

Université de Montréal

**PC7 : une protéase sécrétoire énigmatique ayant une
fonction de sheddase et un ciblage cellulaire unique**

par Lorelei Durand

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée

en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor* (Ph.D)

en biologie moléculaire

Avril 2019

© Lorelei Durand, 2019

Résumé

De nombreuses protéines issues de la voie sécrétoire sont synthétisées sous la forme de précurseurs clivés à un site de reconnaissance spécifique afin d'être activés. Ces clivages sont, entre autres, effectués le long de la voie sécrétoire et/ou à la surface cellulaire par les proprotéines convertases (PCs). Ces dernières sont tout d'abord synthétisées sous forme de zymogène (pro) et par la suite clivées auto-catalytiquement dans le réticulum endoplasmique (RE). Cependant, le prodomaine reste attaché à la PC jusqu'à atteindre la destination intracellulaire adéquate où les PCs se séparent (PC7) ou bien subissent un second clivage pour se libérer du pro-segment (Furine). PC7 est le plus ancien et hautement conservé membre de la famille des PCs. Récemment, des tests sur le comportement de souris dépourvues de PC7 (KO PC7) ont montré que ces souris étaient en santé. Cependant, elles présentent un phénotype anxiolytique puisqu'elles sont moins stressées que les souris de type sauvage (WT). Au contraire des souris, la perte du gène *PCSK7* chez le xénope et le poisson zèbre est létale. Finalement, l'action de protéase de PC7 sur les substrats est redondante avec d'autres PCs, à l'exception du récepteur humain de la transferrine 1 (hTfR1) qui est uniquement clivé par PC7 en une forme soluble (shTfR1).

Afin de comprendre la biologie cellulaire de PC7, nous nous sommes concentrés sur son trafic cellulaire. Pour commencer nous avons délété son domaine transmembranaire (TM) et la queue cytosolique (CT) résultant d'une drastique réduction de l'activité de clivage de PC7 sur hTfR1 et appuyant ainsi l'importance de la localisation membranaire de PC7 *via* son activité TMCT. Les CT chez l'humain et le xénope ne montrent que 35 % d'homologie mais, ces deux espèces clivent hTfR1. Nous nous sommes donc concentrés sur le rôle des acides aminés (aa) conservés entre ces espèces en utilisant des mutagénèses dirigées contre ces aa. Les analyses de localisation subcellulaire par immunofluorescence ainsi que des résultats d'immuno-buvardage de type Western blot de PC7 et de ses mutants E_{719,721} et L₇₂₅ de la CT ont mis en évidence l'importance de ces résidus pour l'activité de clivage de PC7 sur hTfR1. Une perte de L₇₂₅ engendre une relocalisation majeure de PC7 à la surface cellulaire et résulte d'une perte drastique de son activité clivage tout comme la perte de charge de E_{719,721}. Ainsi, nous avons démontré qu'un motif ExExxxL₇₂₅ présent dans la CT régulait l'efficacité de clivage de PC7 sur hTfR1 dans les endosomes en affectant le transport subcellulaire de PC7 et/ou son recyclage au Trans-Golgi (TGN). Des études de résonance

magnétique nucléaire (NMR) sur une séquence peptidique de 14 aa reproduisant la séquence composée du motif ExExxxL ou de son mutant ont révélé que les trois résidus étaient exposés sur un même plan. Le mutant montre, quant à lui, une courbure au niveau de ce motif. L'analyse de possibles partenaires au motif ExExxxL nous a permis d'identifier la protéine adaptatrice 2 (AP-2) comme nouveau régulateur de transport et conséquemment d'activité de clivage de PC7.

De récentes données en immunocytochimie montrèrent que PC7 mature semble se séparer de son pro-segment à la surface cellulaire. Cependant, aucune activité de clivage de PC7 n'a été montrée à la surface. Il est possible que la forme mature et/ou le pro-segment soient liés en surface à des facteurs de régulation. Une éventualité est que la protéine Cab45 se liant au calcium et connue pour transporter les protéines du TGN à la surface, puisse intervenir dans l'activation/régulation de PC7. Plus précisément, Cab45 pourrait réguler le transport et/ou l'activité de PC7 en prévenant la séparation de PC7 de son pro-segment. Nos résultats préliminaires montrent qu'une surexpression de Cab45 réduit de près de 50% l'activité de PC7 sur hTfR1 sans affecter la localisation de hTfR1.

Mots-clés : proprotéine convertase type 7 (PC7), proprotéine convertase subtilisine/kéxine type 7 (PCSK7), transferrine récepteur 1 (TfR1), queue cytosolique; protéine adaptatrice 2 (AP-2), calcium-binding protein 45 (Cab45), clivage, trafic

Abstract

Many secretory proteins are synthesized as precursors that are cleaved at specific sites to become activated. Most of these cleavages are achieved along the secretory pathway and/or at the cell surface by the proprotein convertases (PCs). The latter are first synthesized as zymogens (pro) that are subsequently auto-catalytically cleaved in the endoplasmic reticulum (ER). However, the prodomain and PC remain non-covalently associated until they reach specific intracellular organelles where they either separate (e.g., PC7) or undergo a second cleavage before separation (e.g., Furin). PC7 is the most ancient and highly conserved PC-family member. Recent behavioral tests show that PC7 KO mice are healthy and have a normal lifespan but exhibit an anxiolytic and novelty-seeking behaviors. In contrast, PC7 knockdown is lethal in lower species such as xenopus and zebrafish. PC7 uniquely sheds human transferrin receptor 1 (hTfR1) into soluble shTfR1.

To elucidate the link between biological activities and physiological roles of PC7, we first concentrated on the cellular trafficking of PC7. Thus, we deleted the PC7 transmembrane domain (TM) and cytosolic tail (CT), resulting in a drastic reduction in the activity of PC7 on hTfR1, emphasizing the importance of the membrane localization of PC7 *via* its TMCT for activity. Since human and xenopus CTs are 35% identical and yet both proteins can shed hTfR1, we focused on the role of the conserved amino acids in the CT of human PC7 using deletions and site-directed mutagenesis. Immunocytochemical analysis of the subcellular localization of wild type (WT) and CT mutants, and Western blot analyses of L₇₂₅ and E_{719,721} mutants, were used to assess the importance of these residues on the activity of PC7 on hTfR1. The data show that lack of the L₇₂₅ motif leads to a major re-localization of PC7 to the cell surface, resulting in a drastic loss of activity. The loss of the negative charge of E_{719,721} influences the subcellular endosomal localization of PC7, both mutants results in a reduction in the activity of PC7. Finally, we demonstrate that an ExExxxL motif in the CT significantly regulates the efficacy of PC7 cleavage activity on hTfR1 in endosomes, likely by affecting the subcellular trafficking of active PC7 and/or its recycling to the TGN. Current NMR studies of a 14 aa peptide encompassing this sequence and its mutants point to a specific structural element in this motif. Analyses of possible partners to the ExExxxL motif led to the identification of AP-2 as a new regulator of PC7 trafficking and hence cleavage activity.

Our recent immunocytochemical data revealed that mature PC7 seems to separate from its inhibitory prodomain at the cell surface. However, PC7 activity is not present at the cell surface. A possibility is that mature PC7 and/or its prosegment are bound to a cell surface to regulating factor. This led us to test the possibility that the calcium-dependant Cab45 known to release soluble cargo proteins from the TGN to the cell surface. No report appeared on a possible role of Cab45 on membrane-bound cargo proteins. Cab45 could regulate the traffic and/or activity of PC7 by preventing the separation of PC7 from its prosegment. Our recent data suggests that Cab45 overexpression reduces by ~50% the activity of PC7 on hTfR1, without affecting the hTfR1 trafficking.

Keywords: proprotein convertase type 7 (PC7), proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (PCSK7), transferrin receptor 1 (TfR1), cytosolic tail (CT), adaptor protein 2 (AP-2), calcium-binding protein 45 (Cab45), cleavage, traffic

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Les proprotéines convertases	3
1.1.1 Généralités sur la famille des protéases	3
1.1.2 Structure et fonction des proprotéines convertases.....	6
1.1.2.1 Découverte de la famille des proprotéines convertases.....	6
1.1.2.2 Structure, activation et fonction	7
1.1.2.3 Localisation subcellulaire et tissulaire des PCs actives.....	10
1.1.2.4 Les PCs : Entre spécificité et redondance de fonction	11
1.1.2.5 Rôle physiologique et physiopathologique des proprotéines convertases	12
1.2 PC7, de son activation à sa fonction de sheddase	16
1.2.1 Découverte de la proprotéine convertase 7	16
1.2.2 La structure du gène <i>PCSK7</i>	17
1.2.3 Étude d'association pangénomique (GWAS) et découverte de nouvelles associations avec <i>PCSK7</i>	20
1.2.4 PC7 et l'évolution, les différences entre les espèces	22
1.2.4.1 Les espèces non mammifères	22
1.2.4.2 Les mammifères, impact de la perte de PC7 <i>in vivo</i>	23
1.2.5 Caractérisation de la proprotéine convertase 7	25
1.2.5.1 Structure de la protéine PC7.....	25
1.2.5.2 Autoclivage et activation de PC7	25
1.2.5.3 Les modifications post-traductionnelles de PC7	26
1.2.6 Les substrats de PC7	30

1.2.6.1 L'inflammation et la neurodégénérescence.....	30
1.2.6.2 Le développement	33
1.2.6.3 La prolifération cellulaire et vasculaire.....	33
1.2.6.4 Les cancers	35
1.2.6.5 Le métabolisme lipidique	35
1.2.6.6 L'homéostasie du fer	36
1.3 Le trafic cellulaire de PC7 et ses possibles acteurs	39
1.3.1 Localisation subcellulaire et transport de PC7.....	39
1.3.1.1 Importance du TMCT pour le transport et l'activité de clivage de PC7	41
1.3.1.2 La voie non conventionnelle	42
1.3.2 Les endosomes	43
1.3.2.1 L'endocytose	43
1.3.2.2 La famille des endosomes	44
1.3.2.3 La régulation du transport vésiculaire	45
1.3.3 La Furine et PC7, entre spécificité et redondance	47
1.3.4 Les possibles partenaires de régulation de PC7.....	48
1.3.4.1 Les protéines adaptatrices.....	48
1.3.4.2 Le rétromère et les protéines GGA.....	50
1.3.4.3 D'autres exemples de motifs associés au transport protéique	51
1.3.4.4 Cab45 (calcium-binding protein 45)	52
Hypothèse et objectifs:.....	54
Chapitre 2 : Le motif ExExxxL de la queue cytosolique de la proprotéine convertase sécrétoire humaine 7 régule son transport et son activité de clivage	55
2.1 Résumé	57
2.2 Contribution	57
2.3 Manuscrit.....	58
2.3.1 Abstract	58
2.3.2 Introduction.....	59
2.3.3 Results.....	61
2.3.3.1 Critical CT-residues for the PC7-induced cleavage of hTfR1	61

2.3.3.2 A new ExExxxL motif in the CT of human PC7 is important for its cleavage activity.....	62
2.3.3.3 NMR secondary structure prediction of the ExExxxL motif in the CT of human PC7.....	63
2.3.3.4 Subcellular localization of human PC7 and its CT mutants.....	64
2.3.3.4 AP-2 is necessary for PC7 endosomal sorting and shedding activity on hTfR1 .	66
2.3.4 Discussion	68
2.3.5 Experimental procedures	71
2.3.5.1 Plasmids.....	71
2.3.5.2 Cell culture and transfections	71
2.3.5.2 SiRNA and quantitative RT-PCR.....	72
2.3.5.3 Western Blot analysis	72
2.5.3.4 Co-Immunoprecipitation	73
2.5.3.5 Peptide Synthesis.....	73
2.5.3.6 NMR studies.....	74
2.5.3.7 Immunofluorescence	75
2.5.3.8 Statistical immunofluorescence analysis.....	76
2.5.3.9 Statistical analysis	76
2.3.6 Acknowledgements.....	77
2.3.7 Figures.....	78
2.3.8 Figures legends	92
Chapitre 3: Régulation du trafic et de l'activité de PC7 par Cab45 et le calcium.....	98
3.1 Résumé.....	99
3.2 Contribution	99
3.3 Manuscrit.....	100
3.3.1 Abstract	100
3.3.2 Introduction.....	101
3.3.3 Results.....	103
3.3.3.1 Human mature PC7 separates from its prodomain at the cell surface.....	103
3.3.3.2 Cab45 and PC7 localize in the same mouse tissues	104
3.3.3.3 Cab45 regulates hPC7 cleavage activity	104

3.3.3.4 PC7 is release from the TGN by Cab45	105
3.3.3.5 Cab45 and Ca ²⁺ regulate the localization and activation of PC7 at the cell surface	105
3.3.4 Discussion	106
3.3.5 Experimental procedures	108
3.3.5.1 Plasmids.....	108
3.3.5.2 Cell culture and transfections	108
3.3.5.4 Western Blot analysis	109
3.3.5.5 <i>In situ</i> hybridization.....	110
3.3.5.6 Immunofluorescence	110
3.3.5.7 Statistical immunofluorescence analysis.....	111
3.3.6 Acknowledgements.....	111
3.3.7 Figures.....	112
3.3.8 Figure legends.....	118
Chapitre 4: Discussion et conclusion	121
4.1 Discussion	122
4.1.2 La duplication de PCSK7 et son effet sur VEGFR-2	123
4.1.3 D'autres motifs potentiels dans la CT de PC7	124
4.1.4 Des modifications post-traductionnelles encore incomprises.....	125
4.1.5 La voie non conventionnelle.....	125
4.1.6 PC7, un potentiel candidat comme cible thérapeutique.....	127
4.2 Conclusion	128
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Les proprotéines convertases : Expression et localisation subcellulaire	11
Tableau II.	Association entre les variants de <i>PCSK7</i> et la régulation du métabolisme.....	20
Tableau III.	Comparaison des séquences protéiques de <i>PC7</i> chez différentes espèces.....	23
Tableau IV.	Motifs de reconnaissance de protéines cargo et trafic intracellulaire.....	50

Liste des figures

Figure 1.1 Arbre phylogénétique simplifié de la famille des protéases.....	5
Figure 1.2 La famille des proprotéines convertases.....	9
Figure 1.3 Implication des proprotéines convertases dans les maladies.....	15
Figure 1.4 Localisation du gène humain <i>PCSK7</i> sur le chromosome 11.....	17
Figure 1.5 Arbre phylogénétique des proprotéines convertases issues de la kexine.	19
Figure 1.6 Maturation de PC7 et modifications post-traductionnelles le long de la voie sécrétoire.	29
Figure 1.7 Alignement de séquences des domaines transmembranaires (TM) des protéines humaines PC7 et Furine.	30
Figure 1.8 Activité de clivage de PC7 sur hTfR1 en présence de PAR-1.....	32
Figure 1.9 Clivage de hTfR1 par PC7	37
Figure 1.10 La régulation de l'homéostasie du fer par PC7 et la Furine.	38
Figure 1.11 Localisation subcellulaire et trafic de PC7 et de la Furine le long de la voie conventionnelle.	40
Figure 1.12 : L'endocytose et le trafic endosomal.....	46
Figure 1.13 : Sortie de protéines cargos du Trans-Golgi par Cab45	53
Figure 2.1. The cytosolic tail of PC7 is essential for its cleavage activity.	92
Figure 2.2. A new ExExxxL motif in the CT of human PC7 is important for its cleavage activity.	92
Figure 2.3. The cartoon representation of solution NMR structure of the human PC7 14-mer CT peptide (aa 717-730) and its Ala mutant.	93
Figure 2.4. Localization of human PC7 and its CT mutants with Trans-Golgi Network.	93
Figure 2.5. Localization of human PC7 and its CT mutants with early endosomes.	93
Figure 2.6. Localization of human PC7 and its CT mutants at the cell surface.....	94
Figure 2.7. Overexpression of adaptor-proteins (AP) and localization of human PC7 and its CT mutants with early endosomes.	94
Figure 2.8. Adaptor-protein 2 regulates the hTfR1 cleavage activity of PC7.	94
Figure 2.9. Schematic representation of PC7 trafficking and cleavage activity.	95

Supporting information Figure S2.1. The cytosolic tail of PC7 is essential for its cleavage activity.....	95
Supporting information Figure S2.2. The cytosolic tail of PC7 is essential for its cleavage activity.....	96
Supporting information Figure S2.3. Localization of human PC7-CT mutants in the Trans-Golgi network or early endosomes.	96
Supporting information Figure S2.4. Overexpression of adaptor-proteins (AP) and localization of human PC7 or its CT mutant with TGN.....	96
Figure 3.1. Human mature PC7 separates from its prodomain at the cell surface for its cleavage activity.....	118
Figure 3.2. Cab45 and PC7 localize in the same tissues.....	118
Figure 3.3. Cab45 regulates hPC7 cleavage activity.	118
Figure 3.4. Localization of hTfR1 is not impaired by Cab45.....	119
Figure 3.5. PC7 localization in the TGN is affected in the presence of Cab45.....	119
Figure 3.6. Localization of HApro-hPC7-V5 at the cell surface is influenced by Cab45 and Ca ²⁺	120

Liste des abréviations

ab: antibody

ADAM: a disintegrin and metalloproteinase

AP: protéine adaptatrice/adaptor protein

Arf : ADP-ribosylation factor

Apo: apolipoprotéine

APP: amyloid precursor protein

aa: acides aminés/amino acids

BDNF: bone derived neutrophile factor

BFA: brefeldin A

BiP: binding immunoglobulin protein

BMP: bone morphogenic protein

Ca²⁺: calcium

CVML: cellules vasculaires de muscles lisses

Cab45: calcium-binding protein 45

CCK: cholecystokinin

CLIP: cell-linked indicator of proteolysis

CT: queue cytosolique/cytosolic tail

EE: endosomes précoces/early endosome

EEA1: early endosome 1

EGF: epidermal growth factor

ER: endoplasmic reticulum

GAP: GTPase activating protein

GDF: GDI displacement factor

GDI: GDP dissociation inhibitor

GDP: guanine diphosphate

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GGA: golgi-associated γ -ear-containing ARF binding protein

GTP: guanine triphosphate

GWAS: genome-wide association studies

HAND: HIV-associated neurocognitive disorder

hPC7: humain proprotéine convertase 7

HDL: high density lipoprotein

HSPG: heparan sulfate proteoglycan

hTfR1: récepteur humain de la transferrine 1/ human transferrin receptor 1

IGF-1/IGFR: insulin-like growth factor/receptor

Kex2p: Kexine 2

KO: invalidation génétique/ knock-out

LDLR: low-density lipoprotein receptor

LE : late endosome

LPC: lymphoma proprotéine convertase

MCV: maladies cardio-vasculaires

MMP: métallo-protéases matricielles

MPR: mannose-6-phosphate récepteur

MPT: modifications post-traductionnelles

NGF: nerve growth factor

NORM: novel object recognition memory

NMR: résonance magnétique nucléaire/nuclear magnetic resonance

P1: position 1

PACE4: paired basic amino acid cleaving enzyme 4

PACS-1: phosphofurin acidic cluster sorting protein 1

PAR-1: proteinase-activated receptor 1

PC: proprotéine convertase

PCSK: proprotéine convertase subtilisine/kéxine

pro: pro-domaine, pro-segment/ prodomain

pS: Ser-phosphorylated

RE: réticulum endoplasmique

RVPAT: retour veineux pulmonaire anormal total

sdLDL: small dense low-density lipoprotein

shTfR1: forme soluble du récepteur humain de la transferrine 1

siRNA: small interference RNA

SKI-1/S1P: subtilisin kexin isoenzyme-1/site-1 protease

SNP: single nucleotide polymorphism

SP: signal peptide

SPCA1: secretory pathway calcium ATPase1

SPC7: subtilisin-like proprotein convertase 7

SREBP: sterol regulatory element binding proteins

STFP: social transmission of food preference

STRING: search tool for the retrieval of interacting genes/proteins

TG: triglycérides

TGF: transforming growth factor

TGN: réseau Trans-Golgi / Trans-Golgi Network

TfR: récepteur de la transferrine/transferrin receptor 1

TM: domaine transmembranaire/transmembrane domain

VEGF/VEGFR: vascular endothelial growth factor/receptor

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

WT: type sauvage/ wild type

La folie, c'est se comporter de la même manière et s'attendre à résultat différent.

