Smith,J.S., Shen,H., and Kurosky,A. (1996). Molecular cloning of prohormone convertase 1 from the atrial gland of *Aplysia*. *DNA Cell Biol.* *15*, 339-345.
- Guo,L., Munzberg,H., Stuart,R.C., Nillni,E.A., and Bjorbaek,C. (2004). N-acetylation of hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and regulation by leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 11797-11802.
- Hale,C.C., Hill,C.K., Price,E.M., and Bossuyt,J. (2002). Expressing and purifying membrane transport proteins in high yield. *J. Biochem. Biophys. Methods* *50*, 233-243.
- Henrich,S., Cameron,A., Bourenkov,G.P., Kiefersauer,R., Huber,R., Lindberg,I., Bode,W., and Than,M.E. (2003). The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 520-526.
- Henrich,S., Lindberg,I., Bode,W., and Than,M.E. (2005). Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J. Mol. Biol.* *345*, 211-227.
- Holyoak,T., Kettner,C.A., Petsko,G.A., Fuller,R.S., and Ringe,D. (2004). Structural basis for differences in substrate selectivity in Kex2 and furin protein convertases. *Biochemistry* *43*, 2412-2421.
- Holyoak,T., Wilson,M.A., Fenn,T.D., Kettner,C.A., Petsko,G.A., Fuller,R.S., and Ringe,D. (2003). 2.4 A resolution crystal structure of the prototypical hormone-processing protease Kex2 in complex with an Ala-Lys-Arg boronic acid inhibitor. *Biochemistry* *42*, 6709-6718.
- Hook,V., Yasothornsrikul,S., Greenbaum,D., Medzihradszky,K.F., Troutner,K., Toneff,T., Bunday,R., Logrinova,A., Reinheckel,T., Peters,C., and Bogyo,M. (2004). Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones. *Biol. Chem.* *385*, 473-480.
- Hooper,N.M. (2002). Proteases: a primer. *Essays Biochem.* *38*, 1-8.
- Horimoto,T., Nakayama,K., Smeekens,S.P., and Kawaoka,Y. (1994). Proprotein-processing endoproteases PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. *J. Virol.* *68*, 6074-6078.
- Hwang,S.R., O'Neill,A., Bark,S., Foulon,T., and Hook,V. (2007). Secretory vesicle aminopeptidase B related to neuropeptide processing: molecular identification and

subcellular localization to enkephalin- and NPY-containing chromaffin granules. *J. Neurochem.* 100, 1340-1350.

Ikemura,H. and Inouye,M. (1988). In vitro processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263, 12959-12963.

Ikonomou,L., Schneider,Y.J., and Agathos,S.N. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 1-20.

Inceoglu,A.B., Kamita,S.G., and Hammock,B.D. (2006). Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Adv. Virus Res.* 68, 323-360.

Jackson,R.S., Creemers,J.W., Farooqi,I.S., Raffin-Sanson,M.L., Varro,A., Dockray,G.J., Holst,J.J., Brubaker,P.L., Corvol,P., Polonsky,K.S., Ostrega,D., Becker,K.L., Bertagna,X., Hutton,J.C., White,A., Dattani,M.T., Hussain,K., Middleton,S.J., Nicole,T.M., Milla,P.J., Lindley,K.J., and O'Rahilly,S. (2003). Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J. Clin. Invest* 112, 1550-1560.

Jackson,R.S., Creemers,J.W., Ohagi,S., Raffin-Sanson,M.L., Sanders,L., Montague,C.T., Hutton,J.C., and O'Rahilly,S. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* 16, 303-306.

Jain,R.K., Chang,W.T., Geetha,C., Joyce,P.B., and Gorr,S.U. (2002). In vitro aggregation of the regulated secretory protein chromogranin A. *Biochem. J.* 368, 605-610.

Jain,S.C., Shinde,U., Li,Y., Inouye,M., and Berman,H.M. (1998). The crystal structure of an autoprocessed Ser221Cys-subtilisin E-propeptide complex at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 284, 137-144.

Jan,G., Taylor,N.A., Scougall,K.T., Docherty,K., and Shennan,K.I. (1998). The propeptide of prohormone convertase PC2 acts as a transferable aggregation and membrane-association signal. *Eur. J. Biochem.* 257, 41-46.

Jarvis,D.L., Oker-Blom,C., and Summers,M.D. (1990). Role of glycosylation in the transport of recombinant glycoproteins through the secretory pathway of lepidopteran insect cells. *J. Cell Biochem.* 42, 181-191.

Jarvis,D.L., Summers,M.D., Garcia,A., Jr., and Bohlmeier,D.A. (1993). Influence of different signal peptides and prosequences on expression and secretion of human tissue plasminogen activator in the baculovirus system. *J. Biol. Chem.* 268, 16754-16762.

Jean,F., Basak,A., Rondeau,N., Benjannet,S., Hendy,G.N., Seidah,N.G., Chretien,M., and Lazure,C. (1993). Enzymic characterization of murine and human prohormone convertase-1 (mPC1 and hPC1) expressed in mammalian GH4C1 cells. *Biochem. J.* 292 (Pt 3), 891-900.

- Jean,F., Boudreault,A., Basak,A., Seidah,N.G., and Lazure,C. (1995). Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J. Biol. Chem.* 270, 19225-19231.
- Jean,F., Stella,K., Thomas,L., Liu,G., Xiang,Y., Reason,A.J., and Thomas,G. (1998). α 1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7293-7298.
- Jegou,S., Boutelet,I., and Vaudry,H. (2000). Melanocortin-3 receptor mRNA expression in pro-opiomelanocortin neurones of the rat arcuate nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 12, 501-505.
- Jiao, G. S., Cregar, L., Wang, J., Millis, S. Z., Tang, C., O'Malley, S., Johnson, A.T., Sareth, S., Larson, J., Thomas, G. 2006. Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptamine. *Proc Natl Acad Sci* 103(52):19707-12.
- Johanning,K., Juliano,M.A., Juliano,L., Lazure,C., Lamango,N.S., Steiner,D.F., and Lindberg,I. (1998). Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates. *J. Biol. Chem.* 273, 22672-22680.
- Johnson,R.C., Darlington,D.N., Hand,T.A., Bloomquist,B.T., and Mains,R.E. (1994). PACE4: a subtilisin-like endoprotease prevalent in the anterior pituitary and regulated by thyroid status. *Endocrinology* 135, 1178-1185.
- Julius,D., Brake,A., Blair,L., Kunisawa,R., and Thorner,J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro- α -factor. *Cell* 37, 1075-1089.
- Jutras,I., Seidah,N.G., and Reudelhuber,T.L. (2000). A predicted α -helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 40337-40343.
- Jutras,I., Seidah,N.G., Reudelhuber,T.L., and Brechler,V. (1997). Two activation states of the prohormone convertase PC1 in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 15184-15188.
- Kacprzak,M.M., Than,M.E., Juliano,L., Juliano,M.A., Bode,W., and Lindberg,I. (2005). Mutations of the PC2 substrate binding pocket alter enzyme specificity. *J. Biol. Chem.* 280, 31850-31858.
- Kalus,I., Schnegelsberg,B., Seidah,N.G., Kleene,R., and Schachner,M. (2003). The proprotein convertase PC5A and a metalloprotease are involved in the proteolytic processing of the neural adhesion molecule L1. *J. Biol. Chem.* 278, 10381-10388.
- Kang,H.A., Nam,S.W., Kwon,K.S., Chung,B.H., and Yu,M.H. (1996). High-level secretion of human α 1-antitrypsin from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal sequence. *J. Biotechnol.* 48, 15-24.

