

Université de Montréal

Étude de la Structure-Fonction du
Prosegment et du domaine CHRD de la
PCSK9 humaine

Par

Yascara Grisel Luna Saavedra

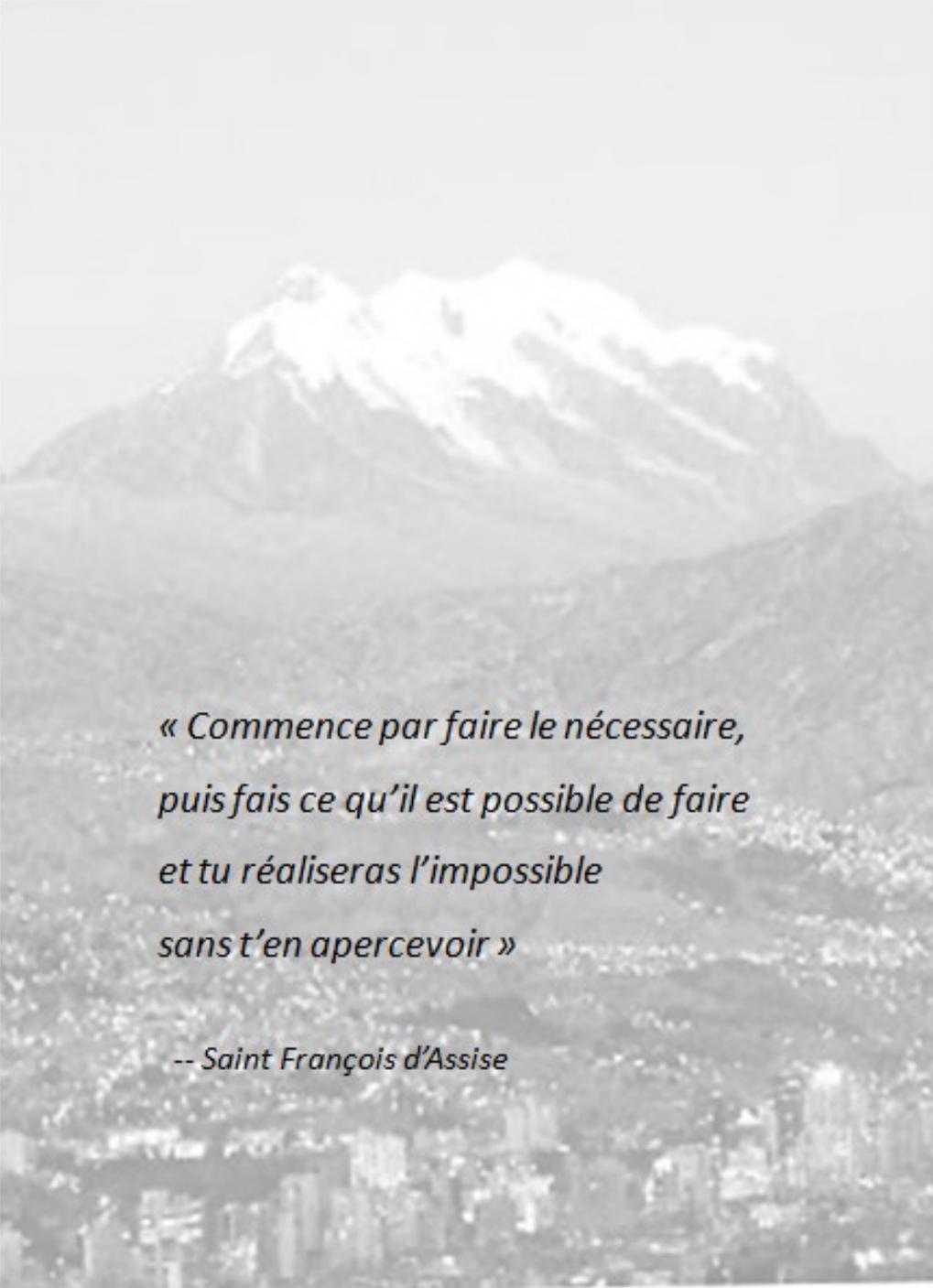
Faculté de Médecine

Département de Biochimie

Thèse présentée à la Faculté de médecine de l'Université de
Montréal en vue de l'obtention du grade de Doctorat en
Biochimie

Août 2013

© Yascara Grisel Luna Saavedra, 2013



*« Commence par faire le nécessaire,
puis fais ce qu'il est possible de faire
et tu réaliseras l'impossible
sans t'en apercevoir »*

-- Saint François d'Assise

REMERCIEMENTS

Je dédie ma thèse à ma famille à qui je dois mille mercis! Je les remercie du fond du cœur pour leur amour qui remplit ma vie de lumière et de bonheur. Merci pour leur support inconditionnel, pour tous les précieux conseils qu'ils m'ont donné et qui m'ont été d'une aide immense. Merci pour toute la patience et leur compréhension lorsqu'ils demandaient quand est-ce que je finissais la thèse et qu'à chaque fois c'était "dans pas longtemps...". Merci à ma toute chère Maria del Rosario Saavedra, ma mère, qui est un pilier dans ma vie et qui m'a appris à découvrir et à aimer la science depuis toute petite. Un jour, j'ai découvert une citation dans le journal, je l'ai découpée et collée sur mon bureau parce qu'elle m'inspirait ce que tu m'as toujours enseigné : « *La vie est un défi à relever, un bonheur à mériter, une aventure à tenter* ». Je peux te dire aujourd'hui que grâce à tes conseils, j'ai passé à travers tous les défis de cette aventure que j'ai choisi, j'ai vécu des moments incroyables de superbonheur (oui assurément! lorsque finalement! j'avais des beaux résultats après des longues semaines de travail ardu...) et que je sais maintenant qu'une aventure pareille n'aurait pas été la même sans toi près de moi. Merci à Luis Alberto Luna Aguilar, mon père, qui est mon ange au ciel. J'aurais tant aimé que tu sois encore là pour constater à quel point ta fille a suivi tes conseils, a appris de ton exemple et a su finir ce qu'elle a entrepris. Merci pour ta présence d'amour à mes côtés en tout temps. Merci à Carlos Marcelo et à Varinia, mon petit frère et ma petite sœur tant aimés. Un immense merci à mon cher époux Frédéric. Tu as été témoin des hauts et des bas durant tout mon parcours et ta confiance envers moi a toujours été inébranlable. Merci, merci, merci!

Je tiens à remercier une personne qui a inspiré et marqué ma vie scientifique. Merci Dr Francine Denizeau, vous avez été la première à avoir cru en moi en tant que biochimiste. Vous m'avez donné ce projet-innovateur et rempli des défis. Ensemble, nous les avons tous relevés et ce succès fut le fruit non seulement de notre travail mais surtout de la sincère confiance que vous m'avez accordée, cela m'a donné des ailes. Votre façon de voir les défis de la science, vos mots d'encouragement et votre reconnaissance lors du travail accompli ont maintenu la flamme et raffermi mon amour pour la science. Vous m'avez donné des bien précieux conseils et un bel exemple de femme-scientifique comme nulle autre jusqu'à date!

Le ciel a voulu vous rappeler lorsqu'on était prêtes à nous relancer dans la découverte des nouveaux défis..... Alors, malgré le chagrin de votre départ, le souvenir de votre force et de votre détermination m'ont aidé à surmonter les obstacles tout au long de mon doctorat et aujourd'hui, je veux vous rendre hommage à vous, qui avez été une excellente scientifique et une source bienfaisante d'inspiration. Votre exemple restera à jamais gravé dans ma vie.

Un merci tout spécial à Maria Blanque et à Ursula Streit qui m'ont énormément aidé et dont leur présence et leurs conseils ont été pour moi, source de bien-être et de reconfort. Merci aussi à mes amis et amies scientifiques et non-scientifiques pour m'avoir encouragée tout au long de mon aventure!

Un grand merci à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal! Merci de m'avoir accueilli. Merci à toutes les personnes qui m'ont apporté leur collaboration durant tout mon séjour. J'ai eu le plaisir de côtoyer des personnes formidables faisant partie du personnel des différents laboratoires, des services techniques, des plateformes technologiques, du service de cafétéria, du personnel de sécurité, de la bibliothèque et du service administratif. Je tiens à exprimer ma gratitude et mon appréciation au Dr Nabil G. Seidah, mon directeur de thèse et directeur du laboratoire de Biochimie Neuroendocrinienne à l'IRCM. Merci pour m'avoir accueilli et ouvert les portes de votre laboratoire ainsi que pour votre supervision du projet doctoral. J'admire votre curiosité scientifique, la richesse des vos connaissances ainsi que votre intelligence émotionnelle. Je suis reconnaissante d'avoir travaillé au sein de votre laboratoire et je remercie votre personnel qui de proche ou de loin ont collaboré aux projets de mon doctorat et qui sans eux, l'expérience n'aurait pas été la même! J'aimerais remercier tout spécialement Brigitte Mary qui non seulement fut un rayon de soleil à mes yeux mais qui m'a apporté toute sa collaboration et sa bonne humeur dans la préparation des manuscrits et tout au long de mon séjour au laboratoire. Je veux remercier aussi mes chères amies! Xiaowei Sun, Estelle Rousselet et Marilena Cojocarui qui m'ont offert leur amitié sincère et leur support tout au long de mon doctorat. Merci les filles!!! Nos aventures vont me manquer terriblement!. Je remercie aussi tous mes collègues de laboratoire qui m'ont guidé scientifiquement, apporté leur soutien, corrigé mes écrits et offert des discussions très stimulantes! Spécialement Johann, Anna, Jadwiga (Edwidge) et Annik. Merci aussi à tous les anciens et nouveaux membres du laboratoire pour nos discussions, les *lunchs*, les '*cookie – day, everyday!*' et surtout pour votre sourire et votre bonne humeur quotidienne!

En terminant, je voudrais remercier et exprimer mon appréciation aux: Dr Éric Lecuyer (Université de Montréal), Dr Jean-Philippe Gratton (Université de Montréal), Dr Stephane Laporte (Université McGill), Dr Nabil G. Seidah (directeur de thèse à l'IRCM) ainsi qu'au Dr François Dubé (représentant de la doyenne de l'Université de Montréal) pour avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci pour me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse.

RÉSUMÉ

L'excès des particules de LDL dans le sang constitue un facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires. Dans ce contexte, nous étudions la protéine PCSK9 qui favorise directement ce facteur de risque. Cette protéine est sécrétée en majorité au niveau du foie par les hépatocytes et possède la capacité de reconnaître et de lier le récepteur LDLR. Le rôle premier de ce dernier est d'éliminer les particules de LDL circulant dans le plasma. Ainsi, lorsque la PCSK9 forme un complexe avec le LDLR et l'amène à la dégradation, la conséquence directe de la diminution des ces récepteurs est une accumulation malsaine des particules LDL dans le plasma.

L'importante implication de la PCSK9 dans le métabolisme des lipides nous a menés vers des recherches de caractérisation de cette protéine ainsi que dans l'étude de son mode d'action. La PCSK9 est composée de trois domaines et notre intérêt s'est porté sur l'étude structure-fonction des deux domaines dont la fonction était inconnue, soit le domaine en N-terminal : le prodomaine et de son domaine en C-terminal : CHRDR.

Le premier article présenté dans cette thèse révèle l'importance d'une région acide (acide aminés 33-58) régulatrice de l'activité de la PCSK9 localisée en N-terminal du prodomaine ainsi que l'effet du pH acide, équivalent à celui des endosomes tardifs, qui accroît la capacité de la PCSK9 à induire la dégradation du LDLR. Le deuxième article dissèque davantage la structure de la PCSK9 et met en lumière la différence des prérequis structurels de la région "Hinge" ainsi que du module M2, composant du domaine CHRDR, dans la voie intracellulaire et la voie extracellulaire d'activité de la PCSK9. La mutation R434W localisée dans la région "Hinge" résulte dans une inhibition totale de l'activité intracellulaire de la PCSK9 tandis que son activité extracellulaire est réduite à ~70%. Contrairement, la perte du module M2 du domaine CHRDR est bien tolérée par la PCSK9 lors de son activité intracellulaire mais totalement inhibitrice pour son activité extracellulaire.

Le troisième article se distingue en présentant une nouvelle stratégie d'inhibition de l'activité de la PCSK9 en utilisant une chimère composée de la fraction Fc de l'immunoglobuline IgG1 humaine couplée avec le prodomaine de la PCSK9. La protéine

fusion Fcpro lie directement la PCSK9, crée un encombrement structurel qui résulte dans une régulation négative l'activité de la PCSK9.

En résumé, nous présentons dans cette thèse, trois manuscrits qui apportent une contribution à la connaissance des composantes structurelles de la PCSK9 et leur implication dans le rôle de la protéine en tant que régulateur négatif du LDLR.

Mots-clés : Proprotéine convertase PCSK9, CHRD, module M2, prodomaine, hypercholestérolémie, inhibiteur, région constante Fc de l'immunoglobuline, dégradation du LDLR, structure-fonction

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is one of the major risk factors leading to cardiovascular disease. In this context, we focused our study on a protein that directly influences hypercholesterolemia: PCSK9. Since 2003, the coding gene for PCSK9 has been identified as the third locus responsible for familial hypercholesterolemia (FH3). PCSK9 is a protein secreted mostly from the liver by hepatocytes and has the capacity to recognize, bind and direct to degradation the LDLR receptor. The latter is responsible for the elimination the LDL particles from the plasma. The direct consequence of the LDLR degradation induced by PCSK9 is the harmful accumulation of the bad cholesterol in the blood.

Since PCSK9 activity has undesirable consequences on lipid metabolism homeostasis, we directed our research to characterize this protein to better understand its mechanism of action. Three domains compose PCSK9 structure and we focused on the ‘‘structure-function study’’ of two domains, of which roles were still unknown: the prodomain located at the N-terminal extremity and the CHRD domain at the C-terminus of PCSK9.

The first manuscript presented in this thesis brings to light the importance of the acidic N-terminal sequence of the prosegment (amino acids 33-58) and its effect on the activity of PCSK9. It also presents a novel mechanism for fine-tuning the activity of PCSK9, which is enhanced at acidic pHs close to those of late endosomes. The second manuscript dissects further the PCSK9 structure, revealing that the structural requirements of the hinge and the M2 module located in the CHRD domain are not the same for the intracellular and extracellular pathways of PCSK9-induced LDLR degradation. Although the R434W natural mutation in the hinge region is absolutely deleterious for the intracellular activity of PCSK9, it reduces by ~70% the extracellular one. In contrast, the loss of M2 module of the CHRD domain is tolerated for the intracellular activity of PCSK9 but not for the extracellular one.

The third manuscript demonstrates for the first time that a chimera containing the prosegment (Fcpro) directly binds PCSK9 and effectively acts as a negative regulator (inhibitor) of its ability to induce LDLR degradation. Our work presents a new strategy

to develop such inhibitors by interfering with the structure of PCSK9 and exploiting the properties of the PCSK9 prosegment and the advantage of its fusion to a humanized Fc of IgG1.

In summary, the present research data sheds new light on the functional contribution of the prodomain and the CHR domain of PCSK9.

Keywords: Proprotein convertase PCSK9, CHR, M2 module, prodomain, hypercholesterolemia, inhibitor, constant region Fc of immunoglobulin, LDLR degradation, structure-function

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	i
<i>RÉSUMÉ</i>	iv
<i>ABSTRACT</i>	vi
<i>Liste des tableaux</i>	xi
<i>Liste des Figures</i>	xii
CHAPITRE I	1
INTRODUCTION	1
1.1 Problématique: L'hypercholestérolémie	3
1.2 Description génétique de la maladie	4
1.3 Cholestérol.....	6
1.3.1 Structure	6
1.3.2 Apport endogène de cholestérol (Biosynthèse).....	6
1.3.3 Régulation de la biosynthèse du cholestérol	7
1.3.4 Apport exogène de cholestérol	11
1.3.5 Absorption du cholestérol exogène	11
1.4 Métabolisme des lipoprotéines	13
1.4.1 Les lipoprotéines	13
1.5 Régulation du métabolisme des lipides	18
1.5.1 Voie exogène	18
1.5.2 Voie endogène	20
1.5.3 Voie inverse.....	22
1.6 Récepteur des LDL (LDLR).....	24
1.6.1 Famille des LDLR	24
1.6.2 Structure du gène.....	25

1.6.3	Organisation des domaines du LDLR	26
1.6.4	Mécanisme d'action du LDLR envers le LDL.....	27
1.6.5	Régulation du LDLR	30
1.7	PCSK9.....	31
1.7.1	PCSK9 membre de la famille de proprotéines convertases	31
	Gène de la PCSK9	33
1.7.2	Maturation de la PCSK9.....	37
1.7.3	Distribution tissulaire de la PCSK9.....	40
1.7.4	Phylogénie de la PCSK9	44
1.7.5	Structure de la PCSK9.....	47
1.7.6	Rôle de la PCSK9 dans la régulation du LDLR.....	54
1.7.7	Régulation extracellulaire du LDLR par la PCSK9	54
1.7.8	Régulation intracellulaire du LDLR par la PCSK9	61
1.8	Autres ligands de la PCSK9	63
1.8.1	Régulation du VLDLR et de l'ApoER2 par la PCSK9	63
1.8.2	Liaison de la PCSK9 à l'annexine A2.....	64
1.8.3	Régulation du récepteur CD81 par la PCSK9	65
1.8.4	Régulation de BACE1 par la PCSK9.....	65
1.8.5	Régulation du canal sodique épithélial ENaC par la PCSK9.....	66
1.9	Mutations naturelles de la PCSK9.....	67
1.10	Traitements de l'hypercholestérolémie	73
1.10.1	Traitement par la régulation de la production de cholestérol.....	73
1.10.2	Traitement par la régulation de la PCSK9.....	76
1.11	Objectifs de la thèse	78

CHAPITRE II	81
<i>Article no.1</i>	81
<i>AVANT-PROPOS</i>	83
Manuscrit 1	85
<i>Discussion</i>	111
CHAPITRE III	123
<i>Article no.2</i>	125
<i>AVANT-PROPOS</i>	127
Manuscrit 2	129
<i>DISCUSSION</i>	151
CHAPITRE IV	165
<i>Article no.3</i>	167
<i>AVANT-PROPOS</i>	169
Manuscrit 3	171
<i>DISCUSSION</i>	187
CHAPITRE V	197
<i>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</i>	199
BIBLIOGRAPHIE	205

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I:	Classification des dyslipidémies monogéniques	5
Tableau II :	Composition des lipoprotéines plasmatiques	13
Tableau III :	Propriétés et fonctions des apoprotéines	14
Tableau IV :	Différents types de statines commercialisées et leur origine	74
Tableau V :	Développement des différents inhibiteurs de la PCSK9 par diverses compagnies pharmaceutiques	77

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma des structures moléculaires du stérol (a) et du cholestérol (b)	6
Figure 2 : Biosynthèse du cholestérol	7
Figure 3 : Régulation des enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol par SREBP1 (a, c) et SREBP2	8
Figure 4 : Activation des SREBPs	10
Figure 5 : Caractéristiques physiques des lipoprotéines	15
Figure 6 : Voie exogène de régulation des lipides	19
Figure 7 : Voie endogène de régulation des lipides	21
Figure 8 : Voie inverse des lipides	23
Figure 9 : Membres de la famille des LDLR	24
Figure 10 : Structure des domaines du récepteur des LDL (LDLR) et leur relation avec l'organisation avec les exons du gène	25
Figure 11 : Organisation en domaines du LDLR	26
Figure 12 : Changement de conformation du LDLR de pH neutre à pH acide	28
Figure 13 : Dendrogramme de la famille des proprotéines convertases (PCs) selon l'homologie des séquences du site catalytique	32
Figure 14 : Position du gène codant pour la PCSK9 sur le chromosome 1	33
Figure 15 : Relation entre l'organisation des exons du gène de la PCSK9 et de ses domaines	33
Figure 16 : Maturation et modifications post-traductionnelles de la PCSK9 dans la voie sécrétoire	39
Figure 17 : Hybridation <i>in situ</i> d'une ribo-sonde de PCSK9 sur une souris au jour 1 et post-natal (P1)	40
Figure 18 : Hybridation <i>in situ</i> d'une ribo-sonde de PCSK9 sur une Souris à plusieurs stades de son développement	40
Figure 19 : Analyse de l'expression de l'ARNm de la PCSK9 dans différents tissus de souris adulte par Q-PCR	41

Figure 20 : Modèle d'expression du gène codant pour la PCSK9 dans différents tissus humains (<i>Projet Illumina Human Body</i>)	42
Figure 21 : Analyse par Q-PCR des différentes lignées cellulaires humaines	43
Figure 22 : Arbre phylogénétique du monde vivant	44
Figure 23 : Schéma de l'arbre phylogénétique de la PCSK9 démontrant la comparaison des séquences du gène codant pour la PCSK9 entre les espèces	45
Figure 24 : Schéma d'un arbre taxonomique évoquant l'évolution du gène codant pour la PCSK9	46
Figure 25 : Domaines composant la structure des proprotéines convertases	47
Figure 26 : Visualisation de la structure moléculaire de la PCSK9 cristallisée à pH 8.5 et à une résolution de 1.98 Å	48
Figure 27 : Visualisation de la structure moléculaire de la PCSK9 cristallisée à pH 7.8 et à une résolution de 2.3 Å	48
Figure 28 : Superposition des structures tridimensionnelles des prosegments de la PCSK9	49
Figure 29 : Structure modulaire du domaine CHRD de la protéine PCSK9	51
Figure 30 : Cavité tapissée de résidus histidines dans le domaine CHRD de la PCSK9	52
Figure 31 : Similarité de repliement tridimensionnel entre la partie C-terminale d'un trimère de la résistine et le domaine CHRD de la PCSK9	53
Figure 32 : Cycle de recyclage du LDLR	54
Figure 33 : Liaison directe du domaine catalytique	55
Figure 34 : Visualisation des différences de liaison entre le domaine catalytique de la PCSK9 avec le domaine EGF-A du LDLR	59
Figure 35 : Effet extracellulaire de l'action de la PCSK9 sur le LDLR liaison, internalisation et dégradation du complexe	60
Figure 36 : Effet intracellulaire de l'action de la PCSK9 sur le LDLR	61

Figure 37 : Pays de provenance des individus possédant des mutations naturelles sur le gène de la PCSK9	67
Figure 38 : Mutations naturelles de la PCSK9	68
Figure 39 : Mutations naturelles de la PCSK9. Histogramme montrant le nombre de mutations affectant chaque domaine structurel de la PCSK9	69
Figure 40 : Mutations naturelles répertoriées GOF ou LOF de la PCSK9 selon les niveaux de LDL-C mesurés dans les sérums des patients	70
Figure 41 : Effet inhibiteur des statines sur l'action de l'enzyme HMG-CoA reductase	73
Figure 42 : Schéma de la protéine protéines tronquées en N-terminal du prodomaine de la PCSK9 humaine	114
Figure 43: Échange de la région acide en N-terminal du prodomaine de la PCSK9 avec celle de la protéine GPIHBP1	117
Figure 44: Alignement de séquences du prodomaine de la PCSK9 de différentes espèces	118
Figure 45: Régions régulatrices hypothétiques dans la structure du prodomaine de la PCSK9	119
Figure 46: Schéma de la structure moléculaire de la PCSK9 produite en milieu acide (PDB 3BPS)	120
Figure 47: Schéma de la PCSK9 détaillant les modules M1, M2 et M3 composant le domaine CHRD	151
Figure 48: Mobilité du module M2 du domaine CHRD en fonction du pH (PDB : 2PMW; 3BPS)	155
Figure 49: Mutations naturelles du module M2 du domaine CHRD de la PCSK9	156
Figure 50: Région formant une "cavité" tapissée des résidus histidine dans le module M2 du CHRD de la PCSK9	157

Figure 51: Localisation de l'insertion des double-mutants générés pour l'étude de l'effet de la charge sur la boucle exposée du module M2 ...	159
Figure 52: Expression et sécrétion des double-mutants transfectés dans des cellules HEK293	159
Figure 53: Structure des domaines de la PCSK9. En rouge la région "Hinge"	161
Figure 54: Mutation naturelle R434W dans la région Hinge de la PCSK9	162
Figure 55: Domaines d'interaction entre la PCSK9 et le LDLR (PDB 3P5B)	192
Figure 56: Focus sur le site d'interaction entre le prodomaine et le B-propeller	193
Figure 57: Schéma récapitulatif de l'étude structure-fonction de la PCSK9.....	203

Liste d'abréviations

A2: Annexine A2

aa: Amino acid

ABCA1: ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1

ABCG5: ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5

ABCG8: ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8

ADH: Autosomal dominant hypercholesterolemia

Apo: Apolipoprotéine

ApoER2: Apolipoprotein E receptor type 2

ARH: Autosomal recessive hypercholesterolemia

ARH: Autosomal recessive hypercholesterolemia adaptor protein

ARNm: Acide ribonucléique, messenger

ATP: Adenosine triphosphate

BACE1: Bêta-sécrétase 1

bHLH zip: Basic-helix-loop-helix-leucine zipper

BIR3: Répétition 3 du baculovirus IAP

CAT: Domaine catalytique

CDCA: Chenodeoxycholic acid

CE: Cholestérol esterifié

CETP: Cholesteryl ester transfer protein

CGN: Cervelet granulaire

Chol: Cholesterol

CHRD: Cysteine-histidine rich domain

CL: Cholestérol libre

CM: Chylomicrons

COP II: Coat protein complex

CV: Column volume

CYP51: Sterol 14 alpha-demethylase

DHCR: 24-dehydrocholesterol reductase

DiI: 3,3'-dioctadecylindocarbocyanine iodide

DPBS : Dulbecco's phosphate-buffered saline

ECD: Extracellular domain

ECL : Enhanced chemiluminescence

EGF: Epidermal growth factor

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

ENaC: Epithelial sodium channel

ER: Endoplasmic reticulum

FA: Fenofibric acid

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

Fc: Fragment crystallizable region

FFA: Free fatty acids

FH : Familial hypercholesterolemia

FPP: farnesyl diphosphate

FRET: Fluorescence resonance energy transfer

FXR: Farnesoid X receptor

GOF: Gain of function

GPAT: Glycerol-3-phosphate acyltransferase

GPIHBP1: Glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1

GPP: Geranyl diphosphate

H : Hinge

HAT: Histone acetyltransferase

HDL: High density lipoprotein

HINFP: Histone nuclear factor P

HL : Hepatic lipase

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A

HNF1alpha: Hepatocyte nuclear factor 1 alpha

hZIP4 : Human zinc transporter, member 4

IDL: Intermediary density lipoprotein

IgG1 : Immunoglobulin G1

Insig-1 : Insulin-induced gene 1

Insig-2: Insulin-induced gene 2

IPP: Isopentenyl diphosphate

JAG1: Jagged 1

LCAT: Lecithin-cholesterol acyltransferase

LCAT: Lecithin-cholesterol acyltransferase

LDL: Low density lipoprotein

LDL-c : Low density lipoprotein cholesterol

LDLR : Low density lipoprotein receptor

LIPA: Lipase A

LOF: Loss of function

Lp(a): Lipoprotein (a)

LPL: Lipoprotein lipase

LRP: Low density lipoprotein receptor-related protein 1

M1: Module 1 du CHR1

M2: Module 2 du CHR1

M3: module 3 du CHR1

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MBTPS1: Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1

MTP : Microsomal triglyceride transfer protein

NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NARC-1: Neural apoptosis-regulated convertase 1

NPAT: Nuclear protein of the ataxia telangectasia mutated locus

NPCL1: Niemann-Pick C1-like 1 protein

PACE4 : Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6

PBS : Phosphate buffered saline

PCs: proprotéines convertases

PCSK9 : Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

PGNase F: N-linked-glycopeptide-(N-acetyl-beta-D-glucosaminy)-L-asparagine
amidohydrolase

PL: Phospholipides

PPAR: Peroxisome proliferator activated receptor

Pro: Prodomain, prosegment, prorégion

PTB: Phosphotyrosine-binding domain

PVDF : Polyvinylidene difluoride

S1P-1: Site 1 Protease

SCAP: SREBP cleavage activating protein

SIP-2: Site 2 Protease

SKI-1: Pyrolysin-like subtilisin kexin isozyme

SP: Signal peptide

SP1: Specificity Protein 1

SR-BI: Scavenger receptor class B member I

SRE: Sterol regulatory element

SREBF-1: Sterol regulatory element binding transcription factor 1

SREBF-2: Sterol regulatory element binding transcription factor 2

SREBP: Sterol regulatory element-binding proteins

SSD: Sterol-sensing domain

SUMO-1: Small ubiquitin-like modifier proteins

TG: Triglycerides

TRRAP: Transformation/transactivation domain associated protein

UTR: Untranslated region

VLDL: Very low density lipoprotein

WT : Wild type

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1.1 PROBLÉMATIQUE: L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE

La problématique dans laquelle s'insère mon projet de recherche est l'hypercholestérolémie. Elle correspond à un état de dysfonctionnement de l'organisme caractérisé par un taux élevé de cholestérol plasmatique.

L'hypercholestérolémie ou cholestérolémie élevée n'est pas considérée comme une maladie en soi mais plutôt comme un trouble métabolique.

En termes de santé publique, l'hypercholestérolémie constitue un des facteurs de risque majeur contribuant au développement des maladies cardiovasculaires. En effet, un individu ayant un taux plasmatique élevé en cholestérol sera à risque de développer de l'athérosclérose qui entraînera de l'hypertension artérielle et qui à son tour, augmentera l'incidence d'accidents vasculaires-cérébraux ainsi que des crises cardiaques. L'agence de santé publique du Canada stipule que les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de décès chez les Canadiens à l'âge adulte. Selon le dernier rapport de Statistique Canada émis en 2012, 17,1% des Canadiens de 12 ans et plus ont déclaré faire de l'hypertension artérielle. Un rapport précédent démontrait déjà que plus de 40% des Canadiens âgés de 20 à 79 ans avaient un taux de cholestérol total nuisible à leur santé. Ainsi, la population canadienne fait face à une problématique de santé concrète et dangereuse qui est non seulement présente au Canada, mais qui affecte un nombre croissant d'individus à travers le monde.

De façon générale, les maladies cardiovasculaires peuvent être évitées avec des habitudes de vie saines. Cependant, lorsque ces maladies sont d'origine héréditaire, elles doivent être traitées. Le meilleur moyen de prévenir ces maladies est de contrôler les facteurs de risque comme l'hypercholestérolémie.

Un grand nombre d'efforts ont été déployés en recherche scientifique pour contrôler et traiter cette affection. La recherche en milieu privé et académique s'investit grandement sur des projets qui touchent le champ d'activité des maladies cardiovasculaires comme par exemple le projet qui est présenté dans cette thèse. Globalement, ils ont pour objectif d'éliminer les accidents vasculaires, soit cardiaques ou cérébraux, et d'améliorer la qualité de vie de milliers d'individus souffrant de ces problèmes de santé.

1.2 DESCRIPTION GÉNÉTIQUE DE LA MALADIE

Une anomalie sévère du taux de lipides dans le sang se nomme une dyslipidémie. Ce taux varie entre individus et ceci s'explique en grande partie par des facteurs génétiques. Les données d'épidémiologie génétique montrent que les formes extrêmes de dyslipidémies sont le plus souvent d'origine *monogénique*. Toutefois, des mutations de plusieurs gènes peuvent aussi conduire au même phénotype de dyslipidémie (maladies à *hétérogénéité génétique*). Il y a aussi des formes fréquentes et modérées de cette anomalie qui résultent de l'interaction entre un environnement donné et des variations de séquence sur plusieurs gènes (maladies *oligo-polygéniques*).

Le tableau I présente les formes des dyslipidémies monogéniques. Celles-ci surviennent lorsqu'un gène codant pour une étape clé du métabolisme lipidique est muté. Cette mutation peut affecter la synthèse des lipides, la synthèse des apoprotéines, leur assemblage, la sécrétion, le transport dans le plasma, la maturation et la capture des lipides.

Ainsi, dépendamment du gène touché par une mutation, la dyslipidémie peut prendre différentes formes. Nous nous concentrerons sur la forme d'hypercholestérolémie autosomale dominante (ADH, *autosomal dominant hypercholesterolemia*). Cette forme d'hypercholestérolémie est héréditaire (FH, *familiar hypercholesterolemia*). Elle se transmet génétiquement de façon dite "autosomale dominante" puisqu'il suffit d'un gène muté sur un seul allèle, porté sur un chromosome non-sexuel, pour que la maladie s'exprime. Celle-ci se manifeste par une accumulation excessive de LDL-cholestérol (LDL-c) dans le plasma, soit de 2 à 3 fois le niveau de référence d'un individu sain.

L'étiologie de l'hypercholestérolémie familiale (FH) est bien établie. Trois locus ont été clairement identifiés et documentés, soit le locus 1 (FH1) au gène codant pour le LDLR (récepteur des LDL-c), le locus 2 (FH2) au gène codant pour l'APOB et le locus 3 (FH3) au gène codant pour la PCSK9. Récemment, une publication (Marduel et al., 2012) a révélé que des mutations au gène codant pour l'APOE ont aussi été associées à l'hypercholestérolémie familiale autosomale dominante donnant lieu à l'identification d'un 4^e locus (FH4) pour cette maladie.

Tableau I : Classification des dyslipidémies monogéniques

Dyslipidémie	Gène affecté	Maladie résultante
1) Excès de LDL-cholestérol	<i>LDLR</i>	Hypercholestérolémie familiale autosomale codominante (FH1)
	<i>APOB</i>	Hypercholestérolémie familiale autosomale dominante (FH2)
	<i>PCSK9</i>	Hypercholestérolémie familiale autosomale dominante (FH3)
	<i>APOE</i>	Hypercholestérolémie familiale autosomale dominante (FH4)
	<i>ARH</i>	Hypercholestérolémie familiale autosomale récessive
	<i>JAG1</i>	Syndrome d'Alagille, autosomale dominante
	<i>LIPA</i>	Surcharge de cholestéryl ester (Maladie de Wolman), autosomale récessive
2) LDL-cholestérol bas	<i>APOB</i>	Hypobétalipoprotéïnémie
	<i>PCSK9</i>	Hypocholestérolémie
	<i>MTP</i>	Abétalipoprotéïnémie
3) Hyperchylomicronémie	<i>APOC-II</i>	Déficiencia en ApoC-II
	<i>LPL</i>	Déficiencia en LPL
4) HDL-cholestérol bas	<i>APOA1</i>	Analphalipoprotéïnémie
	<i>LCAT</i>	Maladie <i>Fish-eye</i> , déficiencia en LCAT
	<i>ABCA1</i>	Maladie de Tangier
5) Excès de HDL-cholestérol	<i>CETP</i>	Déficiencia en CETP
	<i>HL</i>	Déficiencia en lipase hépatique
6) Maladie des remnants	<i>APOE</i>	Dysbétalipoprotéïnémie
	<i>HL</i>	Déficiencia en lipase hépatique
7) Excès en Lp(a)	<i>APO(a)</i>	Hyper-Lp(a)-lipoprotéïnémie
8) Sitostérolémie	<i>ABCG5</i>	Sitostérolémie
	<i>ABCG8</i>	Sitostérolémie

Abréviations : *ABCA1*: *ATP-binding cassette*, sous-famille A, membre 1; *ABCG5*: *ATP-binding cassette*, sous-famille G, membre 5; *ABCG8* : *ATP-binding cassette sous-famille G, membre 8*; *JAG1* : *Jagged 1*; *MPT*: *microsomal triglycerides transfer protein*; *HL*: *Hepatic lipase*; *LIPA* : *lipase A lysosomal acid cholesterol esterase*. LPL: lipoprotéine lipase. Tableau inspiré de réf. (Dufour and Davignon, 2007; Mooser and Darioli, 2002)

1.3 CHOLESTÉROL

Le cholestérol est une molécule organique essentielle pour des nombreux processus biochimiques dans l'organisme. Il est vital pour la fonction cellulaire, il est le précurseur de la synthèse des hormones stéroïdes et constitue une substance primordiale pour le maintien de l'intégrité cellulaire (Grundy, 1978). Cependant, lorsque son taux plasmatique est trop élevé, le cholestérol devient néfaste pour la santé.

1.3.1 STRUCTURE

Le cholestérol est un lipide et fait partie de la famille des stérols. Sa structure de base est un noyau stérol qui est composé de quatre cycles de carbone et une fonction hydroxyle en C3. Les stérols sont aussi appelés stéroïdes alcools puisqu'ils font partie de la classe des stéroïdes.

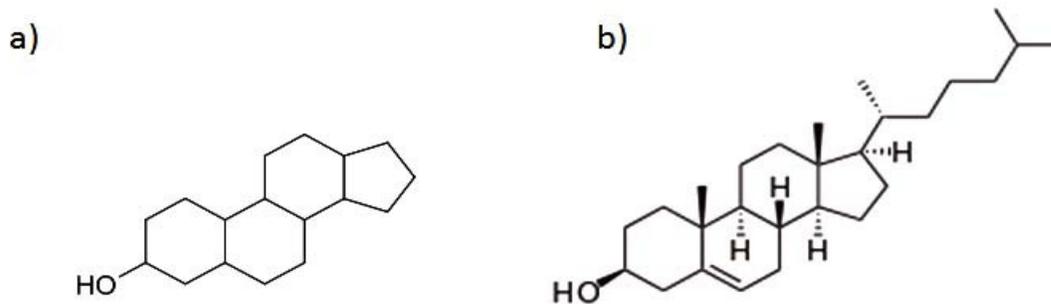


Figure 1 : Schéma des structures moléculaires du stérol (a) et du cholestérol (b).

Le cholestérol présent dans l'organisme provient essentiellement de deux sources, soit d'une source endogène (synthèse de novo dans le foie et les tissus périphériques) ou soit d'une source exogène (diète).

1.3.2 APPORT ENDOGÈNE DE CHOLESTÉROL (BIOSYNTHÈSE)

Le cholestérol est présent sous forme estérifiée dans la plupart des tissus. Sa synthèse se fait dans le cytosol des cellules et tout particulièrement dans celles du foie et de l'intestin. Chez l'humain, les besoins de l'organisme en cholestérol sont d'environ 1.2 g à 1.5 g par jour et le foie humain en sécrète la quantité majoritaire qui est d'environ 1 g par jour, la balance sera donc complétée par un apport exogène. L'apport endogène se fait par la synthèse *de novo* (Figure 2, biosynthèse du cholestérol, (Bloch, 1964)) et par le

recyclage du cholestérol biliaire. La dégradation du cholestérol se fait dans le foie par les acides biliaires et son élimination se fait par les voies biliaires vers l'intestin.

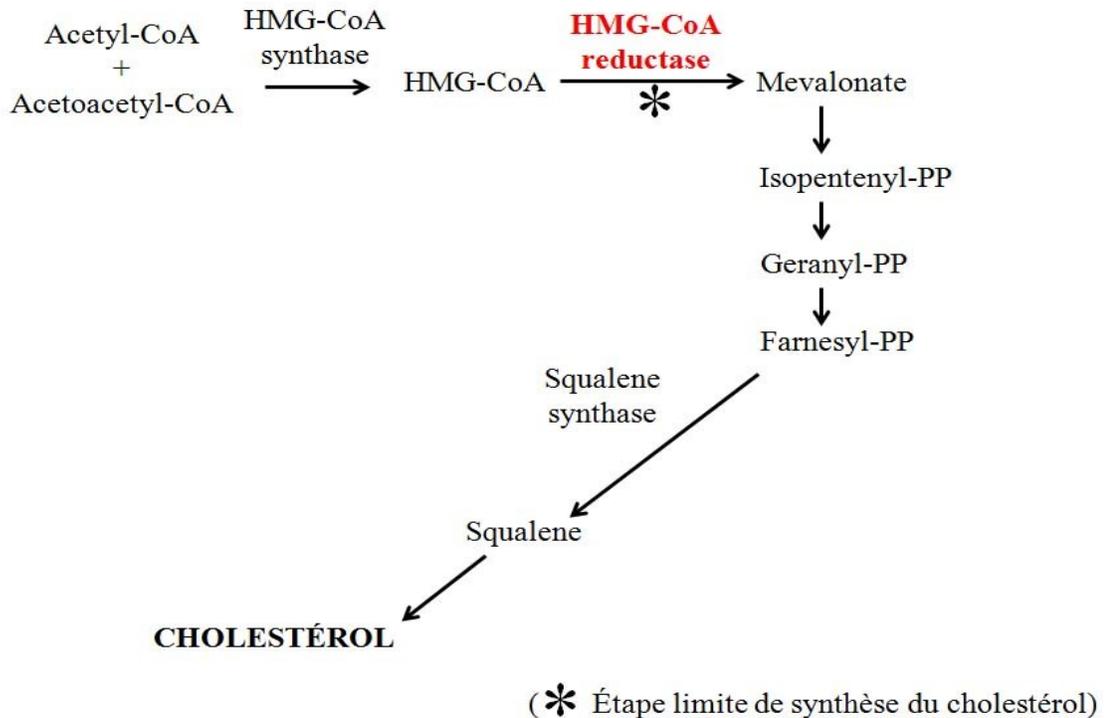


Figure 2 : Biosynthèse du cholestérol

1.3.3 RÉGULATION DE LA BIOSYNTHÈSE DU CHOLESTÉROL

La biosynthèse du cholestérol est autorégulée et fait intervenir, les *sterol regulatory element-binding proteins* ou SREBPs. Ce sont des facteurs de transcription qui régulent l'homéostasie des lipides en contrôlant l'expression de plus de 30 gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse lipidique (Eberlé et al., 2004). Trois membres de la famille des SREBPs ont été identifiés chez les mammifères. Les trois isoformes régulatrices sont SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2. Chaque isoforme a la capacité d'activer des gènes et leur spécificité de transactivation génique peut même se superposer. Cependant, plusieurs études dénotent que les isoformes possèdent des préférences au niveau de leurs rôles dans le processus de régulation lipidique. Par exemple, SREBP-1a et SREBP-1c dérivent du même gène, *SREBF-1*, situé sur le chromosome humain 17p11.2 et sont davantage impliqués dans la lipogenèse et dans la

synthèse hépatique des acides gras. Tandis que SREBP-2 dérive d'un autre gène, *SREBF-2*, situé sur le chromosome humain 22q13 et a été identifié comme ayant une activité de régulation des gènes impliqués plus spécifiquement dans l'homéostasie du cholestérol (Eberlé et al., 2004; Horton, 2002; Schoonjans et al., 2000)

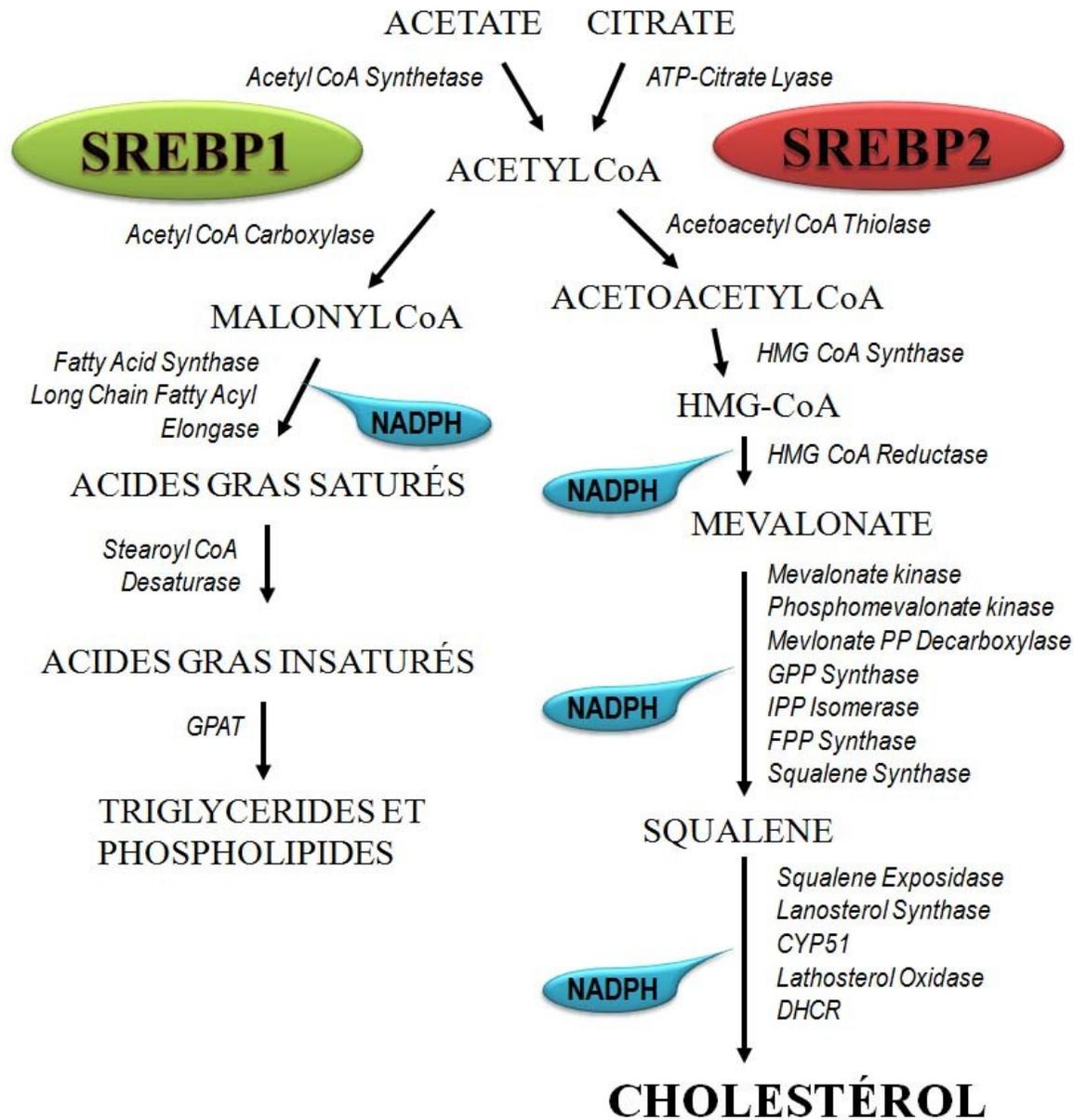


Figure 3 : Régulation des enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol par SREBP1 (a, c) et SREBP2. (En *italique*, les enzymes régulées par les facteurs de transcription SREBP1 ou SREBP2).

Les SREBPs appartiennent à la famille de facteurs de transcription bHLH-Zip (*basic-helix-loop-helix-leucine zipper*) et peuvent être régulés à trois niveaux : (1) transcription (ex : SREPB-1c par l'insuline), (2) clivage protéolytique du précurseur inactif (ex : SREBP-1c et SREBP-2), et (3) modification post-traductionnelle des nSREBPs (*nuclear sterol regulatory element binding proteins*).

Lorsque les ARNm des SREBPs sont traduits, ils entrent en association avec la protéine SCAP (*SREBP cleavage activating protein*). Celle-ci guide le complexe jusqu'à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) où elle liera les stérols par l'intermédiaire de son domaine SSD (*sterol-sensing domain*). Cette liaison provoquera un changement de conformation de SCAP qui entrainera sa liaison avec Insigs (*Insulin-induced gene proteins, Insig-1 and Insig-2*), une protéine résidente du réticulum endoplasmique. Le complexe ainsi formé du précurseur SREBPs, de SCAP et d'Insigs reste donc inactif et fixé à la membrane du réticulum endoplasmique (Eberlé et al., 2004; Goldstein et al., 2006; Sun et al., 2005). Tant que les cellules auront du cholestérol en abondance, ce complexe sera stable. Cependant, lorsque les cellules sont privées de stérols, SCAP-SREBPs se dissocient de Insig qui sera ubiquitiné et dégradé dans le protéasome. Le complexe SCAP-SREBP ainsi libéré liera les protéines transporteurs COP II et sera transloqué vers l'appareil de Golgi où deux protéases SKI-1/S1P et S2P (*Site 1 protease, Site 2 protease*) cliveront le précurseur SREBPs de façon séquentielle libérant la partie active nSREBPs (forme nucléaire) dans le cytoplasme de la cellule. Cette forme active migrera jusqu'au noyau, se fixera sur l'ADN et initiera la transcription des gènes impliqués dans la régulation des lipides (Eberlé et al., 2004; Goldstein et al., 2006; Horton, 2002; Sokolov and Radhakrishnan, 2010; Sun et al., 2005).

Au niveau du noyau, l'activité transcriptionnelle des SREBPs actifs (nSREBPs) peut être régulée par l'intervention des modifications covalentes ou par l'interaction avec d'autres protéines (Eberlé et al., 2004; Kim et al., 1998). Ainsi, une phosphorylation par les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) peut activer l'activité de transcription tandis qu'une sumoylation par une SUMO-1 (*Small Ubiquitin-like Modifier proteins*) peut la réprimer et le tout sans affecter la stabilité de la protéine. Contrairement, l'interaction avec un activateur transcriptionnel tel que le p300 résulte en une acétylation des nSREBPs qui aura comme conséquence d'accroître la stabilité des facteurs de transcription et par ce fait augmenter leur action (Eberlé et al., 2004).

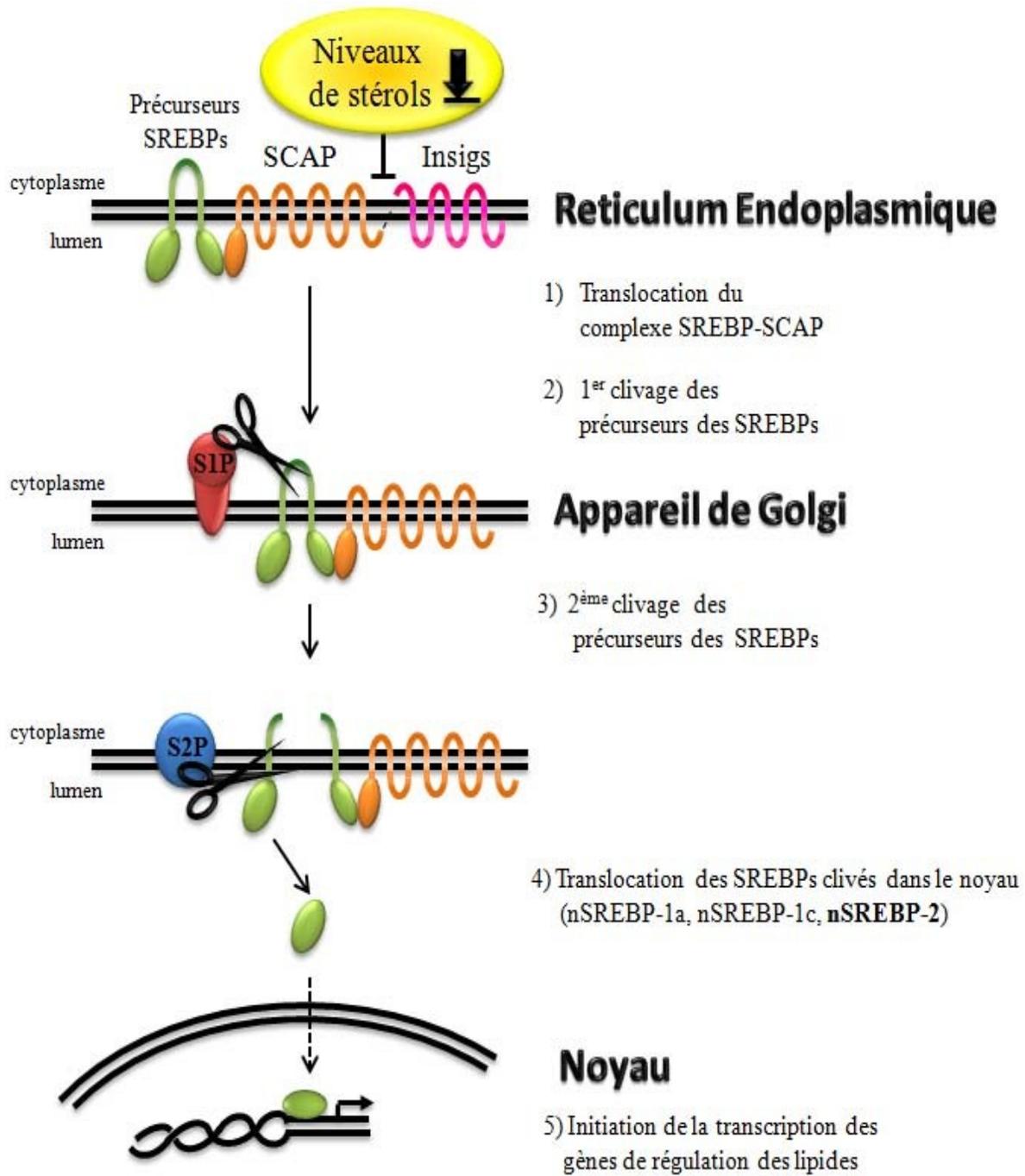


Figure 4 : Activation des SREBPs. (Schéma adapté d'Eberlé et al. 2004)

1.3.4 APPORT EXOGÈNE DE CHOLESTÉROL

L'alimentation est la source de l'apport de cholestérol exogène. Ainsi chez l'humain l'ingestion de nourriture lui apporte environ 400 mg de cholestérol par jour. Toutefois, seulement 50% de celui-ci sera absorbé au niveau de l'intestin et le restant sera excrété dans les fèces (Iqbal and Hussain, 2009).

Afin d'être absorbé, le cholestérol doit être sous forme de cholestérol libre. La diète est composée d'environ 85% de stérols libres et le reste c'est du cholestérol estérifié non-assimilable. Ce dernier doit être hydrolysé afin de libérer le cholestérol libre pour son absorption. L'absorption intestinale du cholestérol est un processus à plusieurs étapes : (1) solubilisation en micelles; (2) transport à travers la membrane plasmique des entérocytes; et (3) formation des chylomicrons pour la sécrétion dans la lymphe et le sang (Betters and Yu, 2010; Iqbal and Hussain, 2009).

1.3.5 ABSORPTION DU CHOLESTÉROL EXOGÈNE

Plusieurs mécanismes sont utilisés par l'organisme afin d'absorber et de transporter les lipides d'origine alimentaire. Les sites principaux d'absorption des lipides dans l'intestin se trouvent dans la section du duodénum et du jéjunum, plus spécifiquement à la surface en brosse des entérocytes. Parmi les principales protéines impliquées dans le processus d'absorption, il y a la protéine NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1 protein*) ainsi que les protéines ABCG5 et ABCG8 (*ATP-binding cassette subfamily G member 5 and 8*) (Iqbal and Hussain, 2009).

NPC1L1 est une glycoprotéine transmembranaire responsable de capter et de transporter le cholestérol. Elle est exprimée surtout au niveau du foie et de l'intestin (Huff et al., 2006; Wang and Song, 2012). La localisation cellulaire de cette glycoprotéine est régulée par les niveaux de cholestérol intracellulaires. Ainsi, une baisse de cholestérol va induire la translocation de la NPC1L1 à la surface de la cellule. Au niveau de la membrane plasmique des entérocytes, elle captera le cholestérol libre, s'invaginera dans des endosomes qui migreront vers le milieu intracellulaire et amènera ainsi le cholestérol dans des vésicules cytosoliques pour les besoins de la cellule. Elle participera ainsi à l'absorption du cholestérol dans la cellule uniquement quand celle-ci en aura besoin. Dans le cas contraire, où les niveaux de cholestérol seraient élevés dans

la cellule, la NPC1L1 restera surtout dans les vésicules cytosoliques en attendant un signal de translocation (Jia et al., 2011; Kwon et al., 2011; Wang and Song, 2012).

ABCG5 et ABCG8 sont des protéines qui fonctionnent en formant des hétérodimères et jouent un rôle critique dans le contrôle du processus d'absorption des stérols. Ces protéines se retrouvent aussi au niveau du foie et de l'intestin. Elles ont un rôle dans l'efflux du cholestérol cellulaire et fonctionnent en tant que transporteurs inverses relativement à la fonction de la NPC1L1. Ainsi l'hétérodimère ABCG5-ABCG8 opère le transport du cholestérol cellulaire vers le lumen intestinal. De plus, elles ont une préférence pour les phytostérols et participent donc davantage à leur efflux. Les phytostérols ne doivent pas s'accumuler dans l'organisme puisqu'ils sont associés à la sitostérolémie, état de santé néfaste augmentant les risques d'accidents cardiovasculaires (Betters and Yu, 2010; Calandra et al., 2011; Iqbal and Hussain, 2009; Wang and Song, 2012). De plus, il a été démontré que les deux isoformes de la protéine ABCB1, soit ABCB1a et ABCB1b, localisées dans le côté apical des entérocytes sont aussi impliquées en tant que transporteurs dans le processus d'efflux du cholestérol du cytoplasme vers la lumière de l'intestin (Le May et al., 2013).

Il est à noter, que l'efficacité du processus d'absorption du cholestérol correspondra à la résultante entre la balance d'activité de la protéine NPC1L1 *versus* celle de l'hétérodimère ABCG5-ABCG8 ainsi que ABCB1a/b. Leur coopération efficace sera importante pour le maintien de l'homéostasie lipidique dans l'organisme (Betters and Yu, 2010; Calandra et al., 2011; Wang and Song, 2012).

1.4 MÉTABOLISME DES LIPOPROTÉINES

Le cholestérol est une molécule amphipathique et insoluble dans un milieu aqueux comme le sang. Afin de pouvoir circuler dans l'organisme, il doit être couplé à des transporteurs. Les molécules qui transportent ainsi le cholestérol se nomment lipoprotéines.

1.4.1 LES LIPOPROTÉINES

Comme son nom l'indique, les lipoprotéines sont des agrégats complexes formés de lipides et des protéines. Leur rôle principal est de permettre aux lipides, tels que le cholestérol, de circuler dans le plasma à partir des sites d'absorption, de synthèse, de catabolisme et d'excrétion. Les lipoprotéines sont synthétisées majoritairement dans le foie et l'intestin. Leur composition varie selon les différentes proportions de lipides et de protéines (Tableau II).

Tableau II. Composition des lipoprotéines plasmatiques.

Lipoprotéine	Protéine (~%)	Lipides (~%)					
		Total	Chol	CE	PL	TG	FFA
Chylomicrons	1	99	2	3	8	86	0
VLDL	8	92	7	15	17	52	1
IDL	11	89	7	32	24	25	1
LDL	21	79	7	38	22	11	1
Lp(a)*	36	64	7	30	17	9	1
HDL:							
HDL ₂	33	67	6	20	32	9	0
HDL ₃	54	46	2	12	24	2	6
Albumine-FFA	99	1	0	0	0	0	1

*Lp(a) est aussi hautement glycosylée et de masse variable.

Abréviations: Chol, cholestérol; CE, cholestérol ester; FFA, (*Free Fatty Acids*)acides gras libres; HDL₂ et HDL₃, dérivés des HDL; PL, phospholipides; TG, triglycérides; (Tableau adapté de Ehnholm *et al*, 1972; Fortmann *et al*, 1997; Olson *et al*, 1998; Christie *et al*, 2012).

Les lipoprotéines ont une membrane formée d'une monocouche de phospholipides (PL) et de cholestérol libre (CL). Elles abritent des lipides Apolaires comme des triglycérides (TG), du cholestérol estérifié (CE) et des apoprotéines.

Certaines apoprotéines contribuent au rôle de structure de maintien des certaines lipoprotéines tandis que d'autres sont mobiles et se positionnent à la surface des lipoprotéines et agissent en tant que molécules de reconnaissance. Ainsi, l'identité de l'apoprotéine portée déterminera le captage de la lipoprotéine par son récepteur spécifique ou son ciblage par les enzymes impliquées dans la modification de ces particules (Tableau III).

Tableau III : Propriétés et fonctions des apoprotéines.

Apoprotéine	Poids moléculaire	Lipoprotéine d'association	Fonction
Apo A-I	28 kDa	HDL, CM	Activation de la LCAT. Ligand de l'ABCA1. Maintien de la structure.
Apo A-II	17.4 kDa	HDL, CM	Stimule l'activité de la lipase hépatique.
Apo A-IV	46 kDa	HDL, CM	Activation de la LCAT. Interagit avec la Apo C-II et la LPL.
Apo A-V	39 kDa	HDL, CM	Activation de la LPL. Stimule la captation des triacylglycérols. Participe à l'assemblage des chylomicrons et des VLDL.
Apo C-I	6 kDa	VLDL, CM, HDL	Activation de la LCAT. Inhibition de la LPL, CETP et de l'interaction entre l'apo E avec le LRP.
Apo C-II	8.9 kDa	VLDL, CM, HDL	Activation de la LPL.
Apo C-III	8.8 kDa	VLDL, CM, HDL	Inhibition de la LPL. Déplace l'apo E du LRP.
Apo B-48	264 kDa	CM	Maintien la structure des CM et des ses résidus.
Apo B-100	550 kDa	LDL, VLDL	Maintien la structure des VLDL, IDL, VLDL. Ligand du récepteur LDLR.
Apo E	34.2 kDa	CM, VLDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP. Modulateur de la LPL, CETP, LCAT. Molécule antioxydante.

(Dominiczak and Caslake, 2011; Olson, 1998; Schaefer et al., 1978)

La classification des lipoprotéines se fera sur la base de leurs propriétés physiques (taille, densité), leur composition en lipides et en protéines ainsi que leur fonction.

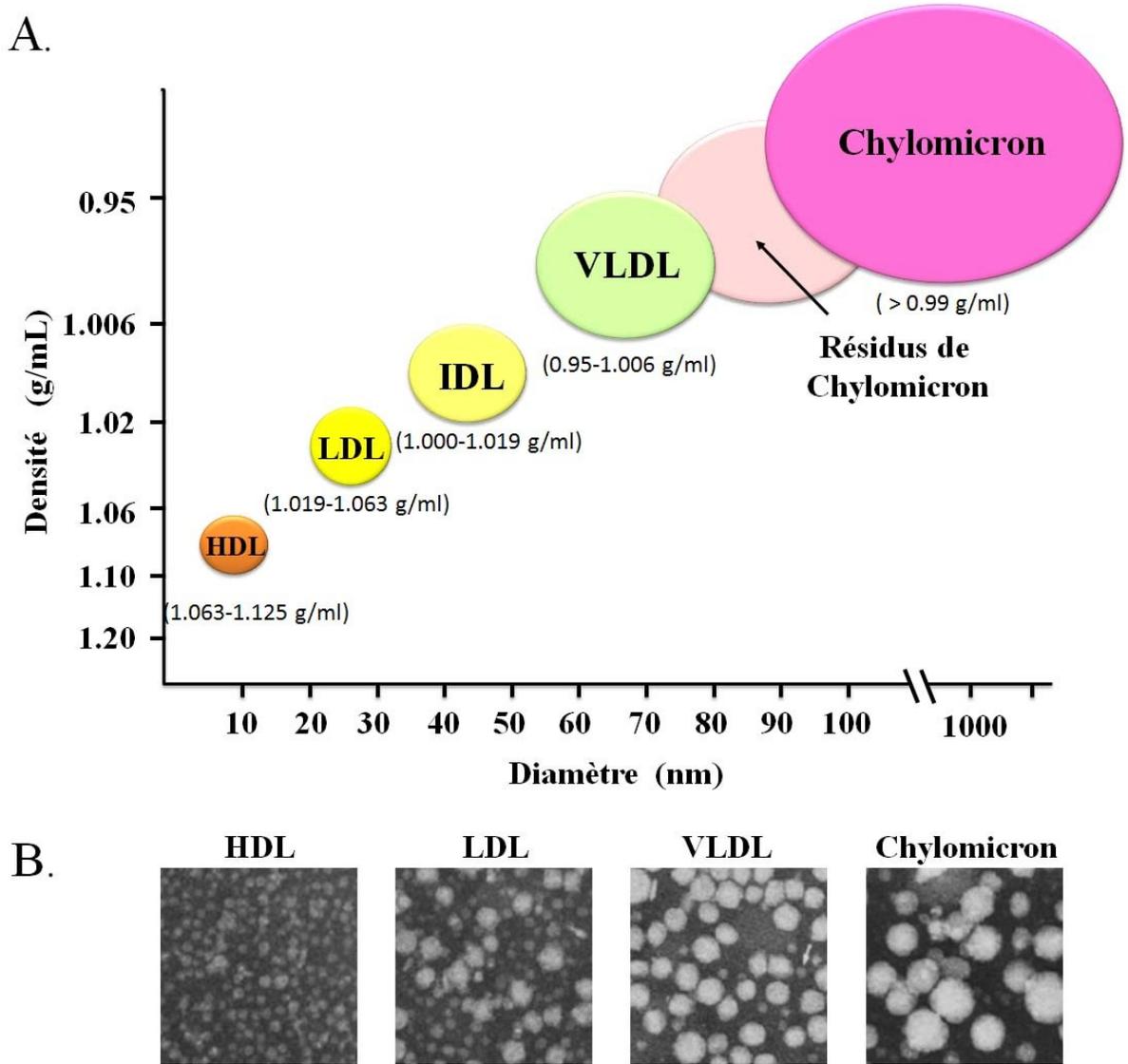


Figure 5: Caractéristiques physiques des lipoprotéines. A) Graphique démontrant la relation inverse entre la densité des lipoprotéines et leur diamètre (Badimón et al., 2009; Colhoun et al., 2002; Hermier et al., 1988; Patsch et al., 1974; Shen et al., 1981). B) Images de microscopie électronique démontrant la variabilité de taille des lipoprotéines (Nanjee et al., 2001).

Les chylomicrons ou CM, sont les plus volumineux (120-1100 nm) et les moins denses (> 0.99 g/ml). Chaque particule nécessite de l'Apo B-48 pour son assemblage et les protéines présentes dans sa composition sont de l'Apo A-I, A-II, A-IV, A-V, B-48, C-I, C-II, C-III et E (Dominiczak and Caslake, 2011; Miller, 1979; Xiao and Lewis, 2012).

Les lipoprotéines de très faible densité ou VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*), sont synthétisées et sécrétées par le foie. Elles ont un diamètre de 30 à 90 nm et une densité variant de 0.95-1.010 g/ml. Chaque particule nécessite l'Apo-B100 pour son assemblage. La fraction protéique est composée par de l'Apo B-100, Apo E, Apo C-I, C-II et C-III. La composition en apoprotéines varie d'une particule à l'autre (Havel, 1984; Kuchinskiene and Carlson, 1982).

Les lipoprotéines de densité intermédiaire ou IDL (*Intermediary density lipoprotein*) constituent le produit d'hydrolyse des VLDL par les lipases. Leur taille et leur densité est intermédiaire aux VLDL et aux LDL, variant de 40 à 80 nm avec des densités d'environ 1.006 à 1.019 g/ml. Leur fraction protéique présente à leur surface une molécule d'Apo B-100 ainsi que plusieurs molécules d'Apo E.

Les lipoprotéines de faible densité ou LDL (*Low density lipoprotein*) font partie de la dernière classe de lipoprotéines contenant de l'Apo B-100. Une particule de VLDL ayant perdu la majeure partie de ses triglycérides (TG) et enrichie de cholestérol estérifié (CE) deviendra une particule de LDL. Leur taille varie entre 21-30 nm avec une densité de 1.019 à 1.063 g/ml. Leur fraction protéique comporte une seule Apo B-100 qui est très importante pour le maintien de la structure des LDL ainsi que pour sa reconnaissance par le récepteur des LDL soit le LDLR à la surface des cellules (Havel, 1984; Kuchinskiene and Carlson, 1982).

Les lipoprotéines de haute densité ou HDL (*High density lipoprotein*) sont divisées en HDL naissantes, HDL₂ et HDL₃. Les HDL sont synthétisées par le foie et l'intestin à partir des produits de l'hydrolyse des chylomicrons et des VLDL, riches en triglycérides. Les HDL naissantes sont composées principalement des phospholipides (PL) et des apoprotéines comme l'Apo A-I, A-II, C-I, C-II, C-III et Apo E. Lors de leur maturation en HDL₂ ou HDL₃ (expliquée plus loin), les apoprotéines Apo C-I, C-II, C-III et E sont transférées vers d'autres lipoprotéines et seules les apoprotéines Apo-A seront conservées. Le diamètre des HDL₃ varie entre 7 et 9 nm et leur densité de 1.125- 1.210 g/ml. Alors que les HDL₂ sont un peu plus volumineuses avec des tailles de 9 à 10 nm et

de densités de 1.063-1.125 g/ml. Les particules de HDL sont les plus denses car elles possèdent le ratio protéines : cholestérol le plus élevé (Miller, 1979; Patsch et al., 1974; Schaefer et al., 1978; Skipski et al., 1967).

Finalement, la **lipoprotéine (a) ou Lp(a)** est composée d'une particule de LDL avec une molécule d'Apo-A fixée de façon covalente sur sa molécule d'Apo B-100. La particule d'Apo-AI est synthétisée par le foie et libérée dans la circulation, où elle se lie à une particule de LDL. Cette lipoprotéine est riche en cholestérol estérifié.

1.5 RÉGULATION DU MÉTABOLISME DES LIPIDES

On distingue trois voies de régulation des lipides qui opèrent dans l'organisme, soit la voie exogène, la voie endogène et la voie inverse.

1.5.1 VOIE EXOGÈNE

Cette voie est responsable de la distribution des lipides d'origine alimentaire vers les différents tissus de l'organisme. Les lipides alimentaires sont hydrolysés au niveau de l'intestin grêle et absorbés par les entérocytes (Figure 6). Les triglycérides (TG) contenant les longues chaînes d'acides gras, le cholestéryl ester (CE) contenant le cholestérol sont libérés et forment, à l'aide de l'apoprotéine B-48 (Apo B-48), un assemblage avec un centre lipidique et protéique, entouré d'une monocouche formée de lipides polaires (phospholipides) et des apoprotéines. Ces dernières seront intégrées progressivement, d'abord l'apoprotéine A-IV (Apo A-IV) et l'apoprotéine A-V (Apo A-V) puis plus tard, l'apoprotéine A-I (Apo A-I) et l'apoprotéine A-II (Apo A-II) ainsi que les apoprotéines C-I, C-II, C-III (Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III) et l'apoprotéine E (Apo E) (Dominiczak and Caslake, 2011; Havel, 1987). Cet assemblage particulièrement riche en triglycérides sera nommé chylomicron. Une fois formés, les chylomicrons seront sécrétés dans le plasma et passeront dans la circulation périphérique où ils entreront en contact avec une enzyme, la lipoprotéine lipase (LPL). Celle-ci est localisée à la surface des cellules endothéliales des capillaires. L'action de cette enzyme est une étape clé dans le métabolisme des lipides et se passe par un mécanisme de reconnaissance impliquant l'Apo C-II à la surface des chylomicrons qui agit comme co-facteur pour l'activation de l'enzyme. Toutefois, son action peut être inhibée par l'Apo C-III (Dominiczak and Caslake, 2011; Goedeke and Fernández-Hernando, 2012). La LPL est responsable d'hydrolyser des triglycérides contenus dans le chylomicron ce qui va libérer des acides gras. Ces derniers sont une source d'énergie importante pour l'organisme et seront absorbés par les cellules afin d'être utilisés ou stockés. Le chylomicron ainsi digéré aura perdu presque la totalité de son contenu en triglycérides, sera de plus petite taille et sera alors appelé résidu de chylomicron (*chylomicron remnant*). En circulation, les résidus des chylomicrons vont perdre leurs apoprotéines de surface dont les Apo A et les Apo C mais conserveront essentiellement l'Apo B-48 ainsi que l'Apo E. Ensuite, ils se rendront au foie où, par l'intermédiaire de leur apoprotéine E de surface, seront reconnus et captés par

les récepteurs présents sur les hépatocytes (ex : LDLR) et seront ensuite internalisés afin d'être dégradés. Les produits de dégradation seront utilisés par la cellule. Par exemple, le cholestérol servira comme composant dans la synthèse des particules de VLDL ou bien, il sera converti en acides biliaires ou simplement excrété dans la bile pour son élimination. De plus, il pourrait être re-estérifié avec des acides gras afin de former des réserves sous forme de cholestérol ester (CE). Dans le cas où il y aurait trop de cholestérol dans la cellule, il servira en tant que "molécule autorégulatrice", en inhibant la synthèse de lipides par les hépatocytes (Grundy, 1983; Olson, 1998; Xiao and Lewis, 2012).

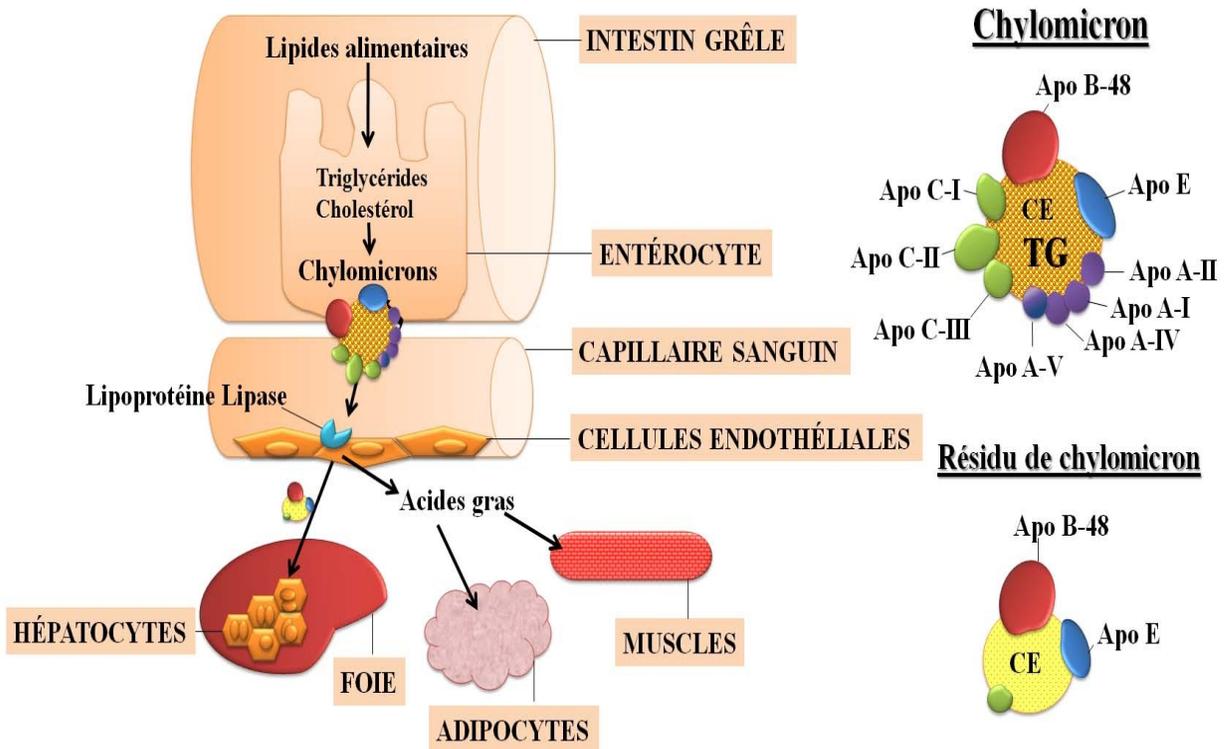


Figure 6 : Voie exogène de régulation des lipides.

Apo, apoprotéine; CE, cholestéryl ester; TG, triglycérides

1.5.2 VOIE ENDOGÈNE

Le foie est l'organe central où débute cette voie. L'objectif est d'assembler les lipides nouvellement synthétisés ou recyclés dans cet organe, en particules nommées des VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) qui seront transformées progressivement en particules de LDL, afin qu'ils soient transportés et distribués vers les tissus périphériques (Figure 7). Cette voie est très importante puisque les triglycérides synthétisés par le foie sont non seulement des éléments fondamentaux des composants cellulaires, des enzymes et des hormones mais ils constituent surtout, une grande source d'énergie nécessaire pour le maintien du bon fonctionnement de l'organisme. Lorsqu'ils ne sont pas utilisés à court terme, les triglycérides sont stockés et forment ainsi la réserve énergétique de l'organisme.

Au départ, les VLDL naissants sont composés d'un centre contenant majoritairement des triglycérides et très peu de cholestéryl ester. À leur surface, ils portent une seule apoprotéine, soit l'Apo B-100, des phospholipides et du cholestérol libre. Par la suite, ils intègrent des petites quantités d'Apo A-I, A-II, A-IV et des quantités plus importantes d'Apo C-I, C-II, C-III ainsi que d'Apo E (Dominiczak and Caslake, 2011; Schaefer et al., 1978). Une fois libérés dans les vaisseaux, et par l'intermédiaire de leur Apo C-II en surface, ils seront reconnus et activeront la lipoprotéine lipase (LPL) présente à la surface des cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux capillaires entourant les hépatocytes. Ainsi, la lipoprotéine lipase activée hydrolysera les triglycérides contenus dans le VLDL tout comme elle le faisait pour les chylomicrons lors de la voie exogène. Les VLDL ainsi partiellement digérés deviendront des résidus de VLDL ou plus communément appelés des IDL (*Intermediary Density Lipoprotein*). Cette hydrolyse des triglycérides causera une restructuration de la particule, qui en ce faisant, perdra ces apoprotéines C. Une fraction variable des IDL sera reconnue, par l'intermédiaire de son apoprotéine E de surface, par des récepteurs des hépatocytes qui vont la lier, l'internaliser et une fois à l'intérieur de l'hépatocyte, la particule sera catabolisée. Une autre part sera convertie en particules de LDL par l'action de la lipase hépatique. Cette enzyme est structurellement homologue à la lipoprotéine lipase, se localise à la surface des cellules endothéliales des capillaires hépatiques et ne nécessite pas l'activation par l'Apo C-II (Grundy, 1983; Havel, 1984). Ainsi, la lipase hépatique catalysera l'hydrolyse des triglycérides de l'IDL en acides gras. Les IDL ayant perdu des apoprotéines ainsi que la

majorité des triglycérides deviendront plus petites et plus denses, et seront appelées des particules de LDL (Havel, 1984). Au niveau protéique, les LDL sont constitués d'apoprotéine B-100 qui est nécessaire au maintien de la stabilité de la particule, et au niveau lipidique, d'un centre composé surtout de cholestéryl esters puis d'une quantité variable et minimale de triglycérides restants (Grundy, 1983; Miller, 1979). Les particules de LDL sont le produit final de la lipolyse intravasculaire hépatique. Chez l'humain, les LDL sont responsables du transport du cholestérol sanguin.

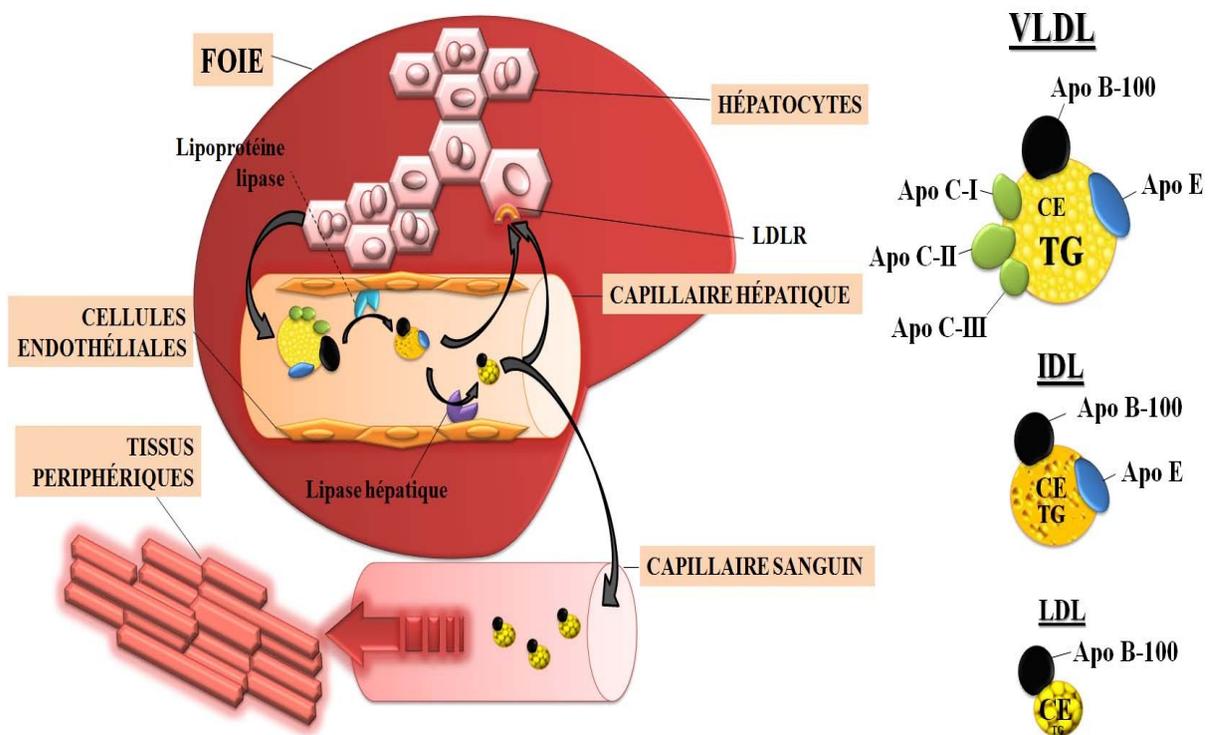


Figure 7 : Voie endogène de régulation des lipides.

1.5.3 VOIE INVERSE

Cette voie représente le transport du retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (Figure 8). La lipoprotéine impliquée dans ce transport est le HDL (*High Density Lipoprotein*). De ce fait, cette voie est aussi appelée voie du métabolisme des HDL (Dominiczak and Caslake, 2011).

Les HDL naissants sont synthétisés dans l'espace extracellulaire du foie et de l'intestin grêle. Ces particules possèdent au départ une forme discoïdale. L'Apo A-I sert de matrice de base dans la formation d'une particule de HDL. Elle proviendra de deux sources soit d'une synthèse *de novo* dans le foie (hépatocytes) ou par les cellules intestinales, ou soit d'un détachement spontané de la surface des chylomicrons. L'Apo A-I sera reconnue par une protéine transporteur, présente à la surface membranaire des cellules, l'ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter 1*). Ce transporteur est responsable du contrôle de l'efflux de cholestérol libre de la cellule ainsi que celui des phospholipides. Suite à son action, l'Apo A-I se chargera des phospholipides membranaires et du cholestérol provenant des cellules donnant lieu à une particule de **HDL naissante**.

Les HDL₃ enrichie en triglycérides sera alors appelée HDL₂ (Barter et al., 2003; Biggerstaff and Wooten, 2004; Grundy, 1983; Kontush and Chapman, 2006; Sviridov and Nestel, 2002).

Les particules de HDL riches en cholestérol, retourneront au foie où elles entameront la dernière étape de cette voie. Elles seront reconnues par un récepteur à la surface des hépatocytes, soit le SR-BI (*Scavenger Receptor Class B member 1*) (Dominiczak and Caslake, 2011). Le SR-BI liera l'Apo A-I de la particule de HDL. Contrairement au LDLR, qui sous forme de complexe avec la particule de LDL l'internalise dans la cellule, le SR-BI n'internalisera pas la particule de HDL. La liaison directe entre le récepteur SR-BI et la particule de HDL engendrera la libération des cholestérol-esters dans des cavéoles. Celles-ci sont des vésicules issues de l'invagination de la membrane plasmique des cellules et sont très riches en lipides. Elles seront donc responsables de l'internalisation de leur charge à l'intérieur de la cellule. La particule de HDL vidée de son contenu pourra alors suivre deux voies : soit, elle est libérée dans la circulation où elle pourra capter à nouveau le cholestérol des cellules et des tissus avant de retourner à nouveau au foie pour le libérer et commencer un autre cycle; ou soit, elle est reconnue

par son Apo E de surface par un récepteur des hépatocytes, qui résultera dans l'internalisation et la dégradation intracellulaire de la particule, terminant ainsi le cycle de la voie inverse (Dominiczak and Caslake, 2011).