Albert Einstein

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Nabil G. Seidah d'être venu me parler à la cafétéria au deuxième étage et de m'avoir proposé une place dans son laboratoire pour effectuer ma thèse. Ce fût le début de nombreuses heures de discussions scientifiques. J'ai énormément appris que ce soit scientifiquement ou humainement parlant à ses côtés. Le Dr Seidah m'a également donné la chance d'aller à plusieurs conférences plus enrichissantes les unes que les autres. Enfin merci Nabil pour toutes ses discussions hors science qui m'ont fait grandir et m'ont éclairé sur mon futur, je garderai en mémoire un directeur passionné de science mais aussi très drôle!

J'aimerais remercier l'ensemble des membres de mes comités de suivi pour leurs expertises scientifiques et de m'avoir poussé lors de ces comités : Dr Stéphane Laporte, Dr Stéphane Lefrançois et Dr Jean-François Côté.

Un merci aux membres du jury final d'avoir acceptés de juger ma défense de thèse : le président Dr Jean-François Côté, les membres du jury Dr Stéphane Laporte et Dr Stéphane Lefrançois, mon directeur de thèse Dr Nabil G. Seidah et le représentant de la doyenne Dr Richard Bertrand.

J'aimerais également remercier Dr Richard Bertrand, directeur du programme de Biologie Moléculaire et Dr Jean-François Côté, qui fut mon référant académique, et Lucie l'adjointe administrative du programme pour leur aide, leurs conseils, et leur appui pour les prolongations trimestrielles de ma thèse. C'est vraiment fortement apprécié.

J'aimerais remercier Annik, tu as été d'un grand soutien moral pendant les baisses de moral et d'une écoute pendant les mauvaises périodes personnelles et aussi merci pour ton œil d'artiste. Je ne l'oublierai pas (ainsi que mes vitamines!)

J'aimerais remercier Johann qui m'a pris sous sa coupe et appris à aimer PC7 dans la bonne humeur! Dommage que tu sois parti si vite.

J'aimerais remercier l'ensemble des membres du laboratoire : "les mémoires du laboratoire " Josée, Ann, Edwige, Anna, les associés et les assistantes Rachid, Delia, Marie-Claude, Valérie, Sandrine, Alexandra (merci pour tous ces clones!) pour leurs conseils

techniques précieux mais aussi pour les pauses discussions toutes plus enrichissantes les unes que les autres. Merci à Brigitte, l'adjointe administrative pour son aide précieuse pour toute la logistique administrative pendant ces six années (et la gestion de soumission d'article!). Merci aux étudiants et post-doc passés et présents du labo Stéphanie (pour ce Co-IP, ces chansons de beaux ponceaux ...), Vatsal, Ali, Julie, Yahya, Sahar, Sepideh, Elodie, Pui, Johann, Emmanuelle, Maryssa, Grisel, Jin pour votre vivacité dans le laboratoire. Lâchez-pas! Il semblerait qu'il y ait bien une fin au doctorat/post-doc!

Merci aux personnes ayant pris le temps de relire ma thèse pendant leur temps libre : Alain, Johann, ce fut d'une grande aide!

Un merci spécial à mes collègues, amies et confidentes Elodie et Emmanuelle. La thèse aurait été bien plus difficile sans vous... Vive le chocolat, les sushis et les sorties!

Merci aux collègues des couloirs et pauses repas pour leur bonne humeur : Philippe, Fanny, Francine, Pierre, Dan, Myriam, Monica, Carolina, Marie, Marc, Julie....

Merci aux personnes qui alimentent mon quotidien, mes amis Pierrette, Dovid, Dany, Jérem, Romain, Jamal, Wascar, Jean, Sarah, Yanish, Pascaline, Cyril, Jeff, Claudie... Votre soutien a été inconditionnel tout au long de ces années de doctorat j'ai pu m'évader un temps de la science grâce à votre présence.

Finalement merci à ma belle-famille et ma famille pour votre soutien moral de près ou de loin de l'autre côté de l'Atlantique. Vous vous êtes toujours soucieux de l'avancement de ma thèse et m'avez toujours soutenu. Plus précisément un énorme merci à ma maman/secrétaire/psychologue/faiseuse de bonne humeur de m'avoir soutenue, écoutée et toujours motivée pendant cette thèse. Et un merci à mon Pier-Luc, qui me supporte depuis plus de 2 ans et demi dans mon quotidien d'étudiante, merci de croire en moi et de m'appuyer...

Chapitre 1 : Introduction

Ce travail de thèse a pour but d'étudier la régulation et la fonction de la proprotéine convertase 7 (PC7) en se focalisant sur la régulation de son transport et de son activité de clivage le long de la voie sécrétoire conventionnelle. Dans mon chapitre d'introduction je commencerai, dans un premier temps, par une description de la famille des proprotéines convertases, puis, dans un second temps, je me focaliserai sur l'ensemble de la littérature concernant PC7 et de son rôle en tant que protéase. La dernière partie de cette introduction résumera l'ensemble des connaissances essentielles en biologie cellulaire sur le transport protéique ainsi que les partenaires possibles de PC7 dans le but de démystifier la régulation et le trafic cellulaire de cette convertase. L'ensemble de cette introduction me permettra de poser une hypothèse et des objectifs. Je répondrai à ces objectifs en deux chapitres écrits sous forme d'articles (un article soumis dans *Journal of Biological Chemistry* et un article en préparation). Une conclusion et discussion sur l'ensemble de ce travail viendront clôturer ce manuscrit.

1.1 Les proprotéines convertases

La diversité humaine est possible grâce aux 20 000 gènes connus pour coder des protéines. À la suite de leur biosynthèse protéique, les protéines subissent des modifications chimiques les rendant uniques dans leur rôle structural ou physiologique. Plus de 200 modifications post-traductionnelles (MPT), réversibles ou non, ont été identifiées et représentent une excellente stratégie pour accroître cette diversité en donnant naissance à un nombre encore mal estimé d'environ 100 000 à plusieurs millions de protéines^{1; 2}. L'ensemble de ces MPT remanie la structure et/ou la fonction de la protéine lors de différents processus cellulaires tels que le cycle cellulaire, le développement, la mort cellulaire ou la régulation cellulaire³. Parmi les MPT réversibles les plus connues citons, l'acétylation, la phosphorylation ou encore la méthylation. Les MPT plus drastiques du fait de leurs irréversibilités incluent entre autres la N-glycosylation, la sulfatation et la protéolyse.

1.1.1 Généralités sur la famille des protéases

La protéolyse est caractérisée par le clivage d'une protéine cible à un lien covalent prédéfini par l'intermédiaire d'une enzyme de type protéase pour donner naissance à deux segments distincts actifs ou non⁴. Ces événements protéolytiques ont pour but de diriger la destinée des autres protéines en agissant sur différents processus tels que le contrôle cellulaire, la mort ou survie cellulaire, la défense immunitaire, l'angiogenèse ou le développement^{4; 5}.

Actuellement, plus de 600 protéases⁶ sont répertoriées et connues sous le nom de dégradome^{4; 7}. Des analyses génomiques comparatives entre l'humain, la souris et le chimpanzé ont montré une homologie de 82% entre le dégradome humain et murin tandis que le chimpanzé possède plus de 99% d'identité avec le dégradome humain^{4; 7}. Ces analyses mettent en évidence la conservation des protéases dans les différentes espèces et suggèrent ainsi le rôle essentiel des protéases dans la régulation physiologique.

Initialement, les protéases étaient divisées en deux sous-groupes selon la localisation du site de clivage : les endopeptidases (cassure du lien covalent à l'intérieur du substrat) et les exopeptidases (cassure aux extrémités NH₂ et COOH de la protéine ciblée)⁵. Ce clivage correspond à une réaction chimique de type hydrolyse autorisant la cassure d'un lien covalent par une molécule d'eau⁸. Cependant, le mécanisme d'action de ces enzymes a mené à une nouvelle classification selon leur site catalytique donnant lieu à cinq familles distinctes chez les mammifères^{9; 10} : les métalloprotéases, les protéases à cystéine, les protéases aspartiques, et finalement les protéases à thréonine et de type sérine^{4; 6} (**Figure 1.1**):

- Les métalloprotéases se caractérisent par la présence d'un ion métallique dans le site actif, divisant cette famille en deux sous-groupes selon le site de catalyse: les MMPs (métalloprotéases matricielles) composées d'un ion de zinc sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et l'inflammation¹¹; les ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase*) interviennent auprès des protéines transmembranaires et sécrétoires et régulent la migration et l'adhésion cellulaire¹².

- Les protéases à cystéine (cathepsines, caspases, papaine) jouent principalement un rôle dans l'apoptose dans le cytosol et la dégradation lysosomale et sont dépendantes de la teneur en pH pour être actives^{13; 14}.

- Les protéases à thréonine ont au centre de leur triade catalytique une thréonine. Ce résidu nucléophile est essentiel pour la première étape de la catalyse puisqu'il attaque le substrat pour former un intermédiaire avant de procéder à la seconde étape, l'hydrolyse.¹⁵

- Les aspartiques (rénine, cathepsines D et E) composent la famille des protéases la moins abondante¹⁶. L'activité de cette famille est favorisée par un environnement acide⁹, mais dans certains cas comme l'aspartyl protéase du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine), un environnement neutre est utilisé.

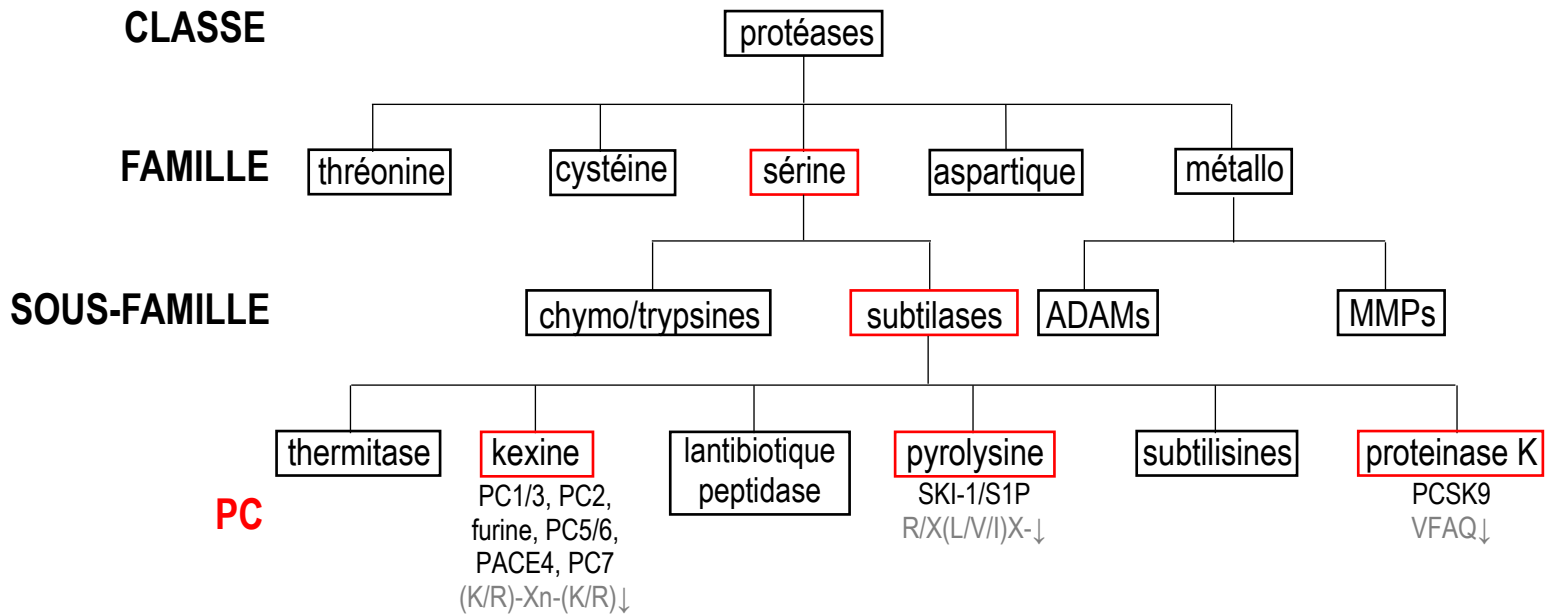


Figure 1.1 Arbre phylogénétique simplifié de la famille des protéases.

Cette figure illustre les différents groupes de protéases classés selon les homologies de séquence catalytique. (Figure adaptée de Siezen et al., 1997¹⁷ et Seidah et Chrétien, 1999¹⁸).

- La dernière famille, qui représente environ 1% de l'ensemble des protéines, est composée des protéases à sérine et se divise en deux principales sous-familles: les trypsines/chymotrypsines et les subtilases¹⁰. Ces deux sous-familles utilisent la même triade catalytique (une sérine (Ser), une histidine (His) et un résidu aspartique (Asp)¹⁷) mais diffèrent par la configuration de la structure secondaire du module catalytique. La sous-famille des subtilases tire son nom de son homologie de séquence avec la triade catalytique de la subtilisine bactérienne *Bacillus subtilis*¹⁹. Plus de 200 subtilases sont actuellement répertoriées et divisées en six familles selon leurs homologies de séquence (les subtilisines, les thermitases, les protéïnases K, les pyrolysines, les peptidases lantibiotiques et les

kexines)¹⁷ (**Figure 1.1**). Les proprotéines convertases (PCs) sont un exemple de protéases à sérine, appartenant à la sous-famille des subtilases²⁰.

De nombreuses maladies sont associées à des altérations des protéases soit au niveau génétique (mutation ou épigénétique) ou par la dégradation du système protéolytique (inhibiteurs, substrats, facteurs de régulation)⁵. Ainsi, les protéases représentent actuellement un intérêt pharmaceutique car elles sont une cible thérapeutique avantageuse et peuvent également être utilisées comme biomarqueurs lors de diagnostics⁵. Cependant cette approche peut être rapidement freinée puisqu'il est rare qu'une protéase ne cible qu'un seul substrat, il est donc difficile d'avoir une spécificité de substrat absolue, rendant l'étude des protéases complexe. Toutefois, la localisation des protéases ainsi que leurs environnements (co-facteurs, récepteurs, adaptateurs) vont faciliter cette spécificité de substrat.

1.1.2 Structure et fonction des proprotéines convertases

1.1.2.1 Découverte de la famille des proprotéines convertases

Découverte entre 1990 et 2003²¹⁻²³, la famille des proprotéines convertases se compose de neuf membres : PC1/3, PC2, Furine, PC4, PACE4 (*paired basic amino acid cleaving enzyme 4*), PC5/6, PC7, SKI-1/S1P (*subtilisin kexin isoenzyme-1/site-1 protease*) et PCSK9 (proprotéine convertase subtilisine/kexine 9) (**Figure 1.2**). Cette famille est catégorisée dans les protéases à sérine de type subtilase puisqu'elle possède environ 23 à 28% d'identité, selon la PC, avec le module catalytique de la subtilisine (triade catalytique Ser-His-Asp)²⁰.

Les PCs clivent spécifiquement leurs substrats selon un motif de reconnaissance. Pour l'ensemble des sept premiers membres (PC1/3, PC2, Furine, PC4, PACE4, PC5/6, PC7), il existe une homologie de séquence (44-46%) avec le site catalytique de la Kexine 2 (Kex2p), une sérine protéase présente chez la levure et connue pour cliver une pro-hormone dépendamment du calcium (Ca²⁺)^{20; 21}. Tout comme la Kex2p, ces sept membres reconnaissent un motif de clivage composé d'acides aminés basiques: (K/R)-2(Xn)-(K/R)↓, où R est une arginine (Arg), K une lysine (Lys), n = 0, 1, 2, 3 et X un acide aminé (aa) autre qu'une cystéine

(Cys) ou une Proline (Pro)²⁴. En position 1 (P1), l'Arg est préférée à la Lys. L'ensemble des sept premières PCs est ainsi classé dans la famille des subtilases de type Kexine (**Figure 1.1**). Ces enzymes activent ou inactivent des facteurs de croissance, récepteurs, enzymes, hormones ou encore des protéines de type viral dans différents compartiments cellulaires (granules de sécrétion, appareil de Golgi, endosomes) à la surface cellulaire ou de façon extracellulaire (matrice extracellulaire)¹⁰.