- Keller, P., Zecca, L., Boukamel, R., Zwicker, E., Gloor, S., and Semenza, G. (1995). Furin, PC1/3, and/or PC6A process rabbit, but not human, pro-lactase-phlorizin hydrolase to the 180-kDa intermediate. *J. Biol. Chem.* 270, 25722-25728.
- Khan, A.R. and James, M.N. (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 7, 815-836.
- Koganesawa, N., Aizawa, T., Masaki, K., Matsuura, A., Nimori, T., Bando, H., Kawano, K., and Nitta, K. (2001). Construction of an expression system of insect lysozyme lacking thermal stability: the effect of selection of signal sequence on level of expression in the *Pichia pastoris* expression system. *Protein Eng* 14, 705-710.
- Kolhekar, A.S., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (1997). Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase: an ascorbate-requiring enzyme. *Methods Enzymol.* 279, 35-43.
- Krysan, D.J., Rockwell, N.C., and Fuller, R.S. (1999). Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J. Biol. Chem.* 274, 23229-23234.
- Kuiper, R.P. and Martens, G.J. (2000). Prohormone transport through the secretory pathway of neuroendocrine cells. *Biochem. Cell Biol.* 78, 289-298.
- Kulakosky, P.C., Hughes, P.R., and Wood, H.A. (1998). N-Linked glycosylation of a baculovirus-expressed recombinant glycoprotein in insect larvae and tissue culture cells. *Glycobiology* 8, 741-745.
- Kulakosky, P.C. and Klinge, C.M. (2003). Maximizing production of estrogen receptor beta with the baculovirus expression system. *Biotechniques* 34, 334-3.
- Lacombe, M.J., Mercure, C., Dikeakos, J.D., and Reudelhuber, T.L. (2005). Modulation of secretory granule-targeting efficiency by cis and trans compounding of sorting signals. *J. Biol. Chem.* 280, 4803-4807.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death. Differ.* 14, 44-55.
- Lanoue, E. and Day, R. (2001). Coexpression of proprotein convertase SPC3 and the neuroendocrine precursor proSAAS. *Endocrinology* 142, 4141-4149.
- Lazure, C. (2002). The peptidase zymogen proregions: nature's way of preventing undesired activation and proteolysis. *Curr. Pharm. Des* 8, 511-531.
- Lazure, C., Gauthier, D., Jean, F., Boudreault, A., Seidah, N.G., Bennett, H.P., and Hendy, G.N. (1998). In vitro cleavage of internally quenched fluorogenic human parathyroid hormone and parathyroid-related peptide substrates by furin. Generation of a potent inhibitor. *J. Biol. Chem.* 273, 8572-8580.

- Ledgerwood, E.C., Brennan, S.O., Birch, N.P., and George, P.M. (1996). The specificity of the neuroendocrine convertase PC3 is determined by residues NH₂- and COOH-terminal to the cleavage site. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 1167-1176.
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A., and Thomas, G. (1992). Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* 267, 14304-14308.
- Lee, M.H., Dodds, P., Verma, V., Maskos, K., Knauper, V., and Murphy, G. (2003). Tailoring tissue inhibitor of metalloproteinases-3 to overcome the weakening effects of the cysteine-rich domains of tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem. J.* 371, 369-376.
- Lee, M.H., Knauper, V., Becherer, J.D., and Murphy, G. (2001). Full-length and N-TIMP-3 display equal inhibitory activities toward TNF-alpha convertase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 945-950.
- Lee, M.H., Verma, V., Maskos, K., Becherer, J.D., Knauper, V., Dodds, P., Amour, A., and Murphy, G. (2002). The C-terminal domains of TACE weaken the inhibitory action of N-TIMP-3. *FEBS Lett.* 520, 102-106.
- Lesage, G., Guimond, J., and Boileau, G. (2003). trans-Complementation assay establishes the role of proregion hydrophobic amino acid residues in the biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* Kex2p endoprotease. *Yeast* 20, 397-406.
- Lesage, G., Prat, A., Lacombe, J., Thomas, D.Y., Seidah, N.G., and Boileau, G. (2000). The Kex2p proregion is essential for the biosynthesis of an active enzyme and requires a C-terminal basic residue for its function. *Mol. Biol. Cell* 11, 1947-1957.
- Lesage, G., Tremblay, M., Guimond, J., and Boileau, G. (2001). Mechanism of Kex2p inhibition by its proregion. *FEBS Lett.* 508, 332-336.
- Li, D.N., Matthews, S.P., Antoniou, A.N., Mazzeo, D., and Watts, C. (2003). Multistep autoactivation of asparaginyl endopeptidase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 38980-38990.
- Li, Q.L., Jansen, E., Brent, G.A., and Friedman, T.C. (2001). Regulation of prohormone convertase 1 (PC1) by thyroid hormone. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 280, E160-E170.
- Li, Y., Hu, Z., Jordan, F., and Inouye, M. (1995). Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J. Biol. Chem.* 270, 25127-25132.
- Liao, D.I., Zheng, Y.J., Viitanen, P.V., and Jordan, D.B. (2002). Structural definition of the active site and catalytic mechanism of 3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *Biochemistry* 41, 1795-1806.

- Lin,G., Wang,X., Long,Q., Pang,Y., Wong,A.O., and Yu,K. (1997). Production of recombinant goldfish growth hormone I in a baculovirus expression system. *Chin J. Biotechnol.* 13, 91-97.
- Lindberg,I. (1994). Evidence for cleavage of the PC1/PC3 pro-segment in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Neurosci.* 5, 263-268.
- Lloyd,D.J., Bohan,S., and Gekakis,N. (2006). Obesity, hyperphagia and increased metabolic efficiency in Pc1 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* 15, 1884-1893.
- Loh,Y.P., Maldonado,A., Zhang,C., Tam,W.H., and Cawley,N. (2002). Mechanism of sorting proopiomelanocortin and proenkephalin to the regulated secretory pathway of neuroendocrine cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 971, 416-425.
- Lopez,d.C., Bassi,D.E., Zucker,S., Seidah,N.G., and Klein-Szanto,A.J. (2005). Human carcinoma cell growth and invasiveness is impaired by the propeptide of the ubiquitous proprotein convertase furin. *Cancer Res.* 65, 4162-4171.
- Lopez-Perez,E., Seidah,N.G., and Checler,F. (1999). Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive alpha-secretase pathway. *J. Neurochem.* 73, 2056-2062.
- Lou,H., Smith,A.M., Coates,L.C., Cawley,N.X., Loh,Y.P., and Birch,N.P. (2007). The transmembrane domain of the prohormone convertase PC3: a key motif for targeting to the regulated secretory pathway. *Mol. Cell Endocrinol.* 267, 17-25.
- Lu,W., Zhang,W., Molloy,S.S., Thomas,G., Ryan,K., Chiang,Y., Anderson,S., and Laskowski,M., Jr. (1993). Arg15-Lys17-Arg18 turkey ovomucoid third domain inhibits human furin. *J. Biol. Chem.* 268, 14583-14585.
- Lusson,J., Benjannet,S., Hamelin,J., Savaria,D., Chretien,M., and Seidah,N.G. (1997). The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem. J.* 326 (Pt 3), 737-744.
- Lusson,J., Vieau,D., Hamelin,J., Day,R., Chretien,M., and Seidah,N.G. (1993). cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6691-6695.
- Maeda,S., Kawai,T., Obinata,M., Fujiwara,H., Horiuchi,T., Saeki,Y., Sato,Y., and Furusawa,M. (1985). Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315, 592-594.
- Maisner,A., Mrkic,B., Herrler,G., Moll,M., Billeter,M.A., Cattaneo,R., and Klenk,H.D. (2000). Recombinant measles virus requiring an exogenous protease for activation of infectivity. *J. Gen. Virol.* 81, 441-449.