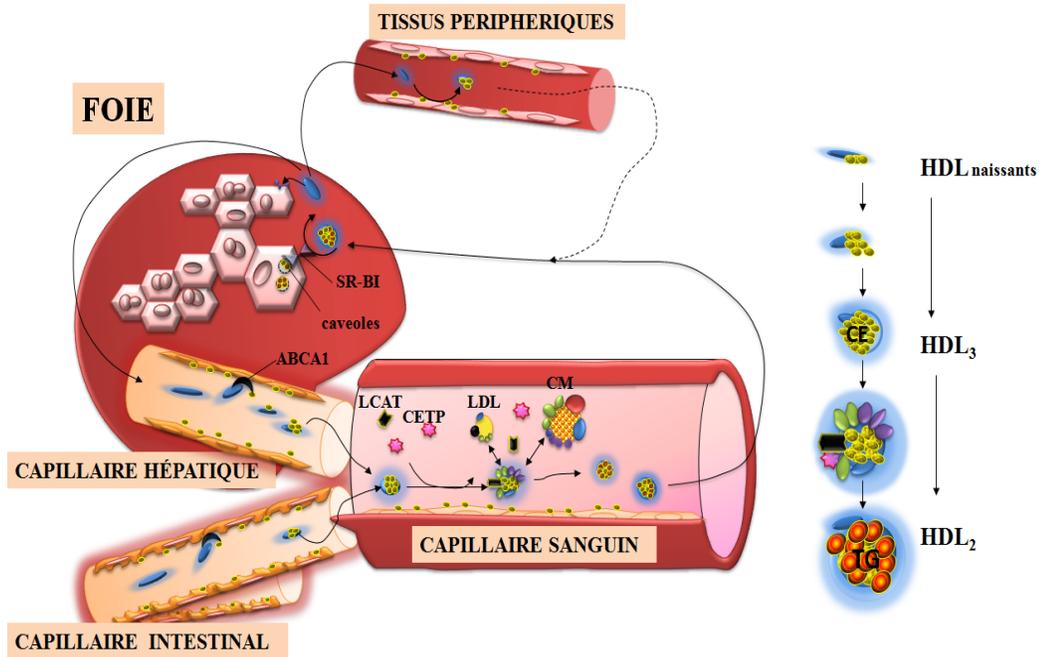


Figure 8 : Voie inverse des lipides

1.6 RÉCEPTEUR DES LDL (LDLR)

Pendant la période s'échelonnant de 1973 à 1985, l'étude du mécanisme moléculaire impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale effectué par Goldstein J.L et Brown M.S, a permis l'identification, la purification ainsi que l'isolation du gène d'une molécule cruciale pour l'homéostasie du cholestérol : le récepteur des LDL ou plus communément appelé le LDLR (*Low-density lipoprotein receptor*). Ce récepteur est la protéine responsable de la capture des particules LDL transportant le cholestérol vers l'intérieur de la cellule (Goldstein and Brown, 2009).

1.6.1 FAMILLE DES LDLR

Le LDLR fait partie d'une famille de récepteurs qui partagent les propriétés structurales et fonctionnelles suivantes : leur expression à la surface cellulaire, leur domaine de liaison du ligand, la nécessité du calcium pour la liaison, la reconnaissance de l'apoprotéine E (Apo E) ou B (Apo B), la présence des domaines homologues au précurseur de l'EGF (*Epidermal growth factor precursor*) avec la répétition des motifs YWTD, un seul domaine transmembranaire et finalement, le signal d'internalisation NPXY du ligand extracellulaire en complexe avec le récepteur (Hussain et al., 1999). Les membres de cette famille sont des glycoprotéines ayant une majorité de leur structure à l'extérieur de la cellule et une petite partie seulement présente dans le cytoplasme (protéines transmembranaires de type I) contrairement aux récepteurs impliqués dans la signalisation intracellulaire dont la majorité de leur structure se retrouve au niveau du cytoplasme (Gent and Braakman, 2004; Hussain et al., 1999; Jeon and Blacklow, 2005).

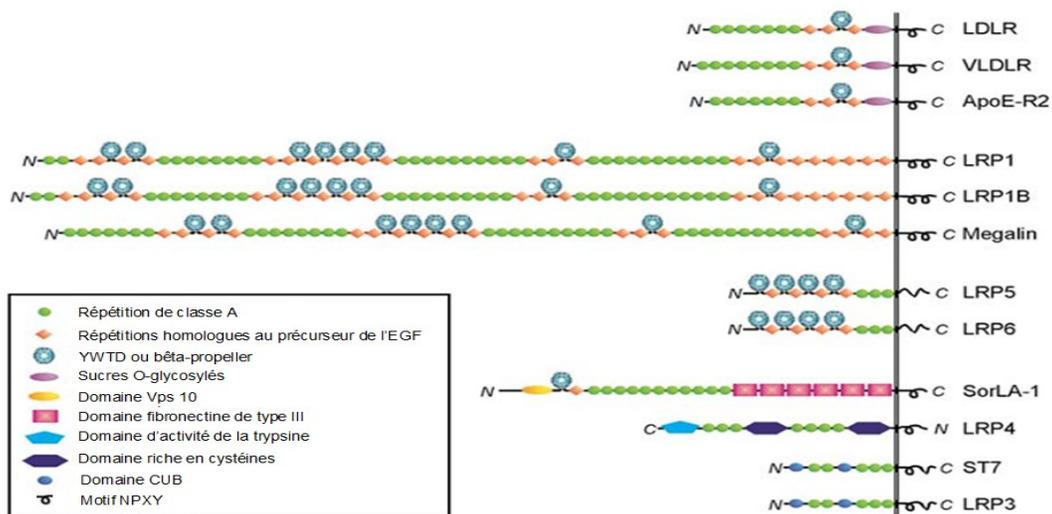


Figure 9: Membres de la famille des LDLR (adapté de Gent J & Braakman I, 2004)

1.6.2 STRUCTURE DU GÈNE

Le gène codant pour le LDLR est localisé au chromosome 19 (p13.1-p13.3) puis est composé de 18 exons et 17 introns. Il existe une corrélation entre l'organisation des exons et les différents domaines de la protéine (Figure 10). L'exon 1 code pour les 21 acides aminés composant le peptide signal qui est responsable de la localisation de la protéine au réticulum endoplasmique. Les exons 2 à 6 codent pour la région de liaison au ligand, les exons 7 à 14 codent pour les domaines homologues au précurseur de l'EGF. Cette région contient trois répétitions de 40 acides aminés chacune désignée A, B et C. Les répétitions A et B sont codées par l'exon 7 et 8 et sont séparées de la répétition C (codée par l'exon 14) par cinq copies d'une répétition contenant un motif YWTD de 40-60 acides aminés codées par les exons 9-13. L'exon 15 code pour la région riche en oligosaccharides, l'exon 16 ainsi que la partie en 5' de l'exon 17 codent pour la région hydrophobique transmembranaire et la partie restante de l'exon 17 ainsi que l'exon 18 codent pour le domaine cytosolique qui contient la séquence signal pour l'endocytose (Hobbs et al., 1990; Hobbs et al., 1992).

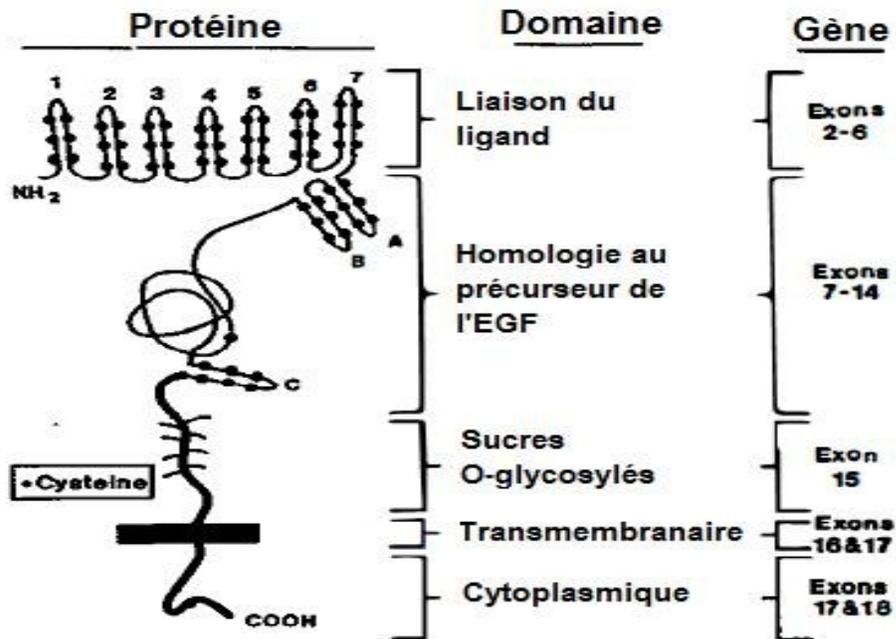


Figure 10 : Structure des domaines du récepteur des LDL (LDLR) et leur relation avec l'organisation avec les exons du gène (adapté de Hobbs HH et al, 1990)

1.6.3 ORGANISATION DES DOMAINES DU LDLR

La caractérisation moléculaire du LDLR démontre que cette glycoprotéine est composée de 839 acides aminés et qu'elle possède cinq domaines avec des fonctions distinctes : en N-terminal le domaine de liaison au ligand, suivi du domaine contenant les régions homologues au précurseur de l'EGF, du domaine des sucres O-glycosylés, du domaine transmembranaire et finalement, du domaine en C-terminal riche en cystéines (Gent and Braakman, 2004).

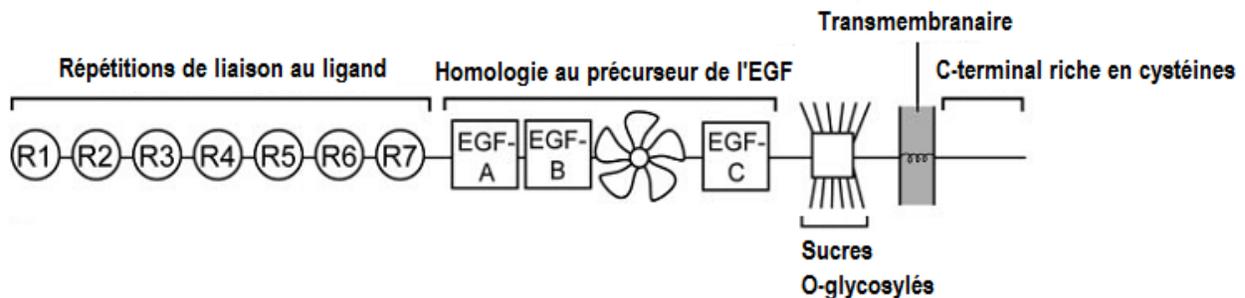


Figure 11 : Organisation en domaines du LDLR. Adapté de (Zhang et al., 2007)

Le domaine en N-terminal de la protéine est formé par une répétition de sept régions nommées R1 à R7 ou LA1 à LA7 (*LDL receptor type A*) (Jeon and Blacklow, 2005) composées d'une quarantaine d'acides aminés. Chaque répétition possède six cystéines. La présence de calcium est nécessaire au repliement, à la formation des ponts disulfures dans chaque répétition ainsi que pour la liaison des lipoprotéines au LDLR.

Le deuxième domaine est formé de trois répétitions homologues au précurseur de l'EGF, soit EGF-A, EGF-B et EGF-C. Chacune contient aussi 6 résidus cystéine conservés et ont environ 40 acides aminés au total. Les régions EGF-B et EGF-C sont séparées par une région d'environ 260 acides aminés composée de six répétitions du motif YWTD aussi connu comme la répétition LDL-B. Celle-ci adopte une structure nommée "β-propeller" ou en hélice.

Le troisième domaine est enrichi en résidus serine et thréonine, ceux-ci agissent en tant que sites de liaison pour les sucres et seront donc O-glycosylés.

Le quatrième est le domaine transmembranaire, une région hydrophobe formée de 24 acides aminés qui fixe le récepteur à la bicouche lipidique de la membrane plasmique de la cellule.

Finalement, le domaine en C-terminal correspond à la seule région cytoplasmique. Il possède le motif caractéristique de la famille des LDLR : FxNPxY et sa séquence correspond à FDNPVY. L'intégrité du motif NPxY est critique pour sa fonction. Ce motif adopte une conformation en épingle qui permettra l'attachement de plusieurs protéines adaptatrices ainsi que des molécules de signalisation intracellulaire (Gent and Braakman, 2004; Jeon and Blacklow, 2005).

1.6.4 MÉCANISME D'ACTION DU LDLR ENVERS LE LDL

La majorité de cholestérol plasmatique est contenu dans les particules de LDL. Le cœur de celles-ci est composé de cholestérol estérifié avec une longue chaîne d'acide gras, le tout entouré d'une couche formée de phospholipides, d'une petite quantité de cholestérol libre et finalement d'une apoprotéine B-100. Afin de synthétiser les membranes, les cellules ont besoin de cholestérol libre. Pour l'obtenir à partir des particules de LDL, la cellule doit le séparer de la lipoprotéine et hydrolyser le cholestérol ester. Ainsi, la molécule cruciale pour que ce processus ait lieu est le LDLR (Brown and Goldstein, 1979).

Le LDLR joue le rôle de "transporteur cellulaire". Pour ce faire, il va procéder en quatre étapes : (1) liaison du ligand (LDL) ; (2) internalisation du complexe LDLR-LDL; (3) libération du LDL pour dégradation; (4) recyclage à la membrane plasmique.

Ainsi, le LDLR à la surface des cellules entre en contact avec une particule de LDL plasmatique (environnement de pH neutre), va reconnaître et lier sa lipoprotéine B-100. La liaison se fera par l'intermédiaire des répétitions R2-R7 du domaine de liaison du ligand ainsi que de la répétition EGF-A (Gent and Braakman, 2004) du LDLR.

Ensuite, le domaine cytoplasmique sera responsable d'induire l'internalisation du complexe formé. En effet, il a été démontré que les 22 premiers acides aminés du domaine cytoplasmique (résidus 790-811) du LDLR sont essentiels, et suffisants, à ce processus. Cette séquence doit contenir obligatoirement un résidu aromatique en position 807 : FDNPVY₈₀₇. Une substitution de ce résidu par un résidu aliphatique ou hydrophilique ou chargé, empêchera toute internalisation (Chen et al., 1990; Jeon and Blacklow, 2005). Cette séquence interagit avec le domaine N-terminal PTB (*phosphotyrosine-binding domain*) de la protéine cytosolique ARH (*autosomal recessive hypercholesterolemia adaptor protein*). Cette dernière agit en tant que protéine

adaptatrice qui initie le processus d'endocytose du complexe LDLR-LDL. L'ARH possède aussi un motif consensus de reconnaissance pour la clathrine : LLDLE (Jeon and Blacklow, 2005). La clathrine est une protéine structurale qui s'assemble en trimères et leur polymérisation génère une structure polyédrale. Ce processus va entraîner l'invagination de la membrane plasmique et la formation des vésicules englobant le complexe LDLR-LDL. Ceux-ci vont se détacher de la membrane et migrer vers l'intérieur de la cellule où ils fusionneront avec des endosomes ayant un milieu à pH plus acide (pH<6) (Rudenko et al., 2002). Ce changement de pH neutre vers un pH acide induira un changement conformationnel dans la structure du LDLR au niveau du domaine d'homologie à l'EGFP et le domaine de liaison du ligand. Le LDLR passe alors d'une conformation dite "ouverte" vers une conformation "fermée" (Figure 12). Ainsi, il y aura formation des liaisons entre les régions R4 et R5 (du domaine liaison au ligand) avec la région β -propeller (hélice du domaine EGFP). Ce mouvement, libérera la particule de LDL dans la lumière de l'endosome (Beglova et al., 2004; Jeon and Blacklow, 2003; Jeon and Blacklow, 2005).

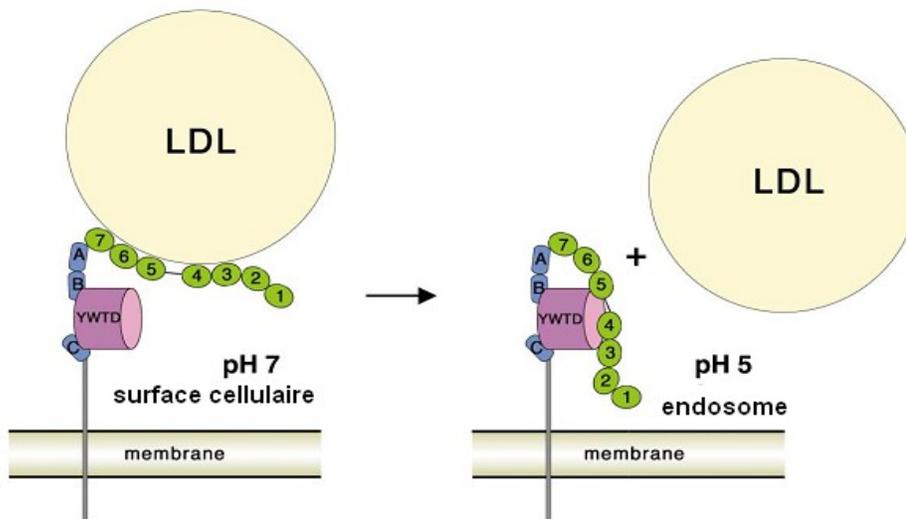


Figure 12 : Changement de conformation du LDLR de pH neutre à pH acide. Adapté de : (Jeon and Blacklow, 2003)

Suite à la dissociation, le LDLR retournera à la surface de la cellule afin de capter une autre particule de LDL. Pour ce faire, il nécessitera son domaine d'homologie à

l'EGFP. Il a été démontré qu'un récepteur délété de ce domaine, pourra toujours lier la particule de LDL et l'internaliser mais il perdra sa capacité de recycler à la surface cellulaire (Rudenko et al., 2002). Le récepteur LDLR pleine longueur peut donc exécuter un cycle de recyclage à chaque 10 minutes et pour une centaine de fois durant sa vie d'environ 20 heures.

Ce processus de recyclage requiert des changements de conformation répétés lors des passages d'un pH neutre à un pH acide et ainsi de suite. Alors il s'applique uniquement aux récepteurs très stables. En effet, les changements de conformation ne doivent pas être irréversibles et le récepteur ne doit pas être sensible à la dénaturation. À cet effet, il a été démontré qu'en absence de O-glycosylation, le récepteur LDLR était rapidement dégradé et que son expression à la surface cellulaire était de beaucoup diminuée (Kozarsky et al., 1988; Kuwano et al., 1991). La relation structure-fonction des sucres O-glycosylés dans le LDLR n'est toujours pas très claire, mais sur la base de ces expérimentations, il a été suggéré qu'ils pourraient avoir un rôle de protection contre la dénaturation lors du cycle de recyclage au niveau des endosomes et de protection du clivage protéolytique par des metalloprotéases lors de son transit vers à la membrane plasmique (Gent and Braakman, 2004; Goldstein et al., 1985).

Suite à l'internalisation du complexe LDL \equiv LDLR, les premières molécules qui seront recyclées à la surface membranaire seront les molécules de cholestérol libre ainsi que celles de sphingomyéline (provenant de l'endocytose de la membrane plasmique) contenues dans les vésicules d'internalisation avec un temps de recyclage estimé de 2 à 4 minutes. Le LDLR sera recyclé plus lentement dans un délai d'environ 18-24 minutes. Les particules de LDL seront triées dans des endosomes afin d'être dirigées vers le lysosome où elles subiront l'hydrolyse de leurs cholestérol-esters en molécules de cholestérol libre. Le temps requis pour le transport du LDL, contenant le cholestérol-ester, de la surface cellulaire jusqu'au lysosome fut estimé à environ 10 à 30 minutes (Brasaemle and Attie, 1990). En ce qui concerne le processus complet depuis la liaison de la particule de LDL en passant par l'internalisation, l'hydrolyse au lysosome, le transfert du cholestérol libre aux organelles (Golgi/ réticulum endoplasmique), le transfert aux cavéoles de la membrane plasmique pour son efflux; il se passe entre 37 à 50 minutes (Hao and Maxfield, 2000; Liscum and Dahl, 1992; Schroeder et al., 2001).

Considérant qu'une particule de LDL porte environ 1600 molécules de cholestérol ester, ce recyclage rapide permet d'assurer un mécanisme particulièrement efficace de captage du cholestérol par les cellules (Gent and Braakman, 2004; Goldstein and Brown, 2009).

1.6.5 RÉGULATION DU LDLR

L'expression du récepteur des LDL est principalement modulée par la concentration intracellulaire de cholestérol. Une baisse de celle-ci, enclenche la transcription du gène codant pour le LDLR. La stimulation de base de la transcription débutera par la fixation du facteur de transcription Sp1 sur les régions R1 et R3 situées en amont du site d'initiation en 5' du gène (nucleotides -79 à -93) (Goldstein et al., 1985). L'activité transcriptionnelle sera augmentée par la fixation du facteur de transcription SREBP-2 sur la région SRE (*sterol regulatory element*) du promoteur. Le SRE est un élément régulateur très important, puisqu'il va s'activer lorsque les niveaux des stérols seront bas, stimulant de la sorte une transcription très active du gène mais son effet sera annulé lorsque les stérols s'accumuleront dans les cellules (Hobbs et al., 1992; Sekar and Veldhuis, 2004).

Par la suite, les niveaux de la protéine mature vont varier selon le succès de maturation au cours du passage de la protéine LDLR précurseur à travers la voie de sécrétion où elle subira les modifications post-traductionnelles nécessaires et importantes à son expression à la surface cellulaire ainsi que pour son activité (Attie and Seidah, 2005). Toutefois, l'intervention d'une autre protéine pourra réguler la fonction du LDLR. Cette molécule régulatrice est la protéine étudiée dans cette thèse : PCSK9.

1.7 PCSK9

En 2003, un nouveau gène fut identifié ayant un rôle dans la régulation du cholestérol plasmatique (Abifadel et al, 2003). Ce gène code pour une protéase à serine nommée proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 ou plus communément appelée : PCSK9. Le gène codant pour la PCSK9 est le troisième gène associé à l'hypercholestérolémie autosomale dominante (ADH).

1.7.1 PCSK9 MEMBRE DE LA FAMILLE DE PROPROTÉINES CONVERTASES

La PCSK9 appartient à la famille des proprotéines convertases ou PCs. Celles-ci font partie de la famille des protéases à serine ayant un domaine catalytique homologue à celui de la subtilisine bactérienne. Tout comme les protéases à serine typiques qui clivent les liens peptidiques des protéines en se servant d'un résidu serine comme acide aminé nucléophile au site actif, les PCs sont capables de cliver et ce, suite à la reconnaissance d'une région particulière. À ce jour trois empreintes sont reconnues par les PCs (Figure 13).

La première empreinte est reconnue par le groupe formé de sept PCs: PC1/3, PC2, furine, PC4, PC5/6, PACE4 et PC7. Ce groupe se caractérise par leur préférence de clivage spécifiquement après des résidus basiques et le motif consensus reconnu correspond à : $(K/R)-(X)_n-(K/R)\downarrow$, où $n=0, 2, 4$ ou 6 et que X sera un acide aminé autre que cystéine et rarement proline (Seidah and Chrétien, 1999). Les gènes codant pour ces protéases sont connus comme *PCSK1* codant pour PC1/3; *PCSK2* codant pour PC2; *FURIN* codant pour furine; *PCSK4* codant pour la PC4; *PCSK5* codant pour les deux isoformes PC5/6A et PC5/6B; *PCSK6* codant pour PACE4 et *PCSK7* codant pour PC7 (aussi nommée SPC7 ou LPC ou PC8). L'homologie de séquence de leur site catalytique avec celle de l'enzyme kexine de la levure, les classe dans la famille des subtilases de type kexine. Ces sept PCs sont impliquées dans l'activation des neuropeptides, des molécules d'adhésion, des récepteurs, des facteurs de croissance, des glycoprotéines de surface ainsi que d'autres enzymes (Seidah and Chrétien, 1999; Siezen and Leunissen, 1997).

La deuxième empreinte est reconnue par le huitième membre de la famille des PCs : SKI-1 (*subtilisin kexin isozyme-1*) ou aussi connu comme SP1 (*site-1 protease*). Le gène codant pour cette convertase est le *MBTPS 1*. Cette convertase se caractérise par son

clivage à la suite des résidus non-basiques et le motif de reconnaissance correspond à **(R/K)-X-(hydrophobe)-X↓** où X est un acide aminé quelconque; plus communément une lysine ou une thréonine (Seidah and Chrétien, 1999). La séquence de son domaine catalytique s'assimile davantage à celle de la pyrolysine. Ainsi, elle sera classifiée comme membre de la famille des subtilases de type pyrolysine. Cette convertase est impliquée dans l'activation des protéines régulatrices qui lient la région activatrice nucléaire SRE (sterol regulatory element) et du facteur BDNF (pro-brain derived neurotrophic factor). SKI-1 est responsable de cliver des protéines critiques dans le contrôle du métabolisme du cholestérol et des acides gras, ainsi que des protéines impliquées dans la protection et la croissance neuronale (Bergeron et al., 2000; Seidah and Chrétien, 1999; Seidah et al., 1999).

Finalement, la troisième empreinte est reconnue par le dernier membre appartenant à la famille des PCs soit la PCSK9 ou PC9, codée par son gène *PCSK9*. Cette convertase a un site de reconnaissance pour son clivage très particulier et bien différent des autres membres. PCSK9 clivera à la suite de la séquence correspondant à : **VFAQ↓** ou **IFAQ↓** chez certaines espèces (ex : Zebrafish) (Seidah and Prat, 2007; Seidah et al., 2003; Seidah et al., 2008). Elle est classifiée comme protéase à serine appartenant à la famille des subtilases de type protéinase K puisqu'elles partagent une homologie de séquence de 42% entre leurs domaines catalytiques (Seidah et al., 2003).

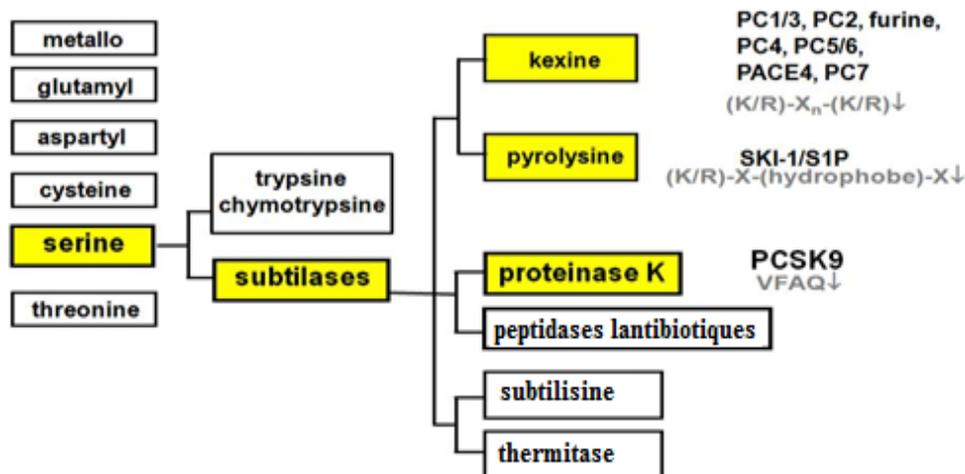


Figure 13 : Dendrogramme de la famille des proprotéines convertases (PCs) selon l'homologie des séquences du site catalytique. Adaptation de: (Siezen and Leunissen, 1997)

GÈNE DE LA PCSK9

Le gène codant pour la *PCSK9* est aussi connu comme *PSEC0052*, *FH3*, *PC9*, *NARC1*, *LDLCQ1*, *NARC-1* ou *HCHOLA3*, *LOC255738* (NCBI Ace view).

Il est localisé sur le chromosome 1 en position p32.3 débutant à 55505149 pb et finissant à 55530526 pb avec une taille de 25 378 bases (séquences de référence NC_000001.10 et NT_032977.9, www.genecards.org).

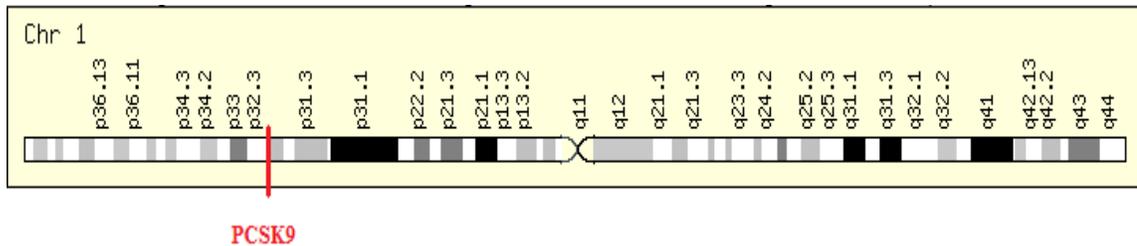


Schéma 14 : Position du gène codant pour la PCSK9 sur le chromosome 1

Le gène est composé de 12 exons qui codent, de 5' vers 3', pour le peptide signal, suivi du prosegment, du domaine catalytique, la région de jonction "hinge" et du domaine riche en cystéines et histidines (CHRD).

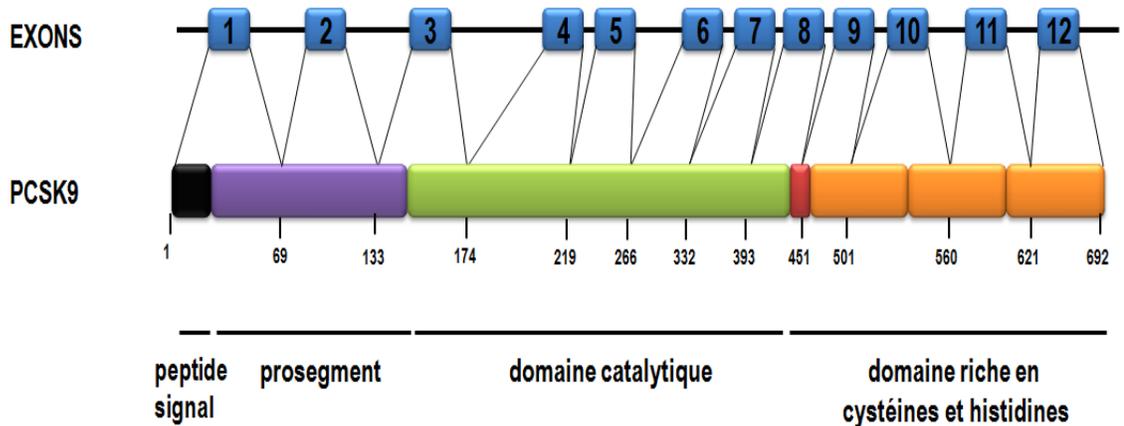


Schéma 15 : Relation entre l'organisation des exons du gène de la PCSK9 et de ses domaines (données NCBI).

Le promoteur proximal du gène de la PCSK9 est situé vers -4 à -1460 nucléotides du site de démarrage de la transcription (noté +1). Il contient, entre autres, une région *SRE* (*sterol regulatory element*) ainsi qu'une région *E-box* (*enhancer box*). La présence de ces régions fait en sorte que la transcription du gène de la PCSK9 est dépendante de la présence ou de l'absence des stéroïdes dans la cellule.

L'expression des formes nucléaires des protéines liant ces régions, telles que les facteurs de transcription SREBP-1c (Costet et al., 2006) ainsi que SREBP-2 (Dubuc et al., 2004), augmentent l'activité du promoteur et par conséquent la transcription active du gène.

Au niveau métabolique, SREBP-1c sera régulé par l'insuline et activera préférentiellement la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras, de l'acetyl-CoA carboxylase ou de la glucokinase. Tandis que SREBP-2 sera régulé par les niveaux de cholestérol cellulaire et aura une préférence pour l'activation des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol. SREBP-2 sera le facteur de transcription prédominant pour l'activation du gène de la PCSK9 (Costet et al., 2006; Dubuc et al., 2004).

Pour plusieurs gènes, les motifs SRE du promoteur sont souvent proches des régions Sp1 ou NF-Y puisqu'elles participent en tant que régions co-activatrices de la transcription génique. Dans le cas du promoteur de la PCSK9, ces régions se situent en amont de la région SRE (-337) soit à -613 pour le site NF-Y et à -430 pour le site Sp1 et elles n'agissent pas en co-activateurs. En effet, l'activation de la transcription du gène de la PCSK9 implique la participation de co-activateurs particuliers soit le HNF1 α (*hepatocyte nuclear factor 1 alpha*) et le HINFP (*histone nuclear factor P*). Ainsi, sa transcription se fera suite à une transactivation positive impliquant la liaison de SREBP-2 sur la région SRE du promoteur en collaboration avec HNF1 α sur une région proximale (environ 28 paires de bases en amont) au SRE se situant entre -374 et -386 nucléotides du site de début de la transcription. La région (-362 à -356) entre le SRE et le site de liaison du HNF1 α comporterait en plus, le motif de reconnaissance du HINFP, un autre facteur essentiel pour la régulation de la transcription du promoteur. Celui-ci participerait dans le recrutement de son cofacteur NPAT (*nuclear protein of the ataxia telangectasia mutated locus*) afin de former un complexe qui recrutera à son tour, TRRAP (*transformation/transactivation domain-associated protein*). Ce dernier est le cofacteur

de HAT, une histone acetyltransferase. Cet assemblage des protéines effectrices au niveau du promoteur de la PCSK9 facilitera l'acétylation de l'histone H4 ce qui favorisera la transcription du gène (Li and Liu, 2012). Une délétion de cette région résulterait dans une diminution de l'activité du promoteur de 95% tandis qu'une délétion de la région SRE diminuerait l'activité du promoteur à 86.2%. Ceci, démontre que cette région comporte des éléments de régulation en cis vitaux pour la transcription de la PCSK9 (Costet et al., 2006; Dubuc et al., 2004; Jeong et al., 2008; Li and Liu, 2012; Li et al., 2009).

Il a été observé que le jeûne régule négativement l'expression de la PCSK9. D'ailleurs, d'autres équipes ont proposé l'existence d'une région de répression de la transcription sur le promoteur qui se localiserait quelque part dans la région entre -1027 à -1460 nucléotides du site de transcription (Costet et al., 2006). Certaines évidences démontrent que la transcription puisse effectivement subir une répression. Les acides biliaires et plus particulièrement, le CDCA (*chenodeoxycholic acid*) agiraient en tant que répresseurs de la transcription du gène de la PCSK9 sans affecter toutefois celle du LDLR (Langhi et al., 2008). Le mécanisme exact de cette répression n'est pas tout à fait clair mais il est connu que les acides biliaires ont la capacité de moduler la transcription génique. En effet, ils peuvent activer certains récepteurs nucléaires comme par exemple le FXR (*farnesoid X receptor*). Ce dernier est une protéine appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires hautement exprimée dans le foie et dans l'intestin, organes où PCSK9 est exprimée en abondance aussi. Si le récepteur FXR est activé, il va transloquer au noyau et lier l'ADN sur des régions régulatrices qui stimuleront ou réprimeront la transcription des gènes (Langhi et al., 2008). Aussi, il a été démontré que les fibrates comme par exemple FA (*fenofibric acid*) peuvent agir comme répresseurs de la transcription du gène de la PCSK9 par l'intermédiaire de l'activation du récepteur PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*) qui agit en tant que facteur de transcription se liant à une région régulatrice sur le promoteur du gène (Kourimate et al., 2008). La participation de ces facteurs pourrait effectivement expliquer la possibilité de régulation négative de l'expression de la PCSK9.

La transcription du gène génère un ARNm de 3731 nucléotides (*NCBI Reference Sequence: NM_174936.3*). Celui-ci code pour le précurseur de la protéine PCSK9 qui comporte 692 acides aminés avec une taille d'environ 75 kDa. Ce précurseur comprend

en N-terminal un peptide signal (résidus 1 à 30), suivi d'un prosegment (résidus 31 à 152), d'un domaine catalytique (résidus 153 à 405) qui contient la triade catalytique Asparagine– Histidine – Sérine (N-H-S), d'une région de liaison "hinge" (résidus 420-455) et finalement en C-terminal, un domaine riche en cystéines et histidines aussi connu comme CHRD (résidus 453-692).

Quatre transcrits possibles ont été identifiés pour ce gène. Le premier correspondant à un transcrit de 3891 pb (*Transcript ID : ENST00000490692; www.Ensembl.org*) mais ne produisant pas de protéine. Le second transcrit fait 1101 pb (*Transcript ID : ENST00000452118; www.Ensembl.org*) et code pour une protéine de 205 acides aminés. Le troisième transcrit de 1541 pb (*Transcript ID : ENST00000543384; www.Ensembl.org*) code pour une protéine de 266 acides aminés (www.ebi.ac.uk). Ces derniers pourraient constituer des isoformes de la PCSK9 mais il n'y pas encore de confirmation expérimentale disponible. Le quatrième transcrit code pour la PCSK9 pleine longueur formée de 692 acides aminés (*Transcript ID : ENST00000302118*) qui est à l'origine de toutes les publications à ce jour.

1.7.2 MATURATION DE LA PCSK9

La protéine issue de l'ARNm sera traduite sous forme de protéine zymogène soluble (preproPCSK9) et son peptide signal lui permettra de se rendre à la voie sécrétoire où elle subira des modifications post-traductionnelles (Figure 16).

Au niveau du réticulum endoplasmique, la preproPCSK9 sera clivée par une protéase à serine complexée à la membrane soit la ‘*signal peptidase*’ qui enlèvera le peptide signal en N-terminal. Ensuite, un deuxième clivage aura lieu mais cette fois il sera intramoléculaire et autocatalytique, il se fera tout de suite après la séquence ...VFAQ₁₅₂↓SIP... qui se trouve entre son prosegment et son domaine catalytique (Benjannet et al., 2004). Le prosegment de ~ 14 kDa (résidus 31 à 152) ainsi clivé va se replier dans la poche catalytique de la protéine et y restera attaché de façon très stable. Il est à noter que pour la plupart des PCs, le prosegment agit habituellement en tant que chaperone intramoléculaire. Celui-ci est essentiel pour la sécrétion et agit aussi en tant qu'inhibiteur de l'activité catalytique de l'enzyme. En général, pour qu'une proprotéine convertase puisse être activée, il lui faudra se défaire de son prosegment. Toujours dans ce compartiment, la PCSK9 subira une **N-glycosylation** dans son domaine CHRD, en C-terminal, sur l'acide aminé asparagine 533 (**Asn 533**) (Benjannet et al., 2004; Seidah et al., 2003). Ainsi, il sera requis pour la preproPCSK9 d'avoir subi le clivage intramoléculaire ainsi que la N-glycosylation afin de passer à l'organelle suivant (Seidah et al., 2003).

Issue du réticulum endoplasmique, la PCSK9 entrera par la face *cis* de l'appareil de Golgi, les oligosaccharides greffés sur l'Asn 533 seront remaniés par une série de réactions ordonnées qui se passeront tout au long de son passage du cis-Golgi jusqu'au trans-Golgi. Cette modification au niveau de la composition des sucres permet de différencier la localisation de la forme immature et la forme mature de la PCSK9. La forme encore immature du réticulum endoplasmique porte des sucres sensibles à l'action de l'endoglycosidase H qui clive les oligosaccharides riches en mannose, tandis que la forme mature localisée au Golgi est plutôt sensible à l'action de la PNGase F (*N-linked-glycopeptide-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)-L-asparagine amidohydrolase*) qui va plutôt de-glycosyler les glycoprotéines fixées sur les résidus asparagine.

Un deuxième type de modification post-traductionnelle que la PCSK9 subit au niveau de l'appareil de Golgi est la **sulfatation**. Celle-ci a été détectée de façon

majoritaire sur le résidu **tyrosine 38** (tyr 38) dans son prosegment et de façon minoritaire sur un résidu non déterminé situé possiblement sur le domaine catalytique. Cette modification serait accomplie par l'action d'une sulfotransférase dépendante du calcium, car lorsque les cellules en sont appauvries par une incubation avec l'ionophore A23187, il y a une diminution marquée de la sulfatation de la PCSK9 (Benjannet et al., 2006).

Le troisième type de modification que la PCSK9 subira est la **phosphorylation**. Deux phosphorylations auront lieu sur les résidus **sérine 47** et **sérine 688**, sur le prosegment et sur le CHRD respectivement. Il a été suggéré que l'enzyme responsable de la phosphorylation serait la *Golgi casein kinase-like kinase* (Dewpura et al., 2008). Il a été démontré que cette modification peut varier selon les différentes lignées cellulaires utilisées en laboratoire, mais que dans le plasma la PCSK9 se retrouve phosphorylée sur les deux résidus. En général, la phosphorylation des protéines est reconnue, entre autres, pour affecter leur "turn over", leur localisation subcellulaire, leur interaction avec d'autres protéines ainsi que leur conformation. Dans ce sens, il a été observé qu'une PCSK9 mutée à son résidu acide glutamique 49 (PCSK9 E49A ou PCSK9 E49D) ne subit plus de phosphorylation et qu'en plus une mutation de l'acide glutamique 49 par une alanine (E49A) affecte la protéine de telle sorte qu'elle subit un clivage additionnel. Ceci suggère qu'effectivement la phosphorylation de la PCSK9 contribuerait à une meilleure stabilité de la protéine ainsi qu'à une résistance à la protéolyse (Dewpura et al., 2008).

Toutefois, il a été observé que des mutations sur le résidu glycosylé (PCSK9 N533Q) ou sulfaté majoritaire (PCSK9 Y38F ou Y38E) n'affectent pas, ni le "processing" intracellulaire, ni l'activité de la PCSK9 envers son ligand LDLR (Benjannet et al., 2006).

La protéine ayant subi son autoclivage, attachée à son prosegment et portant ces résidus modifiés, constituera la protéine mature qui sera sécrétée par la cellule dans le plasma. Le nom sous lequel elle est davantage connue est PCSK9 pour *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* mais peut aussi se retrouver décrite sous certaines variations comme *convertase 9* ou *PC9* ou *subtilisin/kexin-like protease PC9* (NCBI). Auparavant, elle fut aussi connue sous le nom de NARC-1 pour *neural Apoptosis regulated convertase 1*.

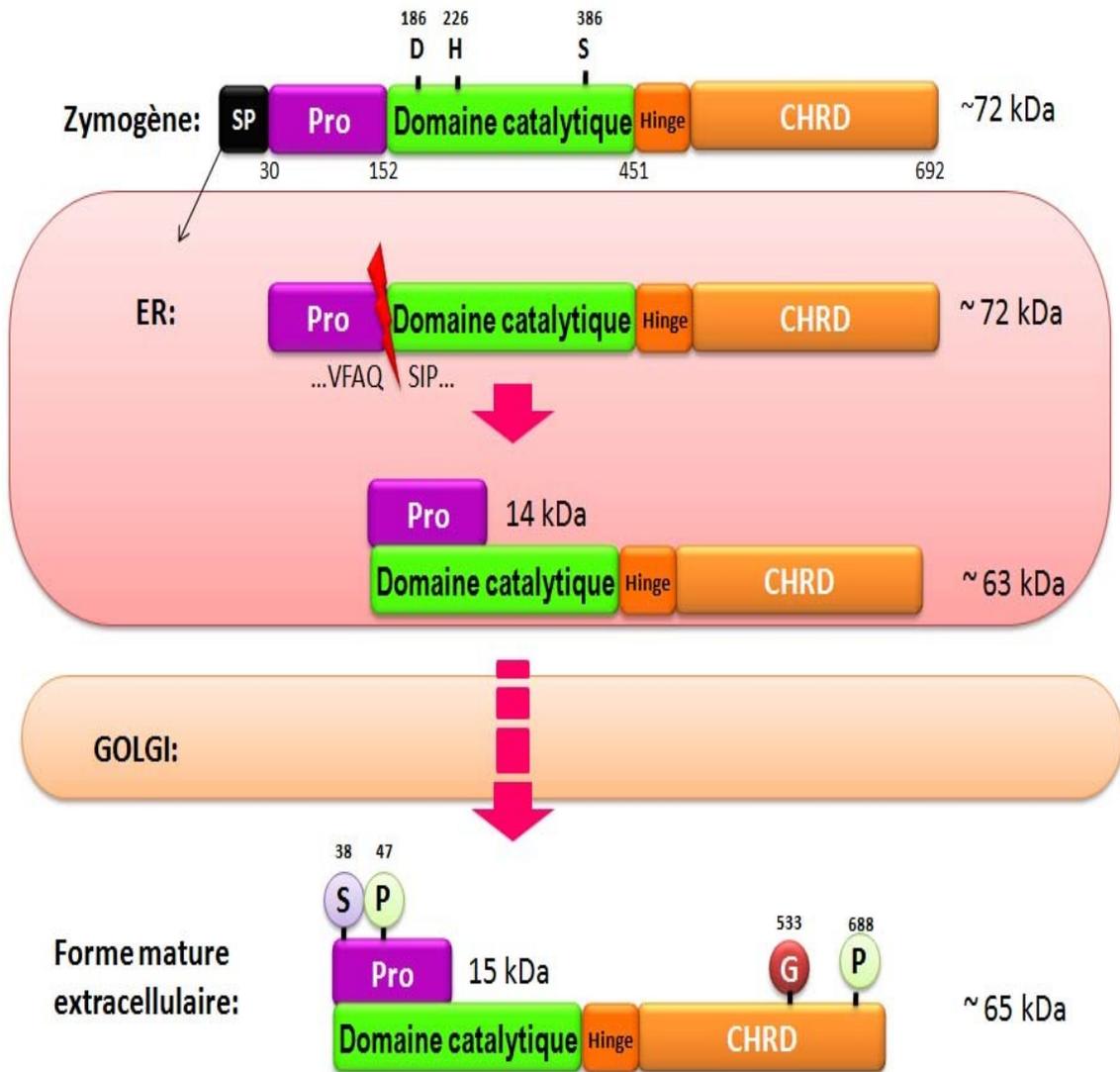


Figure 16 : Maturation et modifications post-traductionnelles de la PCSK9 dans la voie sécrétoire. (SP, peptide signal; Pro, prosegment; CHRD, *cystéine-histidine rich domain*)

1.7.3 DISTRIBUTION TISSULAIRE DE LA PCSK9

Chez la souris, l'analyse par hybridation *in situ*, révèle la présence d'ARNm codant pour la PCSK9 dans un nombre limité de tissus dont le foie, le rein, l'intestin grêle et le cervelet.

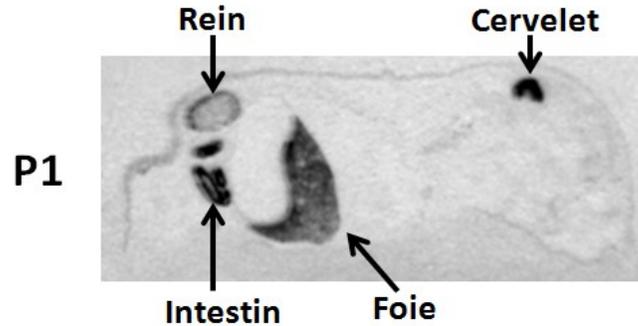


Figure 17 : Hybridation *in situ* d'une ribo-sonde de PCSK9 sur une souris au jour 1 post-natal (P1) (Seidah et al., 2003)

Il a aussi été observé que la région d'expression de la PCSK9 dans un même tissu peut varier entre l'état embryonnaire et l'état adulte:

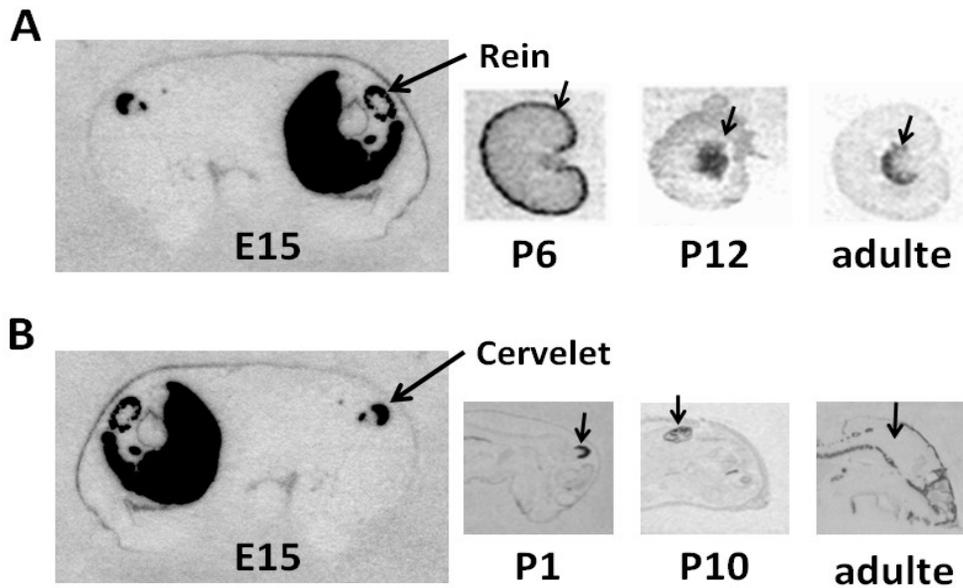


Figure 18 : Hybridation *in situ* d'une ribo-sonde de PCSK9 sur une souris à plusieurs stades de son développement (stade embryonnaire, post-natal et adulte) (A) Expression de l'ARNm de la PCSK9 au rein à E15 (embryon de 15 jours), P6, P 12 (jour 6 et 12 post-natal) et à l'âge adulte ; (B) Expression de l'ARNm de la PCSK9 au cervelet à E15 (embryon de 15 jours), P1, P 10 (jour 1 et 10 post-natal) et à l'âge adulte. (Seidah et al., 2003)

Au niveau du rein, l'ARNm de la PCSK9 est exprimé au cortex rénal jusqu'au jour post-natal P6 et ensuite sa localisation se précise pour l'expression à la médulla rénale. Au niveau du cerveau, l'ARNm de la PCSK9 est décelé dans le cerveau primaire durant l'état embryonnaire entre le stade E9 jusqu'à environ E13, par la suite l'expression se localise au cervelet du stade E15 jusqu'à environ P10 pour finalement disparaître à l'âge adulte.

L'analyse par Q-PCR des tissus de souris adulte (Figure 19) révèle que l'expression de la PCSK9 peut se retrouver à l'état de traces dans une variété d'autres tissus. Toutefois, les tissus plus riches sont clairement les mêmes où le foie se distingue comme tissu prédominant de la transcription de cette protéine.

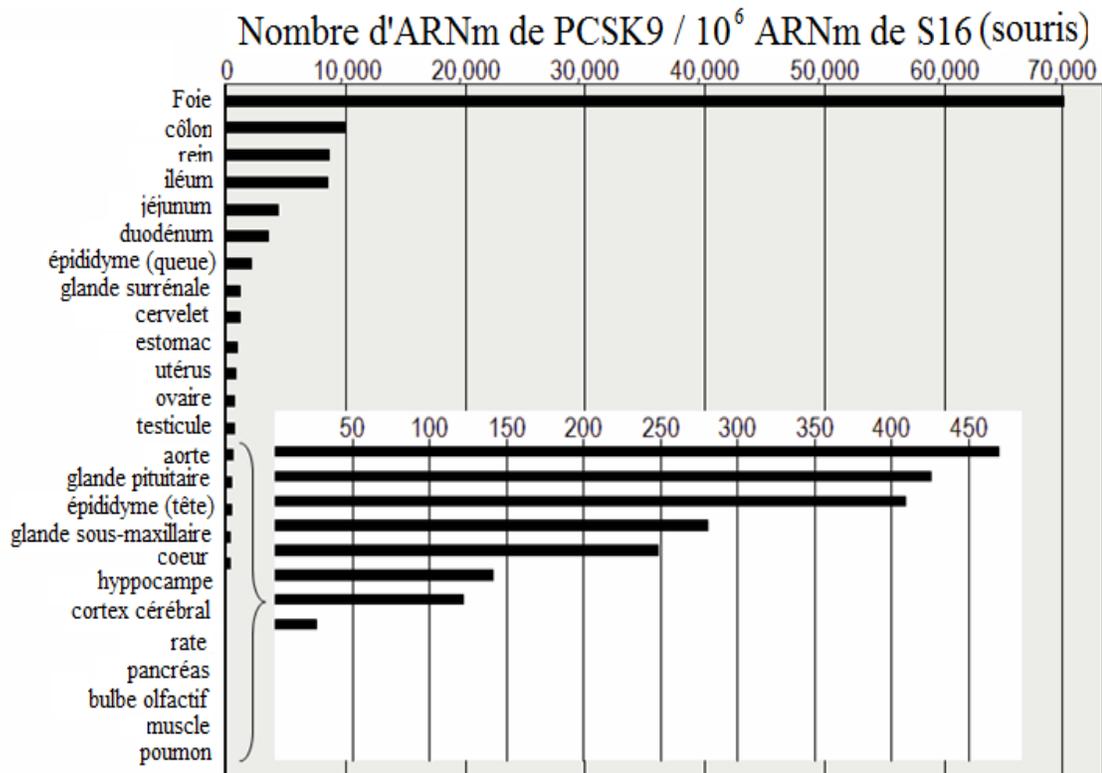


Figure 19 : Analyse de l'expression de l'ARNm de la PCSK9 dans différents tissus de souris adulte par Q-PCR (Zaid et al., 2008)

Chez l'humain, un modèle de transcription de la PCSK9 a été généré en utilisant des données du projet *Illumina Human Body Map 2.0* et démontre que parmi les 16 tissus humains analysés, la transcription de la PCSK9 semble prédominer au niveau du foie.

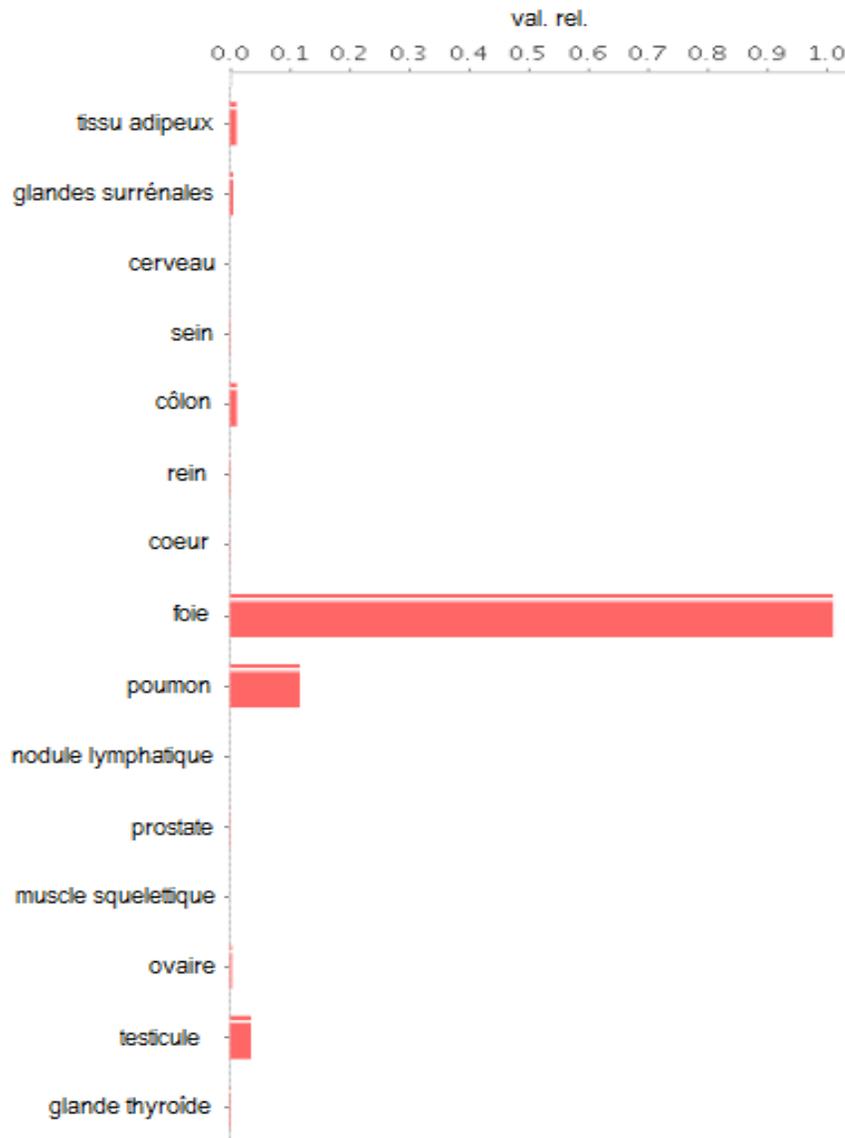


Figure 20 : Modèle d'expression du gène codant pour la PCSK9 dans différents tissus humains analysés lors du projet *Illumina Human Body Map 2.0* (http://bioinf.xmu.edu.cn/PaGenBase/genesp.jsp?username=5f7b6f26-9bad-4a53-9d78-af32f0b0122b&gene_family=ho&tissue=ti&genename=PCSK9&dataset=GSE30611@HO@TI@N&dpm=0.9846&sample=liver&spm=0.9923)

L'analyse par Q-PCR de l'expression de la PCSK9 dans différentes lignées cellulaires humaines a démontré que les lignées provenant du foie comme les hépatocytes de type HuH7 et HepG2 sont les plus actives dans la transcription de cette protéine suivies de certaines lignées provenant des cancers du côlon. Ces résultats corroborent le fait que la transcription du gène codant pour la PCSK9 se fait majoritairement dans le foie et plus particulièrement au niveau des hépatocytes.

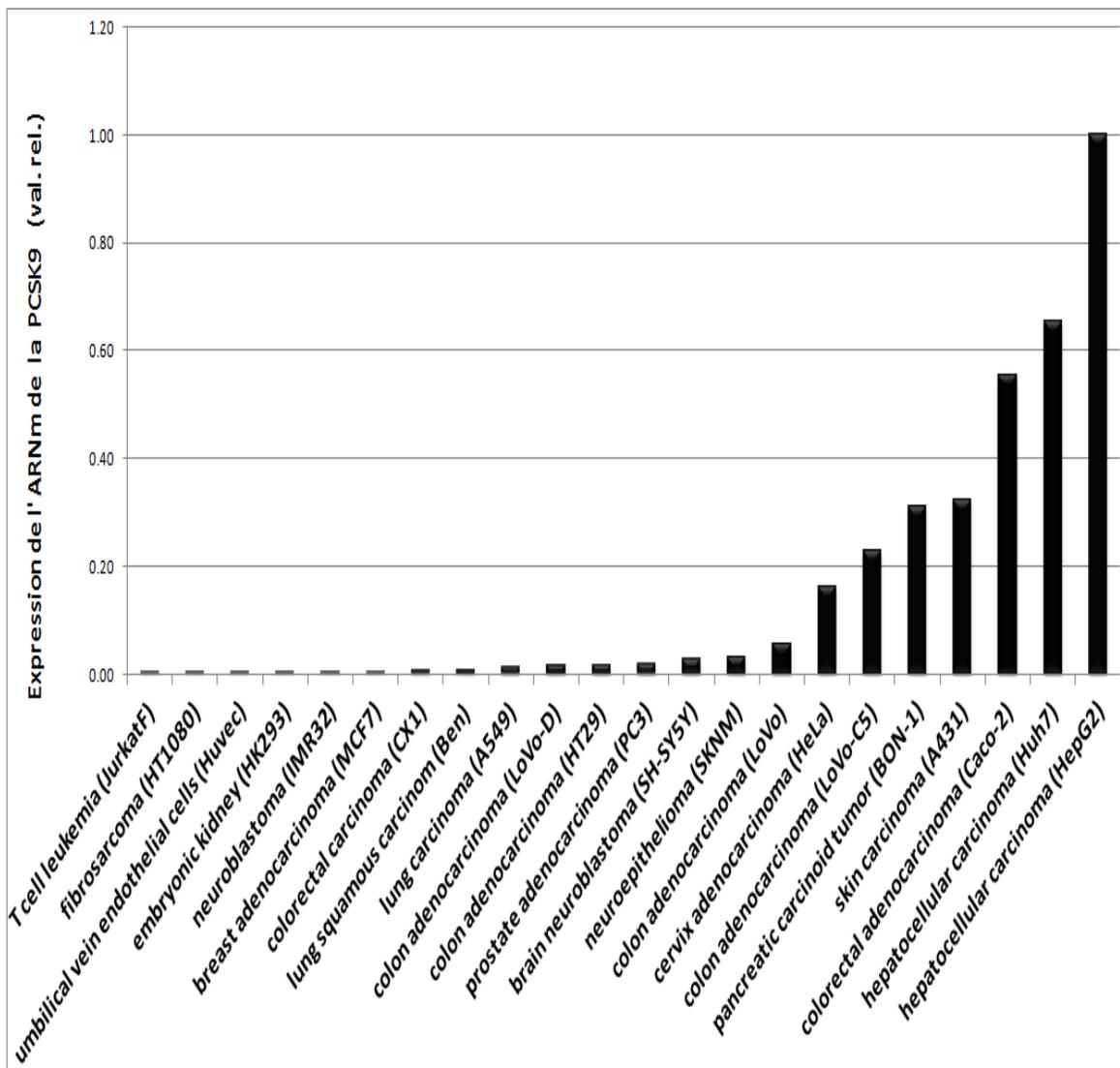


Figure 21 : Analyse par Q-PCR des différentes lignées cellulaires humaines (Seidah et al. 2005, résultats non-publiés)

1.7.4 PHYLOGÉNIE DE LA PCSK9

L'analyse phylogénétique comprend, dans la nouvelle classification, huit niveaux de classement hiérarchique soit : domaine, règne, embranchement, classe, ordre, famille, genre et espèce.

La classification des organismes vivants est classée selon trois grands domaines soit : *Bacteria*, *Archaea*, *Eucaryota* (Woese and Fox, 1977; Woese et al., 1990). Afin de tenter de retracer l'historique évolutif du gène de la PCSK9, une série de séquences provenant de plusieurs espèces furent alignées. Les organismes possédant le gène de la PCSK9 se retrouvent dans le domaine des *Eucaryota* et les espèces appartiennent au règne des organismes pluricellulaires des animaux (Figure 22).

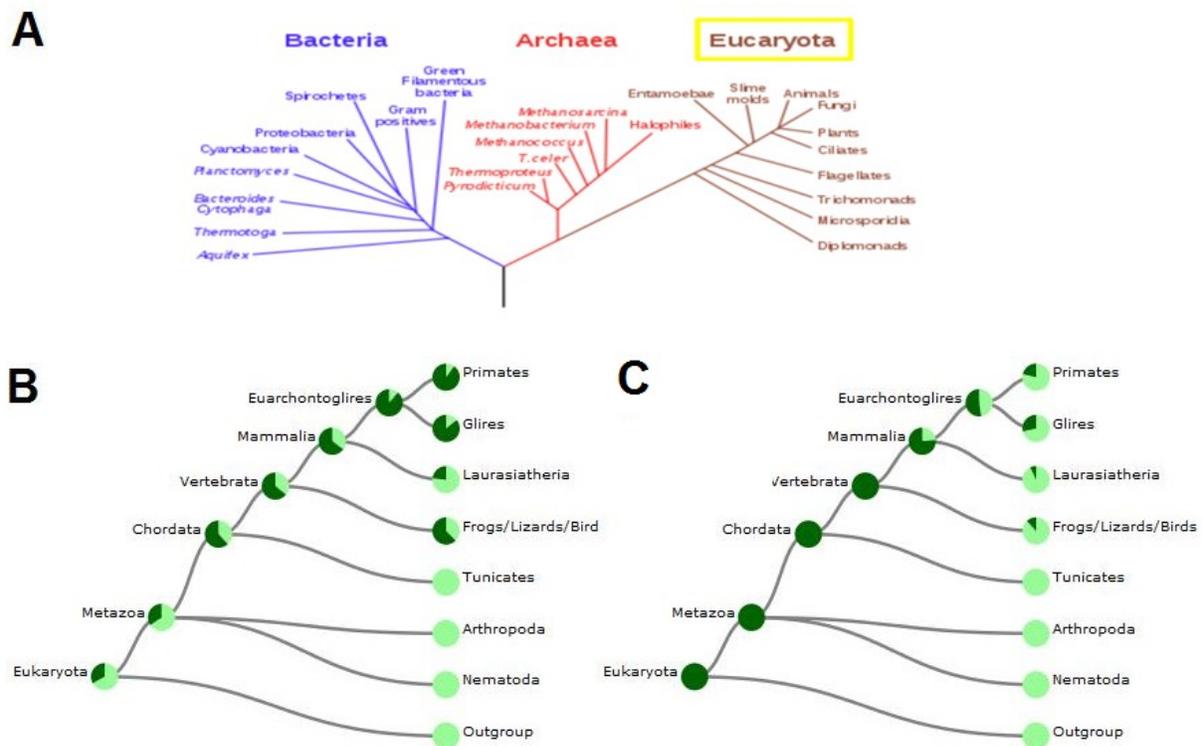


Figure 22 : Espèces possédant le gène codant pour la PCSK9. A) Arbre phylogénétique du monde vivant (Woese et al., 1990); B) Pourcentage (vert foncé) du **nombre d'espèces** possédant le gène codant pour la PCSK9; C) Pourcentage (vert foncé) de **similarité de séquence** (Ruan et al., 2008)

À partir d'une base de données regroupant les génomes complètement séquencés des différentes espèces (*Ensembl*, *NCBI*) une recherche fut lancée afin de trouver des homologues du gène codant pour la PCSK9. Le cladogramme obtenu fut généré grâce à la base de données d'arbres phylogénétiques *TreeFam* et identifia une quarantaine d'espèces partageant une similarité de séquence spécifiquement pour le gène de la PCSK9 (Figure 23).

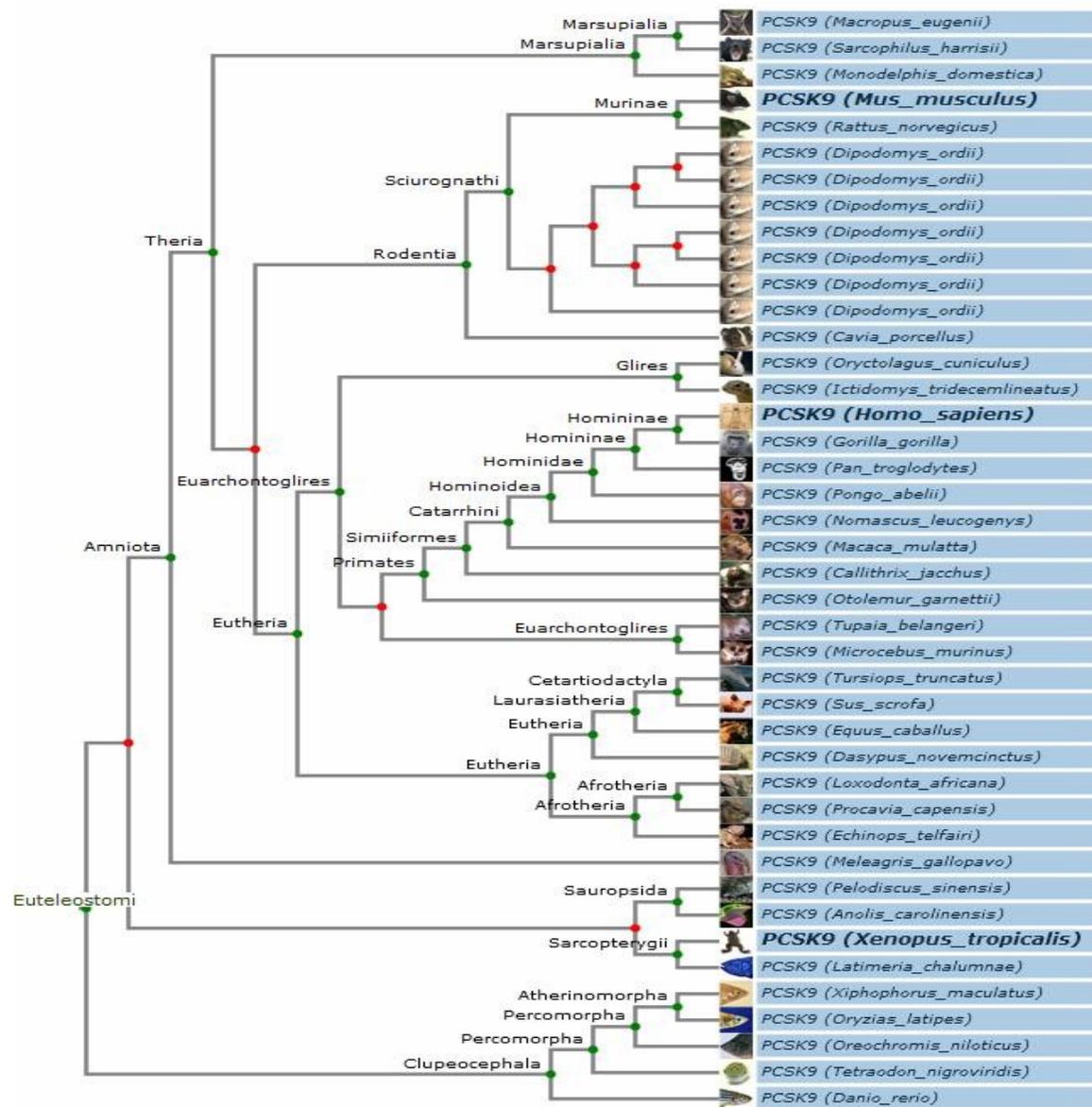


Figure 23 : Schéma de l'arbre phylogénétique de la PCSK9 résultant d'une comparaison des séquences du gène codant pour la PCSK9 entre les espèces obtenu par *TreeFam*. Humain (organisme modèle), en vert : nodule de spéciation, en rouge : évènement de duplication génique (Ruan et al., 2008)

D'autre part, la banque de protéines *Uniprot* identifie seulement vingt orthologues chez qui, la protéine PCSK9 serait effectivement traduite (Figure 24). De ce nombre, peu d'espèces ont été réellement séquencés puisque cette banque, bien que très utile comme support à la recherche dans le cadre de l'étude des maladies génétiques, emmagasine un ensemble des séquences protéiques **dérivées** des génomes séquencés. Ainsi les résultats obtenus, lors d'une recherche d'orthologues regroupe essentiellement des protéines "virtuelles" issues d'une prédiction à partir de l'ARNm.

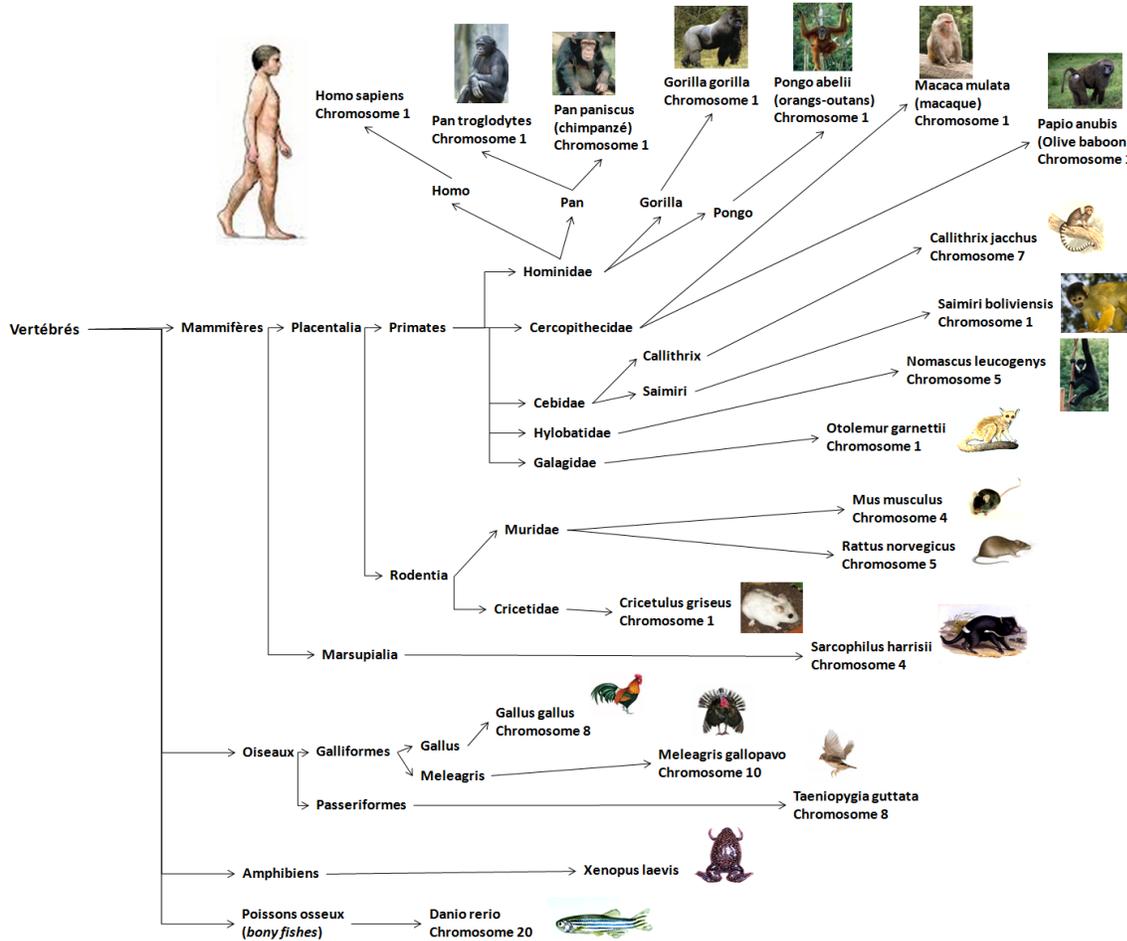


Figure 24 : Schéma d'un arbre taxonomique évoquant l'évolution du gène codant pour la PCSK9 (données de référence provenant de NCBI et *Uniprot*)

Au final, il est certain que ces informations apportent un peu de lumière sur l'historique évolutif de la PCSK9. Ainsi, il apparaît qu'uniquement les organismes pluricellulaires eucaryotes aient hérité de ce gène et parmi eux, seulement quelques espèces possédant une ossature puissent l'exprimer.

1.7.5 STRUCTURE DE LA PCSK9

La PCSK9 ainsi que les autres membres de la famille des proprotéines convertases, partagent une série de domaines similaires (Figure 25):

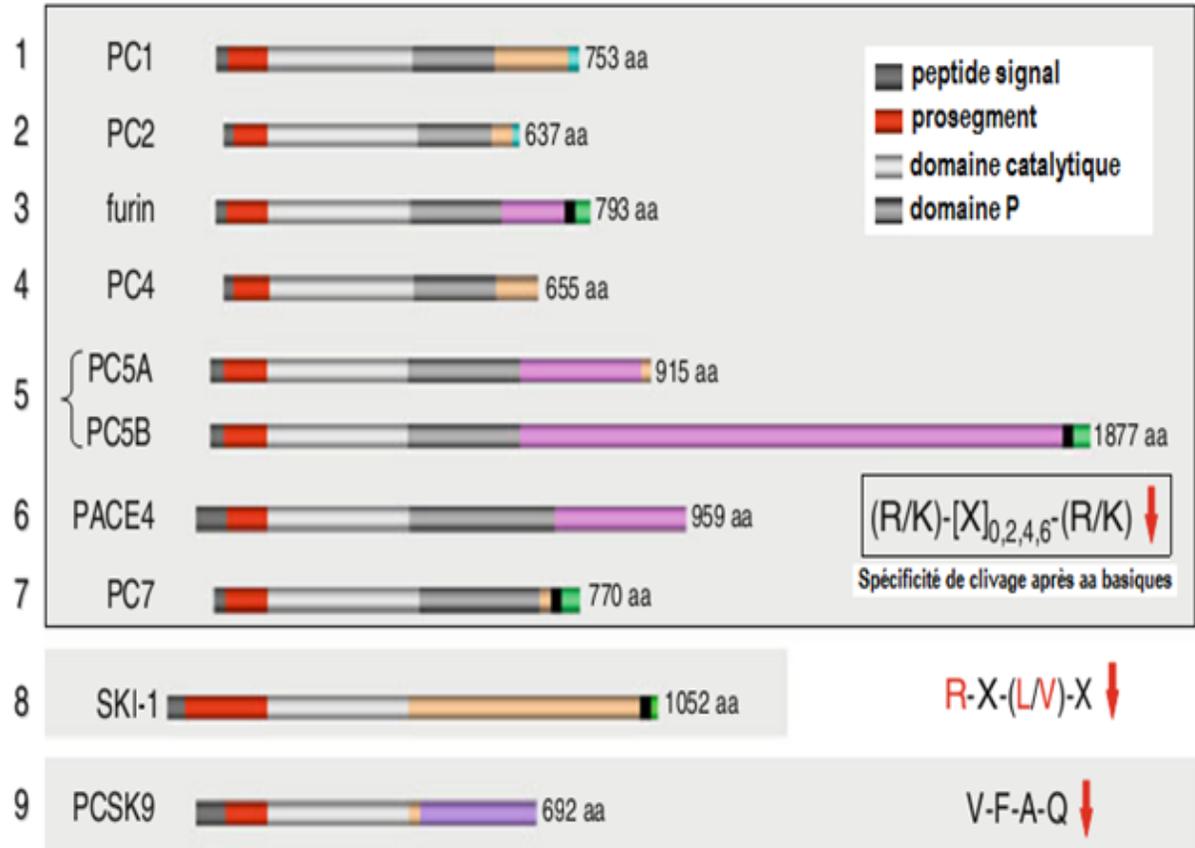


Figure 25 : Domaines composant la structure des proprotéines convertases. Adapté de (Seidah, 2011)

Depuis la découverte du gène de la PCSK9 en 2003 jusqu'en 2006, ce qui était connu concernant la composition en domaines de la PCSK9 se basait sur les résultats d'homologie entre les séquences effectués avec les autres convertases ainsi qu'avec la subtilase. Il a été observé, que tout comme les huit autres convertases, la protéine PCSK9 était composée d'un peptide signal, d'un prosegment, d'un domaine catalytique et d'un domaine en C-terminal riche en histidines et en cystéines équivalent au domaine P chez les autres membres.

En 2007, la structure tridimensionnelle moléculaire des domaines de la PCSK9 a été enfin révélée. Trois articles consécutifs ont été publiés par des chercheurs du milieu de l'industrie pharmaceutique: Cunningham et al. (Pfizer), Piper et al. (Amgen) et Hampton et al. (Novartis). Ils avaient réussi à produire, purifier et cristalliser la protéine PCSK9 humaine. La visualisation des structures publiées et certaines non-publiées, démontrent que la protéine PCSK9 produite dans une solution de pH 6.5, 7.4, 7.8, 8.5 ou 10.5, adopte relativement la même conformation tridimensionnelle. Celle-ci correspond alors à une conformation à l'aspect asymétrique suivant:

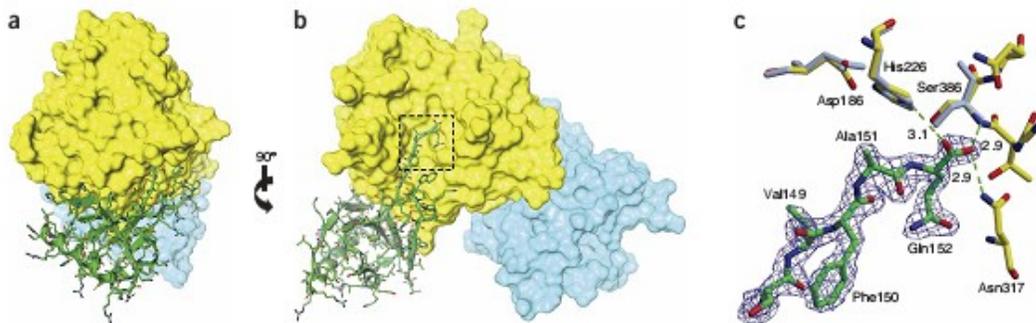


Figure 26 : Visualisation de la structure moléculaire de la PCSK9 (résidus 31-692) cristallisée à un pH de 8.5 et à une résolution de 1.98Å (a) vue de profil ; (b) vue de face; (c) vue de l'interaction du prosegment avec le domaine catalytique (Cunningham et al., 2007)

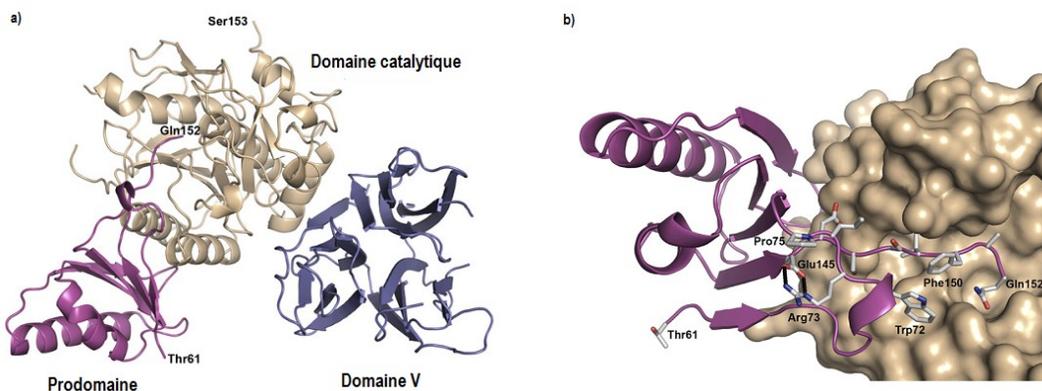


Figure 27 : Visualisation de la structure moléculaire de la PCSK9 (résidus 31-692) cristallisée à un pH de 7.8 et à une résolution de 2.3 Å (a) vue de face; (b) vue de l'interaction du prosegment avec le domaine catalytique (Piper et al., 2007)

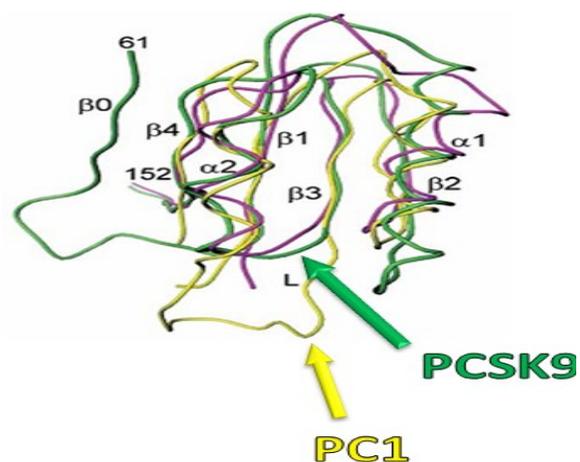
La densité électronique des molécules analysées, a permis d'observer la portion allant du résidu 61 au résidu 682 seulement. Ceci reflétait la structure stable de la molécule qui était visible. La mobilité de certaines petites régions a fait en sorte qu'il a été impossible de les analyser et donc apparaissent comme des régions invisibles.

Tout d'abord, il a été possible de visualiser parfaitement l'occupation du prosegment dans la poche catalytique de l'enzyme suite au clivage autocatalytique qui se passe au niveau du réticulum endoplasmique. Il a été observé que l'acide aminé glutamine 152, situé à la partie C-terminale du prosegment, crée un lien hydrogène avec la histidine 226 de la poche catalytique et occupe le trou de l'oxyanion de l'enzyme. Ainsi placé, il établit des liaisons hydrogènes avec l'azote localisé sur la sérine 386 et l'amide de l'asparagine 317 (Cunningham et al., 2007). Le prosegment est stabilisé dans la poche catalytique par plusieurs interactions moléculaires additionnelles. Par exemple, le tryptophane 72 établit une interaction hydrophobe avec la chaîne latérale de la phénylalanine 150 et forme aussi des liaisons hydrogènes avec la sérine 148, la leucine 74 et l'asparagine 146; puis l'arginine 73 forme un lien hydrogène avec l'acide glutamique 145 (Piper et al., 2007).

L'ensemble de ces liaisons intermoléculaires contribuent à maintenir le prosegment lié de façon quasi permanente au reste de la molécule. Il bloquera l'entrée au site catalytique de l'enzyme et agira ainsi comme un peptide inhibiteur.

La séquence primaire du prosegment de la PCSK9 montre une faible conservation avec celle de la PC1 (10% d'identité) et avec celle de la subtilisine (20% d'identité) et pourtant, lorsqu'on compare leurs repliements respectifs, ils sont étonnamment similaires (voir figure 28).

Figure 28 : Superposition des structures tridimensionnelles des prosegments de la PCSK9 (vert), la PC1 (jaune) et de la subtilisine (mauve) (adapté de Cunningham et al.)



Les structures tridimensionnelles des ces trois prosegments ont été superposées et une information importante en est sortie : la prorégion d'une convertase typique, comme la PC1, possède un long segment (*L-loop*) contenant des acides aminés basiques qui se prolonge à l'extérieur de la structure. Cette exposition, le rend accessible pour un deuxième clivage qui le déstabilisera et permettra son détachement du reste de l'enzyme. Ceci libérera l'enzyme, qui deviendra ainsi, une enzyme catalytiquement active. Différemment, le segment équivalent dans la prorégion de la PCSK9 contient des résidus neutres mais surtout, il est très court. Ceci défavorise grandement les chances qu'il puisse être approché et clivé.