SKI-1/S1P est le huitième membre de la famille des PCs. Cette protéase connue pour intervenir dans l'homéostasie du cholestérol et des acides gras²⁵ appartient, par son homologie de séquence, à la famille des pyrolysines (**Figure 1.1**). Elle reconnaît un motif hydrophobe de type R/X(L/V/I)X↓ où X représente un aa autre qu'une Cys ou une Pro^{26; 27}, L est une leucine (Leu), I une isoleucine (Ile) et V une Valine (Val). SKI-1 active des facteurs de transcription tel que SREBP 1 et 2 (*sterol regulatory element binding proteins 1 and 2*)²⁶.

Le dernier membre des PCs, PCSK9, se classe dans la famille des subtilases associées à la protéinase K (**Figure 1.1**). PCSK9 joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du cholestérol et des lipides²⁸. En particulier, l'interaction entre PCSK9 et le récepteur du cholestérol, le LDLR (*low-density lipoprotein receptor*), permet le transport de ce récepteur aux endosomes puis aux lysosomes afin de le dégrader^{29; 30}. Il s'agit dans ce cas d'une action non-enzymatique. Une autre spécificité de PCSK9 est qu'il n'ait d'autres substrats que lui-même. PCSK9 s'autoactive au niveau de son site de reconnaissance de clivage non basique de type VFAQ↓^{28; 31}.

1.1.2.2 Structure, activation et fonction

Concernant leur structure, les proprotéines convertases sont constituées en N-terminal, d'un peptide signal (SP), suivi d'un pro-segment (pro), d'un domaine catalytique et d'un P-domaine¹⁰. Les régions C-terminales diffèrent et confèrent une identité unique à chacun de ces neuf membres (**Figure 1.2**).

Suite à la transcription, les protéines nouvellement traduites vont rester, pour la plupart, dans le cytosol. Cependant, le peptide signal présent en N-terminal des PCs va les adresser vers le réticulum endoplasmique (RE) dans le but de les aiguiller vers la voie sécrétoire³², dans un

compartiment où elles vont perdre le peptide signal³³. Dans le RE, les PCs sont sous la forme de zymogène, c'est-à-dire une enzyme inactivée par la présence du pro-segment agissant comme auto-inhibiteur et chaperonne intra-moléculaire³⁴. Un premier clivage auto-catalytique du pro se produit, celui-ci reste cependant toujours attaché et les PCs continuent leur chemin le long de la voie sécrétoire et régulée (appareil de Golgi, surface cellulaire, endosomes, granules de sécrétion) sous forme inactive³⁴. Il est à noter que PC2 est la seule PC dont le pro-segment n'est pas clivé dans le RE, puisqu'elle possède sa propre chaperonne, la protéine 7B2, qui maintient PC2 sous sa forme inactive jusqu'aux granules de sécrétion immatures^{35; 36}. Le pro-segment, présent sur l'ensemble des PCs, a pour action de garder l'enzyme inactive lors de la synthèse et du repliement de la protéine mais également de prévenir de l'activation des PCs dans les mauvais compartiments cellulaires⁴.

Un second clivage du pro est nécessaire à l'activation de la plupart de ces PCs, cependant ce clivage s'effectue dans des organelles différentes selon les PCs. Par exemple, pour la Furine, ce deuxième clivage se fait dans le Trans-Golgi (TGN)^{34; 37} alors que PACE4 et PC5 deviennent actives à la surface cellulaire par interaction avec l'*heparan sulfate proteoglycan* (HSPG)^{38; 39}. SKI-1 s'active dans les compartiments *cis*- et *medial* du Golgi⁴⁰. PC4 et PC7 ne subissent pas de second clivage du pro-segment mais se séparent de ce dernier afin de devenir actives^{41; 42}. Le mécanisme d'action de PC7 est encore méconnu pour cette étape de séparation. Enfin PCSK9 est différente des autres membres puisqu'elle reste toujours associée à son pro-segment. Finalement, c'est lors de leur transport le long de la voie sécrétoire que les PCs subissent différentes MPT, les rendant uniques et leur conférant des spécificités de fonction.

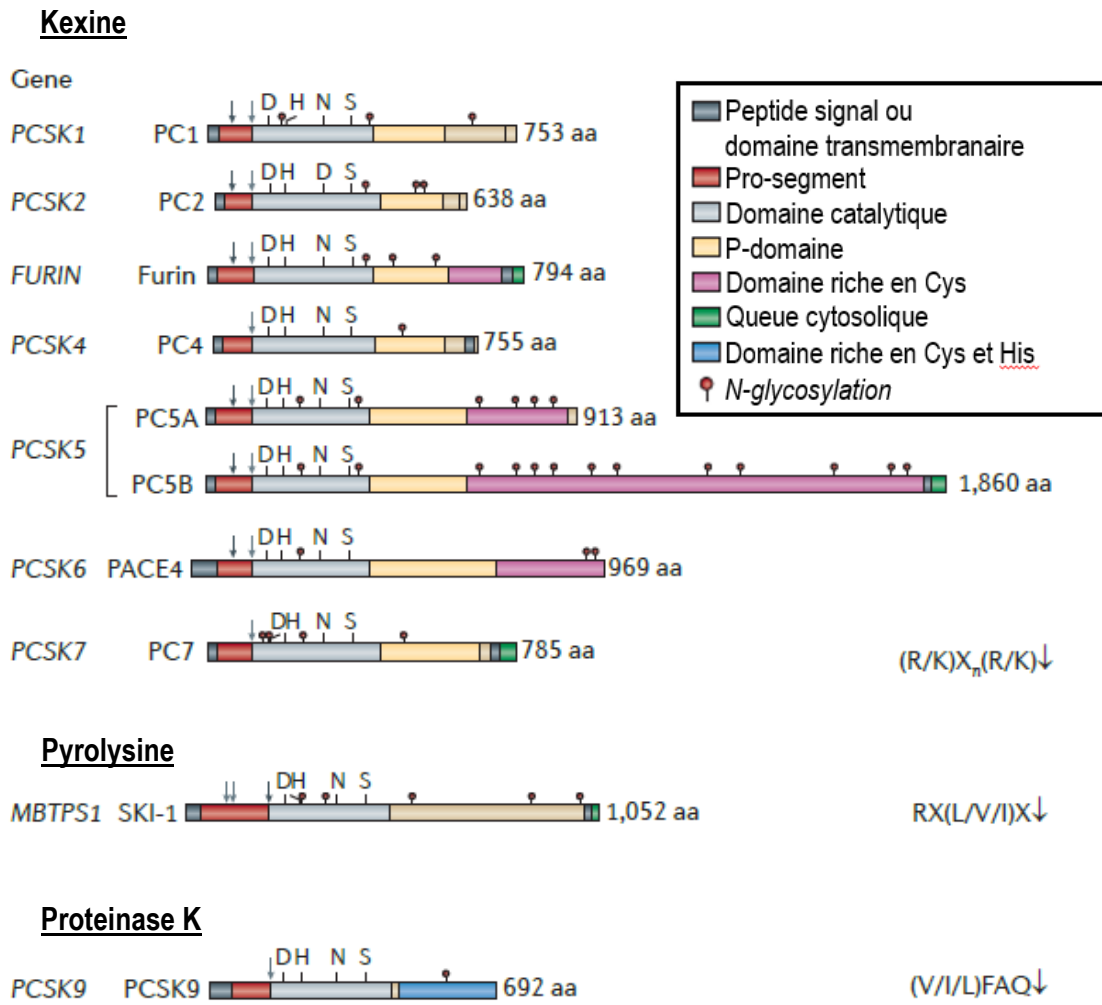


Figure 1.2 La famille des proprotéines convertases.

Cette figure illustre l'ensemble des neuf membres de la famille des PCs. La légende indique les différentes structures composant chacune de ces enzymes (Figure adaptée de Prat et Seidah, 2012¹⁰).

1.1.2.3 Localisation subcellulaire et tissulaire des PCs actives

Lorsqu'elles sont sous forme active, les PCs vont cliver leurs substrats spécifiques dans des compartiments distincts (**Tableau I**)¹⁰. PC1 et PC2 sont présentes dans les granules de sécrétion de cellules endocrines et neurales³⁷ dont le pH acide est favorable à leur activité. La Furine et PC7 ont une distribution tissulaire ubiquitaire^{43; 44} et sont localisées aussi bien à la surface cellulaire qu'au niveau des endosomes et du TGN^{43; 45}. La forme soluble de PC5, PC5A, ainsi que sa forme membranaire, PC5B, et PACE4 localisent à la surface cellulaire en interaction avec les HSPG³⁹. PC5B connaît également le même type de recyclage que la Furine et PC7 depuis les endosomes vers le TGN^{43; 45}. PC4 se limite aux cellules germinales et sa localisation subcellulaire reste encore incertaine bien qu'une présence à la surface cellulaire soit suspectée¹⁰. Exprimée dans l'ensemble des tissus, SKI-1 est principalement présent dans le *cis*- et la région médiane du Golgi ainsi que dans les endosomes et lysosomes⁴⁶. Finalement PCSK9, se situe principalement dans le foie, l'intestin grêle et les reins.

Afin de stabiliser le domaine catalytique, les PCs possèdent une structure conservée d'environ 150 aa appelée P-domaine. Ce P-domaine est requis pour l'activité et le repliement de la PC³. Plus précisément, il régule les PCs en augmentant leur stabilité mais aussi leur dépendance au calcium et leur sensibilité au pH. De plus, ce domaine est composé d'un motif de reconnaissance à l'intégrine (RGD)³⁷ qui semblerait faciliter l'interaction avec les intégrines, cependant cette hypothèse doit être investiguée²⁰.

Tableau I. Les proprotéines convertases : Expression et localisation subcellulaire

(Adapté de Prat et Seidah,2012¹⁰)

Proprotéine convertase	distribution tissulaire	localisation subcellulaire
PC1	neuroendocrine	granules de sécrétion acides
PC2		
Furine	ubiquitaire	TGN, surface cellulaire, endosomes
PC4	germinale	surface cellulaire ?
PC5	cortex, intestin, reins, ovaires	surface cellulaire, matrice extracellulaire
PACE4	muscles, cœur, pituitaire, intestin, cerebellum, reins	
PC7	ubiquitaire	TGN, surface cellulaire, endosomes
SKI-1	ubiquitaire	<i>cis-</i> et <i>medial</i> Golgi
PCSK9	foie, intestin, rein	TGN, extracellulaire

1.1.2.4 Les PCs : Entre spécificité et redondance de fonction

Le **Tableau I** met en avant la redondance de localisation tissulaire mais aussi subcellulaire des PCs rendant ainsi possible le clivage d'un même substrat par plusieurs PCs au même motif de reconnaissance. Par exemple la Furine et PC7 clivent des substrats similaires tels que la pro-sortiline ou le pro-BDNF (*bone derived neutrophil factor*)⁴⁷⁻⁵⁰. Toutefois, certaines PCs ont une fonction opposée sur un même substrat, ainsi la Furine active la protéine

N-cadhérine tandis que PC5/6 l'inactive⁵¹. Il existe tout de même une spécificité de clivage tel que le récepteur de la transferrine 1 (TfR1) connu pour être uniquement clivé par PC7 ou encore l'hepcidine ayant comme seul activateur la Furine⁵². Cette spécificité est possible grâce aux localisations exclusives de ces PCs mais également grâce à leurs régions en C-terminal uniques.

En C-terminal, la Furine, PC4, PC5B, PACE4, PC7 et SKI-1 sont composées d'un domaine transmembranaire (TM) et d'une queue cytosolique (CT), leur permettant d'être ancrées à la membrane. Des MPT telles que la *N*-glycosylation (**Figure 1.2**) ou encore la sulfatation, la *O*-glycosylation ou la palmitoylation de certaines PCs vont accentuer le caractère unique de chacune de ces protéases. Une autre caractéristique spécifique peut être la région C-terminale riche en His et Cys observée chez PCSK9 qui joue un rôle essentiel dans son activité extracellulaire en régulant son trafic intracellulaire⁵³.

1.1.2.5 Rôle physiologique et physiopathologique des proprotéines convertases

Pour mieux comprendre la fonction physiologique des PCs, des approches *in vivo* ont été réalisées chez l'humain et la souris. Chez l'humain, les mutations naturelles furent étudiées tandis que le modèle murin a été utilisé pour déléter les différentes PCs⁵⁴.

Les souris dont la protéine PC1/3 est manquante ont des déficiences de croissance également connues sous le nom de nanisme¹⁰. Des problèmes d'obésité chez l'humain dus à la mutation S307L du gène *PCSK1* sont également rapportés^{55; 56}.

Les souris dont le gène *PCSK2* codant pour la protéine PC2 a été supprimé sont viables. Cependant, elles sont hypoglycémiques due à une déficience en glucagon et possèdent principalement des anomalies au niveau du système neuroendocrinien⁵⁷. L'ensemble de ces caractéristiques présentent un phénotype proche de la maladie de Cushing⁵⁸ et les souris décèdent généralement à l'âge de six semaines.

Chez la souris, la délétion du gène *FURINE* cause une mort embryonnaire engendrée par de nombreux défauts cardiaques⁵⁹. La suppression du gène *PCSK6* codant pour PACE4 entraîne des phénotypes similaires mais moins pénétrant que ceux observés lors de la suppression du

gène *FURINE*⁶⁰. Ces phénotypes analogues renforcent le fait que la Furine et PACE4 clivent des substrats identiques intervenant dans le développement telle que la protéine BMP10 (*bone morphogenic protein*)⁶¹.

Il a été montré que l'inactivation de PC5 chez la souris se traduit par une malformation de l'axe antéro-postérieur, provoquant la mort des souris à la naissance⁶². Dans cette étude, le facteur de croissance et de différenciation GDF-11, qui a une fonction majeure dans le développement squelettique, a été identifié comme substrat de PC5, son inactivation participant ainsi au phénotype des souris dépourvues de PC5.

La perte du gène *PCSK4* codant pour PC4 génère des problèmes d'infertilité aux mâles. En effet, l'activité des spermatozoïdes est diminuée rendant l'étape de fertilisation des oocytes quasi impossible⁶³.

La suppression de SKI-1 chez la souris est létale très tôt durant le développement embryonnaire. Cette protéase est essentielle dans le processus de formation des os mais également dans la régulation des acides gras et du cholestérol¹⁰.

Les souris déficientes en PC7 (PC7 -/- ou KO PC7) ou PCSK9 présentent des phénotypes non apparents physiquement. Le manque de PC7 entraîne des changements comportementaux chez la souris dont une diminution de l'anxiété⁴⁷. La perte de PCSK9 révèle une hypocholestérolémie chez les souris et les humains. De nombreuses mutations du gène *PCSK9* ont été étudiées chez l'humain et présentent des gains ou pertes de fonction de la protéine selon la mutation. Par exemple, la mutation gain de fonction D374Y du gène *PCSK9* favorise l'hypercholestérolémie familiale^{64; 65}.

Ces études *in vivo* ont démontré que les PCs jouent un rôle essentiel dans les processus vitaux et que ces enzymes sont aussi reliées à différentes pathologies humaines telles que les maladies infectieuses, cardiovasculaires, neurodégénératives, inflammatoires ou encore les cancers⁶⁶ (**Figure 1.3**). Ainsi les proprotéines convertases peuvent être considérées comme d'excellentes cibles thérapeutiques¹⁰.

Bien que la délétion de certains gènes codant pour les PCs soit létale, il est possible de cibler ces enzymes au niveau tissulaire ou cellulaire à l'aide d'inhibiteurs appropriés. Ainsi PC1 et PC2 représentent deux cibles intéressantes jouant un rôle clé dans le diabète et l'obésité. PC4 est un excellent candidat pour développer un contraceptif masculin^{10; 54}. Furine et PACE4 peuvent être inhibées pour combattre l'arthrite, mais aussi les invasions tumorales^{10; 67}. Une approche visant à surexprimer le pro-segment de la Furine, connu pour inhiber la Furine, est actuellement envisagée. Des inhibiteurs contre la Furine donnent des résultats prometteurs pour contrer l'invasion du virus Chikungunya⁶⁸.

Une suppression de SKI-1 limiterait les infections hépatiques et préviendrait de la perte musculaire liée au vieillissement^{69; 70}. PC7 est une potentielle cible thérapeutique pour gérer l'anxiété¹⁰.

Finalement, il existe déjà des traitements ciblant PCSK9 afin de diminuer son activité et ainsi réduire la dégradation du LDLR⁷¹. Des anticorps monoclonaux humains connus sous le nom d'Evolocumab et Alirocumab ont démontré des résultats prometteurs sur les différentes cohortes de patients l'ayant utilisé^{72; 73}. En effet, une diminution, très encourageante de près de 50% des risques cardio-vasculaires a été observée à la suite de l'administration de ce traitement sur plus d'une année. Toutefois, ce traitement doit être administré par voie sous-cutanée aux deux semaines et de nouvelles études se focalisent donc sur des molécules plus petites : les anti-sens et les anticorps monoclonaux à simple domaine, dans le but de créer des traitements moins onéreux et possiblement plus facile à administrer⁷⁴⁻⁷⁶.