Marcinkiewicz,M., Day,R., Seidah,N.G., and Chretien,M. (1993). Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 4922-4926.

Marcinkiewicz,M., Ramla,D., Seidah,N.G., and Chretien,M. (1994). Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology* 135, 1651-1660.

Marie-Claire,C., Yabuta,Y., Suefuji,K., Matsuzawa,H., and Shinde,U. (2001). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: the structural and functional characterization of the aqualysin I propeptide. *J. Mol. Biol.* 305, 151-165.

Martens,G.J., Braks,J.A., Eib,D.W., Zhou,Y., and Lindberg,I. (1994). The neuroendocrine polypeptide 7B2 is an endogenous inhibitor of prohormone convertase PC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 5784-5787.

Matsuura,K., Tamada,Y., Deyashiki,Y., Miyabe,Y., Nakanishi,M., Ohya,I., and Hara,A. (1996). Activation of human liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase by sulphobromophthalein. *Biochem. J.* 313 (Pt 1), 179-184.

Matthews,D.J., Goodman,L.J., Gorman,C.M., and Wells,J.A. (1994). A survey of furin substrate specificity using substrate phage display. *Protein Sci.* 3, 1197-1205.

Mbikay,M., Seidah,N.G., and Chretien,M. (2001). Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions. *Biochem. J.* 357, 329-342.

Mbikay,M., Tadros,H., Ishida,N., Lerner,C.P., De Lamirande,E., Chen,A., El Alfy,M., Clermont,Y., Seidah,N.G., Chretien,M., Gagnon,C., and Simpson,E.M. (1997). Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6842-6846.

Medin,J.A., Hunt,L., Gathy,K., Evans,R.K., and Coleman,M.S. (1990). Efficient, low-cost protein factories: expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87, 2760-2764.

MEROPS. The Peptide Database. 2007. <http://merops.sanger.ac.uk/>.
Ref Type: Generic

Mikolajczyk,J., Boatright,K.M., Stennicke,H.R., Nazif,T., Potempa,J., Bogyo,M., and Salvesen,G.S. (2003). Sequential autolytic processing activates the zymogen of Arg-gingipain. *J. Biol. Chem.* 278, 10458-10464.

Miranda,L., Wolf,J., Pichuanes,S., Duke,R., and Franzusoff,A. (1996). Isolation of the human PC6 gene encoding the putative host protease for HIV-1 gp160 processing in CD4+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 7695-7700.

- Mizuno,K., Nakamura,T., Ohshima,T., Tanaka,S., and Matsuo,H. (1988). Yeast KEX2 genes encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 246-254.
- Moiseeva,N.A., Binevski,P.V., Baskin,I.I., Palyulin,V.A., and Kost,O.A. (2005). Role of two chloride-binding sites in functioning of testicular angiotensin-converting enzyme. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 1167-1172.
- Molloy,S.S., Bresnahan,P.A., Leppla,S.H., Klimpel,K.R., and Thomas,G. (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* 267, 16396-16402.
- Moulard,M. and Decroly,E. (2000). Maturation of HIV envelope glycoprotein precursors by cellular endoproteases. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 121-132.
- Muller,L., Cameron,A., Fortenberry,Y., Apletalina,E.V., and Lindberg,I. (2000). Processing and sorting of the prohormone convertase 2 propeptide. *J. Biol. Chem.* 275, 39213-39222.
- Muller,L. and Lindberg,I. (1999). The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63, 69-108.
- Murphy,C.I., McIntire,J.R., Davis,D.R., Hodgdon,H., Seals,J.R., and Young,E. (1993). Enhanced expression, secretion, and large-scale purification of recombinant HIV-1 gp120 in insect cell using the baculovirus egt and p67 signal peptides. *Protein Expr. Purif.* 4, 349-357.
- Nakayama,K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* 327 (Pt 3), 625-635.
- Nie,G., Li,Y., Wang,M., Liu,Y.X., Findlay,J.K., and Salamonsen,L.A. (2005). Inhibiting uterine PC6 blocks embryo implantation: an obligatory role for a proprotein convertase in fertility. *Biol. Reprod.* 72, 1029-1036.
- Nielsen,H., Brunak,S., and von Heijne,G. (1999). Machine learning approaches for the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. *Protein Eng* 12, 3-9.
- Nilaweera,K.N., Barrett,P., Mercer,J.G., and Morgan,P.J. (2003). Precursor-protein convertase 1 gene expression in the mouse hypothalamus: differential regulation by ob gene mutation, energy deficit and administration of leptin, and coexpression with preprorexin. *Neuroscience* 119, 713-720.
- Noriega,G.O., Juknat,A.A., and Batlle,A.M. (1992). Non-essential activation of rat liver porphobilinogen-deaminase by folic acid. *Z. Naturforsch. [C.]* 47, 416-419.
- Norman,D., Isidori,A.M., Frajese,V., Caprio,M., Chew,S.L., Grossman,A.B., Clark,A.J., Michael,B.G., and Fabbri,A. (2003). ACTH and alpha-MSH inhibit leptin expression and

secretion in 3T3-L1 adipocytes: model for a central-peripheral melanocortin-leptin pathway. *Mol. Cell Endocrinol.* 200, 99-109.

Nour,N., Basak,A., Chretien,M., and Seidah,N.G. (2003). Structure-function analysis of the prosegment of the proprotein convertase PC5A. *J. Biol. Chem.* 278, 2886-2895.

Nour,N., Mayer,G., Mort,J.S., Salvas,A., Mbikay,M., Morrison,C.J., Overall,C.M., and Seidah,N.G. (2005). The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol. Biol. Cell* 16, 5215-5226.

O'Rahilly,D.R., Miller,L.K., and Luckow,V.A. (1992). *Baculovirus Expression Vectors (a laboratory manual)*.

Okada,H., Nie,G., and Salamonsen,L.A. (2005). Requirement for proprotein convertase 5/6 during decidualization of human endometrial stromal cells in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90, 1028-1034.

Olmos-Soto,J. and Contreras-Flores,R. (2003). Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 369-373.

Ouafik,L.H., Stoffers,D.A., Campbell,T.A., Johnson,R.C., Bloomquist,B.T., Mains,R.E., and Eipper,B.A. (1992). The multifunctional peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase gene: exon/intron organization of catalytic, processing, and routing domains. *Mol. Endocrinol.* 6, 1571-1584.

Palnaes,H.C., Stadil,F., and Rehfeld,J.F. (2000). Metabolism and acid secretory effect of sulfated and nonsulfated gastrin-6 in humans. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 279, G903-G909.

Pan,H., Che,F.Y., Peng,B., Steiner,D.F., Pinar,J.E., and Fricker,L.D. (2006). The role of prohormone convertase-2 in hypothalamic neuropeptide processing: a quantitative neuropeptidomic study. *J. Neurochem.* 98, 1763-1777.

Paroutis,P., Touret,N., and Grinstein,S. (2004). The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology. (Bethesda.)* 19, 207-215.