L'analyse de l'effet de mutations des acides aminés autour du site de clivage, révèle que les résidus valine 149 en position P4 ainsi que la proline 155 en position P3' sont les plus critiques du motif (Ahmed et al., 2013). Une mutation de ceux-ci entraîne une diminution d'environ 80% du '*processing*' de la molécule (Benjannet et al., 2004). La structure tridimensionnelle démontre que les résidus en position P1 à P4 (VFAQ↓) sont bien logés dans la poche catalytique et davantage stabilisés que ceux en P5 et P6 (qui ne sont pas dans une cavité (Cunningham et al., 2007). Des études de caractérisation de la PCSK9, ont démontré que l'acide aminé en position 152 (P1 du site de clivage) tolère mal son remplacement par des acides aminés acides, basiques, aromatiques ou hydrophobes excepté pour la méthionine. Ces mutations entraînent une inhibition de l'autoclivage de la protéine ainsi que de sa sécrétion. Les seuls acides aminés pouvant partiellement remplacer la glutamine 152 en P1, sont la méthionine, l'alanine, la sérine ou la thréonine. Ces mutants permettront l'autoclivage du zymogène mais la sécrétion sera diminuée de plus de 50% (Benjannet et al., 2004; Benjannet et al., 2012; Naureckiene et al., 2003). La position P2 tolère mieux le remplacement par une sérine ou par une glycine plutôt que par une leucine. La position P3 semble critique puisqu'un changement par une alanine compromet grandement le clivage (Benjannet et al., 2004) La valine 149 en position P4 occupe un espace hydrophobe assez large, ce qui explique probablement sa tolérance lorsqu'il est muté par la leucine (Naureckiene et al., 2003).

Un autre aspect, surprenant et nouveau, observé lors de l'analyse des données cristallographiques de la PCSK9 est la structure particulière adoptée par son domaine CHRD en C-terminal. La structure de ce domaine comporte trois sous-domaines ou modules qui ont été désignés comme M1, M2 et M3 (Figure 29).

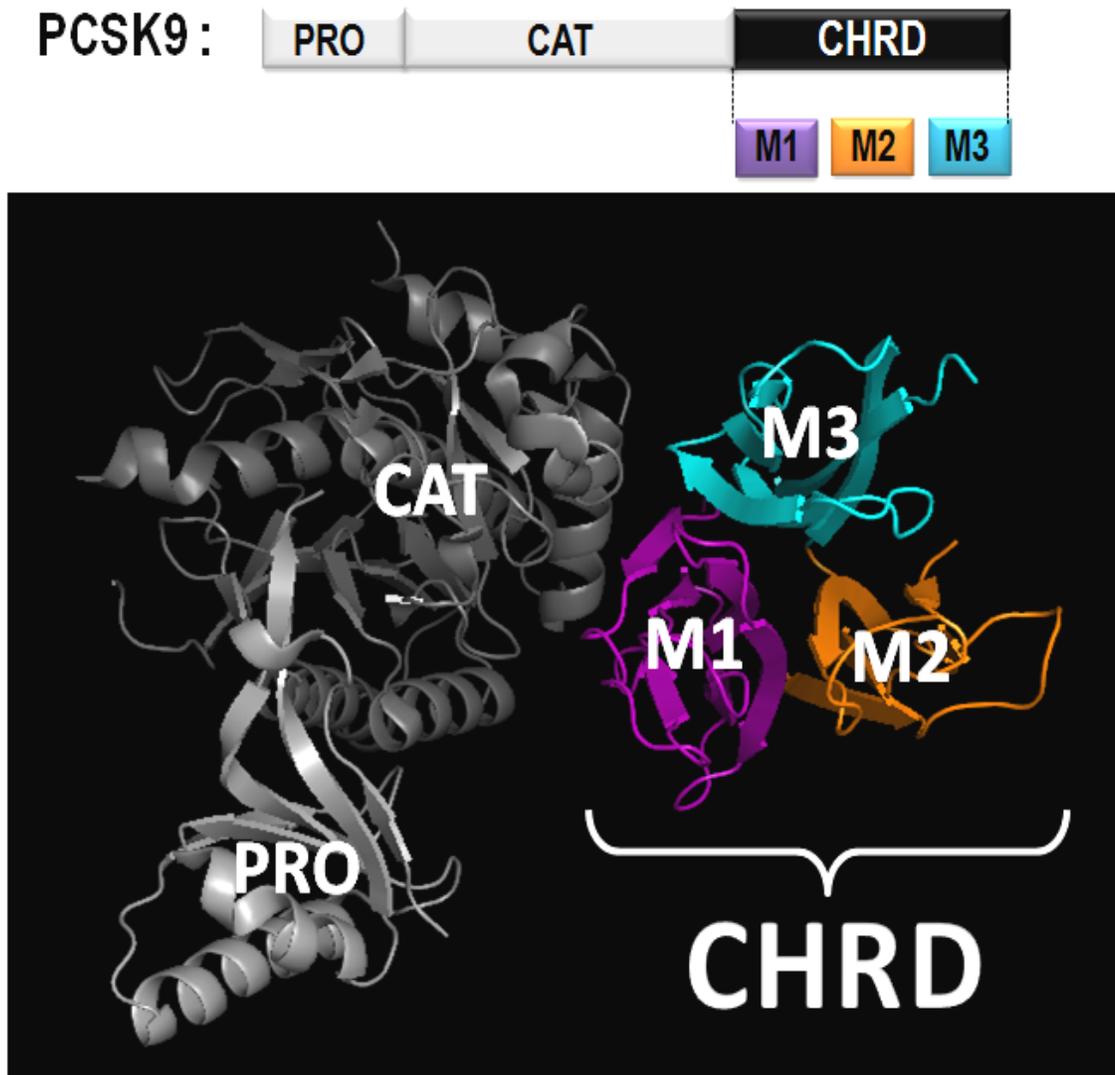


Figure 29 : Structure modulaire du domaine CHRD de la protéine PCSK9 (PRO, prosegment; CAT, domaine catalytique; CHRD, domaine riche en cystéines et histidines)

Le domaine CHRD présente une forme en trèfle composée de modules très bien définis. Chaque module est stabilisé par trois ponts disulfures (feuilles 1 et 6; 2 et 6; 3 et

5) et sont formés par six feuillets bêta antiparallèles (*sandwichs* de feuillets bêta) et aucune hélice alpha. Exceptionnellement, le module M2 ne possède que cinq feuillets bêta et dont le quatrième feuillet semble être mobile puisqu'il y a un manque de densité électronique autour de la région 572 à 584. Le module M3 présente aussi deux segments mobiles soit entre les résidus 660 à 667 et de 683 à 692. Cette mobilité les rend invisibles dans la visualisation tridimensionnelle moléculaire mais est un indicatif d'une certaine flexibilité du domaine CHRD (Cunningham et al., 2007; Piper et al., 2007). L'alignement des séquences des modules démontre que l'identité est très faible entre chacun. Soit de 19% entre les modules M1 et M2 ou entre M1 et M3 et de 29% entre les modules M2 et M3 (Cunningham et al., 2007).

La surface d'interaction du domaine CHRD avec le domaine catalytique de l'enzyme est relativement petite. Il y a trois ponts hydrogènes à l'interface des deux domaines et les autres interactions se résument à des interactions hydrophobes et de Van der Waals (Piper et al., 2007).

Une autre caractéristique très intéressante, fut l'observation de la présence d'une cavité tapissée de résidus histidine qui forme une sorte de couloir s'enfonçant dans la molécule (Figure 30).

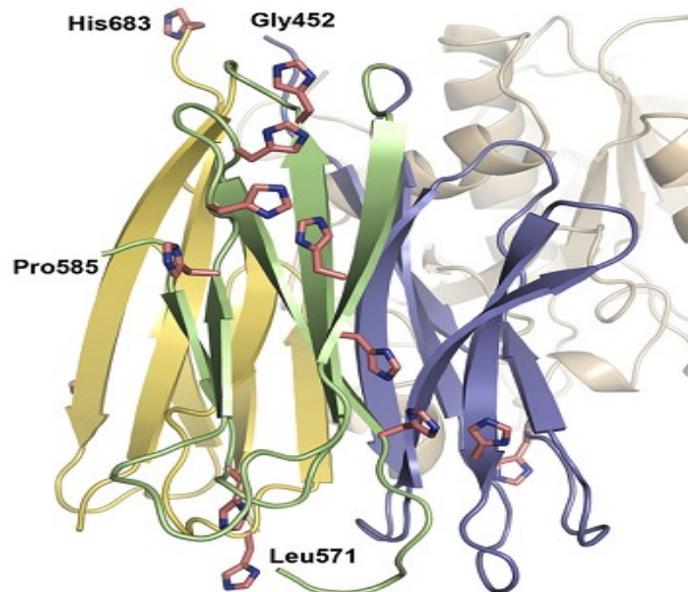


Figure 30 : Cavité tapissée de résidus histidines dans le domaine CHRD de la PCSK9 (Piper et al., 2007)

Le domaine CHRD est effectivement riche en cystéines et histidines. Il comporte 14 histidines en tout, réparties sur ses trois modules : 2 dans le module M1, 9 dans le module M2 et 3 dans le module M3. La ‘*histidine groove*’ (cavité tapissée d’histidines) se situe entre les sous-domaines M2 et M3 (Piper et al., 2007).

La comparaison de la séquence du CHRD avec celle des autres PCs a donné très peu d’identité, ce qui la rend unique dans cette famille. La seule protéine qui en formant des trimères (ou hexamères) adopte une structure relativement équivalente au repliement tridimensionnel du domaine CHRD est la résistine (Figure 31). Toutefois, elles ne partagent que 15% d’identité entre leurs séquences.

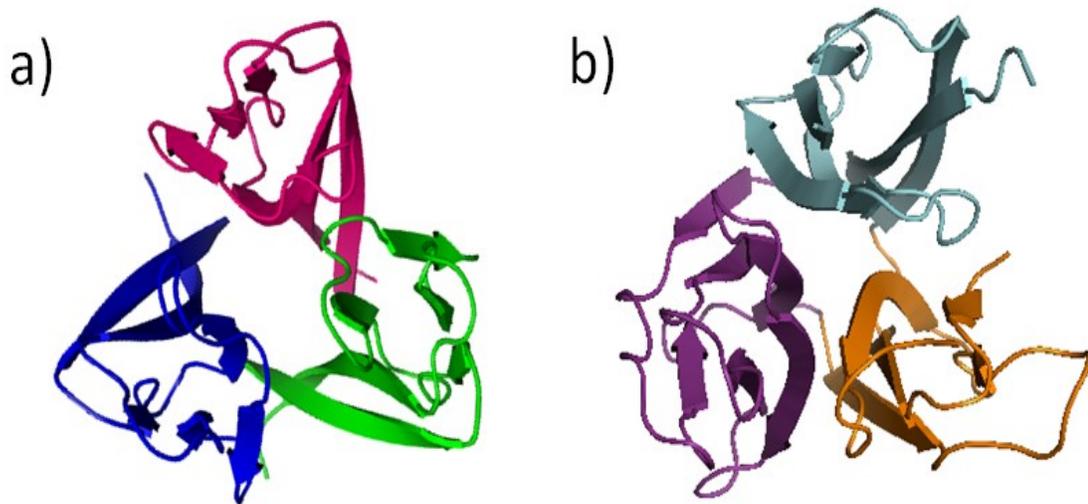


Figure 31 : Similarité de repliement tridimensionnel entre la partie C-terminale d’un trimère de résistine et le domaine CHRD de la PCSK9, (a) résistine; (b) CHRD

L’analyse de données cristallographiques a apporté d’une part, des précisions structurales importantes qui ont aidé à mieux définir les domaines structuraux composant la protéine (peptide signal résidus 1 à 30; prosegment, les résidus 31 à 152; domaine catalytique, les résidus 153 à 421; région ‘*hinge*’, les résidus 422 à 452 ; CHRD, résidus 453 à 692) et d’autre part, des informations indispensables pour la compréhension des propriétés fonctionnelles de la PCSK9.

1.7.6 RÔLE DE LA PCSK9 DANS LA RÉGULATION DU LDLR

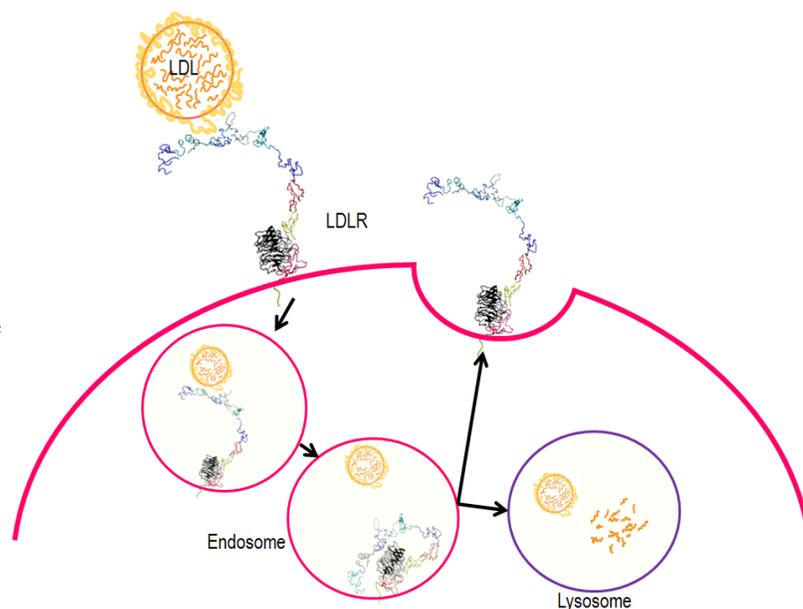
La protéine PCSK9 est principalement reconnue pour jouer un rôle direct dans la régulation du récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDLR) et par ce fait, son activité a un impact important dans le contrôle de l'hypercholestérolémie.

1.7.7 RÉGULATION EXTRACELLULAIRE DU LDLR PAR LA PCSK9

Parmi tous les types cellulaires, les hépatocytes sont reconnus pour produire la majorité de **PCSK9** qu'ils sécrètent dans la circulation sanguine. Le plasma contient aussi les lipoprotéines **LDL**, transporteurs des molécules de cholestérol estérifié, qui se rendent jusqu'aux hépatocytes afin de métaboliser leur charge. Ainsi, non seulement ces deux molécules se retrouvent dans le même environnement physiologique mais possèdent aussi la capacité de reconnaître et de lier la même protéine, soit le LDLR.

La fonction physiologique principale du LDLR est la captation des particules de LDL. Celles-ci seront reconnues et liées par leur apoprotéine B-100. Le complexe LDL=LDLR sera internalisé puis le pH acide de l'endosome entraînera un changement conformationnel du LDLR qui se dissociera de son ligand. La particule de LDL sera acheminée au lysosome pour être dégradée et le LDLR sera recyclé à la surface de la membrane cellulaire. Ainsi, il sera prêt à effectuer plusieurs rondes d'internalisation des lipoprotéines LDL avant d'être dégradé à son tour (Figure 32).

Figure 32 : Cycle de recyclage du LDLR. Liaison avec une lipoprotéine à basse densité (LDL), internalisation du complexe et recyclage du récepteur à la surface cellulaire.



L'activité de la protéine PCSK9 intervient dans le processus de captation des LDL par le LDLR. En effet, la PCSK9 baignant dans l'environnement immédiat des cellules, va entraîner un appauvrissement du nombre de récepteurs LDLR disponibles à la surface cellulaire.

L'effet négatif de la protéine PCSK9 provient de sa capacité à s'accrocher de plus en plus fermement au LDLR au cours des trois étapes de son action : liaison, internalisation et dégradation.

Premièrement, **la liaison**. Elle est directe et se passe à la surface cellulaire. Des expériences de délétion des domaines du LDLR ont permis l'identification du domaine impliqué dans sa liaison avec la PCSK9. Il a été démontré que le domaine EGF-A du LDLR reconnaissait et liait directement le domaine catalytique de la PCSK9 (Figure 33) (Zhang et al., 2007). La visualisation de cette liaison fut possible grâce à la co-cristallisation des deux molécules PCSK9=EGF-AB (Bottomley et al., 2009; Kwon et al., 2008; McNutt et al., 2009).

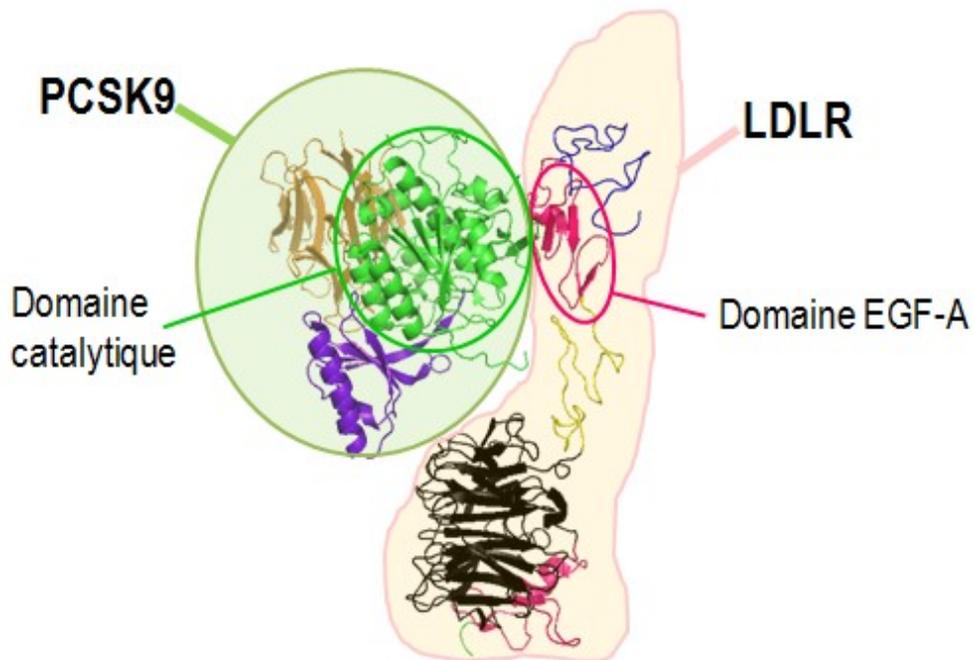


Figure 33 : Liaison directe du domaine catalytique de la PCSK9 avec le domaine EGF-A du LDLR. (co-cristallisation de la PCSK9 et du LDLR à pH 7.0; PBD : 3P5C)

Les modèles générés révèlent un contact entre les feuillets bêta antiparallèles des deux molécules qui forment des interactions polaires intermoléculaires. Il apparaît que les résidus localisés à la région N-terminale puis la région centrale du domaine catalytique de la PCSK9 participent dans les contacts avec les acides aminés localisés à la partie N-terminale du domaine EGF-A.

La modélisation moléculaire des co-cristaux démontre que la majorité de l'interface de liaison implique surtout la région comprise entre les résidus 367 à 381 de la PCSK9 avec la région comprise entre les résidus 295 et 318 du LDLR. Le rapprochement entre les deux molécules crée ainsi une interface hydrophobe où les résidus 377 à 379 de la PCSK9 seraient en contact avec les résidus 308 à 310 de l'EGF-A et parmi ces résidus, la phénylalanine 379 de la PCSK9 se retrouverait au centre de la région et établirait plusieurs contacts avec l'EGF-A. Une contribution à la liaison viendrait aussi de trois résidus clés pour la spécificité de la formation du complexe PCSK9=LDLR, soit la cystéine 378, l'acide aspartique 238 et l'arginine 194 qui forment des liens respectivement avec la leucine 318, l'asparagine 295 et l'acide aspartique 310 de l'EGF-A. Lorsque ces derniers sont mutés, il a été observé qu'il s'en suivait une diminution accrue ou une perte totale de la liaison (Kwon et al., 2008; Zhang et al., 2007).

Une petite contribution à la formation de la liaison, viendrait de la serine 153 de la PCSK9, située juste au site de coupure de son prosegment dans la partie extrême du N-terminal du domaine catalytique. Celle-ci formerait un lien avec l'acide aspartique 299 du LDLR.

Plusieurs équipes ont procédé à la mesure de la constante de dissociation (K_d) de cette liaison par résonance plasmonique de surface. Ainsi, le domaine extracellulaire du LDLR (LDLR ECD) fut fixé et la liaison testée avec une PCSK9 pleine longueur purifiée. En milieu de pH neutre, soit à pH 7.4, les valeurs obtenues sont de 169, 626, 628, 750 et 840 nM (Cunningham et al., 2007; Fisher et al., 2007; Lo Surdo et al., 2011; Mousavi et al., 2011; Piper et al., 2007). En comparaison, l'affinité de liaison du ligand LDL pour son récepteur LDLR mesurée par d'autres équipes révéla des K_d variant de 3 à 8 nM (Havekes et al., 1983; Innerarity et al., 1981; Maletínská et al., 2000; Nigon et al., 1991). Ainsi le ligand physiologique (LDL) a une plus grande affinité de liaison pour le LDLR que la protéine PCSK9 à pH plasmatique.

Deuxièmement, **l'internalisation**. Suite à la formation du complexe LDLR=PCSK9 à la surface cellulaire, le processus d'endocytose s'enclenchera au niveau du cytoplasme. À ce niveau, le mécanisme n'est pas encore complètement défini mais l'effort de plusieurs équipes a fourni un ensemble d'observations qui commencent à éclairer le processus en question. Tout d'abord, il fut proposé que l'internalisation se passait de façon semblable à celle du complexe LDL=LDLR et donc débiterait par la reconnaissance du motif NPVY (séquence d'internalisation) présent sur le domaine cytoplasmique du LDLR (Chen et al., 1990) par le domaine de liaison phosphotyrosine de la protéine intracellulaire ARH (*adaptor protein autosomal recessive hypercholesterolemia*)(Horton et al., 2007; Lagace et al., 2006; Qian et al., 2007). Cette dernière lierait avec une grande affinité (K_d 44nM) le motif NPVY puis initierait l'endocytose du complexe par un mécanisme dépendant de la clathrine (He et al., 2002; Wang et al., 2012).

Plus tard, une équipe observa que l'incubation des lymphocytes ARH^{-/-}, dont le LDLR avait perdu sa capacité d'internaliser, avec un milieu contenant de la PCSK9 extracellulaire menait quand même à une diminution des niveaux de LDLR. Cette nouveauté contrastait avec la nécessité de la protéine ARH pour l'internalisation et ouvrait la possibilité de l'existence d'un processus alternatif (Fasano et al., 2009).

Une autre équipe testa l'importance du domaine cytoplasmique du LDLR dans le mécanisme d'action de la PCSK9. Par la construction d'un LDLR chimérique ayant son domaine cytoplasmique échangé par celui d'un autre récepteur qui recycle aussi, le récepteur à la transferrine, il fut démontré que le processus d'endocytose se passa *quasi* de façon similaire à celui d'un récepteur de type sauvage. Non seulement le récepteur chimérique démontra une bonne stabilité à la surface cellulaire mais aussi qu'il était capable d'endocyter les molécules de LDL ou de PCSK9 de façon similaire au récepteur LDLR de type sauvage (Holla et al., 2010). De plus, la même équipe démontra aussi qu'un LDLR complètement délété de son domaine cytoplasmique permettait jusqu'à 76% d'internalisation de la PCSK9 extracellulaire comparativement au récepteur LDLR pleine longueur (Strøm et al., 2010). Ceci renforça la probabilité de l'existence d'un processus d'endocytose particulier du complexe LDLR=PCSK9 qui n'impliquerait pas obligatoirement la participation du domaine cytoplasmique du LDLR mais

éventuellement d'une autre protéine qui agirait en tant que co-récepteur possédant les séquences requises pour l'internalisation comme la transferrine.

Ainsi, l'implication des domaines extracellulaires du récepteur LDLR est indéniable pour la liaison mais la question reste encore ouverte à savoir s'il n'y aurait pas d'autre(s) protéines impliquées au niveau du processus d'internalisation du complexe.

Troisièmement, **la dégradation**. Cette dernière étape est déterminante pour le LDLR puisque son impact est direct avec les pertes des niveaux de LDLR cellulaires. Cette étape est aussi la moins bien comprise jusqu'à maintenant.

Tout d'abord, des recherches ont démontré que l'activité catalytique de la PCSK9 n'était pas nécessaire dans le processus de dégradation du LDLR. Ainsi, des expériences d'expression en *trans* du prosegment avec la portion catalytique inactive de la PCSK9 (mutée au résidu S386 de sa triade catalytique par une alanine) montrait que la protéine était capable non seulement d'être bien sécrétée mais aussi qu'elle conservait sa capacité à dégrader le LDLR de façon comparable à celle d'une protéine PCSK9 native (Li et al., 2007; McNutt et al., 2007).

Ensuite, une autre équipe étudia les domaines structurels nécessaires à la PCSK9 pour effectuer la dégradation du LDLR. Elle détermina qu'une PCSK9 tronquée de son domaine en C-terminal CHRD, était encore capable de lier le LDLR mais avait perdu totalement sa capacité de stimuler sa dégradation (Zhang et al., 2008). Ce fut la première évidence de l'importance de ce domaine si particulier.

À cette dernière étape, le complexe LDLR=PCSK9 se situe dans un endosome. À noter que l'acidité de l'environnement intérieur de l'endosome stimule un changement de conformation du LDLR (Davis et al, 1987; Rudenko et al 2002). Pendant un cycle régulier, ce changement entraîne la libération du ligand, LDL, par le récepteur qui peut alors se rediriger vers la surface cellulaire. Des recherches ont observé que l'acidité de l'endosome affectait aussi la PCSK9. Ainsi à pH neutre, il a été observé que le résidu D374 de la PCSK9 formait un lien hydrogène avec le résidu cystéine 319 de l'EGF-A. À pH acide, cette situation change. L'acidité du milieu entraîne des changements conformationnels des acides aminés dans les deux molécules. L'histidine 306 du LDLR qui à pH neutre se trouvait "tournée" de façon à favoriser un lien **intramoléculaire** avec la sérine 305 du LDLR, se trouve en milieu acide à subir une protonation qui résulte dans un changement d'orientation qui favorisera plutôt la formation d'un lien hydrogène

intermoléculaire avec l'acide aspartique 374 de la PCSK9 (McNutt et al., 2009) (Figure 34).

Plusieurs groupes ont mesuré, par résonance plasmonique de surface, la constante de dissociation (K_d) correspondant au complexe LDLR=PCSK9 à pH acide soit à pH 5.3 ± 0.1 . Les constantes obtenues sont de 1, 4, 35 et 42 nM (Cunningham et al., 2007; Fisher et al., 2007; Mousavi et al., 2011; Piper et al., 2007). Étonnamment, l'affinité de la liaison en milieu acide augmente grandement (> 100 fois) par rapport à l'affinité à pH neutre. Cette augmentation d'affinité démontre une très grande énergie de liaison entre les deux molécules. Ceci empêchera la libération du LDLR de son lien avec la PCSK9. Ces résidus furent donc identifiés comme acides aminés clés pour l'aspect “avidité de liaison” de la PCSK9 avec le LDLR.

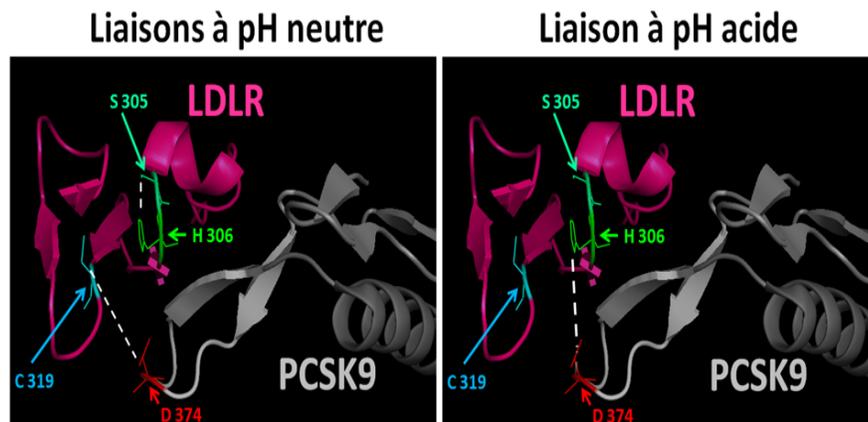


Figure 34 : Visualisation des différences de liaison entre le domaine catalytique de la PCSK9 avec le domaine EGF-A du LDLR, selon la variation du pH du milieu environnant.

Une équipe observa que le maintien des lysines situées dans le domaine cytoplasmique du LDLR, était important pour une dégradation efficace du complexe. En effet, la mutation des lysines en position 790, 795 et 809 résultait dans une diminution de la capacité de dégradation du LDLR (Holla et al., 2010).

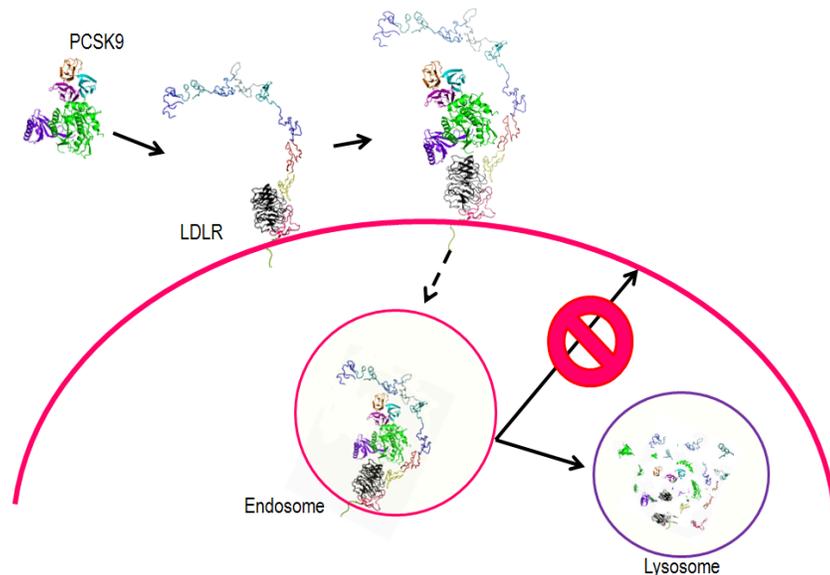
Au niveau cellulaire, il existe deux voies possibles de protéolyse des protéines, soit lysosomale soit cytoplasmique (comprend le protéasome et l'action des calpaines). L'utilisation des inhibiteurs de ces médiateurs démontra que la dégradation du complexe LDLR=PCSK9 se passait au niveau d'une structure acide comme le lysosome et non au

niveau cytoplasmique. En effet, les traitements des cellules avec un inhibiteur des cathepsines E64d ou avec des composés lysosomotropiques comme le NH_4Cl , résultaient dans un blocage de la dégradation du LDLR induite par la PCSK9 (Holla et al., 2011; Maxwell et al., 2005; Tveten et al., 2013; Wang et al., 2012). Par contre, un traitement avec des inhibiteurs du protéasome ou des calpains (ex : ALLN) n'affectait pas le processus de dégradation. L'utilisation des inhibiteurs spécifiques (ex : Pepstatine, phosphoramidon) pour différentes classes de protéases contenues dans le lysosome permit de déclinier la participation de certains types comme les protéases à acide aspartique et les metalloprotéases (Benjannet et al., 2004; Maxwell and Breslow, 2004).

Le mécanisme spécifique du processus de dégradation est encore inconnu ainsi que la participation d'autres protéines à celui-ci. À ce propos, une publication récente, propose l'implication d'une nouvelle protéine partenaire de la PCSK9, l'APLP2. Celle-ci serait recrutée suite à l'endocytose du complexe. Le type de liaison n'a pas été déterminé mais elle participerait dans l'acheminement de la PCSK9 complexée vers le lysosome (DeVay et al., 2013).

Ultimement, le LDLR sera détruit par l'action de la PCSK9, compromettant ainsi son cycle de recyclage. Il en résultera une diminution de sa disponibilité à la surface cellulaire pour la liaison des lipoprotéines LDL qui s'accumuleront de façon croissante dans le plasma. Cette accumulation conduira à l'hypercholestérolémie puis à la formation des plaques athérosclérotiques suivies des complications néfastes pour l'organisme.

Figure 35 : Effet extracellulaire de l'action de la PCSK9 sur le LDLR. Liaison de la PCSK9 au LDLR, internalisation et dégradation du complexe.



1.7.8 RÉGULATION INTRACELLULAIRE DU LDLR PAR LA PCSK9

L'existence d'un processus intracellulaire de dégradation du LDLR par la PCSK9 fut mis en évidence la première fois lors des expériences de surexpression de la PCSK9 dans des souris ARH^{-/-}, donc incapables d'initier l'endocytose du complexe PCSK9=LDLR formé à la surface cellulaire, où il fut observé une diminution marquée du LDLR total au niveau du foie (Park et al., 2004). Ensuite, d'autres expériences de surexpression dans des cultures primaires et des lignées d'hépatocytes ont montré que la PCSK9 n'intervenait pas dans la synthèse du LDLR mais plutôt dans la dégradation de sa forme mature (Maxwell et al., 2005). La dégradation était donc un évènement post-traductionnel. Le traitement des cellules avec un agent empêchant l'internalisation (Dynasore) démontra une diminution des niveaux de LDLR dans les cellules ayant été transfectées avec la PCSK9 (Poirier et al., 2009).

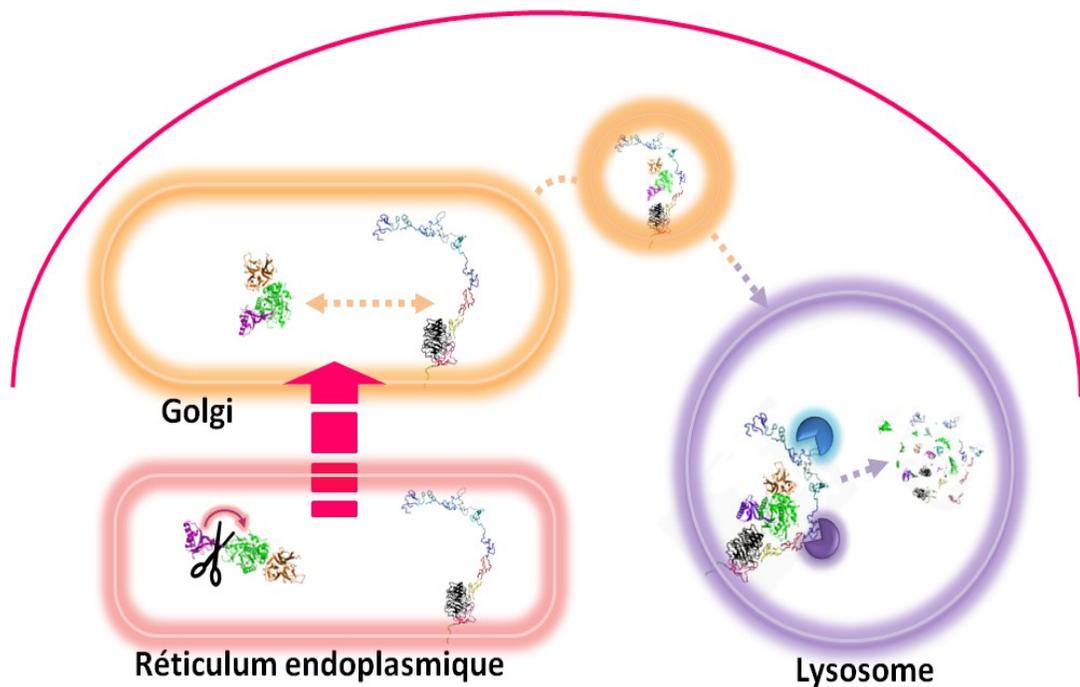


Figure 36 : Effet intracellulaire de l'action de la PCSK9 sur le LDLR.

Alors, outre la dégradation extracellulaire du LDLR par l'action de la PCSK9 sécrétée, le postulat d'un mécanisme de **dégradation intracellulaire** était renforcé et avançait qu'il pourrait avoir lieu quelque part lors du transit intracellulaire du LDLR

entre l'appareil de Golgi et la surface cellulaire (Figure 36) (Maxwell et al., 2005). Le lieu de dégradation serait un compartiment acide car un traitement des cellules avec un agent lysosomotrophique (ex : NH_4Cl) bloquait celle-ci (Maxwell et al., 2005). De plus, un autre groupe proposa l'implication de la molécule c-IAP1, une ligase de l'ubiquitine E3. Les expériences d'immunoprécipitation démontrèrent que seulement la région BIR3 (répétition 3 du baculovirus IAP) de la c-IAP1 liait directement la PCSK9 avec un K_d de liaison mesuré à pH 7.4 de 44.3 ± 5 nM. Il a été proposé que cette ligase intervienne à deux niveaux. Premièrement, en jouant un rôle dans la maturation de la proPCSK9, puisque dans son absence, seulement 10% de la PCSK9 arriverait à maturation. Ceci serait accompagné par la formation d'agrégats de proPCSK9 dans les cellules. Deuxièmement, elle interviendrait au niveau de la dégradation. En effet, il a été observé que l'ubiquitination de la PCSK9 impliquait principalement la présence de la lysine 27 de l'ubiquitine. Cette dernière aurait déjà été identifiée comme importante pour promouvoir la localisation vers le lysosome. À la lumière de ces observations, la ligase c-IAP1 est proposée comme "molécule escorte" du complexe PCSK9=LDLR pour faciliter son cheminement vers le lysosome (Xu et al., 2012).

1.8 AUTRES LIGANDS DE LA PCSK9

Au delà du rôle principal attribué à la PCSK9 pour dégrader le LDLR, il a été démontré qu'il existe d'autres ligands auxquels cette protéine peut s'associer.

1.8.1 RÉGULATION DU VLDLR ET DE L'APoER2 PAR LA PCSK9

Dans un premier temps, il y a deux récepteurs appartenant à la famille des LDLR qui ont démontré une capacité de liaison avec la PCSK9, soit le **VLDLR** (*Very low density lipoprotein receptor* ou *Low-density lipoprotein receptor-related protein 8; LRP8*) et l'**ApoER2** (*Apolipoprotein E receptor type 2*). Parmi tous les autres membres de cette famille, ces deux récepteurs sont ceux qui s'assimilent le plus au niveau structurel du LDLR et partagent avec lui une identité de séquence de 59% pour le VLDLR et de 46% pour l'ApoER2. Des expériences avec des cellules n'exprimant pas de LDLR (CHO-A7) mais surexprimant les récepteurs VLDLR ou ApoER2 ont démontré que les niveaux de ces derniers étaient négativement régulés en présence de PCSK9 (Poirier et al., 2008). De plus, il a été observé que la liaison de la PCSK9 à ces récepteurs était concentration-dépendante, tout comme avec le LDLR. Des expériences de compétition avec le domaine EGF-A, connu pour être le domaine de liaison spécifique du LDLR, ont démontré qu'il était en mesure de déplacer efficacement la PCSK9 lorsqu'elle était liée avec le LDLR ou avec le VLDLR mais moins avec l'ApoER2. Les valeurs d' EC_{50} (concentration d'EGF-A efficace médiane nécessaire pour déplacer 50% de la PCSK9 liée) obtenues suggéraient que la PCSK9 démontrait une plus grande affinité de liaison avec le LDLR (EC_{50} de 12.2 μ M ou 3.4 μ M en présence de calcium) qu'avec le VLDLR (EC_{50} de 4.7 μ M). La liaison avec l'ApoER2 a démontré être faiblement inhibée par l'EGF-A puisqu'il leur a fallu monter à des concentrations de 200 μ M pour obtenir au plus une inhibition de 70% de la liaison. Ainsi, ils en déduisent que le domaine de liaison pour la PCSK9 pour les trois membres de la famille des LDLR serait le EGF-A (Shan et al., 2008).

Tout comme le LDLR est impliqué dans le contrôle des LDL au niveau du foie, les deux autres récepteurs sont davantage impliqués dans la signalisation ayant lieu au niveau du développement du système nerveux.

Ainsi, une étude a mis en évidence que réduire l'expression du gène de la PCSK9 dans les neurones du cervelet granulaire (CGN), se traduisait par une augmentation des

niveaux d'ApoER2 et une diminution significative du processus d'Apoptose suite à une privation de potassium. Ceci permet de suggérer que la protéine PCSK9 pourrait être impliquée dans le processus d'Apoptose neuronal via une modulation des niveaux d'ApoER2 (Kysenius et al., 2012).

Une autre étude mit en évidence l'implication de la PCSK9 circulante dans le métabolisme du tissu adipeux indépendamment du LDLR. Ainsi, il a été démontré que la déficience en PCSK9, chez les souris *Pcsk9*^{-/-} ou *Pcsk9*^{-/-} *Ldlr*^{-/-}, mène à une dystrophie des adipocytes ainsi qu'à une augmentation de 40% des niveaux de VLDLR à leur surface cellulaire comparativement aux souris exprimant de la PCSK9. Toutefois, une restauration de la production de PCSK9 par le foie, fait en sorte que la PCSK9 circulante se rend jusqu'au tissu adipeux et rétablit les niveaux de VLDLR des cellules. Par conséquent, la PCSK9 est pressentie pour être un joueur important dans le métabolisme du tissu adipeux en limitant l'adipogenèse viscérale via la régulation des niveaux de VLDLR. À noter que ce fut la première étude qui mit en évidence une différence dans l'effet de la PCSK9 selon les sexes, puisque les femelles étaient davantage affectées par l'absence de PCSK9 que les mâles (Roubtsova et al., 2011).

1.8.2 LIAISON DE LA PCSK9 À L'ANNEXINE A2

Dans un deuxième temps, une protéine de la famille des annexines soit l'annexine A2 (Anx2) fut identifiée comme partenaire endogène de liaison de la PCSK9. Il a été trouvé que le domaine R1 de l'annexine A2 est le responsable pour sa liaison avec le domaine CHRD de la PCSK9. L'annexine A2 est une protéine qui se retrouve à la membrane cellulaire et dont l'ARNm est principalement exprimé au niveau du jéjunum de l'intestin grêle. Il a été observé que l'interaction de cette protéine avec la PCSK9 avait un effet inhibiteur sur l'action de cette dernière à dégrader le LDLR (Mayer et al., 2008). Cette observation fut corroborée par une autre étude qui évaluait le potentiel inhibiteur d'un peptide dérivé du domaine R1 de l'annexine A2, soit la région comprise entre les résidus 25 à 97 (73 acides aminés). Ce peptide démontra, *in vitro*, qu'il avait effectivement une capacité d'inhibition de la liaison PCSK9=LDLR avec une concentration inhibitrice médiane de $\sim 0.6 \mu\text{M}$ (IC₅₀). De plus, l'expression de l'annexine A2, *in vivo*, résulta dans l'augmentation des niveaux de LDLR dans le foie.

Finalement, le séquençage des exons humains correspondant à l'annexine A2 leur permit d'identifier une variation polymorphique (V98L), située dans le domaine R1 et qui était associée à des niveaux bas de PCSK9 circulante (Seidah et al., 2012).

1.8.3 RÉGULATION DU RÉCEPTEUR CD81 PAR LA PCSK9

L'implication du LDLR dans l'infection par le virus de l'hépatite C, incita des recherches sur un rôle éventuel que la PCSK9 pourrait jouer dans ce processus. Curieusement, l'expression stable de cette dernière dans la lignée d'hépatocyte HuH7, résulta dans une réduction marquée de l'expression du récepteur CD81. Des recherches *in vivo*, ont démontré que celui-ci est directement requis pour la propagation virale du virus de l'hépatite C. De plus, il a été observé que les niveaux du récepteur CD81 pouvaient être modulés de façon concentration-dépendante par la PCSK9 et ce, indépendamment du LDLR. D'autres expériences ont démontré que chez les souris n'exprimant pas de PCSK9 l'expression de CD81 se trouvait réduite. Ainsi elle serait capable de moduler, par une régulation négative, l'expression du récepteur CD81. Sur la base de ces observations, un nouveau rôle fut proposé pour la PCSK9, celui de protéine antivirale (Labonté et al., 2009).

1.8.4 RÉGULATION DE BACE1 PAR LA PCSK9

La bêta-sécrétase 1 ou BACE1 est reconnue pour être l'enzyme responsable de la génération du peptide bêta-amyloïde dont l'accumulation est à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Cette protéase est synthétisée par la cellule, transite à travers la voie de sécrétion afin d'arriver à sa forme mature et va ensuite s'ancrer à la surface cellulaire où elle exercera sa fonction. Au cours de son passage à travers la voie sécrétoire, cette enzyme subit l'acétylation de sept résidus lysine situés au niveau de son domaine N-terminal (Costantini et al., 2007). Cette modification post-traductionnelle a pour but de protéger la protéase naissante afin qu'elle puisse se rendre jusqu'à l'appareil de Golgi pour finir sa maturation. Autrement, les protéases non-acétylées seront acheminées vers les compartiments de dégradation. L'implication de la PCSK9 dans la régulation de BACE1 est mitigée puisque certaines recherches effectuées *in vitro*, sur des lignées cellulaires et *in vivo* chez des souris *Pcsk9*^{-/-}, ont trouvé que la PCSK9 pouvait lier

directement BACE1 et contribuerait au processus de dégradation des protéines BACE1 non-acétylées (Jonas et al., 2008). Par contre, ces résultats furent contredits par un autre groupe de recherche qui observa que les niveaux de BACE1 restaient invariables au niveau du cortex cérébral dans trois génotypes différents de souris soit celles exprimant la PCSK9, des souris *Pcsk9*^{-/-} ou des souris transgéniques pour la PCSK9 (Liu et al., 2010).

1.8.5 RÉGULATION DU CANAL SODIQUE ÉPITHÉLIAL ENaC PAR LA PCSK9

Le canal responsable du transport des ions sodium présent sur la membrane apicale des cellules épithéliales est appelé ENaC (*Epithelial Na Channel*). Il a été démontré que son activité peut être régulée par l'action de plusieurs protéases. Ce canal est connu pour être impliqué, entre autres, dans certaines formes d'hypertension. Ainsi, sa fonction est critique pour le maintien des niveaux de sodium qui sont importants pour le contrôle de la pression artérielle. Puisque la PCSK9 est exprimée au niveau du rein, l'hypothèse qu'elle puisse être impliquée dans la régulation du canal ENaC fut expérimentée. Les résultats obtenus conclurent qu'effectivement elle intervenait en contribuant à la dégradation du canal sodique lors de son passage à travers la voie de sécrétion. Il fut démontré par des expériences d'immunoprécipitation, qu'elle lie ENaC. Le mécanisme de liaison direct ou indirect n'a pas encore été déterminé. Toutefois, ce qui semble clair, c'est que la PCSK9 interviendrait préférentiellement au niveau de l'exocytose du canal et non au niveau de son endocytose. Son lieu d'action se situerait au niveau du réticulum endoplasmique où elle dirigerait le canal sodique à une dégradation par le protéasome. Au final, l'activité de la PCSK9 résulterait dans une diminution des canaux ENaC à la surface cellulaire et par conséquent affecterait directement l'absorption des ions sodium. Par ce fait, les risques d'hypertension seraient grandement augmentés (Sharotri et al., 2012).

1.9 MUTATIONS NATURELLES DE LA PCSK9

Le séquençage de l'ADN des patients souffrant d'hypercholestérolémie familiale révéla l'existence de diverses mutations naturelles du gène codant pour la PCSK9 (Figure 37). D'autres mutations furent aussi repérées chez des individus ayant un profil lipidique "normal" ou soit un profil particulièrement hypocholestérolémique. Grâce à leur relation directe avec le phénotype d'hyper ou d'hypocholestérolémie indépendant de quelque influence des mutations sur le gène codant pour le LDLR ou l'ApoB, ces mutants naturels servirent au développement d'importants "outils moléculaires". Ceux-ci constituent des outils précieux dans l'étude et la compréhension du mécanisme d'action de la PCSK9.

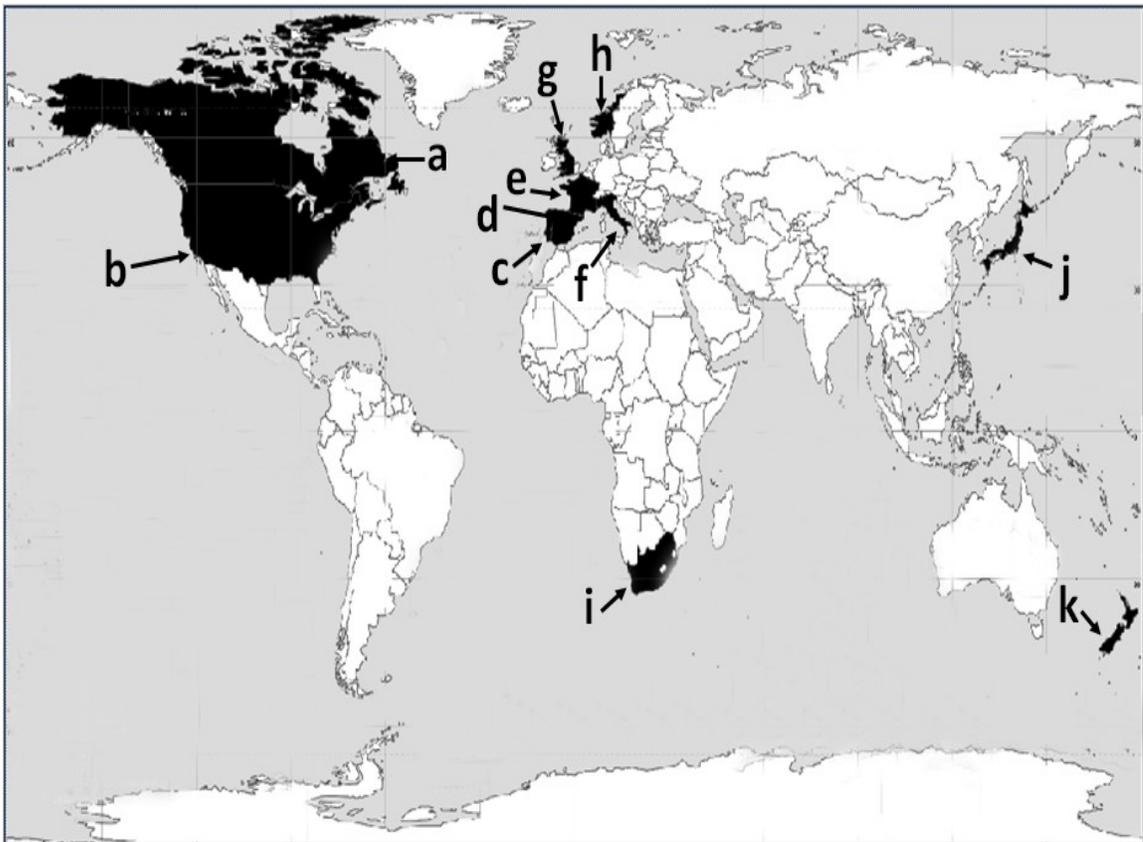


Figure 37 : Pays de provenance des individus possédant des mutations naturelles sur le gène de la PCSK9. (a) Canada, (b) États-Unis, (c) Portugal, (d) Espagne, (e) France, (f) Italie, (g) Grande Bretagne, (h) Norvège, (i) Afrique du Sud, (j) Japon et (k) Nouvelle Zélande.

Une base de données, à accès libre, répertorie une liste presque complète des mutations naturelles de la PCSK9 (Leigh et al., 2009). La compilation des mutations naturelles publiées affectant la région codante de la PCSK9 démontre qu'elles se répartissent à travers tous les exons composant le gène (Figure 38). Il est à noter que les mutations peuvent aussi affecter les régions 5'UTR, 3'UTR du gène ainsi que ses régions non-codantes (introns).

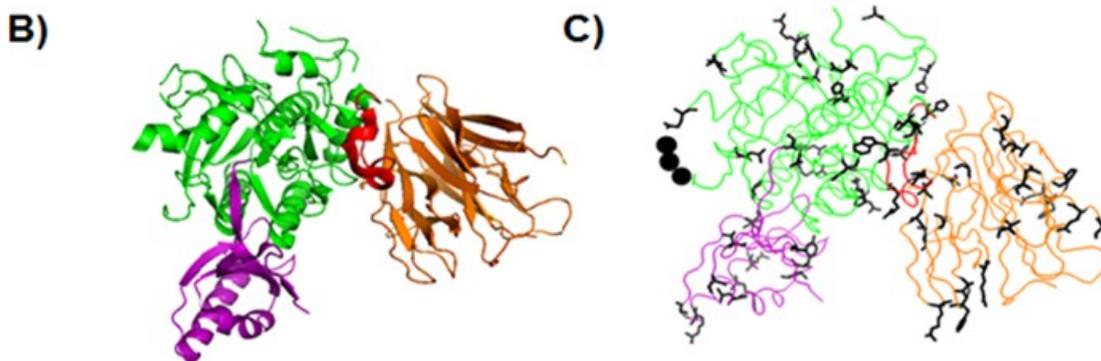
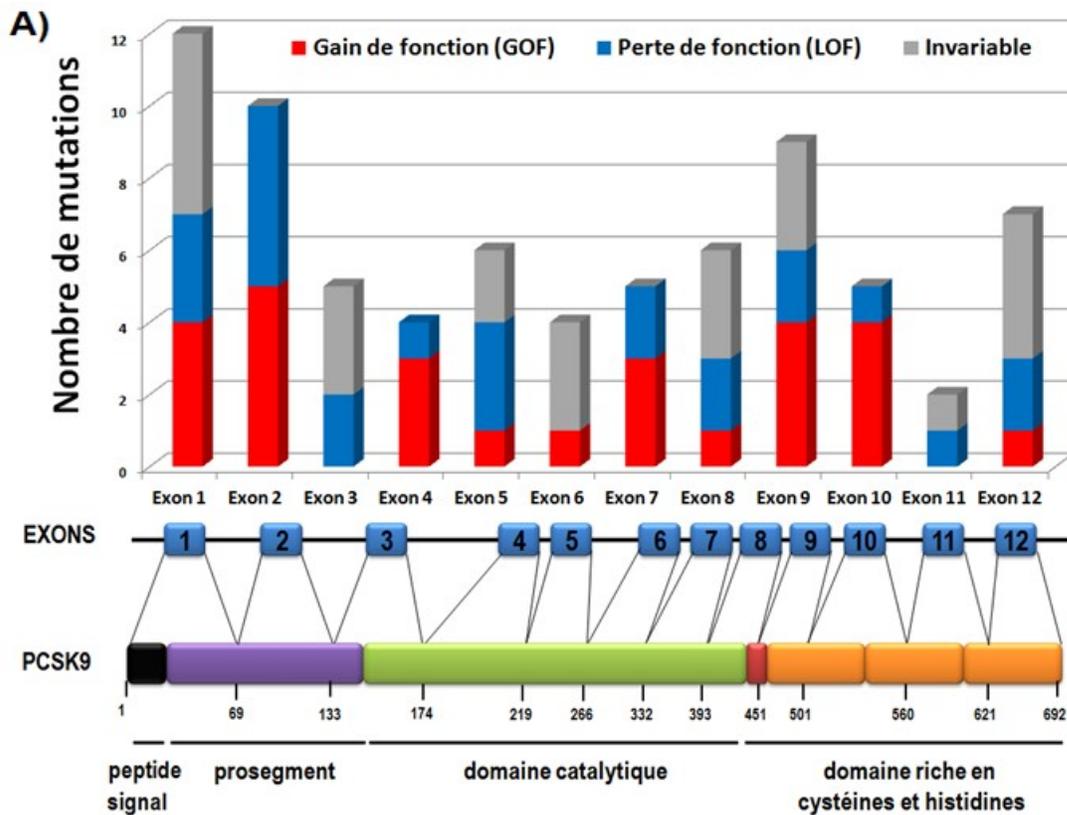


Figure 38 : Mutations naturelles de la PCSK9. (A) Histogramme montrant le nombre de mutations affectant chaque exon. (B) et (C) Modélisation de la structure 3D de la PCSK9. (C) Localisation des mutations sont montrées par les résidus noirs et les cercles noirs sont des résidus mutés non visibles sur la structure du cristal.

Par exemple, au niveau de la région 5'UTR cinq mutations ont été rapportées dont une seule a démontré affecter le promoteur et donc l'activité transcriptionnelle du gène en l'augmentant de 2.5 fois (Blesa et al., 2008). Ceci a pour effet une production accrue de la protéine PCSK9 qui se reflète par une augmentation de son activité de dégradation du LDLR.

Parmi l'ensemble des mutations sur la région codante, il a été observé que seulement certaines auront des effets réels sur l'activité de la protéine. Il y a les mutations dites "invariables" ou silencieuses qui n'auront pas d'effet particulier sur l'activité "normale" de la PCSK9. Les mutations dites "Perte de fonction" ou LOF (*Loss of function*) compromettront à la baisse la production de la protéine mature et/ou son activité. Les mutations dites "Gain de fonction" ou GOF (*Gain of function*) seront probablement les plus "dommageables" car elles entraîneront les plus lourdes conséquences puisqu'elles contribueront à renforcer la capacité de la PCSK9 dans son rôle de régulateur négatif du LDLR (Figure 39).

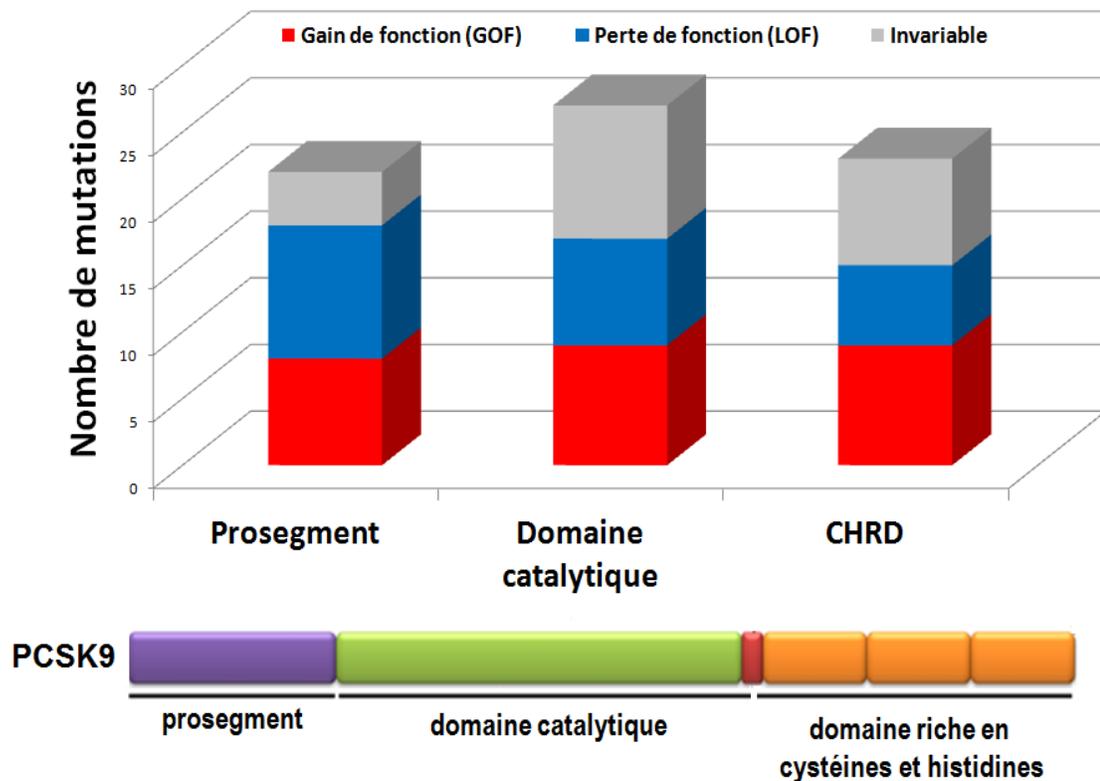


Figure 39 : Mutations naturelles de la PCSK9. Histogramme montrant le nombre de mutations affectant chaque domaine structurel de la PCSK9.

Parmi les types de mutations répertoriées affectant la PCSK9, la plupart sont des substitutions ponctuelles et rarement des insertions ou des délétions. La majorité des substitutions sont des mutations faux-sens qui impliquent un remplacement d'un nucléotide par un autre. Une minorité des mutations sont non-sens, elles insèrent un codon stop dans la séquence, ce qui entraîne un arrêt prématuré de la transcription du gène produisant une protéine tronquée et souvent inactive.

Une disposition des mutations, tout effet confondu, sur les domaines structuraux formant la PCSK9 (Figure 39) nous permet de constater qu'elles ont lieu à ~ 31% au niveau du prosegment, à ~ 38% au niveau du domaine catalytique et à ~ 32% au niveau du CHRD. *Grosso modo*, tous les domaines en sont affectés à une proportion comparable en termes de nombre de mutations.

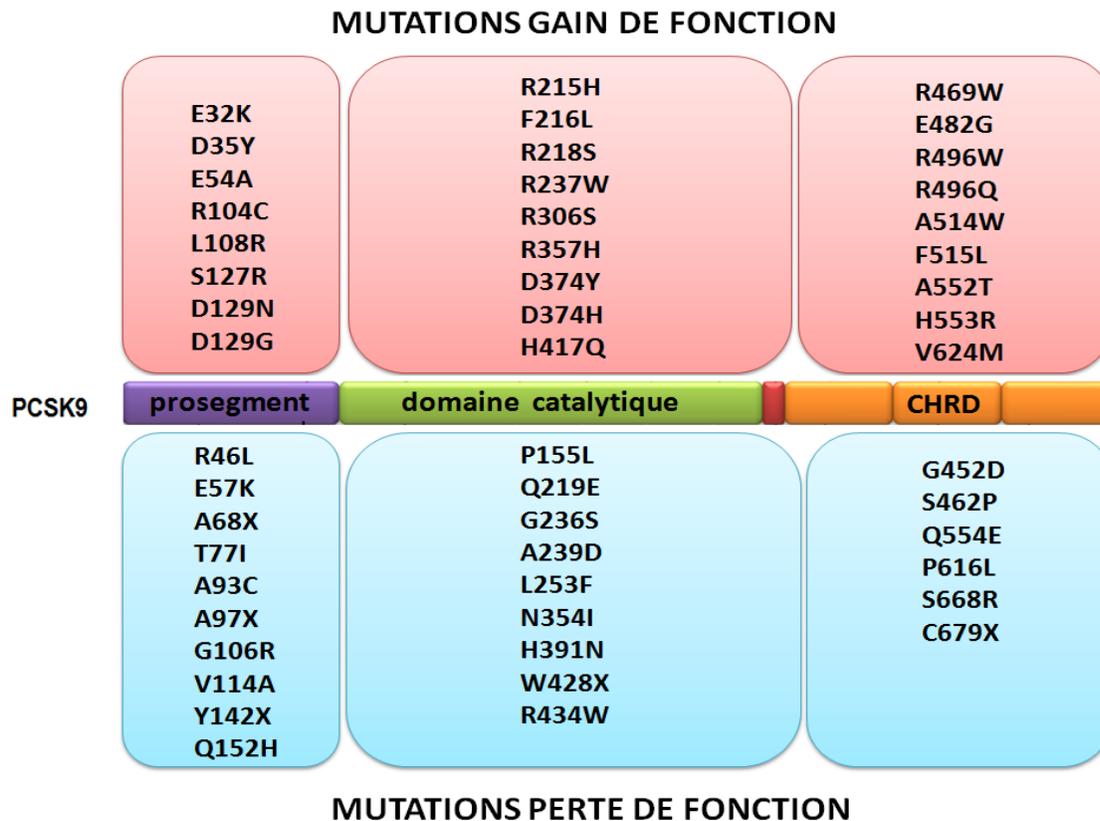


Figure 40 : Mutations naturelles répertoriées GOF ou LOF de la PCSK9 selon les niveaux de LDL-C mesurés dans les sérums des patients.

En termes d'effet direct sur l'activité, nombreuses sont les substitutions qui sont classées GOF ou LOF mais qui lorsque surexprimées dans des lignées cellulaires démontrent uniquement un 'effet léger' sur l'activité de la PCSK9. Cependant, il y a quelques unes qui se sont tout de même démarquées.

La caractéristique la plus intéressante qui découle du résidu D₃₇₄, vu précédemment, est l'augmentation de l'affinité de plus de 100 fois pour la liaison avec le LDLR en milieu acide comparativement avec la liaison en milieu de pH neutre. En effet, le besoin de l'acidification du milieu pour que le résidu D₃₇₄ puisse se repositionner et augmenter l'avidité de la PCSK9 à lier le LDLR est court-circuité lorsqu'il est muté et le résidu acide aspartique est remplacé par un résidu tyrosine (**D374Y**). Cette mutation permet à la PCSK9 d'augmenter sa force de liaison au LDLR de ~25 fois en milieu neutre (pH 7.4) avec un K_d de ~ 6 nM. L'écart des forces de liaison, entre le milieu neutre et acide, est significativement diminué puisque le K_d mesuré à pH acide correspond à 1.6 nM (Cunningham et al., 2007). À ce jour, cette mutation est considérée comme la plus importante parmi toutes les autres mutations naturelles GOF puisqu'elle hausse de ~10 fois l'efficacité de la PCSK9 à réduire les niveaux de LDLR.

La deuxième plus significative dans la liste des mutations GOF serait la **S127R**. Différemment à la D374Y, le mutant S127R est très peu autoclivé et donc il serait envisageable que son influence confère plutôt une perte de fonction à la PCSK9 puisque peu de protéine est sécrétée. Toutefois, ce mutant est relié à un phénotype clairement hypercholestérolémique chez les patients atteints. Le mutant S127R démontre une forte affinité de liaison au LDLR avec une K_d de 32 ou 86 nM à pH 7.4 et de 0.8 ou 56 nM à pH acide. Il a été suggéré que son mécanisme de régulation négative sur le LDLR soit différent à celui entrepris par le D374Y. Ainsi, comparativement au type sauvage, le mutant S127R affecterait davantage la voie intracellulaire de dégradation et le D374Y plutôt la voie extracellulaire (Cameron et al., 2006).

L'analyse de l'effet des mutations naturelles a révélé l'importance du maintien de tous les domaines de la PCSK9 pour son autoclivage, son repliement, sa sécrétion et sa fonction. Par exemple, les mutations W428X et C679X qui induisent une terminaison prématurée de la protéine démontrent que quand bien même la majorité de la séquence protéique reste intacte, la présence et le bon repliement du domaine CHRD est nécessaire pour que la PCSK9 puisse être bien sécrétée et qu'elle reste active.

En observant le positionnement des mutants naturels sur la structure tridimensionnelle du domaine catalytique, deux boucles semblent particulièrement affectées par des mutations. La première boucle, invisible dans les modélisations provenant des cristaux, est susceptible à une série de mutations telles que R215H, F216L, R218S et Q219E dont la plupart d'entre elles confèrent un gain de fonction à la PCSK9. Ceci fut expliqué par le fait que ces mutations stabiliseraient la protéine en la protégeant du clivage effectué par la furine ou la PC5/6A (RFHR₂₁₈ ↓). La deuxième boucle est affectée par les mutations G236S, R237W et A239D dont la majorité induit plutôt une perte de fonction.

D'autres mutations telles que R434W, A443T et G452D, ont mis la lumière sur l'importance d'une région charnière entre le domaine catalytique et le domaine CHRD, dite "*Hinge region*". Cette dernière semble difficilement accepter des mutations puisque tous les mutants à ce niveau affectent à la baisse l'activité de la PCSK9.

Il existe deux individus ayant des mutations sur le gène de la PCSK9 et qui ont une absence totale de PCSK9 circulante dans leur plasma. Il est à noter que ces cas sont rares. À ce jour, seulement deux cas ont été trouvés et uniquement chez des femmes de race noire. La première originaire du Zimbabwe est homozygote pour la mutation C679X (Hooper et al., 2007). La deuxième est afro-américaine et hétérozygote pour la mutation Y142X ainsi que pour une délétion en phase (c.290_292delGCC) qui cause la disparition du codon de l'arginine 97 (Zhao et al., 2006). Leurs niveaux de LDL-cholestérol sanguin sont parmi les plus bas (~15mg/dL) et selon le rapport émis, semblent en bonne santé, sont fertiles, ont une tension normale et les résultats des tests de vérification des fonctions hépatiques, neuronales et rénales sont normaux.

L'identification du gène codant pour la PCSK9 comme le troisième locus clairement impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale, le constat de l'effet régulateur des mutations naturelles sur l'effet de la protéine ainsi que la découverte des individus complètement dépourvus de PCSK9 jouissant d'une bonne santé, furent les bases pour encourager la recherche au développement des moyens biochimiques pour la neutraliser sans compromettre la santé humaine.

1.10 TRAITEMENTS DE L'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE

Le traitement des individus souffrant d'hypercholestérolémie consiste tout d'abord à les conditionner à des habitudes de vie plus saines comme l'adoption d'une diète équilibrée, pauvre en lipides et en sucres complétée par une pratique régulière d'exercices physiques. Ce type de traitement est efficace à deux conditions : premièrement, l'individu ne doit pas souffrir des mutations génétiques corrélant avec un phénotype d'hypercholestérolémie et deuxièmement, le mode de vie suggéré doit être suivi en permanence.

Dans le cas d'un génotype prédisposant au développement d'un désordre métabolique du type hypercholestérolémie familiale, le traitement nécessitera l'ajout de médication. Puisque des niveaux élevés de cholestérol sanguin ont été associés avec des risques majeurs d'accidents cardiovasculaires et qu'un génotype "mutant" (gènes LDLR, ApoB, ApoE ou PCSK9) favoriserait cette accumulation de cholestérol; il est important pour le patient de prendre conscience que la médication ne guérira pas sa condition précaire mais participera plutôt au contrôle du désordre métabolique et servira à titre de prévention d'accidents vasculaires.

1.10.1 TRAITEMENT PAR LA RÉGULATION DE LA PRODUCTION DE CHOLESTÉROL

Les médicaments les plus prescrits pour induire une diminution des niveaux de cholestérol sanguin appartiennent à la classe de statines. Celles-ci sont des dérivés de molécules naturelles ou des molécules synthétiques.

Au niveau moléculaire, les statines sont similaires au HMG-CoA qui est le substrat de l'enzyme *HMG-CoA reductase* (Figure 41). Cette enzyme participe à une étape clé au niveau de la synthèse *de novo* du cholestérol par les cellules. Les statines jouent alors un rôle de compétiteurs du substrat naturel ce qui a comme conséquence une diminution de la production de mevalonate par l'enzyme ce qui limite la cellule dans sa production de cholestérol.

Figure 41 : Effet inhibiteur des statines sur l'action de l'enzyme HMG-CoA reductase

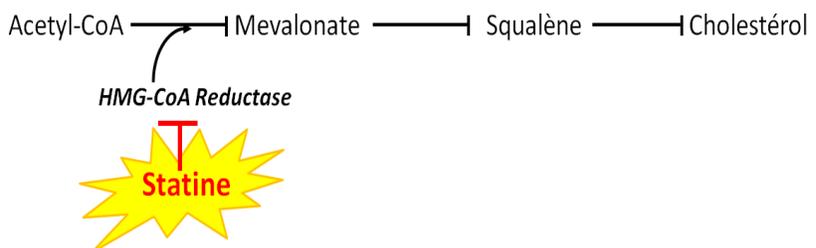
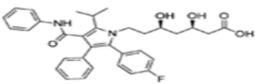
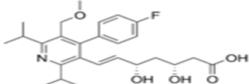
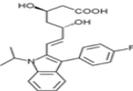
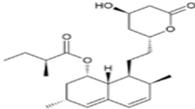
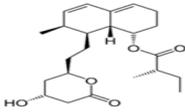
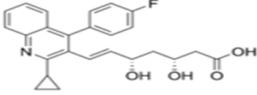
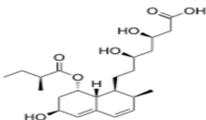
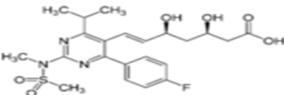
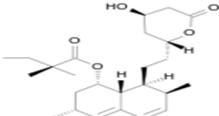


Tableau IV : Différents types de statines commercialisées et leur origine

<u>TYPE de STATINE</u> <i>(nom commercial)</i>	<u>MOLÉCULE</u>	<u>ORIGINE</u>
Atorvastatine <i>(Lipitor, Torvast)</i>		Synthétique
Cerivastatine <i>(Lipobay, Baycol)</i>		Synthétique
Fluvastatine <i>(Lescol, Lescol XL)</i>		Synthétique
Lovastatine <i>(Mevacor, Altocor, Altoprev)</i>		Dérivé naturel (Champignon Huître, Levure de riz rouge)
Mevastatine <i>(Compactin)</i>		Dérivé naturel (Levure de riz rouge)
Pitavastatine <i>(Livalo, Pitava)</i>		Synthétique
Pravastatine <i>(Pravachol, Selektine, Lipostat)</i>		Dérivé naturel <i>(Nocardia autotrophica)</i>
Rosuvastatine <i>(Crestor)</i>		Synthétique
Simvastatine <i>(Zocor, Lipex)</i>		Synthétique <i>(Dérivé d'Aspergillus Terreus)</i>

Les statines varient selon leur stabilité et leur puissance d'effet mais elles sont toutes efficaces pour réduire les niveaux de cholestérol produits par la cellule. Elles peuvent être prescrites seules ou en combinaison avec d'autres composés à action hypolipémiants tels que les fibrates (classe d'acides carboxyliques amphipathiques), la

niacine (vitamine), l'ezetimibe (composé synthétique) (Gille et al., 2008; Shanes, 2012; Steiner, 2007)

Malgré la popularité des statines dans le traitement de l'hypercholestérolémie, il y a deux considérations qui mobilisent actuellement les chercheurs à trouver d'autres sources de médication pour contrer ce désordre métabolique très commun au niveau mondial (Andréjak et al.).

La première est une considération d'effets indésirables. En effet, dans les années 70, les premières études *in vivo* ont démontré que certains types de statines provoquaient des effets secondaires chez les animaux, elles ont donc été retirées (ex : Mevastatin). Les statines ayant fait preuve d'efficacité ainsi que des risques limités pour la santé durant les essais cliniques ont été commercialisées. Celles-ci sont prescrites depuis la fin des années 80 et ont eu un grand succès démontrant rapidement les bénéfices de leur utilisation. Cependant, depuis les années 90, de plus en plus des cas des patients souffrant des effets secondaires reliés à leur médication en statines se sont présentés et depuis, la polémique sur leur utilisation a débuté. Parmi les effets secondaires dénoncés, il y a surtout les douleurs et les faiblesses musculaires, des atteintes rénales et hépatiques puis des pertes de mémoire (Dormuth et al., 2013; Golomb and Evans, 2008)

La deuxième est une considération d'intérêt commercial donc monétaire. Les compagnies pharmaceutiques ont mis sur le marché ces médicaments qui ont été prescrits largement par les médecins non seulement à des patients ayant déjà souffert des accidents cardiovasculaires mais aussi à un grand nombre de patients à titre préventif. Ceci leur a permis d'aller chercher une gigantesque part du marché et ont réalisé un grand nombre de profits grâce aux coûts de vente élevés des statines bien protégés par des brevets internationaux. Le temps de protection commerciale que ces derniers leur procure a atteint pour la plupart leur échéance et les compagnies pharmaceutiques travaillent très fort pour trouver le prochain médicament anti-cholestérol commercialisable qui puisse leur assurer des revenus aussi lucratifs que les statines leur ont procuré.

À ce jour, une constante reste vraie et c'est la nécessité de traiter les patients souffrant d'un taux de cholestérol élevé. Afin de pallier à ce besoin et en tenant compte de deux considérations précédentes, les efforts se sont multipliés au niveau mondial et les équipes de recherche médicale dirigent leur attention vers l'étude et ultimement le contrôle d'une autre molécule régulatrice des niveaux de cholestérol soit la **PCSK9**.

1.10.2 TRAITEMENT PAR LA RÉGULATION DE LA PCSK9

La nouvelle stratégie thérapeutique “anti-cholestérol” repose sur le développement des inhibiteurs de la PCSK9.

Plusieurs facteurs favorisent ce développement dont deux considérations ont été exposées précédemment concernant les statines. Il en existe une troisième qui relie leur effet et la PCSK9. Il a été démontré qu’un traitement aux statines entraîne non seulement une diminution de la production de cholestérol par la cellule mais aussi une stimulation du facteur transcriptionnel SREBP2 (*Sterol response element binding protein 2*) (Rashid et al., 2005). Ce dernier contrôle positivement la transcription des deux gènes particulièrement opposés dans leurs effets, soit le gène codant pour le LDLR et celui codant pour la PCSK9. De ce fait, l’action des statines bien que favorable en ce qui concerne l’augmentation des niveaux de LDLR transcrits, s’avère défavorable lorsqu’on tient en compte l’augmentation parallèle des niveaux de PCSK9. Il a été suggéré, que les conséquences opposées de ces deux protéines, pour le patient hypercholestérolémique, seraient remédiées soit par le **remplacement** du traitement aux statines par un traitement aux inhibiteurs de la PCSK9 ou soit par la **complémentation** de la médication des statines avec un inhibiteur de l’action de la PCSK9, libérant ainsi le LDLR afin qu’il puisse procéder à l’épuration des particules de LDL plasmatiques.

L’inhibition de la PCSK9 peut se faire à deux niveaux, soit au niveau de la transcription du gène codant pour celle-ci ou soit au niveau post-transcriptionnel ciblant plutôt la protéine.

À ce jour, quatre types d’approches moléculaires ont été adoptées afin de produire un inhibiteur efficace de la PCSK9. (1) **Suppresseurs de la transcription génique** (*Gene silencing*) qui ciblent la première ligne de production de la PCSK9 qui est sa transcription. Ainsi, ce sont des molécules qui provoquent une diminution de l’ARNm codant pour la protéine. (2) **Les adnectines** sont des très petites protéines (~10 kDa) dérivées de la fibronectine humaine conçues pour bloquer ou stimuler l’action d’une protéine. (3) **Les bio-peptides** sont des petites molécules organiques (500- 800 Daltons) qui interviennent efficacement dans les processus biologiques soit en mimant le substrat naturel d’une enzyme ou en tant que régulateur de sa fonction. Ces petites molécules ont la capacité de rapidement diffuser à travers la membrane cellulaire et ainsi atteindre des sites d’action intracellulaires. (4) **Les anticorps monoclonaux** sont des grosses

molécules complexes qui reconnaissent exclusivement un seul type d'épitope. Ils constituent la plus grande classe de médicaments biothérapeutiques. Ayant fait leurs preuves, ils sont produits en quantité industrielle pour traiter diverses pathologies (Hooper and Burnett, 2013; King, 2013; Lilly and Rader, 2007; Seidah and Prat, 2012).

Tableau V: Développement des différents inhibiteurs de la PCSK9 par diverses compagnies pharmaceutiques.

Type de molécule inhibitrice	Compagnie	Voie d'administration	État de développement	Baisse de LDL-c
Anticorps monoclonaux:				
Anticorps monoclonal (<i>mAb-AMG145</i>)	Amgen	Injection sous-cutanée	Essais cliniques en phase II/III	43 - 55%
Anticorps monoclonal (<i>mAb-REGN737/SAR238553</i> ;	Sanofi/Regeneron	Injection sous-cutanée	Essais cliniques en phase III	40 - 72%
Anticorps monoclonal (<i>mAb-RN316</i> ; <i>PF-04950615</i>)	Pfizer-Rinat	Injection intraveineuse	Essais cliniques en phase II	46 - 75%
Anticorps monoclonal (<i>LTG 209</i>)	Novartis	Injection	Essais cliniques en phase II	fin en 2016
Anticorps monoclonal/ (<i>RG7652</i>)	Roche/ Genentech	Injection sous-cutanée	Essais cliniques en phase II	fin en 2015
Anticorps monoclonal (<i>ID05-IgG2</i>)	Merck	En développement	En développement	À venir
Anticorps monoclonal (<i>ALD 306</i>)	Alder Biopharmaceuticals	En développement	En développement pré-clinique	À venir
Adnectine:				
Adnectine (<i>BMS-962476</i>)	BMS-Adnexus	Injections intraveineuse & sous-cutanée	Essais cliniques en phase I	fin en 2013
Suppresseurs géniques:				
siRNA (<i>ALN-PCS02</i>)	Alnylam-Novartis	Infusion intra-veineuse	Essais cliniques en phase I	50%
Locked nucleic acid SPC5001	Santaris/Novartis	Injection sous-cutanée	Essais cliniques en phase I	74%
Gene-silencing oligonucleotide (GSO)	Idera Pharmaceuticals	Injection sous-cutanée	Essais précliniques	À venir
Bio-peptides:				
Peptides (<i>small molecule drug</i>)	Shifa Biomedical Corp	En développement	En développement	À venir
Peptides (<i>small molecule inhibitor</i>)	Zydus Cadilla group	En développement	En développement	À venir
Peptides (<i>synthetic mimetics: SX-PCCK9</i>)	Serometrix	En développement	En développement	À venir
Peptides (<i>peptide-based vaccines</i>)	Affiris	En développement	En développement	À venir

Le développement des molécules inhibitrices commença bien avant la compréhension complète du mécanisme d'action de la PCSK9 sur le LDLR. Il est à noter que la capacité d'inhibition des molécules développées n'arrive toujours pas à neutraliser complètement l'action de la PCSK9. Conséquemment, la recherche visant à démystifier le mécanisme de celle-ci reste actuellement une nécessité.

1.11 OBJECTIFS DE LA THÈSE

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse ont été supervisés par le Dr. Nabil G. Seidah au sein de l'unité de Biochimie Neuroendocrinienne à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal. Cette unité de recherche est reconnue pour s'intéresser à l'élucidation des mécanismes moléculaires et cellulaires des proprotéines convertases (PCs) impliquées dans des processus physiologiques ou des conditions pathologiques.

La PCSK9 est devenue un sujet de recherche majeur depuis l'identification de son gène comme le troisième locus impliqué dans l'hypercholestérolémie familiale (FH3) (Abifadel et al., 2003).

Au commencement de ma thèse, la littérature présentait des résultats de caractérisation de la PCSK9 par des études de localisation tissulaire chez la souris, biosynthèse (Seidah et al., 2003), étude moléculaire du site de clivage (Benjannet et al., 2004; Naureckiene et al., 2003), trafic intracellulaire (Nassoury et al., 2007) et implication du domaine catalytique dans la liaison au LDLR (Zhang et al., 2007). Il était connu que l'expression de la PCSK9, *in vitro* et *in vivo*, accélérât la dégradation des récepteurs LDLR (Holla et al., 2007; Maxwell and Breslow, 2004; Park et al., 2004; Qian et al., 2007). Cependant le mécanisme d'action était encore à l'étude.

Mon projet de recherche avait pour objectif de procéder à l'**étude structure-fonction** de deux domaines de la PCSK9, soit le **prodomaine** et le domaine **CHRD**, dont la relation avec la fonction de la protéine était encore **inconnue**.

Par ce projet, nous voulions répondre aux questions suivantes:

- 1) Dans quelle mesure le prodomaine de la PCSK9 pouvait être une région régulatrice de l'activité de la protéine?
- 2) À quel niveau (intracellulaire / extracellulaire) et à quelle étape (liaison/ internalisation/ dégradation), le domaine CHRD trouvait son implication dans la fonction de la PCSK9 à induire la dégradation du LDLR?
- 3) Quel est le potentiel inhibiteur du prodomaine sur la fonction de la PCSK9?

RÉSULTATS

CHAPITRE II

*Effects of the Prosegment and pH on the activity of PCSK9:
Evidence for additional processing events*

ARTICLE NO.1

EFFECTS OF THE PROSEGMENT AND pH ON THE ACTIVITY OF PCSK9: EVIDENCE FOR ADDITIONAL PROCESSING EVENTS

Titre court: *PCSK9-enhanced LDLR degradation*

Suzanne Benjannet¹, Yascara Grisel Luna Saavedra¹, Josée Hamelin, Marie-Claude Asselin, Antonella Pasquato, Peter Lemaire, Gerald Duke, Bowman Miao, Franck Duclos, Rex Parker, Gaétan Mayer, and Nabil G. Seidah

(¹ co-premières auteures de l'article)

Affiliations:

- *Y.G. Luna Saavedra, S. Benjannet, J. Hamelin, M.C. Asselin, A. Pasquato, G. Mayer et N. G. Seidah*: Laboratoire de Biochimie Neuroendocrinienne, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montréal, QC H2W 1R7, Canada affiliés au Département de Biochimie de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, QC, Canada
- *P. Lemaire, G. Duke, B. Miao, F. Duclos, R. Parker*: Bristol-Myers Squibb, Princeton, New Jersey 08543-4000, USA

Demandes de copies de l'article ou concernant toute autre demande, faire parvenir toute correspondance à:

Dr. Nabil G. Seidah

Clinical Research Institute of Montreal
Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology
110 Pine Ave. West,
Montreal, QC
Canada, H2W 1R7

AVANT-PROPOS

Ce premier manuscrit présente les résultats de recherche concernant l'étude de l'effet du pH et du prodomaine dans la régulation de la PCSK9.