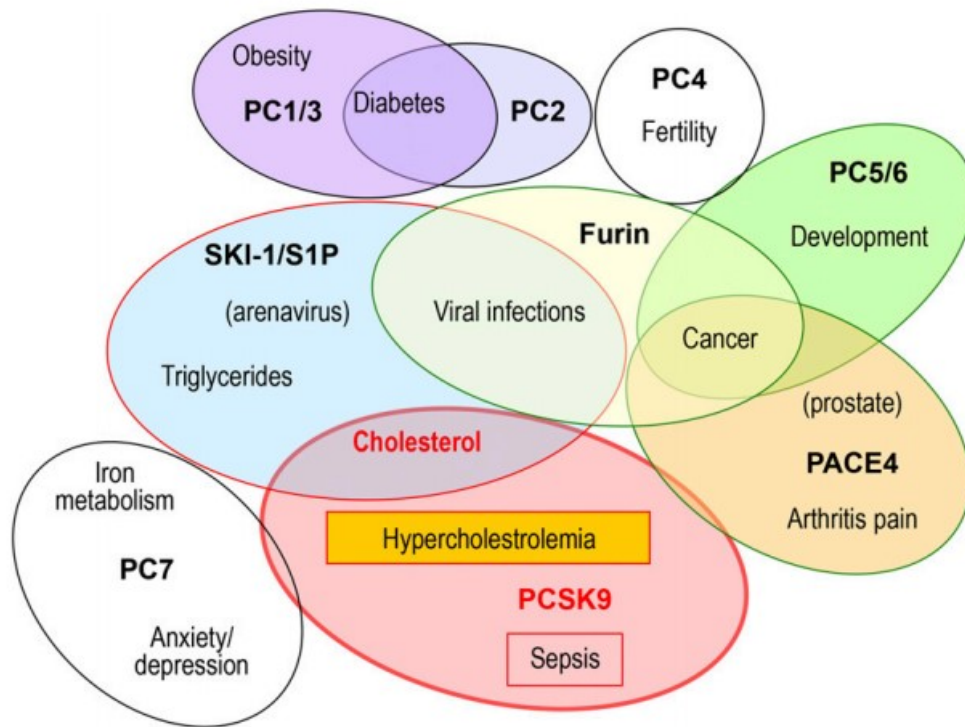


Figure 1.3 Implication des protéines convertases dans les maladies.

(Figure provenant de Seidah et al., 2017⁷¹)

1.2 PC7, de son activation à sa fonction de sheddase

1.2.1 Découverte de la proprotéine convertase 7

Découverte en 1996 par homologie de séquence avec les PCs déjà établies, la proprotéine convertase 7 est connue sous plusieurs noms : PC7, SPC7 (*subtilisin-like proprotein convertase 7*), LPC (*lymphoma proprotein convertase*) ou PC8 (proprotéine convertase 8)^{44; 77-79}. Une première équipe s'intéressant à une translocation entre les chromosomes 11 et 14 t(11;14)(q23;32), observée dans le cas de lymphomes humains, a identifié ce gène sur le chromosome 11q23⁷⁷, le nommant *LPC*. En parallèle, une seconde équipe effectua sur ce gène inconnu des études de transcription inversée sur de l'acide ribonucléique (ARN) issu de l'hypophyse du rat. À la suite d'un criblage, les résultats montrèrent des homologies de séquences avec les membres de la famille des proprotéines convertases aboutissant ainsi à la découverte d'un septième membre de la famille des PCs : PC7 codé par le gène *PCSK7*⁴⁴.

Ces deux équipes analysèrent la distribution tissulaire des ARNs aux stades embryonnaires et post-natal du gène *PCSK7* par transfert d'ARN de type *Northern blot* et hybridation *in situ*. Ils ont ainsi démontré que la répartition du gène *PCSK7* est ubiquitaire que ce soit lors des différents stades embryonnaires⁷⁹ ou post-natal (pancréas, thymus, prostate, testicules, ovaires, petit intestin, colon, cerveau, reins, thyroïde, poumons, rate, duodénum, cœur, foie)^{41; 44; 77; 80}. Cette distribution semble similaire aux ARNs de *FURINE* et *PACE4* préalablement observés²⁰. Cependant, il est à noter que son expression reste plus abondante dans les organes lymphatiques tels que dans le la rate, le thymus, les nodules lymphatiques mais également le colon, les reins, le duodénum et l'hippocampe^{41; 81}.

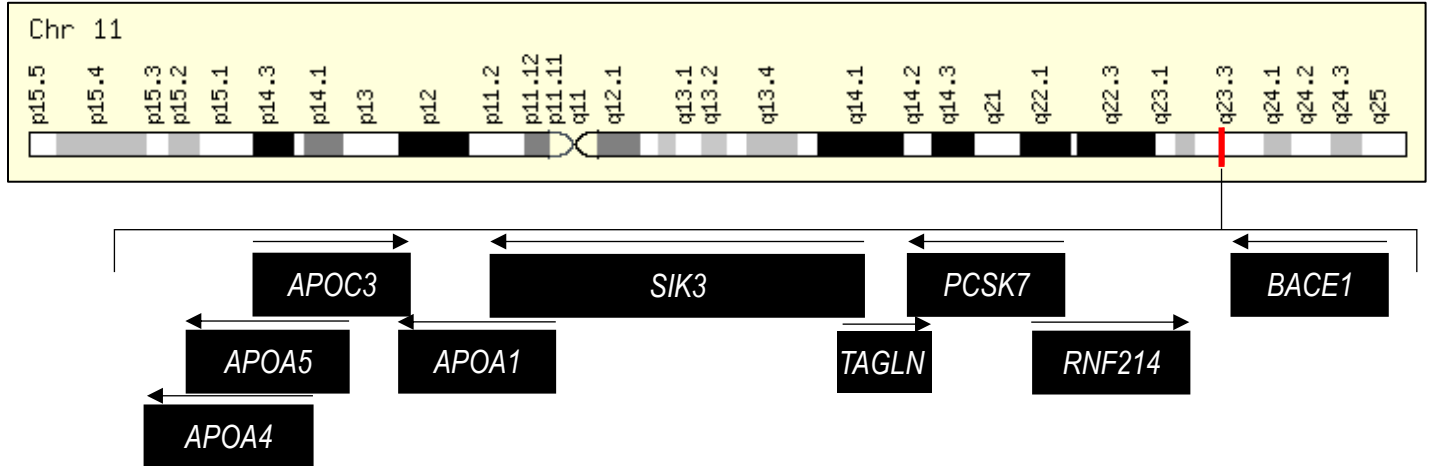


Figure 1.4 Localisation du gène humain *PCSK7* sur le chromosome 11.

L'ensemble des gènes entourant *PCSK7* est indiqué dans les différents rectangles noirs. Les flèches indiquent le sens de la transcription de ces gènes. (séquence de référence NC_000011.10, www.genecards.org)

1.2.2 La structure du gène *PCSK7*

Situé sur le chromosome 11, *PCSK7* se situe à proximité d'un groupe de gènes codant pour des apolipoprotéines (Apo) impliquées dans la régulation des triglycérides et du cholestérol (*APOA1/APOC3/APOA4/APOA5*)⁸² (**Figure 1.4**). Le gène *PCSK7* couvre 25 kilobases (kb) et se compose de 16 exons⁸³. Plusieurs transcrits de tailles variables résultant du gène *PCSK7* ont été répertoriés dans différents tissus: 3.4 kb, 4.3 kb et 6 kb. La forme la plus abondante, celle de 4.3 kb, est observée dans les cellules cancéreuses tandis que la forme la plus conservée entre les espèces (humain, rat et souris) semble être de 3.4 kb⁸⁴. Des possibilités de polyadénylation, des épissages alternatifs (par exemple la présence de l'intron 12), la possibilité de plusieurs sites promoteurs et une absence de TATA box expliquent la présence de ces trois formes⁸⁴. Un fait étonnant est la duplication inversée de 3.3 kb (exons 13-16) de la région 3' du gène à proximité

du point de cassure sur le chromosome 11. Cette région a été répertoriée comme instable et les réarrangements y sont fréquents⁸³. Une étude génétique de 2018 rapporte que cette duplication ou bien la délétion de *PCSK7* sont associées à une cardiopathie congénitale grave nommée (RVPAT) (retour veineux pulmonaire anormal total). Par ailleurs, à l'aide de la base de données STRING (*search tool for the retrieval of interacting genes/proteins*) qui permet d'effectuer des prédictions d'interactions protéiques, les auteurs indiquent que *PCSK7* interagit directement avec VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*). On peut alors supposer que la duplication ou la délétion dans le gène *PCSK7* pourraient moduler la régulation de VEGFR et ainsi participer au développement de la RVPAT.

PCSK7 possède près de 50% d'homologie avec les gènes *PACE4*, *PC5A* et *FURINE*⁷⁷. Malgré un haut degré de conservation dans les séquences génétiques des PCs, *PCSK7* est tout de même assez divergent des autres membres de la famille des PCs. Des alignements de séquences des domaines catalytiques des membres de la famille des PCs en comparaison au domaine du gène *KEXINE 2* (*KEX2*) soulignent une plus forte homologie de séquence entre *PCSK7* et *KEX2* comparativement aux autres PCs suggérant PC7 comme le membre le plus ancestral de cette famille⁴⁴ (**Figure 1.5**).

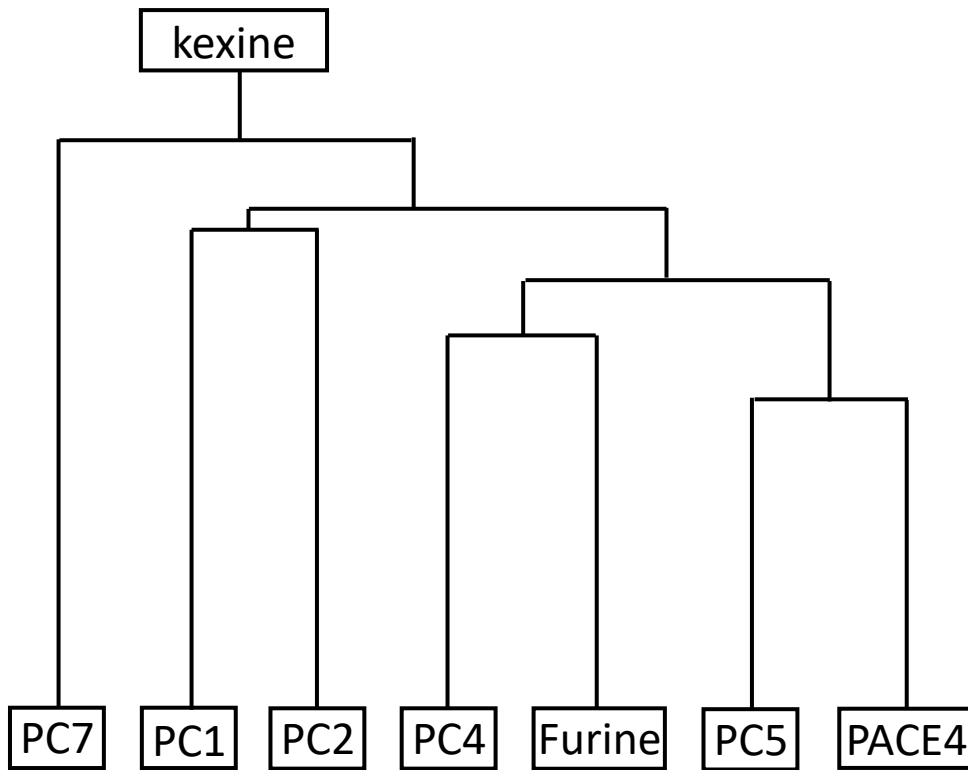


Figure 1.5 Arbre phylogénétique des proprotéines convertases issues de la kexine.

(Dendogramme adapté de Seidah et al., 1996⁴⁴)

1.2.3 Étude d'association pangénomique (GWAS) et découverte de nouvelles associations avec *PCSK7*

Des méta-analyses par association génétique (GWAS : *genome-wide association studies*) ont révélé qu'un ou plusieurs SNP (*single nucleotide polymorphism*) de *PCSK7* étaient en lien étroit avec d'autres loci du génome humain impliqués dans des phénotypes pathologiques (**Tableau II**). Ces variants sont définis par la faible fréquence de la mutation qui n'excède généralement pas 0.1%.

Tableau II. Association entre les variants de *PCSK7* et la régulation du métabolisme

SNP <i>PCSK7</i>	impact
rs236918	augmentation du niveau de la forme soluble du récepteur de transferrine dans le plasma ⁸⁵ ; lien avec la cirrhose et fibrose avancée; résistance à l'insuline et développement de diabète de type 2 ⁸⁶⁻⁸⁸
rs142953140	Le mutant R504H régule l'homéostasie lipidique (augmentation de 30% du niveau de TG et diminution de 40% du niveau de HDL) ⁸²
rs508487	dyslipidémie associée à une augmentation du niveau des TG et des sdLDL ^{82; 89}
rs662799	lié à APOA5 et aux maladies coronaires ⁸⁹

Ainsi, une première étude démontre en 2011, qu'un taux élevé de la forme soluble du récepteur de la transferrine (TfR1) impliquée dans l'homéostasie fer, est associée à la présence du SNP rs236918 de *PCSK7*⁸⁵. Par la suite, il a été montré que la présence de ce SNP constitue un facteur de risque pour le développement de cirrhose du foie chez les patients présentant une hémochromatose héréditaire^{87; 88}. Il semblerait que ce variant régule la transcription de *PCSK7* puisqu'il est présent dans l'intron 9. Plus précisément rs236918 jouerait le rôle d'activateur au niveau de l'acétylation 27 de l'histone H3⁸⁷. Ce variant est aussi associé au risque de diabète de type 2 et à une résistance à l'insuline chez les personnes obèses ayant ingéré une diète grasse haute en carbohydrates sur plus de six mois⁸⁶. Fait intéressant puisqu'une association entre

PCSK7 et la différenciation des adipocytes a déjà été suggérée rendant ainsi ce lien plausible avec une résistance à l'insuline^{86,90}.

Une autre étude de type GWAS a été effectuée à partir de cohortes de jumeaux coréens. Cette étude montra l'implication du variant *PCSK7* rs199890178 dans la régulation de triglycérides (TG)⁹¹. Ce résultat fut consolidé par une analyse quantitative de loci (eQTL : *expression Quantative Trait Loci*) établissant un lien entre ces variants, l'hypertriglycémie et la résistance à l'insuline⁹². À partir d'une cohorte de 2994 volontaires sains japonais et d'une cohorte de validation de 6805 coréens, une autre étude a identifié six autres variants de *PCSK7* (rs508487, rs236911, rs2239011, rs3830008, rs2277287, rs522645) associés à des profils lipidiques soulignant une fois de plus un lien entre *PCSK7* et les TG⁹³. Cette étude montre en particulier une association significative entre les variants rs508487 et rs236911 et les taux de TG circulant⁸².

Le SNP rs142953140 est associé à la mutation R504H qui est présente uniquement chez les individus américains d'origine africaine et à une fréquence de 1/500 chez cette population. R504H corrèle avec une augmentation de 40% du niveau HDL (*high density lipoprotein*) considéré comme le bon cholestérol et une diminution de 30% du niveau des triglycérides⁸². Ce variant démontre, une fois de plus, l'association d'un SNP *PCSK7* avec la régulation de l'homéostasie lipidique cardio-vasculaire et la calcification vasculaire. Ce lien pourrait s'expliquer par la localisation du gène *PCSK7* proche d'un groupe de gènes codant pour les apolipoprotéines (**Figure 1.4**) impliquées dans l'homéostasie lipidique^{82; 91}. En effet, il est possible que, par leur proximité, ces gènes interviennent dans la régulation des TG.

Toujours dans la régulation du métabolisme lipidique, le variant rs508487 situé dans la région intergénique de *TAGLN* et de *PCSK7* (**Figure 1.4**), est associé entraîne une augmentation du niveau des TG mais également des taux élevés de sdLDL (*small dense low density lipoprotein*). Il est maintenant établi que des taux élevés de sdLDL sont associés à une prédisposition aux maladies cardiovasculaires (MCV) telle que la dyslipidémie favorisant ainsi les MCV^{89; 94}. Chez des personnes atteintes d'athérosclérose, le niveau du sdLDL présent dans le plasma est plus élevé, ainsi des études de types GWAS sur ces patients ont montré la présence de nouvelles associations reliées à ce phénotype tel que le variant *APOA5* rs662799 en lien avec

PCSK7. Ce variant est associé aux maladies coronariennes soulignant encore une fois l'implication de *PCSK7* dans la régulation de métabolisme lipidique⁸⁹.

1.2.4 PC7 et l'évolution, les différences entre les espèces

1.2.4.1 Les espèces non mammifères

Les gènes codant pour les PCs sont des gènes orthologues. En effet, les neuf membres sont conservés dans de nombreuses espèces telles que le xénope, le poisson zèbre, la souris ou l'humain. Deux études sur *Zebrafish Danio rerio* et *Xenopus laevis* ont montré que la perte d'expression de *PCSK7*, à l'aide d'oligonucléotides antisens de type morpholino, résultait d'une létalité embryonnaire ou post-natale⁹⁵. Dans ces deux espèces, PC7 est essentielle au développement des yeux (œil cyclope en absence de *PCSK7*) et du cerveau, mais aussi des plaques neurales chez *Xenopus Laevis*. Ces résultats suggèrent une implication de PC7 dans l'activation de protéines de types BMP permettant la mise en place des structures antérieures du cerveau. Des souris KO BMP7 ont montré des phénotypes similaires à ceux du xénope dépourvu de PC7⁹⁶. Étonnement les souris dépourvues de l'expression de *PCSK7* sont viables, ne présentent pas de physiopathologie apparente et sont en santé. Cette différence entre espèces indique une possible redondance des PCs mammifères sur les substrats impliqués dans le développement (BMP4 et BMP7 chez les mammifères) comparativement au poisson zèbre et au xénope. De plus, PC7 tout comme la Furine régulent le facteur de croissance TGF- β (*transforming growth factor*) impliqué dans le développement au stade larvaire pour favoriser différenciation et prolifération cellulaire. L'absence du stade larvaire chez les mammifères pourrait expliquer les différences phénotypiques observées entre les espèces⁹⁷, mais il est aussi possible que PC7 soit peu impliqué dans le développement des mammifères comparativement aux espèces antérieures^{95; 98}. Finalement, une comparaison des séquences codantes pour PC7 humain, rat, souris et xénope met en évidence une certaine homologie, mais aussi de nombreuses différences entre les espèces qui pourraient appuyer les différences phénotypiques entre ces dernières (**Tableau III**).

D'autres sources de variabilité des protéases par le polymorphisme avec des variants menant par exemple à un épissage alternatif ou une polyadénylation sont également à prendre en considération pour examiner les différences entre les espèces⁴.