Philipps,B., Rotmann,D., Wicki,M., Mayr,L.M., and Forstner,M. (2005). Time reduction and process optimization of the baculovirus expression system for more efficient recombinant protein production in insect cells. *Protein Expr. Purif.* 42, 211-218.

Power,S.D., Adams,R.M., and Wells,J.A. (1986). Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 3096-3100.

Powner,D. and Davey,J. (1998). Activation of the kexin from *Schizosaccharomyces pombe* requires internal cleavage of its initially cleaved prosequence. *Mol. Cell Biol.* 18, 400-408.

- Pritchard,L.E., Turnbull,A.V., and White,A. (2002). Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J. Endocrinol.* 172, 411-421.
- Puente,X.S., Sanchez,L.M., Overall,C.M., and Lopez-Otin,C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 4, 544-558.
- Puri,S., Bachert,C., Fimmel,C.J., and Linstedt,A.D. (2002). Cycling of early Golgi proteins via the cell surface and endosomes upon luminal pH disruption. *Traffic.* 3, 641-653.
- Qian,Y., Devi,L.A., Mzhavia,N., Munzer,S., Seidah,N.G., and Fricker,L.D. (2000). The C-terminal region of proSAAS is a potent inhibitor of prohormone convertase 1. *J. Biol. Chem.* 275, 23596-23601.
- Rabah , N., Ebling, P., and Lazure, C. Production of protein convertases 1/3 (PC1/3) and PC7. PENCE (The protein Engineering Network of Centers of Excellence) Annual Meeting.Toronto. 2001.
- Rabah,N., Gauthier,D., Wilkes,B.C., Gauthier,D.J., and Lazure,C. (2006). Single amino acid substitution in the PC1/3 propeptide can induce significant modifications of its inhibitory profile toward its cognate enzyme. *J. Biol. Chem.* 281, 7556-7567.
- Rabah,N., Gauthier,D.J., Gauthier,D., and Lazure,C. (2004). Improved PC1/3 production through recombinant expression in insect cells and larvae. *Protein Expr. Purif.* 37, 377-384.
- Rancourt,S.L. and Rancourt,D.E. (1997). Murine subtilisin-like proteinase SPC6 is expressed during embryonic implantation, somitogenesis, and skeletal formation. *Dev. Genet.* 21, 75-81.
- Ravn,P., Arnau,J., Madsen,S.M., Vrang,A., and Israelsen,H. (2003). Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 149, 2193-2201.
- Robbins,L.S., Nadeau,J.H., Johnson,K.R., Kelly,M.A., Roselli-Rehfuss,L., Baack,E., Mountjoy,K.G., and Cone,R.D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-834.
- Rockwell,N.C. and Fuller,R.S. (1998). Interplay between S1 and S4 subsites in Kex2 protease: Kex2 exhibits dual specificity for the P4 side chain. *Biochemistry* 37, 3386-3391.
- Rockwell,N.C. and Fuller,R.S. (2002). Specific modulation of Kex2/furin family proteases by potassium. *J. Biol. Chem.* 277, 17531-17537.

Rockwell,N.C., Krysan,D.J., Komiyama,T., and Fuller,R.S. (2002). Precursor processing by kex2/furin proteases. *Chem. Rev.* 102, 4525-4548.

Rockwell,N.C. and Thorner,J.W. (2004). The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends Biochem. Sci.* 29, 80-87.

Roebroek,A.J., Schalken,J.A., Leunissen,J.A., Onnekink,C., Bloemers,H.P., and Van De Ven,W.J. (1986). Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J.* 5, 2197-2202.

Roebroek,A.J., Umans,L., Pauli,I.G., Robertson,E.J., van Leuven,F., Van De Ven,W.J., and Constam,D.B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 125, 4863-4876.

Rovere,C., Luis,J., Lissitzky,J.C., Basak,A., Marvaldi,J., Chretien,M., and Seidah,N.G. (1999). The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin alpha5beta1. *J. Biol. Chem.* 274, 12461-12467.

Rozan,L., Krysan,D.J., Rockwell,N.C., and Fuller,R.S. (2004). Plasticity of extended subsites facilitates divergent substrate recognition by Kex2 and furin. *J. Biol. Chem.* 279, 35656-35663.

Rufaut,N.W., Brennan,S.O., Hakes,D.J., Dixon,J.E., and Birch,N.P. (1993). Purification and characterization of the candidate prohormone-processing enzyme SPC3 produced in a mouse L cell line. *J. Biol. Chem.* 268, 20291-20298.

Sambrook,J. and Russell,D. (2001). *Molecular Cloning (a laboratory manual)*. (NewYork: Cold Spring Harbor).

Sanchez,V.C., Goldstein,J., Stuart,R.C., Hovanesian,V., Huo,L., Munzberg,H., Friedman,T.C., Bjorbaek,C., and Nillni,E.A. (2004). Regulation of hypothalamic prohormone convertases 1 and 2 and effects on processing of prothyrotropin-releasing hormone. *J. Clin. Invest* 114, 357-369.

Sarac,M.S., Cameron,A., and Lindberg,I. (2002). The furin inhibitor hexa-D-arginine blocks the activation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in vivo. *Infect. Immun.* 70, 7136-7139.

Sasakawa,H., Yoshinaga,S., Kojima,S., and Tamura,A. (2002). Structure of POIA1, a homologous protein to the propeptide of subtilisin: implication for protein foldability and the function as an intramolecular chaperone. *J. Mol. Biol.* 317, 159-167.

Sauter,N.K., Mau,T., Rader,S.D., and Agard,D.A. (1998). Structure of alpha-lytic protease complexed with its pro region. *Nat. Struct. Biol.* 5, 945-950.

Schechter,I. and Berger,A. (1967b). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157-162.

Schechter,I. and Berger,A. (1967a). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157-162.

Scott,D.J., da Costa,B.M., Espy,S.C., Keasling,J.D., and Cornish,K. (2003). Activation and inhibition of rubber transferases by metal cofactors and pyrophosphate substrates. *Phytochemistry* 64, 123-134.

Scougall,K., Taylor,N.A., Jermany,J.L., Docherty,K., and Shennan,K.I. (1998). Differences in the autocatalytic cleavage of pro-PC2 and pro-PC3 can be attributed to sequences within the propeptide and Asp310 of pro-PC2. *Biochem. J.* 334 (Pt 3), 531-537.

Segel, I. H. *Enzyme Kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems.* 1993. New York, John Wiley & Sons Inc.

Sehgal,D., Malik,P.S., and Jameel,S. (2003). Purification and diagnostic utility of a recombinant hepatitis E virus capsid protein expressed in insect larvae. *Protein Expr. Purif.* 27, 27-34.

Seidah,N.G. and Chretien,M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* 848, 45-62.

Seidah,N.G., Day,R., Benjannet,S., Rondeau,N., Boudreault,A., Reudelhuber,T., Schafer,M.K., Watson,S.J., and Chretien,M. (1992). The prohormone and proprotein processing enzymes PC1 and PC2: structure, selective cleavage of mouse POMC and human renin at pairs of basic residues, cellular expression, tissue distribution, and mRNA regulation. *NIDA Res. Monogr* 126, 132-150.

Seidah,N.G., Hamelin,J., Mamarbachi,M., Dong,W., Tardos,H., Mbikay,M., Chretien,M., and Day,R. (1996). cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3388-3393.