La PCSK9 agit sur le LDLR en trois étapes: [1] la liaison au récepteur; [2] l'internalisation et [3] la dégradation du complexe PCSK9=LDLR. Des études biophysiques ont révélé que la constante dissociation (K_d) de la liaison de la PCSK9 avec le domaine extracellulaire du récepteur LDLR diminuait, passant de 170 nM à 1 nM, lorsque le pH passait de 7.5 à 5.4 (Cunningham et al., 2007; Zhang et al., 2007). Ces observations démontraient une affinité plus grande de la PCSK9 à lier le LDLR dans un environnement de pH acide, similaire à celui retrouvé dans les endosomes. Toutefois, une question restait ouverte: Est-ce que la variation du pH pouvait aussi moduler les autres étapes d'action de la PCSK9 sur le LDLR?

Le rôle du prodomaine dans la fonction de la PCSK9 était inconnu. Toutefois, il y avait quelques informations pertinentes aux prodomaines des proprotéines convertases (PCs). D'une part, des études antérieures sur les PCs avaient démontré qu'ils possédaient un rôle régulateur de l'activité des celles-ci. D'autre part, la comparaison des structures adoptées par les prodomaines de la PCSK9, de la subtilisine et de la PC1 démontra que le prodomaine de la PCSK9 présentait un repliement similaire aux deux autres à l'exception de la longueur d'une boucle. Celle-ci fut identifiée comme importante pour exposer un site de clivage protéolytique qui permettrait la séparation du prodomaine du reste de la molécule et l'activation de la convertase mature. Ce clivage n'a pas lieu dans le prodomaine de la PCSK9 dû au fait que cette boucle est plus courte dans la structure de son prodomaine (Cunningham et al., 2007). Conséquemment, celui-ci reste inséré dans la poche catalytique de la convertase mature sans toutefois affecter l'activité de la PCSK9 à induire la dégradation du LDLR (Li et al., 2007). Sur la base de ces indications, certaines questions se posaient: Est-ce que l'attachement du prodomaine à la structure de la PCSK9 aurait un rôle dans la régulation de l'activité de cette protéine? Et dans l'affirmative, quelle région du prodomaine serait responsable de cette régulation?

Dans cet article, nos résultats démontrent que la PCSK9 exposée à des pH acides, augmente non seulement sa liaison au récepteur LDLR mais accélère aussi

l'internalisation et la dégradation du complexe PCSK9=LDLR. D'autre part, nos résultats révèlent que la région acide localisée en N-terminal du prodomaine, correspondant aux acides aminés 33-58, régule négativement l'activité de la PCSK9. Ainsi, notre étude démontre pour la première fois, que le prodomaine, qui était considéré uniquement comme structure servant de chaperone pour la sécrétion de la protéine, possède aussi un rôle de régulateur négatif de l'activité de la PCSK9.

MANUSCRIT 1

Effects of the Prosegment and pH on the Activity of PCSK9

EVIDENCE FOR ADDITIONAL PROCESSING EVENTS^{*[5]}

Received for publication, June 23, 2010, and in revised form, September 3, 2010. Published, JBC Papers in Press, October 11, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.154815

Suzanne Benjannet^{†1}, Yascara Grisel Luna Saavedra^{†1}, Josée Hamelin[‡], Marie-Claude Asselin[‡], Rachid Essalmani[‡], Antonella Pasquato^{†2}, Peter Lemaire[§], Gerald Duke[§], Bowman Miao[§], Franck Duclos[§], Rex Parker[§], Gaëtan Mayer[‡], and Nabil G. Seidah^{†3}

From the [†]Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Quebec H2W 1R7, Canada and [§]Bristol-Myers Squibb, Princeton, New Jersey 08543-4000

PCSK9, a target for the treatment of dyslipidemia, enhances the degradation of the LDL receptor (LDLR) in endosomes/lysosomes, up-regulating LDL-cholesterol levels. Whereas the targeting and degradation of the PCSK9-LDLR complex are under scrutiny, the roles of the N- and C-terminal domains of PCSK9 are unknown. Although autocatalytic zymogen processing of PCSK9 occurs at Gln¹⁵² ↓, here we show that human PCSK9 can be further cleaved in its N-terminal prosegment at Arg⁴⁶ ↓ by an endogenous enzyme of insect High Five cells and by a cellular mammalian protease, yielding an ~4-fold enhanced activity. Removal of the prosegment acidic stretch resulted in ~3-fold higher binding to LDLR *in vitro*, in ≥4-fold increased activity on cellular LDLR, and faster cellular internalization in endosome/lysosome-like compartments. Finally, swapping the acidic stretch of PCSK9 with a similar one found in the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparin-binding protein 1 does not impair PCSK9 autoprocessing, secretion, or activity and confirmed that the acidic stretch acts as an inhibitor of PCSK9 function. We also show that upon short exposure to pH values 6.5 to 5.5, an ~2.5-fold increase in PCSK9 activity on total and cell surface LDLR occurs, and PCSK9 undergoes a second cleavage at Arg²⁴⁸, generating a two-chain PCSK9-ΔN²⁴⁸. At pH values below 5.5, PCSK9 dissociates from its prosegment and loses its activity. This pH-dependent activation of PCSK9 represents a novel pathway to further activate PCSK9 in acidic endosomes. These data enhance our understanding of the functional role of the acidic prosegment and on the effect of pH in the regulation of PCSK9 activity.

low density lipoprotein-cholesterol represent a major risk factor that leads to coronary heart disease associated with increased death and morbidity worldwide (1). LDL is constantly cleared by internalization into cells by the LDL receptor (LDLR)⁴ which binds and internalizes LDL via its unique apolipoprotein B (apoB) protein. Mutations in *LDLR* or *APOB* genes are major causes for the frequent autosomal dominant genetic disorder known as familial hypercholesterolemia (2, 3). More recently, the *PCSK9* gene (4), which is highly expressed in liver and small intestine (5), was identified as the third locus associated with familial hypercholesterolemia (6). PCSK9 binds the LDLR and triggers its intracellular degradation in acidic endosomes/lysosomes, resulting in increased circulating LDL-cholesterol (7–10).

Following its autocatalytic cleavage, PCSK9 is secreted as a stable noncovalent complex with its 122-amino acid (aa 31–152) N-terminal prosegment (5, 7). This cleavage results in a conformational change (11), which favors the binding of PCSK9 to the EGFA domain of the LDLR (12), with much increased affinity at acidic pH values (11).

Overexpression studies in liver suggested that PCSK9 targets the LDLR (9, 13, 14) toward degradation in late endosomes/lysosomes (7–10). The extracellular pathway is defined by the ability of extracellular PCSK9 to target the LDLR for destruction. A recent study presented a clinically relevant monoclonal antibody (mAb) that inhibits PCSK9 interaction with LDLR at the cell surface and results in an ~80% reduction of LDL-cholesterol that lasted for 2-weeks in cynomolgus monkey (15). However, we recently presented evidence for the presence of both intracellular and extracellular pathways of PCSK9-induced LDLR degradation (16).

The crystal structure of PCSK9 revealed three separate domains as follows: the prosegment (aa 31–152) and catalytic domain (aa 153–404) in tight complex, and the spatially separated hinge region (aa 405–454) (17) and Cys-His rich domain (CHRD; aa 455–692) (11, 18, 19). In all reported crystal structures, aa 31–60 of the prosegment and portions of the CHRD were unresolved, indicating their unstructured nature.

Complications resulting from cardiovascular disorders are the main cause of death worldwide. High levels of circulating

* This work was supported by Canadian Institutes of Health Research Grants MOP-102741 and CTP-82946 (to N. G. S.), Strauss Foundation grant (to N. G. S.), Bristol-Myers Squibb collaborative research grant, and Canada Chair 216684 (to N. G. S.).

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. S1–S6.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² Present address: Institute of Microbiology, University Hospital Center and University of Lausanne, Rue du Bugnon 48, CH-1011 Lausanne, Switzerland.

⁴ The abbreviations used are: LDLR, low density lipoprotein receptor; CHRD, Cys-His-rich domain; EGFA domain, epidermal growth factor precursor homology domain; ER, endoplasmic reticulum; GOF, gain of function; LPDS, lipoprotein-deficient serum; LOF, loss of function; aa, amino acid; dil, 1,1'-diocetadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine; CV, column volume.

Biochemical (20) and co-crystal structure (12) studies revealed that aa 153–156 and 367–381 directly interact with the EGFA domain of the LDLR. The most severe mutation, D374Y associated with hypercholesterolemia (21), is within aa 367–381 and results in an ~25-fold higher affinity of PCSK9 toward LDLR (11). The shallow binding surface on PCSK9 is distant from its catalytic site, and the EGFA domain of LDLR apparently makes no contact with either the prosegment or the CHRDR.

Even though the prosegment does not bind the EGFA domain of LDLR (12), it negatively regulates the binding of PCSK9 to LDLR. Deletion of an N-terminal stretch (aa 31–53), which exhibits Tyr³⁸ sulfation (5) and Ser⁴⁷ phosphorylation (22), enhances the binding of PCSK9 to soluble LDLR by >7-fold (12). Whether under certain conditions this unstructured acidic stretch (11, 18, 19) binds another domain of PCSK9 or LDLR and/or interacts with another protein have yet to be defined. Interestingly, natural variants of PCSK9 exist in this highly acidic stretch of the prosegment. Of note, the variants E32K and E57K reduce the overall negative charge of this part of the prosegment and result in a gain of function (GOF), whereas the reduced positive charge in the R46L variant results in loss of function (LOF).

In this study, we focused on the N-terminal acidic region of the prosegment and on the effect of pH in the regulation of the activity of PCSK9 toward LDLR. The information presented herein opens new avenues in deciphering the structural components of PCSK9 that dynamically regulate its ability to enhance LDLR degradation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and Reagents—Human PCSK9 and its mutant cDNAs were generated and cloned into pIRES2-EGFP (Clontech) as described previously (5). HepG2, HuH7, and HEK293 cells (American Type Culture Collection) were routinely cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent). Low density lipoprotein coupled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (dil-LDL) and lipoprotein-deficient serum (LPDS) were from Biomedical Technologies. Purified recombinant human hPCSK9 was obtained from a baculovirus expression system (see below). The cDNA of GPIHBP1 was a kind gift of Drs. Anne Beigneux and Stephen G. Young (UCLA).

Expression and Purification of Full-length (30–692) and Truncated (47–692) Forms of PCSK9 from Baculovirus/Insect Cells—Human PCSK9 cDNA (residues 30–692) was PCR-amplified and cloned into a pAcHLT vector (Pharming) with GP67 secretion signal, confirmed by sequencing to confer expression and secretion of hexahistidine-tagged (C-terminal) PCSK9. Recombinant baculovirus was generated by co-transfection with BaculoGold DNA (Pharming) and amplified once. The resulting viral stock (133 ml) was used to inoculate 40 liters of High Five cells (Invitrogen) in ESF921 media (Expression System LLC) at a density of 2×10^6 cells/ml. Cells were grown at 27 °C in two 25-liter WAVE Bioreactors (GE Healthcare) for 65–72 h and harvested when cell viability reached 70%. Culture supernatants were centrifuged

at $1,000 \times g$ for 15 min and kept at 20 °C for 30–60 min prior to purification. The supernatants from 40 liters of baculovirus culture were concentrated and exchanged into 1 liter of Buffer A (25 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7.4). The remaining purification steps were performed at 0–5 °C. The sample was supplemented with 5 mM imidazole, centrifuged, and applied at 10 ml/min to a 9.5×2.6 -cm (50 ml) nickel-nitrilotriacetic acid column (Qiagen) pre-equilibrated in Buffer A. The column was then washed with 20 column volumes (CV) of Buffer A + 5 mM imidazole, 5 CV of Buffer A + 10 mM imidazole, and 10 CV of Buffer A + 35 mM imidazole. PCSK9 was then eluted in two 5-CV portions of Buffer A + 250 mM imidazole, partially concentrated, and then diluted 15-fold in Buffer B (25 mM Tris-HCl, pH 7.5) immediately prior to loading onto a 9.5×2.6 -cm (50 ml) SOURCE 15Q column (GE Healthcare) pre-equilibrated in Buffer B containing 10 mM NaCl. Truncated (47–692) and full-length (30–692) forms of PCSK9 were base-line-resolved and eluted in this order using a 12-CV linear gradient from 10 to 600 mM NaCl in Buffer B. Fractions found to contain each form of PCSK9 by SDS-PAGE were separately pooled and concentrated to 5 mg/ml. Each form of PCSK9 was loaded onto a 60×2.6 -cm (320 ml) HiLoad Superdex 200 column (GE Healthcare) pre-equilibrated and isocratically eluted at 3 ml/min in final storage buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 200 mM NaCl, 5% glycerol). Fractions containing monomeric PCSK9 were pooled, concentrated to 3 mg/ml, and stored at –80 °C. Purified proteins were analyzed by Bradford, SDS-PAGE, dynamic light scattering using a Plate Reader Plus (Wyatt Technologies) with a laser wavelength of 829 nm, and LC/ESI-MS using a LTQ mass spectrometer (Thermo) in positive ion mode. Expression and purification process yields typically ranged from 80 to 110 mg of purified PCSK9(30–692)-His₆ and from 5 to 10 mg of purified PCSK9(47–692)-His₆ per 40 liters of baculovirus supernatants. Analytical data showed ~95% purity with hydrodynamic radii of 4.1 nm, consistent with a glycosylated monomer with 11% polydispersity, and mass spectra consistent with heterogeneous N-linked glycosylation of the catalytic CHRDR and partial sulfation of the nontruncated prodomain form.

dil-LDL Uptake Cell-based Assay for PCSK9 Activity—A cell culture method to assay PCSK9 functional activity on the LDLR was developed measuring cellular LDLR activity as the uptake of fluorescently labeled LDL. Our method was adapted from the dil-LDL uptake procedure by Teupser *et al.* (23). HepG2 cells were plated at 20,000 cells/well in a 96-well format in RPMI + 10% FBS, and on the 2nd day the medium was changed to RPMI + 10% LPDS with 100 nM statin (catalog no. 423526, Bristol-Myers Squibb) for 16 h. Cells were then preincubated with recombinant human PCSK9 protein at the levels indicated for 2 h, followed by the addition of 5 μg/ml dil-LDL for a further 2-h incubation at 37 °C. Uptake was stopped by the addition of 4% formaldehyde in 10 μM Hoechst 33342 for 20 min at 20 °C. Cells were washed twice with PBS, and fluorescence measured for Hoechst (DNA content) at excitation/emission 360/460 nm (dichroic mirror = 400 nm) was read. After DNA reading, the cells were lysed in 0.1 N NaOH, 0.1% SDS and shaken for 10 min followed by fluorescence reading

for diI-LDL excitation/emission at 530/580 nm (dichroic mirror = 561 nm) on an LJI Analyst instrument. For data analysis, the fluorescence ratio of diI-LDL/Hoechst 33342 was used to normalize diI-LDL uptake value to cell count.

FRET-based Assays for PCSK9:EGFA and PCSK9:LDLR Binding—Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based assays were developed to determine the binding affinity of PCSK9 with LDLR, adapted from the general method described previously by Miao *et al.* (24). The PCSK9:EGFA FRET assay measures PCSK9 binding to the LDLR epidermal growth factor precursor homology domain (EGFA domain) using recombinant human PCSK9 expressed in baculovirus and a synthetic 40-mer EGFA peptide (biotinylated) produced by solid-phase chemistry. EGFA has been shown to represent the key interacting domain of LDLR with PCSK9 (12). This assay uses a PCSK9 C-terminal domain binding mAb produced in Bristol-Myers Squibb (mAb-4H5) labeled with europium-chelate to provide FRET interaction with biotinyl-EGFA through the streptavidin/allophycocyanin fluorophore complex. A second assay measured PCSK9 binding to the full-length LDLR ectodomain using biotinyl-LDLR-His₆ and the same mAb-4H5 system described above.

Transfections, Biosynthetic Analyses, and Immunoprecipitations of PCSK9—Transfections were done with 3×10^5 HEK293 cells using Effectene (Qiagen) and a total of 0.4 μg of cDNAs. Alternatively, 5×10^5 HuH7 or 6×10^5 HepG2 cells were transfected with a total of 4 μg of cDNAs in Lipofectamine 2000 (Invitrogen). In some cases, 2-day post-transfection, HEK293 cells were washed and then incubated for various times with either 250 $\mu\text{Ci/ml}$ [³⁵S]Met or [³⁵S]Cys (PerkinElmer Life Sciences). The cells were lysed in modified RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5), 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, and a protease inhibitor mixture (Roche Applied Science), after which the lysates and media were prepared for immunoprecipitation (25). The antibodies used were the anti-V5 mAb (Invitrogen, 1:500), goat anti-prosegment PCSK9 (Imx-3786, 1:200), and rabbit anti-PCSK9 31–454 (A-03) (10). Immunoprecipitates were resolved by SDS-PAGE on 8% Tricine gels and autoradiographed. Most of these experiments were repeated at least three times. Quantitation was performed on a Storm Imager (Amersham Biosciences) by using the ImageQuant version 5.2 software.

PCSK9 Incubations at Different pH Values—Full-length and various PCSK9 constructs secreted from HEK293 cells in media composed of RPMI in 5% LPDS and 1% sodium pyruvate, pH 7.2, were incubated at 37 °C for 1–4 h at various pH values from 7.2 to 4.5. The pH was then immediately neutralized with NaOH to pH 7.2. The samples were incubated for 4 h with HuH7 cells for FACS analyses and then 4 h or overnight with either HepG2 or HuH7 cells for Western blots of PCSK9 and LDLR.

LDLR Activity Assay—HepG2 cells were plated in a 96-well poly-D-lysine-coated plate (BD Biosciences) at a density of 15,000 cells/well in RPMI 1640 medium (Invitrogen), containing 5% lipoprotein-deficient serum (Intracel). After 18 h, purified PCSK9 protein was added to the cells in 30 μl of medium (RPMI 1640 containing 5% LPDS). After 2 or 24 h of incuba-

tion at 37 °C, 5 $\mu\text{g/ml}$ diI-LDL (Biomedical Technologies) were added to the cell media, and cells were returned to the tissue culture incubator for another 2 h. Cells were then fixed in the presence of a 2% paraformaldehyde solution containing 4 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst (Molecular Probes). After three washes of the cell layer, plates were scanned on Cellomics Array-scan (Thermo). diI-LDL uptake measured as the mean total intensity of fluorescence per cell was obtained from quadruplicate wells with an average read of 500–700 cells/well for each treatment condition. Data were analyzed using GraphPad Prism 4.

Western Blot Analysis—Cells were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in complete RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, and 0.1% (v/v) SDS) supplemented with 1 \times Complete Protease Inhibitor Mixture (Roche Applied Science). Proteins were separated by 8% SDS-PAGE and blotted on polyvinylidene difluoride (PVDF, PerkinElmer Life Sciences) membranes (GE Healthcare), which were blocked for 1 h in TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% nonfat dry milk. Membranes were then incubated for 3 h in 1% nonfat milk with a polyclonal hPCSK9 antibody (1:2500) (10) and human LDLR antibody (1:1,000, R & D Systems). Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000, Sigma) was used for detection with enhanced chemiluminescence using the ECL Plus kit (GE Healthcare).

FACS—HuH7 cells were incubated for 1–4 h at 37 °C with various PCSK9 constructs and then washed three times with calcium/magnesium-free Dulbecco's PBS containing 0.5% bovine serum albumin (Sigma) and 1 g/liter glucose (solution A). Cells were then incubated 5 min at 37 °C with 500 μl of 1 \times Versene solution (Invitrogen) and layered on 5 ml of solution A. Cells were then centrifuged for 5 min at 1,000 rpm and resuspended in 1 ml of solution A containing 1:100 of monoclonal LDLR antibody C7 directed against human LDLR (mAb-C7, Santa Cruz Biotechnology) for 40 min. Cells were washed once with 5 ml of solution A, centrifuged, and resuspended for 20 min in 1 ml of PBS containing 1:250 of Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse (Molecular Probes). Cells were washed and resuspended in 300 μl of PBS 0.2% of propidium iodide. Viable cells (propidium iodide-negative) were then analyzed by FACS for both propidium iodide and Alexa Fluor 647 using the FACS BD LSR (BD Biosciences).

Immunocytochemistry—Cells were washed three times with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 10 min, and incubated with 150 mM glycine to stabilize the aldehydes. The cells were then incubated for 30 min with 1% BSA (Fraction V, Sigma) containing 0.1% Triton X-100, followed by overnight incubation at 4 °C with selected antibodies (1:100 goat polyclonal anti-LDLR, R & D Systems; 1:500 mouse anti-V5, Invitrogen). The cells were then incubated for 60 min with corresponding Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) and mounted in 90% glycerol containing 1% 1,4-diazabicyclo-[2.2.2]octane (Sigma). Immunofluorescence analyses were performed with a Zeiss LSM-510 confocal microscope coupled with a Nikon Eclipse TE2000-U laser-scanning

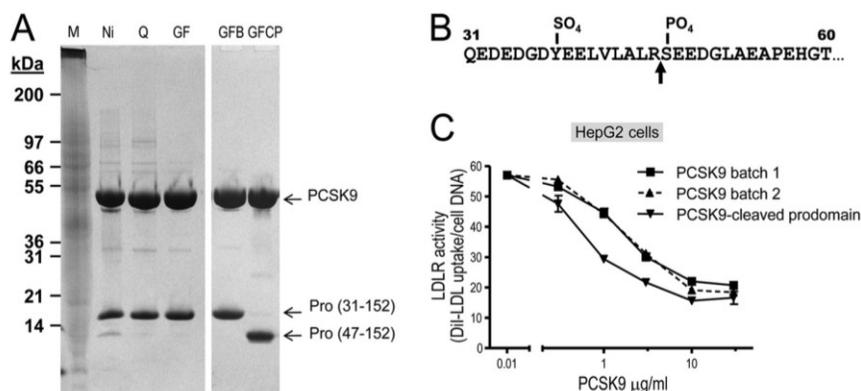


FIGURE 1. Comparative activity of PCSK9 and its shortened prosegment isoform. PCSK9-(His)₆ was produced in large quantities from 35-liter baculovirus High Five cells and subjected to multiple steps of purification including Ni²⁺-affinity followed by Mono Q anion exchange and finally gel filtration chromatography. The anion exchange (SOURCE 15Q) column effectively resolved two forms of PCSK9. The truncated form of PCSK9(47–692) eluted between 100 and 150 mM NaCl, whereas the full-length form of PCSK9(30–692) eluted between 250 and 300 mM NaCl. **A**, Coomassie Blue staining of 18 µg of total proteins from each preparation separated on a 4–12% gradient in MES buffer, SDS-PAGE under nonreducing conditions are shown. The position of the molecular size markers, total proteins in the High Five supernatant before purification, purification by Ni²⁺-affinity chromatography (Ni), SOURCE 15Q anion exchange (Q), and Superdex 200 gel filtration (GF) are shown. Notice the presence of a small amount of cleaved prosegment associated with PCSK9 apparent after the nickel purification step, and the two PCSK9 complexes with normal and shortened prosegments were finally resolved and purified to homogeneity after the anion exchange and gel filtration columns in two different preparations (right panels). M, Mark 12 (25 µl); S, supernatant (10 µl); Ni, nickel-nitrilotriacetic acid pool (18 µg); Q, SOURCE Q pool (18 µg); GF, gel filtration pool of batch 7 (18 µg); GFB, gel filtration pool of batch 7B (18 µg); GFPC, gel filtration pool of batch 7CP (18 µg). **B**, microsequencing analysis of the prosegments revealed an ⁴⁷SEEDG... sequence demonstrating that the prosegment was cleaved Arg⁴⁶ (arrow). **C**, concentration dependence for PCSK9 effect on LDLR of HepG2 cells using diI-LDL incorporation (16). PCSK9(31–692) and PCSK9(47–692) produced and purified from baculovirus/insect cell expression as shown in **A** were tested for biological activity on the LDLR in the HepG2 cell diI-LDL uptake assay as described under "Experimental Procedures." Notice that the PCSK9 associated with the truncated 47–152 prosegment is ~4-fold more active than the WT protein in two independent preparations (batches 1 and 2).

microscope with 408-, 488-, and 543-nm laser lines. Images were processed with Adobe Photoshop CS2, version 9.0 (Adobe Systems). For internalization experiments, HepG2 cells were incubated for 60 min at 4 °C with conditioned media from HEK293 cells overexpressing PCSK9-V5 or the deletion mutant Δpro-33–58-PCSK9-V5. Cells were then incubated at 37 °C for 0, 30, and 60 min before immunofluorescence as described above.

RESULTS

Effect of Prosegment on the PCSK9-induced LDLR

Degradation—We first concentrated on the very acidic sequence (aa 31–60) at the N terminus of the prosegment of PCSK9 (aa 31–152), which exhibits ~50% Asp and Glu residues, as well as Tyr³⁸ sulfation (5) and Ser⁴⁷ phosphorylation (22). This segment is not seen in any of the crystal structures analyzed at both acidic and neutral pH values in the presence or absence of the EGFA domain of LDLR (11, 12, 26), suggesting high flexibility, or the need for another protein to stabilize it.

Upon purification of full-length PCSK9 produced by the baculovirus expression system in High Five insect cells, we noticed the presence of a shorter prosegment form likely resulting from processing by an endogenous protease(s) during expression/purification (Fig. 1A). The SOURCE 15Q column employed in purification effectively resolved two forms of PCSK9, with a truncated form of PCSK9(47–692) eluting between 100 and 150 mM NaCl, and a full-length form of PCSK9(30–692) eluting between 250 and 300 mM NaCl. N-terminal sequence analysis revealed that the shorter form started at Ser⁴⁷ (data not shown), demonstrating that it represents a PCSK9 prosegment cleaved after Arg⁴⁶ ↓ and missing residues AQEDEDGDYEEELVLR⁴⁶ (Fig. 1B).

Separation and complete purification of both forms of the PCSK9 heterodimer with either the prosegment 30–152 or 47–152 allowed us to test side by side their functional activity on HepG2 cells based on diI-LDL incorporation (16). Clearly, the loss of aa 30–46 resulted in increased PCSK9 functional activity on the LDLR, with an ~4-fold reduction in the PCSK9 concentration needed to reduce diI-LDL incorporation by 50%: EC₅₀ ~1 µg/ml for the truncated prosegment form and 3.5 µg/ml for the full-length form (Fig. 1C). We conclude that the N-terminal acidic domain of the prosegment naturally inhibits the activity of PCSK9 on LDLR.

Finally, we had previously reported that the mammalian basic amino acid-specific proprotein convertase PC7 (27) was the only the proprotein convertase that can partially process the prosegment of PCSK9 into a shorter fragment (28). We now further demonstrate that this fragment is also most likely generated by cleavage after Arg⁴⁶ ↓, because the natural hypocholesterolemic R46L variant is no longer cleaved by PC7 (data not shown). Therefore, both an endogenous convertase in insect High Five cells and mammalian PC7 can process the prosegment at Arg⁴⁶ ↓ resulting in a more active PCSK9 complex.

We next wanted to define the boundaries of this inhibitory domain. Because all reported crystal structures of PCSK9 did not detect aa 31–60 (11, 12, 26), most of our present constructs concentrated on this part of the prosegment. For this, we generated V5-tagged PCSK9 constructs (Fig. 2) either lacking aa 33–46 (Δ33–46), Δ33–58, or the whole prosegment Δ33–152. We kept aa 31 and 32 to make sure the signal peptide was correctly cleaved at the Ala³⁰ ↓ (5). We also generated RRRR ↓ EL mutants (Fig. 2A) that are optimal for cleavage (↓) by furin in the *trans*-Golgi network/cell surface

(28). These were strategically placed at RRRREL⁴⁹ and RRRREL⁵⁸ (Fig. 2A). Finally, we also generated (signal peptide-V5-prosegment) constructs containing the V5 tag at the N terminus of either aa 33–152 (pre-V5–33-152) or 59–152 (pre-V5–59-152) of the prosegment. All the above C-terminally V5-tagged constructs were co-expressed with LDLR. The autoradiographic data obtained after pulse labeling of HEK293 cells for 4 h with [³⁵S]Met and -Cys followed by immunoprecipitation of cell lysates and media with either mAb-V5 or an LDLR mAb-C7, as reported previously (10),

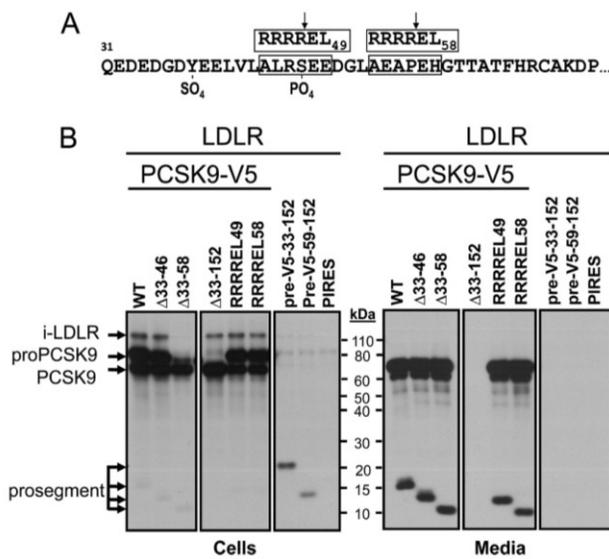


FIGURE 2. Biosynthetic analysis of PCSK9 constructs. *A*, sequence representation of the prosegment, its Tyr³⁸ sulfation and Ser⁴⁷ phosphorylation, and the location of the two RRRREL mutants. The segment 31–60 was not seen in any of the crystal structures analyzed. *B*, various PCSK9-V5 constructs produced were co-expressed with the LDLR and analyzed by SDS-PAGE separation of mAb-V5 immunoprecipitated materials obtained following a 4-h pulse labeling with [³⁵S]Met + -Cys of HEK293 cells transiently overexpressing each construct.

and SDS-PAGE analysis (28) are shown in Fig. 2B. The data demonstrate that processing and secretion of most of these constructs were as expected, resulting in secretory proteins consistent with their modifications or cleavage by endogenous furin-like enzymes in HEK293 cells (28). Exceptions are PCSK9 lacking the whole prosegment (Δ33–152-PCSK9) (29), as well as the prosegments alone pre-V5–33-152 and pre-V5–59-152, which likely remain in the endoplasmic reticulum (ER), as previously observed with other prosegment mutants (7).

As reported before, only pro-PCSK9 co-immunoprecipitated with the immature ER-associated form of LDLR (~110 kDa) (10). This was further confirmed in immunoprecipitates using the LDLR mAb-C7 (data not shown). Interestingly, except for Δ33–58-PCSK9, all other secretable constructs that contained the PCSK9 catalytic subunit co-immunoprecipitated with immature LDLR in the ER. It is likely that the fast processing of the Δ33–58-pro-PCSK9 into Δ33–58-PCSK9 (Fig. 2B, cells) resulted in too low ER-associated zymogen levels for detection of the complex. The fact that the Δ33–152-PCSK9 construct that is unable to leave the ER (29) still binds immature form of LDLR strongly argues that this interaction does not require the prosegment and likely occurs via the catalytic subunit of PCSK9, as found at the cell surface for the mature forms of PCSK9 and LDLR (12).

Upon overexpression of the PCSK9 prosegment deletants in HepG2 and HuH7 cells, we analyzed by Western blot their effect on total cellular LDLR levels. Thus, WT PCSK9 and its D374Y GOF mutant caused an overall decrease in total LDLR by ~30 and 75% in HepG2 cells and by ~30 and 92% in HuH7 cells, respectively (Fig. 3). In contrast, Δ33–46 and Δ33–58 decreased LDLR levels by ~45 and ~60% in HepG2 cells and by ~65 and ~80% in HuH7 cells, respectively, confirming that removal of aa 33–58 enhances by ~3–4-fold the PCSK9 activity on total LDLR. Finally, the most active constructs

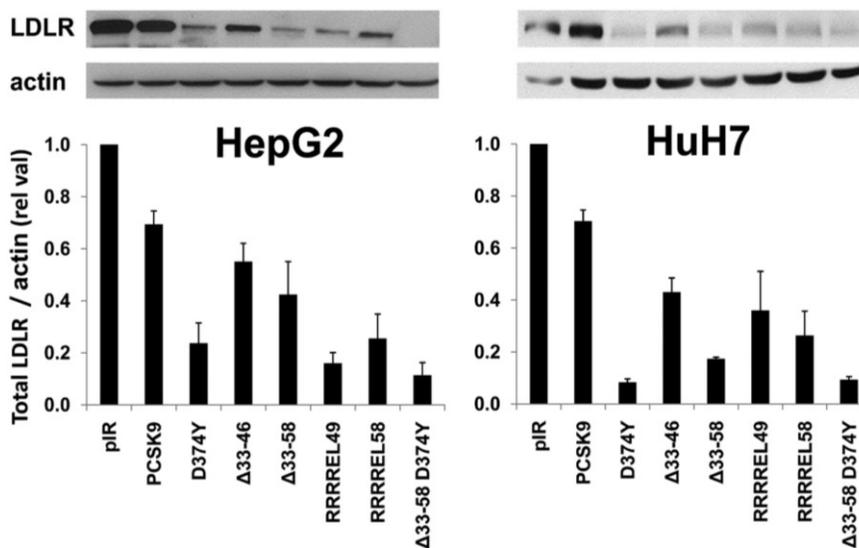


FIGURE 3. Effect of extracellular PCSK9 and its GOF mutants on total LDLR levels in HepG2 cells. Western blot analysis of LDLR in HepG2 (*left panel*) and HuH7 (*right panel*) cells transfected with PCSK9 and its gain of function mutants D374Y, Δ33–46, Δ33–58, and D374Y-Δ33–58. The estimated % decrease in total LDLR was normalized to β-actin levels. These data are representative of three independent experiments.

were PCSK9-D374Y and D374Y lacking aa 33–58 ($\Delta 33$ –58-D374Y), and the latter results in an $\sim 90\%$ decrease in total LDLR levels in both cell lines (Fig. 3).

FACS analysis was also performed to test the effect of the best constructs on the level of cell surface LDLR. Thus, $\sim 0.7 \mu\text{g/ml}$ of each protein construct secreted from HEK293 cells, estimated by ELISA directed against aa 31–454 (17) (not recognizing the CHR), was incubated for 4 h with HuH7 cells. The cells were then detached and immediately incubated with the mAb-C7 and then analyzed by FACS for LDLR levels (Fig. 4). The data show that removal of the acidic prosegment ($\Delta 33$ –58) results in an ~ 6 -fold increase in the activity of PCSK9 on cell surface LDLR and that the most active extracellular PCSK9 constructs were the D374Y and ($\Delta 33$ –58)-D374Y (Fig. 4), similar to what was observed in HepG2 and HuH7 cells (Fig. 3).

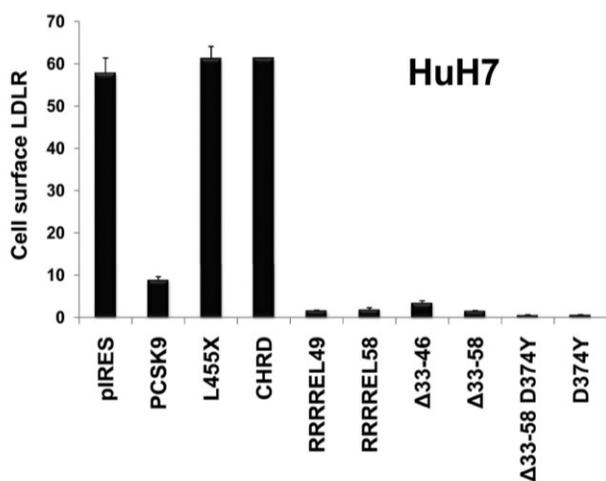


FIGURE 4. Effect of extracellular PCSK9 and its mutants on HuH7 cell surface LDLR. PCSK9 and its gain of function mutants D374Y, $\Delta 33$ –46, $\Delta 33$ –58, and D374Y- $\Delta 33$ –58 obtained from HEK293 cells ($0.7 \mu\text{g/ml}$) were incubated with HuH7 cells for 4 h. The cells were then detached, and the levels of cell surface LDLR were measured by FACS analysis. As control, we used either a construct lacking the CHR (L455X) or only a secreted form of the CHR, which had no effect on the LDLR. These data are representative of at least four independent experiments.

The data also show that a secretory CHR construct (SP-CHR) or one lacking the CHR (aa 1–454; L455X) has no effect on LDLR degradation (Fig. 4), even though L455X can bind the LDLR (30). This reinforces the notion that the CHR, although not binding the LDLR (11), is critical for the internalization and/or sorting of the PCSK9-LDLR complex into endosomes/lysosomes for degradation.

Acidic Region of the Prosegment Dampens the Binding PCSK9 to Either EGFA or LDLR—Two FRET-based assays were used to examine the binding affinity of the full-length versus N-terminal truncated forms of PCSK9 purified from the baculovirus/High Five system. The binding of PCSK9 to the LDLR epidermal growth factor precursor homology domain peptide (EGFA domain) was markedly increased for truncated PCSK9(47–692) compared with full-length PCSK9(30–692), as seen by the higher FRET signal with increasing levels of EGFA peptide added (Fig. 5, left panel). Using full-length LDLR ectodomain with the two forms of PCSK9 in a second FRET assay revealed that truncated PCSK9 bound LDLR with >3 times higher affinity (lower EC_{50}) than full-length PCSK9 (Fig. 5, right panel). These findings indicate that loss of the acidic N terminus of the prodomain resulted in a marked increase in PCSK9 binding affinity to the LDLR EGFA domain consistent with the increased functional activity observed in the cell-based assays.

Internalization Rate of PCSK9 and Its Gain of Function Deletant—By using mAb-V5, we assessed by immunocytochemistry the rate of internalization of PCSK9 and PCSK9($\Delta 33$ –58) (supplemental Fig. S1). Incubation of HepG2 cells at 4°C for 1 h with $\sim 0.7 \mu\text{g/ml}$ of these constructs was followed by 0-, 30-, and 60-min incubations at 37°C . Immunocytochemical analysis of the V5 and endogenous LDLR immunoreactivities revealed a much faster rate of internalization of PCSK9($\Delta 33$ –58) as compared with the wild type proteins. This is especially clear at the 30-min (supplemental Fig. S1B) and 60-min (supplemental Fig. S1C) time points, where the punctate-like structures, likely representing endosomes/lysosomes where PCSK9 and LDLR co-localize (10), are much more evident. In conclusion, removal of the 33–58 segment of PCSK9 leads to a >4 -fold higher activity toward cell surface

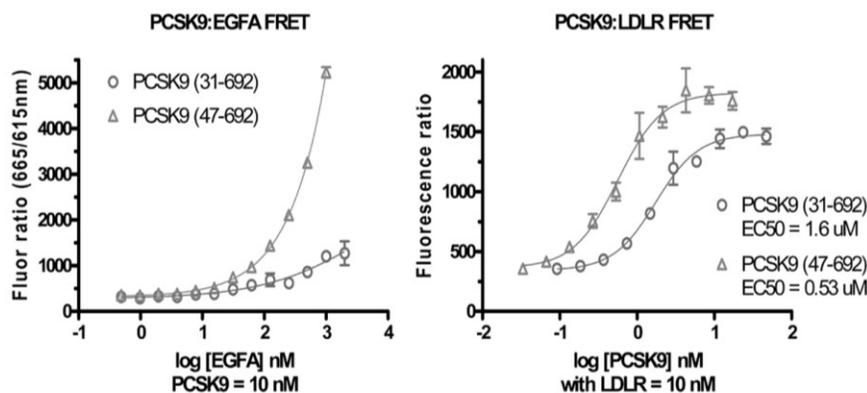


FIGURE 5. Binding affinities by FRET assays. Left panel, binding EGFA to full-length or truncated prodomain forms of PCSK9. Either form of PCSK9 (10 nM) was incubated with increasing levels of biotinyl-EGFA 40-mer peptide with 1 nM mAb 4H5-europium and 1 nM streptavidin-allophycocyanin conjugated at pH 7.4. Right panel, binding affinity by FRET assay for LDLR ectodomain binding to full-length or truncated prodomain forms of PCSK9. Biotinyl-PCSK9 (10 nM) was incubated with increasing levels of LDLR-His along with 1 nM anti-His-mAb-europium and 1 nM streptavidin-allophycocyanin conjugated.

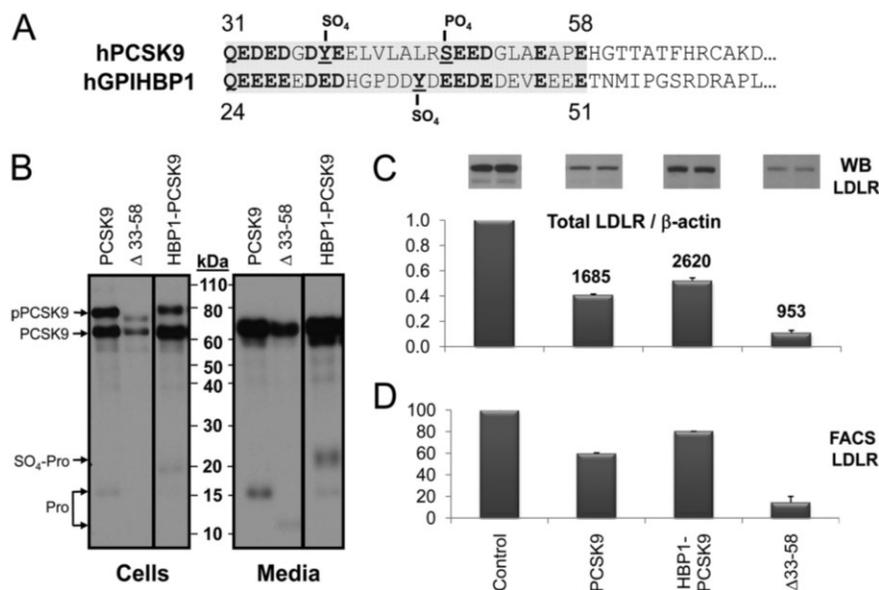


FIGURE 6. Biosynthetic analysis and comparative activity of PCSK9 and its HBP1 chimera. *A*, alignment of the acidic N-terminal domains of human PCSK9 and GPIHBP1. The shaded regions were swapped in the HBP1-PCSK9 chimera. Boldface residues emphasize the homology of acidic residues, including the Tyr sulfation and Ser phosphorylation. *B*, SDS-PAGE analysis of mAb-V5 immunoprecipitated materials obtained following a 3-h pulse labeling with [³⁵S]Met + -Cys of HEK293 cells transiently overexpressing each construct, including wild type PCSK9, its Δ33–58 construct, and HBP1-PCSK9 chimera. The slower migrating prosegment associated with the HBP1-PCSK9 chimera is likely to be the Tyr-sulfated form, as predicted (31). *C*, Western blot analysis of total LDLR levels of HuH7 cells exposed to various constructs for 4 h. The bar graph represents the average values of two independent experiments shown above each bar. The numbers above each bar represent the levels of PCSK9 in ng/ml measured by ELISA. *D*, FACS analysis for LDLR expression following a 4-h incubation of HuH7 cells with 0.7 μg/ml of the represented constructs, estimated by ELISA.

LDLR and results in a higher cellular internalization rate of the PCSK9-LDLR complex into endosomal/lysosomal-like structures.

Functional Similarity between the Acidic Stretch of the Prosegment of PCSK9 and That of GPIHBP1—Could the inhibitory effect of aa 31–58 of PCSK9 be due to the highly acidic nature of this segment? Literature search of secretory proteins that exhibit a similar acidic stretch playing a functional role in regulating their activity singled out GPIHBP1. Thus, we noted a significant similarity in acidity and length of the Tyr³⁸-sulfated, Ser⁴⁷-phosphorylated aa 31–58, ³¹QEDEDGDY^{SO₄}EELVLA^{PO₄}LRSEEDGLAEAPEH⁵⁸, of PCSK9 to the heparin-like, Tyr-sulfated, acidic stretch, including aa 24–51, ²⁴QEEEEDEDHGPD^{SO₄}DDYDEEDEDVEVEEET⁵¹, at the N terminus of the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein GPIHBP1. The latter domain binds lipoprotein lipase and apolipoprotein AV on chylomicrons, thereby enhancing lipoprotein lipase activity on triglycerides (31–33). Note that 13/14 acidic residues of PCSK9 (including the Tyr sulfation and Ser phosphorylation sites) align with similar residues in human GPIHBP1 (Fig. 6A).

Accordingly, using PCR mutagenesis we swapped the above sequences, and the chimeric HBP1-PCSK9 with aa 24–51 of GPIHBP1 replacing aa 31–58 of PCSK9 was analyzed. Biosynthetic (Fig. 6B), Western blot (Fig. 6C), and FACS (Fig. 6D) analyses revealed that the HBP1-PCSK9 chimeric construct behaved similar to WT PCSK9, in terms of its autocatalytic activation, secretion from HEK293 cells (~1.6-fold enhanced, estimated by ELISA) (Fig. 6B), and activity on total (Fig. 6C) and cell surface (Fig. 6D) LDLR in HuH7 cells (~20% less efficient). This suggested that the acidic stretch

of the prosegment of PCSK9 can be replaced by that of GPIHBP1 without overt deleterious effects on its activity on LDLR.

pH Dependence of the PCSK9 Association with Cells—To investigate a possible role of pH on the activity of extracellular PCSK9 on cell surface LDLR, we first defined the best conditions to analyze this process on two human hepatocyte-derived HepG2 and HuH7 cell lines. Incubation of each cell line with 0.7 μg/ml of PCSK9 at 37 °C for 30 min up to 4 h led to a gradual decrease of cell surface LDLR, as measured by FACS analysis of the cells after each incubation period (supplemental Fig. S2A). We noticed that even though both naive cell lines start with similar amounts of cell surface LDLR, HepG2 cells are ~3-fold more sensitive to PCSK9 within the first 30 min of incubation. Thus, in 30 min, LDLR levels decreased by ~1.7%/min in HepG2 cells and only by ~0.5%/min in HuH7 cells (supplemental Fig. S2A). However, following the first 30 min, the loss of cell surface LDLR slowed down in both cell lines, reaching a linear value of ~0.1%/min (supplemental Fig. S2B). The difference between the two cell lines may in part be due to the presence of the PCSK9 inhibitor annexin A2 at the plasma membrane of HuH7 cells, but not HepG2 cells (34), thus slowing down the initial effect of PCSK9. After 4 h of incubation with PCSK9, ~51 and ~24% of LDLR remained at the cell surface of HuH7 and HepG2 cells, respectively.

Because PCSK9 is known to better bind the EGFA domain of the LDLR at acidic pH values (11, 20), we sought to test the effect of pH on its domain structure and its ability to bind and enhance the degradation of the LDLR. ³⁵S-PCSK9-V5, obtained from the media of HEK293 cells pulse-labeled for 4 h with [³⁵S]Cys + -Met, was incubated with HepG2 cells for 30

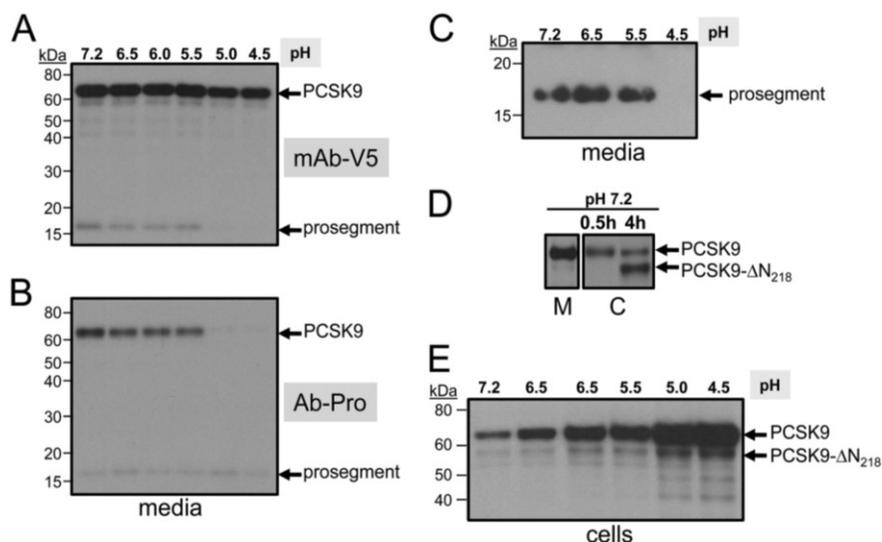


FIGURE 7. pH dependence of the PCSK9-prosegment complex and its association with HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with ^{35}S -PCSK9 (obtained from a 4-h pulse labeling of HEK293 cells overexpressing PCSK9-V5 (28)) for 30 min at 37 °C; the media were harvested and immediately neutralized at pH 7.2. The latter were then sequentially immunoprecipitated with mAb-V5 (A) and their supernatants (B) re-immunoprecipitated with the prosegment polyclonal antibody (Ab-Pro^{47–67}). The immunoprecipitates were analyzed on 8% SDS-PAGE in Tricine buffer, and their autoradiograms were depicted with 2-h (A) or 20-h (B) exposures. C, following immunoprecipitations with mAb-V5, the supernatants were then immunoprecipitated with the prosegment antibody Ab-Pro and then analyzed by SDS-PAGE. SDS-PAGE analysis of the immunoprecipitations of the ^{35}S -PCSK9-V5 bound/internalized to/into HepG2 cells after the 30-min or 4-h incubation period at pH 7.2 (D) and exposed for 30 min at various pH values (E). Notice the formation of the furin-cleaved form (PCSK9- ΔN_{218}) at 4 h of incubation at pH 7.2 and 30-min ones at acidic pH values.

min in DMEM containing 0.2% BSA, of which the pH values were adjusted to 7.2, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, and 4.5. The media were then harvested and immediately neutralized to pH 7.2, and the proteins were immunoprecipitated with the mAb-V5, and the supernatants were immunoprecipitated with an in-house polyclonal prosegment antibody Ab-Pro^{47–67} generated in goat. SDS-PAGE analysis revealed that although mature PCSK9 and its prosegment formed a heterodimer (5) at pH values 7.2 to 5.5, the prosegment dissociated from the catalytic subunit of PCSK9 at pH values 5.0 and 4.5, as it is no longer immunoprecipitated with the mAb-V5 (Fig. 7A), but it is still immunoprecipitated with the prosegment antibody as a single entity of ~17 kDa (Fig. 7B). To further prove that the prosegment dissociates from mature PCSK9 at pH 4.5, immunoprecipitation of the media with mAb-V5, followed by immunoprecipitation of the supernatant with the prosegment antibody Ab-Pro^{47–67} and SDS-PAGE analysis, failed to reveal the ~17-kDa prosegment only when the media were incubated for 30 min at pH 4.5 but not at pH values 7.2, 6.5, or 5.5 (Fig. 7C).

We also analyzed the ^{35}S -PCSK9-V5 bound/internalized to/into HepG2 cells after 30 min or 4 h of preincubation at pH 7.2 (Fig. 7D) or at various pH values (Fig. 7E). The data revealed that PCSK9 association with HepG2 cells increased gradually as a function of lowering the pH, reaching a maximum at pH 4.5 (Fig. 7E). The strong cell association of PCSK9 that lacks the prosegment at pH 4.5 may be related to its cell surface aggregation at this pH (see below). We also noticed in cell lysates the increased generation of the furin-cleaved form at Arg²¹⁸ (PCSK9- ΔN_{218}) (28) with time (4 h versus 0.5 h; Fig. 7D). This suggests that this processing, which results in the loss of function of PCSK9, is achieved by cell surface furin (35).

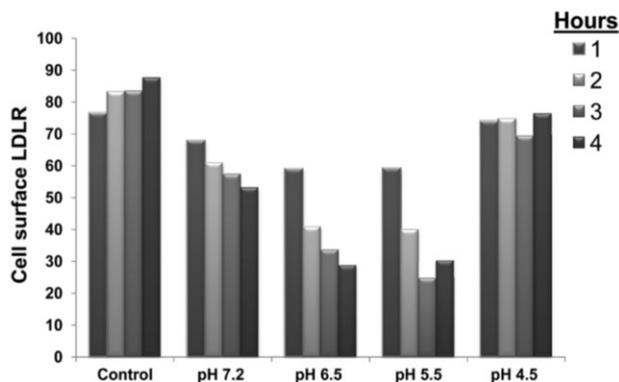


FIGURE 8. FACS analysis of HuH7 cells for LDLR expression. PCSK9 obtained from HEK293 cells (0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated at 37 °C for 1 h at pH 7.2, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, and 4.5. The media were then neutralized to pH 7.2 and incubated with HuH7 cells for 1–4 h. The cells were then extensively washed, treated with Versene for 5 min to suspend them, and then were immediately analyzed by FACS analysis for LDLR expression at the cell surface. Cell viability was higher than 70% in all cases, as judged by FACS analysis. The levels of measured cell surface LDLR are plotted (in arbitrary units) against pH and compared with control HuH7 cells not exposed to PCSK9 but subjected to similar manipulations using media from naive HEK293 cells. Similar data were obtained in more than three separate experiments.

pH Dependence of the PCSK9-induced Reduction of Cell Surface LDLR Levels—We next assessed whether short exposure of PCSK9 to acidic pH values affects its ability to enhance the degradation of cell surface LDLR. Accordingly, we incubated PCSK9 at the above pH values for 1 h and then immediately neutralized the media. These were then incubated for 1–4 h with HuH7 cells at pH 7.2, and cell surface LDLR levels were measured by FACS, with a representative example (out of three independent ones) shown in Fig. 8. To our surprise, the data revealed an irreversible pH-dependent in-

creased activity of PCSK9 at all incubation times (1–4 h) from pH 7.2 to 5.5, with a maximal ~2.5-fold higher activity after 3 h of incubation at pH 5.5. Interestingly, incubation of PCSK9 for 1 h at pH 4.5, followed by neutralization, resulted in an irreversible loss of its activity toward cell surface LDLR in HuH7 cells at all incubation times studied (Fig. 8), likely reflecting a profound conformational change of PCSK9 resulting in the dissociation of its prosegment (Fig. 7).

We next tested the pH-dependent extracellular activity of the various PCSK9 constructs lacking or not the acidic stretch of the prosegment (Fig. 2). The level of all proteins secreted from HEK293 cells were quantified by an ELISA (17). Equal amounts of PCSK9 (0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) from each preparation were then incubated at 37 °C at various pH values for 1 h, neutralized to pH 7.2, and then incubated with HuH7 cells for 4 h, and the cell surface LDLR was quantified by FACS (supplemental Fig. S3). The data show that the natural mutants R46L and A53V do not significantly modify the PCSK9 activity or its pH dependence. However, the constructs lacking aa 33–46 and especially 33–58 are about 2- and >4-fold more active than WT PCSK9, at all pH values, approaching the activity of the most potent PCSK9 D374Y mutant (11). These data clearly show that removal of aa 33–58 results in a significantly enhanced activity on cell surface LDLR of HuH7 cells. Because it was reported that co-expression of the prosegment and PCSK9 lacking the latter results in a secreted bioactive complex (29, 36, 37), we also used this approach to verify whether the lack of aa 33–58 would also result in an enhancement of the pH-dependent activity of PCSK9 on LDLR. Although the high level of activity achieved upon removal of the acidic stretch of the prosegment masked the pH-dependent effect, we did see that it still remained when we co-expressed PCSK9 lacking the prosegment (PCSK9- Δpro) with either the full-length prosegment or its $\Delta 33\text{--}58$ mutant (supplemental Fig. S3, right histograms). Although in *trans* co-expression of the prosegment and mature PCSK9 results in a less active protein than the native one, it is still sensitive to the irreversible pH 5.5 activation. This suggests that the determinant responsible for the pH-dependent activation of PCSK9 does not reside in aa 33–58 of the prosegment and more specifically that the conserved His⁵⁸ is not involved.

pH-dependent Internalization of PCSK9 and Its Co-localization with LDLR—HepG2 cells were incubated with ~0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PCSK9 that were preincubated for 1 h at pH values 7.2, 5.5, and 4.5, followed by neutralization at pH 7.2. Immunocytochemistry at the confocal level revealed a stronger intensity of labeling and degree of co-localization of PCSK9 and LDLR at the cell surface and in endosome/lysosome-like punctate structures upon preincubation at pH 5.5 versus pH 7.2 (Fig. 9). In contrast, preincubation at pH 4.5 resulted in an aggregated PCSK9 that stuck nonspecifically to cells at areas mostly devoid of LDLR.

Novel Cleavage of PCSK9 at pH 5.5—To probe the mechanism behind the irreversible activation of PCSK9 following a 1-h incubation at pH 5.5, we examined the molecular forms of PCSK9 by Western blot. Upon incubation of PCSK9-V5 secreted from HEK293 cells, which contains both full-length

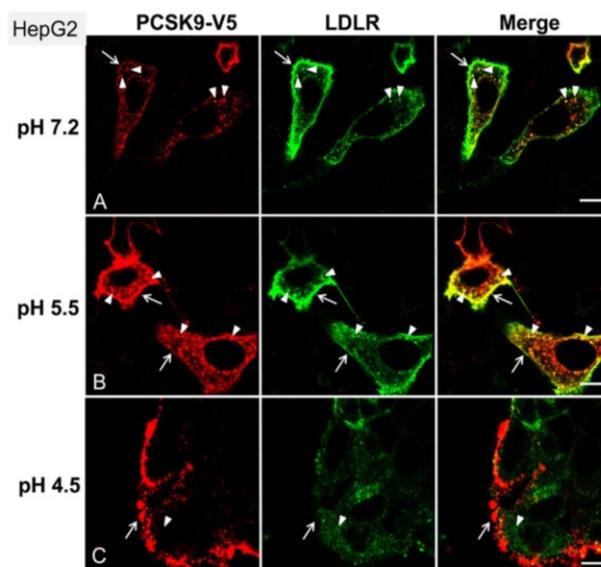


FIGURE 9. Increased internalization of PCSK9 after exposure to pH 5.5. HepG2 cells were incubated for 60 min at 37 °C with condition media, from HEK293 cells overexpressing PCSK9-V5, that have been preincubated at the indicated pH (A–C), as described under “Experimental Procedures.” After fixation and permeabilization of the cells, surface binding and internalization of PCSK9 as well as the localization of LDLR were detected by immunofluorescence with anti-V5 (red) and anti-LDLR antibodies (green). Arrows point to the cell surface labeling of PCSK9 and LDLR, and arrowheads indicate the internalized PCSK9 and its co-localization with LDLR. Bars, 10 μm .

and the furin-cleaved PCSK9- ΔN^{218} , only at pH 5.5, we clearly observed the formation of a novel V5-positive fragment that is ~3 kDa N-terminally shorter than PCSK9- ΔN^{218} , hereafter called PCSK9- ΔNx (Fig. 10A). HuH7 cells were then incubated with the above neutralized media for 1–4 h and washed extensively, and the PCSK9-bound/internalized forms were analyzed by Western blotting (Fig. 10B). Clearly, a gradual increase in PCSK9- ΔNx was seen in cell lysates of the samples originating from the pH 5.5 incubations. We observed only small amounts of cell-associated PCSK9 at higher pH values possibly because they are rapidly hydrolyzed. Notice that the inactive furin-cleaved form PCSK9- ΔN^{218} (28) does not associate with cells. The novel cleavage site is believed to occur after the active site His²²⁶, based on its molecular mass relative to PCSK9- ΔN^{218} . From the crystal structure data (11), this would predict that PCSK9- ΔNx is composed of two disulfide-bonded subunits held by Cys²²³–Cys²⁵⁵ (Fig. 10C). Whether this form is more active than the full-length PCSK9 or is actually an inactivated form remain to be defined, but it is produced coincidentally at pH 5.5, and much less so at pH 6.5, which coincides with the observed maximal PCSK9 activity on LDLR. Interestingly, PCSK9 arising from the pH 4.5 preincubation, which resulted in dissociation of the prosegment (Fig. 7), was strongly bound to HuH7 cells (Fig. 10B) but seemingly was not able to enhance the degradation of the LDLR (Fig. 8). This might be due to its propensity to aggregate at pH 4.5, as seen on the surface of HepG2 cells (Fig. 9).

The above data suggested that at pH values 6.5–5.5, PCSK9 could irreversibly adopt a more active structure. Whether or not this is counterbalanced or associated with the production

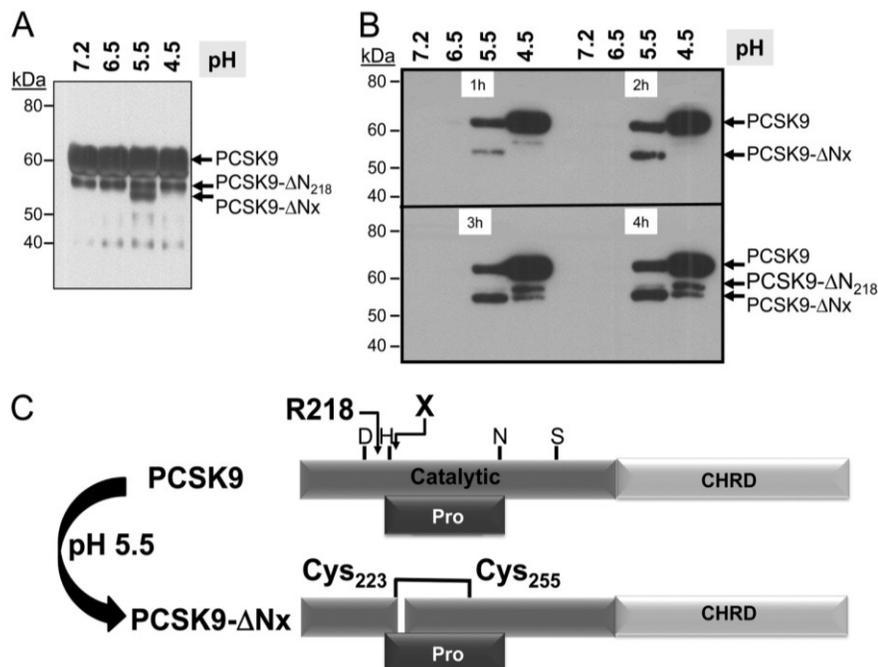


FIGURE 10. Generation of a novel PCSK9- Δ Nx product at pH 5.5. *A*, SDS-PAGE analysis of the media containing 35 S-PCSK9 exposed to various pH values for 1 h. Notice the appearance of the novel PCSK9- Δ Nx product at pH 5.5, migrating below the furin-cleaved PCSK9- Δ N 218 . *B*, SDS-PAGE analysis of the lysates of HuH7 cells exposed to 35 S-PCSK9 preincubated at various pH values, neutralized, and then incubated for 1–4 h with the cells. Notice that very little PCSK9 can be detected in cells at pH values below 5.5, likely due to its rapid uptake and degradation. The level of the PCSK9- Δ Nx product gradually increases with time. Notice that the furin-cleaved PCSK9- Δ N 218 is not taken up by the cells, in accordance with its loss of aa 152–218 and the prosegment (28). *C*, proposed model for the generation at pH 5.5 of a two-chain disulfide-linked PCSK9- Δ N 218 still bound to the prosegment.

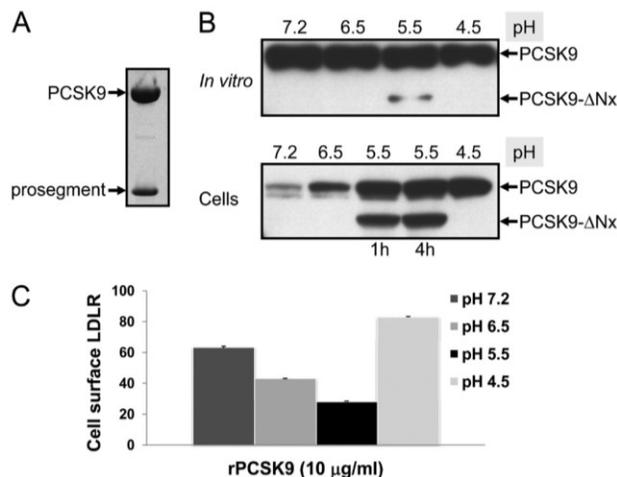


FIGURE 11. Pure PCSK9 can generate PCSK9- Δ Nx at pH 5.5 with increased activity. *A*, Coomassie staining of pure PCSK9 purified from the media of baculovirus High Five cells, attesting for its complex formation with the prosegment and its purity as confirmed by protein sequence analysis (data not shown). *B*, Western blot analysis using our PCSK9 polyclonal antibody (10) of pure PCSK9 (10 μ g/ml) incubated *in vitro* at 37 $^{\circ}$ C at various pH values for 1 h. Notice the production of PCSK9- Δ Nx only at pH 5.5. Following neutralization and incubation with HuH7 cells for 4 h, the cells were lysed, and their content was analyzed by Western blot. *C*, FACS analysis of cell surface LDLR of HuH7 cells exposed to 10 μ g/ml of pure PCSK9 preincubated *in vitro* at 37 $^{\circ}$ C at various pH values for 1 h, neutralized, and then incubated with the cells for 4 h.

of PCSK9- Δ Nx is still not clear. We next incubated *in vitro* affinity-purified PCSK9 obtained from baculovirus expression (Fig. 11A) for 1 h at various pH values. The data show that

here again PCSK9- Δ Nx is only produced at pH 5.5, albeit at a very low level. However, further incubation of this reaction pool with HuH7 cells for 1 or 4 h showed much enhanced cleavage and the preferential cellular binding/internalization of the cleaved *versus* full-length form, as the levels of the two cell-associated forms are now almost equal (Fig. 11B). Finally, FACS analysis of the LDLR levels at the surface of HuH7 cells exposed to this reaction mixture also showed a similar maximal \sim 2.5-fold increased activity of the sample preincubated at pH 5.5 (Fig. 11C). Thus, purified PCSK9, which may be contaminated with traces of a protease activity from High Five cells, behaves the same as the one originating from HEK293 cells overexpressing it, and its cleavage at site X is maximal at pH 5.5. Collectively, these data suggest that PCSK9- Δ Nx is likely generated by cleavage of PCSK9 by a soluble protease and that this form has a strong affinity to bind, and likely internalize, into cells.

Finally, we wished define the cleavage site resulting in PCSK9- Δ Nx. Based on its \sim 3-kDa size smaller than the furin-cleaved form at Arg 218 , and the presence of a disulfide bond, cleavage likely occurs between aa 244 and 254 (Fig. 12A). Accordingly, although cleavage of the natural GOF R218S and LOF R237W mutants still occurred at pH 5.5 (Fig. 12B), the pH dependence of the less active R237W mutant was somewhat blunted (Fig. 12C). This suggested that the degree of pH dependence is sensitive to one or more residue(s) close to Arg 237 . It seems that the positive charge of Arg 237 is important, because its replacement with Trp decreased the extent of the pH 5.5 cleavage, whereas the R237H mutant, which is pos-

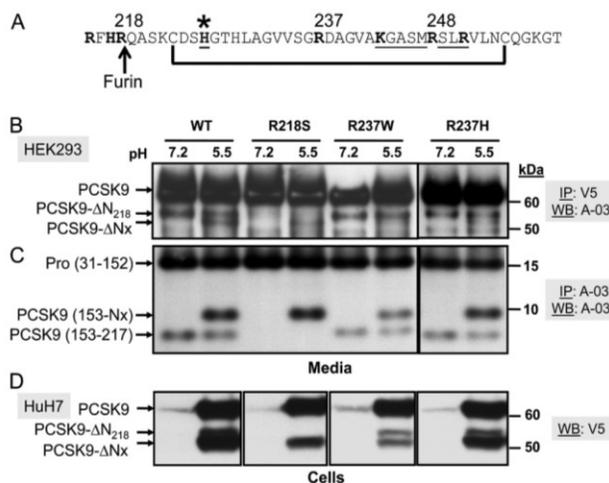


FIGURE 12. Evidence that the natural variants R218S and R237W can still generate PCSK9-ΔNx at pH 5.5. A, amino acid sequence of the segment, including aa 215–260 of PCSK9. The various Arg and His residues, including the potential KGASMRSLR ↓ VL²⁵³ furin-like sites, and the disulfide bridge are emphasized. B, SDS-PAGE analysis of the media of HEK293 cells overexpressing WT or R218S, R237W, or R237H. The media of the above cells were incubated for 1 h at 37 °C at either pH 7.2 or 5.5 and then immediately neutralized to pH 7.2 and immunoprecipitated (IP) with mAb-V5 and Western-blotted (WB) with the PCSK9 antibody A-03, recognizing aa 31–454 (10), or immunoprecipitated and Western-blotted with A-03 (C). D, same neutralized media were then incubated for 4 h at 37 °C with HuH7 cells. The cells were extensively washed three times and the lysates analyzed by Western blot with mAb-V5. The emphasized migration positions are those of PCSK9 and its furin-processed form PCSK9-ΔN²¹⁸, as well as the novel PCSK9-ΔNx product and the corresponding prosegment (aa 31–152) and N-terminal aa 153-Nx and 153–217.

itively charged at acidic pH values, was almost as well cleaved as the WT. Notably, production of the PCSK9-ΔNx form and its PCSK9(153–217) counterpart (the Arg²¹⁸ is expected to be removed by a basic carboxypeptidase, *e.g.* CPD (38)) was not affected by the loss of the furin cleavage at Arg²¹⁸ ↓ (R218S; Fig. 12C), providing evidence that its generation is independent from that of the furin cleavage at Arg²¹⁸ ↓. Finally, incubation of HuH7 cells with neutralized media expressing either PCSK9 or its R218S, R237W, or R237H mutants, which had been pre-exposed to pH 5.5 for 1 h, also revealed that PCSK9-ΔNx is robustly associated with cells. From the small amounts of PCSK9-ΔNx seen in the media compared with PCSK9 (Fig. 12B), we can deduce that PCSK9-ΔNx is relatively more strongly associated with cells than the uncleaved WT PCSK9 (Fig. 12D).

Identification of Arg²⁴⁸ as the Cleavage Site of PCSK9 at pH 5.5—Scrutiny of the PCSK9 sequence revealed two other potential furin-like sites following Arg²¹⁸, *i.e.* at either Arg²⁴⁸ or Arg²⁵¹ (39) in the sequence KGASMR²⁴⁸-SLR²⁵¹-VL²⁵³. However, preincubation of PCSK9 at pH 5.5 for 2 h, followed by overnight incubation with pure furin at neutral pH, did not enhance this cleavage (supplemental Fig. S6). In fact, this resulted in a novel cleavage, likely at REIEGR¹⁹⁹ ↓ VM, even in the absence of pH 5.5 preincubation (supplemental Fig. S6). Furthermore, we believe that cleavage does not occur autocatalytically because a similar incubation of the complex prosegment PCSK9-H226A with the active site His²²⁶ mutated to Ala (5, 29) also generated the same PCSK9(153-Nx) (supplemental Fig. S6). Interestingly, the H226A mutant is resistant

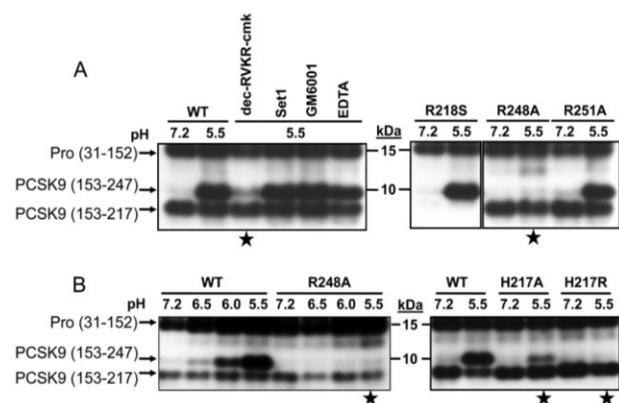


FIGURE 13. Identification of Arg²⁴⁸ as the site of cleavage and implication of His²¹⁷. SDS-PAGE analysis of the media of HEK293 cells overexpressing WT PCSK9 at pH 7.2 or 5.5. The media of the above cells were incubated for 1 h at 37 °C at either pH 7.2 or 5.5 and then immediately neutralized to pH 7.2 and immunoprecipitated (IP) with mAb-V5 and Western-blotted (WB) with the PCSK9 antibody A-03, as in Fig. 12. A, effect of protease inhibitors on this pH 5.5 processing. This includes incubation of PCSK9 at pH 5.5 in the presence of either 50 μM of the furin-like inhibitor decanoyl-RVCR-chloromethyl ketone (RVKR-cmk), the serine and cysteine protease inhibitor mixture (Set1: 500 μM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride + 150 nM aprotinin + 1 μM E-64 + 0.5 mM EDTA + 1 μM leupeptin) or the metalloprotease inhibitors 150 μM GM6001 or 15 mM EDTA. Processing of the mutants R218S, R248A, and R251A at pH values 7.2 and 5.5 is also shown. B, left panel, pH-dependent processing of PCSK9 into PCSK9-ΔN²⁴⁷. Note that the mutant R248A is not processed. Right panel, influence of His²¹⁷ (WT) and its mutants H217A and H217R on the processing at Arg²⁴⁸. The stars point to the conditions that block cleavage at Arg²⁴⁸ at pH 5.5.

to this novel furin cleavage (supplemental Fig. S6). Thus, at neutral pH the cell surface furin inactivates PCSK9 by cleavage at Arg²¹⁸ ↓. In contrast, the conformational changes occurring at pH 5.5 favor activation of PCSK9 with the concomitant production of a two-chain PCSK9-ΔNx through cleavage by another protease, likely within the acidic environment of endosomal compartments.

We also noted that such cleavage occurs rapidly, because incubation of PCSK9 secreted from HEK293 cells at pH 5.5 for as short as 10 min generated most of the observed cleavage. However, the presence of 50 μM RVKR-chloromethyl ketone, a furin-like protease inhibitor (40), during the incubation period prevented the observed cleavage (Fig. 13A). In contrast, incubation of PCSK9 with either a mixture of serine and cysteine protease (500 μM 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride + 150 nM aprotinin + 1 μM E-64 + 0.5 mM EDTA + 1 μM leupeptin) or metalloprotease (150 μM GM6001 or 15 mM EDTA) inhibitors did not prevent cleavage. Upon mutagenesis of the likely PC-like sites, we observed that only R248A, but not R251A, abolished cleavage at pH 5.5 (Fig. 13A). This suggested that processing of PCSK9 at pH 5.5 occurs at Arg²⁴⁸, which exhibits an unusual PC-like site with a Lys²⁴³ at P6 (39), within the sequence KGASMR²⁴⁸-SL. However, the pH-dependent generation of PCSK9-ΔN²⁴⁸, which is maximal at pH 5.5 (Fig. 13, A and B, left panel; aa 153–247, as Arg²⁴⁸ would be removed by a carboxypeptidase), is not autocatalytic (supplemental Fig. S6) nor is it enhanced in the presence of soluble furin, PACE4 or PC5/6 (data not shown), suggesting that a rapidly cleaving enzyme, very active at pH 5.5 and distinct from the PCs, is responsible for this cleavage. The

observed inhibition by the furin-like inhibitor RVKR-chloromethyl ketone is likely due to the ability of this inhibitor to bind and inactivate PCSK9 itself by an unusual mechanism (data not shown).

In agreement with the crystal structure of PCSK9, which suggested that His²¹⁷ can form contacts with residues close to Arg²⁴⁸ (11), the mutants H217A and much more so H217R abolished the cleavage of PCSK9 at pH 5.5 (Fig. 13B, right panel). Thus, the pH-dependent processing of PCSK9 at Arg²⁴⁸ is at least in part regulated by His²¹⁷, which would become positively charged at pH 5.5, but such an effect is not just due to charge because it is not mimicked by a bulkier Arg residue.

DISCUSSION

The discovery and characterization of PCSK9 in 2003 (5) and the genetic evidence for its implication in LDL-cholesterol regulation (6) were a stepping stone for a major research effort by many laboratories to define the mechanism behind the observed PCSK9 activity (4, 41–43). Very soon it became clear that the main hepatic target of PCSK9 is the LDLR (13) and that the degradation of the latter in acidic endosome/lysosome-like compartments is enhanced by PCSK9 (7–10), and it does not seem to require the PCSK9 proteolytic activity (36, 37). This was rationalized by structural and biochemical studies that revealed that the spatially separate catalytic domain of PCSK9 (11) binds the EGFA domain of LDLR (20) and that this interaction is enhanced at acidic pH values (11), likely due in part to the protonation of His³⁰⁶ of EGFA (12, 44). It also became apparent that the inhibitory N-terminal prosegment, which remains noncovalently complexed to PCSK9 (5) and is not easily dislodged (11), and the C-terminal CHRDLR play critical roles in regulating the activity of PCSK9 (12) and the cellular trafficking of the PCSK9-LDLR complex (10, 30). Indeed, specific mutations in the prosegment and CHRDLR (4, 45), as well as the hinge region connecting the catalytic domain and the CHRDLR (17), were reported to influence the PCSK9 activity likely by modulating its ability to drag the LDLR toward subcellular degradative compartments.

In this study, we examined more closely the boundary of the prosegment that negatively regulates intracellular and extracellular activity of PCSK9 on the LDLR. Our data pointed out that deletion of aa 31–58 of the prosegment results in a >4-fold higher activity of PCSK9 toward cellular LDLR. In addition, a construct combining the lack of this segment and the GOF mutation D374Y results in a >15-fold enhanced activity of PCSK9 (Figs. 3 and 4). The existence of endogenous proteases that can process the prosegment at Arg⁴⁶ ↓ was shown both in baculovirus-expressing High Five cells (Fig. 1) and by the ability of PC7 to cleave the prosegment of PCSK9 (28). Interestingly, the LOF mutation R46L that mostly affects Caucasians (45), and is associated with hypocholesterolemia (46), is no longer processed by PC7 (data not shown), and it may result in resistance to cleavage *in vivo*. In addition, another E32K mutant observed in a Japanese population, which reduces

the acidic nature of the prosegment, was associated with a GOF of PCSK9 (47).

What is the mechanism behind the inhibitory activity of the acidic aa 31–58? This may be due in part to its inferred effect on the overall conformation of PCSK9, because the removal of aa 31–53 enhances >7-fold the *in vitro* binding of PCSK9 and EGFA (12). In our hands, removal of aa 30–46 results in a 3-fold better binding to LDLR (Fig. 5) *in vitro*, and the lack of aa 33–58 significantly enhances the internalization rate of the PCSK9-LDLR complex in HepG2 cells (supplemental Fig. S1). However, this segment was not seen in any of the crystal structures published at both acidic and basic pH values and is believed to be flexible and/or unstructured (11, 18, 19). An alternative, but not mutually exclusive, possibility would be that this acidic prosegment may transiently bind positive charges in a basic domain of PCSK9 (maybe within the CHRDLR) or in another protein *in vivo*, which would regulate its inhibitory effect.

A positive correlation between PCSK9 levels and circulating triglycerides was reported in human plasma (17, 48). The similarity of the N-terminal acidic sequence of PCSK9 to that of GPIHBP1, which enhances lipase hydrolysis of triglycerides in chylomicrons (31–33), led us to show that these domains could be swapped without a deleterious effect on the PCSK9 function (Fig. 6). Thus, it is plausible that like GPIHBP1 (31–33), it is the acidic nature of the prosegment that regulates its activity. Through its acidic segment, could PCSK9 up-regulate triglyceride levels by sequestering a limiting lipase such as lipoprotein lipase and/or endothelial lipase or apoAV on lipoprotein particles, thereby reducing triglyceride hydrolysis to free fatty acids? Whether PCSK9 can compete with the negatively charged N-terminal segment of GPIHBP1 for this activity needs to be analyzed. Thus, much more work is required to confirm this hypothesis and to explain the observed positive effect of PCSK9 on circulating triglyceride levels in human.

Even though His³⁰⁶ of the EGFA domain contributes to the pH-dependent interaction of PCSK9 with the LDLR (12, 44), there is currently no clear structural explanation for the increased PCSK9 binding to LDLR at low pH (11). Could aa 534–607 within the second repeat domain of the CHRDLR that contains 9 His residues, all localized within a groove (18, 19), undergo electrostatic repulsion due to their positive charge at low pH? Is the LDLR degradation favored by changes in the CHRDLR conformation and/or through binding to another protein?

To begin to answer such questions, we first studied in more detail the effect of pH on the activity of extracellular PCSK9 in HuH7 cells. To our surprise, we found that a short exposure of PCSK9 to acidic pH values (pH values 6.5 or 5.5) followed by neutralization of the solution resulted in an irreversible and significantly enhanced activity of PCSK9 on cell surface LDLR, reaching a maximal ~2.5-fold activation at pH 5.5 (Fig. 8). This pH dependence was still present in the absence of aa 33–58 (supplemental Fig. S3), suggesting that the critical aa is/are present elsewhere within the molecule. Interestingly, at the most effective pH 5.5, we also observed a novel cleavage resulting in the gen-

eration of a likely two-chain disulfide-linked PCSK9- ΔN^{248} that still retains the prosegment (Figs. 10 and 13). The generation of this product seems to be the result of a protease possibly present at the cell surface of cells (that may also be shed into the medium), because purified PCSK9 can undergo such cleavage and activation in the media and when incubated with cells (Figs. 11 and 13), and it is produced from PCSK9 isolated from either High Five or HEK293 cells. It is conceivable that such cleavage would produce a more flexible two-chain PCSK9 that can better interact with the LDLR and/or the sorting machinery. It is still possible that the observed enhanced activity of PCSK9 at pH 5.5 may be due to a pH-dependent conformational change of full-length PCSK9 and that the generation of PCSK9- ΔN^{248} rather results in loss of function. However, preliminary FACS data revealed that the activity of the PCSK9-R248A mutant on LDLR is much less sensitive to pH, especially between pH values 6.0 and 5.5, suggesting that cleavage is necessary for maximal activity. However, the ultimate proof of functionality will require the future purification of the cleaved protein at Arg²⁴⁸. What is clear however is that preincubation of PCSK9 at pH 5.5 results in a more active molecule that internalizes faster into endosomes together with cell surface LDLR (Fig. 9). It is noted that although Arg²⁴⁸ in PCSK9 is conserved between various primates and *Xenopus laevis*, it is replaced by a His in the rodent rat and mouse orthologues. Because the R248A mutant is not processed (Fig. 13), and neither soluble PC5/6A, PACE4, nor furin can cleave at this residue in human PCSK9, it is plausible that the cognate processing enzyme may not be a proprotein convertase nor exclusively Arg-specific. Alternatively, cleavage at Arg²⁴⁸ may be specific to primate and *Xenopus laevis* PCSK9. Coincidentally, the best pH for PCSK9 activation is close to that of late endosomes (49), suggesting that this process may actually take place within the acidifying endosomes *en route* to their fusion with lysosomes and delivery of cargo for degradation. The enzymatic activity of PCSK9 is not necessary for LDLR (36, 37) or the VLDL receptor and apoER2 (29) receptor degradation nor is it necessary for the generation of PCSK9- ΔN^{248} (Figs. 12 and 13 and supplemental Fig. S6). In that context, preincubation of PCSK9 at any pH value from 7.5 to 4.5 did not yield an active protease that would degrade the ectodomain of LDLR, because it was unable to digest soluble LDLR (supplemental Fig. S4). Thus, at least *in vitro*, the activation of PCSK9 observed at pH 5.5 does not seem to generate a protease activity that would degrade the LDLR. Interestingly, SDS-PAGE analysis of the molecular forms generated at pH 7.2 and 5.5 revealed that at acidic pH values mostly the cleaved forms of PCSK9, but not the CHR, exhibit the highest propensity to oligomerize under nonreducing conditions (supplemental Fig. S5). This is in accord with a report suggesting that the self-association of PCSK9, especially observed at acidic pH values, correlates with its LDLR degrading activity (50).

In conclusion, this study sheds new light on the importance of the acidic N-terminal sequence of the prosegment and its effect on the activity of PCSK9. We also present a novel

mechanism for fine-tuning the activity of PCSK9, which is enhanced at acidic pH values close to those of late endosomes.

Acknowledgments—We thank all the members of the Seidah laboratory for helpful discussions and Brigitte Mary for efficacious editorial assistance. We also thank Brian Carpenter, Yaqun Zhang, Deepa Calambur, Mian Gao, and Mark Witmer of Bristol-Myers Squibb for PCSK9 cloning/baculovirus expression and production. We also thank the reviewers of this article who gave us valuable advice that enhanced the content of this manuscript.