Tableau III. Comparaison des séquences protéiques de PC7 chez différentes espèces

Ce tableau relate en pourcentage les homologies de séquence du rat, de la souris et du xénope par rapport à l'humain (100%) sur l'ensemble de la protéine mais aussi en comparant uniquement le domaine transmembranaire (TM) ou la queue cytosolique (CT).

	protéine totale	TM	CT
rat	87,30%	85%	58%
souris	91,80%	85%	46%
xénope	72,50%	55%	35%

1.2.4.2 Les mammifères, impact de la perte de PC7 *in vivo*

Les souris dépourvues du gène *PCSK7* sont viables et ne présentent pas de phénotypologie apparente⁴⁷. Des études ciblant le comportement des souris telles que la préférence sociale ou de nourriture à l'aide du test STFP (*social transmission of food preference*) n'ont montré aucune différence entre les souris de type sauvage (WT) et KO. De plus, aucune différence n'a été décelée au niveau de la motricité de la souris ou pour la dépression. Toutefois, des tests sur la mémoire utilisant la méthode NORM (*novel object recognition memory*) ont mis en évidence des problèmes de mémoire épisodique et spatiale chez la souris KO résultant d'un fonctionnement anormal dans l'hippocampe en absence de PC7. L'hippocampe joue un rôle

essentiel dans la mémoire et navigation spatiale, une lésion de l'hippocampe se témoigne par une augmentation de l'activité de la souris^{99; 100}.

L'utilisation du test de la peur conditionnelle a mis en évidence que les souris KO PC7 sont moins anxieuses que les souris de type sauvage puisqu'elles montrent une déficience pour la mémoire émotionnelle, ou mémoire de la peur régulée par l'amygdale du cerveau. La mémoire épisodique et la mémoire émotionnelle sont toutes les deux régulées par la protéine BDNF présente sous forme de pro-BDNF qui est clivée par PC7 et la Furine. Ainsi, chez les souris KO PC7, une diminution de 40% du BDNF a été observée. De plus, la diminution de la mémoire émotionnelle pourrait aussi s'expliquer par la diminution de la forme active de CCK (cholecystokinin) dans le cerveau. En effet, les souris KO PC7 montrent une diminution dans plusieurs zones du cerveau de ce neuropeptide qui joue un rôle dans l'anxiété, la rétention de la mémoire, l'apprentissage, la dépression, le relargage de dopamine et la perception de la douleur¹⁰¹⁻¹⁰³. CCK connue sous forme de pro-CCK peut être activée dans la voie sécrétoire par les PCs. La présence de CCK augmente le niveau de BDNF donc même si un possible clivage direct de la part de PC7 sur CCK reste hypothétique, le lien entre les deux protéines est bien présent.

D'un point de vue métabolique, les profils lipidiques des souris WT et KO PC7 avec une diète de type *chow* (c'est-à-dire sans ajout de carbohydrates ou de nourriture grasse), ont été analysés et comparés. Aucun changement du niveau de cholestérol, des TG ou des lipides n'a été constaté que ce soit chez les souris mâles ou femelles⁴⁹, fait étonnant puisque de nombreux variants de *PCSK7* sont associés à une augmentation du niveau des TG ou en lien avec des MCV. Toutefois, aucune étude n'a montré si une diète de type *Western* (haute en carbohydrates donc riche en gras) pouvait influencer ces profils lipidiques.

1.2.5 Caractérisation de la proprotéine convertase 7

1.2.5.1 Structure de la protéine PC7

Comme les autres membres de la famille des proprotéines convertases, la protéine PC7 humaine (hPC7) composée de 785 aa est constituée d'un peptide signal (36 aa), d'un pro-segment (aa 37-141), une région catalytique (aa 142-427) formée de la triade catalytique (Asp₁₈₇, His₂₂₈ et Ser₄₀₆^{45; 78}), un P-domaine (aa 427-619), et une région riche en histidine (aa 620-667). Cette protéine membranaire de type I présente aussi en C-terminal un domaine transmembranaire hydrophobe (aa 668-688) et une queue cytosolique de 97 résidus (aa 689-785)⁴⁴. L'ensemble de ces structures permet d'estimer la taille de la protéine PC7 humaine non active à ~102 kiloDaltons (kDa) et sa forme mature dépourvue du pro-segment à ~92kDa⁴⁵ (**Figure 1.6**).

1.2.5.2 Autoclivage et activation de PC7

Les différents membres de la famille des PCs présentent une homologie de séquence de leur pro-segment de 30 à 67% avec une conservation absolue de 8 aa situés en C-terminal du pro-segment¹⁰⁴. Plus précisément les alignements de séquence entre ces différents membres suggèrent que la fin du pro-segment de hPC7 (12.3 kDa) est localisée au site de clivage autocatalytique Arg-Arg-Ala-Lys-Arg₁₀₄↓^{41; 44} où la présence d'une Arg en P1 est essentielle pour l'obtention du premier clivage dans le RE¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. En effet, l'Arg en P1 est très conservée entre les espèces et pour l'ensemble des protéases reliées à la Kexine renforçant l'idée que cet auto-clivage est essentiel pour la régulation de ces protéases¹⁰⁷. De plus, cet auto-clivage est possible par la présence de la chaperonne BiP (*binding immunoglobulin protein*) dans le RE qui se lie à PC7 et assure son bon repliement³³. Finalement, en plus du pro-segment, la triade catalytique est essentielle pour la sortie de PC7, en effet, une mutation de l'un de ces résidus empêche la sortie de PC7 et par conséquent la formation de sa forme maturée⁴⁵.

Afin de mieux comprendre la fonction de ce pro-segment, des décapeptides codant pour des parties de cette pro-région ont été synthétisés¹⁰⁴. L'utilisation d'un décapeptide, composé des 10 aa en amont du site d'auto-clivage, suffit à inhiber la protéine PC7 active indiquant, ainsi, le caractère essentiel de ces 10 résidus dans la fonction inhibitrice du pro-segment¹⁰⁸. De plus, ce décapeptide peut, *in vitro*, inhiber d'autres PCs (PC5, Furine, PACE 4, Kexine), suggérant ainsi l'existence d'une réaction croisée entre les différents pro-segments des PCs et une redondance/conservation dans la régulation des PCs.

Ce premier clivage, nécessaire dans le RE, reste cependant insuffisant pour l'activation de PC7¹⁰⁹. Une deuxième étape consiste à se séparer de ce pro-segment afin d'obtenir une forme mature de PC7. L'utilisation de marquage radioactif de type *pulse-chase* sur PC7 a mis en évidence une forme sécrétée de pro-segment dans le milieu extracellulaire sous la forme d'un peptide de 102 aa⁴¹; ce n'est pas le cas pour la forme active qui n'est présente qu'intracellulairement. Le mécanisme d'action ainsi que la localisation de cette séparation restent, toutefois, méconnus. Il est possible que la séparation du pro-segment s'explique par l'action d'une carboxypeptidase¹¹⁰ basique pouvant reconnaître le motif Lys-Arg₁₄₁ ou encore HSPG déjà connu pour son implication dans l'activation de PC5 à la surface pourrait également réguler l'activation de PC7³⁹. Enfin, bien que plusieurs résultats montrent l'importance d'un pH neutre (6-7) pour le bon fonctionnement de cette protéine mature aucune étude n'a mis en évidence si le pH et le calcium jouent un rôle essentiel pour la séparation du pro-segment et subséquemment l'activation de ce zymogène⁸¹.

1.2.5.3 Les modifications post-traductionnelles de PC7

PC7 acquiert différentes MPT lors de son passage dans la voie de sécrétion. Ces modifications vont accentuer la spécificité fonctionnelle de PC7 : quatre N-glycosylations, deux cystéines palmitoylées et des sites de sulfatation.

La N-glycosylation :

La N-glycosylation est une MPT qui commence dans le RE et se finalise dans l'appareil de Golgi. Elle consiste en l'ajout d'oligosaccharides sur un résidu asparagine (Asn) de la protéine lorsqu'un motif de reconnaissance de type Asn-X-Ser/Thr (Thr représente une thréonine) est présent. PC7 est sensible au traitement avec l'enzyme endoglycosydase H (endo-H) connue pour cliver les sucres riches en mannoses dans le RE, suggérant ainsi la présence de N-glycosylation sur la PC7⁴⁵. L'analyse de la séquence protéique de PC7 prédit quatre sites potentiels de N-glycosylation aux positions Asn₁₆₇, Asn₁₇₅, Asn₂₄₁ et Asn₅₁₁^{44; 45}. Cependant, aucune étude n'a mis en évidence de façon systématique ces 4 MPT. Des mutations dirigées sur les quatre Asn potentielles ainsi qu'un traitement endo-H valideraient les quatre sites.

La palmitoylation :

PC7 mature est composée deux sites de palmitoylation situés sur les cystéines 699 et 704 (C₆₉₉,C₇₀₄)⁴¹ de la CT. La palmitoylation correspond l'ajout d'un acide palmitique hydrophobe lié à une chaîne d'acide gras à groupe thiol (SH) de la cystéine. La présence de cette MPT réversible accroît l'hydrophobicité de la protéine et pourrait faciliter des interactions avec les phospholipides^{45; 111; 112} et par conséquent, un meilleur ancrage à la membrane. Afin de comprendre l'importance de ces deux palmitoylations, des mutations des deux Cys en Ala couplées à la mutation d'un motif basique de la CT (HRSRKAK₇₁₄) ont montré une perte de localisation de PC7 au TGN, suggérant l'importance de ce motif basique allié aux deux palmitoylations comme essentiels pour la régulation du transport de PC7 des endosomes vers le TGN¹¹². (Cf 1.3.1.1 Importance du TMCT pour le transport et l'activité de clivage de PC7)

Cependant, la perte de palmitoylation n'affecte en aucun cas le choix de trafic de la protéine entre les voies conventionnelles et non conventionnelles⁴¹ (Cf 1.3.1.2 La voie non conventionnelle). De plus, en présence de ces deux Cys mutées l'activité de clivage de PC7 sur ses substrats proEGF (*epidermal growth factor*) et TfR1 n'est pas entravée^{52; 113} (Cf 1.2.6 Les substrats de PC7). Toutefois, ces deux cystéines sont impliquées dans l'activation de la toxine bactérienne nommée anthrax toxine (ou maladie du charbon). L'entrée de cette bactérie par la voie endocytaire est possible grâce à son interaction avec des récepteurs spécifiques ayant subi

des MPT. Dans ce cas, il s'agit de la Furine et de PC7 palmitoylées qui viennent cliver l'antigène protecteur de cette bactérie dans des microdomaines acides situés sous la membrane plasmique et favorisant l'endocytose. Dans cette étude, la palmitoylation des parties cytosoliques de PC7 mais aussi de l'antigène protecteur de la bactérie est possible grâce à la palmitoyl-transférase ZDHHC5 connue pour réguler le transport endosomal. Plus précisément cette palmitoylation confère aux deux PC7 une localisation morcelée dans la membrane plasmique¹¹⁴.

La sulfatation :

La sulfatation se caractérise par l'ajout d'un groupe sulfate (SO_4^{2-}) sur les tyrosines, sérines ou thréonines. Le but d'une sulfatation est d'activer une enzyme ou de renforcer des interactions protéiques. Un traitement au sulfate de sodium radioactif ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) a montré que PC7 possédait des sites de sulfatation. L'utilisation de ce marquage radioactif couplé à un traitement au PGNase F (N-linked-glycopeptide-(N-acetyl-beta-D-glucosaminy)-L-asparagine amidohydrolase) a mis en évidence une perte de la taille de PC7 comparativement à un PC7 non traité⁴¹. Il est à noter que les protéines réagissent au traitement au PGNase F lorsqu'elles subissent des MPT dans l'appareil de Golgi. Avec ce traitement, un clivage est effectué au niveau de la N-acétylglucosamine qui s'est liée aux Asn. Cette sulfatation se greffe à PC7 dans ce compartiment. La perte de cette MTP est observée lorsque le domaine transmembranaire (TM) de PC7 est remplacé par celui de la Furine⁴¹, suggérant ainsi la sulfatation de PC7 dans son TM potentiellement aux trois résidus tyrosines (Tyr ou Y) localisés dans le TM aux positions Y₆₈₁, Y₆₈₂, Y₆₈₇ de PC7 mais absentes chez la Furine. Les sulfatations pourraient être à l'origine de la régulation de la voie non conventionnelle. (Cf

1.3.1.2 La voie non conventionnelle)

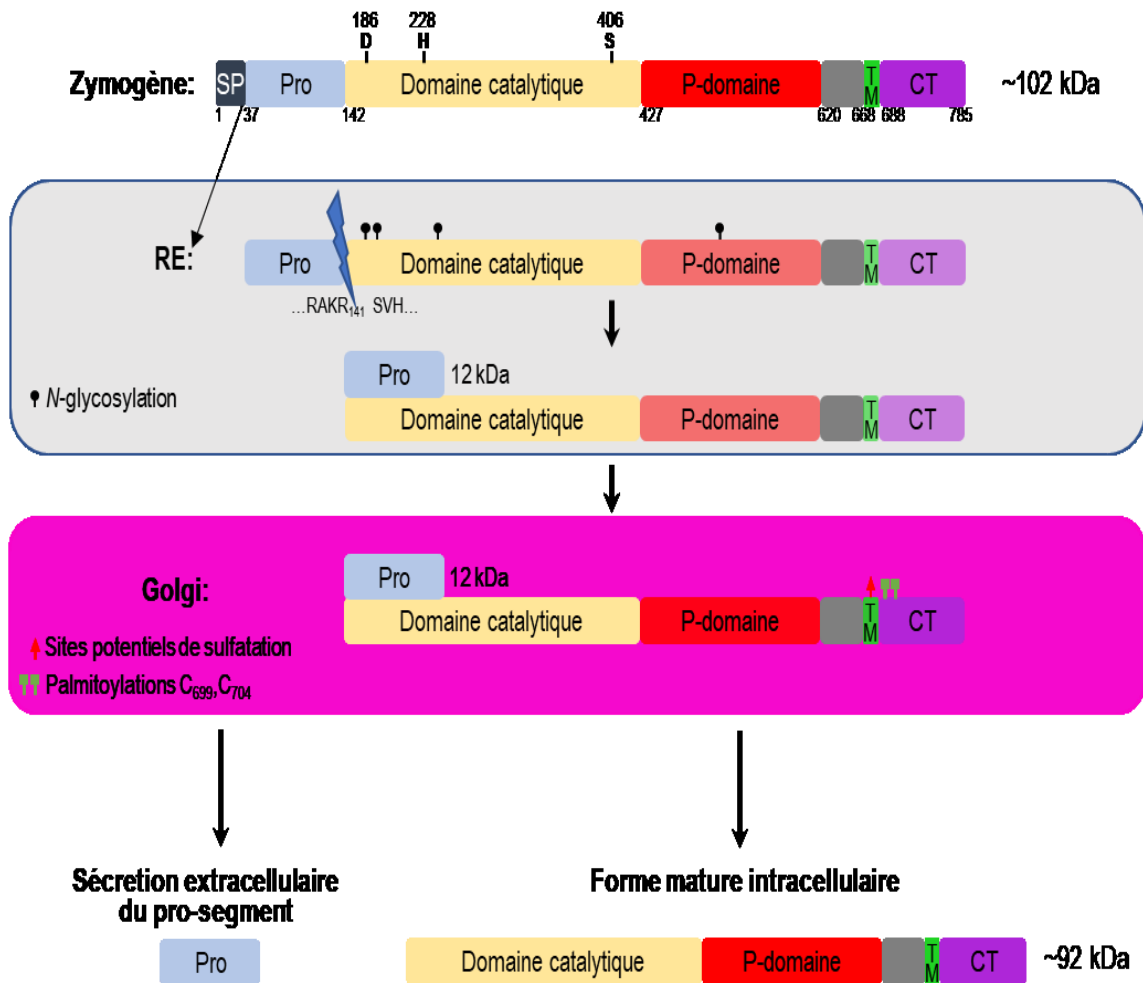


Figure 1.6 Maturation de PC7 et modifications post-traductionnelles le long de la voie sécrétoire.

(Schéma adapté de la thèse de Luna Saavedra, 2013¹¹⁵)

TM	{	hPC7	LVLVGCFTVFWTV YY M LE V Y L	688
		hfurine	VVAGLSCAFIVL V F V T V F L V L QL	738

Figure 1.7 Alignement de séquences des domaines transmembranaires (TM) des protéines humaines PC7 et Furine.

Les tyrosines (Y) potentiellement sulfatées sont en rouges. Les aa montrant des différences majeures dans leur charge entre les deux PCs lors de l'alignement de séquence sont en gras.

1.2.6 Les substrats de PC7

Différents tests *in vitro* ont établi les conditions optimales pour l'activité de PC7. Ainsi un pH neutre entre 6-7 et la présence de calcium facilitent son activité de clivage sur ses différents substrats⁸¹. L'expression tissulaire ubiquitaire de PC7 suggère qu'elle peut, tout comme la Furine, être impliquée dans l'activation de précurseurs présents le long de la voie sécrétoire dans différents organes (cerveau, foie...) et lors de processus variés tels que le développement, l'inflammation, la neurodégénérescence, le métabolisme lipidique, l'homéostasie du fer ou encore dans les cas de cancers. La redondance d'activité entre les PCs rend difficile l'étude de la spécificité de substrat pour PC7.

1.2.6.1 L'inflammation et la neurodégénérescence

PC7 et la Furine sont deux protéines exprimées dans les cellules lymphocytaires CD4⁺. La glycoprotéine 160 (gp160) est une protéine membranaire, également présente dans les cellules lymphocytaires, composant l'enveloppe du VIH. Cette protéine clivée confère deux

protéines gp41 et gp120 favorisant respectivement la liaison au virus ainsi que la fusion membranaire¹¹⁶. L'activation de ces cellules lymphocytaires avec l'interleukine-2 favorise l'activité enzymatique de PC7 et Furine qui, de ce fait, clivent gp160¹¹⁷⁻¹²⁰. Cependant, ce clivage semble être principalement effectué par la Furine et non par PC7 avec un chevauchement de clivage partiel par cette dernière¹²¹. En plus de PC7 et de la Furine, les transcrits de PC5 et PACE4 sont également surexprimés chez les personnes atteintes du VIH. En plus d'être infectées par le HIV, certaines personnes développent une neurodégénérescence (HAND : *HIV-associated neurocognitive disorder*)¹²⁰. Chez ces patients HAND, la surexpression des transcrits IL-2, PC7, PC5, PACE4, Furine mais aussi de PAR-1 (*proteinase-activated receptor 1*) a été observée suggérant l'implication de PCs dans l'inflammation. PAR-1 est une protéine G couplée aux récepteurs¹²⁰. La surexpression de PAR-1 mène à l'inhibition de plusieurs PCs membranaires telles que PC5B, Furine et PC7 donnant ainsi à PAR-1 un rôle d'inhibiteur naturel de PCs pour la première fois de l'histoire¹²⁰. En effet, l'activité de clivage de hTfr1 par PC7 (Cf 1.2.6.6 L'homéostasie du fer) est partiellement diminuée en présence de PAR-1 (**Figure 1.8**). PC7, PC5 ainsi que la Furine sont aussi impliquées dans l'activation d'autres virus tel que le virus syncytial respiratoire¹²².