Shennan,K.I., Taylor,N.A., Jermany,J.L., Matthews,G., and Docherty,K. (1995). Differences in pH optima and calcium requirements for maturation of the prohormone convertases PC2 and PC3 indicates different intracellular locations for these events. *J. Biol. Chem.* 270, 1402-1407.

Shinde,U., Fu,X., and Inouye,M. (1999). A pathway for conformational diversity in proteins mediated by intramolecular chaperones. *J. Biol. Chem.* 274, 15615-15621.

Shinde,U. and Inouye,M. (1995a). Folding mediated by an intramolecular chaperone: autoprocessing pathway of the precursor resolved via a substrate assisted catalysis mechanism. *J. Mol. Biol.* 247, 390-395.

Shinde,U. and Inouye,M. (1995b). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: characterization of the structural changes in pro-subtilisin E coincident with autoprocessing. *J. Mol. Biol.* 252, 25-30.

Shinde,U. and Inouye,M. (2000). Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 35-44.

Shinde,U.P., Liu,J.J., and Inouye,M. (1997). Protein memory through altered folding mediated by intramolecular chaperones. *Nature* 389, 520-522.

Shomali,M.E. and Hussain,M.A. (2000). Cushing's syndrome: from patients to proteins. *Eur. J. Endocrinol.* 143, 313-315.

Siezen,R.J., Creemers,J.W., and Van De Ven,W.J. (1994). Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *Eur. J. Biochem.* 222, 255-266.

Siezen,R.J. and Leunissen,J.A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* 6, 501-523.

Sohl,J.L., Shiau,A.K., Rader,S.D., Wilk,B.J., and Agard,D.A. (1997). Inhibition of alpha-lytic protease by pro region C-terminal steric occlusion of the active site. *Biochemistry* 36, 3894-3902.

Spence,M.J., Sucic,J.F., Foley,B.T., and Moehring,T.J. (1995). Analysis of mutations in alleles of the fur gene from an endoprotease-deficient Chinese hamster ovary cell strain. *Somat. Cell Mol. Genet.* 21, 1-18.

St Germain,C., Croissandeau,G., Mayne,J., Baltz,J.M., Chretien,M., and Mbikay,M. (2005). Expression and transient nuclear translocation of proprotein convertase 1 (PC1) during mouse preimplantation embryonic development. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 483-493.

Stawowy,P. and Fleck,E. (2005). Proprotein convertases furin and PC5: targeting atherosclerosis and restenosis at multiple levels. *J. Mol. Med.* 83, 865-875.

Stein,J., Shah,R., Steiner,D.F., and Dey,A. (2006a). RNAi-mediated silencing of prohormone convertase (PC) 5/6 expression leads to impairment in processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor. *Biochem. J.* 400, 209-215.

Stein,J., Steiner,D.F., and Dey,A. (2006b). Processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor proteins by prohormone convertases (PCs) and its implications. *Peptides* 27, 1919-1925.

Steiner,D.F., Cunningham,D., Spigelman,L., and Aten,B. (1967). Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 157, 697-700.

Stettler,H., Suri,G., and Spiess,M. (2005). Proprotein convertase PC3 is not a transmembrane protein. *Biochemistry* 44, 5339-5345.

Stieneke-Grober,A., Vey,M., Angliker,H., Shaw,E., Thomas,G., Roberts,C., Klenk,H.D., and Garten,W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 11, 2407-2414.

Storrie,B. (2005). Maintenance of Golgi apparatus structure in the face of continuous protein recycling to the endoplasmic reticulum: making ends meet. *Int. Rev. Cytol.* 244, 69-94.

Stratton,J.R., Pelton,J.G., and Kirsch,J.F. (2001). A novel engineered subtilisin BPN' lacking a low-barrier hydrogen bond in the catalytic triad. *Biochemistry* 40, 10411-10416.

Stray,S.J., Ceres,P., and Zlotnick,A. (2004). Zinc ions trigger conformational change and oligomerization of hepatitis B virus capsid protein. *Biochemistry* 43, 9989-9998.

Subbian,E., Yabuta,Y., and Shinde,U.P. (2005). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: intrinsically unstructured propeptide modulates stochastic activation of subtilisin. *J. Mol. Biol.* 347, 367-383.

Takagi,H. and Takahashi,M. (2003). A new approach for alteration of protease functions: pro-sequence engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 1-9.

Takahashi,S., Nakagawa,T., Kasai,K., Banno,T., Duguay,S.J., Van De Ven,W.J., Murakami,K., and Nakayama,K. (1995). A second mutant allele of furin in the processing-incompetent cell line, LoVo. Evidence for involvement of the homo B domain in autocatalytic activation. *J. Biol. Chem.* 270, 26565-26569.

Tanaka,S. (2003). Comparative aspects of intracellular proteolytic processing of peptide hormone precursors: studies of proopiomelanocortin processing. *Zoolog. Sci.* 20, 1183-1198.

Tangrea,M.A., Alexander,P., Bryan,P.N., Eisenstein,E., Toedt,J., and Orban,J. (2001). Stability and global fold of the mouse prohormone convertase 1 pro-domain. *Biochemistry* 40, 5488-5495.

Tangrea,M.A., Bryan,P.N., Sari,N., and Orban,J. (2002). Solution structure of the prohormone convertase 1 pro-domain from *Mus musculus*. *J. Mol. Biol.* 320, 801-812.

Taylor,N.A., Jan,G., Scougall,K.T., Docherty,K., and Shennan,K.I. (1998). Sorting of PC2 to the regulated secretory pathway in AtT20 cells. *J. Mol. Endocrinol.* 21, 209-216.

Taylor,N.A., Van De Ven,W.J., and Creemers,J.W. (2003). Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *FASEB J.* 17, 1215-1227.

Tessier,D.C., Thomas,D.Y., Khouri,H.E., Laliberte,F., and Vernet,T. (1991). Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* 98, 177-183.

Teuchert,M., Berghofer,S., Klenk,H.D., and Garten,W. (1999a). Recycling of furin from the plasma membrane. Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. *J. Biol. Chem.* 274, 36781-36789.

Teuchert,M., Maisner,A., and Herrler,G. (1999b). Importance of the carboxyl-terminal FTSL motif of membrane cofactor protein for basolateral sorting and endocytosis. Positive and negative modulation by signals inside and outside the cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* 274, 19979-19984.

Than,M.E., Henrich,S., Bourenkov,G.P., Bartunik,H.D., Huber,R., and Bode,W. (2005). The endoprotease furin contains two essential Ca²⁺ ions stabilizing its N-terminus and the unique S1 specificity pocket. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 61, 505-512.

Thomas,G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 753-766.

Thomas,G., Thorne,B.A., Thomas,L., Allen,R.G., Hruby,D.E., Fuller,R., and Thorner,J. (1988). Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* 241, 226-230.

Tjalsma,H., Stover,A.G., Driks,A., Venema,G., Bron,S., and van Dijk,J.M. (2000). Conserved serine and histidine residues are critical for activity of the ER-type signal peptidase SipW of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 275, 25102-25108.

Tsuneoka,M., Nakayama,K., Hatsuzawa,K., Komada,M., Kitamura,N., and Mekada,E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* 268, 26461-26465.

Turk,B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 785-799.

Tyndall,J.D., Nall,T., and Fairlie,D.P. (2005). Proteases universally recognize beta strands in their active sites. *Chem. Rev.* 105, 973-999.