REFERENCES

- Lloyd-Jones, D., Adams, R., Carnethon, M., De Simone, G., Ferguson, T. B., Flegal, K., Ford, E., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Nichol, G., O'Donnell, C., Roger, V., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Stafford, R., Steinberger, J., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N., Wylie-Rosett, J., and Hong, Y. (2009) *Circulation* **119**, e21–181
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 788–792
- Maxfield, F. R., and Tabas, I. (2005) *Nature* **438**, 612–621
- Seidah, N. G., and Prat, A. (2007) *J. Mol. Med.* **85**, 685–696
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 928–933
- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Vileger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., and Boileau, C. (2003) *Nat. Genet.* **34**, 154–156
- Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D. J., Boileau, C., Brissette, L., Chretien, M., Prat, A., and Seidah, N. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 48865–48875
- Maxwell, K. N., Fisher, E. A., and Breslow, J. L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 2069–2074
- Park, S. W., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 50630–50638
- Nassoury, N., Blasiolo, D. A., Tebon Oler, A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A., and Seidah, N. G. (2007) *Traffic* **8**, 718–732
- Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffior, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R., Mansour, M. N., McGrath, K. M., Seddon, A. P., Shenolikar, S., Stutzman-Engwall, K. J., Warren, L. C., Xia, D., and Qiu, X. (2007) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 413–419
- Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D., and Deisenhofer, J. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1820–1825
- Maxwell, K. N., and Breslow, J. L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7100–7105
- Lagace, T. A., Curtis, D. E., Garuti, R., McNutt, M. C., Park, S. W., Prather, H. B., Anderson, N. N., Ho, Y. K., Hammer, R. E., and Horton, J. D. (2006) *J. Clin. Invest.* **116**, 2995–3005
- Chan, J. C., Piper, D. E., Cao, Q., Liu, D., King, C., Wang, W., Tang, J., Liu, Q., Higbee, J., Xia, Z., Di, Y., Shetterly, S., Arimura, Z., Salomonis, H., Romanow, W. G., Thibault, S. T., Zhang, R., Cao, P., Yang, X. P., Yu, T., Lu, M., Retter, M. W., Kwon, G., Henne, K., Pan, O., Tsai, M. M., Fuchslocher, B., Yang, E., Zhou, L., Lee, K. J., Daris, M., Sheng, J., Wang, Y., Shen, W. D., Yeh, W. C., Emery, M., Walker, N. P., Shan, B., Schwarz, M., and Jackson, S. M. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 9820–9825
- Poirier, S., Mayer, G., Poupon, V., McPherson, P. S., Desjardins, R., Ly,

- K., Asselin, M. C., Day, R., Duclos, F. J., Witmer, M., Parker, R., Prat, A., and Seidah, N. G. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 28856–28864
17. Dubuc, G., Tremblay, M., Paré, G., Jacques, H., Hamelin, J., Benjannet, S., Boulet, L., Genest, J., Bernier, L., Seidah, N. G., and Davignon, J. (2010) *J. Lipid Res.* **51**, 140–149
 18. Hampton, E. N., Knuth, M. W., Li, J., Harris, J. L., Lesley, S. A., and Spraggon, G. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 14604–14609
 19. Piper, D. E., Jackson, S., Liu, Q., Romanow, W. G., Shetterly, S., Thibault, S. T., Shan, B., and Walker, N. P. (2007) *Structure* **15**, 545–552
 20. Zhang, D. W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 18602–18612
 21. Timms, K. M., Wagner, S., Samuels, M. E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M. H., Hopkins, P. N., Hunt, S. C., and Shattuck, D. M. (2004) *Hum. Genet.* **114**, 349–353
 22. Dewpura, T., Raymond, A., Hamelin, J., Seidah, N. G., Mbikay, M., Chrétien, M., and Mayne, J. (2008) *FEBS J.* **275**, 3480–3493
 23. Teupser, D., Thiery, J., Walli, A. K., and Seidel, D. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1303**, 193–198
 24. Miao, B., Sun, S., Santomenna, L. D., Zhang, J. H., Young, P., and Mukherjee, R. (2002) *Methods Enzymol.* **357**, 180–188
 25. Benjannet, S., Elagöz, A., Wickham, L., Mamarbachi, M., Munzer, J. S., Basak, A., Lazure, C., Cromlish, J. A., Sisodia, S., Checler, F., Chrétien, M., and Seidah, N. G. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10879–10887
 26. Bottomley, M. J., Cirillo, A., Orsatti, L., Ruggeri, L., Fisher, T. S., Santoro, J. C., Cummings, R. T., Cubbon, R. M., Lo Surdo, P., Calzetta, A., Noto, A., Baysarowich, J., Mattu, M., Talamo, F., De Francesco, R., Sparrow, C. P., Sitlani, A., and Carfi, A. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 1313–1323
 27. Seidah, N. G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M., and Day, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3388–3393
 28. Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N. G. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 30561–30572
 29. Poirier, S., Mayer, G., Benjannet, S., Bergeron, E., Marcinkiewicz, J., Nassoury, N., Mayer, H., Nimpf, J., Prat, A., and Seidah, N. G. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 2363–2372
 30. Zhang, D. W., Garuti, R., Tang, W. J., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13045–13050
 31. Beigneux, A. P., Davies, B. S., Gin, P., Weinstein, M. M., Farber, E., Qiao, X., Peale, F., Bunting, S., Walzem, R. L., Wong, J. S., Blaner, W. S., Ding, Z. M., Melford, K., Wongsirirot, N., Shu, X., de Sauvage, F., Ryan, R. O., Fong, L. G., Bensadoun, A., and Young, S. G. (2007) *Cell Metab.* **5**, 279–291
 32. Gin, P., Yin, L., Davies, B. S., Weinstein, M. M., Ryan, R. O., Bensadoun, A., Fong, L. G., Young, S. G., and Beigneux, A. P. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 29554–29562
 33. Beigneux, A. P., Davies, B. S., Bensadoun, A., Fong, L. G., and Young, S. G. (2009) *J. Lipid Res.* **50**, S57–S62
 34. Mayer, G., Poirier, S., and Seidah, N. G. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 31791–31801
 35. Thomas, G. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 753–766
 36. McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 20799–20803
 37. Li, J., Tumanut, C., Gavigan, J. A., Huang, W. J., Hampton, E. N., Tumanut, R., Suen, K. F., Trauger, J. W., Spraggon, G., Lesley, S. A., Liau, G., Yowe, D., and Harris, J. L. (2007) *Biochem. J.* **406**, 203–207
 38. Arolas, J. L., Vendrell, J., Aviles, F. X., and Fricker, L. D. (2007) *Curr. Pharm. Des.* **13**, 349–366
 39. Seidah, N. G., and Chrétien, M. (1999) *Brain Res.* **848**, 45–62
 40. Ozden, S., Lucas-Hourani, M., Ceccaldi, P. E., Basak, A., Valentine, M., Benjannet, S., Hamelin, J., Jacob, Y., Mamchaoui, K., Mouly, V., Després, P., Gessain, A., Butler-Browne, G., Chrétien, M., Tangy, F., Vidalain, P. O., and Seidah, N. G. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 21899–21908
 41. Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) *Trends Biochem. Sci.* **32**, 71–77
 42. Seidah, N. G. (2009) *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 19–28
 43. Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2009) *J. Lipid Res.* **50**, S172–S177
 44. McNutt, M. C., Kwon, H. J., Chen, C., Chen, J. R., Horton, J. D., and Lagace, T. A. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 10561–10570
 45. Kotowski, I. K., Pertsemliadis, A., Luke, A., Cooper, R. S., Vega, G. L., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2006) *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 410–422
 46. Berge, K. E., Ose, L., and Leren, T. P. (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1094–10100
 47. Noguchi, T., Katsuda, S., Kawashiri, M. A., Tada, H., Nohara, A., Inazu, A., Yamagishi, M., Kobayashi, J., and Mabuchi, H. (2010) *Atherosclerosis* **210**, 166–172
 48. Lakoski, S. G., Lagace, T. A., Cohen, J. C., Horton, J. D., and Hobbs, H. H. (2009) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 2537–2543
 49. Czekay, R. P., Orlando, R. A., Woodward, L., Lundstrom, M., and Farquhar, M. G. (1997) *Mol. Biol. Cell* **8**, 517–532
 50. Fan, D., Yancey, P. G., Qiu, S., Ding, L., Weeber, E. J., Linton, M. F., and Fazio, S. (2008) *Biochemistry* **47**, 1631–1639

SUPPLEMENTAL FIGURES

- Supplemental Fig. S1. **Immunocytochemical analysis of the internalization of extracellular PCSK9 and its GOF mutants.** HepG2 cells were incubated for 0 (S1A), 30 (S1B) or 60 (S1C) min at 4°C with condition media of HEK293 cells overexpressing either (a) PCSK9-V5, or (b) the prosegment deletant Δ 33-58-PCSK9-V5. Following fixation and permeabilization of the cells, surface binding and internalization of PCSK9 and the mutated PCSK9 constructs as well as the localization of LDLR were detected by immunofluorescence with anti-V5 (red) and anti-LDLR antibodies (green). Arrows and arrowheads point to the cell surface labeling and the intracellular localization of PCSK9 and LDLR, respectively. Scale bars = 10 μ M.
- Supplemental Fig.S2. **Time dependent effect of extracellular PCSK9 on the cell surface LDLR levels of HuH7 and HepG2 cells.** (A) FACS analysis of HuH7 and HepG2 cells for cell surface levels of LDLR following incubation of 0.7 μ g/ml of PCSK9 secreted from HEK293 cells overexpressing it (quantitated by ELISA) for various times from 30-240 min. The right panels show that if the HuH7 cells are washed with fresh medium lacking PCSK9 following the first 30 min, the effect of PCSK9 is completely abrogated, suggesting that a continuous presence of PCSK9 is needed to see its time dependent effect on LDLR. (B) Analysis of the data show the presence of two phases of LDLR decrease, an initial rapid phase faster in HepG2 cells, followed by a slower linear one similar in both cell lines (the best fit linear equation is depicted).
- Supplemental Fig.S3. **The pH dependence of PCSK9 activity is not regulated by the acidic stretch encompassing aa 31-58.** Various PCSK9 forms were pre-incubated at the indicated pHs for 1h, neutralized, and then incubated with HuH7 cells. FACS analysis of cell surface LDLR expression is shown compared to untreated cells. These data are representative of 2 independent experiments.
- Supplemental Fig.S4. **PCSK9 does not cleave *in vitro* soluble LDLR at any pH.** ³⁵S-labeled soluble LDLR was obtained from the media of HEK293 cells overexpressing the ectodomain of LDLR-V5 (aa 1-540) and pulsed for 3h with ³⁵S-[Met + Cys]. The media were incubated at 37°C for 3h at pHs 7.5, 6.5, 6.0, 5.5 and 4.5 in the presence (+) or absence (-) of ~0.7 μ g/ml of untagged PCSK9 secreted from HEK293 cells overexpressing it (quantitated by ELISA) or at pH 6.5 with 10 μ g/ml purified PCSK9 (Figure 1A). All media were then neutralized to pH 7.5 and the immunoprecipitated with mAb-V5 and separated by 8% SDS-PAGE, the gel dried and then autoradiographed. The migration positions of the less glycosylated and fully glycosylated LDLR (10) are shown.
- Supplemental Fig.S5. **Oligomerization of the cleaved forms of PCSK9 at pH 5.5.** SDS-PAGE analysis of the ³⁵S-labeled PCSK9 and its derivatives obtained from the media of HEK293 cells pulse labeled for 4h with ³⁵S-(Met+Cys). The samples were incubated for 1h at either pH 7.2 or 5.5 followed by neutralization, immunoprecipitation with mAb-V5 and then boiling in SDS buffer in the presence (+SH) or absence (-SH) of β -mercaptoethanol. With the exception of the CHR, notice the propensity of the cleaved forms at pH 5.5 to oligomerize.
- Supplemental Fig.S6. **Inability of furin to generate *in vitro* PCSK9 (153-Nx).** HEK293 cells were co-transfected with proCSK9-Prosegment (encoding V5-31-152) and either PCSK9- Δ Pro-V5 or PCSK9 (H226A)- Δ Pro-V5. The overnight media of these cells were incubated at either pH 7.2 or 5.5 for 1h at 37°C and the later neutralized to pH 7.2. In each case the media (200 ng of PCSK9) were incubated overnight in absence or presence of furin (5 units, Sigma). The media were then immunoprecipitated with Ab-03. The latter were separated by 8% SDS-PAGE and WB with Ab-03. Only the region representing the apparent molecular masses of 20-3.5 kDa is shown, together with the position of V5-Pro 31-152, PCSK9 (153-Nx), PCSK9 (153-217) and PCSK9 (153-198?). The question mark emphasizes the hypothetical cleavage site at Arg₁₉₉ followed by carboxypeptidase action.

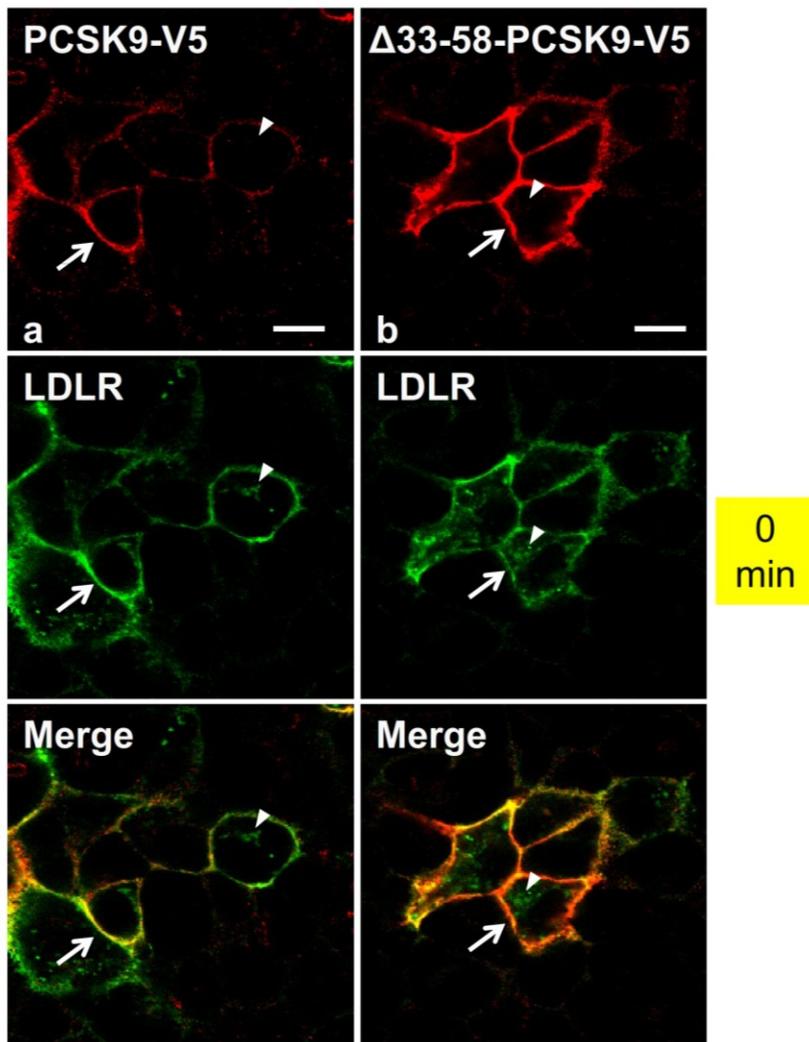


Figure S1A

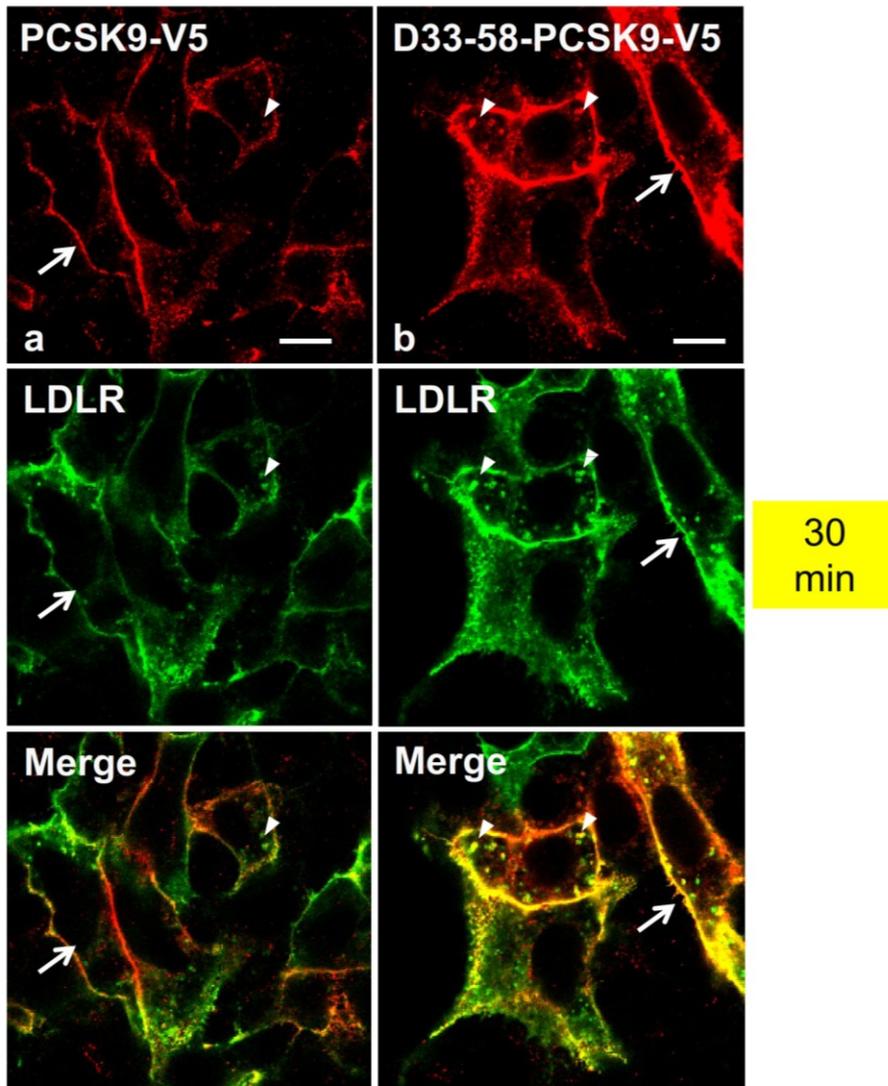


Figure S1B

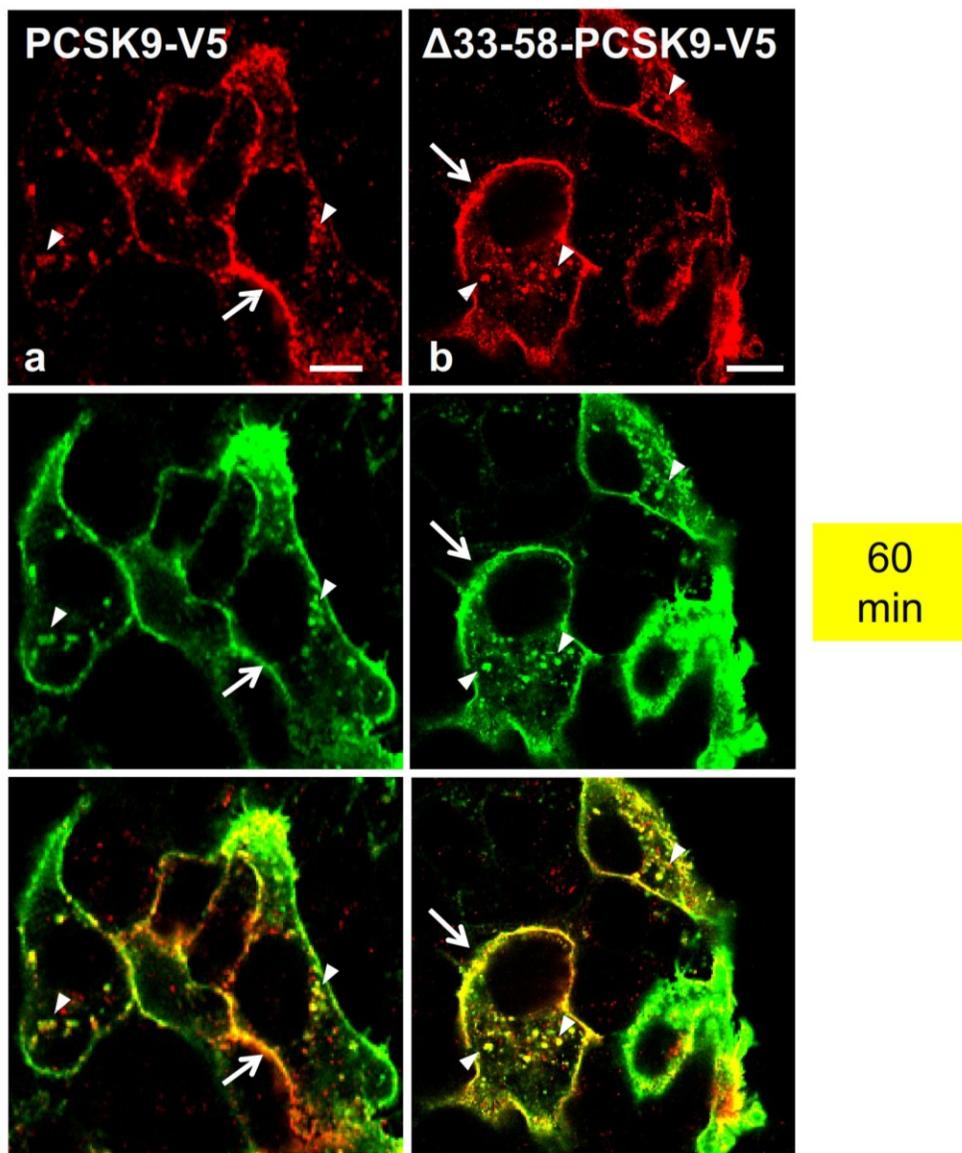


Figure S1C

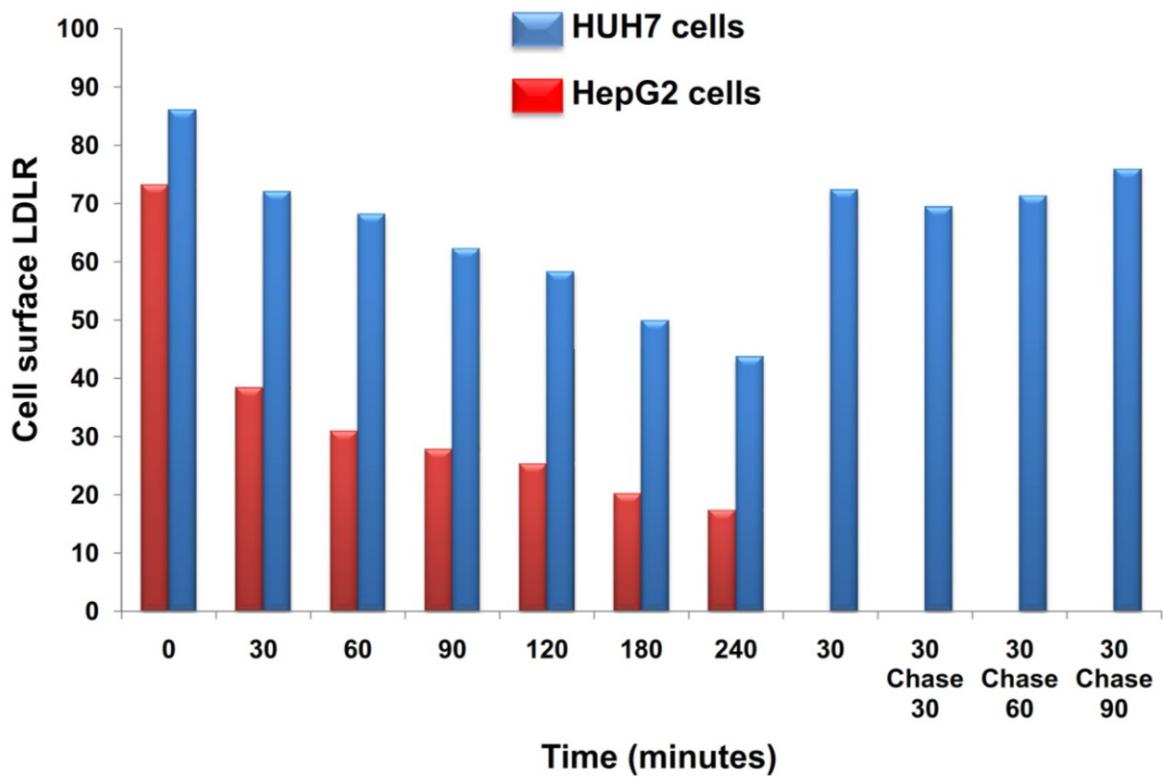


Figure S2A

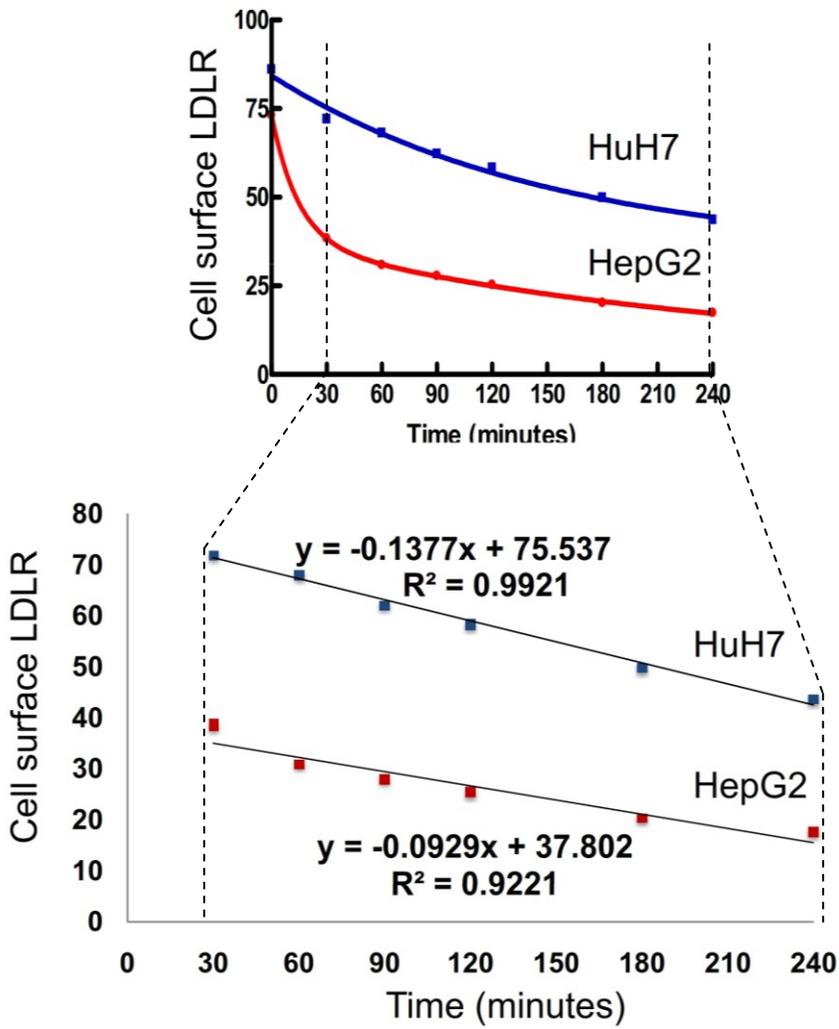


Figure S2B

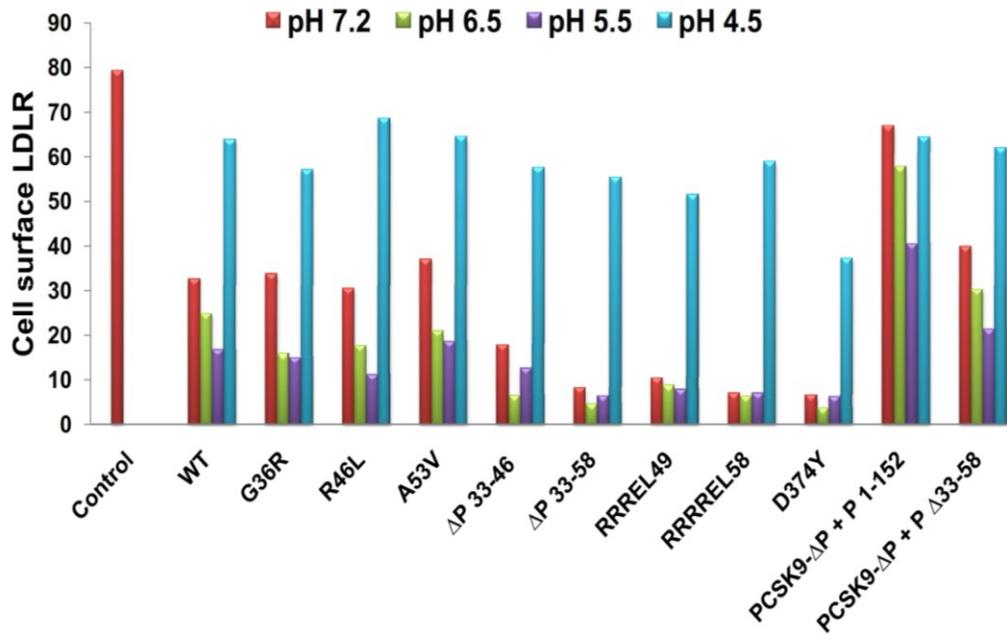


Figure S3

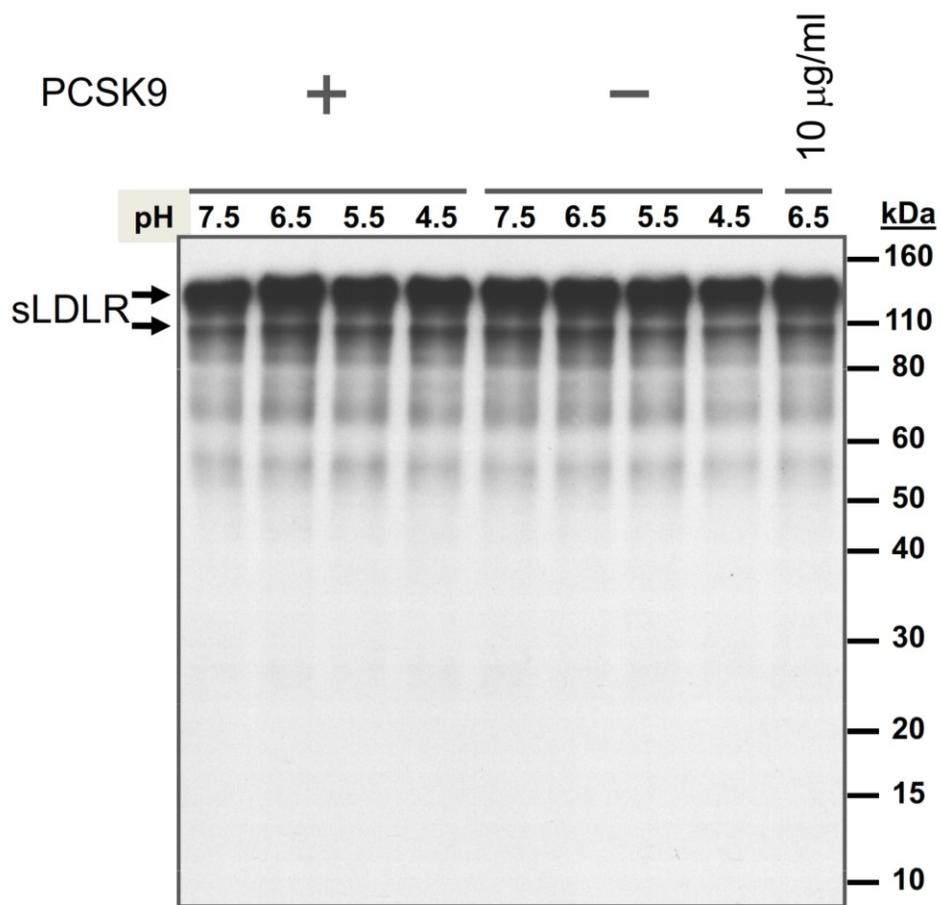


Figure S4

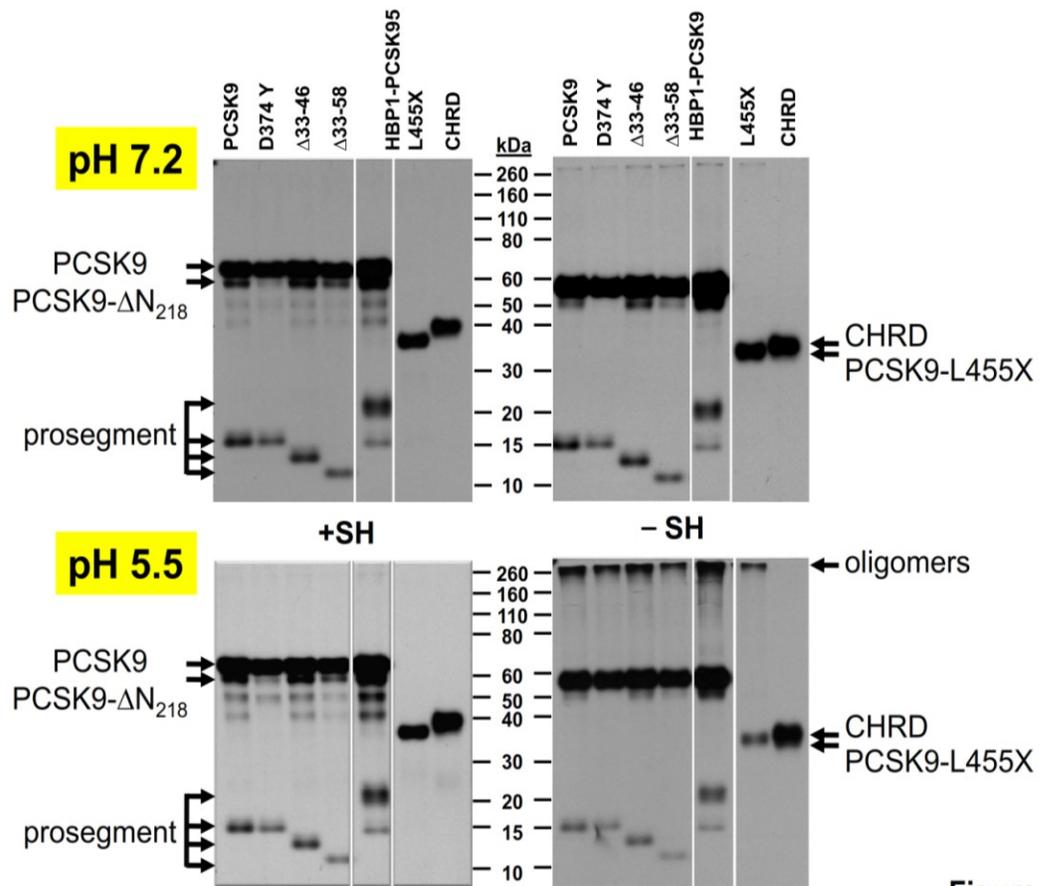


Figure S5

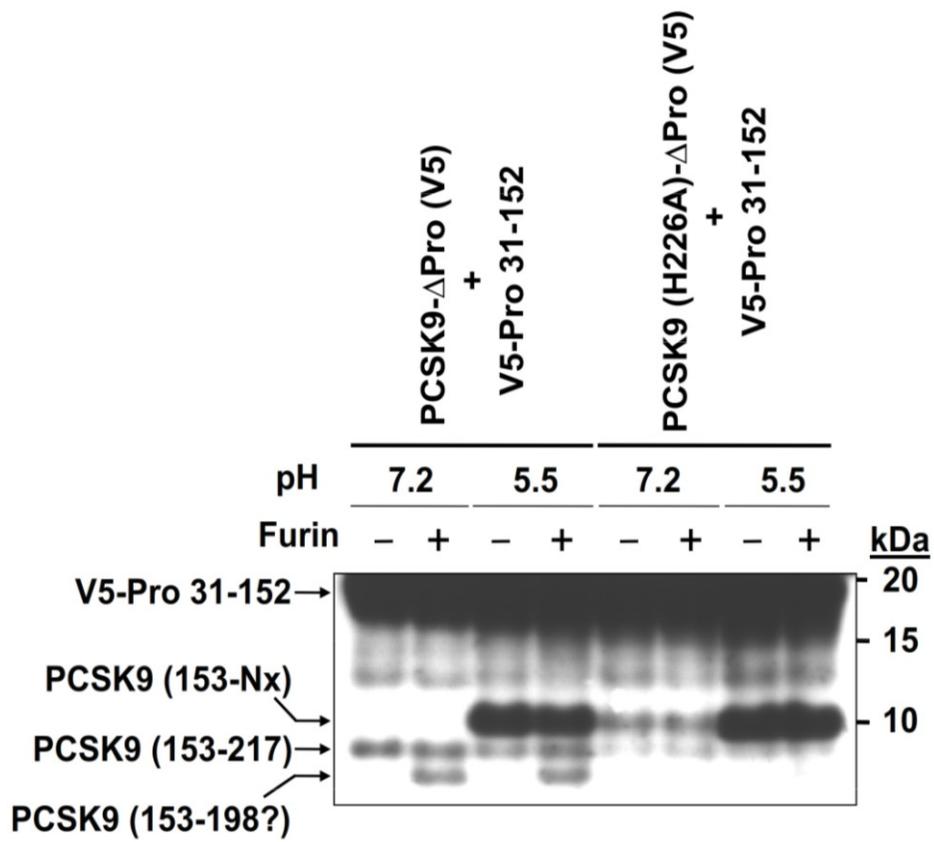


Figure S6

DISCUSSION

La PCSK9 est une protéine qui suscite un grand intérêt depuis la découverte de son implication dans le métabolisme des lipides et plus particulièrement, dans son action sur les récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDLR) (Abifadel et al., 2003). L'information dont nous disposons à ce jour, démontre que la capacité de la PCSK9 à induire la dégradation des récepteurs LDLR n'implique pas une réaction enzymatique directe (Li et al., 2007) mais correspond plutôt à une relation "ligand-récepteur" qui génère une suite d'évènements menant à la dégradation accélérée des récepteurs LDLR par la cellule.

Modulation de l'activité de la PCSK9 :

Pour exercer son action sur le LDLR, la PCSK9 doit préalablement être "activée". Ceci se produit suite à son clivage intramoléculaire qui donne lieu à un remaniement conformationnel nécessaire à la protéine pour être sécrétée et agir sur le LDLR. La seule **activité enzymatique** reconnue à la PCSK9 est son autoclivage qui a lieu entre son prodomaine et son domaine catalytique. À cette fin, la spécificité du motif de reconnaissance est important et la PCSK9 se distingue en reconnaissant un motif différent (VFAQ↓ SIP) (Benjannet et al., 2004; Naureckiene et al., 2003) de celui reconnu par les autres membres de la famille des proprotéines convertases ((K/R)-(X)n-(K/R)↓ ou (R/K)-X-(L, I, V)-Z↓) (Seidah and Prat, 2012). Plusieurs facteurs peuvent affecter cette activité enzymatique, comme par exemple: la présence de calcium, la température et le pH (Naureckiene et al., 2003). La présence de calcium semble stabiliser la protéine sans toutefois être obligatoire. L'autoclivage est optimal à 37°C et une variation de $\pm \sim 7$ °C le fait diminuer de $\sim 20\%$ (Naureckiene et al., 2003).

En ce qui concerne son **activité non-enzymatique** sur le LDLR, l'implication de la PCSK9 a lieu à plusieurs niveaux de la cellule, soit à la surface membranaire pour la liaison, dans les endosomes pour l'internalisation du complexe et finalement dans les endosomes tardifs/lysosomes pour la dégradation. Le pH à l'intérieur des ces différents organelles diffère, passant de neutre à acide (de la membrane vers le lysosome), et représente alors un déterminant important pour l'activité de la PCSK9.

Effet du pH sur l'activité de la PCSK9 :

Des études *in vitro*, ont mis en évidence que des conditions acides (pH<6) augmentaient l'affinité de la PCSK9 à lier le domaine EGF-A du LDLR (Cunningham et al., 2007; Kwon et al., 2008; Zhang et al., 2007). La comparaison des co-cristaux EGF-A=PCSK9 à pH 4.8 (acide) *versus* LDLR=PCSK9 à pH 7.0 (neutre) révèle que certains résidus changent d'orientation sous l'influence du pH et établissent des liens ioniques entre les deux molécules. Par exemple, l'histidine 306 du LDLR qui en milieu acide passe d'un lien intramoléculaire à un lien intermoléculaire avec l'acide aspartique 374 du domaine catalytique de la PCSK9 (Kwon et al., 2008; Lo Surdo et al., 2011). Ainsi, le pH a une influence directe sur la mobilité des résidus et donc sur la stabilisation de l'interaction entre la PCSK9 et le LDLR.

Au cours de mon travail de thèse, nous avons approfondi l'étude de *l'effet du pH sur l'activité de la PCSK9 ex vivo*. Nous avons soumis la convertase à une variation de pH allant de neutre à acide (*pH-conditionnée*) et observé l'impact sur le LDLR. Par la microscopie confocale nous avons observé une augmentation de la co-localisation de la PCSK9 et du LDLR à la surface des cellules lorsque la PCSK9 était préconditionnée à des pH acides comparativement à celle conditionnée à un pH neutre. Ce résultat est en accord avec les données d'affinité de liaison *in vitro* publiées (Cunningham et al., 2007) et montre aussi une augmentation de la liaison à la surface des cellules. Notre analyse des protéines *pH-conditionnées* nous a permis d'observer que le traitement à des pH< 5.5 provoquait curieusement la perte du prodomaine de la PCSK9 mature. L'étude fonctionnelle des ces dernières a révélé qu'elles avaient aussi perdu toute capacité d'induire l'internalisation du LDLR à la surface des cellules, contrairement à celles ayant conservé leur prodomaine et qui ont maintenu leur activité.

Ainsi, nos résultats démontrent d'une part, que la variation du pH vers des valeurs acides a un effet "accélérateur" sur les étapes d'action de la PCSK9 sur le LDLR et d'autre part, qu'une acidité trop importante du milieu environnant (pH< 5.5) a un effet négatif sur la molécule puisqu'il entraînait la perte du prodomaine ainsi que la perte concomitante de l'activité. Ce fait est intéressant et en opposition avec le rôle du prodomaine des autres membres de la famille des proprotéines convertases. En effet, pour celles-ci, la séparation de leur prodomaine est nécessaire à leur activation (Seidah and Prat, 2012).

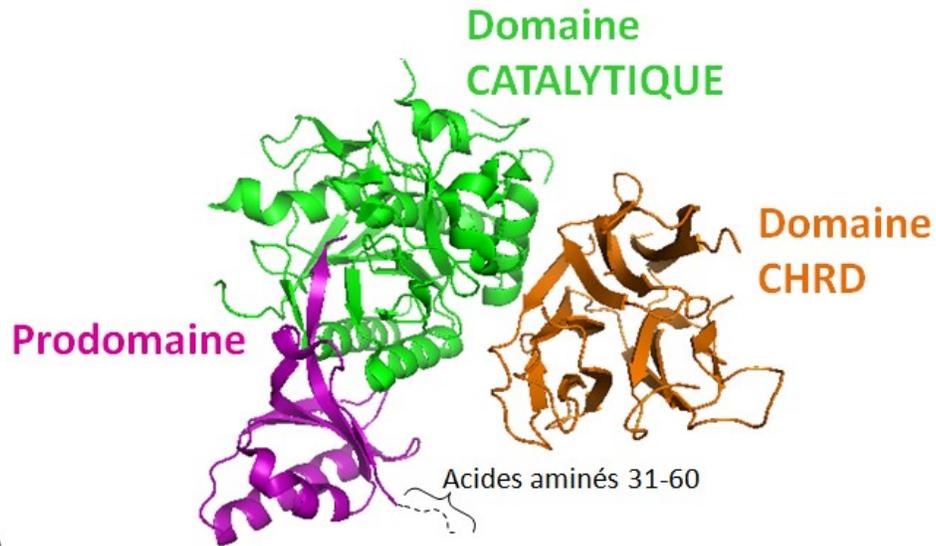
Régulation de l'activité de la PCSK9 par son prodomaine :

D'un point de vue structure-fonction, il apparaît donc que la présence du prodomaine est essentielle à la fonction de la PCSK9. Cependant, est-ce que l'intégralité de celui-ci est requise? Les travaux de Kwon et al. (2008) semblent indiquer que non, puisque des mesures de liaison *in vitro* à l'ectodomaine du LDLR démontrent une plus grande affinité de liaison (mesurées à pH 7.4 et à pH 6.0) d'une PCSK9 délétée des résidus 31 à 53 comparativement à la forme sauvage (Kwon et al., 2008).

Lors de nos expériences de purification de la PCSK9 humaine, nous avons détecté deux produits finaux. Le premier correspondait à la PCSK9 pleine longueur attendue et l'autre, à une forme plus courte de PCSK9. Celle-ci était tronquée dans la région N-terminale du prodomaine (Δ 31-47) probablement générée par une protéase endogène du système d'expression. Nous avons testé, *ex-vivo*, l'activité de ces deux formes en évaluant l'incorporation de Dil-LDL par des cellules HepG2 exposées à des concentrations croissantes de deux formes. La forme tronquée a révélé une activité 4-fois supérieure à celle de la PCSK9 pleine longueur. Il est intéressant de noter que la région N-terminale correspondant aux résidus 31 à 60 de la PCSK9 est invisible dans toutes les structures moléculaires provenant des analyses cristallographiques (Cunningham et al., 2007; Hampton et al., 2007; Piper et al., 2007). Cela indique bien que les protéines aient été produites avec cette région, celle-ci semble "très mobile" dans le cristal affectant ainsi l'acquisition des données de modélisation correspondantes.

Nous avons alors étudié cette région en produisant des constructions où le prodomaine de la PCSK9 était délété des portions de plus en plus importantes de sa région N-terminale: PCSK9 RRRR \surd EL₄₉, RRRR \surd EL₅₈ (\surd : clivage par la furine génère la délétion), Δ 33-46, Δ 33-58, Δ 33-69 et Δ 33-152 (délétion complète du prodomaine; Figure 42). Nous avons observé que seules les protéines PCSK9 composées des résidus 48-692 (RRRREL₄₉), 57-692 (RRRREL₅₈), 47-692 (Δ 33-46) et 59-692 (Δ 33-58) étaient bien exprimées, autoclivées et sécrétées comparativement à la PCSK9 pleine longueur (31-692).

A)



B)

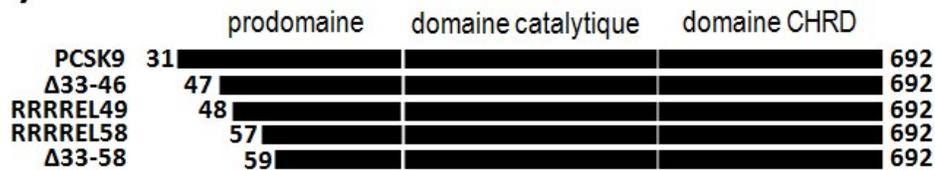


Figure 42: Schéma de la protéine PCSK9. (A) Structure de la PCSK9, en pointillé: résidus 31 à 60, invisibles dans le cristal (PDB 2P4E). (B) Schéma des protéines tronquées en N-terminal du prodomaine de la PCSK9 humaine.

Étude de la région acide en N-terminale du prodomaine :

Dans un second temps, tout comme pour l'effet du pH, nous avons étudié l'*effet de la délétion partielle du prodomaine* sur chaque étape de l'activité de la PCSK9. L'analyse de la liaison avec le domaine EGF-A ou l'ectodomaine du LDLR, a démontré que la forme tronquée liait avec 3-fois plus d'affinité *in vitro* comparativement à la forme pleine longueur. L'augmentation de l'affinité de liaison de la forme tronquée fut confirmée *ex-vivo* par nos observations de microscopie confocale où l'intensité du signal de co-localisation à la surface des cellules de la forme courte était plus forte que celle de la PCSK9 sauvage. De plus, nous observâmes qu'en fonction du temps, la forme tronquée stimulait aussi une internalisation plus rapide comparativement à la PCSK9 pleine longueur. La rapidité de l'endocytose du complexe fut aussi révélée par nos résultats de

cytométrie en flux où la diminution des niveaux de LDLR de surface était de ~6-fois supérieure lorsque les cellules étaient incubées avec une PCSK9 délétée en N-terminal de son prodomaine comparativement à la PCSK9 de type sauvage. Finalement, au niveau de la dégradation, les mesures des niveaux de "LDLR total" des cellules HepG2 ou HuH7 incubées avec les différentes formes de PCSK9, confirmèrent que les formes courtes induisaient davantage la dégradation des récepteurs LDLR (~3-fois supérieure à la forme pleine longueur). L'ensemble de nos résultats démontrent que la délétion des résidus 31 jusqu'à 58 en N-terminal du prodomaine résulte en un "gain de fonction" général (liaison/internalisation/dégradation) de la PCSK9.

Au niveau physiologique, la conséquence d'un "gain de fonction" de cette convertase, observé chez les mutants naturels, résulte en une augmentation significative des niveaux de particules de LDL plasmatiques et par ce fait, augmente dangereusement le risque d'accidents cardiovasculaires. La mutation naturelle ayant le plus d'impact sur la dégradation prématurée du LDLR est la mutation ponctuelle PCSK9 D374Y. Il a été démontré que les niveaux de LDL plasmatiques (mauvais cholestérol) chez les individus possédant cette mutation vont jusqu'à ~12 mmol/L, ce qui représente une augmentation de ~4-fois comparativement aux valeurs (< 3.0 mmol/L) associées à des risques mineurs de développer des maladies cardiovasculaires (Anderson et al., 2013; Leren, 2004; Perk et al., 2012). L'incidence négative d'un "gain de fonction" de la PCSK9 est donc considérable pour la santé humaine.

Nous avons alors comparé l'effet de la mutation D374Y à celle de la forme tronquée de PCSK9. Nos résultats au niveau des étapes de la liaison aux LDLR présents à la surface cellulaire, de l'internalisation et de la dégradation du complexe démontrent que l'efficacité du mutant naturel D374Y est toujours supérieure comparativement aux formes tronquées. Ainsi, une PCSK9 D374Y a un impact important sur les niveaux de LDLR cellulaires en entraînant une diminution de ~90% du LDLR total comparativement à ~30-40% pour la forme sauvage et de 60-80% pour les formes tronquées en N-terminal du prodomaine.

Nous nous sommes demandés si les effets individuels des formes "gain de fonction" (délétion et mutant naturel) étaient additives. Pour cela, nous avons combiné les deux et testé la nouvelle construction résultante PCSK9 Δ 33-58 D374Y. L'effet obtenu s'est avéré similaire à l'effet individuel de la mutation D374Y et ce, autant pour

l'internalisation que pour la dégradation des LDLR totaux. Il est probable que la supériorité de l'effet du mutant naturel soit due au maintien d'une plus grande affinité de liaison tout au long du processus d'induction à la dégradation du LDLR. En accord avec cette hypothèse, des expériences de compétition révèlent que l'affinité de liaison *in vitro* d'une forme courte de PCSK9 (PCSK9 Δ 53) est de \sim 7.3-fois supérieure à celle de la forme pleine longueur (EC_{50} wt 202.6nM vs EC_{50} PCSK9 Δ 53 27.8nM (Kwon et al., 2008). Tandis que d'autres essais de compétition révèlent que le mutant naturel D374Y possède \sim 25-fois plus d'affinité pour le LDLR que la forme sauvage (EC_{50} wt 56 nM vs EC_{50} D374Y 2.2 nM) (Pandit et al., 2008).

Nos résultats montrent donc clairement que la région N-terminale du prodomaine de la PCSK9 régule sa fonction. De plus, comme la composition en acides aminés de cette région est constituée de plusieurs résidus acides: Q₃₁**EDEDGDYEE**LVLAR**SEED**GLA**EAP**E_{H58}... (Figure 43), nous nous sommes questionnés sur *l'origine de l'effet régulateur de cette région*, à savoir si elle était régulatrice par sa séquence ou plutôt par sa charge globale. Nous avons alors remplacé cette "*région acide*" par une autre séquence acide provenant de la protéine GPIHBP1 (Figure 43), Cette dernière est impliquée dans le métabolisme des lipides, liant la lipoprotéine lipase et l'apoprotéine AV des chylomicrons afin de rapprocher les deux molécules pour faciliter la fonction de la lipase.

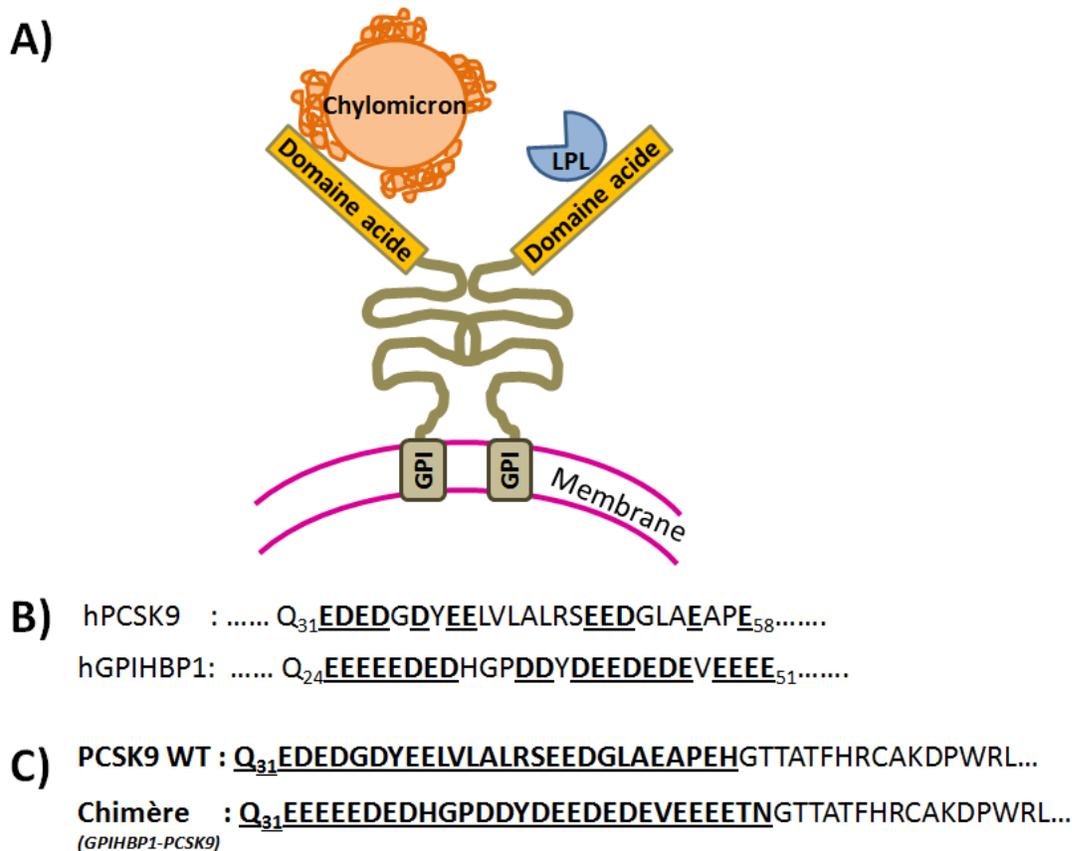


Figure 43: Échange des régions acides en N-terminal du prodomaine de la PCSK9. LPL : Lipoprotéine lipase. (A) Schéma de l'interaction de la protéine GPIHBP1 avec la LPL et les chylomicrons (B) Séquences acides des régions en N-terminal de la PCSK9 et de la GPIHBP1. (C) Début de la séquence de la protéine chimère (GPIHBP1-PCSK9) comparée à la séquence de la PCSK9 sauvage.

Nous avons montré que la protéine-chimère GPIHBP1-PCSK9 est similaire à la PCSK9 de type sauvage en ce qui concerne son expression, l'autoclivage du zymogène et la sécrétion. Par ailleurs, elle présente une efficacité semblable à la PCSK9 sauvage pour stimuler l'internalisation et induire la dégradation du LDLR. Ces résultats renforcent l'hypothèse qu'un 'effet de charge globale en N-terminal du prodomaine' est à l'origine de l'effet 'modérateur' de la région N-terminale sur l'activité de la PCSK9.

Région acide du prodomaine de la PCSK9



Figure 44: Alignement de séquences du prodomaine de la PCSK9 des différentes espèces. En rouge : résidus acides conservés.

Il est intéressant de noter que parmi toutes les mutations rapportées dans la région ‘acide’, 60% affectent des acides glutamiques (résidus acides) et que curieusement, le remplacement de l’acide glutamique E₃₂ ou E₅₄ par une lysine ou une alanine respectivement, résulte dans un ‘**gain de fonction**’ de la PCSK9 (Leigh et al., 2009). Ainsi, une perte des résidus acides dans cette région semblerait affaiblir l’effet régulateur et contribuer à une augmentation de l’activité de la PCSK9. Le remplacement de l’acide glutamique E₅₇ par une lysine est associé, quant à lui, à une perte de fonction. Comme l’illustre la Figure 44, le résidu E₅₇ n’est pas conservé entre toutes les espèces, contrairement aux acides glutamiques E₃₂, absent chez le rat et la souris seulement, et qui est invariable à chez toutes les autres espèces; et E₅₄, qui est conservé ou remplacé par l’acide aspartique conservant ainsi sa charge. Ainsi, la ‘perte de fonction’ de la PCSK9 due à la mutation E57K pourrait peut-être s’expliquer par son *positionnement* dans une autre région régulatrice située dans la région ‘médiane’ du prodomaine (Figure 45).

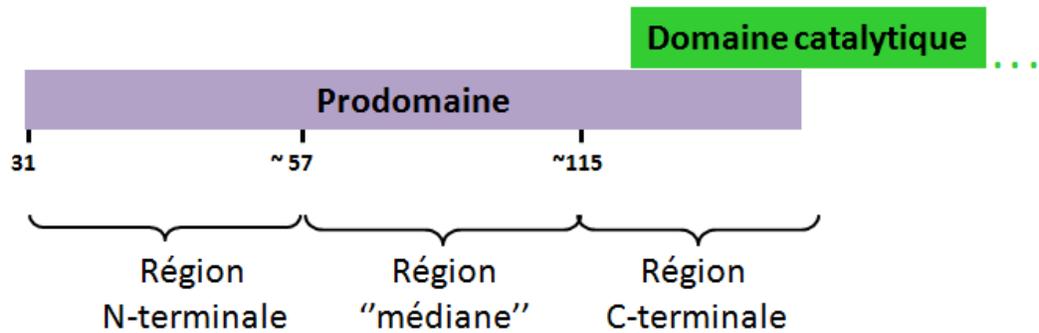


Figure 45: Régions régulatrices hypothétiques dans la structure du prodomaine de la PCSK9.

L'hypothèse que le prodomaine possède plusieurs régions régulatrices de son activité est renforcée par l'analyse des mutants naturels de la région hypothétique "médiane" du prodomaine. En effet, on observe que les différentes mutations (E57K, T77I, R93C, delta R97, G106R, V114A) résultent en majorité en une "perte de fonction" de la PCSK9. La région C-terminale (Figure 45) quant à elle est importante pour loger le prodomaine clivé dans la cavité du site catalytique afin de le bloquer mais aussi permettre à la convertase d'être sécrétée et active envers son ligand.

Évidence d'un nouveau clivage de la PCSK9 en milieu acide:

Au cours de notre étude, nous avons également présenté une observation intéressante concernant l'apparition d'un nouveau clivage de la PCSK9 en milieu acide qui aurait lieu après le résidu arginine 248 dans le domaine catalytique. Ce clivage est bloqué par un inhibiteur des convertases reconnaissant le motif-type (R/K)-X_n-(R/K)↓ suggérant qu'une PC, soit impliquée dans ce clivage. Toutefois, l'ajout de la furine, PACE4 ou PC5/6 n'a pas eu d'effet sur l'augmentation de ce clivage.

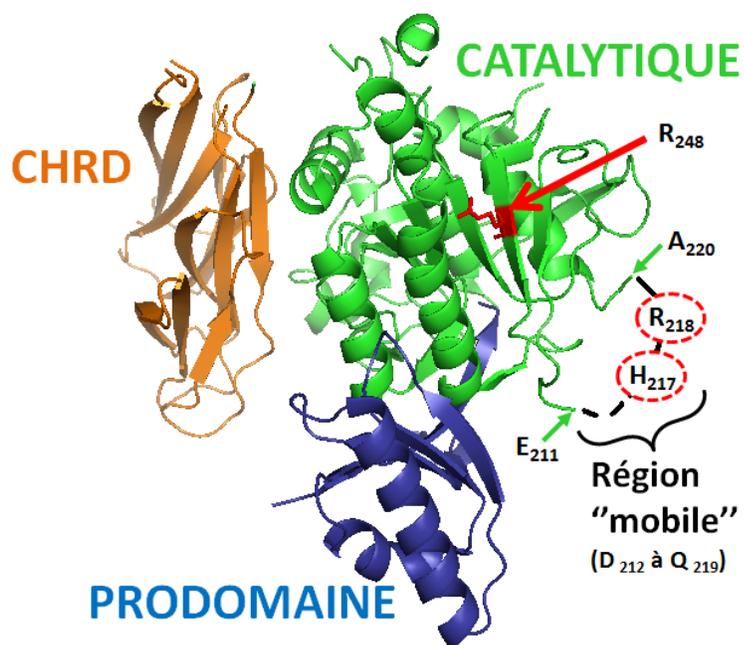


Figure 46: Schéma de la structure moléculaire de la PCSK9 produite en milieu acide (PDB 3BPS).

Par ailleurs, nous avons observé que le “maintien” de la “boucle mobile” délimitée par les résidus E₂₁₁ à A₂₂₀ (Figure 46) est important pour que le nouveau clivage (... GASMR₂₄₈↓ ...) ait lieu. En effet, celui-ci est aboli si la boucle est clivée par la furine après le résidu R₂₁₈ ou subit la mutation ponctuelle H217R. Nous ne savons pas si le “maintien” est au niveau de la longueur de la séquence de la boucle ou du type des résidus qui la composent puisque nous n’avons pas testé l’effet de délétion ou de substitution d’acides aminés autres que l’histidine 217 dans cette région. Cependant, sur la base de la nécessité d’un environnement acide pour que ce nouveau clivage ait lieu, il est envisageable que celui-ci se passe au niveau de l’étape de dégradation du complexe PCSK9=LDLR dans les organelles telles que les endosomes tardifs/lysosomes. Ces derniers sont les seuls pourvus d’un “environnement interne” à pH acide. Il est probable que cet environnement déstabilise des liens ioniques intra- ou intermoléculaires. Ainsi, la structure moléculaire de la PCSK9 pourrait être affectée et changer de conformation. La PCSK9 pourrait alors se libérer de son prodomaine et exposer des nouveaux sites susceptibles aux clivages par des protéases présentes au niveau des organelles acides. Cette hypothèse est renforcée par une récente étude qui révèle l’apparition d’une bande

de 17kDa correspondant à un clivage du LDLR en présence de PCSK9 uniquement en milieu acide (Tveten et al., 2013). Ainsi, il est plausible que ces nouveaux fragments observés, à pH acide, soient issus de la dégradation du complexe dans les compartiments acides (endosomes tardifs/lysosomes).

Bien que le mécanisme exact de la dégradation du complexe PCSK9=LDLR soit encore inconnu à ce jour, notre travail démontre que la PCSK9 n'a pas la capacité directe de dégrader le LDLR mais agit plutôt comme molécule "chaperone" pour lier et diriger le LDLR à la dégradation prématurée dans des organelles acides. En conclusion, cette première partie de ma thèse a permis de mettre en évidence: [1] que l'activité de la PCSK9 est régulée par sa structure puisque la présence du prodomaine est obligatoire pour la fonction; [2] que la portion en N-terminale (résidus ~31 à 56) du prodomaine constitue une région régulatrice indispensable afin de prévenir un "gain de fonction" de la molécule; [3] que l'effet du pH acide stimule une plus grande affinité de liaison au LDLR et accélère les processus d'internalisation ainsi que de dégradation du complexe PCSK9=LDLR.

CHAPITRE III

The M2 Module of the Cys-His-rich Domain (CHRD) of PCSK9 Protein Is Needed for the Extracellular Low-density Lipoprotein Receptor (LDLR) Degradation Pathway

ARTICLE NO.2

THE M2 MODULE OF THE CYS-HIS-RICH DOMAIN OF PCSK9 IS NEEDED FOR THE EXTRACELLULAR LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR DEGRADATION PATHWAY

Titre court: *PCSK9-ΔM2 lacks extracellular activity*

Yascara Grisel Luna Saavedra, Robert Day, and Nabil G. Seidah

Affiliations:

- *Y.G. Luna Saavedra et N. G. Seidah*: Laboratoire de Biochimie Neuroendocrinienne, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montréal, QC H2W 1R7, Canada affiliés au Département de Biochimie de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, QC, Canada
- *Robert Day*: Institut de pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

Demandes de copies de l'article ou concernant toute autre demande, faire parvenir toute correspondance à:

Dr. Nabil G. Seidah

Clinical Research Institute of Montreal
Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology
110 Pine Ave. West,
Montreal, QC
Canada, H2W 1R7

AVANT-PROPOS

Des études de caractérisation moléculaire ont démontré que le domaine catalytique de la PCSK9 était responsable de la liaison directe avec le domaine EGF-A du LDLR (Zhang et al., 2007). Ces observations furent corroborées par les données de la co-cristallisation de la PCSK9 avec le domaine EGF-A du LDLR révélèrent également que les deux autres domaines, le prodomaine et le domaine CHRD, n'étaient pas directement impliqués dans cette liaison (Kwon et al., 2008). Toutefois, des essais fonctionnels de la PCSK9 déléetée de son domaine CHRD révélèrent que malgré le fait qu'elle conservait sa capacité de liaison avec le récepteur, elle **perdait complètement** sa capacité d'induire la dégradation du complexe PCSK9=LDLR (Zhang et al., 2008).

En complément, la publication des données cristallographiques de la PCSK9 mit en lumière la structure particulière adoptée par son domaine CHRD localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Différemment aux deux autres domaines, le domaine CHRD est composé des trois sous-domaines ou modules (M1, M2 et M3). Ceux-ci sont composés surtout des *feuilletés bêta* et adoptent des repliements distinctifs. Ces caractéristiques propres au domaine CHRD nous incita à entreprendre la dissection de sa structure multi-modules afin d'évaluer leur implication fonctionnelle dans l'activité de la PCSK9.

Dans cet article, nous présentons pour la première fois, que le domaine CHRD n'est pas requis pour l'étape d'internalisation du complexe PCSK9=LDLR mais joue plutôt un rôle dans la dernière étape de dégradation. De plus, nous avons découvert que le module **M2**, du domaine CHRD, est **indispensable** pour l'activité de **dégradation** du complexe PCSK9=LDLR induite par une **voie extracellulaire** mais pas pour celle induite par une voie intracellulaire.

Dans l'intérêt de neutraliser l'activité de la PCSK9 sécrétée dans le plasma, notre étude nous permet de proposer le module M2 comme nouvelle région-cible pour le développement des inhibiteurs contre la PCSK9.

MANUSCRIT 2

The M2 Module of the Cys-His-rich Domain (CHRD) of PCSK9 Protein Is Needed for the Extracellular Low-density Lipoprotein Receptor (LDLR) Degradation Pathway^{*S}

Received for publication, June 28, 2012, and in revised form, October 25, 2012. Published, JBC Papers in Press, October 26, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.394023

Yascara Grisel Luna Saavedra[‡], Robert Day[§], and Nabil G. Seidah^{†1}

From the [‡]Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, (IRCM), affiliated to the University of Montreal, Montreal, Québec H2W 1R7, Canada and the [§]Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

Background: PCSK9 regulates low-density lipoprotein receptor levels in the liver. The importance of the M1, M2, and M3 modules within the C terminus of PCSK9 is unknown.

Results: The M2 module is needed for the extracellular, but not intracellular, activity of PCSK9.

Conclusion: The integrity of the M2 module is essential for the extracellular function of PCSK9.

Significance: Targeting the M2 module should neutralize circulating PCSK9 and reduce LDL-cholesterol.

PCSK9 enhances the cellular degradation of the LDL receptor (LDLR), leading to increased plasma LDL cholesterol. This multidomain protein contains a prosegment, a catalytic domain, a hinge region, and a cysteine-histidine rich domain (CHRD) composed of three tightly packed modules named M1, M2, and M3. The CHRD is required for the activity of PCSK9, but the mechanism behind this remains obscure. To define the contribution of each module to the function of PCSK9, we dissected the CHRD structure. Six PCSK9 deletants were generated by mutagenesis, corresponding to the deletion of only one (Δ M1, Δ M2, Δ M3) or two (Δ M12, Δ M13, Δ M23) modules. Transfection of HEK293 cells showed that all deletants were well processed and expressed compared with the parent PCSK9 but that only those lacking the M2 module were secreted. HepG2 cells lacking endogenous PCSK9 (HepG2/shPCSK9) were used for the functional analysis of the extracellular or intracellular activity of PCSK9 and its deletants. To analyze the ability of the deletants to enhance the LDLR degradation by the intracellular pathway, cellular expressions revealed that only the Δ M2 deletant retains a comparable total LDLR-degrading activity to full-length PCSK9. To probe the extracellular pathway, HepG2/shPCSK9 cells were incubated with conditioned media from transfected HEK293 or HepG2/shPCSK9 cells, and cell surface LDLR levels were analyzed by FACS. The results showed no activity of any secreted deletant compared with PCSK9. Thus, although M2 is dispensable for secretion, its presence is required for the extracellular activity of PCSK9 on cell surface LDLR.

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) is the latest and ninth member of the mammalian subtilisin-like ser-

* This research was supported by Canadian Institute of Health Research Grants MOP-102741 and CTP 82946, a Bristol-Myers Squibb collaborative agreement grant, a Strauss Foundation grant, and Canada Chair no. 216684.

^S This article contains supplemental Figs. S1–S7 and Table S1.

ine proprotein convertases (PC)² family (1, 2). Its high expression in liver, localization of its gene *PCSK9* on human chromosome 1p32, and characterization of two gain-of-function (GOF) mutants in families with high levels of circulating low density lipoprotein cholesterol (LDLc) led to its identification as the third locus implicated in autosomal dominant hypercholesterolemia, with the low-density lipoprotein receptor (LDLR), apolipoprotein B (3), and apolipoprotein E (4) as the other three.

Early studies demonstrated that, similar to the other PC family members, PCSK9 is first synthesized as a zymogen (proPCSK9) that undergoes an autocatalytic cleavage of its prosegment (1) at VFAQ₁₅₂↓ (5, 6) within the endoplasmic reticulum (ER). This cleavage is a prerequisite for the exit and secretion of the prosegment=PCSK9 complex from the ER, as the zymogen is not secreted (1, 5). It became apparent that, different from the other eight PC family members, PCSK9 never gets rid of its inhibitory prosegment (2) and is thus secreted as a catalytically inactive protease. This tight prosegment=PCSK9 interaction was confirmed by the crystal structure of PCSK9 that revealed multiple points of contact between the prosegment and the catalytic subunit of PCSK9 (7–9). These data further showed that following the catalytic domain, the PCSK9 structure exhibits the presence of an exposed hinge region (residues 422–439) (10) followed by a C-terminal Cys/His-rich domain (CHRD) composed of three repeat modules termed M1 (amino acids 453–531), M2 (amino acids 530–605), and M3 (amino acids 604–692) (supplemental Fig. S1) (7).

Soon after its discovery, it became clear that PCSK9 is implicated in the degradation of the LDLR itself, as its overexpression in mice (11), primary hepatocytes (12), and/or cell lines including its natural GOF mutants (5) resulted in decreased levels of this receptor. It was also shown that the degradation of the PCSK9=LDLR complex occurs in acidic compartments (5) likely to be endosomes/lysosomes (13). Cellular studies showed that PCSK9 targets the LDLR for degradation by two pathways:

² The abbreviations used are: PC, proprotein convertase; GOF, gain of function; LDLc, LDL cholesterol; LDLR, LDL receptor; ER, endoplasmic reticulum; CHRD, cysteine/histidine-rich domain.

an intracellular one from the *trans* Golgi network directly to lysosomes, implicating clathrin light chains (14), and an extracellular one (15) requiring clathrin heavy chain-mediated endocytosis of the cell surface PCSK9=LDLR complex (13).

Biochemical, cell biological, and structural studies demonstrated that the catalytic subunit of PCSK9 binds the epidermal growth factor-like repeat A domain of the LDLR (16–18). As suspected from the exclusive secretion of the catalytically inactive prosegment=PCSK9 complex, it was formally shown that the catalytic activity of PCSK9 was not required for its ability to enhance the degradation of the LDLR (19), suggesting that the latter is performed by undefined endogenous endosomal/lysosomal proteases. This was further confirmed for the other two receptors that PCSK9 also targets, namely Very Low Density Receptor and Apolipoprotein E receptor 2 (20).

The cell surface endocytosis of the PCSK9=LDLR complex is a dominant degradation pathway that shunts the typical LDLR recycling route (21, 22). As a major consequence of PCSK9 action, levels of hepatocyte cell surface LDLR decrease, as confirmed in mouse knockout models (23, 24), leading to the accumulation of LDLc in mouse and human plasma (23–25). In cases of high levels or GOF mutants of PCSK9, this can result in inflammation and the formation of atherosclerotic plaques (26), ultimately leading to cardiovascular disease (27). Accordingly, inhibition or silencing of PCSK9 function is a novel powerful therapeutic approach to lower LDLc, as attested by multiple ongoing phase II clinical trials (2, 28).

In contrast to major advances in PCSK9-based therapies, the molecular mechanisms regulating the sorting of the prosegment=PCSK9=LDLR complex to endosomes/lysosomes by the extracellular or intracellular pathways are poorly defined. Our present understanding of the subcellular trafficking of the PCSK9=LDLR complex leading to its degradation is that it requires the presence of the CHR1 (13, 29) but not the cytosolic tail of the LDLR (30). Furthermore, removal of the acidic N-terminal sequence of the prosegment significantly enhances the degradation efficacy of the complex (17, 31, 32).

To expand our understanding of the contribution of the CHR1 in the enhanced degradation of LDLR by PCSK9, we present structure-function studies in which we dissected the M1, M2, and M3 modules of the CHR1 and analyzed the activity of resulting deletants in the extracellular and intracellular pathways of LDLR degradation. The data demonstrated the critical requirement for the M2 domain in the extracellular pathway but not for the intracellular one.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and Reagents—Human PCSK9 and its mutant cDNAs (hPCSK9 L455X and PCSK9 CHR1) were cloned into pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain View, CA) as described (1, 13). Human HepG2/shPCSK9 cells essentially lacking endogenous PCSK9 (14) and HEK293 cells (ATCC) were cultivated in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FBS (Wisent). Puromycin (2 μ g/ml, Invitrogen) was added only to HepG2/shPCSK9 cells as a selection antibiotic. Lipoprotein-deficient serum was from Biomedical Technologies.

cDNA Constructs—The construct pIRES2-EGFP-human PCSK9-V5 (C-terminal V5-tag) (1) was used as a template to

generate cDNAs coding for human PCSK9 mutants and module deletants. The oligonucleotides used are listed in [supplemental Table S1](#). Two-step PCRs were used to introduce deletion mutants as described previously (5). All constructs contain a V5 tag at the C terminus. All constructs were confirmed by DNA sequencing.

Cell Culture and Transfections—HepG2/shPCSK9 cells were seeded at 1×10^5 cells/well in a 12-well microplate (Greiner Bio-One). After 24 h, the cells were transfected with 1 μ g of cDNAs using FuGENE HD (Roche Applied Science), and 24 h post-transfection, the cells were washed and then incubated with fresh DMEM without serum for an additional 24 h before recovering media and cells.

Preparation of Conditioned Media— 2×10^6 HEK293 or HepG2/shPCSK9 cells in a 100-mm Petri dish coated with poly-L-lysine (Invitrogen) were transfected with a total of 4 μ g of cDNA using Effectene (Qiagen). At 24 h post-transfection, the cells were washed and incubated with serum-free media. Conditioned media were recovered 72 h post-transfection. The spent media were then concentrated on an Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit with a 10-kDa membrane cutoff (Millipore). Concentrated V5-tagged PCSK9 and its derivatives in conditioned media were quantitated by enzyme-linked immunosorbent assay detecting V5-tagged proteins (ELISA-V5, Invitrogen, catalog no. R960-25).

Media Transfer Experiments—HepG2/shPCSK9 cells were seeded in a 12-well microplate at 3×10^5 cells/well (Greiner Bio-One). After an overnight incubation, cells were washed and incubated in LPDS media (Dulbecco's phosphate-buffered saline (Invitrogen), 0.1% sodium pyruvate (Invitrogen), and 5% lipoprotein-deficient serum (Biomedical Technologies)). Following 24-h incubation, media were replaced by conditioned media containing PCSK9 or its mutants/deletants at a final concentration of 1.2 μ g/ml. After 4 h of incubation at 37 °C, cells were lysed in 1 \times radioimmune precipitation assay buffer (RIPA: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)) containing 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS supplemented with 1 \times complete protease inhibitor mixture (Roche Applied Science) and then analyzed.

Western Blot Analyses—Media were recovered 48 h post-transfection, and the cells were lysed in 1 \times radioimmune precipitation assay buffer. Proteins in the cell lysates and media were resolved by 10% Tris-glycine SDS-PAGE. The gels were blotted onto PVDF (PerkinElmer Life Sciences) membranes (GE Healthcare), blocked for 1 h in TBS-T (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% nonfat milk, and immunoblotted with a homemade polyclonal human PCSK9 antibody (1:1000) (13), human LDLR antibody (1:1000, R&D Systems), β -actin (1:5000; Sigma), and mAb V5-HRP (1:5000, Sigma). Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10000, Sigma) were used for detection with enhanced chemiluminescence using the ECL Plus kit (GE Healthcare). Quantitation of protein bands was obtained using ImageJ software.

FACS Analysis—HepG2/shPCSK9 cells were incubated at 37 °C for the indicated times (0, 30, 60 min) with various conditioned media containing WT PCSK9, single-point mutants, or module deletants. The cells were then washed three times

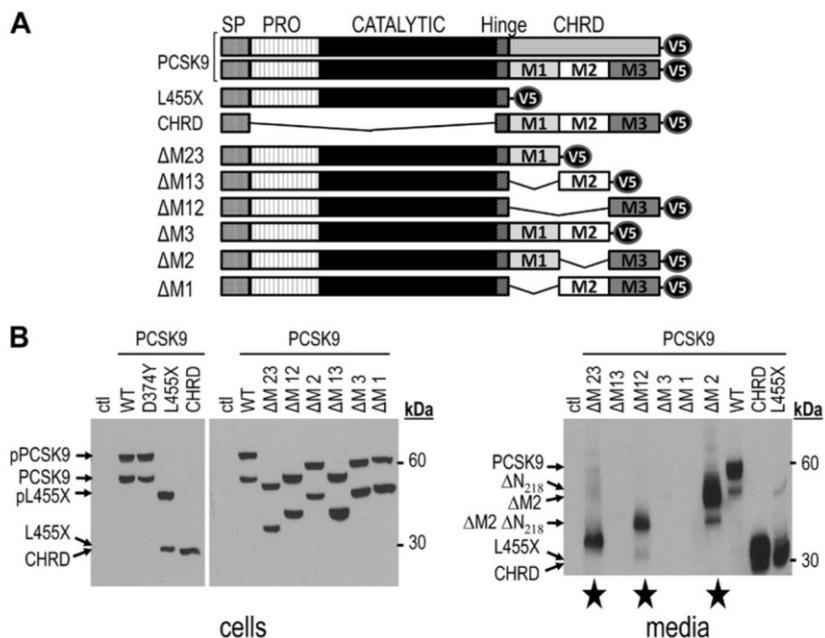


FIGURE 1. Expression, autocleavage, and secretion of CHRD module deletants. *A*, schematic representation of V5-tagged WT human PCSK9, PCSK9 domain deletants (L455X, lacking CHRD, and CHRD, lacking the prosegment (PRO) and catalytic domain but retaining the hinge region (10)), and PCSK9 CHRD module deletants (Δ M1, Δ M2, Δ M3, Δ M12, Δ M23, and Δ M13). *SP*: Signal Peptide. *B*, HEK293 cells were transiently transfected with cDNAs encoding the above constructs. 48 h post-transfection, proteins in cell lysates and media were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Western blot analysis using mAb-V5. The migration positions of reference molecular weight proteins, as well as those of the precursor and mature PCSK9 products are emphasized. The secreted CHRD module deletants are labeled with a star. *Ctl*, control.

with solution A (calcium/magnesium-free Dulbecco's PBS (Invitrogen) containing 0.5% bovine serum albumin (Sigma) and 1g/liter glucose). The cells were then incubated for 10 min at room temperature with 1 \times Versene solution (Invitrogen) followed by the addition of 5 ml of solution A. The cells were then incubated for 40 min in solution A containing a human LDLR mAb-C7 (1:100, Santa Cruz Biotechnology). Following washes, the cells were then incubated for 20 min in solution A containing a secondary antibody (Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse antibody, 1:250, Molecular Probes). Following suspension in PBS containing 0.2% of propidium iodide, the cells were analyzed by FACS for both propidium iodide (dead cells) and LDLR in live cells with Alexa Fluor 647 using the FACS Becton Dickinson LSR (BD Biosciences).

Immunocytochemistry—Cells were washed three times with PBS, fixed with a solution of 4% paraformaldehyde, 4% sucrose in PBS for 15 min, and permeabilized with a solution of 25% BSA, 10% fetal bovine serum, 0.3 M glycine, and 0.1% Tween/PBS for 10 min. The cells were then incubated for 30 min with 5% BSA (Fraction V, Sigma), followed by an overnight incubation at 4 °C with selected antibodies (1:100 goat polyclonal anti-hLDLR, R&D Systems; 1:500 mouse mAb-V5, Invitrogen; 1:200 human TGN46, Serotech; 1:200 human protein disulfide isomerase, Santa Cruz Biotechnology). The cells were then incubated for 60 min with the corresponding Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes) and mounted in ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Invitrogen). Immunofluorescence analyses were performed with a Zeiss LSM 710 confocal microscope coupled with a Nikon Eclipse TE2000-U laser scanning microscope with 405-, 488-,

543-, and 633-nm laser lines. Images were processed with Zen 2009 software. For internalization experiments, HepG2/shPCSK9 cells were preincubated for 15 min at room temperature followed by 30 min of incubation with conditioned media at room temperature, and then transferred to 37 °C for 0, 60, or 180 min before preparation for immunofluorescence analysis as described above.