L'implication de PC7 dans le système immunitaire est renforcée par l'observation d'une surexpression de *PCSK7* mais aussi de *FURINE* et *PCSK5* dans les cellules régulatrices des cellules T (Tregs). Les Tregs contrôlent de nombreuses voies des systèmes inflammatoire et immunitaire. Plus précisément, Fop3, une protéine qui agit comme facteur de transcription, intervient dans le développement et la fonction des Tregs et bien que cette protéine possède un site de reconnaissance de clivage par les PCs elle n'est pas clivée par ces dernières, suggérant une action indirecte des PCs dans la voie de régulation des Tregs¹²³.

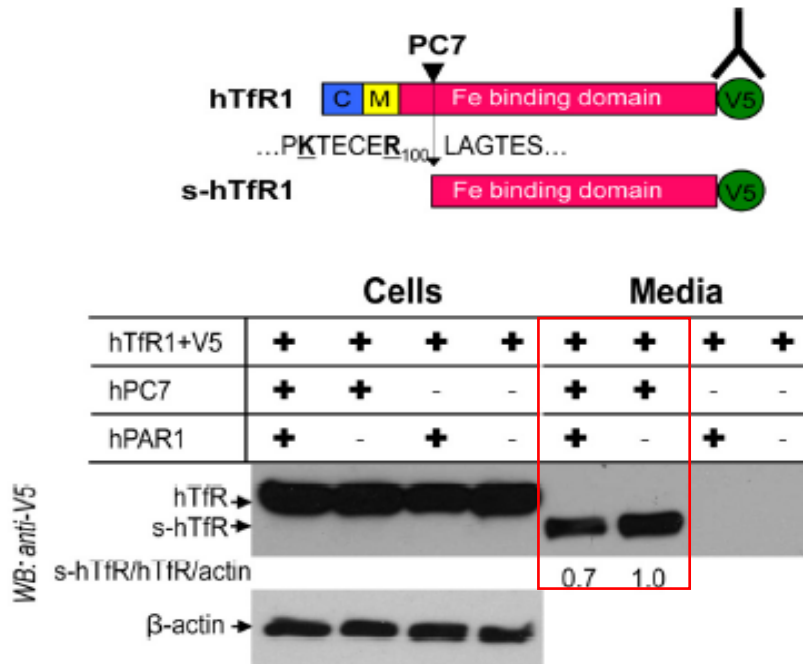


Figure 1.8 Activité de clivage de PC7 sur hTfR1 en présence de PAR-1.

(Cette figure est issue de Kim et al., 2015¹²⁰)

Les métalloprotéases ADAMS sont entre autres connues pour favoriser la formation de plaques amyloïdes *via* l'activation de la protéine APP- α (*amyloid precursor protein*) chez les personnes atteintes de la maladie neurodégénérative Alzheimer. Chez ces patients, une surexpression de PC7 a été observée et suggérée comme activatrice de la protéine APP- α . Cette activation indirecte par PC7 fut confirmée puisque cette enzyme, tout comme la Furine, clive la métalloprotéase ADAM10 (site de clivage RKKR)¹²⁴⁻¹²⁶.

En plus du clivage de différents précurseurs, PC7 est impliquée en tant que protéine contrôle-qualité dans la stabilité du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Le rôle du

CMH est de présenter les antigènes aux lymphocytes T afin de les activer. Le contrôle qualité CMH est réalisé dans plusieurs compartiments et il semblerait que PC7 intervienne soit dans des vésicules proches de la membrane plasmique ou au niveau du TGN¹²⁷.

1.2.6.2 Le développement

Les PCs ont une activité de clivage redondante sur des substrats intervenant dans le développement. Ainsi, la Furine, PACE4 et PC7 activent BMP 4 lors de la dentinogénèse. Il est également possible que ces PCs clivent les précurseurs du procollagène lors du développement des dents¹²⁸. Le clivage d'un autre précurseur E-cadherine par les PCs (Furine, PACE4 et PC7) facilite, quant à lui, l'adhésion cellulaire lors la formation de blastocytes lors du développement¹²⁹.

IGF-1 (*insulin-like growth factor*) est une protéine essentielle au développement embryonnaire et à la croissance post-natale. L'absence de cette protéine cause une mort post-natale et de nombreuses anomalies développementales. Cette protéine connue pour exister sous forme de proprotéine possède deux sites de clivage (KxxKxxR₇₁xxRxxR₇₇). PC7 ne clive qu'à la position Arg₇₁ générant une protéine IGF-1 (1-70) tandis que la Furine, PC6B et PACE4 peuvent cliver aux positions Arg₇₁ et Arg₇₇¹³⁰. Son récepteur IGF-1R intervenant également dans la mitogénèse et la tumorigénèse est quant à lui uniquement clivé par Furine et PC5A mais pas par PACE4 ni PC7¹³¹.

1.2.6.3 La prolifération cellulaire et vasculaire

À la suite d'une lésion du nerf sciatique chez la souris, un changement d'expression de PC1, PC5, FURINE et PC7 mais aussi de BDNF et de NGF (*nerve growth factor*) a été observé dans les cellules de Schwanns¹³². Cette observation n'est pas surprenante puisque la Furine est connue pour couper pro-NGF en forme active et PC7 et la Furine clivent le pro-BDNF qui est impliqué dans le développement neuronal et la plasticité synaptique⁴⁷. PC5 et PC7 sont surtout

surexprimées un jour après la lésion alors que PC1 est principalement présente dans les quatre à sept jours suivant la lésion indiquant des fonctions différentes et/ou une redondance entre certaines PCs. En plus de leur présence dans les cellules de Schwann lors de la lésion, PC7 et la Furine sont également présentes dans les tissus musculaires où elles co-localisent avec les macrophages¹³³. Ces PCs favorisent ainsi l'activité de NGF dans le but d'activer la prolifération des cellules vasculaires de muscles lisses (CVML). La surexpression, *in vivo*, de PC7, de la Furine et de PC5 lors du remodelage des CVML, pourrait faire de ces enzymes d'excellents marqueurs de la prolifération vaculaire¹³⁴. Cependant, NGF est également impliquée dans les pathologies vasculaires telle que la formation de plaques d'athérosclérose.

En ce qui concerne le pro-BDNF (35 kDa), son clivage produit une protéine active de 14 kDa¹³². PC7 co-localise avec BDNF dans l'hippocampe et les amygdales qui sont connus pour réguler le stress (Cf 1.2.4.2 **Les mammifères, impact de la perte de PC7 *in vivo***). Une diminution de l'anxiété peut être causée par la perte de production de BDNF actif. La sortiline mature (Cf 1.2.6.5 **Le métabolisme lipidique**), également clivée par PC7 et la Furine, intervient dans la régulation du BDNF puisqu'elle le protège de la dégradation¹³⁵.

En plus de l'activation de NGF, PC7 joue aussi un rôle important dans l'activation de facteurs de croissance tel que le proEGF principalement exprimé dans les glandes maxillaires, les reins et les glandes lacrymales. Cette protéine membranaire de type I intervient dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire en interagissant avec le récepteur EGF (EGFR). Dans le rein, le processus de clivage est actuellement méconnu cependant une forme clivée de 115 kDa du proEGF a été observée intracellulairement. Parmi les neuf PCs, seule PC7 clive proEGF dans les endosomes dépendant de la clathrine. Cependant, un siRNA (*small interference RNA*) dirigé contre PC7 ne supprime pas le clivage du proEGF suggérant l'intervention de d'autres protéases¹¹³. L'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre les protéases de type cystéine ou sérine n'inactive pas la fonction enzymatique de PC7 mais une diminution du clivage de proEGF, suggérant que le clivage du proEGF par PC7 est indirect. Bien que l'EGF soit une protéine membranaire de type I, sa forme soluble est également clivée, indiquant que son ancrage à la membrane n'est pas requis pour son clivage, toutefois la forme soluble de PC7 ne peut cliver proEGF (Cf 1.3.1.1 **Importance du TMCT pour le transport et l'activité de clivage de PC7**).

1.2.6.4 Les cancers

VEGF-C et VEGF-D sont deux protéines connues pour faciliter la croissance tumorale et l'angiogenèse. VEGF-C semble être clivée extracellulairement ou à la surface cellulaire par PC7, Furine et PC5 qui reconnaissent un motif dibasique RR. Ces mêmes PCs clivent également VEGF-D mais à des sites de clivage distincts donnant naissance à plusieurs protéines tronquées. Selon la protéine clivée les récepteurs VEGFR-2 ou 3, une interaction ligand/récepteur va être possible. L'expression de VEGF-C est détectée dans 50% des cancers ainsi un inhibiteur des PCs inhiberait leur activation et diminuerait la prolifération tumorale^{136; 137}. Un fait intéressant est qu'une étude génétique (base de données STRING) a montré que la duplication ou la délétion de *PCSK7* semblait être en lien avec VEGFR-2 connu également sous le nom de KDR (Cf 1.2.2 **La structure du gène *PCSK7***). Cependant, cette approche génétique ne valide aucunement s'il s'agit d'un clivage direct de PC7 sur VEGFR-2. Ainsi, PC7 semble essentiel au développement de l'angiogenèse puisqu'elle régule à la fois les ligands et récepteurs de la famille des VEGF. L'introduction d'inhibiteurs de PC7 comme adjuvant dans le traitement des cancers pourrait permettre de diminuer la prolifération tumorale.

1.2.6.5 Le métabolisme lipidique

Les cellules 3T3-L1 sont un excellent outil pour comprendre la différenciation des adipocytes *in vitro*. Leur différenciation peut être induite à l'aide de protéines telles que l'IGFR (*insuline growth factor receptor*)¹³⁸ et se caractérise par l'augmentation de l'expression de la Furine, PACE4 et PC7 et se voit abolit lorsque les cellules 3T3-L1 sont traitées avec un le decanoyl RVKR-chloromethylketone (dec-RVKR-CMK) connu pour inhiber les PCs. La Furine, mais pas PC7, clive IGFR. Cependant, des tests de type GWAS montrent des liens entre

les adipocytes et des variants de *PCSK7* (Cf **1.2.3 Étude d'association pangénomique (GWAS) et découverte de nouvelles associations avec *PCSK7***).

La pro-sortiline est clivée par Furine et PC7^{48;49}. Cette protéine intervient dans le trafic cellulaire, elle permet le transport de ligands depuis l'appareil de Golgi et la membrane plasmique vers le lysosome¹³⁹. Génétiquement, des hauts niveaux de sortiline sont associés avec des niveaux réduits de LDL circulant (mauvais cholestérol), ainsi PC7 intervient dans la régulation du métabolisme *via* ces différents précurseurs clivés par PC7. Cette protéine interagit aussi avec une protéine du cerveau BDNF (Cf **1.2.6.3 La prolifération cellulaire et vasculaire**)

1.2.6.6 L'homéostasie du fer

En 2011, une étude GWAS a montré que la surexpression de la transferrine dans le plasma humain corrélait avec un SNP de *PCSK7* (Cf **1.2.3 Étude d'association pangénomique (GWAS) et découverte de nouvelles associations avec *PCSK7***)⁸⁵. Ainsi le récepteur de la transferrine humaine (hTfR1) (85 kDa), glycoprotéine dimérique membranaire de type II présente dans le foie et le plasma, a été testé avec l'ensemble des sept premiers membres de la famille des PCs (**Figure 1.9**)⁵². Étonnamment, seul PC7 clive ce substrat, dans les endosomes, au site **KTECER**₁₀₀, ce qui aboutit au relargage d'une forme soluble de 75 kDa dans le milieu extracellulaire (**Figure 1.9**). La lysine en position P6 et l'arginine en P1 sont deux résidus critiques au motif de clivage. En conséquence, ce clivage est observé chez le rat (KEECVR), mais absent chez la souris (KEECVK) où l'Arg en P1 n'est pas conservée⁵². Le clivage de hTfR1 peut être évité lorsque la O-glycosylation en aval du site de clivage est présente au site Thr₁₀₄. Différents inhibiteurs des autres familles de protéases ont été testés afin de s'assurer de la spécificité de clivage par PC7. **Ainsi, pour la première fois, PC7 a un unique substrat : hTfR1.** Ce clivage s'effectue dans les endosomes précoces acides puisqu'un traitement au sucrose qui empêche l'interaction entre la clathrine et les protéines adaptatrices initiant l'endocytose¹⁴⁰ inhibe l'activité de clivage de PC7 sur hTfR1⁵². De plus, la présence du domaine transmembranaire et de la queue cytosolique de PC7 sont essentiels à son activité⁵² (Cf **1.3.1.1 Importance du TMCT pour le transport et l'activité de clivage de PC7**). Toutefois, le variant

R504H de PC7 n'affecte aucunement l'activité de clivage du substrat⁸². Tfr1 possède un homologue, Tfr2, qui bien que clivé, n'est pas une cible des proprotéines convertases et Tfr2 intervient dans des mécanismes indépendants de Tfr1¹⁴¹.

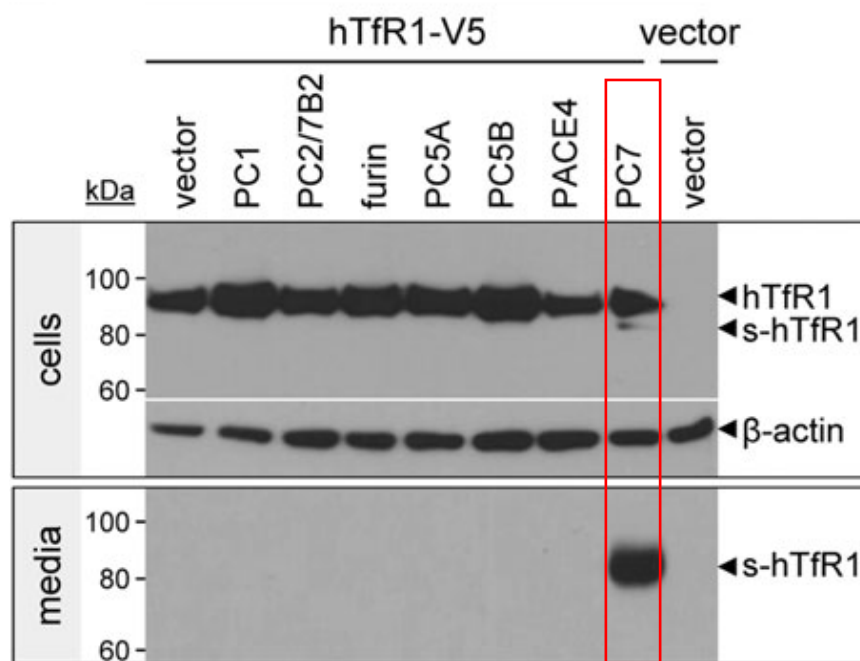


Figure 1.9 Clivage de hTfR1 par PC7

(Cette figure est issue de l'article Guillemot et al., 2013⁵²)

Afin de mieux comprendre la régulation ferrique, il faut savoir que le transport d'oxygène est possible dans le corps humain grâce au fer¹⁴². De nombreuses protéines facilitent le transport du fer circulant dans l'ensemble du corps grâce à la transferrine. Le fer localise principalement au niveau des sites fonctionnels (érythrocytes et hémoglobine), cependant le fer

en excès doit être stocké dans le foie sous forme de ferritine¹⁴³. L'ensemble du réseau ferrique est régulé par l'hormone hepcidine (clivée par la Furine) et son récepteur la ferroportine¹⁴⁴. Afin de transporter le fer, ce dernier est chargé sur la transferrine qui s'attache aux récepteurs de transferrine. Ainsi, en manque de fer, la transferrine est peu chargée en fer¹⁴³. Au contraire, en présence d'un excès de fer circulant, l'hepcidine est activée par la Furine afin de limiter le fer circulant dans le sang en entraînant la dégradation de la ferroportine et hTfR1 est inhibé par le clivage de PC7. À l'inverse, une surexpression de hTfR1 permet de combler une carence en fer et dans ce cas l'hepcidine est inhibée (**Figure 1.10**).

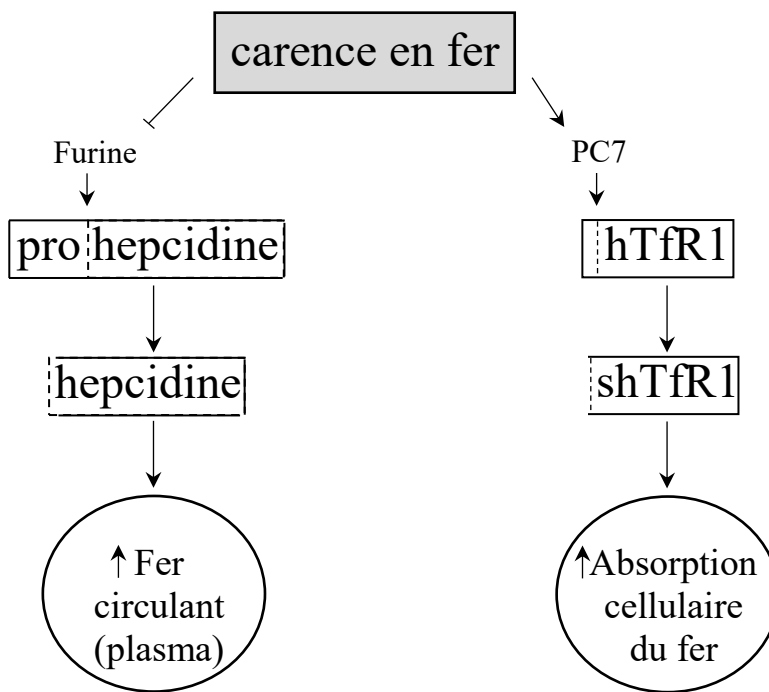


Figure 1.10 La régulation de l'homéostasie du fer par PC7 et la Furine.