Tzimas,G.N., Chevet,E., Jenna,S., Nguyen,D.T., Khatib,A.M., Marcus,V., Zhang,Y., Chretien,M., Seidah,N., and Metrakos,P. (2005). Abnormal expression and processing of the proprotein convertases PC1 and PC2 in human colorectal liver metastases. *BMC. Cancer* 5, 149.

Udupi,V., Townsend,C.M., Jr., Gomez,G., Zhang,T., and Greeley,G.H., Jr. (1995). Downregulation of prohormone convertase-1 by a phorbol ester. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 495-500.

Udupi,V., Townsend,C.M., Jr., and Greeley,G.H., Jr. (1998). Stimulation of prohormone convertase-1 mRNA expression by second messenger signaling systems. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 463-465.

Ueda,K., Lipkind,G.M., Zhou,A., Zhu,X., Kuznetsov,A., Philipson,L., Gardner,P., Zhang,C., and Steiner,D.F. (2003). Mutational analysis of predicted interactions between the catalytic and P domains of prohormone convertase 3 (PC3/PC1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 5622-5627.

Ugleholdt,R., Zhu,X., Deacon,C.F., Orskov,C., Steiner,D.F., and Holst,J.J. (2004). Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. *Endocrinology* **145**, 1349-1355.

Ulloa-Aguirre,A., Timossi,C., and Mendez,J.P. (2001). Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? I. Gonadotrophins are synthesized and released in multiple molecular forms. A matter of fact. *Hum. Reprod.* **16**, 599-604.

Van De Ven,W.J., Voorberg,J., Fontijn,R., Pannekoek,H., van den Ouweland,A.M., van Duijnhoven,H.L., Roebroek,A.J., and Siezen,R.J. (1990). Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* **14**, 265-275.

Villemure,M., Fournier,A., Gauthier,D., Rabah,N., Wilkes,B.C., and Lazure,C. (2003). Barley serine proteinase inhibitor 2-derived cyclic peptides as potent and selective inhibitors of convertases PC1/3 and furin. *Biochemistry* **42**, 9659-9668.

Villeneuve,P., Lafortune,L., Seidah,N.G., Kitabgi,P., and Beaudet,A. (2000a). Immunohistochemical evidence for the involvement of protein convertases 5A and 2 in the processing of pro-neurotensin in rat brain. *J. Comp Neurol.* **424**, 461-475.

Villeneuve,P., Seidah,N.G., and Beaudet,A. (2000b). Immunohistochemical evidence for the implication of PC1 in the processing of proneurotensin in rat brain. *Neuroreport* **11**, 3443-3447.

Vindrola,O. and Lindberg,I. (1992). Biosynthesis of the prohormone convertase mPC1 in AtT-20 cells. *Mol. Endocrinol.* **6**, 1088-1094.

Volchkov,V.E., Feldmann,H., Volchkova,V.A., and Klenk,H.D. (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 5762-5767.

Walsh, C. T. *Posttranslational Modification of Proteins: Expanding Nature's Inventory*. 2006. Colorado. USA., Roberts and Company Publishers.

Walsh,G. and Jefferis,R. (2006). Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1241-1252.

Wang,L., Ruan,B., Ruvinov,S., and Bryan,P.N. (1998). Engineering the independent folding of the subtilisin BPN' pro-domain: correlation of pro-domain stability with the rate of subtilisin folding. *Biochemistry* 37, 3165-3171.

Wang,L., Ruvinov,S., Strausberg,S., Gallagher,D.T., Gilliland,G., and Bryan,P.N. (1995). Prodomain mutations at the subtilisin interface: correlation of binding energy and the rate of catalyzed folding. *Biochemistry* 34, 15415-15420.

Wang,L., Yang,G., and Wu,X. (2004). Expression, purification and characterization of recombinant mouse PC6B from baculovirus-infected insect cells. *Protein Pept. Lett.* 11, 63-69.

Wei,S., Feng,Y., Che,F.Y., Pan,H., Mzhavia,N., Devi,L.A., McKinzie,A.A., Levin,N., Richards,W.G., and Fricker,L.D. (2004). Obesity and diabetes in transgenic mice expressing proSAAS. *J. Endocrinol.* 180, 357-368.

Wei,S., Segura,S., Vendrell,J., Aviles,F.X., Lanoue,E., Day,R., Feng,Y., and Fricker,L.D. (2002). Identification and characterization of three members of the human metallocarboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.* 277, 14954-14964.

Weiss,G.A., Watanabe,C.K., Zhong,A., Goddard,A., and Sidhu,S.S. (2000). Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8950-8954.

Whitford,M., Stewart,S., Kuzio,J., and Faulkner,P. (1989). Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67, an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 63, 1393-1399.

Wickner,R.B. (1976). Mutants of the killer plasmid of *Saccharomyces cerevisiae* dependent on chromosomal diploidy for expression and maintenance. *Genetics* 82, 273-285.

Wilkinson,C.W. (2006). Roles of acetylation and other post-translational modifications in melanocortin function and interactions with endorphins. *Peptides* 27, 453-471.

Winsky-Sommerer,R., Grouselle,D., Rougeot,C., Laurent,V., David,J.P., Delacourte,A., Dournaud,P., Seidah,N.G., Lindberg,I., Trottier,S., and Epelbaum,J. (2003). The proprotein convertase PC2 is involved in the maturation of prosomatostatin to somatostatin-14 but not in the somatostatin deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 122, 437-447.

Wong,B.S., Liu,S., Schultz,G.A., and Rancourt,D.E. (2002). Subtilisin proprotein convertase-6 expression in the mouse uterus during implantation and artificially induced decidualization. *Mol. Reprod. Dev.* 61, 453-459.

Xiang,Y., Molloy,S.S., Thomas,L., and Thomas,G. (2000). The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol. Biol. Cell* 11, 1257-1273.

Yabuta, Y., Takagi, H., Inouye, M., and Shinde, U. (2001). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone: propeptide release modulates activation precision of pro-subtilisin. *J. Biol. Chem.* 276, 44427-44434.

Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradszky, K.F., Toneff, T., Bunday, R., Miller, R., Schilling, B., Petermann, I., Dehnert, J., Logvinova, A., Goldsmith, P., Neveu, J.M., Lane, W.S., Gibson, B., Reinheckel, T., Peters, C., Bogyo, M., and Hook, V. (2003). Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 9590-9595.

Ye, Y. and Fortini, M.E. (2000). Proteolysis and developmental signal transduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 211-221.

Zachariah, C., Cameron, A., Lindberg, I., Kao, K.J., Beinfeld, M.C., and Edison, A.S. (2001). Structural studies of a neuropeptide precursor protein with an RGD proteolytic site. *Biochemistry* 40, 8790-8799.

Zarkik, S., Decroly, E., Wattiez, R., Seidah, N.G., Burny, A., and Ruyschaert, J.M. (1997). Comparative processing of bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp72 by subtilisin/kexin-like mammalian convertases. *FEBS Lett.* 406, 205-210.

Zhang, L., Li, W.H., Anthonavage, M., and Eisinger, M. (2006). Melanocortin-5 receptor: a marker of human sebocyte differentiation. *Peptides* 27, 413-420.

Zhong, M., Munzer, J.S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S.J., Decroly, E., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1999). The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity. *J. Biol. Chem.* 274, 33913-33920.

Zhou, A. and Mains, R.E. (1994). Endoproteolytic processing of proopiomelanocortin and prohormone convertases 1 and 2 in neuroendocrine cells overexpressing prohormone convertases 1 or 2. *J. Biol. Chem.* 269, 17440-17447.

Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J., and Steiner, D.F. (1998). Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 273, 11107-11114.

Zhou, A., Paquet, L., and Mains, R.E. (1995). Structural elements that direct specific processing of different mammalian subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 270, 21509-21516.

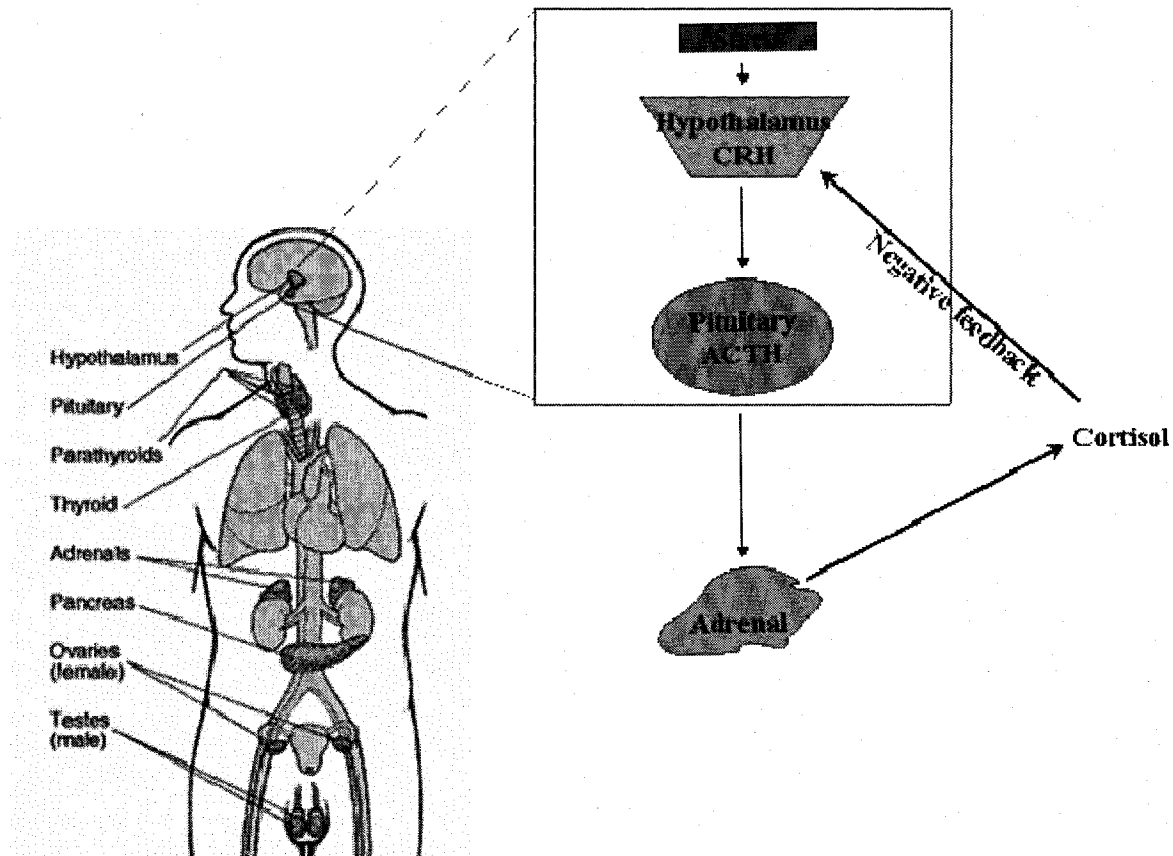
Zhou, Y. and Lindberg, I. (1993). Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J. Biol. Chem.* 268, 5615-5623.

Zhou, Y. and Lindberg, I. (1994). Enzymatic properties of carboxyl-terminally truncated prohormone convertase 1 (PC1/SPC3) and evidence for autocatalytic conversion. *J. Biol. Chem.* 269, 18408-18413.

Zhu,X., Orci,L., Carroll,R., Norrbom,C., Ravazzola,M., and Steiner,D.F. (2002a). Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lacking prohormone convertase 1/3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 10299-10304.

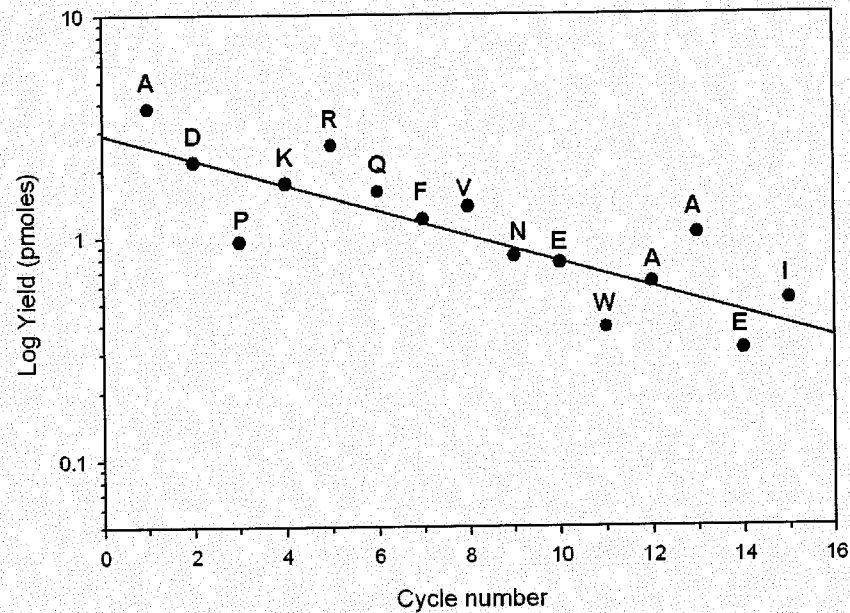
Zhu,X., Zhou,A., Dey,A., Norrbom,C., Carroll,R., Zhang,C., Laurent,V., Lindberg,I., Ugleholdt,R., Holst,J.J., and Steiner,D.F. (2002b). Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 10293-10298.

Annexe 1



L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien appelé également l'axe corticotrope joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie. Il représente les connections établies entre l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande surrénalienne. Les neurones hypophysaires produisent différentes hormones telles que l'hormone de libération corticotrope (CRH) qui va agir au niveau de l'hypophyse antérieure afin de stimuler la production d'ACTH. L'ACTH agit sur la surrénale en stimulant la production de cortisol. Le cortisol est important dans le contrôle de la glycémie, de la balance énergétique ainsi que dans les phénomènes de stress. Le cortisol agit sur l'hypothalamus en diminuant la production de CRH ce qui crée ainsi une boucle de rétro-contrôle.

Annexe 2



$$b_0 = 0.4646 \text{ (2.91 pmoles)}$$

$$b_1 = -0.0574 \text{ (87.62\%, } n = 12)$$

$$r^2 = 0.7972$$

Deduced Sequence:

Ala-Asp-Pro-Lys-Arg-Gln-Phe-Val-Asn-Glu-Trp-Ala-Ala-Glu-Ile...