RESULTS

Expression, Zymogen Processing, and Secretion of CHRD Module Deletants—The reported crystal structures of PCSK9 revealed that its C-terminal CHRD contains three distinct Cys/His-rich modules named M1, M2, and M3 (7–9) (supplemental Fig. S1). The CHRD was shown to be critical for targeting the PCSK9=LDLR complex to endosomes/lysosomes for degradation (13, 29). Thus, it was of interest to define the contribution of each module in this process and whether they could equally affect the extracellular (33) and intracellular (14) pathways of PCSK9-induced LDLR degradation. Accordingly, six C-terminally V5-tagged CHRD module deletants were generated by mutagenesis, resulting in human PCSK9 forms lacking only one (Δ M1, Δ M2, or Δ M3) or two (Δ M12, Δ M23, or Δ M13) modules (Fig. 1A). To analyze the fate of each deletant and its ability to fold and be secreted, among other cell lines, we first selected HEK293 cells, which are efficiently transfected, allowing the collection of media with enough material for multiple extracellular incubations. Accordingly, HEK293 (or HepG2/shPCSK9) cells were transiently transfected with cDNAs coding for these constructs. Cell lysates and media were then analyzed by Western blot analysis using mAb-V5. The data show that, similar to

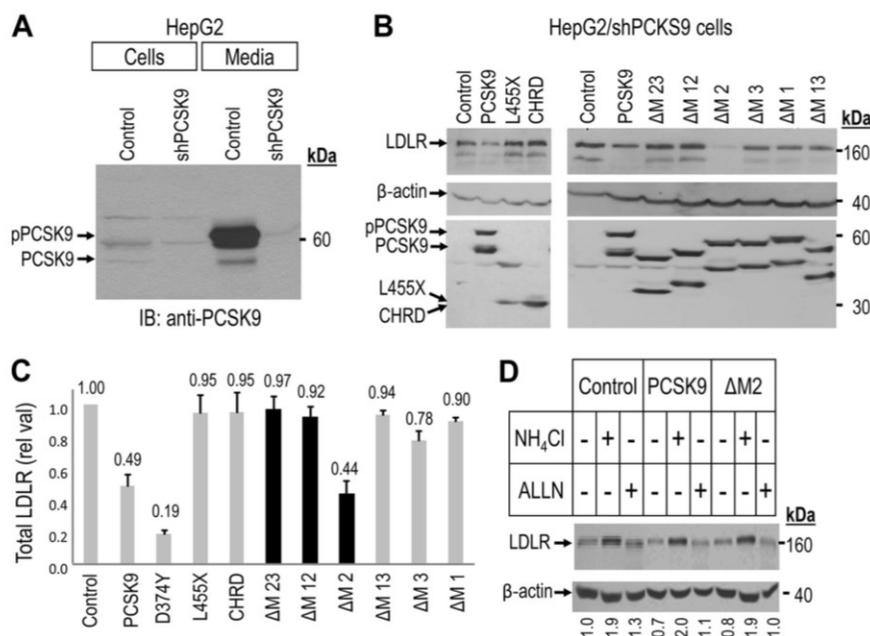


FIGURE 2. Effect of intracellular expression of CHRD module deletants on total LDLR levels in HepG2/shPCSK9 cells. Western blot analysis of total LDLR in HepG2/shPCSK9 cells transiently transfected with either an empty vector control, WT PCSK9, L455X, CHRD, and CHRD module deletants (Δ M23, Δ M12, Δ M2, Δ M3, Δ M1, and Δ M13). *A*, intracellular and secretion levels of endogenous PCSK9 in HepG2 cells expressing non-target shRNA (*Control*) compared with HepG2/shPCSK9 cells. The migration positions of proPCSK9 and PCSK9 forms are emphasized. *B*, immunoblot. *B*, total LDLR reducing activity of WT PCSK9, L455X, CHRD, and CHRD domain deletants compared with cells expressing an empty vector control (*upper panels*). The levels of cellular and secreted PCSK9 forms are shown (*center panels*) as well as those of the β -actin cellular loading controls (*lower panels*). Endogenous LDLR was detected using a polyclonal antibody recognizing its extracellular domain, and all PCSK9 constructs, except the control empty vector one, were detected with a V5 HRP-conjugated mAb. *C*, total LDLR levels normalized to β -actin. As negative controls we used either L455X (a construct lacking the CHRD) or the secreted CHRD domain, which had no effect on the LDLR (31). The *black bars* emphasize the secreted CHRD module deletants. These data are representative of at least three independent experiments. *D*, intracellular degradation of LDLR by PCSK9 and PCSK9 Δ M2 occurs in acidic compartment(s) and is blocked upon 7 h incubation of HepG2/shPCSK9 cells by 10 mM NH_4Cl but not by 50 μM acetyl-Leu-Leu-norleucinal (*ALLN*).

WT PCSK9 (1, 5) and its construct lacking the CHRD (L455X) (31), each CHRD module deletant is synthesized as a zymogen (pPCSK9), which is cleaved into a mature form, similar to WT PCSK9 (Fig. 1*B*, *cell lysates*, *left panel*). The CHRD only shows one protein product because it lacks both the prosegment and catalytic domain of PCSK9. However, only PCSK9, L455X, and CHRD and PCSK9 Δ M23, Δ M12, and Δ M2 are secreted (Fig. 1*B*, *media*, *right panel*). This suggested that loss of the M2 domain does not negatively affect folding and/or secretion (Fig. 1*B*, *media*, *right panel*). In contrast, in the presence of M2, the loss of M1, M3, or both (Δ M1, Δ M3, Δ M13) prevents secretion into the medium (Fig. 1*B*, *media*, *right panel*) but not zymogen cleavage (*A*, *cells*, *left panel*). In agreement, immunocytochemistry (*supplemental Fig. S2*) confirmed that Δ M1, Δ M3, and Δ M13 are retained in the ER and colocalize with the ER marker protein disulfide isomerase. In contrast, the secreted Δ M2, Δ M12, and Δ M23 colocalize with the *trans* Golgi network marker protein TGN46. We also noted that all secreted constructs containing the catalytic domain exhibit small amounts of the product of furin-cleavage at Arg₂₁₈, resulting in the loss of the N-terminal residues 152–218 (Δ N₂₁₈) (34, 35).

LDLR Degradation by Overexpressed PCSK9 and Its Domain Deletants—Because PCSK9 is mostly expressed in hepatocytes (1, 24) it was pertinent to study its ability to degrade LDLR in these cells. We previously reported the activity of PCSK9 on LDLR in the human hepatocyte-derived HepG2 cell line (5, 31). Furthermore, because of the endogenous expression of PCSK9

in naïve HepG2 cells, we engineered cells lacking its expression by stable shRNA silencing. The resultant HepG2/shPCSK9 cells showed a more robust activity of added PCSK9 (14). Accordingly, we used these cells to further study the various PCSK9 constructs. Western blot analysis of the expression of endogenous PCSK9 in HepG2 cells expressing non-functional shRNA (*Control*) versus HepG2/shPCSK9 cells revealed that in the latter, the total protein levels (cells and media) of endogenous PCSK9 are reduced by > 90% (Fig. 2*A*).

We next transiently transfected cDNAs coding for PCSK9 and its various V5-tagged deletion constructs in HepG2/shPCSK9 cells and analyzed their intracellular production and effects on the levels of LDLR 48 h post-transfection (Fig. 2*B*). All the data obtained with HepG2/shPCSK9 cells were confirmed in naïve HepG2 cells (*supplemental Fig. S3A*). The expression and intracellular processing of PCSK9 and its deletants were very similar to those observed in HEK293 cells (Fig. 1*B*, *cells*, *left panel*). Western blot analysis of total LDLR in these cells (Figs. 2*B*, *upper panel*, and *C*) showed that only PCSK9, its GOF D374Y mutant, and PCSK9 Δ M2 effectively enhance the degradation of endogenous LDLR in these HepG2/shPCSK9 cells. Furthermore, WT PCSK9 and its Δ M2 deletant are equipotent in this respect (Fig. 2*C*). Surprisingly, even though PCSK9 Δ M23 and Δ M12 are secreted (Fig. 1*B*), they do not enhance LDLR degradation, similar to the PCSK9 L455X and the CHRD (Fig. 3*C*). In accordance with the observed absence of secretion of the module deletants PCSK9 Δ M13, Δ M3, and Δ M1 (Fig. 1*B*,

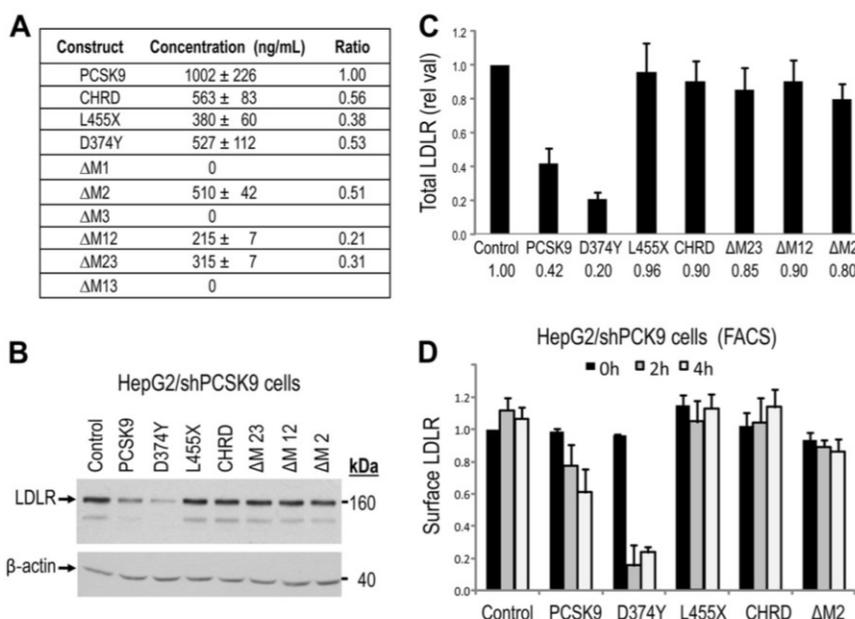


FIGURE 3. Lack of modulation of LDLR levels following extracellular incubation of HepG2/shPCSK9 cells with CHRD module deletants. *A*, ELISA-V5 assay of secreted PCSK9, L455X, CHRD, D374Y, and CHRD deletants (Δ M2, Δ M12, and Δ M23) from transiently transfected HEK293 cells. *B* and *C*, HepG2/shPCSK9 cells were incubated with equal amounts of PCSK9 constructs (1.2 μ g/ml) for 4 h at 37 °C. Cells were then lysed, and total LDLR levels were analyzed by Western blot analysis (*B*) and normalized to β -actin (*C*). Total LDLR was detected using a polyclonal antibody recognizing its extracellular domain, and all PCSK9 constructs were detected with a V5 HRP-conjugated antibody. *D*, HepG2/shPCSK9 cells were incubated for 0, 2, and 4 h at 37 °C with equal amounts (1.2 μ g/ml) of secreted PCSK9 constructs, including Δ M2. Cells were detached as described under "Experimental Procedures," and the levels of cell surface LDLR were measured by FACS analysis. As negative controls we used either a construct lacking the CHRD (L455X) or that expressing only the CHRD, both of which had no effect on LDLR levels, similar to the PCSK9 Δ M2 construct. These data are representative of at least three independent experiments. Only PCSK9 and its D374Y mutant significantly ($p < 0.001$) enhance the degradation of the LDLR.

media, right panel), these constructs are completely inactive on the LDLR (Fig. 2, *B* and *C*).

The similar activity of PCSK9 and its M2 deletant begged the question of whether they both act in a similar fashion to induce LDLR degradation in acidic endosomal/lysosomal compartments. Similar to what was previously observed for WT PCSK9 in HEK293 cells (5), incubation of HepG2/shPCSK9 cells with 10 mM of the alkalizing agent NH_4Cl completely abrogated the effects of both PCSK9 and its Δ M2 deletant (Fig. 2*D*), as also observed in control cells. Note that the proteasome inhibitor acetyl-Leu-Leu-norleucinal does not significantly affect the ability of either PCSK9 or PCSK9 Δ M2 to induce the degradation of LDLR. Thus, we can conclude that similar to WT PCSK9, the PCSK9 Δ M2 construct also enhances the degradation of the PCSK9=LDLR complex in acidic compartment(s).

LDLR Degradation in HepG2/shPCSK9 Cells by Extracellular PCSK9 and its Domain Deletants—We next proceeded to gauge the effects of PCSK9 and its domain deletants on the extracellular pathway of LDLR degradation. Accordingly, we concentrated approximately ten times the media of HEK293 cells obtained 72 h post-transfection with each cDNA construct. The concentration of each V5-tagged protein in these media was assessed by an ELISA-V5 (Fig. 3*A*). As expected, no protein is secreted from the Δ M1, Δ M3, and Δ M13 constructs. We also observed that the D374Y mutant and the deletants analyzed are all less secreted than WT PCSK9, with Δ M23 and Δ M12 being the least (five times less) secreted ones (Fig. 3*A*, *Ratio* column).

All protein constructs were adjusted to a final 1.5 μ g/ml concentration in LPDS media and then incubated for 4 h at 37 °C with HepG2/shPCSK9 cells that were preincubated for 24 h in LPDS media to stimulate LDLR expression (5). Unexpectedly, Western blot analysis of total LDLR revealed that only WT PCSK9 and its GOF D374Y are active in this assay. These data confirm the observed inactivity of extracellular L455X and CHRD on LDLR (31) and extends this observation to constructs lacking M23 and M12 modules, expected from their inactivity in the intracellular pathway (Fig. 2, *B* and *C*). However, in contrast to the intracellular expression of PCSK9 Δ M2 (Fig. 2, *B* and *C*), its extracellular incubation with HepG2/shPCSK9 cells had no significant effect on LDLR levels (Fig. 3, *B* and *C*). This unexpected observation was repeated many times and further confirmed in naive HepG2 cells (supplemental Fig. S3*B*) as well as by FACS analysis of cell surface LDLR following 0, 2-h, and 4-h incubations (Fig. 3*D*).

To test whether the lack of activity observed upon incubation of cells with 1.5 μ g/ml may be due to a lower intrinsic activity that may be detectable at higher concentrations, HepG2/shPCSK9 cells were incubated for 4 h at 37 °C with increasing concentrations (0, 0.5, 1, 3, and 5 μ g/ml) of either PCSK9 or its Δ M2 deletant (Fig. 4*A*). The data show that 5 μ g/ml PCSK9 can reduce total LDLR levels by \sim 60% but that PCSK9 Δ M2 is still completely inactive at the same concentration. Finally, to eliminate the possibility that post-translational modifications in hepatocytes would be different from HEK293 cells, we also confirmed the loss of extracellular function of PCSK9 Δ M2, even

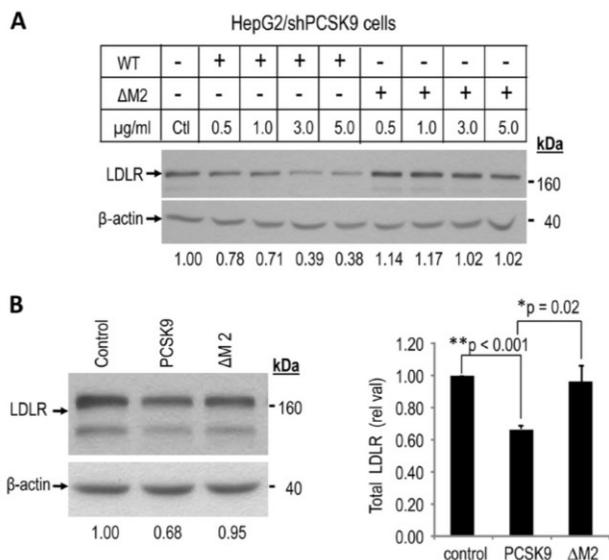


FIGURE 4. Loss of extracellular degradation activity on LDLR by PCSK9 $\Delta M2$ produced in and/or tested on HepG2/shPCSK9 cells. Wild type PCSK9 and PCSK9 $\Delta M2$ obtained from HEK293 or HepG2/shPCSK9 cells incubated for 4 h at (A) increasing concentrations (0 [control, Ctl], 0.5, 1.0, 3.0, and 5.0 $\mu\text{g/ml}$, quantified by ELISA assays) with HepG2/shPCSK9 cells, or (B) 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (quantified by ELISA assays) with HepG2/shPCSK9 cells. Cells were then lysed and total LDLR was analyzed by Western blot. Total LDLR was detected using a polyclonal antibody recognizing its extracellular domain and its levels were normalized to β -actin cellular loading controls. These data are representative of three independent experiments. Statistical values were estimated by Student's *t*-test and considered significant when *p* values are < 0.05 . The data show that PCSK9 significantly reduces LDLR (**, $p < 0.001$) and that the LOF of PCSK9 $\Delta M2$ versus PCSK9 is significant with *, $p = 0.02$, but not versus control, supporting its complete LOF.

when it is produced in and tested on HepG2/shPCSK9 cells (Fig. 4B). Thus, we can conclude that the M2 domain is critical for the activity of PCSK9 on LDLR in the extracellular pathway but not in the intracellular one.

Internalization of Extracellular PCSK9, $\Delta M2$, and L455X in HepG2/shPCSK9 Cells—In view of the inactivity of either PCSK9 L455X or PCSK9 $\Delta M2$ on LDLR, it was of interest to define the critical step that these deletants cannot achieve and that is required to enhance the degradation of the PCSK9=LDLR complex. To avoid degradation in acidic compartments, HepG2/shPCSK9 cells were preincubated overnight with 5 mM NH_4Cl and maintained in these conditions until cell fixation. To slow down cellular metabolism, cells were placed for 15 min at room temperature. To allow cell surface binding, HepG2/shPCSK9 cells were incubated for 30 min with each of the three constructs. Subsequently, incubations were shifted to 37 °C for 0, 60, or 180 min to follow the possible cellular internalization of the proteins by confocal microscopy under permeabilizing conditions (31).

As expected, analysis of confocal microscopy images showed that PCSK9 colocalized with cell surface LDLR and, after 60 and 180 min, was internalized into the cell with the LDLR (Fig. 5A). Confocal images revealed that at $t = 0$ min, L455X (supplemental Fig. S4) and the module deletant $\Delta M2$ (Fig. 5B) also colocalized with the LDLR, indicative of their binding to this receptor. Subsequently, at $t = 60$ and 180 min, both deletant proteins were also found to increasingly colocalize with intracellular

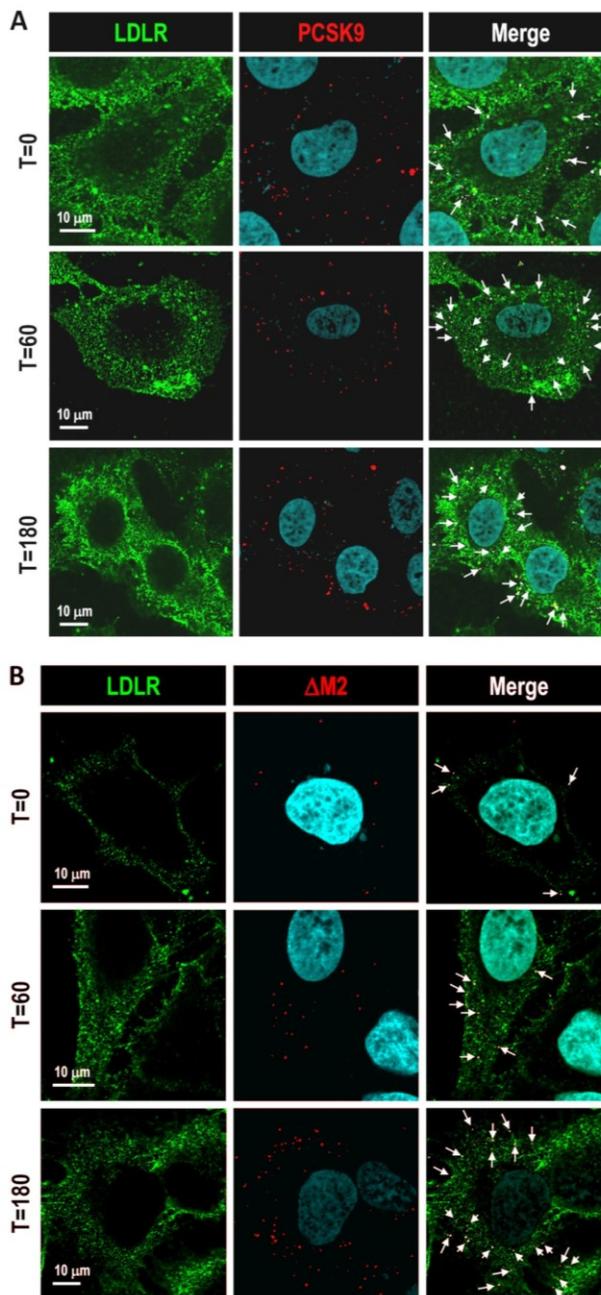


FIGURE 5. Internalization of PCSK9 $\Delta M2$. HepG2/shPCSK9 cells were incubated at the indicated times with HEK293 media containing 1.5 $\mu\text{g/ml}$ of PCSK9 (A) and PCSK9 $\Delta M2$ (B), both V5-tagged. After 0, 60, or 180 min of incubation, cells were prepared for immunocytochemistry under permeabilizing conditions, and the internalization of V5-tagged proteins was analyzed by confocal microscopy. Scale bar = 10 μm .

LDLR, suggesting that their internalization also occurred (Fig. 5B and supplemental Fig. S4).

Role of the Basic Residues Containing Loops within the Hinge Region and M2—The hinge region of PCSK9, linking the catalytic subunit to the CHR1, is not a disordered sequence as it is visible in all crystal structures and contains an exposed loop, possibly representing a binding region to a partner protein. The latter could regulate the PCSK9-induced degradation of LDLR.

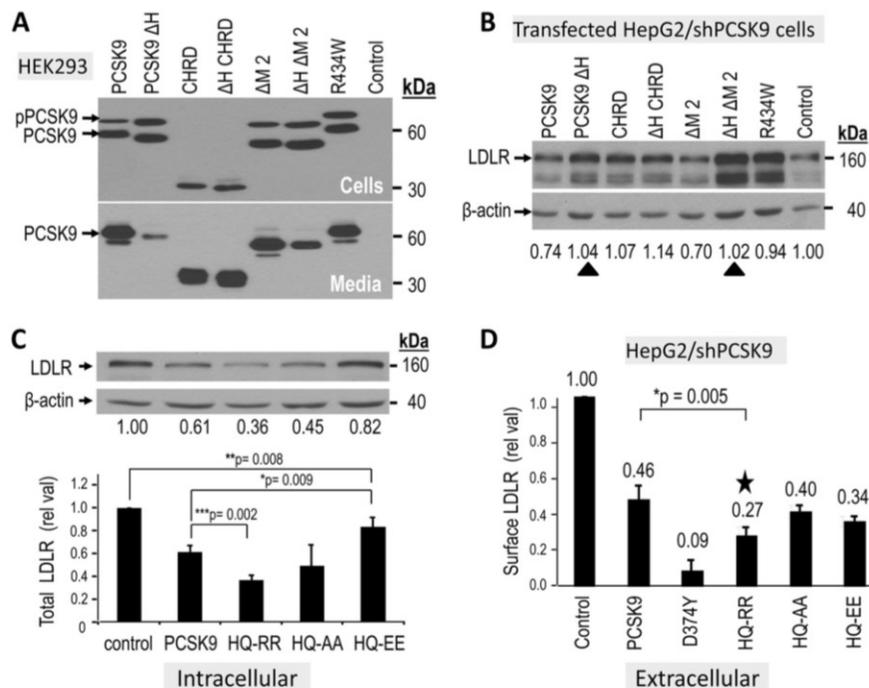


FIGURE 6. Impact of basic residues in the hinge region and M2 module on the activity of PCSK9. Hinge region: **A**, HepG2/shPCSK9 cells were transiently transfected with various V5-tagged constructs containing or lacking the hinge region of PCSK9 (aa 405–420) and/or lacking the M2 module. At 48 h post-transfection, the proteins in the media and cell lysates were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using mAb-V5. The migration positions of proPCSK9 (pPCSK9) and mature PCSK9 are emphasized. **B**, the total LDLR-degrading activity of each construct was analyzed 48 h post transfection by Western blot of cell lysates using a polyclonal LDLR antibody, and the levels of the ~160 kDa were normalized to β -actin cellular loading controls. The ~110 kDa LDLR represents the immature form of the receptor. The *black triangles* point to the abrogation of the intracellular activity in WT and Δ M2 constructs upon removal of the hinge region. M2 module: **C**, HepG2/shPCSK9 cells were transiently transfected with various V5-tagged constructs expressing PCSK9 Δ M2, WT PCSK9 or some of its single point mutant (GOF D374Y) and the charge modified double point mutants (HQ553,554RR; HQ553,554AA; HQ553,554EE). The total LDLR-degrading activity of each construct was analyzed in **B**. **D**, cell surface LDLR levels were evaluated by FACS analysis following 4 h incubation of HepG2/shPCSK9 cells with most of the constructs in **C**. The *star* emphasizes the GOF of the HQ553,554RR mutant in this assay. These data are representative of at least three independent experiments. Statistical significance is emphasized (*, $p < 0.05$).

Alternatively, the hinge region could be necessary for the correct folding of PCSK9 and the spatial positioning of the CHR Δ versus the rest of the molecule to optimize its function. Indeed, we showed previously that a natural mutation of the basic residue at Arg-434 present within an exposed loop within the hinge region (supplemental Fig. S5, A and B) into Trp (R434W) results in an ~70% reduction in the extracellular pathway function of PCSK9 (10). In this report, we extend this observation and show that following transfection of HepG2/shPCSK9 cells, the R434W mutant lacks intracellular activity on the LDLR (Fig. 6B). These data point to the critical importance of the hinge region in regulating both the intracellular and extracellular activity of PCSK9 on the LDLR. We thus analyzed the effects of constructs lacking the hinge region (PCSK9 Δ H, Δ H Δ M2, and Δ H CHR Δ ; supplemental Fig. S5) on the overall intracellular activity of PCSK9. Overexpression of these V5-tagged constructs (supplemental Fig. S6) in HEK293 cells revealed that removal of the hinge region does not affect the expression or secretion of the CHR Δ . Similarly, zymogen processing of PCSK9 and its Δ M2 deletant are not affected, but the lack of the hinge region results in a significantly reduced secretion of PCSK9 and less so of the Δ M2 construct (Fig. 6A). Lack of the hinge region in the latter proteins results in a complete loss of their intracellular activity on LDLR (Fig. 6B), supporting the

notion that the hinge region is critical to maintain an active PCSK9 conformation.

A survey of known PCSK9 natural mutations modifying the charge around basic residues within an exposed loop of the CHR Δ M2 module (residues 530–605, supplemental Fig. S5C) led us to concentrate on the only reported natural GOF H553R and LOF Q554E (36) mutants found within the sequence **R**VH**C**H₅₅₃Q**Q**G**H**. Accordingly, we doubly mutated residues 553 and 554 to Arg, Ala, or Glu (HQ-RR, HQ-AA, and HQ-EE). The resulting double mutants did not affect the zymogen processing or secretion of PCSK9 (Fig. S7) or its capacity to enhance the degradation of the LDLR via the intracellular pathway (Fig. 6C). However, we note that the HQ-RR mutant results in a 1.7-fold enhanced extracellular activity of PCSK9, as measured by quantitative FACS analysis of cell surface LDLR (Fig. 6D). This result agrees with the observation that the H533R is a GOF but also circumscribes this enhanced activity to the extracellular pathway and not the intracellular one. We conclude that the critical importance of the M2 domain in the extracellular and intracellular pathways can be enhanced by specific mutations that increase the basicity of this exposed loop, such as the selected GOF HQ-RR mutation. This finding further emphasizes the major role played by the M2 module, and specific exposed residues within, in regulating the activity of PCSK9.

DISCUSSION

Hypercholesterolemia, which is characterized by elevated blood LDLc, is one of the main risk factors for cardiovascular disease worldwide (37) and is observed in > 20% of the Western population. Among existing treatments, “statins,” which target HMG-CoA reductase, are by far the most efficient drugs. However, at least 15% of patients either do not respond to statin treatment, encounter serious side effects (38), or do not reach ideal target levels of circulating LDLc to control their dyslipidemia. Consequently, new drugs to treat elevated LDLc and tools to identify responders *versus* non-responders to LDLc-lowering treatments are needed urgently.

Studies performed over the past 9 years have indicated that the proprotein convertase PCSK9 plays a central role in regulating blood LDLc levels (2, 21). Indeed, the mature, active form of PCSK9 binds to the LDLR at the external face of the plasma membrane to enhance its degradation in endosomes/lysosomes, thus preventing internalization of circulating LDLc by liver hepatocytes. Most notably, PCSK9 has been shown to be an efficient therapeutic target in humans (2, 21, 39). Indeed, injections of PCSK9-silencing siRNAs or anti-PCSK9 mAbs, currently in phase II and III clinical trials, have been shown to efficiently reduce LDLc in the blood circulation of patients (2, 28).

Natural mutations within the hinge region and CHR domain were reported to modify the function of PCSK9 and, thus, circulating LDLc levels. For example, the R434W hinge mutation results in a LOF of PCSK9 (10). The five significant LOF mutations in the CHR are in the M1 (S462P), M2 (Q554E), and M3 (P616L, S668R, and C679X) modules, and the reported eight GOF mutations are in the M1 (R469W, E482G, R496W, A514T, F515L, and A522T), M2 (H553R), and M3 (V624M) modules. Even though the hinge region and M2 module exhibit the highest prevalence of structural mobility, the latter possibly because of the lack of disulfide stabilization (7), they are the structural units with the least reported natural mutations, with only two juxtaposed mutations (GOF H553R and LOF Q554E) within the exposed loop of the M2 module (supplemental Fig. S5).

On the basis of the above observations, the requirement of the CHR for the activity of PCSK9 (13, 29) and the demonstration of the presence of intracellular and extracellular pathways by which PCSK9 enhances the degradation of the LDLR (14, 15), we aimed to define the contribution of the hinge region and the three CHR modules in the regulation of the PCSK9 activity.

Accordingly, we generated six CHR module deletants (Δ M1, Δ M2, Δ M3, Δ M12, Δ M23, or Δ M13) (Fig. 1A). We next evaluated their role in the PCSK9 intracellular processing, secretion, subcellular localization, and the two LDLR degradation pathways. Interestingly, intracellular expression of the CHR domain module deletants in HEK293, HepG2/shPCSK9 (cells in Figs. 1B and 2B) or HepG2 cells (not shown) revealed that the lack of one or two modules in the CHR domain did not affect the ability of proPCSK9 to undergo autocatalytic processing into mature PCSK9. Surprisingly, among all six CHR module deletants, only PCSK9 Δ M2, Δ M12, and Δ M23

were secreted (media in Fig. 1A), indicating that for secretion, M2 was the only dispensable module.

Our previous data showed that except for the GOF D374Y, cellular overexpression of WT PCSK9 mostly results in lowering LDLR levels by the intracellular pathway (14). This is due to the relatively low secretion levels of PCSK9 from transfected cells (~ 0.1 μ g/ml), *versus* the ten times higher concentration necessary to effectively enhance LDLR degradation from the extracellular pathway (31). We conclude that the intracellular overexpression of PCSK9 and its Δ M2 deletant exhibit a comparable ability to enhance the degradation of the LDLR, likely by the intracellular pathway.

We next assessed the extracellular activity of the three secreted CHR domain deletants (Fig. 3, B and C, and supplemental Fig. S3). Unexpectedly, none of them showed any activity on the LDLR, even the Δ M2 at a concentration up to 5 μ g/ml, which results in an $\sim 60\%$ reduction of LDLR levels by WT PCSK9 (Fig. 4A). This conclusion was further confirmed by FACS analysis, which also revealed that similar incubations resulted in no detectable reduction of cell surface LDLR levels (Fig. 3D). We analyzed the cellular association of each construct by incubating them with HepG2/shPCSK9 cells followed by extensive washes. Western blot analysis of cell lysates demonstrated that all of them bound to cells (data not shown). Thus, the lack of activity of the PCSK9 L455X and CHR domain deletants is not due to their inability to bind and likely internalize into cells.

To rationalize the inactivity of the extracellular Δ M2 protein, immunocytochemistry was used to analyze its fate. Confocal images showed that PCSK9, L455X, and even the Δ M2 deletant colocalize with LDLR at all time points, revealing their cell surface binding and internalization (Fig. 5 and supplemental Fig. S4). However, these steps were not accomplished with the same efficiency, as evidenced by the higher binding and faster internalization of WT PCSK9 *versus* L455X or Δ M2. On the basis of these observations, it is clear that the inability of PCSK9 Δ M2 to enhance LDLR degradation does not reside in its lack of LDLR binding or its cointernalization with the LDLR, suggesting that the M2 module carries structural requirements to achieve the critical and late LDLR sorting and degradation steps within endosomes/lysosomes.

The hinge region is tightly linked to the CHR domain, even if the hinge is only 17 amino acids long, its sequence seems to be important to maintain the full activity of WT PCSK9. Notably, the only natural mutation (R434W) reported (10) in the hinge region is a loss of function. This evidence led us to more closely examine the role of the hinge region in the folding, secretion, and, ultimately, in PCSK9 activity. On the basis of PCSK9 crystal structures, we selected to delete the exposed loop (residues 422–439) corresponding to the hinge region (supplemental Fig. S5). Interestingly, although autocatalytically processed, PCSK9 lacking amino acids 422–439 is very poorly secreted (PCSK9 Δ H, supplemental Fig. S6A). In contrast, removal of the same sequence from either the N terminus of the CHR or the Δ M2 construct (PCSK9 Δ H Δ M2) had much less effect. Overexpression of either construct in HepG2/shPCSK9 cells revealed that none of these constructs is active on the LDLR (Fig. 6B). Thus, although the PCSK9 Δ M2 is active intracellularly, the loss of the

hinge region abrogates its activity. Hence, the integrity of the hinge region is critical for the intracellular activity of PCSK9 (Fig. 6B). This is likely due to its structural requirement as a linker providing flexibility to the CHR. Amazingly, replacement of only one basic residue (Arg-434) by a Trp within the hinge region results in an almost complete intracellular loss of function (R434W in Fig. 6B) and a reduction by ~70% of its extracellular activity on LDLR (10).

The gain of a basic residue at neutral pH in the H553R mutant within the M2 domain does not affect the intracellular activity (data not shown) and, yet, results in a GOF (36), as also observed for the double mutant HQ₅₅₄-RR₅₅₄ (Fig. 6D). Interestingly, the intracellular activity is either not affected when HQ₅₅₄ is replaced by neutral residues (HQ₅₅₄-AA₅₅₄) or decreased if replaced by acidic residues (HQ₅₅₄-EE₅₅₄; Fig. 6C). The only natural mutations reported in the M2 module (36) are in the exposed His-rich HCHQQGH₅₅₇ loop (supplemental Fig. S5C), resulting in either an increased basicity at neutral pH (GOF, H553R) or increased acidity (relatively weak LOF, Q554E). We thus conclude that the whole M2 module is only critical for the extracellular activity of PCSK9 and that natural mutations within it affect this pathway. This is relevant, because neutralizing mAb injections are being presently tested in phases II and III of various clinical trials to reduce hypercholesterolemia by inhibiting the function of PCSK9 on LDLR (2, 28). All these mAbs target the catalytic subunit of PCSK9 and prevent its extracellular binding to cell surface LDLR. The only attempts to obtain CHR-directed interfering mAbs against the extracellular activity of PCSK9 targeted the M3 domain, achieving a maximum of 50% reduction in PCSK9 activity (40). According to this study, targeting the M2 module of the CHR could represent a novel strategy to inhibit the extracellular activity of PCSK9.

This concept of increased basicity favoring the CHR contribution to the extracellular activity of PCSK9 has also been proposed recently (41). In agreement with the present results, the authors show that replacements of up to 7 His, mostly located in the M2 module, do not affect the intracellular activity of PCSK9. Unfortunately, the authors have not measured the extracellular activity of their mutants, which according to our study should have been the predominantly affected pathway. Furthermore, the authors suggest that replacement of the CHR by an unrelated, similarly charged basic domain, results in a comparable activity to WT PCSK9 (41). Although the total basicity of the CHR may well be important, our data further zoom in on a specific site within the M2 domain that is a hot spot for natural mutations. We show that, indeed, the higher basicity of the HQ₅₅₄-RR₅₅₄ mutant within an exposed loop results in a robust ~2-fold higher extracellular activity on LDLR (Fig. 6D).

A recent report also suggested that the M2 module is dispensable for the intracellular activity of PCSK9 (42). However, the authors did not measure the extracellular function of their PCSK9 Δ M2 construct, which is abrogated according to this work (Figs. 3 and 4).

The mechanism governing the critical role of the M2 module, and possibly its exposed HCHQQGH₅₅₇ loop (supplemental Fig. S5), in regulating the extracellular activity of PCSK9 is

not yet defined. One possibility would be that the M2 module interacts with a critical, as yet undefined, protein that would result in the efficient targeting of the PCSK9=LDLR complex to lysosomes for degradation by endogenous hydrolases (13, 29). This would fit with the observation that an excess of CHR could compete extracellularly with PCSK9 for LDLR degradation (42). Even though it was reported that *in vitro* high concentrations of the CHR could bind the N-terminal R1-R7 repeat domain of the LDLR, the crystal structure of PCSK9 bound to the ectodomain (18) or full-length (PDB codes 3M0C and 3P5B) LDLR do not support this model, as the CHR is far away in space from the β -barrel repeat domains of this receptor. Thus, the hepatocyte CHR-binding protein remains to be identified.

In conclusion, the structural requirements of the hinge and M2 domains are not the same for the intracellular and extracellular pathways of PCSK9-induced LDLR degradation. Although the R434W mutation in the hinge region is absolutely deleterious for the intracellular activity of PCSK9, it reduces by ~70% the extracellular one. In contrast, the loss of M2 is tolerated for the intracellular activity of PCSK9 but not for the extracellular one. This information should lead to the development of more targeted approaches, possibly against the M2 domain, to inhibit the extracellular function of PCSK9 and reduce circulating LDLc.

Acknowledgments—We thank all the members of the Seidah laboratory for helpful discussions and Brigitte Mary for efficacious editorial assistance.

REFERENCES

1. Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A., and Chretien, M. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1). Liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 928–933
2. Seidah, N. G., and Prat, A. (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 367–383
3. Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J. P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., Derré, A., Villéger, L., Farnier, M., Beucler, I., Bruckert, E., Chambaz, J., Chanu, B., Lecerf, J. M., Luc, G., Moulin, P., Weissenbach, J., Prat, A., Krempf, M., Junien, C., Seidah, N. G., and Boileau, C. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154–156
4. Marduel, M., Ouguerram, K., Serre, V., Bonnefont-Rousselot, D., Marques-Pinheiro, A., Berge, K. E., Devillers, M., Luc, G., Lecerf, J. M., Tosolini, L., Erlich, D., Peloso, G. M., Stitzel, N., Nitchke, P., Jais, J. P., Abifadel, M., Kathiresan, S., Leren, T. P., Rabès, J. P., Boileau, C., and Varret, M. (2012) Description of a large family with autosomal dominant hypercholesterolemia associated with the APOE p.Leu167del mutation. *Hum. Mutat.*, doi: 10.1002/humu.22215
5. Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M. C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., Trillard, M., Abifadel, M., Tebon, A., Attie, A. D., Rader, D. J., Boileau, C., Brissette, L., Chretien, M., Prat, A., and Seidah, N. G. (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J. Biol. Chem.* **279**, 48865–48875
6. Naureckiene, S., Ma, L., Sreekumar, K., Purandare, U., Lo, C. F., Huang, Y., Chiang, L. W., Grenier, J. M., Ozenberger, B. A., Jacobsen, J. S., Kennedy, J. D., DiStefano, P. S., Wood, A., and Bingham, B. (2003) Functional characterization of NARC 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**, 55–67
7. Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R.,

- Mansour, M. N., McGrath, K. M., Seddon, A. P., Shenolikar, S., Stutzman-Engwall, K. J., Warren, L. C., Xia, D., and Qiu, X. (2007) Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 413–419
8. Piper, D. E., Jackson, S., Liu, Q., Romanow, W. G., Shetterly, S., Thibault, S. T., Shan, B., and Walker, N. P. (2007) The crystal structure of PCSK9. A regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure* **15**, 545–552
 9. Hampton, E. N., Knuth, M. W., Li, J., Harris, J. L., Lesley, S. A., and Spraggon, G. (2007) The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 14604–14609
 10. Dubuc, G., Tremblay, M., Paré, G., Jacques, H., Hamelin, J., Benjannet, S., Boulet, L., Genest, J., Bernier, L., Seidah, N. G., and Davignon, J. (2010) A new method for measurement of total plasma PCSK9. Clinical applications. *J. Lipid Res.* **51**, 140–149
 11. Maxwell, K. N., and Breslow, J. L. (2004) Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 7100–7105
 12. Park, S. W., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2004) Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **279**, 50630–50638
 13. Nassoury, N., Blasiole, D. A., Tebon Oler, A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A., and Seidah, N. G. (2007) The cellular trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* **8**, 718–732
 14. Poirier, S., Mayer, G., Poupon, V., McPherson, P. S., Desjardins, R., Ly, K., Asselin, M. C., Day, R., Duclos, F. J., Witmer, M., Parker, R., Prat, A., and Seidah, N. G. (2009) Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced LDLR degradation. Evidence for an intracellular route. *J. Biol. Chem.* **284**, 28856–28864
 15. Holla, Ø. L., Cameron, J., Berge, K. E., Ranheim, T., and Leren, T. P. (2007) Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly. *BMC Cell Biol.* **8**, 9
 16. Zhang, D. W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2007) Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat a of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 18602–18612
 17. Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D., and Deisenhofer, J. (2008) Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1820–1825
 18. Lo Surdo, P., Bottomley, M. J., Calzetta, A., Settembre, E. C., Cirillo, A., Pandit, S., Ni, Y. G., Hubbard, B., Sitlani, A., and Carfi, A. (2011) Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* **12**, 1300–1305
 19. McNutt, M. C., Lagace, T. A., and Horton, J. D. (2007) Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 20799–20803
 20. Poirier, S., Mayer, G., Benjannet, S., Bergeron, E., Marcinkiewicz, J., Nassoury, N., Mayer, H., Nimpf, J., Prat, A., and Seidah, N. G. (2008) The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J. Biol. Chem.* **283**, 2363–2372
 21. Horton, J. D., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2009) PCSK9. A convertase that coordinates LDL catabolism. *J. Lipid Res.* **50**, S172–S177
 22. Seidah, N. G. (2009) PCSK9 as a therapeutic target of dyslipidemia. *Expert Opin. Ther. Targets* **13**, 19–28
 23. Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y. A., and Horton, J. D. (2005) Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking PCSK9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 5374–5379
 24. Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Hamelin, J., Tremblay, M., Jacques, H., Jin, W., Davignon, J., Seidah, N. G., and Prat, A. (2008) Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* **48**, 646–654
 25. Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H., Jr., and Hobbs, H. H. (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–1272
 26. Denis, M., Marcinkiewicz, J., Zaid, A., Gauthier, D., Poirier, S., Lazure, C., Seidah, N. G., and Prat, A. (2012) Gene inactivation of PCSK9 reduces atherosclerosis in mice. *Circulation* **125**, 894–901
 27. Davignon, J., Dubuc, G., and Seidah, N. G. (2010) The influence of PCSK9 polymorphisms on serum low-density lipoprotein cholesterol and risk of atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* **12**, 308–315
 28. Stein, E. A., Gipe, D., Bergeron, J., Gaudet, D., Weiss, R., Dufour, R., Wu, R., and Pordy, R. (2012) Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy. A phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* **380**, 29–36
 29. Zhang, D. W., Garuti, R., Tang, W. J., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2008) Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 13045–13050
 30. Strøm, T. B., Holla, Ø. L., Tveten, K., Cameron, J., Berge, K. E., and Leren, T. P. (2010) Disrupted recycling of the low density lipoprotein receptor by PCSK9 is not mediated by residues of the cytoplasmic domain. *Mol. Genet. Metab.* **101**, 76–80
 31. Benjannet, S., Saavedra, Y. G., Hamelin, J., Asselin, M. C., Essalmani, R., Pasquato, A., Lemaire, P., Duke, G., Miao, B., Duclos, F., Parker, R., Mayer, G., and Seidah, N. G. (2010) Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9. Evidence for additional processing events. *J. Biol. Chem.* **285**, 40965–40978
 32. Holla, Ø. L., Laerdahl, J. K., Strøm, T. B., Tveten, K., Cameron, J., Berge, K. E., and Leren, T. P. (2011) Removal of acidic residues of the prodomain of PCSK9 increases its activity towards the LDL receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **406**, 234–238
 33. Cameron, J., Holla, Ø. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E., and Leren, T. P. (2006) Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1551–1558
 34. Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N., and Seidah, N. G. (2006) The proprotein convertase PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A. Functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J. Biol. Chem.* **281**, 30561–30572
 35. Essalmani, R., Susan-Resiga, D., Chamberland, A., Abifadel, M., Creemers, J. W., Boileau, C., Seidah, N. G., and Prat, A. (2011) *In vivo* evidence that furin from hepatocytes inactivates PCSK9. *J. Biol. Chem.* **286**, 4257–4263
 36. Kotowski, I. K., Pertsemliadis, A., Luke, A., Cooper, R. S., Vega, G. L., Cohen, J. C., and Hobbs, H. H. (2006) A spectrum of PCSK9 Alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 410–422
 37. Davignon, J., and Dufour, R. (2007) *Primary Hyperlipidemias: An Atlas of Investigation and Diagnosis*, pp. 1–128, Clinical Publishing, Oxford
 38. Sikka, P., Kapoor, S., Bindra, V. K., Sharma, M., Vishwakarma, P., and Saxena, K. K. (2011) Statin intolerance. Now a solved problem. *J. Postgrad. Med.* **57**, 321–328
 39. Cariou, B., Le May, C., and Costet, P. (2011) Clinical aspects of PCSK9. *Atherosclerosis* **216**, 258–265
 40. Ni, Y. G., Condra, J. H., Orsatti, L., Shen, X., Di Marco, S., Pandit, S., Bottomley, M. J., Ruggeri, L., Cummings, R. T., Cubbon, R. M., Santoro, J. C., Ehrhardt, A., Lewis, D., Fisher, T. S., Ha, S., Njimoluh, L., Wood, D. D., Hammond, H. A., Wisniewski, D., Volpari, C., Noto, A., Lo Surdo, P., Hubbard, B., Carfi, A., and Sitlani, A. (2010) A proprotein convertase subtilisin-like/kexin type 9 (PCSK9) C-terminal domain antibody antigen-binding fragment inhibits PCSK9 internalization and restores low density lipoprotein uptake. *J. Biol. Chem.* **285**, 12882–12891
 41. Holla, Ø. L., Cameron, J., Tveten, K., Strom, T. B., Berge, K. E., Laerdahl, J. K., and Leren, T. P. (2011) Role of the C-terminal domain of PCSK9 in degradation of the LDL receptors. *J. Lipid Res.* **52**, 1787–1794
 42. Du, F., Hui, Y., Zhang, M., Linton, M. F., Fazio, S., and Fan, D. (2011) Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 43054–43061

SUPPLEMENTAL FIGURES

Fig. S1. **Ribbon diagram of the 3D structure of human PCSK9.** Based on the 3D structure published (7) and found in the database corresponding to PDB 2P4E, we used the program PYMOL (Delano, W. www.pymol.org) to visualize the three distinct CHRD modules M1, M2 and M3 that are clearly apparent, and spatially separated from the inhibitory prosegment (purple) of which C-terminus is lodged within the catalytic pocket of the protease subunit (green). The multiple discontinuities in the PCSK9 structure are missing in the crystal structure, likely because they are disordered. The positions of the visible N-terminal (N) and C-terminal (C) residues are shown.

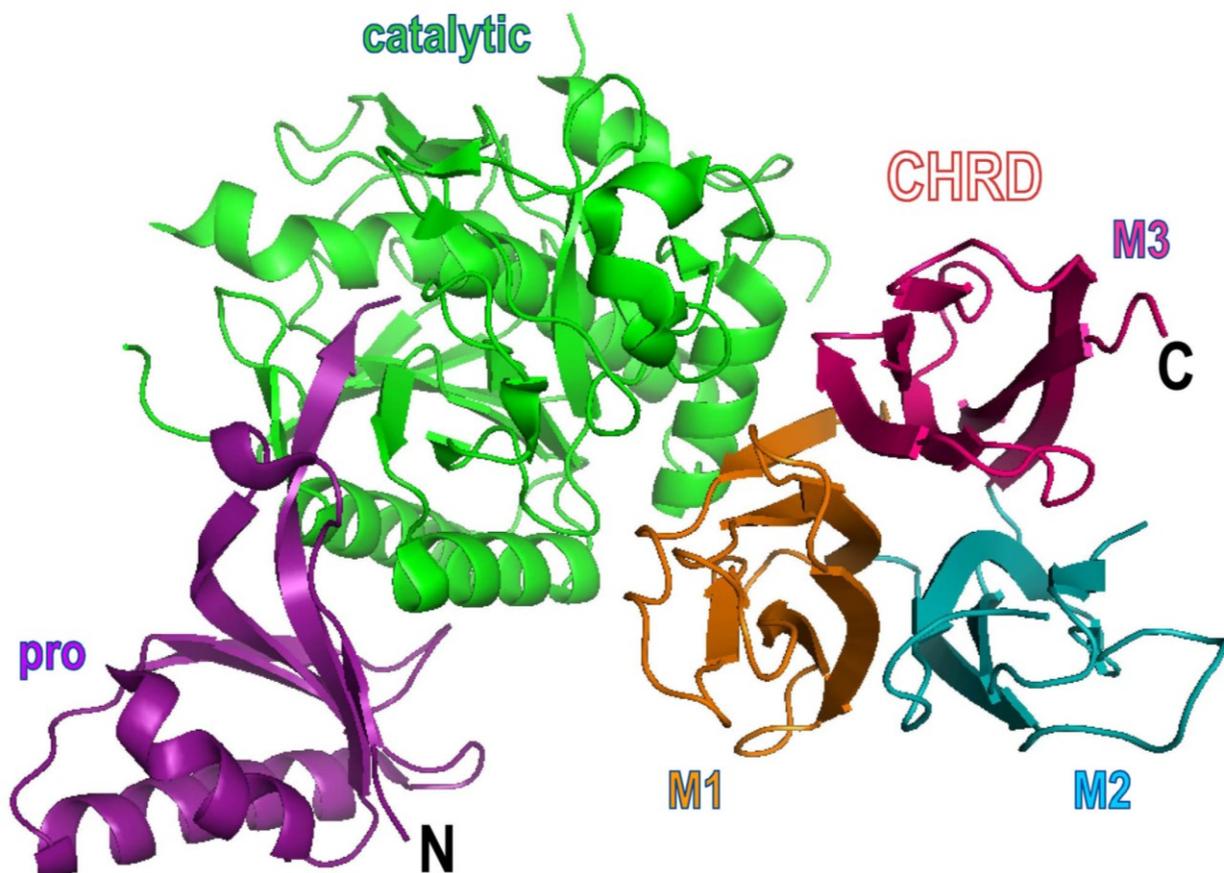


Fig. S2. **Immunocytochemical analysis of the intracellular localization of WT PCSK9, its domains and CHR D modules deletants.** HepG2/shPCSK9 cells were transiently transfected with cDNAs encoding V5-tagged WT PCSK9, L455X, CHR D and CHR D module deletants (Δ M1, Δ M2, Δ M3, Δ M12, Δ M23, Δ M13; see Fig. 1A). For immunocytochemistry, the cells were treated using permeabilizing conditions as described in “Experimental procedures”. The Immunofluorescence of V5-tagged PCSK9 and its derivatives is shown in pink, while that of human PDI (an ER marker) and TGN46 (a TGN marker), is in green. A whitish color indicates co-localization with a subcellular marker protein. Bar = 20 μ m.

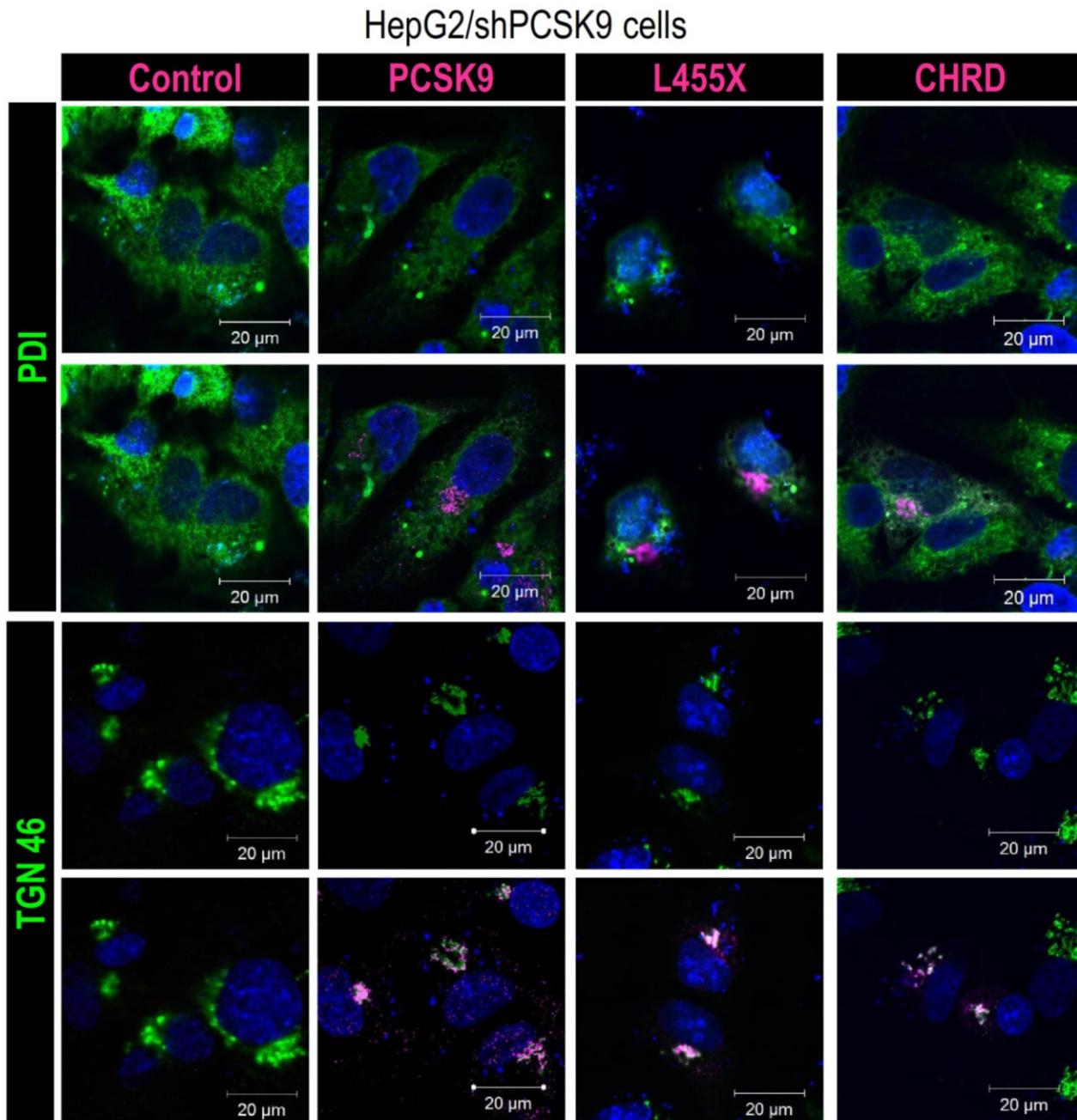


Fig. S2.

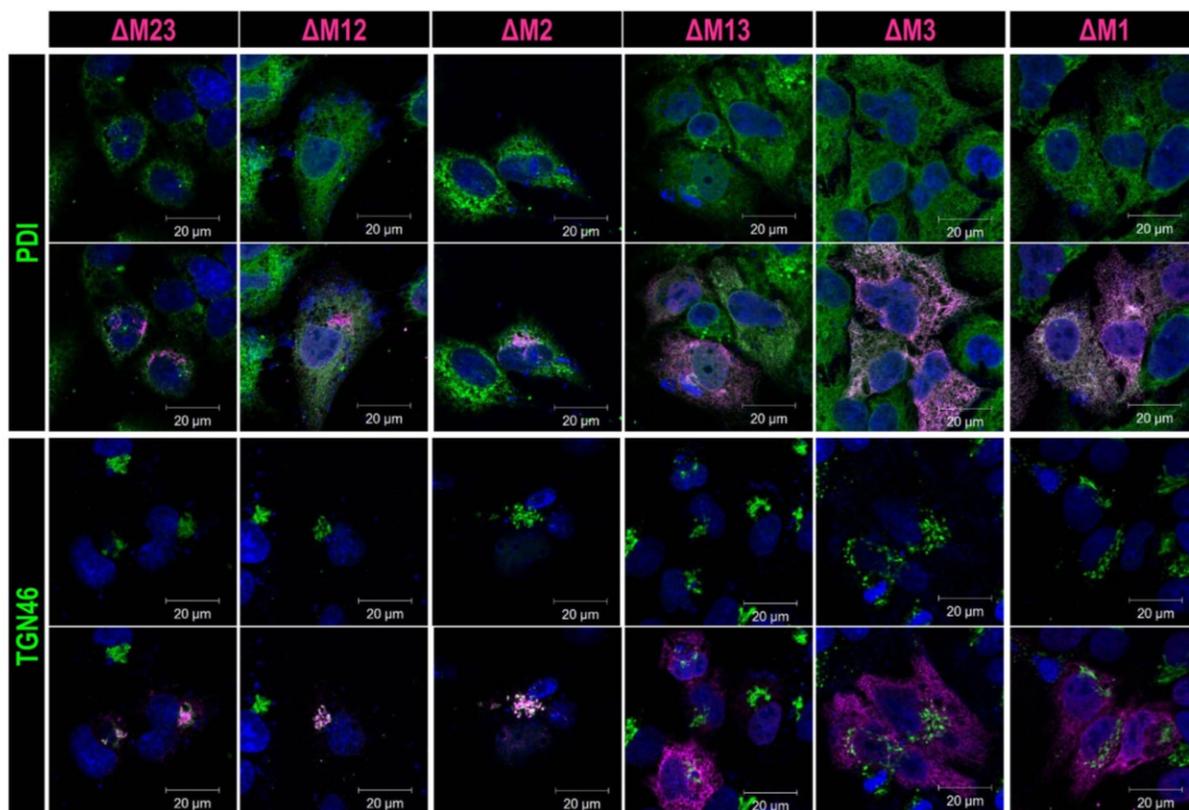


Fig. S3. **Effect of CHRD module deletants on total LDLR levels in HepG2 cells.** Quantification of Western blot analysis of total LDLR normalized to β -actin. **(A)** HepG2 cells were transiently transfected with either an empty vector control, WT PCSK9, GOF D374Y, L455X, CHRD, and CHRD module deletants (Δ M23, Δ M12, Δ M2, Δ M13, Δ M3, Δ M1). **(B)** Incubation of HepG2 cells for 4h at 37°C with media obtained from HEK293 cells transiently transfected with either an empty vector control, WT PCSK9, GOF D374Y, L455X, CHRD, and secreted CHRD module deletants (Δ M23, Δ M12, Δ M2) at final concentration of 1.5 μ g/ml as estimated by an ELISA-V5. These data are representative of at least three independent experiments. In the intracellular pathway PCSK9, its D374Y mutant and PCSK9- Δ M2, and in the extracellular pathway of LDLR degradation only PCSK9 and its D374Y mutant exhibit statistically significant ($p < 0.02$) activities.

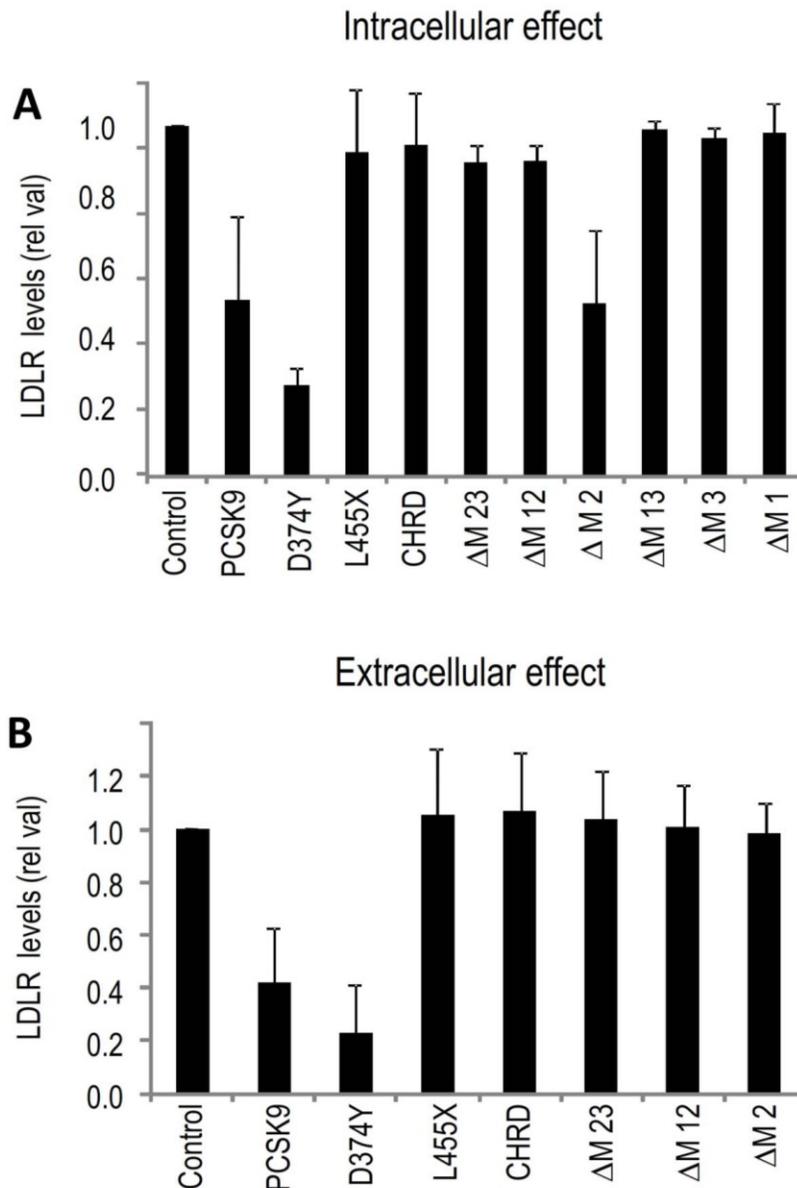


Fig. S4. **Internalization of L455X.** HepG2/shPCSK9 cells were incubated at the indicated times with HEK293 media containing 1.5 $\mu\text{g/ml}$ of L455X V5 tagged. After 0, 60 or 180 minutes of incubation, cells were prepared for immunocytochemistry under permeabilizing conditions and internalization of V5-tagged proteins was analyzed by confocal microscopy. *Bar* = 10 μm .

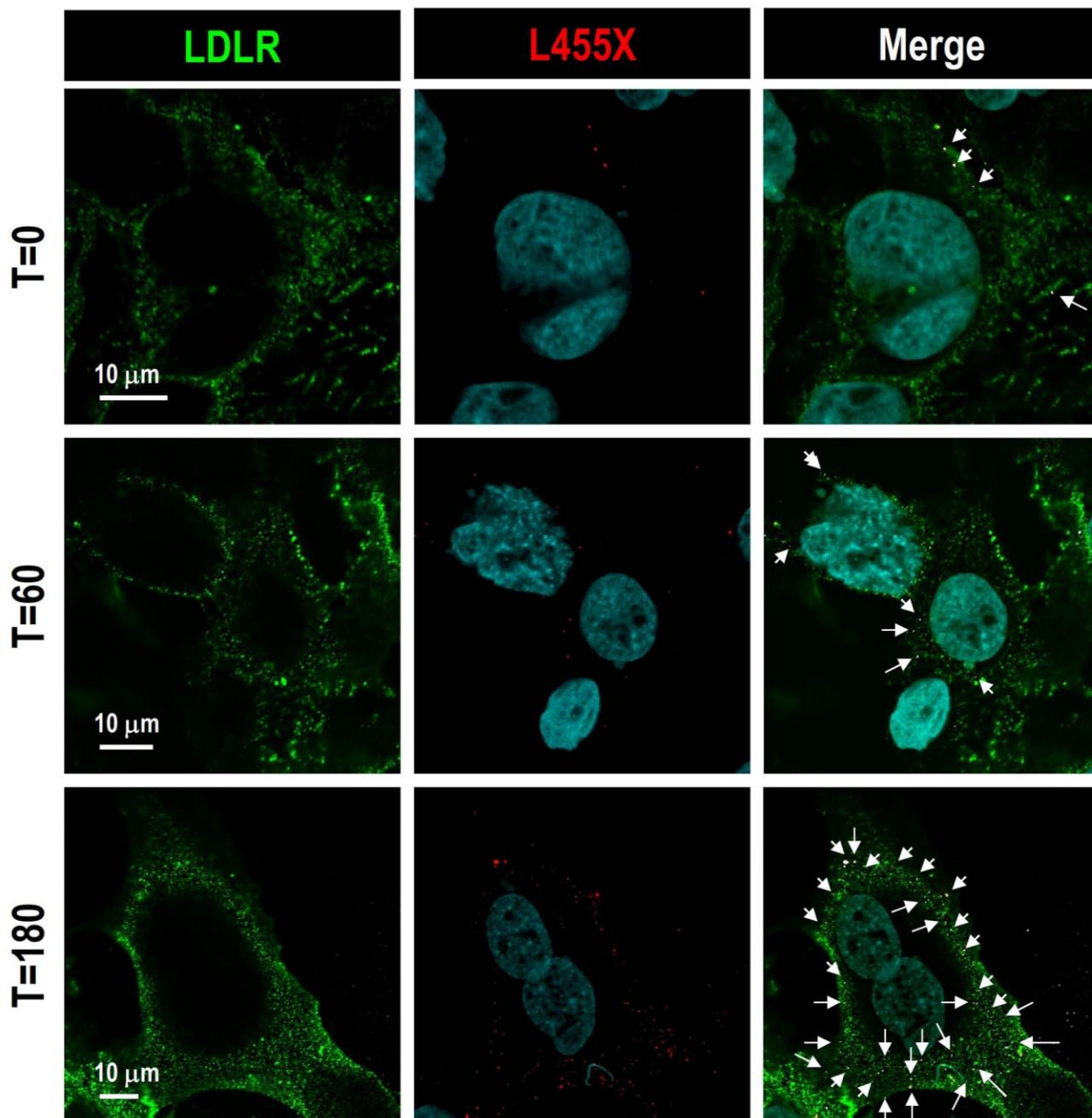


Fig. S5. **Ribbon diagram of the 3D structure of PCSK9.** Based on the 3D structure published (7) and found in the database corresponding to PDB 2P4E, we used the program PYMOL (Delano, W. www.pymol.org) to visualize the following features: **(A)** Ribbon diagram of the 3D structure of PCSK9 emphasizing the prosegment (pro), catalytic subunit, hinge region (H) and the CHR.D. **(B)** Alternative representation of the structure shown in (A) underlining the position of the hinge region (red). **(C)** Expanded 3D structure of the CHR.D, with its modules M1, M2 and M3, showing the M2 module exposed loop HCHQQGH₅₅₇. **(D)** Expanded 3D structure of the CHR.D, with its modules M1, M2 and M3, showing the positions of the His residues in all modules (green) and emphasizing His₅₅₃ (red), which is the sole His present in a loop structure within M2.

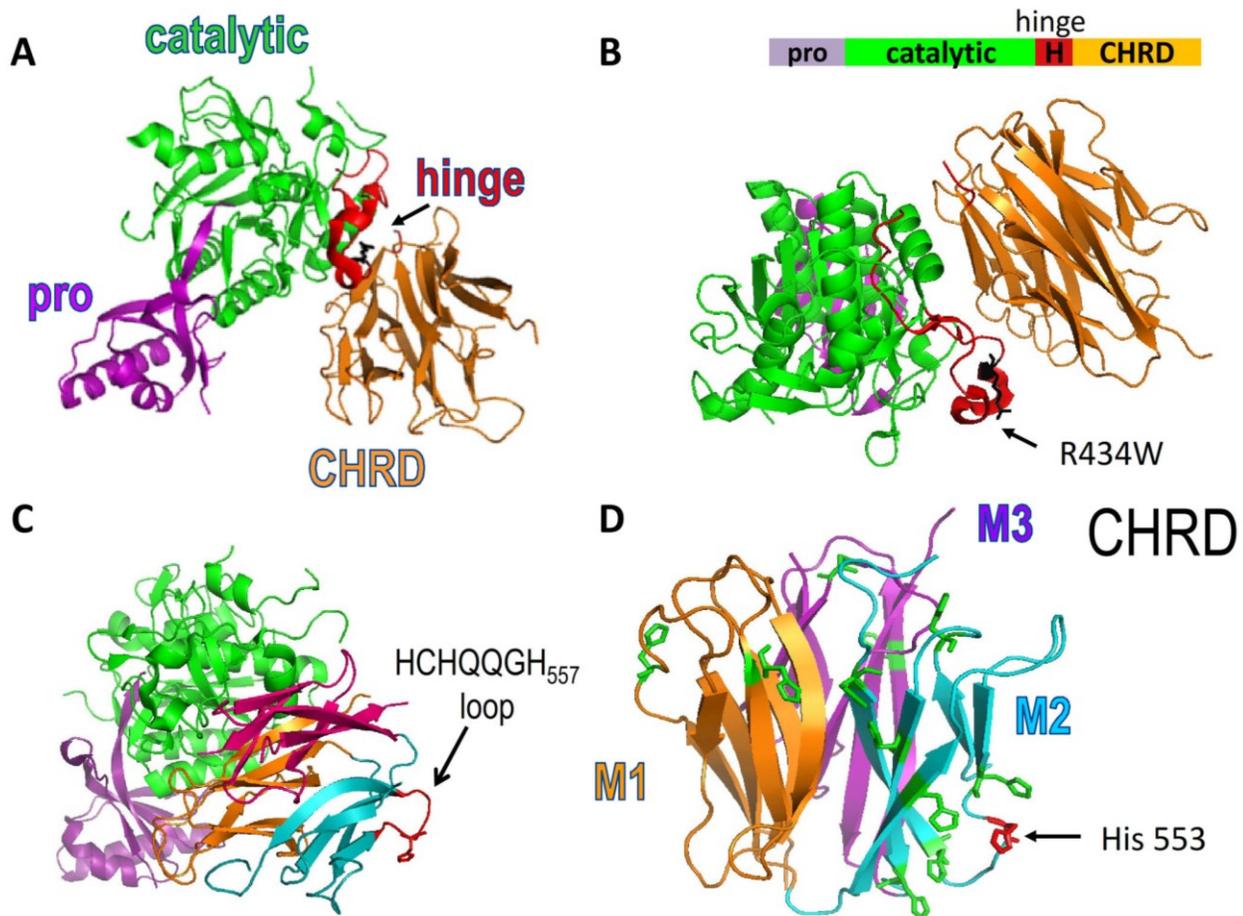


Fig. S6. **Schematic representation of V5-tagged Δ hinge (Δ H) constructs.** The V5-tagged constructs include WT PCSK9, PCSK9 Δ H, PCSK9 Δ M2, PCSK9 Δ H Δ M2, CHR D, and Δ H CHR D.

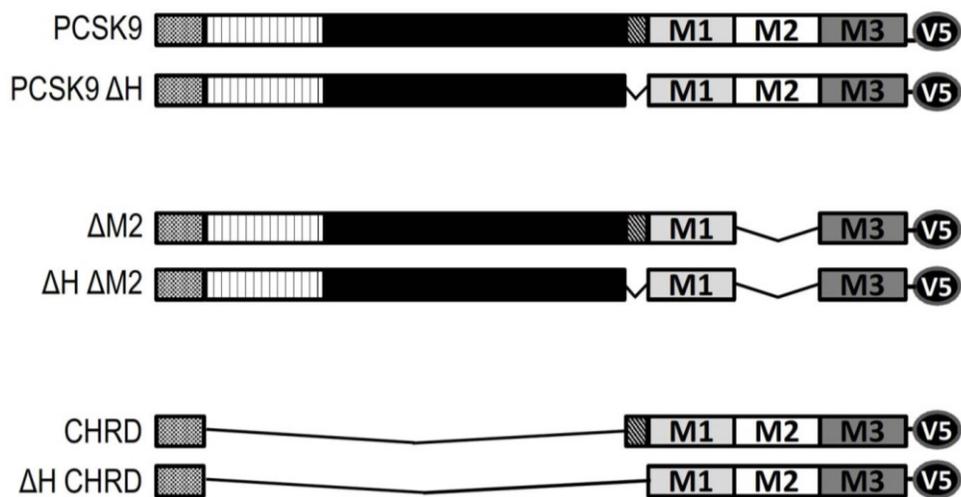
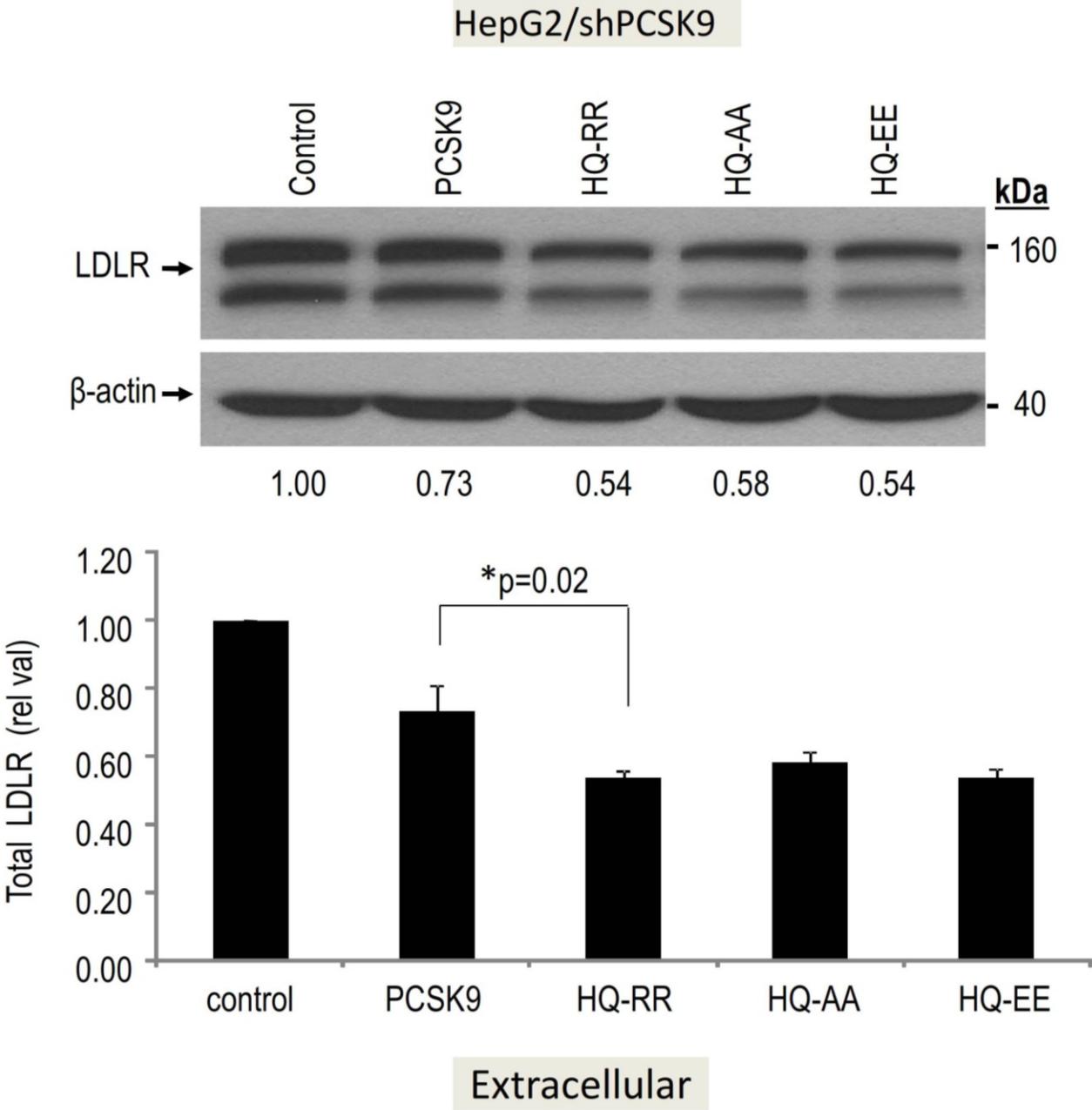


Fig. S7. **Impact of basic residues in the M2 module on the extracellular activity of PCSK9.** Total LDLR levels were evaluated by Western blot analysis following 4h incubation of HepG2/shPCSK9 cells with WT PCSK9 or its M2-mutants HQ553,554RR (HQ-RR), HQ553,554AA (HQ-AA), HQ553,554EE (HQ-EE), mutants obtained from the conditioned media of HepG2/shPCSK9 cells expressing these constructs. These data are representative of two independent experiments. Statistical significance was only found for the HQ-RR *versus* the WT PCSK9 sequence (*p=0.02).



SUPPLEMENTAL TABLE 1

The forward and reverse oligonucleotide sequences used to generate by PCR the various PCSK9 CHR1 module deletants and the Δ hinge constructs.

Constructs	Forward primer	Reverse primer
PCSK9 Δ M1	5'-GGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGG-3'	5'-GGCCTGGGGACCTGCCCCATGGG-3'
	5'-CATGGGGCAGGTCCCCAGGCCAACTGC-3'	5'-CGCACACCGGCCTTATTCCAAG-3'
PCSK9 Δ M2	5'-AGGGTGCCAGCATGCGCAG-3'	5'-TCCAGACCTGGCTGGGGTAGCAGGCAG-3'
	5'-CTACCCAGCCAGGTCTGGAATGC-3'	5'-CGCACACCGGCCTTATTCCAAG-3'
PCSK9 Δ M3	5'-GGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGG-3'	5'-GGCTTACCGGTACCTGGGGCATGGCAG-3'
PCSK9 Δ M12	5'-AGGGTGCCAGCATGCGCAG-3'	5'-TCCAGACCTGGACCTGCCCCATGGG-3'
	5'-CATGGGGCAGGTCCAGGTCTGGAATGC-3'	5'-CGCACACCGGCCTTATTCCAAG-3'
PCSK9 Δ M13	5'-AGGGTGCCAGCATGCGCAG-3'	5'-GGCCTGGGGACCTGCCCCATGGG-3'
	5'-CATGGGGCAGGTCCCCAGGCCAACTGC-3'	5'-GGCTTACCGGTACCTGGGGCATGGCAG-3'
PCSK9 Δ M23	5'-CTACCAAGATCCTGCATG-3'	5'-GGCTTACCGGTCTGGGGTAGCAGGCAG-3'
PCSK9 Δ H from PCSK9 WT	5'-GGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGG-3'	5'-GGCCACCAGTTTGGCAGAGAAGTGGATCAG -3'
	5'-CTCTGCCAAACTGGTGGCCGCCC-3'	5'-CGCACACCGGCCTTATTCCAAG-3'
PCSK9 Δ H Δ M2 from PCSK9 Δ M2	5'-GGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGG-3'	5'-GGCCACCAGTTTGGCAGAGAAGTGGATCAG -3'
	5'-CTCTGCCAAACTGGTGGCCGCCC-3'	5'-CGCACACCGGCCTTATTCCAAG-3'
Δ H CHR1 from CHR1	5'-GGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGG-3'	5'-GGCCACCAGTTTGGCAGAGAAGTGGATCAG -3'
	5'-CTCTGCCAAACTGGTGGCCGCCC-3'	5'-CGCACACCGGCCTTATTCCAAG-3'

DISCUSSION

La fonction d'une protéine est conférée par sa structure tridimensionnelle. Ainsi, l'ordre et la nature des acides aminés qui composent sa séquence dictent l'organisation du repliement de la chaîne et la formation des regroupements ordonnés et distinctifs au sein même de la molécule. Ces régions distinctes peuvent avoir d'une part, un **rôle de soutien** structurel pour assurer le maintien de la conformation optimale de la molécule biologique ou d'autre part, peuvent avoir un **rôle fonctionnel** indépendant qui serait utile au niveau d'une étape spécifique d'action de celle-ci. Ainsi, les données cristallographiques correspondant à la structure de la PCSK9 permirent la visualisation de trois domaines distincts composant cette convertase (prodomaine, domaine catalytique, domaine CHRD; Figure 47). Le domaine en C-terminal se distingue des deux autres car il démontre une organisation particulière en trois sous-domaines ou modules (M1, M2 et M3; Figure 47) (Cunningham et al., 2007; Hampton et al., 2007; Piper et al., 2007). De plus, il s'avère que son absence complète n'affecte pas la liaison de la PCSK9 à son ligand LDLR (Zhang et al., 2007). Par contre, sa délétion n'est pas sans conséquences et comme toute fonction est liée à une structure, la perte du domaine CHRD abolit la capacité de la PCSK9 d'acheminer le ligand vers la dégradation (Benjannet et al., 2010; Zhang et al., 2008).

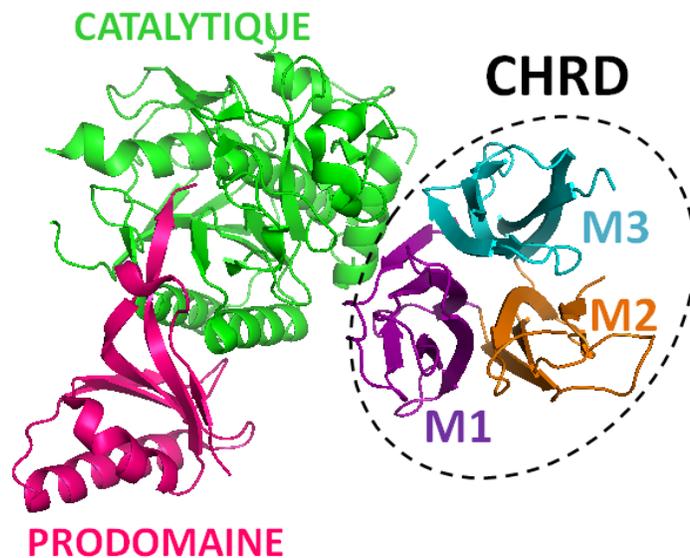


Figure 47: Schéma de la structure moléculaire de la PCSK9 détaillant les modules M1, M2 et M3 composant le domaine CHRD.

Au début de ma thèse, peu de données étaient disponibles sur l'implication du CHRDR dans les étapes subséquentes à la liaison, soit l'internalisation et la dégradation du complexe. Notre travail permet ainsi d'élargir les connaissances concernant ce domaine de la PCSK9.

Effet de la dissection du CHRDR sur l'activité de la PCSK9 humaine:

Nous avons procédé à l'étude du domaine CHRDR par la dissection d'un ou deux modules à la fois ('*délétants*') afin de vérifier l'effet de leur absence sur l'activité de la PCSK9. Nos observations révèlent que la délétion des modules n'affecte pas l'expression de la protéine. De plus, les variants de PCSK9 ainsi tronqués en C-terminal s'autoclivent normalement ('activation') entre leur prodomaine et leur domaine catalytique tout comme le fait la PCSK9 délétée de son domaine CHRDR complet (PCSK9 Δ CHRDR). Ceci confirme que le domaine CHRDR n'est pas requis dans le processus d'autoclivage intramoléculaire de la protéine. Bien que ce dernier ne semble pas affecter l'activation de la PCSK9, la dissection des modules semble influencer le trafic intracellulaire de la convertase dans la voie de sécrétion. Ainsi, nos observations de la colocalisation des délétants avec des protéines du réticulum endoplasmique (PDI) ou de l'appareil de Golgi (TGN46) ont révélé que seulement trois (Δ M2, Δ M12, Δ M23) des six, suivaient un trafic comparable à la PCSK9 de type sauvage tandis que les trois autres (Δ M1, Δ M3, Δ M13) restaient majoritairement trappés au niveau du réticulum endoplasmique. Curieusement, les trois délétants sécrétés avaient un point en commun, l'absence du module M2.

Nous avons alors évalué l'activité fonctionnelle des délétants. En premier lieu, nous avons procédé à la surexpression de ces derniers dans des cellules HepG2/shPCSK9 (dépourvues de PCSK9 endogène). Nos résultats montrent que parmi tous les variants de PCSK9 délétées d'un ou des deux modules, seule la PCSK9 Δ M2 a maintenu la capacité d'induire la dégradation du LDLR total comparable à la PCSK9 pleine longueur. De plus, la voie de dégradation entreprise par ces dernières (PCSK9 Δ M2, PCSK9) semble être identique et se passe dans un compartiment 'acide' puisque le traitement des cellules avec un agent lysosomotropique (NH₄Cl) qui augmente le pH (acide) des endosomes tardifs/lysosomes inhibe la dégradation du LDLR total induit par la PCSK9 ou par la PCSK9 Δ M2. Il est à noter que malgré la plus basse expression de PCSK9 Δ M2 comparée à PCSK9 (forme sauvage) les deux formes semblent avoir une activité intracellulaire

similaire (voir Figure 3 de l'article 2). À ce stade, nos observations convergeaient vers l'hypothèse que le module M2 est "facultatif" à la **maturation, l'activation et à la fonction** de la PCSK9.