(Cette figure est adaptée du schéma final de l'article de Guillemot et al., 2013⁵²)

1.3 Le trafic cellulaire de PC7 et ses possibles acteurs

1.3.1 Localisation subcellulaire et transport de PC7

Afin de comprendre la biologie cellulaire de PC7, les différentes localisations de cette enzyme ont été mises en évidence par fractionnement cellulaire ou immunofluorescence à l'aide de marqueurs spécifiques d'organelles^{41; 145}. Tout comme l'ensemble des PCs, PC7 localise dans le RE sous forme de zymogène afin de contrôler le bon repliement de l'enzyme. Contrairement au pro-segment, la forme mature de PC7 n'est pas sécrétée, la rétention de cette protéine peut s'expliquer par la présence du domaine transmembranaire (**Figure 1.6**).

PC7 poursuit son chemin le long de la voie sécrétoire, on le retrouve ainsi faiblement localisé à la surface cellulaire. Plusieurs études suggèrent que PC7 est également sous la membrane, dans les endosomes précoces^{41; 127}. Cependant, cette localisation reste incertaine car plusieurs études ont mentionné qu'il s'agissait d'un compartiment inconnu juxtaposé à la membrane¹¹⁴. L'internalisation de PC7 depuis la membrane plasmique est médiée par les vésicules dépendantes de la clathrine. PC7 co-localise avec les endosomes précoces (marqueur *early endosome 1* (EEA1))⁵², mais aussi les endosomes tardifs (marqueur mannose-6-phosphate récepteur (MPR)) (**Cf 1.3.2 Les endosomes**). Toutefois, comme la Furine, PC7 demeure principalement dans la région Trans du Golgi (marqueurs du TGN γ -adaptine et TGN38 (protéine de 38 kDa présente dans le TGN) (**Figure 1.11**)^{41; 146}. Un recyclage de PC7 depuis les endosomes vers le TGN est possible grâce aux informations présentes dans la CT de PC7¹¹² (**Cf 1.3.1.1 Importance du TMCT pour le transport et l'activité de clivage de PC7**). Ce recyclage au TGN est bloqué par le nocodazole inhibant la maturation des endosomes tardifs par une dépolymérisation des microtubules, et empêchant ainsi le transport protéique depuis les endosomes précoces vers les endosomes tardifs¹⁴⁷. Ainsi, tout comme la Furine, PC7 recycle *via* les endosomes tardifs. Toutefois ces deux protéines se dirigent dans des compartiments différents au TGN^{112; 148}. Contrairement à la Furine dont des oligosaccharides N-glycans sont sialylés, PC7 localise dans des compartiments du TGN déficients en sialyltransférase. Finalement, deux études ont montré que PC7 ne co-localisait pas avec les lysosomes^{41; 121}.

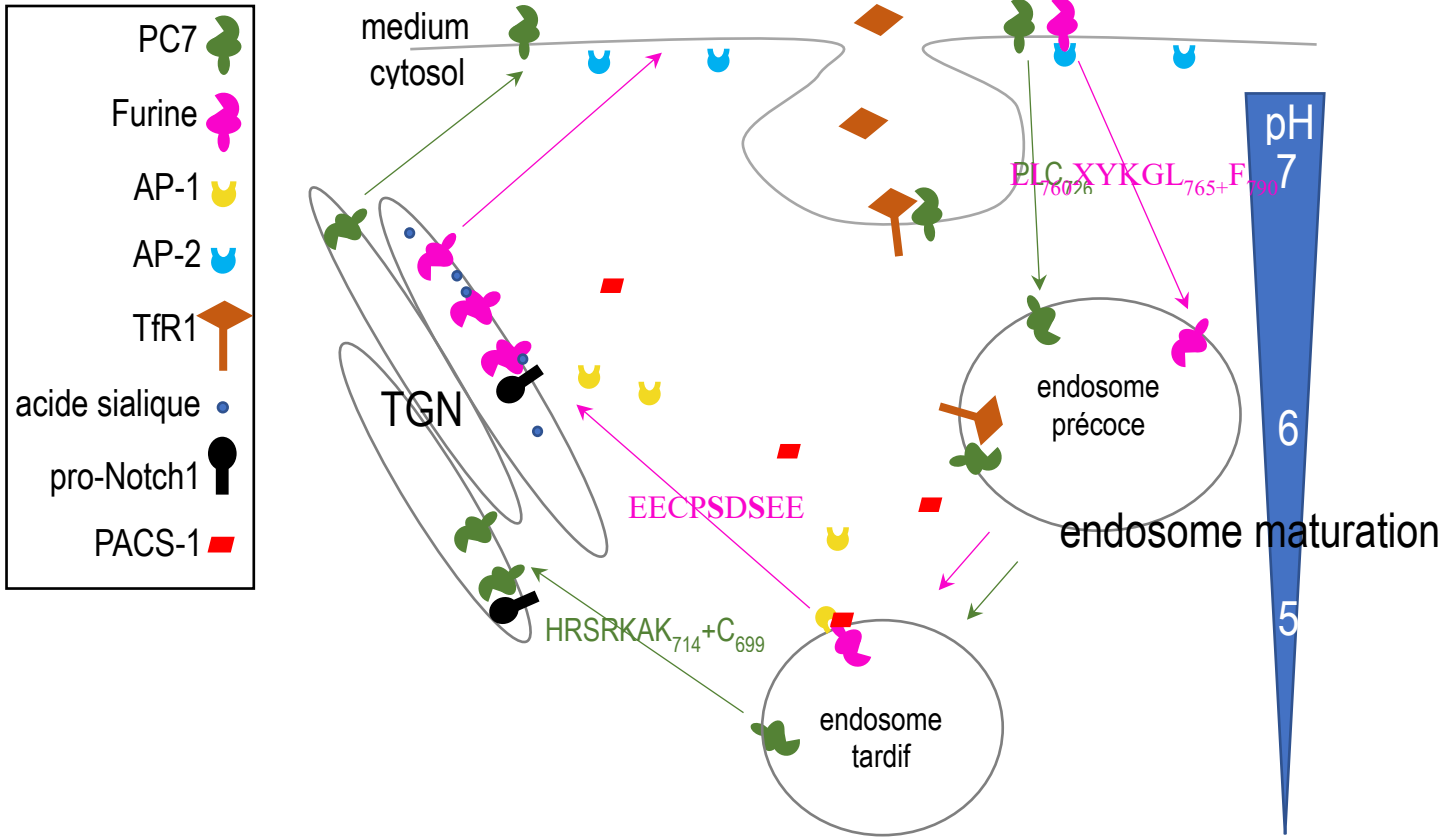


Figure 1.11 Localisation subcellulaire et trafic de PC7 et de la Furine le long de la voie conventionnelle.

Les flèches indiquent le transport de PC7 (vert) et de la Furine (rose) entre les organelles. Les motifs présents dans les CT aidant au trafic sont annotés au-dessus de chacune des flèches.

Tfr1 est un marqueur des endosomes, c'est dans cette organelle qu'il est clivé par PC7⁴⁹. Cependant, la localisation subcellulaire de l'activité de clivage de PC7 sur les autres substrats n'est pas aussi claire. Une analyse de 152 séquences de sites clivage de PCs a montré 95% de similitudes entre ces 152 motifs de reconnaissance, or toutes les PCs ne clivent pas les mêmes substrats. Ainsi, une équipe créa des biosenseurs nommés CLIP (*cell-linked indicator of proteolysis*) pour comprendre la distribution de l'activité des PCs, *in vitro*, et plus précisément de PC7 et de la Furine. Par cette approche, il a été mis en évidence que, dans les cellules de

mélanome B16F, la Furine et PC7 clivent proNotch-1 dans le TGN¹⁴⁹. Pour la première fois, *in vitro*, un clivage de PC7 a été démontré dans le TGN.

1.3.1.1 Importance du TMCT pour le transport et l'activité de clivage de PC7

La localisation cellulaire de PC7 est contrôlée par des signaux présents en C-terminal dans son domaine transmembranaire et sa queue cytosolique¹⁴⁵. Le TM permet une rétention intracellulaire de la protéine. En effet, PC7 est résistant un traitement au carbonate de sodium (Na₂CO₃) utilisé pour extraire les protéines faiblement ou non liées à la membrane ce qui a permis de conclure que cette protéine est ancrée à la membrane⁸¹.

La région cytosolique de PC7 régule l'internalisation endosomale grâce au motif Pro-Leu-Cys₇₂₆ (PLC) présent dans sa CT (**Figure 1.11**) mais ne semble aucunement réguler la localisation de PC7 dans le TGN. En effet, pro-Notch1 est toujours clivé même par un mutant PLC₇₂₅-AAA chez la souris¹⁴⁹. Présentement, aucun mécanisme n'explique l'importance de ce motif, à part l'internalisation endosomale, ni les partenaires potentiels pouvant s'y lier.

Comme déjà énoncé précédemment, un motif basique dans la CT de PC7 (HRSRKAK₇₁₄) couplé aux deux cystéines (C_{699,704}) palmitoylées favorise le recyclage de PC7 depuis les endosomes précoces vers le TGN en passant par les endosomes tardifs. Une mutation du groupe basique seul ou associé aux deux Cys engendre une relocalisation de PC7 à la surface. Cependant, la mutation des deux Cys seules n'affecte aucunement la localisation de PC7 au TGN, elle amplifie uniquement le phénotype du groupe basique muté. Étonnement, contrairement au motif basique, les deux Cys sont conservées au cours de l'évolution (**Figure 2.1**). Il est possible que le groupe basique agisse chez l'humain comme site de liaison pour une protéine qui va diriger PC7 vers le TGN. En effet, un mécanisme similaire est déjà observé avec la Furine et son motif acide (motif EECPSDSE_{EE}DE où S est un site de phosphorylation)⁴³ se liant à PACS-1 (*phosphofurin acidic cluster sorting protein 1*) afin de recycler la Furine à partir des endosomes au TGN^{43; 150}.

L'absence du TMCT de PC7 génère une protéine soluble non active. En effet, les substrats hTfR1, gp160 ou encore pro-BDNF ne peuvent être clivés par la forme soluble de PC7 (shPC7)^{52; 118}. Ce n'est pas le cas pour la Furine qui, dépourvue de son TMCT, clive tout de même gp160¹¹⁸. Ce résultat renforce la spécificité d'action de PC7 sur ses substrats dépendamment de sa région C-terminale transmembranaire. Ainsi, des informations essentielles dans le TMCT de PC7 régulent sa localisation et/ou son interaction avec d'autres protéines l'assistant dans son transport et/ou son activité de clivage.

Afin d'approfondir la fonction du TMCT de PC7, un échange de ces domaines avec ceux de la Furine a démontré que PC7 a tendance à être plus sulfatée et emploie plus efficacement la voie conventionnelle⁴¹.

1.3.1.2 La voie non conventionnelle

À l'aide d'une méthode de marquage en surface par biotinylation, il est possible d'estimer le temps nécessaire à PC7 pour atteindre la surface cellulaire en utilisant la voie sécrétoire conventionnelle (c'est-à-dire en passant par l'appareil de Golgi), soit environ une heure⁴¹. Cependant, une portion de PC7 (environ 60%) peut atteindre la surface cellulaire en 10 minutes *via* une voie non conventionnelle allant directement du RE à la surface cellulaire. En effet, malgré l'utilisation de la *brefeldin A* (BFA) inhibant le transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi on trouve tout de même l'enzyme PC7 en surface marquée à la biotine⁴¹. L'utilisation de cette deuxième voie ne permet pas la sécrétion du pro-segment dans le milieu ni la présence de MTP sur PC7. En effectuant un échange des domaines TMCT de la Furine et PC7, la Furine-TMCT_{PC7} peut atteindre la surface cellulaire *via* la voie non conventionnelle, ce qui n'est pas le cas pour la Furine de type sauvage ou pour PC7-TMCT_{Furine}. Plus précisément, en échangeant uniquement les TM des deux protéines, PC7-TM_{Furine} reste bloquée au RE sous forme de zymogène, tandis que la Furine-TM_{PC7} peut atteindre la surface cellulaire en empruntant la voie non conventionnelle. Ce résultat indique le caractère essentiel et unique du TM de PC7. En alignant les deux TM (**Figure 1.7**), on peut noter que les différences majeures sont pour PC7 au niveau des résidus: Trp₆₇₈, Tyr₆₈₁, Tyr₆₈₂, Tyr₆₈₇ et Glu₆₈₅⁴¹. Peu de mécanismes sont connus

en ce qui concerne les voies non conventionnelles, plusieurs possibilités seront abordées dans la partie discussion de ce manuscrit.

1.3.2 Les endosomes

1.3.2.1 L'endocytose

L'endocytose correspond à l'invagination de molécules du milieu extracellulaire vers l'intérieur d'une cellule. Ce mécanisme peut impliquer des calvéoles, et être indépendant ou dépendant de la clathrine. Dans ce dernier cas, il se caractérise par la formation de dépressions tapissées d'un manteau de clathrine permettant l'invagination de la membrane plasmique afin d'autoriser l'internalisation de molécules extracellulaires. La protéine AP-2 va initier l'endocytose en mobilisant la clathrine et par le recrutement de protéines cargos¹⁵¹⁻¹⁵³. Afin de stabiliser le puits nouvellement formé, la polymérisation d'actine va contribuer à la formation de la vésicule en fermant le puits. La scission de cette vésicule par la dynamine, enzyme appartenant à la famille des GTPases, donne naissance à une vésicule (**Figure 1.12**)¹⁵⁴. Cependant, la dynamine n'est pas spécifique à l'endocytose puisqu'elle interagit également avec le cytosquelette et intervient dans d'autres voies vésiculaires telle que la fission des bourgeons permettant le transport rétrograde depuis les endosomes vers le Trans-Golgi¹⁵⁵. Ainsi, il faut être vigilant quant à l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre la dynamine (dynasore) puisqu'en plus de l'endocytose, d'autres mécanismes vont être bloqués tels que la formation de vésicules pour l'appareil de Golgi ou la régulation du cholestérol au niveau de la membrane plasmique¹⁵⁶. Lorsque la vésicule est détachée de la membrane, le manteau de clathrine est désassemblé grâce à l'intervention de l'ATPase HSC 70 (*heat shock cognate*)¹⁵¹. Les vésicules nouvellement formées et dépourvues de leur manteau de clathrine vont pouvoir fusionner avec les endosomes précoces (*early endosome* (EE)). C'est par ce type de mécanisme endocytique que la transferrine et son récepteur sont absorbés¹⁵⁷.

1.3.2.2 La famille des endosomes

À la suite de l'endocytose, les vésicules nouvellement formées vont fusionner avec les EE dans le but de relarguer leur contenu provenant du milieu extracellulaire. Les EE sont des vésicules de petite taille situées à proximité de la membrane plasmique pour une période de 10 à 15 minutes. Ces EE, dont le pH varie entre 5.9 et 6.8, vont trier et diriger le contenu vésiculaire aux bons destinataires par différents chemins intracellulaires¹⁵⁸. Si les protéines cargos sont destinées à être dégradées, elles sont retenues dans la paroi vacuolaire des EE. Dans ce cas, il peut y avoir la formation de vésicules intra-luminales afin d'arrêter tout lien avec les voies intracellulaires et autoriser le relargage du mauvais contenu à l'extérieur de la cellule¹⁵⁹. Ces vésicules intra-luminales tout comme les EE peuvent aussi envoyer les protéines aux lysosomes, pour dégradation, en passant par les endosomes tardifs (*late endosome* (LE)).

Les endosomes tardifs, également connus sous le nom de corps vésiculaires à cause de leur taille et compositions variables, sont facilement identifiables par leur membrane hautement négativement chargée^{147; 160}. Ces vésicules se forment par des fusions de type '*kiss-and-run*'. Les LE, dont le pH varie entre 6 et 4.9, ont un rôle de médiateur pour transporter des protéines à leur destination finale : les lysosomes composés de nombreuses hydrolases et d'un pH très acide¹⁵⁸. L'ensemble de ces vésicules forme un mécanisme continu avec une évolution depuis les EE vers les lysosomes en passant par les LE (**Figure 1.12**). Ce processus est possible par une acidification des vésicules, mais aussi par des changements de fusion vésiculaire, ou encore de la composition des membranes¹⁵⁹.

Les EE n'adressent pas uniquement des protéines à la dégradation. En effet, certaines protéines utilisent la voie rétrograde caractérisée par un transport de protéines des EE vers le TGN en passant ou non par les endosomes de recyclage ayant un pH d'environ 6.4¹⁶¹. Les endosomes de recyclage stockent les protéines et les trient afin de les envoyer vers la destination adéquate¹⁶². Cette voie favorise le recyclage de protéines préalablement passées dans le TGN pour atteindre la membrane (voie antérograde), à revenir à cette organelle pour être de nouveau utilisée. PC7 semble utiliser cette voie grâce à son motif basique couplé aux deux Cys palmitoylées¹¹². D'autres protéines telles que la Furine, le MPR ou encore le transporteur de

glucose (GLUT4)¹⁶³ empruntent également ce chemin. Plusieurs protéines dont AP-1 ou encore le rétromère et GGA3 (*Golgi-associated γ -ear-containing ARF binding protein 3*) participent à la régulation de ce transport rétrograde (Cf **1.3.4.2 Le rétromère et les protéines GGA**). En plus de participer au transport rétrograde, les endosomes de recyclage peuvent revenir à la membrane plasmique. L'ensemble de ces vésicules sont entre autres régulées par les SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*)¹⁶³. Il est à noter que TfR1 est une protéine empruntant ces endosomes afin d'être transportée entre les EE, le TGN et la surface cellulaire¹⁶³.