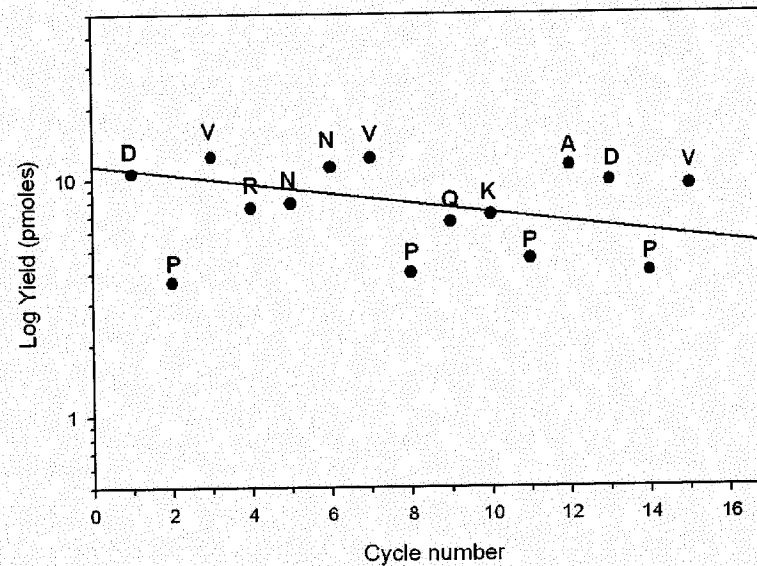
Séquençage N-terminal de la pro-PC1/3 obtenue des granules d'inclusion des cellules SF9. Voir section matériel et méthodes des chapitres II et III pour les détails expérimentaux. Les trois premiers résidus en position N-terminale correspondent à ceux présents dans la portion C-terminal du peptide signal de la protéine gp67. Il est à noter que lors de l'utilisation du peptide signal murin, des expériences similaires ont conduit à un mélange préproenzyme et proenzyme.

Annexe 3



Tricoplusia ni au dernier stade larvaire 'fifth instar'. Taille réelle 2.4cm.

Annexe 4



$b_0 = 1.0627$ (11.55 pmoles)

$b_1 = -0.0199$ (95.5%, $n = 7$)

$r^2 = 0.3127$

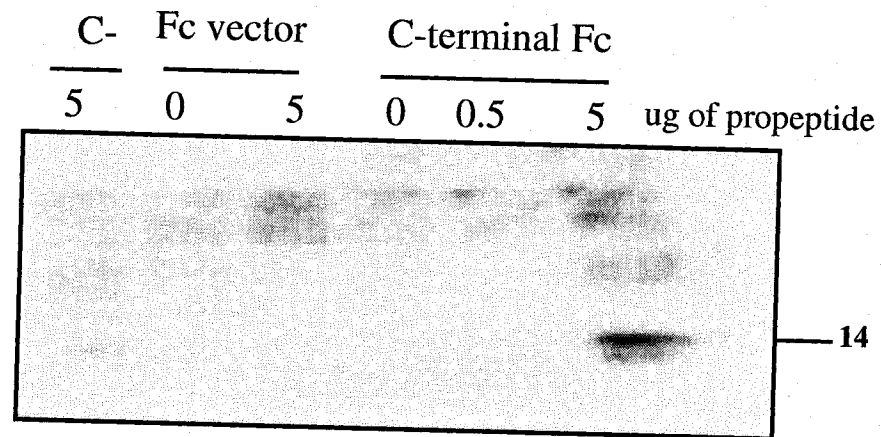
Deduced Sequence:

Asp-Pro-Val-Arg-Asn-Asn-Val-Pro-Gln-Lys-Pro-Ala-Asp-Pro-Val

Protein identified: *Trichoplusia ni* Acidic juvenile hormone-suppressible protein 1 (AJHSP1) accession P22327

Détermination de la séquence N-terminale de l'hormone juvénile acide (AJHSPI, accession P22327), qui co-purifie avec de la PC1/3 produite au niveau des larves d'insectes *Trichoplusia ni*. Voir section matériel et méthodes des chapitres II et III pour les détails expérimentaux

Annexe 5

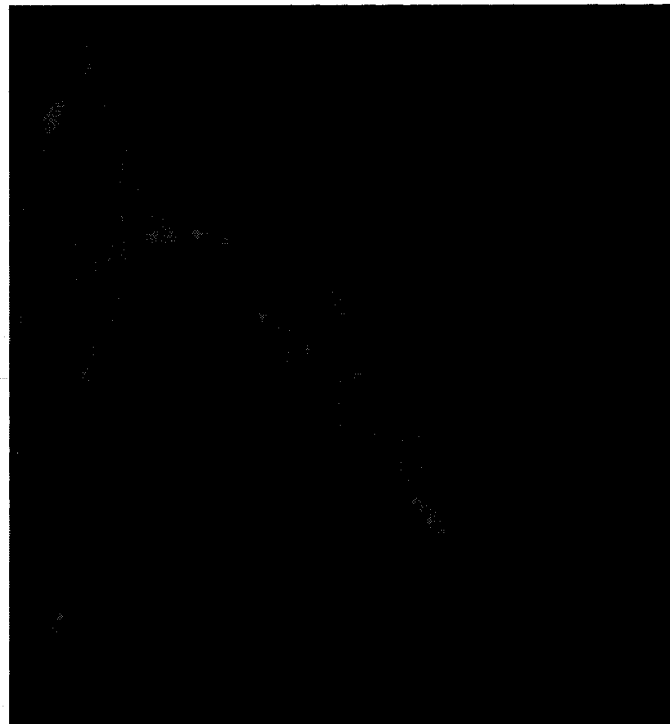


PC1/3 propeptide can be co-precipitated with the C-terminal tail. The C-terminal tail of PC1/3 (amino-acids 618-753) was expressed as a Fc-fusion protein (the construct was provided by Dr. T. Reudelhuber, IRCM) in CHO cells. Two days after transfection the medium was harvested. The PC1/3 propeptide was added in trans at 0.5 and 5ug per 2.5 ml of solution. The complex was precipitated using protein A-Sepharose, resolved on a 15% acrylamide gel and revealed using the anti-propeptide antibody by ECL detection.

Annexe 6



A. Negative control



**B. Anti-PC1/3propeptide
1:50**



**C. Anti- PC1/3propeptide
1:50
Pre-Incubated with 5µM of propeptide**

The propeptide seems to follow PC1 in the mature secretory granules. A: negative control in the absence of Propeptide antibody). B: anti-Propeptide antibody diluted 1:50. C: The antibody solution was preincubated 1 hour with 5µM PC1/3 propeptide before labelling the cells. Cells were grown on plastic slide chambers for 4 to 5 days, fixed with paraformaldehyde 4%, and permeabilised with 1X triton /goat serum solution. Propeptide antibody was used at a dilution 1:50 for an O/N period. Propeptide specific signal was revealed using a rhodamine-coupled secondary antibody.

Annexe 7



A
Anti- PC1/3propeptide 1:50



B
Anti-PC1/3propeptide 1:50
NaCl 50mM
(basal secretion)



C
Anti-PC1/3propeptide 1:50
KCl 50mM
(stimulated degranulation)

The PC1/3 propeptide is released upon stimulation in ATt20 cells. A: Without treatment. B: Cells were incubated in 50mM NaCl (basal secretion), before antibody labelling. C: Cells were incubated in 50mM KCl (stimulated degranulation), before antibody labelling . ATt20 cells were grown on plastic slide chambers for 4 to 5 days, fixed with paraformaldehyde 4%, and permeabilised with 1X triton /goat serum solution. Propeptide antibody was used at a dilution 1:50 for an O/N period. Propeptide specific signal was revealed using a rhodamine-coupled secondary antibody. The incubation in the saline solutions was done at 37°C for 30min.