Puisqu'il est maintenant bien décrit que la PCSK9 peut agir aussi bien par une voie intracellulaire qu'extracellulaire (Poirier et al., 2009; Qian et al., 2007), nous avons poursuivi notre étude par l'évaluation de **l'activité extracellulaire** des trois délétants sécrétés (Δ M2, Δ M12, Δ M23). Nous avons incubé des cellules dépourvues de PCSK9 endogène (HepG2/shPCSK9) avec des concentrations égales de PCSK9, PCSK9 Δ M2, Δ M12 ou Δ M23. Nos résultats montrent que contrairement à la PCSK9 pleine longueur, tous les délétants présentent une perte de fonction, incluant étonnamment la **PCSK9 Δ M2** qui avait pourtant démontré une activité comparable à la PCSK9 sauvage lorsqu'exprimée par voie intracellulaire. Nous avons alors soumis les cellules à des concentrations croissantes de PCSK9 Δ M2 extracellulaire afin d'augmenter les chances d'observer un effet sur la dégradation du LDLR. Ces expériences confirment la perte de fonction de ce délétant. Nous avons ainsi démontré que le module M2 n'est pas "facultatif" mais qu'il joue un rôle déterminant dans la fonction de la PCSK9 via sa voie d'action extracellulaire. Les résultats précédents nous ont amené à nous demander à quel niveau du processus (liaison/internalisation/dégradation), l'absence du module M2 bloque l'action de la PCSK9? Tout d'abord, la probabilité que ce soit au niveau de l'étape de **liaison** est faible. Ainsi, plusieurs équipes ont confirmé que la région responsable d'initier la liaison avec le LDLR était le domaine catalytique de la PCSK9 (Fisher et al., 2007; Kwon et al., 2008; Zhang et al., 2007). De plus, des études de liaison *in vitro* (co-immunoprécipitation) ont révélé que le domaine CHRD n'était pas impliqué directement dans cette liaison puisqu'il était incapable de lier l'ectodomaine du LDLR contrairement à la PCSK9 Δ CHRD ou la PCSK9 de type sauvage (Zhang et al., 2008). Seulement deux études proposent l'implication du domaine CHRD dans la stabilisation de la liaison avec le LDLR (Tveten et al., 2012; Yamamoto et al., 2011). Cependant, ceci s'applique lorsque le complexe se trouve en milieu acide, ce qui n'est pas le cas dans le contexte physiologique où la PCSK9 plasmatique (extracellulaire) lie le LDLR à la surface des cellules à pH neutre. Finalement, les données structurales provenant de la co-cristallisation de l'ectodomaine du LDLR avec la PCSK9 à pH neutre (pH=7.0) ne démontrent aucune région de rapprochement (ou zone de liaison possible) entre le

domaine CHRD de la PCSK9 avec le LDLR (Lo Surdo et al., 2011). Par conséquent, ces informations suggèrent que le rôle du module M2 dans la fonction de la PCSK9 intervient dans les étapes ultérieures à la liaison.

Dans la suite de notre étude, nous nous sommes donc intéressés à explorer les étapes d'internalisation et de dégradation. Tout d'abord, nous avons suivi l'**internalisation** du complexe par la colocalisation de la PCSK9 et du LDLR dans les cellules à différents temps par microscopie confocale. Nos observations révèlent qu'en fonction du temps (0, 60 et 180 minutes), les deux protéines [PCSK9 et LDLR] ou [PCSK9 Δ M2 et LDLR] colocalisent et sont internalisées dans la cellule de façon comparable. Ces observations indiquent que l'absence du module M2 dans le domaine C-terminal de la PCSK9 n'empêche pas le complexe d'être internalisé. De plus, nous fîmes la même constatation avec la PCSK9 Δ CHRD (L455X) qui forme aussi un complexe avec le LDLR de surface et est également internalisé par la cellule. Ceci fut la première évidence, à notre connaissance, démontrant l'internalisation de la PCSK9 dépourvue de son domaine CHRD (PCSK9 Δ CHRD) en colocalisation avec le LDLR. L'ensemble de ces observations nous a alors orientés vers l'hypothèse que la fonction prédominante du domaine CHRD devait intervenir lors de l'étape de dégradation du complexe tout comme le blocage de l'action extracellulaire de la PCSK9 Δ M2.

Importance du module M2 lors de l'étape de dégradation

Sur la base des nos résultats précédents, il apparaît clairement que le module M2 est une région clé qui semble facultative pour l'action de la PCSK9 via la voie intracellulaire mais indispensable dans la voie extracellulaire. Les données cristallographiques concernant le domaine CHRD suggèrent aussi que le module M2 possède des caractéristiques distinctes comparativement aux deux autres modules M1 et M3. En effet, les structures de PCSK9 obtenues à différents pH mettent en évidence la mobilité particulière du module M2 puisqu'il est visible à pH= 7.8 (Piper et al., 2007) mais invisible à pH=4.8 (Kwon et al., 2008) (Figure 48) résultat d'une mobilité accrue dans un environnement acide comme celui retrouvé dans les endosomes tardifs/lysosomes où vraisemblablement l'étape de dégradation a lieu.

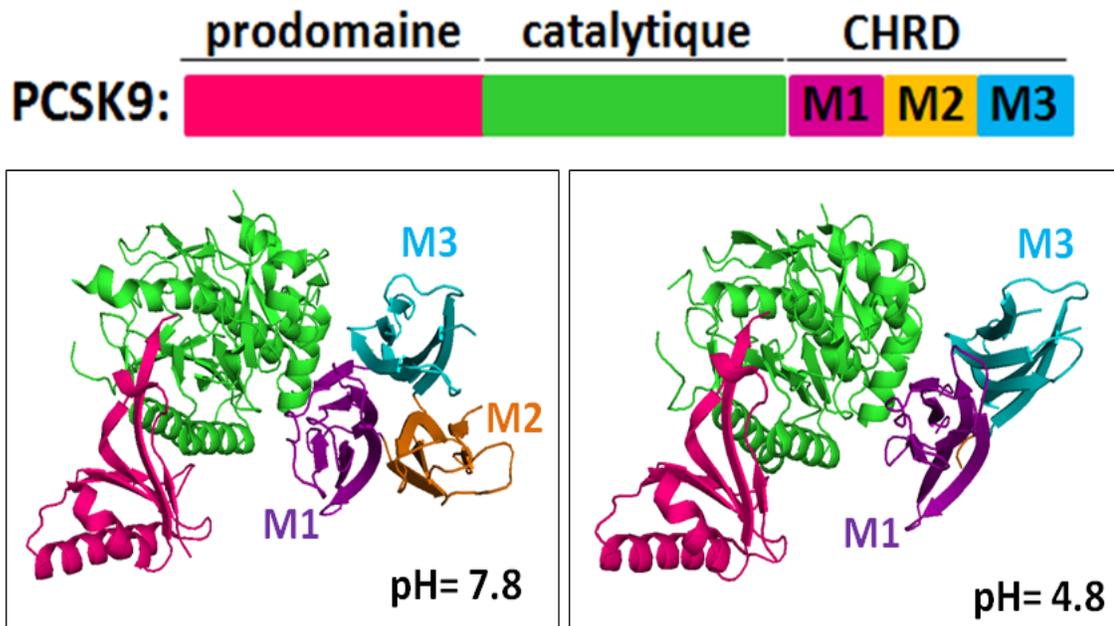


Figure 48: Mobilité du module M2 du domaine CHRD en fonction du pH (PDB : 2PMW; 3BPS)

De plus, il a été démontré que le module M2 possède non seulement la majorité des résidus histidines (9 des 14) présents dans le domaine CHRD mais également que ceux-ci sont regroupés à l'intérieur d'une cavité présente dans la structure du module (Piper et al., 2007). Il est intéressant de préciser que les histidines possèdent la propriété de changer de charge en fonction du pH environnant. Ainsi, les diminutions de pH qui ont lieu lors du passage du complexe PCSK9=LDLR à travers la voie d'endocytose (surface cellulaire → endosomes → endosomes tardifs/lysosomes) permettraient de rendre les histidines positivement chargées favorisant la dégradation du complexe. Par conséquent, il est envisageable que le module M2 ait une implication *directe* dans le recrutement des protéases présentes dans les compartiments acides ou *indirecte* par son association avec une protéine-partenaire ("protéine X") impliquée dans le processus de dégradation. Quoi qu'il en soit, l'ensemble des évidences révèlent l'importance du

module M2 comme structure essentielle à la PCSK9 pour qu'elle puisse acheminer efficacement le LDLR à la dégradation par la voie extracellulaire.

Effet des mutations dans le domaine M2:

Les études cliniques ont rapporté plusieurs mutations naturelles de la PCSK9 (Leigh et al., 2009). Parmi celles-ci, seulement deux affectent le module M2 : H553R et Q554E (Kotowski et al., 2006). Il est à noter que ces dernières se localisent dans la même boucle exposée et sont juxtaposées (Figure 49).

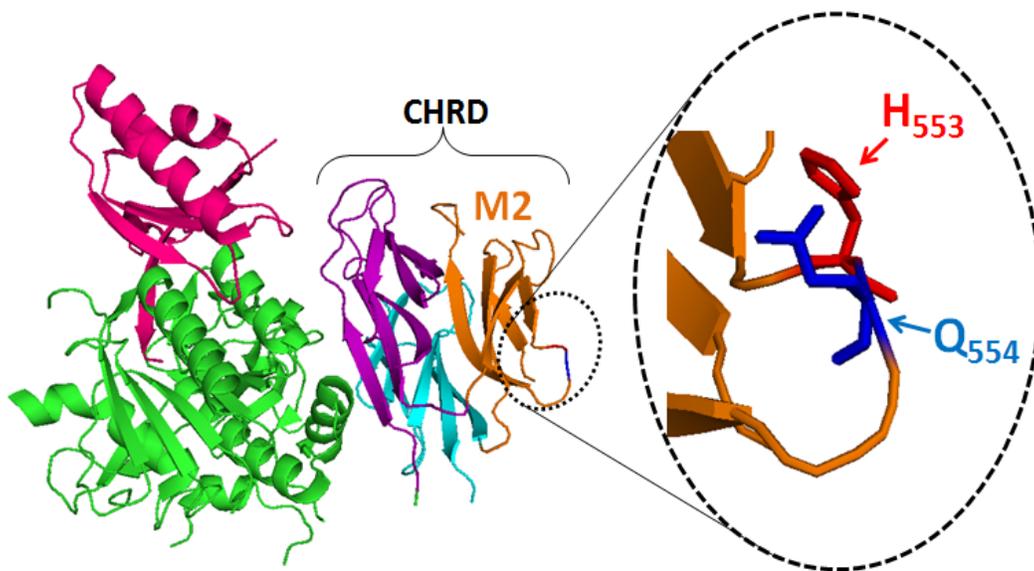


Figure 49: Mutations naturelles du module M2 du domaine CHRd de la PCSK9.

La mutation H553R est associée à un gain de fonction de la PCSK9 tandis que la mutation Q553E est associée, à une perte de fonction. Il apparaît donc que cette boucle est spécialement importante pour le rôle du module M2 au sein de la fonction de la PCSK9. Cependant, comment expliquer que la mutation ponctuelle de deux résidus côte-à-côte puisse ainsi réguler la perte ou le gain de fonction de la convertase? Nous avons mentionné auparavant, que le module M2 possède une "cavité tapissée d'histidines" et il se trouve que cette boucle où les mutations surviennent semble être une sorte "d'entrée" vers cette cavité (Figure 50). Il est intéressant aussi de remarquer l'absence de résidus à

charge négative dans cette zone (VCH₅₅₃Q₅₅₄QGHVLTGC) qui seraient probablement défavorables à l'environnement positif créé par l'ensemble d'histidines en milieu acide.

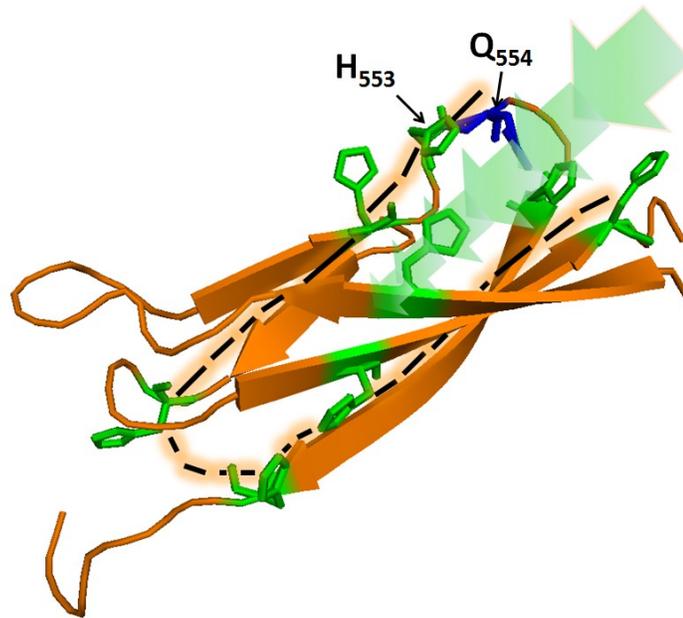


Figure 50: Région formant une ‘cavité’ tapissée des résidus histidine dans le module M2 du CHRD de la PCSK9. En vert : Histidines; en bleu : Glutamine.

Cette région riche en histidines fut déjà soupçonnée d'avoir une fonction propre (Piper et al., 2007). En accord avec cette hypothèse, nous suggérons que cette fonction serait relative à la dégradation du complexe PCSK9=LDLR dans les compartiments acides. Il existe très peu d'exemples des protéines ayant un domaine riche en histidines qui aurait un rôle dans l'étape de dégradation. C'est toutefois le cas pour hZIP4, une protéine transporteur de zinc. Celle-ci possède un domaine riche en histidines, qui fut démontré facultatif pour l'endocytose du transporteur dans les endosomes mais qui est important pour l'étape de dégradation (Mao et al., 2007). Bien que l'étude ait porté sur la voie de l'ubiquitination/protéasome, les auteurs n'écartent pas pour autant la possibilité de la dégradation du transporteur par les lysosomes. Pour aller dans le sens de cette hypothèse, plusieurs études ont montré que le protéasome aurait, outre sa fonction de dégradation, **une fonction dans le ciblage** de certaines protéines (comme les transporteurs qui recyclent dans la cellule) des endosomes tardifs vers les lysosomes (Longva et al., 2002; van Kerkhof et al., 2001; Yu and Malek, 2001). Or la dégradation du complexe

PCSK9=LDLR est pressenti avoir lieu dans ces compartiments. Cependant, il a été démontré par l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome que celui-ci n'était pas responsable de la dégradation directe du complexe (Maxwell et al., 2005). Toutefois, l'exemple de la hZIP4 démontre qu'il peut exister une coopération complexe et "non habituelle" entre le protéasome et les endosomes tardifs/lysosome. Cette collaboration mènerait aussi à la dégradation des protéines. Est-ce que c'est le cas pour la PCSK9? Il est difficile de le dire, puisque la région riche en histidines de la PCSK9, contrairement à la hZIP4, est dirigée en principe vers l'intérieur des endosomes ce qui rend improbable l'interaction avec le protéasome du cytosol. Une hypothèse à tester serait d'évaluer si l'acidité des endosomes tardifs ne produit pas un réarrangement structurel de la PCSK9 conduisant à une exposition de la région riche en histidines vers le cytoplasme et de cette manière le CHRD pourrait interagir avec des protéines-partenaires (protéine X?) afin de déclencher la dégradation du complexe.

Notre travail nous a permis d'émettre l'hypothèse que la **boucle** située à l'entrée de la cavité dans le module M2 devait obligatoirement garder une **charge positive** afin de conserver l'intégrité de l'étape de dégradation. Conséquemment, une mutation telle que Q554E qui génère une perte de fonction de la PCSK9 serait probablement due à l'insertion de la charge négative portée par l'acide glutamique (E) qui a remplacé l'acide aminé neutre glutamine (Q). Étant donné sa localisation à l'entrée de la cavité, on pourrait penser que cela déstabiliserait les premiers points d'interaction des '*protéines partenaires*' présumément négativement chargées et donc induire une perte de fonction de la convertase. Inversement, la mutation Q553R serait plutôt bénéfique à la conservation de la charge de la cavité car en milieu acide (étape de dégradation), toutes les histidines seront chargées positivement. En effet, le remplacement de l'histidine 554 (H) par une arginine (R) chargée positivement (grâce à la présence de son noyau guanidium très basique) maintient la condition électrovalente nécessaire et optimale pour la dégradation. Conséquemment ceci se traduit par un gain de fonction comme constaté lors des études cliniques sur des patients atteints de la mutation H554R (Kotowski et al., 2006). Ces considérations, nous ont amené à tester cette hypothèse en créant des doubles mutations sur la boucle exposée du module M2. Nous avons généré trois double-mutants qui inséreraient des charges neutres (alanines), ou des charges négatives (acides

glutamiques), ou des charges positives (arginines) à l'endroit où les mutations naturelles avaient lieu (Figure 51).

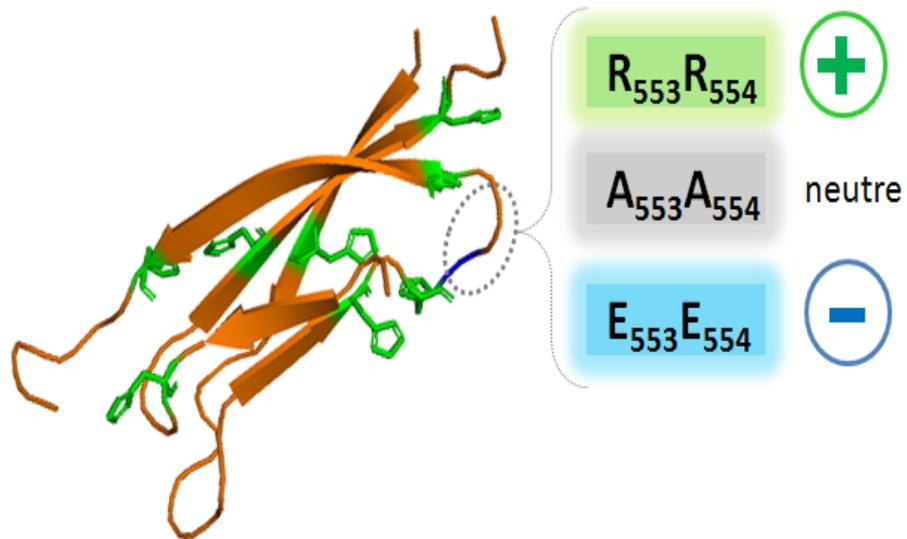


Figure 51: Localisation de l'insertion des double-mutants générés pour l'étude de l'*effet de la charge* sur la boucle exposée du module M2 (R=arginine; A= alanine; E= acide glutamique).

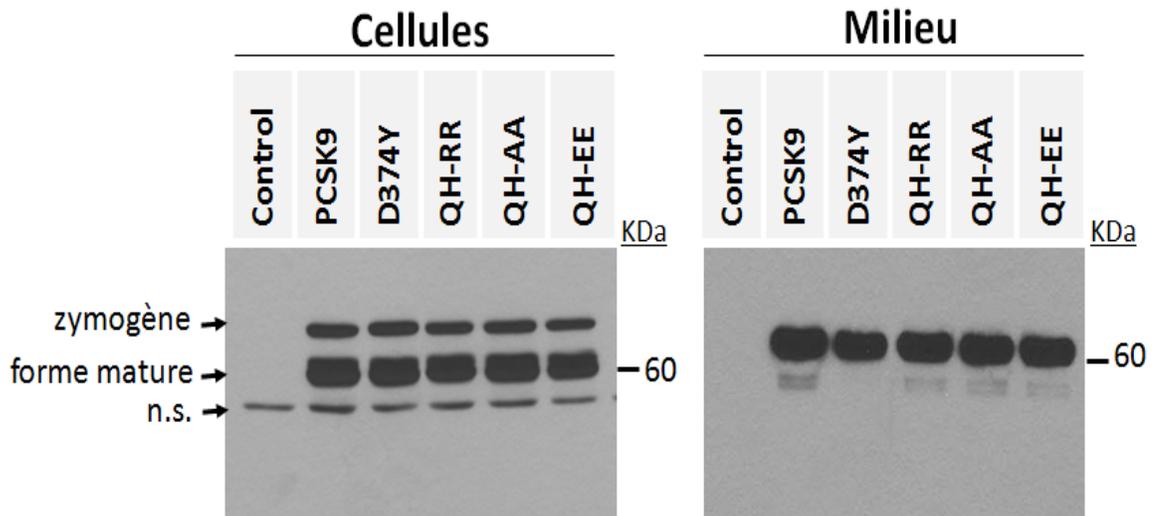


Figure 52: Expression et sécrétion des double-mutants transfectés dans des cellules HEK293 (n.s. = bande non-spécifique).

Nos résultats démontrent que tous les double-mutants sont bien exprimés, correctement autoclivés et que leur sécrétion est comparable à celle de la protéine native (Figure 52). Enfin, lors des essais fonctionnels (dégradation du LDLR) sur les cellules dépourvues de PCSK9 endogène (HepG2/shPCSK9), nous avons observé que l'activité de la PCSK9 H₅₅₃Q₅₅₄-AA portant la charge neutre est comparable à celle de la PCSK9 de type sauvage. Par ailleurs, la PCSK9 H₅₅₃Q₅₅₄-EE, portant la **charge négative**, subit une **perte de fonction** tout comme le mutant naturel Q553E tandis qu'à l'inverse, la PCSK9 H₅₅₃Q₅₅₄-RR, avec la **charge positive**, acquiert un **gain de fonction** sur la dégradation du LDLR. En accord avec nos résultats, l'étude de Holla et al. (2011) démontre que le remplacement des sept histidines localisées dans le module M2 par des résidus lysines (chargés positivement) entraîne un gain de fonction de la PCSK9 et à l'inverse, le remplacement des histidines par des acides glutamiques (chargés négativement) induit une perte de fonction. Cependant, les auteurs de cette étude indiquent également que le remplacement du CHR1 complet par une protéine chargée positivement (*DsRed-Express fluorescent protein*) serait suffisant à la PCSK9 pour compléter avec succès l'étape de dégradation du LDLR. Cette conclusion nous semble un peu simpliste car, bien que nous soyons en accord avec le besoin d'une charge positive au niveau du CHR1, nos observations nous indiquent que l'organisation ainsi que la nature des modules composant le CHR1 est importante pour diriger l'action de la PCSK9 selon différentes voies d'action.

Les évidences expérimentales concernant le lieu d'action de la PCSK9 démontrent que celle-ci achemine le LDLR sous forme de complexe vers la dégradation par des mécanismes qui prennent place dans les compartiments "*post-réticulum endoplasmique*" (Maxwell et al., 2005) via deux voies possibles, la voie extracellulaire (Qian et al., 2007) ou la voie intracellulaire (Poirier et al., 2009). Nos résultats, tout en confirmant l'existence de ces deux voies d'action, révèlent l'implication des différents modules du domaine CHR1 dans ces deux voies. Ainsi, nos résultats démontrent l'importance du module M2 du CHR1 dans la voie extracellulaire, tandis que la présence des modules M1 et M3 est suffisante à la PCSK9 pour qu'elle achemine le LDLR à la dégradation via la voie intracellulaire. Finalement, nos résultats ont été confirmés par une autre étude qui observe également le maintien de la fonction de la PCSK9 délétée de son module M2 (Du et al., 2011).

Influence de la région de liaison “Hinge” dans l’activité de la PCSK9:

Les études structure-fonction se sont surtout penchées sur les trois domaines principaux qui composent la structure de la PCSK9, toutefois il existe aussi une petite région, appelée ‘*Hinge*’, qui fait partie intégrante de la structure et qui constitue la liaison entre le domaine catalytique et le domaine CHRD (Figure 53).

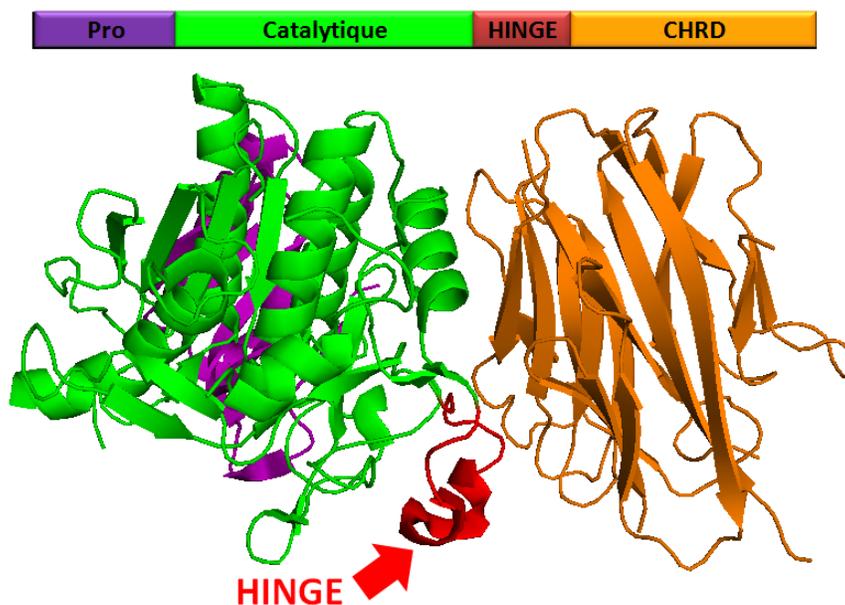


Figure 53: Structure des domaines de la PCSK9. En rouge la région “*Hinge*”

Cette structure, bien que très courte, est importante pour la fonction de la PCSK9. En effet, il a été démontré qu’une seule mutation naturelle (R434W) (Figure 54) affectant cette région avait des répercussions importantes lorsque la convertase agissait par la voie extracellulaire et se traduisait par une perte ~70% de son activité sur le LDLR (Dubuc et al., 2010). Nos résultats de surexpression du mutant R434W, nous indiquent que celui-ci est bien exprimé dans la cellule et s’autoclive aussi bien que la PCSK9 de type sauvage. De plus, la sécrétion n’est pas affectée et nous avons confirmé que la PCSK9 R434W avait aussi perdu son activité vis-à-vis du LDLR par la voie intracellulaire.

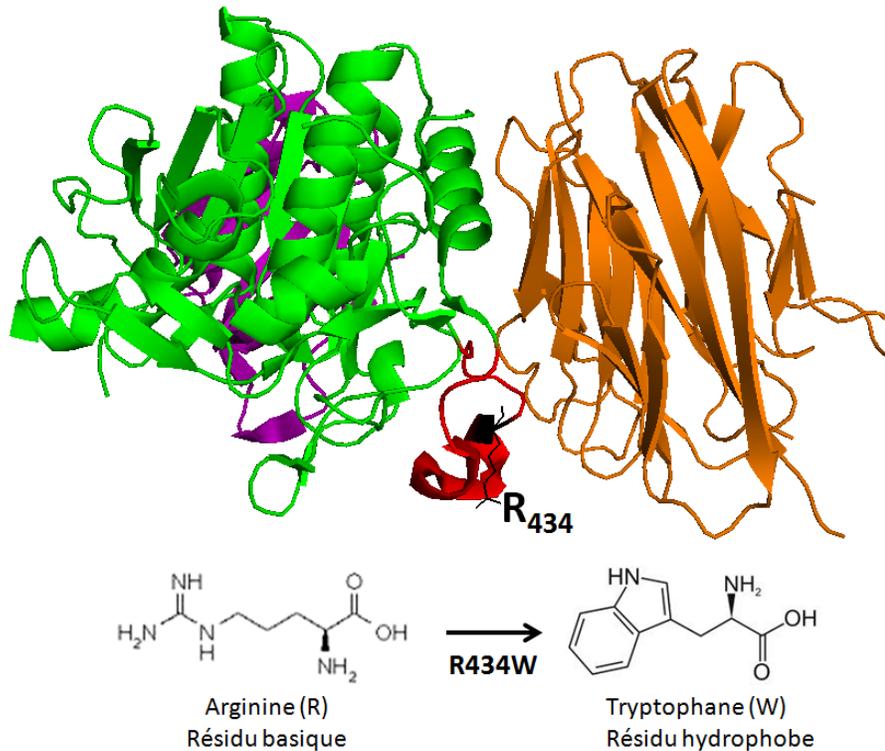


Figure 54: Mutation naturelle R434W dans la région *Hinge* de la PCSK9

Ainsi, la région *Hinge* semble sensible au remplacement du résidu basique arginine 434 (R) par le tryptophane (W) qui porte des cycles aromatiques et qui lui confèrent des propriétés hydrophobes. L'insertion d'un résidu aussi volumineux au sein d'une petite région de liaison comme le *Hinge* nous amène à penser qu'il introduit un encombrement stérique qui serait suffisant pour déstabiliser le positionnement des domaines et en particulier le module CHRD qui est directement lié à l'étape de dégradation du complexe PCSK9≡ LDLR. Nous avons mentionné auparavant que la structure des protéines était composée d'une part, des *domaines* qui pouvaient avoir des fonctions individuelles au sein de la protéine et d'autre part, des *régions* distinctes sans fonction individuelle mais qui agissent en association avec les domaines pour assurer le bon fonctionnement de la molécule. Suite à ces considérations, nous avons émis l'hypothèse que la "région *Hinge*" est une région sans fonction propre mais servant de support structurel pour le maintien de la fonction du domaine CHRD. Nous avons alors testé cette hypothèse et nous avons délété la région *Hinge* (**H**) de la PCSK9 et du délétant PCSK9ΔM2 (fonctionnel uniquement par la voie intracellulaire) afin d'étudier l'effet sur

la maturation et la fonction de la convertase. Nos résultats ont révélé que l'expression et l'autoclivage des variants générés (PCSK9 Δ H, PCSK9 Δ H Δ M2) étaient comparables à celle de la PCSK9 de type sauvage. Toutefois, nous avons observé que l'absence de la région *Hinge* affectait négativement le repliement de la convertase menant à une diminution marquée de la sécrétion des variants Δ H. De plus, la délétion du *Hinge* conduit à la liaison directe du domaine catalytique avec le CHRD et ceci engendre une perte totale d'activité de la PCSK9 Δ H et de la PCSK9 Δ H Δ M2 à induire la dégradation du LDLR. Ces résultats soutiennent notre hypothèse et suggèrent que la région *Hinge* aurait un *rôle de maintien de la structure* afin que les domaines puissent être suffisamment espacés et ainsi probablement bien positionnés pour effectuer efficacement leur fonction.

Le mécanisme exact de dégradation du complexe PCSK9=LDLR n'est toujours pas connu, toutefois notre étude complète les données concernant ce processus en démontrant que les prérequis structuraux pour l'action de la PCSK9 ne sont pas les mêmes selon qu'elle entreprend son action sur le LDLR via la voie intracellulaire ou la voie extracellulaire. Nous avons démontré l'importance du maintien de la région *Hinge*, du module M2 dans la voie extracellulaire ainsi que la boucle exposée donnant accès à la cavité d'histidines. Cibler cette boucle, par l'utilisation des peptides synthétiques bloquants, des petites molécules ou des anticorps monoclonaux contre la boucle, résulterait dans l'abolition de l'activité de la PCSK9 vis-à-vis de la dégradation du LDLR et ceci constitue un attrait important dans le développement des inhibiteurs contre la PCSK9 (plasmatique) en cours de développement afin de contrer l'hypercholestérolémie consécutive à des mutations '*gain de fonction*' de cette convertase.

CHAPITRE IV

PCSK9 Prosegment Chimera as Novel Inhibitors of LDLR Degradation

ARTICLE NO.3

PCSK9 PROSEGMENT CHIMERA AS NOVEL INHIBITORS OF LDLR DEGRADATION

Titre court: *The PCSK9 Prosegment Inhibits its Activity on LDLR*

Yascara Grisel Luna Saavedra, Jianbing Zhang, and Nabil G. Seidah

Affiliations:

- *Y.G. Luna Saavedra et N. G. Seidah*: Laboratoire de Biochimie Neuroendocrinienne, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Avenue des Pins Ouest, Montréal, QC H2W 1R7, Canada affiliés au Département de Biochimie de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, QC, Canada
- *Jianbing Zhang*: Institut des Sciences Biologiques, Conseil National des Recherches Canada, Ottawa, Ontario, K1A 0R6, Canada

Demandes de copies de l'article ou concernant toute autre demande, faire parvenir toute correspondance à:

Dr. Nabil G. Seidah

Clinical Research Institute of Montreal
Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology
110 Pine Ave. West,
Montreal, QC
Canada, H2W 1R7

AVANT-PROPOS

L'hypercholestérolémie est un facteur de risque majeur dans le développement des maladies cardiovasculaires. Ce trouble métabolique affecte un nombre croissant d'individus à travers le monde et est devenu un fléau au niveau de la santé publique. Actuellement, le traitement pour contrer l'hypercholestérolémie se base surtout sur l'utilisation des statines. Ces médicaments "anti-cholestérol" ont eu énormément de succès mais, depuis quelques années, l'apparition des divers effets secondaires commence à inquiéter la communauté médicale et scientifique. Ainsi, la découverte de traitements alternatifs est plus que jamais une nécessité.

La lutte contre l'hypercholestérolémie s'oriente actuellement sur une nouvelle cible d'intervention qui est l'inhibition de l'activité de la PCSK9. En effet, des études cliniques obtenues chez des individus possédant des mutations naturelles sur le gène codant pour la PCSK9, révèlent que la perte de fonction ou l'absence de PCSK9 circulante dans le plasma est associée à des niveaux bas de "mauvais cholestérol" sanguin (diminution des particules de LDL). Cet effet réduit largement le risque de développer une maladie cardiovasculaire et encourage par conséquent, la recherche des inhibiteurs de la PCSK9.

L'isolation et la production des prodomaines des proprotéines convertases telles que la furine, PC1/3 ou PC7, ont servi comme petites protéines inhibitrices de leurs propres convertases *in vitro* et *ex vivo* (Boudreault et al., 1998; Zhong et al., 1999). Sur cette base, nous nous sommes questionnés à savoir si le prodomaine de la PCSK9 pouvait, à son tour, servir d'inhibiteur de l'action de la PCSK9 sur le LDLR. L'analyse des données structurales provenant de la cristallisation de la PCSK9 ne révèlent pas toute la structure de son prodomaine. Nous avons donc entrepris la production du prodomaine seul. J'ai réussi à purifier le prodomaine mais il s'est avéré très difficile d'obtenir des quantités suffisamment grandes pour procéder à des analyses physico-chimiques ou pour le tester comme inhibiteur dans des essais fonctionnels, étant donné qu'il s'accumule dans les cellules et que sa sécrétion est très faible. Toutefois, nous avons contourné le problème en fusionnant le prodomaine à la fraction cristallisable de l'immunoglobuline humaine IgG1 pour produire une protéine chimère appelée **Fcpro**. Cette stratégie nous a

permis de produire et de tester la capacité inhibitrice du prodomaine sur l'activité de la PCSK9. Nos résultats ont démontré que la chimère Fcpro inhibait efficacement la dégradation du LDLR induite par la PCSK9 autant par la voie intracellulaire qu'extracellulaire. Nous proposons dans ce troisième article, une nouvelle stratégie de développement des inhibiteurs de la PCSK9 basés sur la propriété de son prodomaine à agir en tant que régulateur négatif de l'activité de la PCSK9.

MANUSCRIT 3

PCSK9 Prosegment Chimera as Novel Inhibitors of LDLR Degradation

Yascara Grisel Luna Saavedra¹, Jianbing Zhang², Nabil G. Seidah^{1*}

1 Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, affiliated to the Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, **2** Institute for Biological Sciences, National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, Canada

Abstract

The proprotein convertase PCSK9, a target for the treatment of hypercholesterolemia, is a negative regulator of the LDL receptor (LDLR) leading to its degradation in endosomes/lysosomes and up-regulation of plasma LDL-cholesterol levels. The proprotein convertases, a family of nine secretory serine proteases, are first synthesized as inactive zymogens. Except for PCSK9, all other convertases are activated following the autocatalytic excision of their inhibitory N-terminal prosegment. PCSK9 is unique since the mature enzyme exhibits a cleaved prosegment complexed with the catalytic subunit and has no protease activity towards other substrates. Similar to other convertases, we hypothesized that the *in trans* presence of the PCSK9 prosegment would interfere with PCSK9's activity on the LDLR. Since the prosegment cannot be secreted alone, we engineered a chimeric protein using the Fc-region of human IgG1 fused to the PCSK9 prosegment. The expression of such Fcpro-fusion protein in HEK293 and HepG2 cells resulted in a secreted protein that binds PCSK9 and markedly inhibits its activity on the LDLR. This was observed by either intracellular co-expression of PCSK9 and Fcpro or by an extracellular *in vitro* co-incubation of Fcpro with PCSK9. Structure-function studies revealed that the inhibitory function of Fcpro does not require the acidic N-terminal stretch (residues 31–58) nor the C-terminal Gln₁₅₂ of the prosegment. Fcpro likely interacts with the prosegment and/or catalytic subunit of the prosegment=PCSK9 complex thereby allosterically modulating its function. Our data suggest a novel strategic approach for the design and isolation of PCSK9 inhibitors.

Citation: Luna Saavedra YG, Zhang J, Seidah NG (2013) PCSK9 Prosegment Chimera as Novel Inhibitors of LDLR Degradation. PLoS ONE 8(8): e72113. doi:10.1371/journal.pone.0072113

Editor: Maria Cristina Vinci, Cardiological Center, Italy

Received: June 4, 2013; **Accepted:** July 9, 2013; **Published:** August 12, 2013

Copyright: © 2013 Luna Saavedra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by CIHR grants MOP-102741 and CTP-82946, a Strauss Foundation grant, and a Canada Chair # 216684. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The mammalian proprotein convertases (PCs) [1] are members of a secretory serine protease family composed of nine members related to bacterial subtilisin and yeast kexin. Seven of these (PC1/3, PC2, Furin, PC4, PC5/6, PACE4 and PC7) exhibit homology of their catalytic domain to that of yeast kexin, and are known to cleave after basic residues. The eighth member, SKI-1/S1P, shows homology to bacterial pyrolysin and cleave after non-basic residues. Finally, the last member, PCSK9, shows homology to fungal proteinase K and cleaves itself once in the endoplasmic reticulum at the (V/I)FAQ↓ motif. Like many other proteases, these convertases are synthesized as inactive zymogens. Their prosegment located at their N-terminus is implicated in the productive folding of the enzyme and in its stabilization as an inactive form, like a natural inhibitor, until one or more cleavages occur followed by the release of the active enzyme dissociated from its prosegment [2].

Five PCs regulate sterols and/or lipid metabolism (Furin, PC5/6, PACE4, SKI-1/S1P and PCSK9). Among these, the gene coding for convertase PCSK9 [3] was discovered to be the third locus implicated in Familial Hypercholesterolemia (FH3) [4]. Since 2003, *in vitro* and *in vivo* studies unraveled the physiological roles of PCSK9 in the regulation of the cholesterol and fatty acid metabolism. PCSK9 is highly expressed in liver hepatocytes and is first synthesized as a pre-proprotein convertase. During its passage

through the secretory pathway and at the level of the endoplasmic reticulum (ER), the zymogen gets autocatalytically cleaved at VFAQ₁₅₂↓SIP separating its prosegment from the catalytic domain. The cleaved C-terminus of the prosegment then occupies the catalytic pocket of the enzyme and blocks access to other exogenous substrates [5–7]. The complex prosegment=PCSK9 (herein abbreviated pPCSK9) then exits the ER and reaches the Golgi apparatus leading to its rapid secretion into the medium [3] or in plasma. Through its catalytic domain, mature PCSK9 binds the EGF-A domain of the LDL receptor (LDLR) [8] both intracellularly in the TGN [9] and at the cell surface [10]. Once the non-covalent complex pPCSK9=LDLR is formed, it gets internalized by endocytosis and directed to degradation in the acidic compartments of endosomes/lysosomes [11,12] by an as yet unknown mechanism. Thus, PCSK9 acts as a negative regulator of the cellular LDLR protein by preventing its recycling to the cell surface. This down-regulation and the subsequent accumulation of LDL particles (LDLR natural ligand) in plasma lead to hypercholesterolemia. LDL particles being atherogenic, they obstruct the luminal side of vessels resulting in vascular complications such as atherosclerosis, stroke and premature heart attacks [13].

Since the worldwide discovery of individuals harboring natural mutations of PCSK9, clinical studies have established a causative association between “gain of function” (GOF) mutations with hypercholesterolemia [4] and “loss of function” (LOF) mutations

with hypocholesterolemia [14]. Moreover, the identification of two seemingly healthy individuals carrying LOF mutations in both alleles, which lead to a complete absence of circulating PCSK9 and correlating with very low plasma LDL-cholesterol levels was a major breakthrough that encouraged the scientific community to develop PCSK9 inhibitors as a novel treatment of hypercholesterolemia [1].

As for all members of the proprotein convertase family, the zymogen of PCSK9 has a prosegment located at the N-terminus followed by a subtilisin-like catalytic domain and a C-terminal segment. The prosegment itself serves as intramolecular chaperone ensuring the correct folding of the enzyme during the maturation process. Consistently, such zymogens undergo an intramolecular cleavage between their prosegment and their catalytic domain followed, in most cases, by a second cleavage within the prosegment. This allows the convertases to get rid of their inhibitory prosegment and the generation of an active protease. One of the peculiarities of PCSK9 compared to other convertases is its inability to get rid of its prosegment. In fact, immediately after the first intramolecular cleavage in the ER, the C-terminal extremity of the prosegment binds tightly to the catalytic pocket. As suggested by X-ray structure studies [5–7], the prosegment acts as a “specific inhibitor” of PCSK9 preventing any further enzymatic activity. Since we previously demonstrated that the prosegments of the PCs can act as potent inhibitors of these convertases both *in vitro* and *ex vivo* in cell lines [15], we hypothesized that the PCSK9 prosegment may also function as an effective inhibitor blocking the activity of the pPCSK9 on LDLR degradation. If true, ultimately this would represent a novel strategy to inhibit PCSK9 function and hence increase cellular LDLR levels.

In the present study we generated a recombinant chimeric protein called Fcpro by taking advantage of the growing class of human therapeutics consisting in the use of the constant Fc domain of the human immunoglobulin G (hIgG1) to build stable recombinant fusion proteins. Herein, we provide evidence that when fused to an Fc fragment such chimeric PCSK9 prosegment (Fcpro) can be well expressed and secreted. We also show that the recombinant Fcpro protein is able to directly bind PCSK9 and block its activity towards the degradation of the LDLR by an intracellular manner as shown by our co-expression experiments or by an extracellular route when both proteins are co-incubated. The interaction of recombinant Fcpro with wild type PCSK9 or its gain-of-function mutants resulted in a recovery of the cellular LDLR levels.

Materials and Methods

Plasmids and reagents

Human PCSK9 and its mutant cDNAs (L455X, CHR1, D374Y, Δ 33–58, Δ 33–58 D374Y) were cloned into pIRES2-EGFP (Clontech, Mountain view CA) as described [3,12]. Human HepG2/shPCSK9 cells essentially lacking endogenous PCSK9 [16] and HEK293 cells (American Type Culture Collection) were cultivated in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent). Puromycin (2 μ g/mL; Invitrogen) was added only to HepG2/shPCSK9 cells as a selection antibiotic. Lipoprotein deficient serum (LPDS) was from Biomedical technologies.

cDNA constructs

The construct pIRES2-EGFP-human PCSK9-V5 (C-terminal V5-tag) [3] was used as a template to generate cDNAs coding for human PCSK9 mutants. Two-step PCRs were used to introduce

deletion mutants as described previously [11]. All constructs contain a V5 tag at the C-terminus. The cDNA coding for the Fcpro recombinant protein (*alias* pTT5-Fc1_hPSM) was generated as described [17]. Briefly, a vector pTT5-hFc2 was first constructed to facilitate the insertion of human prosegment of Fc of human IgG1 of pTT5-hFc11 vector to introduce restriction sites of NsiI and HindIII without changing the amino acid sequence of Fc, generating vector pTT5-hFc2. DNA coding for the prosegment of PCSK9 (amino acid, aa 31–152) was synthesized at GeneArt, to which hinge region of human IgG1 was added at the N-terminus and NsiI and HindIII restriction sites were introduced using standard PCR technique. The fragment was subsequently cloned into pTT5-hFc2, which resulted in pTT5-Fc1_hPSM (Fcpro), an expression vector of a fusion protein consisting of Fc of human IgG1, hinge range of human IgG1 and PCSK9 prosegment (pro). This arrangement is made based on the consideration that the C-terminus of human prosegment should be left free to allow its binding to human PCSK9. Human Fc was included to extend the likely short serum half life of human PCSK9’s prosegment, and the hinge range was included to allow free movement of the prosegment. All constructs were confirmed by DNA sequencing.

Cell culture and transfections

HepG2/shPCSK9 cells were seeded at 1×10^5 cells/well in a 12 well microplate (Greiner Bio-One). After 24 h, the cells were transfected with 1 μ g cDNAs using Fugene HD (Roche Applied Science), and 24 h post-transfection, the cells were washed and then incubated with fresh DMEM medium without serum for an additional 24 h before recovering media and cells.

Preparation of conditioned media

HEK293 or HepG2/shPCSK9 cells were seeded at 2×10^6 cells/100 mm petri dish coated with poly-L-Lysine (Invitrogen) and were transfected with a total of 4 μ g of cDNA using Effectene (Qiagen) or Fugene HD (Roche) respectively. At 24 h post-transfection, the cells were washed and incubated with serum free media. Conditioned media were recovered 72 h post-transfection. The spent media were then concentrated on an Amicon Ultra-15 centrifugal filter unit with a 10 kDa membrane cutoff (Millipore). Concentrated V5-tagged PCSK9, its derivatives, Fc and Fcpro in conditioned media were quantitated by direct enzyme-linked immunosorbent assay detecting V5-tagged or Fc-proteins (R961-25, Invitrogen; AP113P, Millipore).

Media transfer experiments

HepG2/shPCSK9 cells were seeded in a 12-well microplate at 3×10^3 cells/well (Greiner Bio-One). After an overnight incubation, cells were washed and incubated in LPDS media (Dulbecco’s phosphate-buffered saline (DPBS; Invitrogen), 0.1% sodium pyruvate (Invitrogen) and 5% lipoprotein-deficient serum (Biomedical Technologies Inc). Following 24 h incubation, media were replaced by conditioned media containing PCSK9 or its mutants at a final concentration of 1.5 μ g/ml. After 4 h incubation at 37°C, cells were lysed in $1 \times$ RIPA buffer and then analyzed.

Western blot analyses

Cells were recovered 48 h post-transfection, and lysed in $1 \times$ RIPA buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS supplemented with $1 \times$ complete protease inhibitor mixture

(Roche Applied Science)). Proteins in the cell lysates and media were resolved by 12% Tris- Glycine SDS-PAGE. The gels were blotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF, Perkin Elmer Life Sciences) membranes (GE Healthcare), blocked for 1 h in TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) containing 5% nonfat milk and immunoblotted with a homemade polyclonal human PCSK9 antibody (1:1000) [12], human LDLR antibody (1:1000, R&D Systems), beta-Actin (1:5000; Sigma), monoclonal antibody (mAb) V5-HRP (1:5000; Sigma), PCSK9 prosegment antibody (1:1000; GenScript); Fc-HRP (1:10000; Cedarlane Millipore). Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:10000, Sigma) were used for detection with enhanced chemiluminescence using the ECL Plus kit (GE Healthcare). Quantification of protein bands was obtained using Image J software.

Far western analyses

Two microgram of Fc-, Fcpro- or Fcpro QH-containing conditioned media were heated in reducing Laemmli sample buffer, resolved by SDS-PAGE on 10% tris-glycine gels, and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF, Perkin Elmer Life Sciences) membranes (GE Healthcare). Membranes were incubated for 1 h with 5% no fat milk in Tris-buffered saline, 0.1% Tween (TBST), the membranes were then incubated with conditioned medium produced in HepG2/shPCSK9 cells over-expressing either an empty vector (pIRES-V5), PCSK9-V5 or incubated with purified PCSK9 protein for 3 h at 4°C. The membranes were then washed in TBST and incubated with the polyclonal anti-human PCSK9 homemade antibody [12] or with an HRP conjugated anti-IgG1 Fc antibody. The bands were revealed by enhanced chemiluminescence (GE Healthcare).

Results

Expression and secretion of recombinant Fcpro protein

Transient transfection of a cDNA coding for the prosegment alone in HEK293 or in HepG2 cells confirmed its inability to exit the cells, as previously observed [18]. We first attempted to produce a N-terminal His-tagged PCSK9 prosegment by cloning the cDNA coding for aa 31–152 into the pET16b vector and transforming the construct into the bacterial expression host BL21(DE3). After screening transformants, testing protein production, scaling-up and purification of the His-tagged PCSK9 prosegment, we end up with a very poor production level after dialysis and concentration of 10 L batches, with a total yield of ~65 µg of pure protein/L (*not shown*). To circumvent this poor yield, we fused the Fc fragment of human immunoglobulin IgG1 with the N-terminus of the hPCSK9 prosegment (aa 31–152), resulting in an Fcpro chimera ending at natural C-terminus Gln₁₅₂ of the prosegment (Figure 1A). Transient transfection of this recombinant Fcpro protein in HEK293 cells (Figure 1B) or HepG2/shPCSK9 cells (lacking endogenous PCSK9 [16]) resulted in a well expressed and secreted Fcpro protein. At 72 h post-transient transfection, we also measured the level of secreted Fcpro by direct-ELISA and found an average production yield of ~4 µg/ml (~4 mg/L). Upon incubation of the membrane with the secondary antibody recognizing Fc regions, we observed in the media a protein band corresponding to that of the control Fc protein alone (~25 kDa), with much lower levels seen in cell lysates, likely due to an efficient secretion, as expected [19]. Interestingly, the Fcpro protein was also well secreted (~40 kDa) but less so than the Fc alone, as a significant portion is retained in the cells (Figure 1B).

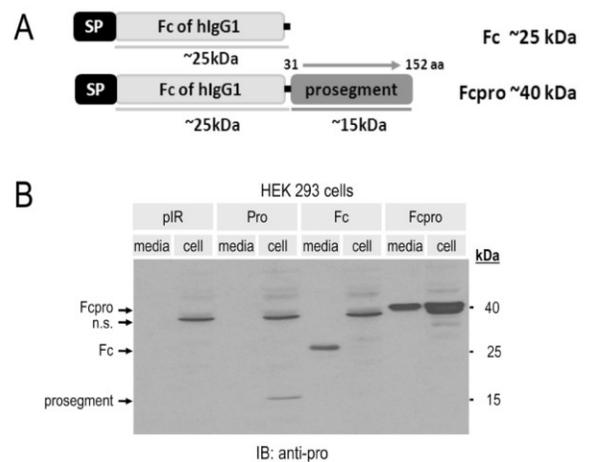


Figure 1. Expression and secretion of Fcpro chimera. A) Schematic representation of Fc and Fcpro constructs. SP: signal peptide. Prosegment: human PCSK9 aa 31 to 152. B) HEK293 cells transiently transfected with cDNAs encoding either *pIR*: control empty pIRES vector; *Pro*: PCSK9 prosegment; *Fc*: human IgG1 fragment crystallizable region; *Fcpro*: Fc fraction fused to PCSK9 prosegment. 48 h post-transfection, proteins in cell lysates and media were resolved by 12% SDS-PAGE, analyzed by Western blot and immunoblotted using a polyclonal anti-human PCSK9 prosegment antibody followed by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. doi:10.1371/journal.pone.0072113.g001

Down-regulation of LDLR degradation by co-expression of PCSK9 and Fcpro recombinant protein

Since PCSK9 is mostly expressed in hepatocytes [3], which are the main source of circulating pPCSK9 [20,21], we decided to test our constructs in these cells. We first tested the effect of Fcpro on naive HepG2 cells and showed that its transient overexpression led to a ~1.6 fold increased levels of total LDLR (Figure S1A), suggesting that it can inhibit the effect of endogenous PCSK9 in these cells. However, it was also pertinent to choose a cell type devoid of endogenous PCSK9. Thus, we used the previously reported human hepatocyte-derived HepG2 cell line lacking PCSK9 expression by stable shRNA silencing (HepG2/shPCSK9 cells) and that have been tested to be even more sensitive to the PCSK9-induced degradation of their endogenous LDLR as compared to wild type HepG2 cells [9,16,18]. We also performed experiments in the widely used human embryonic kidney epithelial HEK293 cells, because they do not express PCSK9, are sensitive to exogenous PCSK9-induced degradation of the LDLR [16], and exhibit a better transfection efficiency than HepG2 cells. To induce a higher expression of LDLR, HEK293 cells were first grown for 24 h in a lipoprotein deficient serum (LPDS) for 24 h before transfection. We first tested the effect of the control protein Fc or the Fcpro recombinant protein on both cell types, lacking endogenous PCSK9. Western blot analysis of the HepG2/shPCSK9 cell lysates (Figure 2A), or the HEK293 cells (Figure S1B) recovered 48 h post-transfection of the empty pIRES vector, Fc or Fcpro revealed no effect on total LDLR cellular protein levels, showing that the use of the empty vector or the Fc alone constitute good negative controls for the ensuing experiments. It should be emphasized that Fcpro alone does not affect LDLR levels in two cell types that lack endogenous PCSK9. In order to test the inhibitory effect of our recombinant Fcpro in HEK293 cells, we co-expressed it with PCSK9 at a DNA ratio of

PCSK9:Fcpro of 1:3, a ratio usually used for other convertases [22]. Western blot analysis of cell lysates revealed that the ~44% enhanced LDLR degradation by PCSK9, is ~75% reversed when Fcpro is co-expressed (only 11% reduction in LDLR levels left) (Figure 2B). In order to test whether the transfection ratio was optimal, we increased the ratio in favor of Fcpro, up to 9-fold, keeping PCSK9 constant. The data showed that maximum inhibitory activity of Fcpro was already achieved at the 1:3 ratio (Figure 2C), prompting us to keep this ratio in further experiments. In Figures 2D (HepG2/shPCSK9 cells) and S1 (HEK293 cells), we tested the effect of the co-expression of Fcpro with full length PCSK9 or with its domain-deleted forms. These included PCSK9 lacking the CHR domain (L455X) or the C-terminal Cys-His-rich domain (CHRD) alone [12]. The latter constructs do not have any effect on total LDLR levels [18] and thus served as controls. The results showed that only full length PCSK9 activity is inhibited by Fcpro, and that the latter has no significant effect on LDLR in the presence or absence of the domain-deleted constructs.

We next sought to compare the inhibitory effect of Fcpro on the activity of PCSK9 and that of the most powerful D374Y GOF mutant as well as that of a GOF construct consisting of either the wild type sequence or the D374Y mutant both lacking the acidic N-terminal region of the prosegment (Δ 33-58) [18]. Thus, Western blot analyses of cell lysates of HepG2/shPCSK9 cells co-expressing of Fcpro with these constructs revealed that Fcpro is also capable of decreasing their activity to induce cellular LDLR degradation. When compared with wild type PCSK9 or its Δ 33-58 derivative, it seems that the average 4-fold increased LDLR levels in the presence of Fcpro and the GOF mutants (D374Y or Δ 33-58

D374Y) as compared to the GOF D374Y or Δ 33-58 D374Y alone (0.1, 0.08 versus 0.44, 0.31) is more efficient than the ~1.4-fold effect of Fcpro in the presence of WT or Δ 33-58 PCSK9 (Figures 3A,B).

Fcpro inhibits LDLR degradation induced by extracellular PCSK9

Based upon the ability of secreted PCSK9 to bind directly to the extracellular domain of LDLR, we tested if the recombinant Fcpro protein co-incubated with an extracellular PCSK9 would compromise its function, and thus prevent cellular LDLR degradation by this route. Accordingly, we concentrated ~10 \times the media produced in HEK293 cells obtained after 72 h post-transfection with each cDNA construct. The concentration of each V5-tagged or Fc region containing protein in these media was assessed by ELISA-V5 or ELISA-Fc. We first verified the potential extracellular activity of Fc or Fcpro alone on the human cell line HepG2/shPCSK9. The recombinant proteins obtained from conditioned media of HEK293 cells and used for the extracellular effect experiments are shown in Figure 4A. The media were adjusted to a final concentration of 3 μ g/ml of each protein before the 4 h cell incubations. Western blot analysis of the cell lysates are shown in Figure 4B where the levels of total cellular LDLR are very similar, revealing the absence of activity of the Fc- or Fcpro-containing conditioned media after an incubation period of 4 h at 37°C with HepG2/shPCSK9 cells. Thus, Fc or Fcpro proteins containing media represent negative controls for further extracellular-effect experiments. Next, we pre-incubated conditioned media containing 3 μ g/ml of Fc or Fcpro with 1 μ g/ml of full length PCSK9 or its domain deletants (L455X or CHRD) (protein ratio 1:3).

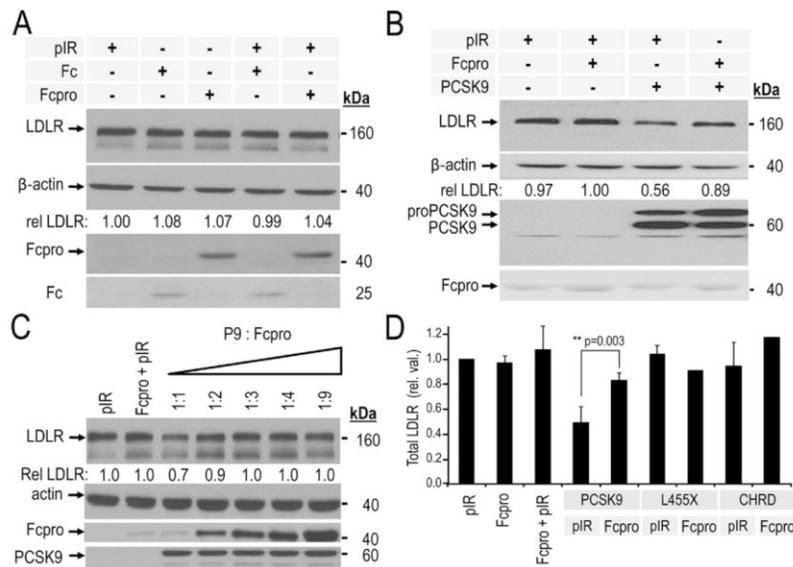


Figure 2. Intracellular *trans*-acting inhibitory effect of Fcpro on PCSK9 capacity to induce LDLR degradation. HepG2/shPCSK9 cells were co-transfected: **A–D**) with an empty pIRES vector (pIR) or human IgG1 fragment crystallizable region (Fc), both as negative controls; with the wild type human PCSK9; PCSK9 lacking CHR domain (L455X); the CHR domain alone, or the PCSK9 prosegment fused to Fc (Fcpro). **C**) Cells were co-transfected with wild type human PCSK9 and increasing ratios of Fcpro. Cell lysates were resolved by 12% SDS-PAGE and proteins analyzed by Western blot. **B,D**) Total LDLR was detected using a polyclonal anti-human LDLR and its levels were normalized relative to β -actin cellular loading controls. Fc and Fcpro proteins were detected using a polyclonal anti-Fc antibody. PCSK9, L455X and CHRD proteins were detected using a monoclonal anti-V5 antibody. Statistical values were estimated by Student's t-test and considered significant when p-values were <0.05. The data show that co-expression of Fcpro with PCSK9 significantly reduces its capacity to induce LDLR degradation (**p=0.003). These data are representative of at least three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0072113.g002

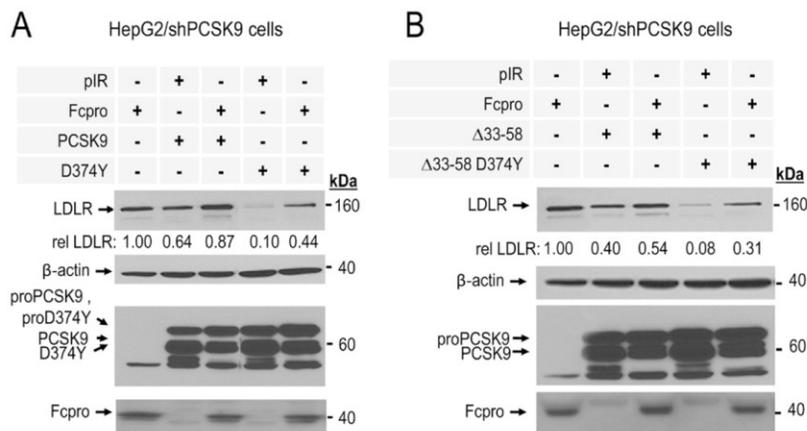


Figure 3. LDLR degradation induced by PCSK9 GOF mutants is decreased by their co-expression with Fcpro. HepG2/shPCSK9 cells were co-transfected with **A**) and **B**) pIR empty vector as a negative control or PCSK9 prosegment fused to the Fc region chimera (Fcpro) with **A**) wild type human PCSK9 or its GOF natural mutant PCSK9 D374Y (D374Y); **B**) PCSK9 GOF mutants: prosegment acidic stretch deletant Δ33-58 (Δ33-58) or Δ33-58 D374Y. Cells lysates were resolved by 10% SDS-PAGE and proteins analyzed by Western blot. Total LDLR was detected using a polyclonal anti-human LDLR and its levels were normalized relative to β-actin cellular loading controls. Fcpro proteins were detected using a polyclonal anti-Fc antibody. PCSK9 or its GOF mutant proteins were detected using a monoclonal anti-V5 antibody. These data are representative of at least three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0072113.g003

HepG2/shPCSK9 cells were then incubated with these pre-incubated conditioned media (Figure 4C) under the same conditions as in Figure 4B. Western blot analysis of total LDLR in these cells lysates (Figure 4D) showed a decrease of ~50% of LDLR cellular levels induced by extracellular PCSK9 incubation. However, in the presence of Fcpro this effect was significantly reduced by ~60% (from ~50% to ~20% total LDLR degradation). Moreover, as seen in intracellular overexpression experiments, extracellular L455X or the CHRDL did not affect LDLR levels in the presence or absence of Fcpro.

Evidence for direct binding of Fcpro to PCSK9

To assess if the interfering activity of Fcpro was due to a direct or indirect binding to PCSK9, we used a Far-Western based approach to detect protein-protein interactions *in vitro*. As prey proteins, we resolved 2 μg of Fc- or Fcpro-containing conditioned media on an SDS-PAGE 10% tris-glycine gel and transferred the proteins onto a PVDF membrane. Next, the bait proteins consisted of either human purified recombinant PCSK9 or conditioned media containing PCSK9. Following 4 h incubations, extensive washes were performed to remove all unbound protein from the surface of the PVDF membrane. Immunodetection using an anti-human PCSK9 antibody [12] revealed the presence of PCSK9 bound to Fcpro protein (~40 kDa) but not to Fc control protein (~25 kDa) (Figure 5A). Thus, since the result was the same with either pure PCSK9 or the one derived from conditioned media, this eliminated the possibility of another protein in the conditioned media could mediate the Fcpro=PCSK9 interaction. This result supports the notion that Fcpro directly binds pPCSK9.

We recently showed that Gln₁₅₂ represents a critical residue for PCSK9 recognition and autocatalytic cleavage, as only its replacement by Met or Ala marginally reduced cleavage [23]. Furthermore, the LOF Q152H natural mutant [24] is not processed and acts a dominant negative resulting in a significant reduction of zymogen processing, thereby abrogating PCSK9 secretion [23,24]. Thus, we tested the direct binding of PCSK9 to

either Fcpro or its single point mutant with the C-terminal Gln substituted by His (Fcpro QH). The data show that both proteins directly bind pure pPCSK9 (Figure 5B) or PCSK9 obtained from conditioned media (*not shown*). This reveals that the C-terminal Gln in Fcpro is not critical for such interaction, nor does it affect the inhibitory activity of Fcpro or Fcpro QH on PCSK9-induced LDLR degradation (Figure S2), yet it is critical for productive binding to the catalytic pocket of PCSK9 [23].

We thus considered the possibility that Fcpro QH may bind another region of pPCSK9. This hypothesis is further supported by our earlier observation that the prosegment and its Q152H as well as Q152W mutants can all bind the zymogen in the ER, as well as PCSK9-Δpro that lacks its prosegment. This was also seen using Fcpro and Fcpro QH (Figure S3). However, only the wild type prosegment can productively interact with PCSK9-Δpro and allow its secretion [23].

To dissect which structural part of PCSK9 could be implicated in the binding to Fcpro, we repeated the Far Western experiment using conditioned media containing 2 μg of either CHRDL or L455X proteins (Figures 5C, D). Interestingly, only the L455X protein bound Fcpro, but not the CHRDL. This showed that Fcpro binds the prosegment and/or the catalytic domain of PCSK9.

Finally, we tested the possibility that Fcpro could bind the prosegment of pPCSK9. For this we generated a pPCSK9 in which the prosegment is V5-tagged at the N-terminus (Figure S4A), by co-expression V5-prosegment with PCSK9-Δpro [23]. Unexpectedly, while Fcpro bound the prosegment=PCSK9 (Figure 5B), it did not bind the V5-prosegment=PCSK9 (Figure S4B), suggesting that the V5-tag inserted at the N-terminus of the prosegment blocks the binding of pPCSK9 to Fcpro.

Discussion

Since the validation by genetic studies that PCSK9 has a clear role in the regulation of cholesterol homeostasis, many efforts have been made to develop an inhibitor of this attractive therapeutic target for the treatment of hypercholesterolemia [1]. Considering that PC-prosegments may represent important molecules that

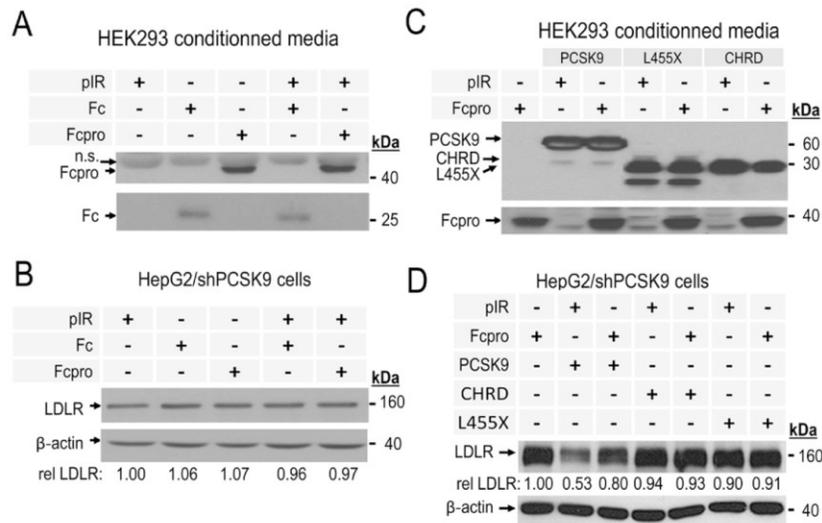


Figure 4. Extracellular *trans*-acting inhibitory effect of Fcpro co-incubated with PCSK9 on LDLR degradation. **A**) and **C**) Secreted Fc (human IgG1 fragment crystallizable region), Fcpro (Fc fused to PCSK9 prosegment), human wild type PCSK9 or its deletants forms L455X or CHR D proteins contained in conditioned media from transiently transfected HEK293 cells were analyzed following 10% SDS-PAGE by Western blot. Fc and Fcpro proteins were detected using a polyclonal anti-Fc antibody. n.s. indicate a non-specific band. PCSK9, L455X and CHR D proteins were detected using a mAb anti-V5. **B**) and **D**) HepG2/shPCSK9 cells were incubated with 1:3 (weight:weight) ratio of PCSK9 or L455X or CHR D to Fc or Fcpro amounts of proteins (quantified by ELISA assays) for 4 h at 37°C. Cells were then lysed, and LDLR levels were analyzed by Western blot analysis and normalized relative to β -actin cellular loading controls. Total LDLR was detected using a polyclonal antibody anti-human LDLR and its levels were normalized relative to β -actin cellular loading controls. These data are representative of at least three independent experiments. **A–D**) pIR: control empty pIRES vector.

doi:10.1371/journal.pone.0072113.g004

regulate enzymatic activity, some of them were previously used as potent inhibitors against their cognate convertases [22,25–27]. We previously demonstrated that the removal of the acidic stretch of the PCSK9 prosegment resulted in not only a higher binding but also in an increased activity of the convertase on LDLR [18]. Based on these observations, we hypothesized that while acting as a “natural brake” for the enzymatic activity of PCSK9, the prosegment could also inhibit its non-enzymatic activity on specific targets such as LDLR, and thus act as a “dominant negative molecule” interfering with the mechanism of LDLR degradation induced by PCSK9.

Our previous efforts to produce a PCSK9 prosegment in bacterial cultures resulted in a poor yield of this fragment. In this work, we overcome this obstacle by generating a recombinant fusion protein of the Fc region from human immunoglobulin IgG1 to the prosegment of human PCSK9 (Fcpro) (Figure 1A). This strategy allowed the prosegment to be successfully expressed and secreted (Figure 1B) in a yield that was ~62-fold higher than bacteria. The advantage of using the Fc portion of the immunoglobulin IgG1 greatly facilitated the expression and secretion of the recombinant protein. Moreover, this extension can also provide additional advantages as proteins fused to Fc regions have improved solubility and stability and can be produced and purified in a large scale using a protein A affinity chromatography [28]. Indeed, most of the successful fusion protein therapeutic approaches today contain different Fc-proteins of immunoglobulins [29].

Herein, we demonstrate for the first time that a chimera containing the prosegment (Fcpro) directly binds to pPCSK9 (Figure 5) and effectively acts as a negative regulator of its ability to induce LDLR degradation. This direct down-regulation of pPCSK9 activity was revealed by intracellular co-expression

experiments of Fcpro with either wild type PCSK9 or two of its GOF mutants. The data showed that all PCSK9 forms exhibited reduced activity on LDLR in the presence of Fcpro (Figures 2,3). This inhibitory effect was also observed to be valid extracellularly, whereupon pre-incubation of pPCSK9 with Fcpro resulted in almost total inactivation of the pPCSK9 ability to induce the degradation of cellular LDLR (Figure 4).

Concerning the pPCSK9 region that binds Fcpro, our data suggested that it could implicate the prosegment following the acidic stretch (i.e., aa 59–152), excluding the C-terminal Gln₁₅₂ (Figure S2). Indeed, earlier data showed that the zymogen proPCSK9 can oligomerize in the ER and that such oligomers can be dissociated using a reducing agent [3]. Subsequent studies revealed that the prosegment alone can also oligomerize in the ER [23]. We further deduce that the acidic region of the prosegment (aa 33–58) is not implicated, since the PCSK9 Δ 33–58 is still inhibited by Fcpro (Figure 3B). Since the bulky Trp₁₅₂ is not expected to productively enter the tight catalytic pocket of PCSK9, yet the prosegment Q152W still binds the zymogen [23], this strongly suggests that the postulated second binding region seemingly does not implicate the catalytic pocket *per se*, but may be due to either a prosegment=prosegment and/or prosegment=catalytic domain interaction. However, we cannot exclude the possibility that the bulky Fcpro could also modify the catalytic subunit either by direct binding or due to steric hindrance. In that context, overexpression of the prosegment alone with full length PCSK9 resulted in a significant decrease in level of the furin-cleaved form at Arg₂₁₈ ↓ [23], revealing that the *in trans* binding of the overexpressed prosegment allosterically modifies the catalytic subunit in such as way that the cleavage of PCSK9 by furin is largely restricted.

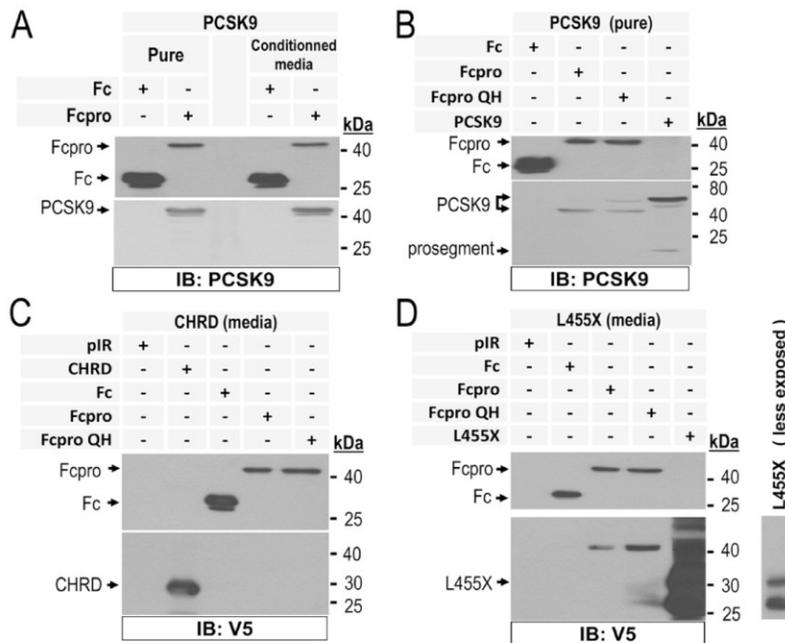


Figure 5. In vitro association of PCSK9 and Fcpro chimera. Direct binding of Fcpro to PCSK9 was analyzed by Far Western blot. Concentrated conditioned media from HEK293 cells containing 2 μ g of Fc or Fcpro or Fcpro QH proteins were resolved by 12% SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a PVDF membrane and were incubated 4 h with: **A)** (right panel) and **B)** 15 μ g/mL of purified human wild type PCSK9 (quantified by ELISA assays) and in **A)** (left panel), **C)** and **D)** with conditioned media from HepG2/shPCSK9 cells containing 5 μ g/mL of V5-tagged wild type PCSK9 or its domain deletants L455X or CHRD proteins. **A)** and **B)** binding of PCSK9 to proteins bound on the PVDF membranes were detected by using our polyclonal homemade anti-human PCSK9 antibody. **C)** and **D)** Binding of the PCSK9 domain deletants variants were detected by using horseradish peroxidase conjugated-V5 mAb. These data are representative of at least three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0072113.g005

Since PCSK9 is now considered a major target for lowering high levels of circulating LDL-cholesterol, which is highly atherogenic and can lead to cardiovascular failure, a number of pharmaceutical companies are developing potent inhibitors of circulating PCSK9 that would prevent its ability to enhance the degradation of liver LDLR. The most promising present strategies to inhibit PCSK9 includes the use of blocking monoclonal antibodies (mAb) or fibronectin fragments (adnectins) that prevent the formation of the pPCSK9=LDLR complex at the cell surface [1,30]. Recently, mAbs against PCSK9 that block its interaction with the LDLR have clearly shown very promising results and are now in Phase-II and -III clinical trials [1,31]. However, such conventional antibodies possess many intrinsic negative characteristics as drugs. In general, they are high-molecular mass proteins (~150 kDa), complex to manufacture, and potentially immunogenic; they are unsuited to oral delivery. Above all, the high cost associated with the development and manufacture of mAbs limits their wide applicability to all but advanced stages of serious diseases.

The present work presents an alternative, new strategy to develop PCSK9 inhibitors by interfering with the structure of pPCSK9 and exploiting the properties of the PCSK9 prosegment and the advantage of its fusion to a humanized Fc of IgG1. This fusion strategy has been very successful in the treatment of various diseases by administration of specific Fc-chimeras, including rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases [29]. The proposed Fcpro fusion protein could be injected to knockin mice expressing human PCSK9 at the place of mouse PCSK9 in order to further test its potency on LDL lowering *in vivo*. Once validated

and toxicity and pharmacodynamic studies performed this Fcpro inhibitor could then conceivably move to preclinical studies, as was done for mAbs [1,30]. Furthermore, in the future modifications of Fc to create smaller monomeric forms of Fcpro [32] could also be made to enhance the bio-availability of this construct towards its target pPCSK9. In conclusion, the present mAbs results are very encouraging and may well lead to a novel approach to combat hypercholesterolemia and possibly other PCSK9-related pathologies [33]. The alternative use of Fcpro as a potential PCSK9 inhibitor offers the advantage of compounds easier to manufacture at lower cost. The future will tell whether this approach is more attractive than the presently used mAb strategy.

Supporting Information

Figure S1 Decreased PCSK9-mediated degradation of LDLR in transiently transfected HepG2 cells with Fcpro and co-transfected HEK293 cells with PCSK9 and Fcpro.

A) Naïve HepG2 cells were transfected with either an empty pIRES vector (pIR) or with the PCSK9 prosegment fused to the Fc region chimera (Fcpro), and **B)** HEK293 cells were co-transfected with an empty pIRES vector (pIR) or Fcpro and the wild type human PCSK9, or PCSK9 lacking the CHRD (L455X), or the CHRD alone. Cells lysates were resolved by 12% SDS-PAGE and proteins analyzed by Western blot. Total LDLR was detected using a polyclonal anti-human LDLR and its levels were normalized relative to β -actin cellular loading controls. Fcpro proteins were detected using a polyclonal anti-Fc antibody.

PCSK9, L455X and CHRD proteins were detected using a monoclonal horseradish peroxidase conjugated-V5 antibody. These data are representative of at least three independent experiments.
(TIF)

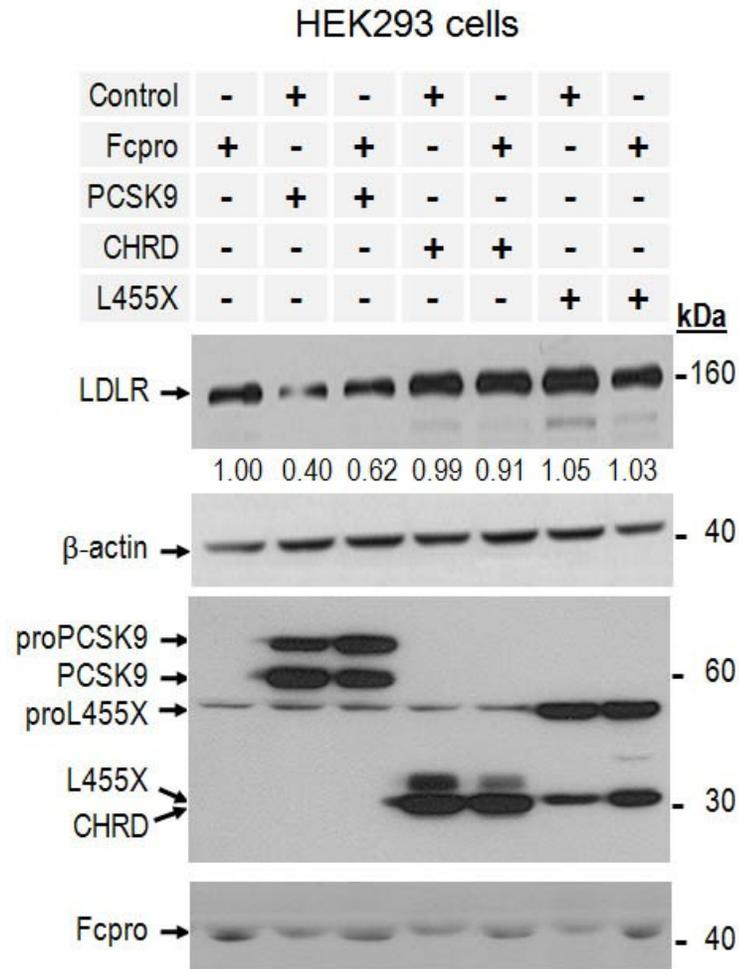
Figure S2 Similar inhibitory effect on LDLR degradation induced by PCSK9 when co-expressed with Fcpro or Fcpro QH. Cell lysates of HEK293 cells co-expressing Fcpro or Fcpro QH with human wild type PCSK9 were resolved by 10% SDS-PAGE. Total LDLR levels were analyzed by Western blot and LDLR proteins were detected by using a polyclonal anti-human LDLR antibody and its levels were normalized relative to β -actin cellular loading controls. pIR: control empty pIRES vector.
(TIF)

Figure S3 Pull-down of PCSK9 by Fcpro or Fcpro QH chimeras in HepG2/shPCSK9 cells. Cell lysates of HepG2/shPCSK9 cells co-expressing Fc or Fcpro or Fcpro QH with a full length PCSK9 or a PCSK9 Δ prosegment were immunoprecipitated (IP) with an anti-PCSK9 prosegment antibody and the immunoprecipitates were resolved by 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot using a monoclonal horseradish peroxidase conjugated-V5 antibody (IB:V5). The migration positions of the zymogen of PCSK9 (proPCSK9) and PCSK9 are shown. This figure is representative of at least two independent experiments. pIR: control empty pIRES vector.
(TIF)

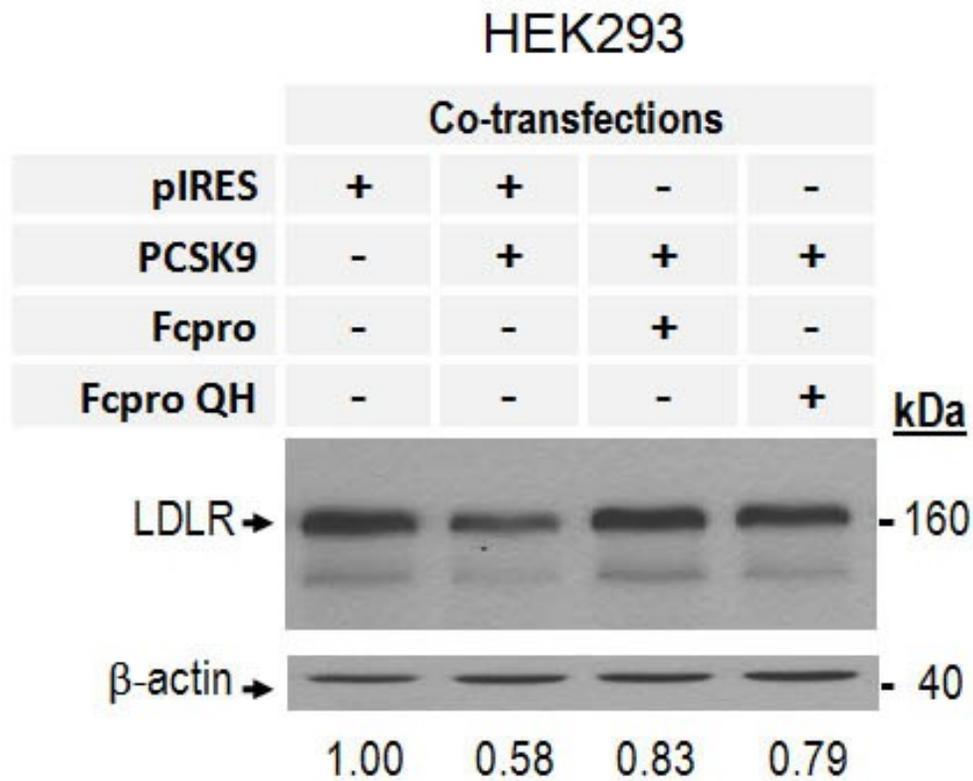
References

- Seidah NG, Prat A (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov* 11: 367–383.
- Shinde U, Thomas G (2011) Insights from bacterial subtilases into the mechanisms of intramolecular chaperone-mediated activation of furin. *Methods Mol Biol* 768: 59–106.
- Seidah NG, Benjannet S, Wickham L, Marcinkiewicz J, Jasmin SB, et al. (2003) The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 928–933.
- Abifadel M, Varret M, Rabes JP, Allard D, Ouguerram K, et al. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34: 154–156.
- Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffior MC, Hawkins JL, et al. (2007) Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 14: 413–419.
- Piper DE, Jackson S, Liu Q, Romanow WG, Shetterly S, et al. (2007) The Crystal Structure of PCSK9: A Regulator of Plasma LDL-Cholesterol. *Structure* 15: 545–552.
- Hampton EN, Knuth MW, Li J, Harris JL, Lesley SA, et al. (2007) The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14604–14609.
- Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, et al. (2007) Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat a of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem* 282: 18602–18612.
- Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Desjardins R, et al. (2009) Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced LDLR degradation: Evidence for an intracellular route. *J Biol Chem* 284: 28856–28864.
- Cameron J, Holla OL, Ranheim T, Kulseth MA, Berge KE, et al. (2006) Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum Mol Genet* 15: 1551–1558.
- Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, et al. (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem* 279: 48865–48875.
- Nassoury N, Blasiale DA, Tebon OA, Benjannet S, Hamelin J, et al. (2007) The Cellular Trafficking of the Secretory Proprotein Convertase PCSK9 and Its Dependence on the LDLR. *Traffic* 8: 718–732.
- Cariou B, Le MC, Costet P (2011) Clinical aspects of PCSK9. *Atherosclerosis* 216: 258–265.
- Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, et al. (2005) Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 37: 161–165.
- Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, et al. (2008) The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1111–1125.
- Saavedra YG, Day R, Seidah NG (2012) The M2 module of the Cys-His-rich domain (CHRD) of PCSK9 is needed for the extracellular low density lipoprotein receptor (LDLR) degradation pathway. *J Biol Chem* 287: 43492–43501.
- Zhang J, Liu X, Bell A, To R, Baral TN, et al. (2009) Transient expression and purification of chimeric heavy chain antibodies. *Protein Expr Purif* 65: 77–82.
- Benjannet S, Saavedra YG, Hamelin J, Asselin MC, Essalmani R, et al. (2010) Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9: evidence for additional processing events. *J Biol Chem* 285: 40965–40978.
- Lo KM, Sudo Y, Chen J, Li Y, Lan Y, et al. (1998) High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng* 11: 495–500.
- Zaid A, Roubtsova A, Essalmani R, Marcinkiewicz J, Chamberland A, et al. (2008) Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): Hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 48: 646–654.
- Roubtsova A, Munkonda MN, Awan Z, Marcinkiewicz J, Chamberland A, et al. (2011) Circulating Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 (PCSK9) Regulates VLDLR Protein and Triglyceride Accumulation in Visceral Adipose Tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 785–791.
- Zhong M, Munzer JS, Basak A, Benjannet S, Mowla SJ, et al. (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.
- Benjannet S, Hamelin J, Chretien M, Seidah NG (2012) Loss- and Gain-of-function PCSK9 Variants: Cleavage specificity, dominant negative effects, and low density lipoprotein receptor (LDLR) degradation. *J Biol Chem* 287: 33745–33755.
- Mayne J, Dewpura T, Raymond A, Bernier L, Cousins M, et al. (2011) Novel Loss-of-Function PCSK9 Variant Is Associated with Low Plasma LDL Cholesterol in a French-Canadian Family and with Impaired Processing and Secretion in Cell Culture. *Clin Chem* 57: 1415–1423.
- Boudreault A, Gauthier D, Lazure C (1998) Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J Biol Chem* 273: 31574–31580.
- Nour N, Mayer G, Mort JS, Salvas A, Mbikay M, et al. (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.

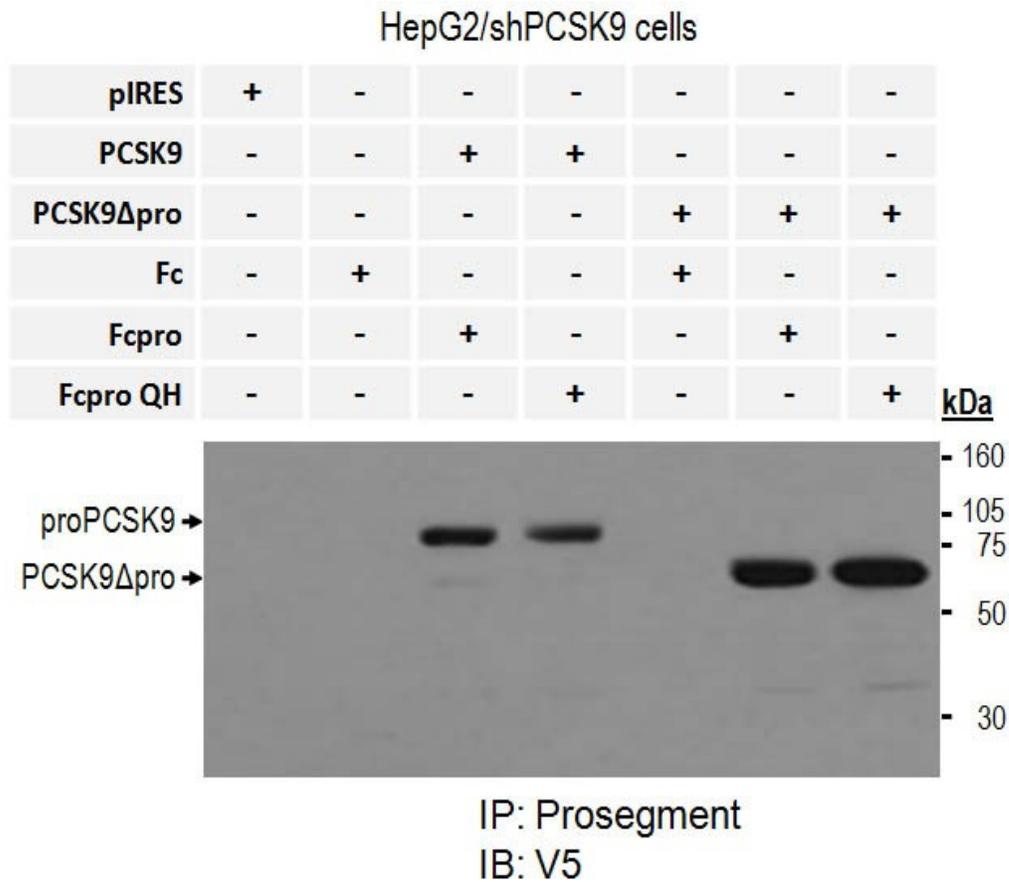
27. Pullikotil P, Vincent M, Nichol ST, Seidah NG (2004) Development of protein-based inhibitors of the proprotein of convertase SKI-1/S1P: processing of SREBP-2, ATF6, and a viral glycoprotein. *J Biol Chem* 279: 17338–17347.
28. Carter PJ (2011) Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective. *Exp Cell Res* 317: 1261–1269.
29. Walsh G (2010) Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol* 28: 917–924.
30. Seidah NG (2013) Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9 (PCSK9) inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia and other pathologies. *Curr Pharm Des* 19: 3161–3172.
31. Stein EA, Mellis S, Yancopoulos GD, Stahl N, Logan D, et al. (2012) Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N Engl J Med* 366: 1108–1118.
32. Ying T, Chen W, Gong R, Feng Y, Dimitrov DS (2012) Soluble monomeric IgG1 Fc. *J Biol Chem* 287: 19399–19408.
33. Sun X, Essalmani R, Day R, Khatib AM, Seidah NG, et al. (2012) Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia* 14: 1122–1131.



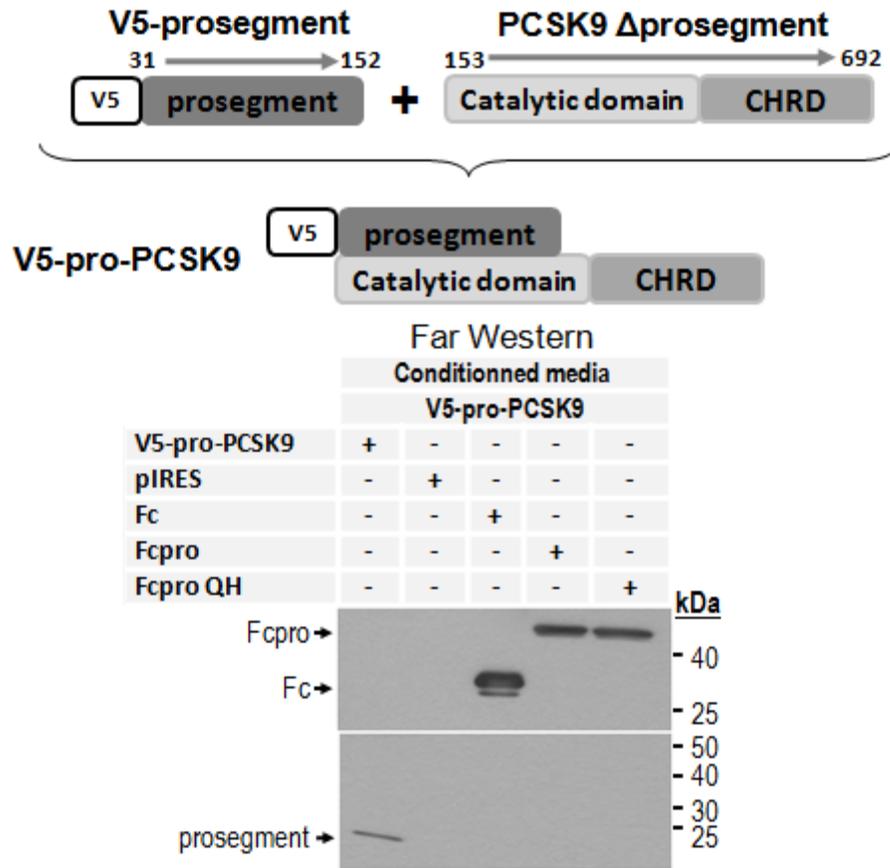
Supplemental Figure S1. Decreased PCSK9-mediated degradation of LDLR in transient co-transfected HEK293 cells with PCSK9 and Fcpro. HEK293 cells were co-transfected with an empty vector (control) or PCSK9 prosegment fused to the Fc region chimera (Fcpro) and the wild type human PCSK9, or PCSK9 lacking the CHRD (L455X), or the CHRD alone. Cells lysates were resolved by 12% SDS-PAGE and proteins analyzed by Western blot. Total LDLR was detected using a polyclonal anti-human LDLR and its levels were normalized to β-actin cellular loading controls. Fcpro proteins were detected using a polyclonal anti-Fc antibody. PCSK9, L455X and CHRD proteins were detected using a monoclonal horseradish peroxidase conjugated-V5 antibody. These data are representative of at least three independent experiments.



Supplemental Figure S2. Similar inhibitory effect on LDLR degradation induced by PCSK9 when co-expressed with Fcpro or Fcpro QH. Cell lysates of HEK293 cells co-expressing Fcpro or Fcpro QH with human wild type PCSK9 were resolved by 10% SDS-PAGE. Total LDLR levels were analyzed by Western blot and LDLR proteins were detected by using a polyclonal anti-human LDLR antibody and its levels were normalized to β -actin cellular loading controls.



Supplemental Figure S3. Pull-down of PCSK9 by Fcpro or Fcpro QH chimeras in HepG2/shPCSK9 cells. Cell lysates of HepG2/shPCSK9 cells co-expressing Fc or Fcpro or Fcpro QH with a full length PCSK9 or a PCSK9 Δ prosegment were immunoprecipitated (IP) with an anti-PCSK9 prosegment antibody and the immunoprecipitates were resolved by 12% SDS-PAGE and analyzed by Western blot using a monoclonal horseradish peroxidase conjugated-V5 antibody (IB:V5). The migration positions of the zymogen of PCSK9 (proPCSK9) and PCSK9 are shown. This figure is representative of at least two independent experiments.



Supplemental Figure S4. Loss of Fcpro binding capacity to a N-terminally V5-tagged PCSK9 prosegment. Concentrated conditioned media from HEK293 cells containing 2 μ g of Fc or Fcpro or Fcpro QH proteins were resolved by 12% SDS-PAGE. Proteins were transferred onto a PVDF membrane and were incubated 4 h with conditioned media produced in HepG2/shPCSK9 cells (expressing in trans a N-terminus V5-tagged PCSK9 prosegment and a no-tagged PCSK9 Δ prosegment) containing 5 μ g/mL of N-terminally V5-pro-PCSK9. Binding of N-tagged PCSK9 to proteins bound on the PVDF membrane was detected by using our polyclonal homemade anti-human PCSK9 antibody. These data are representative of at least three independent experiments.

DISCUSSION

L'escorte forcée d'une protéine aussi importante qu'est le LDLR vers la dégradation résulte dans des conséquences graves pour l'homéostasie lipidique de l'organisme. La PCSK9, un membre de la famille des proprotéines convertases (PCs), possède justement la capacité de se lier fortement au LDLR et de l'entraîner dans la cellule vers des compartiments acides où il subira une dégradation prématurée. Plusieurs études cliniques ont rapporté des cas d'individus atteints des mutations "gain de fonction" de la PCSK9 et qui présentent un état d'hypercholestérolémie grave (Abifadel et al., 2003). De plus, d'autres études révèlent l'existence des individus qu'inversement avaient hérité ou subi des mutations attribuant une "perte de fonction" de la PCSK9 et pour qui, les taux de "mauvais cholestérol plasmatique" (LDL) étaient très bas (Cohen et al., 2006). La constatation ultime vint de la découverte des individus en bonne santé mais porteurs des mutations sur les deux allèles du locus codant pour le gène de la PCSK9 ce qui avait pour conséquence l'absence plasmatique de cette protéine (Hooper et al., 2007; Zhao et al., 2006). Ainsi la preuve génétique accompagnée de la constatation physiologique associant la **perte** de fonction de la PCSK9 avec une augmentation importante de la **protection** cardiovasculaire conduisit la recherche scientifique à trouver un inhibiteur de l'action de la PCSK9 vis-à-vis le LDLR. Depuis, l'activité de recherche s'activa grandement afin de caractériser la biologie cellulaire de cette convertase. Notre équipe est à l'issue de la découverte de sept des neuf membres de la famille des PCs et la connaissance acquise par l'étude de ces dernières aida énormément pour la suite du projet de recherche présenté dans ce dernier article de thèse.

Prodomaine des convertases comme inhibiteurs naturels :

Toutes les convertases possèdent un prodomaine en N-terminal qui agit d'une part, comme une molécule chaperone en assurant le bon repliement et la maturation de la convertase-inactive (zymogène) puis d'autre part, comme inhibiteur naturel de la protéine (Seidah, 2011). Auparavant, cette caractéristique particulière fut utilisée pour développer des inhibiteurs spécifiques des convertases (Boudreault et al., 1998; Zhong et al., 1999). Est-ce que la même stratégie pouvait être applicable afin d'inhiber la PCSK9? À prime

abord c'était difficile de le concevoir puisque les convertases pour qui cette stratégie avait bien fonctionné présentaient la différence majeure avec la PCSK9 d'avoir subi un deuxième clivage qui les avait libéré de leur "inhibiteur naturel" (prodomaine) afin qu'elles puissent devenir actives envers leurs substrats en tant qu'enzymes. Différemment, la PCSK9 lors de son processus de maturation, ne subit qu'un seul autoclivage entre son prodomaine et son domaine catalytique qui est suivi non pas par la libération du prodomaine ainsi clivé mais par le déplacement de celui-ci vers la poche catalytique de la convertase de manière stable et surtout irréversible. Pourquoi la PCSK9 garde ainsi son prodomaine? Des études de mutation du site catalytique (PCSK9 H226A) ont démontré d'une part que l'autoclivage était obligatoire à la PCSK9 pour être sécrétée (Seidah et al., 2003) et d'autre part, que l'expression d'une PCSK9 délétée déjà de son prodomaine (PCSK9 Δ pro) abolissait tout autant sa sortie de la cellule (McNutt et al., 2007). Ainsi, uniquement la coexpression du prodomaine seul avec la PCSK9 Δ pro réussit à rétablir la sécrétion de la PCSK9 et ce même dans le cas d'une PCSK9 ayant un site catalytique inactif (PCSK9 Δ pro S386A) (Li et al., 2007). La preuve fut donc claire que le prodomaine était important pour la sécrétion de la convertase.

Nos résultats présentés dans le premier article de cette thèse nous ont permis de comprendre que le prodomaine n'était pas seulement important pour sa sécrétion mais agissait aussi comme *région régulatrice de l'activité* de la PCSK9 sur le LDLR. En effet, nous avons démontré que la délétion de la région 31 à 58 du prodomaine résultait dans une dégradation accrue du LDLR par la PCSK9 Δ 33-58 (gain de fonction important). Ceci constitua la preuve que le prodomaine agissait aussi comme "région régulatrice" de l'activité de la convertase. En complément, il a aussi été observé que la PCSK9 peut s'oligomériser (Fan et al., 2008; Seidah et al., 2003) mais son domaine en C-terminal ne serait pas responsable de cela puisque lorsqu'exprimé seul, aucune oligomérisation n'est constatée (Seidah et al., 2003) contrairement au prodomaine qui s'oligomérisent (Benjannet et al., 2012). Des études de mutagenèse du prodomaine démontrèrent que le remplacement de certains résidus augmentaient sa capacité d'agir comme dominant négatif en se oligomérisant de façon plus stable avec le zymogène de la PCSK9 et l'empêchant ainsi de sortir de la cellule (Benjannet et al., 2012). Toutes ces évidences nous ont permis de concevoir que l'utilisation du prodomaine de la PCSK9 pourrait

conduire, tout comme pour les autres convertases, à un inhibiteur spécifique de son activité.

Stratégie de production et mécanisme d'action de l'inhibiteur de la PCSK9 :

Nos efforts pour produire et purifier le prodomaine seul de la PCSK9 dans des systèmes d'expression bactériens ou mammifères furent soldés par l'obtention d'un très faible rendement qui fut insuffisant pour les essais fonctionnels. Nous nous tournâmes alors vers une stratégie de production améliorée basée sur l'utilisation des fragments Fc provenant des immunoglobulines pour créer des protéines-chimères ayant amélioré leur solubilité et acquis de la sorte une excellente capacité de sécrétion (Lo et al., 1998). Considérant que l'extrémité C-terminale du prodomaine de la PCSK9 fut démontrée importante pour son interchangeabilité au niveau intracellulaire (Benjannet et al., 2012), nous avons fusionné le fragment Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1 en N-terminal du prodomaine de la PCSK9 ce qui produisit la chimère **Fcpro**. La sécrétion efficace dans le milieu extracellulaire de celle-ci suite à sa surexpression dans les cellules HEK293 ou HepG2/shPCSK9 (dépourvues de PCSK9 endogène) démontra le succès de la stratégie adoptée. Nous quantifiâmes la sécrétion de notre protéine fusion par ELISA et constatâmes que la production de la Fcpro était de ~60-fois supérieure à la production bactérienne du prodomaine seul. Bien que la fusion avec le fragment Fc ait augmenté le rendement de production de façon si importante, il restait à tester si la protéine chimère avait la propriété d'inhiber la PCSK9. Ainsi, nous avons démontré par des expériences de coexpression de la Fcpro avec la PCSK9 dans des cellules dépourvues de PCSK9 endogène (HepG2/shPCSK9) qu'effectivement la chimère inhibait l'activité de la convertase à induire la dégradation du LDLR. De plus, nous démontrâmes que cet effet provenait de la portion "*prodomaine*" et non de la portion "*Fc*" de la chimère puisque l'activité de la PCSK9 était inchangée en présence de cette dernière. La surexpression de la Fcpro dans les cellules HepG2 naïves résulta aussi dans une hausse des niveaux de LDLR cellulaires conséquence de l'inhibition de l'action de la PCSK9 endogène.

En tenant compte que les effets néfastes de la PCSK9 sont surtout associés à un "gain de fonction" (GOF) de cette dernière, nous avons testé l'effet de notre "inhibiteur" (Fcpro) sur le mutant D374Y qui est le mutant ayant l'effet le plus puissant

de GOF de la PCSK9 sur la dégradation du LDLR (Timms et al., 2004). Les résultats obtenus confirmèrent l'efficacité inhibitrice du Fcpro à neutraliser une grande partie de l'activité du mutant PCSK9 D374Y. Nous avons aussi testé l'effet de notre "inhibiteur" sur des mutants de la PCSK9 (PCSK9 Δ 33-58 et PCSK9 Δ 33-58 D374Y) que nous avons généré pour l'étude du prodomaine (article 1) qui démontrent une activité d'induction à la dégradation du LDLR supérieure à la majorité des mutants naturels GOF mais comparable à la mutation D374Y. La coexpression de Fcpro avec PCSK9 Δ 33-58 ou PCSK9 Δ 33-58 D374Y résulta dans une inhibition de la "super-activité" de ces derniers. L'ensemble de ces observations furent très encourageantes et nous confirmèrent que la protéine-fusion Fcpro avait la propriété d'agir en tant que molécule inhibitrice de l'activité de la PCSK9 lorsqu'elle était coexprimée avec cette dernière ou les mutants GOF. Cependant, dans les conditions physiologiques, l'action de la PCSK9 peut non seulement avoir lieu via la voie intracellulaire (Poirier et al., 2009) mais aussi via la voie extracellulaire (Qian et al., 2007). Nous avons alors testé l'effet du Fcpro par la voie extracellulaire et étonnamment, nous avons aussi observé une inhibition efficace de l'action de la PCSK9 sécrétée, lorsque celle-ci était pré-incubée avec la Fcpro et déposée ultérieurement sur les cellules HepG2/shPCSK9. L'inhibition de la protéine PCSK9 sécrétée était inattendue puisque notre première hypothèse du *mécanisme d'inhibition* était basée sur le phénomène d'*interchangeabilité du prodomaine* de la PCSK9. Celui-ci avait été démontré valable uniquement avec la forme zymogène et non avec la forme mature-sécrétée (Benjannet et al., 2012). Les résultats de nos expériences de cotransfection suggéraient que le mécanisme d'inhibition que nous observions pouvait effectivement s'expliquer par l'échange entre le prodomaine natif de la PCSK9 (au moment de son autoclivage) avec la Fcpro disponible au même moment dans le réticulum endoplasmique. Mais notre hypothèse n'était plus valable pour expliquer l'efficacité d'inhibition de la PCSK9 mature (milieu extracellulaire) par la Fcpro puisque, à pH physiologique (neutre), le prodomaine de la PCSK9 mature est lié de façon très stable à la convertase, et de plus, nous avons démontré (article 1) que le prodomaine ne se détache que dans les conditions acides des organelles de dégradation. Donc il était fortement improbable qu'il y eut échange du prodomaine logé dans la cavité catalytique avec le Fcpro. Nonobstant, nous avons généré une Fcpro-Q152H afin de tester si son effet d'inhibition serait supérieur à celui du Fcpro. Nous avons choisi de faire cette mutation

puisque dans l'étude rapportant l'*interchangeabilité du prodomaine*, le dominant négatif le plus puissant était celui portant la mutation Q152H (Benjannet et al., 2012). Nos résultats révélèrent que l'effet d'inhibition de la Fcpro-Q152H n'était pas supérieur comme nous l'attendions mais il était comparable à celui observé avec la Fcpro. Ceci invalida davantage notre hypothèse initiale mais nous dirigea vers une autre hypothèse où le mécanisme d'inhibition impliquerait la liaison du Fcpro sur une région régulatrice de l'activité de la PCSK9 interférant de la sorte avec l'activité de cette dernière.

Un autre aspect que nos conditions d'expérimentation n'écartaient pas, concernant le mécanisme d'action du Fcpro, était l'intervention d'une protéine "partenaire" provenant du milieu intracellulaire lors des expériences de surexpression ou sécrétée lors des expériences d'incubation avec des milieux conditionnés (voie extracellulaire). Alors, nous nous sommes questionnés à savoir si l'inhibition de la PCSK9 par la Fcpro était issue d'une interaction *directe* ou *indirecte*. À cette fin, nous avons testé l'interaction *in vitro* de deux protéines, PCSK9 et Fcpro, par *Far Western*. Des expériences précédentes au laboratoire nous ont appris que lors de ce type d'expérimentation il était impératif de maintenir la PCSK9 en solution puisque son repliement structurel était primordial dans le succès des liaisons avec d'autres protéines (Mayer et al., 2008). Nous avons ainsi utilisé la PCSK9 sécrétée dans le milieu des cellules mais aussi la PCSK9 purifiée. Les deux sources de PCSK9 ont donné les mêmes résultats soit la confirmation que la liaison entre la PCSK9 et la Fcpro était bien directe.

Recherche du site d'interaction de l'inhibiteur Fcpro avec la PCSK9 :

Puisque notre deuxième hypothèse impliquait la liaison de la chimère Fcpro sur un *site régulateur* de l'activité de la PCSK9, nous avons testé l'interaction *in vitro* de la Fcpro avec différents domaines de la PCSK9 soit le CHRD ou avec la PCSK9 Δ CHRD (L455X). De façon intéressante nos résultats ont révélé que l'interaction de la Fcpro avait lieu efficacement avec la PCSK9 Δ CHRD et non avec le domaine C-terminal CHRD. Cela suggérait que le site d'interaction était circonscrit au prodomaine ou au domaine catalytique. Une équipe qui produisit le cristal du complexe PCSK9=LDLR à pH neutre démontra par une nouvelle modélisation (PDB 3P5B) que la liaison de ces deux molécules se passait principalement par le domaine catalytique de la PCSK9 liant le domaine EGF-A du LDLR mais aussi par une interaction additionnelle qui aurait lieu

entre le prodomaine de la PCSK9 et le domaine β -propeller du LDLR (Lo Surdo et al., 2011) (Figure 55). Selon leurs données, ces deux domaines ne seraient pas responsables de l'interaction principale mais plutôt responsables d'un renforcement (stabilisation) de l'interaction intermoléculaire par des liaisons faibles de type *Van der Waals*. Ils ajoutent que l'effet de "gain de fonction" du mutant S127R (localisé au prodomaine) (Abifadel et al., 2009) serait expliqué justement parce que la mutation contribuerait à une plus forte stabilisation des liens intermoléculaires entre le prodomaine muté S127R avec le domaine β -propeller du LDLR (Lo Surdo et al., 2011).

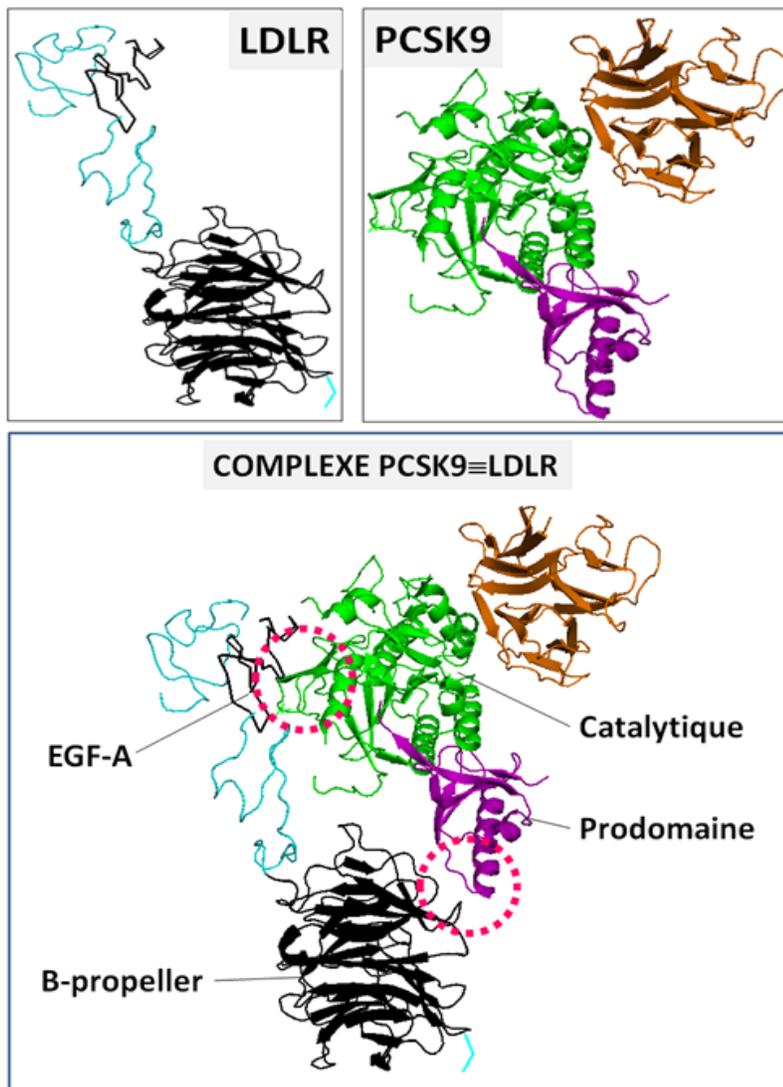


Figure 55: Domaines d'interaction entre la PCSK9 et le LDLR (PDB 3P5B). En magenta pointillé : sites d'interaction inter-domaines. LDLR : en bleu, domaines EGF-B

et R7 du LDB, en noir, domaines EGF-A et β -*propeller*. PCSK9 : en orange, domaine CHRD; en vert, domaine catalytique; en violet, prodomaine.

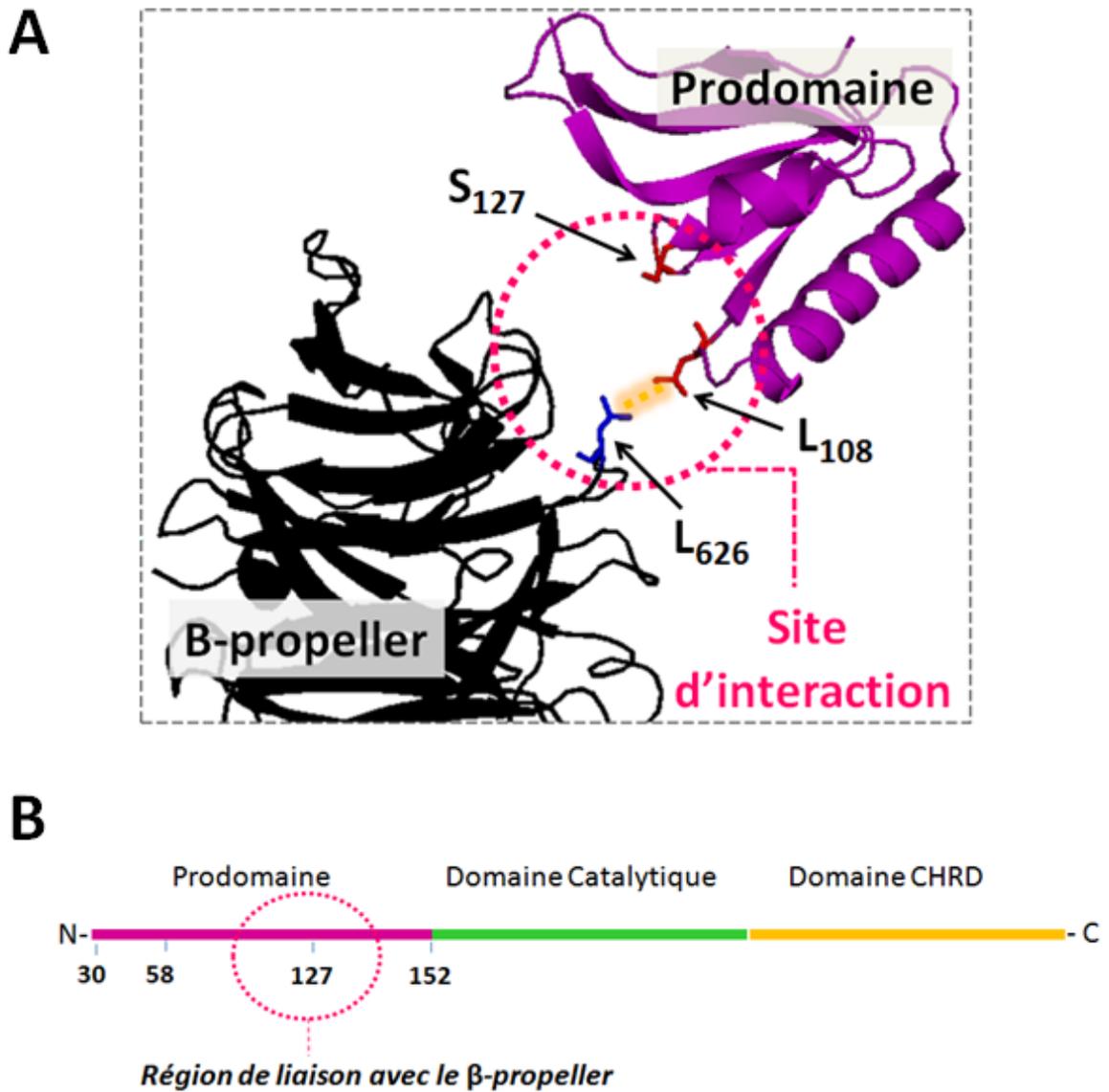


Figure 56: Focus sur le site d'interaction entre le prodomaine et le B-propeller. (A) Résidus impliqués dans l'interaction intermoléculaire. (B) Schéma des domaines composant la PCSK9 et indiquant (zone pointillée) la région médiane du prodomaine contenant les résidus impliqués dans la liaison avec le B-propeller du LDLR.

Les auteurs de l'étude qui révèle ce nouveau site d'interaction (prodomaine/ β -propeller) mentionnent l'implication principale de la leucine 108 du prodomaine avec la leucine 626 du β -propeller. Ils n'excluent pas la participation du résidu sérine 127 qui est situé dans une autre boucle exposée mais proche de celle qui contient la leucine 108 (Lo Surdo et al., 2011). Ensemble, ces résidus délimitent une région qui se retrouve dans la zone médiane du prodomaine entre son N- et son C-terminal (Figure 56). Nous avons démontré précédemment que la PCSK9 Δ 33-58 avait une capacité de liaison accrue au LDLR (article 1). Ceci suggère que la délétion de la partie en N-terminale du prodomaine pourrait probablement faciliter l'établissement de l'interaction entre la zone médiane du prodomaine et le β -propeller. De plus, nous avons observé que la chimère Fcpro avait aussi la capacité d'inhiber l'activité de la PCSK9 Δ 33-58. Ceci révèle que la région en N-terminale du prodomaine (33 à 58) n'est pas la région de liaison du Fcpro. En ce qui concerne la région C-terminale du prodomaine, nous avons démontré que le Fcpro-Q152H n'était pas un meilleur inhibiteur de la PCSK9 comparativement au Fcpro. Ceci signifie non seulement que la liaison du prodomaine natif est très stable dans la poche catalytique et ne peut être déplacée mais aussi (et surtout) que l'extrémité en C-terminale du prodomaine n'est pas impliquée dans la liaison des Fcpro ou Fcpro-Q152H. Il ne reste donc que la région médiane qui est exposée et qui semble faciliter l'action de la PCSK9 à acheminer le LDLR à la dégradation. Bien sûr, ces considérations n'excluent pas la possibilité que la liaison se passe aussi au niveau du domaine catalytique. Néanmoins, nous avons observé que la liaison de la chimère Fcpro ainsi que la variante Fcpro-Q152H avec la PCSK9 était **abolie** lorsque l'extrémité en N-terminale de cette dernière n'était pas libre. Autrement dit, la présence d'une séquence supplémentaire, dans l'occurrence un 'tag-V5' (V5-PCSK9), à cette extrémité empêchait complètement la liaison avec la protéine Fcpro. L'ajout de cette séquence supplémentaire en N-terminale a probablement conduit à un changement de la conformation de cette extrémité ou a introduit simplement un encombrement stérique qui fut suffisant pour empêcher la liaison de la Fcpro avec la PCSK9. Cette observation constitue une évidence supplémentaire qui soutient que le site de liaison de la chimère Fcpro pourrait bien se situer sur la région médiane du prodomaine.

Malgré que les détails du mécanisme d'action du Fcpro ne soient pas encore clairement définis, il n'en reste pas moins que nous avons réussi : [1] à produire avec

succès le prodomaine en fusion avec le fragment Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1; [2] à démontrer la liaison directe entre la Fcpro avec la portion prodomaine/catalytique de la PCSK9 ; [3] à montrer la capacité d'inhibition de la PCSK9 par la Fcpro autant par la voie intracellulaire que par la voie extracellulaire et en dernier lieu, [4] à montrer que cette capacité d'inhibition était aussi confirmée pour les variantes "gain de fonction" de la PCSK9. Ainsi, notre approche expérimentale pour la production de la protéine chimère Fcpro couplée avec la nouveauté de l'utilisation du prodomaine en tant qu'inhibiteur intra- et extracellulaire de la PCSK9 propose une stratégie nouvelle et alternative pour la production d'inhibiteurs, tant recherchés, pour neutraliser l'effet de la PCSK9 vis-à-vis le LDLR.

CHAPITRE V

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

À ce jour, le mécanisme exact par lequel la protéine PCSK9 achemine le LDLR à la dégradation prématurée reste encore inconnu. La connaissance de ce mécanisme nous permettrait non seulement de comprendre la biologie cellulaire de cette protéine mais surtout de cerner avec exactitude son(ses) point(s) faible(s) afin de pouvoir contrôler son effet négatif dans l'homéostasie lipidique. Bien que la réponse se fasse attendre, la recherche scientifique se rapproche de celle-ci à grands pas. Les articles présentés dans cette thèse sont une contribution dans la compréhension des éléments impliqués dans le mécanisme d'action de la PCSK9. Nous avons ainsi exploré *ex vivo* la relation qui existe entre la **structure** des domaines en N-terminal (prodomaine) et en C-terminal (CHRD) avec la **fonction** de la PCSK9 vis-à-vis le LDLR. Notre premier article concernant le prodomaine, met en lumière *l'effet du pH* ainsi que l'existence d'une *région acide* (33-58) qui agissent comme **modulateurs importants de l'activité** de la PCSK9. Notre deuxième article s'intéresse, quand à lui, à l'étude du domaine C-terminal CHRD qui présente un repliement particulier en modules et pour lequel, nous avons démontré que les modules M1 et M3 étaient suffisants à la PCSK9 pour induire la dégradation *intracellulaire* du LDLR mais que le module M2 était absolument indispensable à la PCSK9 pour qu'elle puisse efficacement accomplir la dernière étape menant à la dégradation du complexe PCSK9=LDLR par la voie *extracellulaire*. De plus, la découverte de cette différence des prérequis structurels pour la fonction de la PCSK9 mit en valeur le module M2 et plus particulièrement la boucle exposée à l'entrée de la "cavité des histidines" afin de proposer cette région en tant que **nouvelle cible thérapeutique** pour le développement des inhibiteurs qui neutraliseraient particulièrement l'effet de la PCSK9 plasmatique. De façon complémentaire, les résultats de recherche présentés dans le troisième article proposent une nouvelle stratégie d'inhibition de la PCSK9 par l'utilisation de son prodomaine. Ainsi, nous avons réussi la production du prodomaine en fusion avec le fragment Fc de l'immunoglobuline humaine IgG1 qui a généré la chimère Fcpro. Celle-ci démontra non seulement se lier directement à la PCSK9 (probablement via la région médiane du prodomaine) mais réussit surtout à inhiber l'action de la PCSK9, par la voie intra- et extracellulaire, ainsi que celle des mutants "gain de fonction". Cette dernière étude propose une application pratique de

l'utilisation du **prodomaine de la PCSK9 comme inhibiteur** et par la même occasion propose une stratégie alternative pour le développement des nouveaux médicaments afin de contrecarrer l'effet négatif de la PCSK9 sur le LDLR et ainsi contribuer à la lutte contre l'hypercholestérolémie.

Les perspectives d'utilisation des inhibiteurs de la PCSK9 sont très positives. Les individus souffrant des conséquences de l'hypercholestérolémie sont très nombreux à travers le monde et actuellement, la thérapie la plus courante pour la prise en charge des hypercholestérolémies est l'utilisation des statines. Ces molécules comme nous l'avons expliqué dans l'introduction de la thèse agissent directement sur la production de cholestérol par les cellules et par ce fait, elles sont efficaces pour limiter le nombre des particules LDL libérées dans le plasma. Toutefois, la popularité des statines est à la baisse depuis quelques années, du au fait que de plus en plus des patients traités avec celles-ci dénoncent les effets secondaires importants suite à leur utilisation à moyen et à long-terme (Bruckert et al., 2005). Sans compter tous les patients hypercholestérolémiques qui sont insensibles aux statines et qui nécessitent grandement d'un traitement alternatif afin de prévenir les maladies cardiovasculaires issues de cette condition. Conséquemment, **la demande** des nouvelles thérapies "anti-cholestérol" s'est fortement accrue. **L'offre** était limitée jusqu'à l'avènement des résultats cliniques des inhibiteurs de la PCSK9. En effet, les résultats encourageants (réduction moyenne des niveaux de LDL plasmatiques de ~50%) provenant des études cliniques suite à l'utilisation des inhibiteurs de la PCSK9 chez des individus sains ou souffrant d'hypercholestérolémie, ont été accueillis avec grand espoir. De plus, ces études ont démontré que l'utilisation des molécules inhibitrices de la PCSK9, pourraient être utilisées seules ou conjointement avec les statines puisque l'effet de cette double-thérapie a démontré être additif (Petrides et al., 2013)

Y a-t-il des effets sous-jacents à la réduction physiologique de la PCSK9? Une étude chez des souris dépourvues de PCSK9 plasmatique (souris *Pcsk9*^{-/-}) suggère que la baisse de cholestérol plasmatique résultante d'une augmentation de niveaux de LDLR en absence de PCSK9 corrèle avec une diminution de la dissémination des métastases au niveau du foie suite à l'injection des cellules cancéreuses (Sun et al., 2012). Ceci représente un **effet secondaire "bénéfique"** de la disparition de la PCSK9. En ce qui concerne les **effets secondaires "négatifs"**, une étude *ex-vivo* révèle qu'une

augmentation de l'expression de la PCSK9 diminue l'expression du récepteur CD81 qui est impliqué dans la propagation du virus de l'hépatite C (Labonté et al., 2009). Des études *in vivo*, chez des souris *Pcsk9^{-/-}*, ont révélé premièrement, que l'absence de PCSK9 résulte dans une accumulation de tissu adipeux viscéral (Roubtsova et al., 2011). Ceci est inquiétant étant donné que l'excès de gras au niveau viscéral est justement une anomalie qui caractérise le syndrome métabolique. Celui-ci est reconnu pour rester longtemps asymptomatique mais peut entraîner des conséquences graves pour la santé humaine. Une autre étude démontre que suite à une hépatectomie partielle, le foie nécessite absolument de cholestérol pour se régénérer mais que celle-ci était significativement compromise lorsque la PCSK9 était absente (Zaid et al., 2008). Chez l'humain, les études cliniques ont révélé que les thérapies utilisant les ARN antisens ciblant la PCSK9 (SPC 5001/Santaris; BMS-844421/BMS-ISIS Pharmaceuticals) ont été soudainement arrêtées à la phase I (évaluation de la tolérance et l'absence d'effets indésirables chez des individus sains). Les détails des effets secondaires ou toxiques observés n'ont pas été dévoilés (Lambert et al., 2012) (*ClinicalTrials.gov Identifier NCT01350960*). D'autres molécules qui sont passées à travers la phase I et qui sont actuellement en phase II et III sont des anticorps monoclonaux "anti-PCSK9" (AMG145/AMGEN; REGN727 /Sanofi-Adventis-Regeneron). Les informations concernant les effets secondaires indésirables associés à l'anticorps monoclonal REGN727, mentionnent que les traitements avec l'inhibiteur est "bien toléré" et "qu'aucun volontaire n'avait du suspendre l'essai clinique du à la gravité des effets secondaires" (Stein et al., 2012b). Toutefois, il existe quelques cas rapportés comme ayant présenté des effets secondaires "légers" suite à l'administration par injection intraveineuse de cet anticorps monoclonal. Plusieurs participants de l'essai clinique se sont plaints des maux de tête mais il apparaît que ceci, était aussi constaté chez les individus prenant les placebos (Petrides et al., 2013; Stein et al., 2012a; Stein et al., 2012b). De plus, trois hommes (19, 26 et 54 ans) injectés à l'anticorps REGN727 ont présenté temporairement, une occlusion de l'intestin, une augmentation de la bilirubine et une élévation de la créatine kinase sérique respectivement (Stein et al., 2012b). Quant aux effets secondaires associés à l'anticorps monoclonal AMG145, certains individus présentèrent aussi des élévations de créatine kinase sérique qui fut expliquée par la pratique d'une activité nécessitant de l'effort musculaire. Puis finalement, les effets

communs rapportés par sept ‘volontaires’ suite au traitement, furent des douleurs/spasmes musculaires et de la fatigue (Dias et al., 2012). Malgré ces observations, il n’en reste pas moins que ces anticorps monoclonaux ‘anti-PCSK9’ ont réussi à réduire substantiellement les niveaux de LDL plasmatiques (chez les individus sains/atteints de l’hypercholestérolémie familiale ou non-familiale) diminuant significativement le risque de développer des maladies cardiovasculaires, ce qui ultimement, résulte dans un bénéfice majeur pour la santé des populations à travers le monde (Petrides et al., 2013).

Quelles sont les perspectives futures de l’étude de la PCSK9? Au point de vue mécanisme d’action, il est important de compléter l’étude de l’étape de dégradation. Il serait pertinent de procéder à l’isolation des endosomes/endosomes tardifs afin d’étudier l’état du complexe PCSK9=LDLR juste avant la dégradation et ceci permettrait l’identification des nouvelles protéines-partenaires. Au point de vue tissulaire, il reste à déterminer quel est le rôle de la PCSK9 au niveau des autres organes où elle est exprimée. Par exemple, il a été démontré qu’elle avait la capacité d’acheminer à la dégradation la protéine ENaC. Cette dernière est présente, entre autres, au niveau du rein et possède une fonction très importante dans le maintien de la pression sanguine. L’analyse de l’expression tissulaire a montré que la PCSK9 est exprimée fortement au niveau du rein. Ainsi, un point qui pourrait être adressé est le rôle de la PCSK9 au niveau de cet organe ainsi que le mécanisme privilégié pour son action (intracellulaire versus extracellulaire). Au point de vue métabolisme, il serait pertinent de vérifier dans quelle mesure la suppression de PCSK9, induite par l’utilisation des inhibiteurs de son *expression* ou de sa *fonction*, serait associé ou contribuerait au développement du syndrome métabolique. L’ensemble de ces études permettraient de mieux cerner les conséquences systémiques de la fonction de la PCSK9 afin d’éviter le plus possible les impacts négatifs d’une thérapie ‘anti-PCSK9’. À l’heure actuelle, les compagnies pharmaceutiques voient dans le développement des inhibiteurs contre la PCSK9 l’espoir ultime de trouver et de commercialiser ‘le’ nouveau médicament ‘*blockbuster*’ générateur des profits considérables. À ce jour, tous les résultats vont dans le sens de leurs espoirs, mais à l’exemple des inhibiteurs développés contre les protéines PPAR (ex: Aleglitazar, Actos, Avandia), il serait peut-être plus avisé de rester prudents quand à

l'utilisation trop hâtive des inhibiteurs de la PCSK9 sachant que tout médicament possède une dualité celle d'être à la fois remède et à la fois poison. Enfin, seul l'avenir le dira si les effets de ces inhibiteurs pencheront majoritairement du côté curatif.

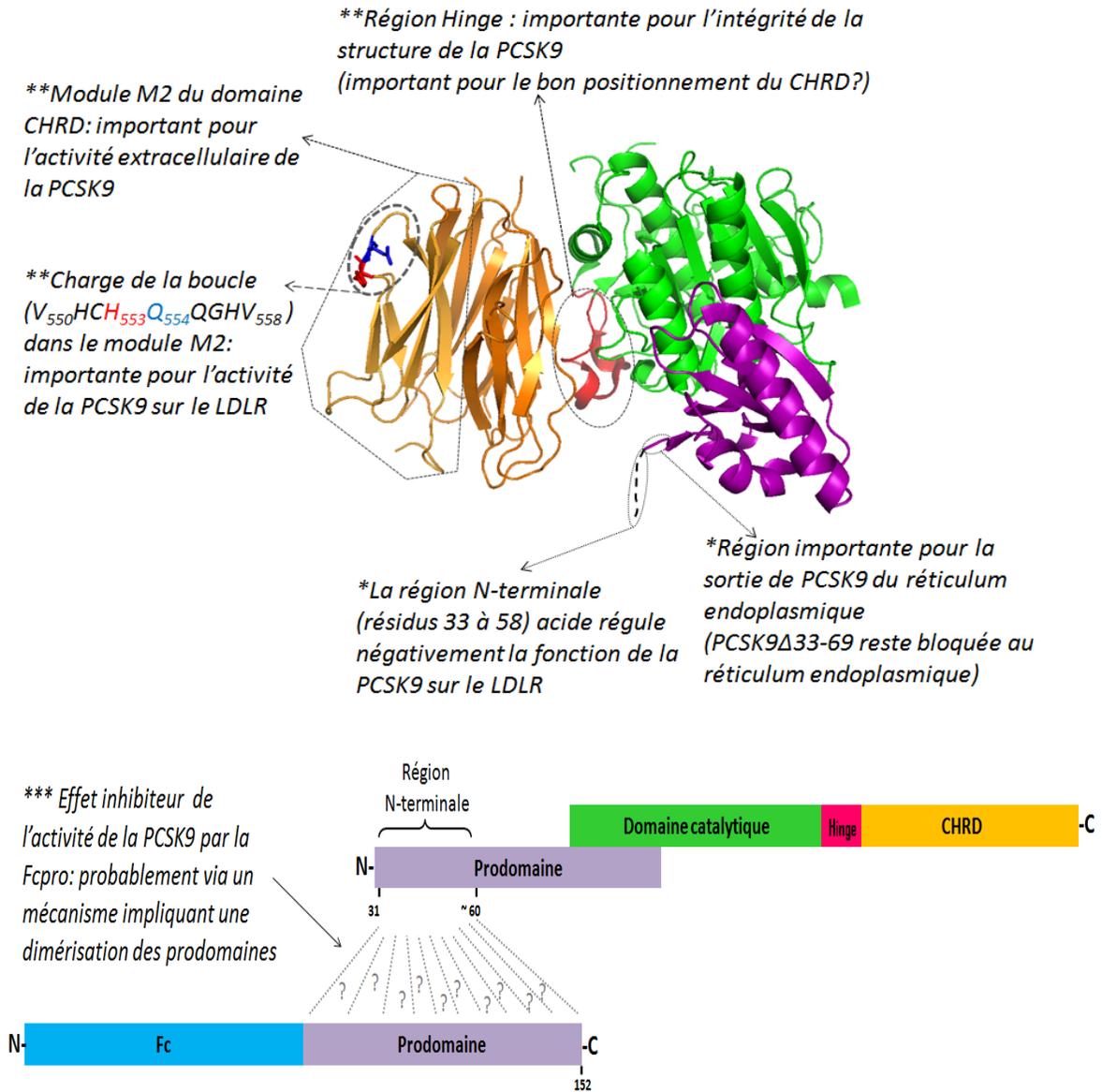


Figure 57 : Schéma récapitulatif de l'étude structure-fonction de la PCSK9 humaine (* Manuscrit # 1, ** Manuscrit # 2, *** Manuscrit # 3)

BIBLIOGRAPHIE

- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., et al.** (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* **34**, 154–6.
- Abifadel, M., Rabès, J.-P., Devillers, M., Munnich, A., Erlich, D., Junien, C., Varret, M. and Boileau, C.** (2009). Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum. Mutat.* **30**, 520–9.
- Ahmed, W., Whittall, R., Riaz, M., Ajmal, M., Sadeque, A., Ayub, H., Qamar, R. and Humphries, S. E.** (2013). The genetic spectrum of familial hypercholesterolemia in Pakistan. *Clin. Chim. Acta.* **421**, 219–25.
- Anderson, T. J., Grégoire, J., Hegele, R. A., Couture, P., Mancini, G. B. J., McPherson, R., Francis, G. A., Poirier, P., Lau, D. C., Grover, S., et al.** (2013). 2012 update of the Canadian Cardiovascular Society guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia for the prevention of cardiovascular disease in the adult. *Can. J. Cardiol.* **29**, 151–67.
- Andréjak, M., Gras, V., Massy, Z. A. and Caron, J.** [Adverse effects of statins]. *Thérapie* **58**, 77–83.
- Attie, A. D. and Seidah, N. G.** (2005). Dual regulation of the LDL receptor--some clarity and new questions. *Cell Metab.* **1**, 290–2.
- Badimón, L., Vilahur, G. and Padró, T.** (2009). Lipoproteins, platelets and atherothrombosis. *Rev. Esp. Cardiol.* **62**, 1161–78.
- Barter, P., Kastelein, J., Nunn, A. and Hobbs, R.** (2003). High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis* **168**, 195–211.
- Beglova, N., Jeon, H., Fisher, C. and Blacklow, S. C.** (2004). Structural features of the low-density lipoprotein receptor facilitating ligand binding and release. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 721–3.
- Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.-C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D., et al.** (2004). NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J. Biol. Chem.* **279**, 48865–75.
- Benjannet, S., Rhainds, D., Hamelin, J., Nassoury, N. and Seidah, N. G.** (2006). The proprotein convertase (PC) PCSK9 is inactivated by furin and/or PC5/6A: functional consequences of natural mutations and post-translational modifications. *J. Biol. Chem.* **281**, 30561–72.

- Benjannet, S., Saavedra, Y. G. L., Hamelin, J., Asselin, M.-C., Essalmani, R., Pasquato, A., Lemaire, P., Duke, G., Miao, B., Duclos, F., et al.** (2010). Effects of the prosegment and pH on the activity of PCSK9: evidence for additional processing events. *J. Biol. Chem.* **285**, 40965–78.
- Benjannet, S., Hamelin, J., Chrétien, M. and Seidah, N. G.** (2012). Loss- and Gain-of-function PCSK9 Variants: CLEAVAGE SPECIFICITY, DOMINANT NEGATIVE EFFECTS, AND LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR (LDLR) DEGRADATION. *J. Biol. Chem.* **287**, 33745–55.
- 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.
- Betters, J. L. and Yu, L.** (2010). NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett.* **584**, 2740–7.
- Biggerstaff, K. D. and Wooten, J. S.** (2004). Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. *Adv. Physiol. Educ.* **28**, 105–6.
- Blesa, S., Vernia, S., Garcia-Garcia, A.-B., Martinez-Hervas, S., Ivorra, C., Gonzalez-Albert, V., Ascaso, J. F., Martín-Escudero, J. C., Real, J. T., Carmena, R., et al.** (2008). A new PCSK9 gene promoter variant affects gene expression and causes autosomal dominant hypercholesterolemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3577–83.
- Bloch, K.** (1964). The biological synthesis of cholesterol. *Nobel Lect.*
- Bottomley, M. J., Cirillo, A., Orsatti, L., Ruggeri, L., Fisher, T. S., Santoro, J. C., Cummings, R. T., Cubbon, R. M., Lo Surdo, P., Calzetta, A., et al.** (2009). Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants. *J. Biol. Chem.* **284**, 1313–23.
- Boudreault, A., Gauthier, D. and Lazure, C.** (1998). Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J. Biol. Chem.* **273**, 31574–80.
- Brasaemle, D. L. and Attie, A. D.** (1990). Rapid intracellular transport of LDL-derived cholesterol to the plasma membrane in cultured fibroblasts. *J. Lipid Res.* **31**, 103–12.
- Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1979). Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3330–7.
- Bruckert, E., Hayem, G., Dejager, S., Yau, C. and Bégaud, B.** (2005). Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **19**, 403–14.

- Calandra, S., Tarugi, P., Speedy, H. E., Dean, A. F., Bertolini, S. and Shoulders, C. C.** (2011). Mechanisms and genetic determinants regulating sterol absorption, circulating LDL levels, and sterol elimination: implications for classification and disease risk. *J. Lipid Res.* **52**, 1885–926.
- Cameron, J., Holla, Ø. L., Ranheim, T., Kulseth, M. A., Berge, K. E. and Leren, T. P.** (2006). Effect of mutations in the PCSK9 gene on the cell surface LDL receptors. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1551–8.
- Chen, W. J., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.** (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**, 3116–23.
- Cohen, J. C., Boerwinkle, E., Mosley, T. H. and Hobbs, H. H.** (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1264–72.
- Colhoun, H. M., Otvos, J. D., Rubens, M. B., Taskinen, M. R., Underwood, S. R. and Fuller, J. H.** (2002). Lipoprotein subclasses and particle sizes and their relationship with coronary artery calcification in men and women with and without type 1 diabetes. *Diabetes* **51**, 1949–56.
- Costantini, C., Ko, M. H., Jonas, M. C. and Puglielli, L.** (2007). A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *Biochem. J.* **407**, 383–95.
- Costet, P., Cariou, B., Lambert, G., Lalanne, F., Lardeux, B., Jarnoux, A.-L., Grefhorst, A., Staels, B. and Krempf, M.** (2006). Hepatic PCSK9 expression is regulated by nutritional status via insulin and sterol regulatory element-binding protein 1c. *J. Biol. Chem.* **281**, 6211–8.
- Cunningham, D., Danley, D. E., Geoghegan, K. F., Griffor, M. C., Hawkins, J. L., Subashi, T. A., Varghese, A. H., Ammirati, M. J., Culp, J. S., Hoth, L. R., et al.** (2007). Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 413–9.
- DeVay, R. M., Shelton, D. L. and Liang, H.** (2013). Characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) trafficking reveals a novel lysosomal targeting mechanism via amyloid precursor-like protein 2 (APLP2). *J. Biol. Chem.* **288**, 10805–18.
- Dewpura, T., Raymond, A., Hamelin, J., Seidah, N. G., Mbikay, M., Chrétien, M. and Mayne, J.** (2008). PCSK9 is phosphorylated by a Golgi casein kinase-like kinase ex vivo and circulates as a phosphoprotein in humans. *FEBS J.* **275**, 3480–93.
- Dias, C. S., Shaywitz, A. J., Wasserman, S. M., Smith, B. P., Gao, B., Stolman, D. S., Crispino, C. P., Smirnakis, K. V, Emery, M. G., Colbert, A., et al.** (2012).

Effects of AMG 145 on Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels: Results From 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Ascending-Dose Phase 1 Studies in Healthy Volunteers and Hypercholesterolemic Subjects on Statins. *J. Am. Coll. Cardiol.* **60**, 1888–98.

Dominiczak, M. H. and Caslake, M. J. (2011). Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann. Clin. Biochem.* **48**, 498–515.

Dormuth, C. R., Hemmelgarn, B. R., Paterson, J. M., James, M. T., Teare, G. F., Raymond, C. B., Lafrance, J.-P., Levy, A., Garg, A. X. and Ernst, P. (2013). Use of high potency statins and rates of admission for acute kidney injury: multicenter, retrospective observational analysis of administrative databases. *BMJ* **346**, f880.

Du, F., Hui, Y., Zhang, M., Linton, M. F., Fazio, S. and Fan, D. (2011). Novel domain interaction regulates secretion of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 43054–61.

Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N. G., Bernier, L. and Prat, A. (2004). Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 1454–9.

Dubuc, G., Tremblay, M., Paré, G., Jacques, H., Hamelin, J., Benjannet, S., Boulet, L., Genest, J., Bernier, L., Seidah, N. G., et al. (2010). A new method for measurement of total plasma PCSK9: clinical applications. *J. Lipid Res.* **51**, 140–9.

Dufour, R. and Davignon, J. (2007). *An Atlas of Investigation and Diagnosis. Primary hyperlipidemias*. Oxford, UK: Clinical Publishing.

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P. and Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**, 839–48.

Fan, D., Yancey, P. G., Qiu, S., Ding, L., Weeber, E. J., Linton, M. F. and Fazio, S. (2008). Self-association of human PCSK9 correlates with its LDLR-degrading activity. *Biochemistry* **47**, 1631–1639.

Fasano, T., Sun, X.-M., Patel, D. D. and Soutar, A. K. (2009). Degradation of LDLR protein mediated by “gain of function” PCSK9 mutants in normal and ARH cells. *Atherosclerosis* **203**, 166–71.

Fisher, T. S., Lo Surdo, P., Pandit, S., Mattu, M., Santoro, J. C., Wisniewski, D., Cummings, R. T., Calzetta, A., Cubbon, R. M., Fischer, P. A., et al. (2007). Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J. Biol. Chem.* **282**, 20502–12.

Gent, J. and Braakman, I. (2004). Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 2461–70.

- Gille, A., Bodor, E. T., Ahmed, K. and Offermanns, S.** (2008). Nicotinic acid: pharmacological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **48**, 79–106.
- Goedeke, L. and Fernández-Hernando, C.** (2012). Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 915–30.
- Goldstein, J. L. and Brown, M. S.** (2009). The LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 431–8.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W. and Schneider, W. J.** (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 1–39.
- Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. a and Brown, M. S.** (2006). Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35–46.
- Golomb, B. A. and Evans, M. A.** (2008). Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* **8**, 373–418.
- Grundy, S. M.** (1978). Cholesterol metabolism in man. *West. J. Med.* **128**, 13–25.
- Grundy, S. M.** (1983). Absorption and metabolism of dietary cholesterol. *Annu. Rev. Nutr.* **3**, 71–96.
- Hampton, E. N., Knuth, M. W., Li, J., Harris, J. L., Lesley, S. A. and Spraggon, G.** (2007). The self-inhibited structure of full-length PCSK9 at 1.9 Å reveals structural homology with resistin within the C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14604–9.
- Hao, M. and Maxfield, F. R.** (2000). Characterization of rapid membrane internalization and recycling. *J. Biol. Chem.* **275**, 15279–86.
- Havekes, L., van Hinsbergh, V., Kempen, H. J. and Emeis, J.** (1983). The metabolism in vitro of human low-density lipoprotein by the human hepatoma cell line Hep G2. *Biochem. J.* **214**, 951–8.
- Havel, R. J.** (1984). The formation of LDL: mechanisms and regulation. *J. Lipid Res.* **25**, 1570–6.
- Havel, R. J.** (1987). Lipid transport function of lipoproteins in blood plasma. *Am. J. Physiol.* **253**, E1–5.
- He, G., Gupta, S., Yi, M., Michaely, P., Hobbs, H. H. and Cohen, J. C.** (2002). ARH is a modular adaptor protein that interacts with the LDL receptor, clathrin, and AP-2. *J. Biol. Chem.* **277**, 44044–9.

- Hermier, D., Forgez, P., Laplaud, P. M. and Chapman, M. J.** (1988). Density distribution and physicochemical properties of plasma lipoproteins and apolipoproteins in the goose, *Anser anser*, a potential model of liver steatosis. *J. Lipid Res.* **29**, 893–907.
- Hobbs, H. H., Russell, D. W., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1990). The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 133–70.
- Hobbs, H. H., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1992). Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mutat.* **1**, 445–66.
- Holla, Ø. L., Cameron, J., Berge, K. E., Ranheim, T. and Leren, T. P.** (2007). Degradation of the LDL receptors by PCSK9 is not mediated by a secreted protein acted upon by PCSK9 extracellularly. *BMC Cell Biol.* **8**, 9.
- Holla, Ø. L., Strøm, T. B., Cameron, J., Berge, K. E. and Leren, T. P.** (2010). A chimeric LDL receptor containing the cytoplasmic domain of the transferrin receptor is degraded by PCSK9. *Mol. Genet. Metab.* **99**, 149–56.
- Holla, Ø. L., Cameron, J., Tveten, K., Strøm, T. B., Berge, K. E., Laerdahl, J. K. and Leren, T. P.** (2011). Role of the C-terminal domain of PCSK9 in degradation of the LDL receptors. *J. Lipid Res.* **52**, 1787–94.
- Hooper, A. J. and Burnett, J. R.** (2013). Anti-PCSK9 therapies for the treatment of hypercholesterolemia. *Expert Opin. Biol. Ther.* **13**, 429–35.
- Hooper, A. J., Marais, A. D., Tanyanyiwa, D. M. and Burnett, J. R.** (2007). The C679X mutation in PCSK9 is present and lowers blood cholesterol in a Southern African population. *Atherosclerosis* **193**, 445–8.
- Horton, J. D.** (2002a). Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1091–1095.
- Horton, J. D.** (2002b). SREBP proteins-lipid synthesis.
- Horton, J. D., Cohen, J. C. and Hobbs, H. H.** (2007). Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* **32**, 71–77.
- Huff, M. W., Pollex, R. L. and Hegele, R. A.** (2006). NPC1L1: evolution from pharmacological target to physiological sterol transporter. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2433–8.
- Hussain, M. M., Strickland, D. K. and Bakillah, A.** (1999). The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.* **19**, 141–72.

- Innerarity, T. L., Kempner, E. S., Hui, D. Y. and Mahley, R. W.** (1981). Functional unit of the low density lipoprotein receptor of fibroblasts: a 100,000-dalton structure with multiple binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 4378–82.
- Iqbal, J. and Hussain, M. M.** (2009). Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E1183–94.
- Jeon, H. and Blacklow, S. C.** (2003). An intramolecular spin of the LDL receptor beta propeller. *Structure* **11**, 133–6.
- Jeon, H. and Blacklow, S. C.** (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 535–62.
- Jeong, H. J., Lee, H.-S., Kim, K.-S., Kim, Y.-K., Yoon, D. and Park, S. W.** (2008). Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J. Lipid Res.* **49**, 399–409.
- Jia, L., Betters, J. L. and Yu, L.** (2011). Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annu. Rev. Physiol.* **73**, 239–59.
- Jonas, M. C., Costantini, C. and Puglielli, L.** (2008). PCSK9 is required for the disposal of non-acetylated intermediates of the nascent membrane protein BACE1. *EMBO Rep.* **9**, 916–22.
- Kim, J. B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K. M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B. B. and Spiegelman, B. M.** (1998). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.* **101**, 1–9.
- King, A.** (2013). Lipids. Antibodies against PCSK9--a new era of therapy. *Nat. Rev. Cardiol.* **10**, 1.
- Kontush, A. and Chapman, M. J.** (2006). Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **3**, 144–53.
- Kotowski, I. K., Pertsemlidis, A., Luke, A., Cooper, R. S., Vega, G. L., Cohen, J. C. and Hobbs, H. H.** (2006). A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet* **78**, 410–422.
- Kourimate, S., Le May, C., Langhi, C., Jarnoux, A. L., Ouguerram, K., Zaïr, Y., Nguyen, P., Krempf, M., Cariou, B. and Costet, P.** (2008). Dual mechanisms for the fibrate-mediated repression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J. Biol. Chem.* **283**, 9666–73.

- Kozarsky, K., Kingsley, D. and Krieger, M.** (1988). Use of a mutant cell line to study the kinetics and function of O-linked glycosylation of low density lipoprotein receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 4335–9.
- Kuchinskiene, Z. and Carlson, L. A.** (1982). Composition, concentration, and size of low density lipoproteins and of subfractions of very low density lipoproteins from serum of normal men and women. *J. Lipid Res.* **23**, 762–9.
- Kuwano, M., Seguchi, T. and Ono, M.** (1991). Glycosylation mutations of serine/threonine-linked oligosaccharides in low-density lipoprotein receptor: indispensable roles of O-glycosylation. *J. Cell Sci.* **98 (Pt 2)**, 131–4.
- Kwon, H. J., Lagace, T. A., McNutt, M. C., Horton, J. D. and Deisenhofer, J.** (2008). Molecular basis for LDL receptor recognition by PCSK9. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1820–1825.
- Kwon, H. J., Palnitkar, M. and Deisenhofer, J.** (2011). The structure of the NPC1L1 N-terminal domain in a closed conformation. *PLoS One* **6**, e18722.
- Kysenius, K., Muggalla, P., Mätlik, K., Arumäe, U. and Huttunen, H. J.** (2012). PCSK9 regulates neuronal apoptosis by adjusting ApoER2 levels and signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 1903–16.
- Labonté, P., Begley, S., Guévin, C., Asselin, M.-C. C., Nassoury, N., Mayer, G., Prat, A., Seidah, N. G., Labonte, P. and Guevin, C.** (2009). PCSK9 impedes hepatitis C virus infection in vitro and modulates liver CD81 expression. *Hepatology* **50**, 17–24.
- Lagace, T. A., Curtis, D. E., Garuti, R., McNutt, M. C., Park, S. W., Prather, H. B., Anderson, N. N., Ho, Y. K., Hammer, R. E. and Horton, J. D.** (2006). Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* **116**, 2995–3005.
- Lambert, G., Sjouke, B., Choque, B., Kastelein, J. J. P. and Hovingh, G. K.** (2012). The PCSK9 decade. *J. Lipid Res.*
- Langhi, C., Le May, C., Kourimate, S., Caron, S., Staels, B., Krempf, M., Costet, P. and Cariou, B.** (2008). Activation of the farnesoid X receptor represses PCSK9 expression in human hepatocytes. *FEBS Lett.* **582**, 949–55.
- Le May, C., Berger, J. M., Lespine, A., Pillot, B., Prieur, X., Letessier, E., Hussain, M. M., Collet, X., Cariou, B. and Costet, P.** (2013). Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1484–93.
- Leigh, S. E. A., Leren, T. P. and Humphries, S. E.** (2009). Commentary PCSK9 variants: A new database. *Atherosclerosis* **203**, 32–3.

- Leren, T. P.** (2004). Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin. Genet.* **65**, 419–22.
- Li, H. and Liu, J.** (2012). The novel function of HINFP as a co-activator in sterol-regulated transcription of PCSK9 in HepG2 cells. *Biochem. J.* **443**, 757–68.
- Li, J., Tumanut, C., Gavigan, J.-A. A., Huang, W.-J. J., Hampton, E. N., Tumanut, R., Suen, K. F., Trauger, J. W., Spraggon, G., Lesley, S. A., et al.** (2007). Secreted PCSK9 promotes LDL receptor degradation independently of proteolytic activity. *Biochem J* **406**, 203–207.
- Li, H., Dong, B., Park, S. W., Lee, H. S., Chen, W. and Liu, J.** (2009). Hepatocyte nuclear factor 1alpha plays a critical role in PCSK9 gene transcription and regulation by the natural hypocholesterolemic compound berberine. *J Biol Chem* **284**, 28885–28895.
- Lilly, S. M. and Rader, D. J.** (2007). New targets and emerging therapies for reducing LDL cholesterol. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 650–5.
- Liscum, L. and Dahl, N. K.** (1992). Intracellular cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **33**, 1239–54.
- Liu, M., Wu, G., Baysarowich, J., Kavana, M., Addona, G. H., Bierilo, K. K., Mudgett, J. S., Pavlovic, G., Sitlani, A., Renger, J. J., et al.** (2010). PCSK9 is not involved in the degradation of LDL receptors and BACE1 in the adult mouse brain. *J. Lipid Res.* **51**, 2611–8.
- Lo, K. M., Sudo, Y., Chen, J., Li, Y., Lan, Y., Kong, S. M., Chen, L., An, Q. and Gillies, S. D.** (1998). High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells. *Protein Eng.* **11**, 495–500.
- Lo Surdo, P., Bottomley, M. J., Calzetta, A., Settembre, E. C., Cirillo, A., Pandit, S., Ni, Y. G., Hubbard, B., Sitlani, A. and Carfi, A.** (2011). Mechanistic implications for LDL receptor degradation from the PCSK9/LDLR structure at neutral pH. *EMBO Rep.* **12**, 1300–5.
- Longva, K. E., Blystad, F. D., Stang, E., Larsen, A. M., Johannessen, L. E. and Madshus, I. H.** (2002). Ubiquitination and proteasomal activity is required for transport of the EGF receptor to inner membranes of multivesicular bodies. *J. Cell Biol.* **156**, 843–54.
- Maletínská, L., Blakely, E. A., Bjornstad, K. A., Deen, D. F., Knoff, L. J. and Forte, T. M.** (2000). Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. *Cancer Res.* **60**, 2300–3.

- Mao, X., Kim, B.-E., Wang, F., Eide, D. J. and Petris, M. J.** (2007). A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **282**, 6992–7000.
- Marduel, M., Ouguerram, K., Serre, V., Bonnefont-Rousselot, D., Marques-Pinheiro, A., Erik Berge, K., Devillers, M., Luc, G., Lecerf, J.-M., Tosolini, L., et al.** (2012). Description of a Large Family with Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Associated with the APOE p.Leu167del Mutation. *Hum. Mutat.*
- Maxwell, K. N. and Breslow, J. L.** (2004). Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 7100–5.
- Maxwell, K. N., Fisher, E. A. and Breslow, J. L.** (2005). Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2069–2074.
- Mayer, G., Poirier, S. and Seidah, N. G.** (2008). Annexin A2 is a C-terminal PCSK9-binding protein that regulates endogenous low density lipoprotein receptor levels. *J. Biol. Chem.* **283**, 31791–801.
- McNutt, M. C., Lagace, T. A. and Horton, J. D.** (2007). Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 20799–803.
- McNutt, M. C., Kwon, H. J., Chen, C., Chen, J. R., Horton, J. D. and Lagace, T. A.** (2009). Antagonism of secreted PCSK9 increases low density lipoprotein receptor expression in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **284**, 10561–70.
- Miller, N. E.** (1979). Plasma lipoproteins, lipid transport, and atherosclerosis: recent developments. *J. Clin. Pathol.* **32**, 639–50.
- Mooser, V. and Darioli, R.** (2002). Formes monogéniques de dyslipidémie: à l'interface entre le laboratoire, le praticien et le patient. *Rev. Med. Suisse* No–617.
- Mousavi, S. A., Berge, K. E., Berg, T. and Leren, T. P.** (2011). Affinity and kinetics of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 binding to low-density lipoprotein receptors on HepG2 cells. *FEBS J.* **278**, 2938–50.
- Nanjee, M. N., Cooke, C. J., Wong, J. S., Hamilton, R. L., Olszewski, W. L. and Miller, N. E.** (2001). Composition and ultrastructure of size subclasses of normal human peripheral lymph lipoproteins: quantification of cholesterol uptake by HDL in tissue fluids. *J. Lipid Res.* **42**, 639–48.
- Nassoury, N., Blasiolo, D. A., Tebon Oler, A., Benjannet, S., Hamelin, J., Poupon, V., McPherson, P. S., Attie, A. D., Prat, A. and Seidah, N. G.** (2007). The cellular

- trafficking of the secretory proprotein convertase PCSK9 and its dependence on the LDLR. *Traffic* **8**, 718–32.
- Naureckiene, S., Ma, L., Sreekumar, K., Purandare, U., Frederick Lo, C., Huang, Y., Chiang, L. W., Grenier, J. M., Ozenberger, B. a, Steven Jacobsen, J., et al.** (2003). Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch. Biochem. Biophys.* **420**, 55–67.
- Nigon, F., Lesnik, P., Rouis, M. and Chapman, M. J.** (1991). Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res.* **32**, 1741–53.
- Olson, R. E.** (1998). Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.* **128**, 439S–443S.
- Pandit, S., Wisniewski, D., Santoro, J. C., Ha, S., Ramakrishnan, V., Cubbon, R. M., Cummings, R. T., Wright, S. D., Sparrow, C. P., Sitlani, A., et al.** (2008). Functional analysis of sites within PCSK9 responsible for hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* **49**, 1333–43.
- Park, S. W., Moon, Y.-A. and Horton, J. D.** (2004). Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J. Biol. Chem.* **279**, 50630–8.
- Patsch, J. R., Sailer, S., Kostner, G., Sandhofer, F., Holasek, a and Braunsteiner, H.** (1974). Separation of the main lipoprotein density classes from human plasma by rate-zonal ultracentrifugation. *J. Lipid Res.* **15**, 356–66.
- Perk, J., De Backer, G., Gohlke, H., Graham, I., Reiner, Z., Verschuren, W. M. M., Albus, C., Benlian, P., Boysen, G., Cifkova, R., et al.** (2012). European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by re. *Atherosclerosis* **223**, 1–68.
- Petrides, F., Shearston, K., Chatelais, M., Guilbaud, F., Meilhac, O. and Lambert, G.** (2013). The promises of PCSK9 inhibition. *Curr. Opin. Lipidol.* **24**, 307–12.
- Piper, D. E., Jackson, S., Liu, Q., Romanow, W. G., Shetterly, S., Thibault, S. T., Shan, B. and Walker, N. P. C.** (2007). The crystal structure of PCSK9: a regulator of plasma LDL-cholesterol. *Structure* **15**, 545–52.
- Poirier, S., Mayer, G., Benjannet, S., Bergeron, E., Marcinkiewicz, J., Nassoury, N., Mayer, H., Nimpf, J., Prat, A. and Seidah, N. G.** (2008). The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *J. Biol. Chem.* **283**, 2363–72.

- Poirier, S., Mayer, G., Poupon, V., McPherson, P. S., Desjardins, R., Ly, K., Asselin, M.-C., Day, R., Duclos, F. J., Witmer, M., et al.** (2009). Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J. Biol. Chem.* **284**, 28856–64.
- Qian, Y.-W., Schmidt, R. J., Zhang, Y., Chu, S., Lin, A., Wang, H., Wang, X., Beyer, T. P., Bensch, W. R., Li, W., et al.** (2007). Secreted PCSK9 downregulates low density lipoprotein receptor through receptor-mediated endocytosis. *J. Lipid Res.* **48**, 1488–98.
- Rashid, S., Curtis, D. E., Garuti, R., Anderson, N. N., Bashmakov, Y., Ho, Y. K., Hammer, R. E., Moon, Y.-A. and Horton, J. D.** (2005). Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5374–9.
- Roubtsova, A., Munkonda, M. N., Awan, Z., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Lazure, C., Cianflone, K., Seidah, N. G. and Prat, A.** (2011). Circulating proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (PCSK9) regulates VLDLR protein and triglyceride accumulation in visceral adipose tissue. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 785–91.
- Ruan, J., Li, H., Chen, Z., Coghlan, A., Coin, L. J. M., Guo, Y., Hériché, J.-K., Hu, Y., Kristiansen, K., Li, R., et al.** (2008). TreeFam: 2008 Update. *Nucleic Acids Res.* **36**, D735–40.
- Rudenko, G., Henry, L., Henderson, K., Ichtchenko, K., Brown, M. S., Goldstein, J. L. and Deisenhofer, J.** (2002). Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* **298**, 2353–8.
- Schaefer, E. J., Eisenberg, S. and Levy, R. I.** (1978). Lipoprotein apoprotein metabolism. *J. Lipid Res.* **19**, 667–87.
- Schoonjans, K., Brendel, C., Mangelsdorf, D. and Auwerx, J.** (2000). Sterols and gene expression: control of affluence. *Biochim. Biophys. Acta* **1529**, 114–25.
- Schroeder, F., Gallegos, A. M., Atshaves, B. P., Storey, S. M., McIntosh, A. L., Petrescu, A. D., Huang, H., Starodub, O., Chao, H., Yang, H., et al.** (2001). Recent advances in membrane microdomains: rafts, caveolae, and intracellular cholesterol trafficking. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **226**, 873–90.
- Seidah, N. G.** (2011). The proprotein convertases, 20 years later. *Methods Mol. Biol.* **768**, 23–57.
- Seidah, N. G. and Chrétien, M.** (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res.* **848**, 45–62.

- Seidah, N. G. and Prat, A.** (2007). The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J. Mol. Med. (Berl)*. **85**, 685–96.
- Seidah, N. G. and Prat, A.** (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 367–83.
- Seidah, N. G., Mowla, S. J., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Benjannet, S., Touré, B. B., Basak, A., Munzer, J. S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., et al.** (1999). Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1321–6.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Wickham, L., Marcinkiewicz, J., Jasmin, S. B., Stifani, S., Basak, A., Prat, A. and Chretien, M.** (2003). The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 928–933.
- Seidah, N. G., Mayer, G., Zaid, A., Rousselet, E., Nassoury, N., Poirier, S., Essalmani, R. and Prat, A.** (2008). The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1111–25.
- Seidah, N. G., Poirier, S., Denis, M., Parker, R., Miao, B., Mapelli, C., Prat, A., Wassef, H., Davignon, J., Hajjar, K. A., et al.** (2012). Annexin A2 is a natural extrahepatic inhibitor of the PCSK9-induced LDL receptor degradation. *PLoS One* **7**, e41865.
- Sekar, N. and Veldhuis, J. D.** (2004). Involvement of Sp1 and SREBP-1a in transcriptional activation of the LDL receptor gene by insulin and LH in cultured porcine granulosa-luteal cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287**, E128–35.
- Shan, L., Pang, L., Zhang, R., Murgolo, N. J., Lan, H. and Hedrick, J. A.** (2008). PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 69–73.
- Shanes, J. G.** (2012). A review of the rationale for additional therapeutic interventions to attain lower LDL-C when statin therapy is not enough. *Curr. Atheroscler. Rep.* **14**, 33–40.
- Sharotri, V., Collier, D. M., Olson, D. R., Zhou, R. and Snyder, P. M.** (2012). Regulation of epithelial sodium channel trafficking by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9). *J. Biol. Chem.* **287**, 19266–74.
- Shen, M. M., Krauss, R. M., Lindgren, F. T. and Forte, T. M.** (1981). Heterogeneity of serum low density lipoproteins in normal human subjects. *J. Lipid Res.* **22**, 236–44.

- Siezen, R. J. and Leunissen, J. A.** (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci.* **6**, 501–23.
- Skipiski, V. P., Barclay, M., Barclay, R. K., Fetzer, V. A., Good, J. J. and Archibald, F. M.** (1967). Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem. J.* **104**, 340–52.
- Sokolov, A. and Radhakrishnan, A.** (2010). Accessibility of cholesterol in endoplasmic reticulum membranes and activation of SREBP-2 switch abruptly at a common cholesterol threshold. *J. Biol. Chem.* **285**, 29480–90.
- Stein, E. A., Mellis, S., Yancopoulos, G. D., Stahl, N., Logan, D., Smith, W. B., Lisbon, E., Gutierrez, M., Webb, C., Wu, R., et al.** (2012a). Effect of a monoclonal antibody to PCSK9 on LDL cholesterol. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2425–6; author reply 2426.
- Stein, E. A., Gipe, D., Bergeron, J., Gaudet, D., Weiss, R., Dufour, R., Wu, R. and Porady, R.** (2012b). Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* **380**, 29–36.
- Steiner, G.** (2007). Atherosclerosis in type 2 diabetes: a role for fibrate therapy? *Diab. Vasc. Dis. Res.* **4**, 368–74.
- Strøm, T. B., Holla, Ø. L., Tveten, K., Cameron, J., Berge, K. E., Leren, T. P., Strom, T. B. and Holla, O. L.** (2010). Disrupted recycling of the low density lipoprotein receptor by PCSK9 is not mediated by residues of the cytoplasmic domain. *Mol Genet Metab* **101**, 76–80.
- Sun, L.-P., Li, L., Goldstein, J. L. and Brown, M. S.** (2005). Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J. Biol. Chem.* **280**, 26483–90.
- Sun, X., Essalmani, R., Day, R., Khatib, A. M., Seidah, N. G. and Prat, A.** (2012). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 deficiency reduces melanoma metastasis in liver. *Neoplasia* **14**, 1122–31.
- Sviridov, D. and Nestel, P.** (2002). Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* **161**, 245–54.
- Timms, K. M., Wagner, S., Samuels, M. E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M. H., Hopkins, P. N., Hunt, S. C. and Shattuck, D. M.** (2004). A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum. Genet.* **114**, 349–53.

- Tveten, K., Holla, Ø. L., Cameron, J., Strøm, T. B., Berge, K. E., Laerdahl, J. K. and Leren, T. P.** (2012). Interaction between the ligand-binding domain of the LDL receptor and the C-terminal domain of PCSK9 is required for PCSK9 to remain bound to the LDL receptor during endosomal acidification. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1402–9.
- Tveten, K., Strøm, T. B., Berge, K. E. and Leren, T. P.** (2013). PCSK9-mediated degradation of the LDL receptor generates a 17 kDa C-terminal LDL receptor fragment. *J. Lipid Res.* **54**, 1560–6.
- Van Kerkhof, P., Alves dos Santos, C. M., Sachse, M., Klumperman, J., Bu, G. and Strous, G. J.** (2001). Proteasome inhibitors block a late step in lysosomal transport of selected membrane but not soluble proteins. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2556–66.
- Wang, L.-J. and Song, B.-L.** (2012). Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 964–72.
- Wang, Y., Huang, Y., Hobbs, H. H. and Cohen, J. C.** (2012). Molecular characterization of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9-mediated degradation of the LDLR. *J. Lipid Res.* **53**, 1932–43.
- Woese, C. R. and Fox, G. E.** (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5088–90.
- Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L.** (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4576–9.
- Xiao, C. and Lewis, G. F.** (2012). Regulation of chylomicron production in humans. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 736–46.
- Xu, W., Liu, L. and Hornby, D.** (2012). c-IAP1 Binds and Processes PCSK9 Protein: Linking the c-IAP1 in a TNF- α Pathway to PCSK9-Mediated LDLR Degradation Pathway. *Molecules* **17**, 12086–101.
- Yamamoto, T., Lu, C. and Ryan, R. O.** (2011). A two-step binding model of PCSK9 interaction with the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **286**, 5464–70.
- Yu, A. and Malek, T. R.** (2001). The proteasome regulates receptor-mediated endocytosis of interleukin-2. *J. Biol. Chem.* **276**, 381–5.
- Zaid, A., Roubtsova, A., Essalmani, R., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Hamelin, J., Tremblay, M., Jacques, H., Jin, W., Davignon, J., et al.** (2008). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* **48**, 646–54.

- Zhang, D.-W., Lagace, T. A., Garuti, R., Zhao, Z., McDonald, M., Horton, J. D., Cohen, J. C. and Hobbs, H. H.** (2007). Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 18602–12.
- Zhang, D.-W. W., Garuti, R., Tang, W.-J. J., Cohen, J. C. and Hobbs, H. H.** (2008). Structural requirements for PCSK9-mediated degradation of the low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13045–13050.
- Zhao, Z., Tuakli-Wosornu, Y., Lagace, T. A., Kinch, L., Grishin, N. V, Horton, J. D., Cohen, J. C. and Hobbs, H. H.** (2006). Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote. *Am J Hum Genet* **79**, 514–523.
- Zhong, M., Munzer, J. S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S. J., Decroly, E., Chrétien, 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**, 33913–20.