1.3.2.3 La régulation du transport vésiculaire

La régulation spatio-temporelle du transport vésiculaire est possible grâce à l'intervention des protéines Rab appartenant à la famille des GTPases et à la superfamille des Ras. Ces protéines sont exprimées ubiquitairement, certaines ont été caractérisées par leur implication dans le transport vésiculaire, mais la plupart ont encore une fonction inconnue. Les Rab fonctionnent de façon cyclique sous deux formes : une forme active à la membrane en lien avec le GTP (guanine triphosphate) et une forme inactive dans le cytosol associée au GDP (guanine diphosphate). Ces protéines inactives et solubles dans le cytosol sont d'abord insérées dans les membranes cellulaires/vésiculaires *via* la MPT géranylgeranylation avant de devenir actives¹⁶⁴. Le maintien de la forme inactive des Rab est contrôlé par l'enzyme GDI (*GDP dissociation inhibitor*). Suite à la relocalisation membranaire, le GDF (*GDI displacement factor*) chasse le GDI et permet ainsi au facteur d'échange GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) d'initier l'échange du GDP en GTP afin d'activer la protéine Rab¹⁵¹. La présence du GTP initie le recrutement d'effecteurs (phosphate inositol, SNARE, protéines d'arrimage pour l'adressage de vésicules...) ¹⁵⁸ en lien avec le Rab actif.

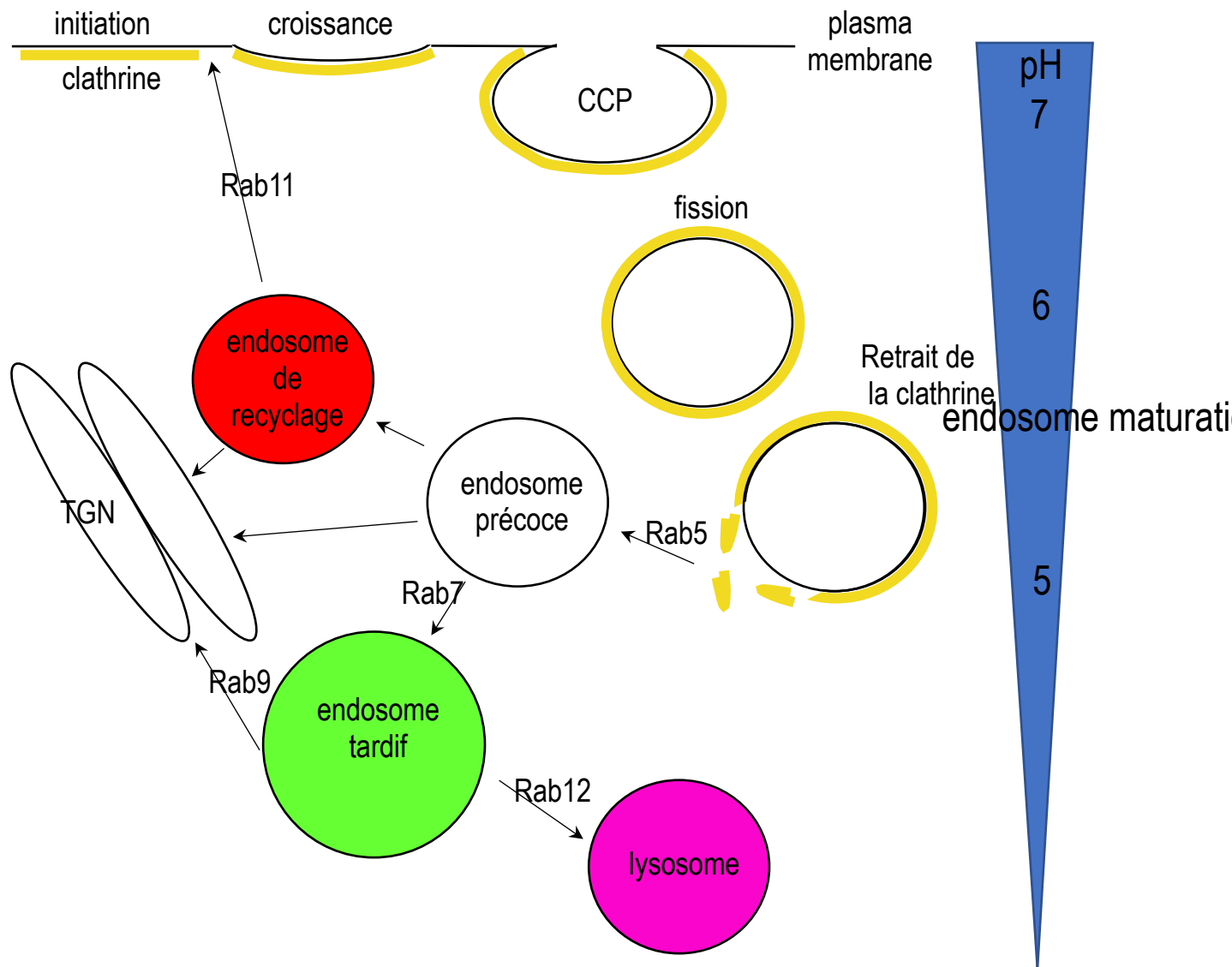


Figure 1.12 : L'endocytose et le trafic endosomal

Ce schéma représente les différentes étapes de l'endocytose menant à la formation d'endosomes précoces. La clathrine est représentée en orange. Les différentes Rab intervenant dans le trafic endosomal sont annotées au-dessus des flèches. (Adapté de Kaksonen et al., 2018 et Roosen et al., 2016^{165; 166})

Les Rab représentent une famille d'une soixantaine de protéines¹⁶⁷, parmi elles, Rab5 qui est connue pour localiser préférentiellement dans les EE tandis que Rab7 et Rab9 se situent aux LE et Rab9 et Rab11 aux endosomes de recyclage (**Figure 1.12**)¹⁶¹. Rab7 et Rab9 sont impliquées dans le recyclage de protéines depuis les LE au TGN¹⁶⁸. Il est ainsi possible de trouver différentes Rab dans une même membrane toutefois, chacune de ces protéines semble avoir une fonction spécifique et possède une localisation unique dans des microdomaines membranaires¹⁶⁹. La maturation des EE en LE est possible grâce à la présence de Rab7 et à l'inactivation de Rab5 qui est médiée par l'hydrolyse du GTP en GDP catalysée par une enzyme GAP (*GTPase activating protein*)¹⁵⁸.

1.3.3 La Furine et PC7, entre spécificité et redondance

Bien que la Furine et PC7 ne présentent une homologie de séquence que de 31,2%, elles possèdent une grande redondance dans leur fonction de sheddase puisqu'elles clivent un grand nombre de substrats identiques (ADAM10, Notch1, IGF-1...)^{130; 149; 170}. Ces deux PCs sont toutes les deux localisées dans le TGN où elles ne se chevauchent que partiellement^{127; 145} (**Cf 1.3.1 Localisation subcellulaire et transport de PC7: sialylation**), la Furine y est toutefois plus abondante. La Furine est présente de façon plus spartiate à la surface cellulaire et dans les endosomes précoces et tardifs comparativement à PC7^{112; 145; 171}. Cependant son activité, mesurée à l'aide des biosenseurs CLIP, est trois fois plus enrichie dans les endosomes que dans le TGN où elle est recyclée^{149; 172}. Une différence majeure entre ces deux PCs est que la Furine peut cliver des substrats à la surface cellulaire, ce n'est pas le cas pour PC7⁴⁵.

Tout comme PC7, la Furine est une protéine transmembranaire pourvue d'une CT de 56 aa. Cette CT est composée de plusieurs motifs régulant sa localisation subcellulaire. Depuis la surface cette protéine est endocytée dépendamment de la clathrine grâce à un motif contenant une tyrosine (YKGL₇₆₅) étendu à un motif di-leucine (LI₇₆₀) et une phénylalanine (Phe₇₉₀)^{173; 174}. La tyrosine va se lier à la protéine adaptatrice 2 (AP-2) et permettre le déplacement rétroactif de la Furine depuis la membrane vers les endosomes^{172; 175}. Tel que mentionné précédemment, (**Cf 1.3.1 Localisation subcellulaire et transport de PC7**), un

motif acide dans sa CT est phosphorylé par la caséine kinase II afin de réguler le recyclage de la Furine des endosomes au TGN¹⁷⁶⁻¹⁸⁰. Ce motif va être reconnu par PACS-1 qui va se lier à la protéine adaptatrice 1 (AP-1) afin d'effectuer le transport rétrograde de la Furine^{150; 181}. En l'absence de la caséine kinase II la phosphorylation est inexistante et la Furine est relocalisée par AP-1 dans des granules de sécrétion depuis la voie sécrétoire vers la voie régulée¹⁸².

(**Figure 1.11**). PC7 est dépourvue de ces motifs et sites de phosphorylation, cependant contrairement à la Furine elle est palmitoylée⁴⁵. Présentement, aucun partenaire de régulation de PC7 n'est connu et seul le motif basique et la triade PLC furent découverts pour réguler le trafic de PC7^{112; 146}.

L'inversion des TMCT de PC7 et la Furine démontre que le TM de PC7 est essentiel pour s'orienter vers la voie non conventionnelle (**Cf 1.3.1.2 La voie non conventionnelle**). Pour ce qui est de la voie conventionnelle, la spécificité de substrat de PC7 sur hTfr1 est à la fois dépendante de ses régions catalytique et C-terminale. En effet, PC7-CT_{Furine} clive partiellement hTfrR1 comparativement à PC7, tandis que les chimères PC7-TMCT_{Furine}, Furine-TMCT_{PC7} ou Furine-CT_{PC7} ne le clivent pas⁵². Ces résultats appuient le fait que le TMCT de PC7 est essentiel à sa fonction. Au contraire de PC7, la Furine qui peut être sécrétée dans le milieu, peut cliver ses précurseurs même sous la forme soluble²⁴.

1.3.4 Les possibles partenaires de régulation de PC7

1.3.4.1 Les protéines adaptatrices

Les protéines adaptatrices (AP) sont une famille de 5 protéines toutes composées de 4 sous unités : deux larges sous-unités (γ , α , δ , ϵ , ζ et $\beta 1-5$), une sous unité medium ($\mu 1-5$) et une petite sous unité ($\sigma 1-5$) respectivement pour les AP1-5¹⁸³. Les sous-unités μ et σ sont au centre du complexe et sont impliquées dans la reconnaissance de motifs des protéines cibles. Les AP se lient grâce à la reconnaissance de courtes séquences spécifiques d'aa à la CT de protéines cargo afin de les relocaliser (**Tableau IV**). Les protéines adaptatrices interviennent dans la régulation du transport protéique membranaire le long de la voie sécrétoire et dans les

compartiments endocytiques dans le but de maintenir des fonctions physiologiques. Seules les trois premières AP sont associées à la clathrine¹⁸³. Deux principaux motifs sont reconnus par ces trois premiers membres: le motif tyrosine YXXØ et le motif di-leucine [DE]XXX[LI] (où X est un aa et Ø un aa hydrophobe) (**Tableau IV**) ou encore le motif NPYX¹⁸⁴. Par exemple, le motif tyrosine est associé au signal de la CT de hTfR1 permettant ainsi de le transporter dans les endosomes. En ce qui concerne AP-4, elle interagit, entre autres, avec la protéine APP impliquée dans la maladie d'Alzheimer *via* le motif YKFFE. Enfin, le dernier membre de la famille, AP-5 est encore peu défini en ce qui concerne ses motifs de reconnaissance, il intervient dans la régulation de l'homéostasie lysosomale^{183; 185}.

La protéine adaptatrice 1 est présente à la fois aux endosomes et au TGN, elle se lie aux protéines Arf1 (*ADP-ribosylation factor*) et PI4P (phosphatidylinositol (4,5) -biphosphate) qui l'amènent au TGN. AP-1 intervient dans la biogenèse de granules de sécrétion, et le transport bidirectionnel entre le TGN et les endosomes de recyclage¹⁸⁶. Une mutation de la sous unité β entraîne une accumulation de MPR dans les EE puisqu'il ne peut plus être recyclée au TGN¹⁸⁷, tandis qu'une mutation de la sous-unité sigma de la protéine adaptatrice 1 cause un retard mental lié au chromosome X¹⁸⁸.

AP-2 est recrutée à la membrane plasmique par PIP2 ou par la protéine Arf6. Ce recrutement entraîne un changement de conformation de la protéine adaptatrice facilitant son accès aux motifs de reconnaissance di-leucine et tyrosine¹⁸⁶. Ainsi, AP-2 se lie à CD4 *via* le motif di-leucine et favorise une internalisation endocyttaire rapide de CD4¹⁸⁹.

Chez la souris la délétion de gènes codant pour AP-1 ou AP-2 est létale. Chez l'homme plusieurs mutations d'importance clinique ont été rapportées. Ainsi, une mutation de AP-1 est associée au syndrome de Fried qui se caractérise par le développement d'un retard mental et un dysmorphisme facial¹⁸³.

Tableau IV. Motifs de reconnaissance de protéines cargo et trafic intracellulaire

(Ce Tableau est adapté de Park et al., 2014¹⁸³)

Protéine	localisation	signal de reconnaissance	fonctions
AP-1	TGN/endosomes	YXXØ ou [DE]XXXL[LI]	associée à la clathrine, transport entre le TGN et les endosomes
AP-2	membrane plasmique	YXXØ ou [DE]XXXL[LI]	associée à la clathrine, transport de la membrane aux endosomes
AP-3	endosomes	YXXØ ou [DE]XXXL[LI]	en lien avec les lysosomes
AP-4	TGN	YX [FYL][FL]E	polarisation cellulaire
AP-5	endosomes tardifs	nd	homeostasie lysosomale
GGA	endosomes précoces et TGN	DXXLL	transport du TGN aux endosomes
Rétromère	endosomes et TGN	YSVL	motif de reconnaissance de la sortiline
AP-2	endosomes	NPXY	associée à la clathrine

1.3.4.2 Le rétromère et les protéines GGA

Chez les mammifères, le rétromère est un hétéropentamère composé d'un dimère BAR-SNX (*Bin- Amphiphysin-Rvs*)-(sorting nexin)¹⁹⁰ essentiel au remodelage de la membrane pour y favoriser le recrutement du rétromère¹⁹⁰, et d'un trimère Vps26-29-35 (*vacuolar protein sorting*). Ce complexe régule le transport rétrograde des endosomes au Trans-Golgi de nombreuses protéines telles que la sortiline ou MPR¹⁹¹. Les sous-unités du rétromère ont différents rôles dans le transport rétrograde, ainsi le dimère SNX se lie aux membranes des endosomes précoces¹⁹² tandis que le trimère se lie à un motif de reconnaissance aux CT de protéines. Par exemple, ce complexe reconnaît le motif YSVL de la CT de la sortiline¹⁹¹ alors qu'AP-1 permet le transport de la sortiline aux endosomes¹⁹³. Le rétromère régule aussi le transport de la bactérie Shiga toxine des endosomes au TGN^{194; 195}. Le dimère SNX est nécessaire mais pas suffisant au recrutement du trimère. En effet, l'intervention de Rab7 palmitoylée est essentielle au bon fonctionnement du rétromère^{196; 197}. Une mutation de Rab7-GTP va perturber le trafic de MPR qui se retrouvera bloqué dans le TGN au golgi^{196; 198}. En ce qui concerne le trimère, VPS35 sert de structure de base pour les sous-unités VPS26 et 29.

Finalement, d'un point de vue phénotypique, un dysfonctionnement du rétromère favorise le développement de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et d'Alzheimer¹⁹⁹.

En plus des APs et du rétromère, les protéines GGAs (*γ*-ear containing ADP-ribosylation factor-binding protein) sont une autre famille protéique capable d'interagir avec des motifs de protéines cargo dans le but de les relocaliser du TGN aux des vésicules dépendantes de la clathrine²⁰⁰. Les GGAs sont constituées d'un domaine VHS (Vps27p, HRS, STAM) capable de reconnaître les motifs acides di-leucine (DXXLL) tel que le motif du MPR : EESEERDDHLLPM²⁰¹. Ce domaine VHS interagit aussi avec la protéine BACE1 (*beta-site APP cleaving enzyme 1*) impliquée dans la protéolyse de APP et la formation de plaques neurales. Cette interaction régule le transport de BACE1 entre les endosomes et les lysosomes^{192; 202}.

1.3.4.3 D'autres exemples de motifs associés au transport protéique

Les protéines transmembranaires possèdent des motifs de reconnaissance dans leur CT permettant de réguler le transport à leur destination finale. Le **Tableau IV** met en avant une liste de protéines régulant transport intracellulaire de protéines cargos *via* leur motif de reconnaissance^{186; 203}. En plus des protéines citées précédemment, d'autres motifs interviennent dans la régulation de ce transport protéique. Par exemple un motif di-leucine (LL) est présent dans la CT de la protéine Mnk (Menkes). Cette protéine est impliquée dans le transport du cuivre et cycle entre le TGN et la membrane plasmique et ce motif lui permet d'être internalisée depuis la membrane plasmique vers les endosomes²⁰⁴. Actuellement, la protéine régulant ce trafic *via* la reconnaissance du motif di-leucine n'a pas encore été caractérisée bien que les protéines AP soient suggérées pour ce mécanisme²⁰⁴. De plus, ce motif n'est pas suffisant pour la localisation dans l'appareil de Golgi²⁰⁴, c'est une information critique présente dans son TM qui lui permet rester dans le TGN²⁰⁵.

Un deuxième exemple est celui de la protéine SMAP2 appartenant à la famille des Arf GTPase. Cette protéine localise au TGN grâce à la présence du motif basique KYEKKK²⁰⁶. Deux autres motifs LLGLD et DLL reconnus par AP-1 contribuent à l'interaction de SMAP2 avec la clathrine, protéine également présente dans les EE²⁰⁷.

Finalement, un dernier exemple est celui de PC5B qui possède un motif acide YGLL couplé à un motif di-leucine (LL) se liant à PACS-1 dans le but de la re-localiser dans le TGN^{150; 181; 208}. En plus du transport vers le TGN, un second motif YEKL favorise l'internalisation endosomale de PC5B²⁰⁸.

1.3.4.4 Cab45 (calcium-binding protein 45)

Actuellement, aucun mécanisme de régulation n'explique le transport de PC7 du TGN à la membrane plasmique, ainsi une possibilité serait que Cab45 se lie à PC7 pour l'amener à sortir du TGN et l'envoyer à la surface cellulaire. De plus, l'activation et l'activité des PCs sont régulées par le calcium suggérant un lien avec une protéine se liant au calcium (exemple Cab45).

Codée par le gène *sdf4* (*stromal cell derived factor 4*), la protéine Sdf4/Cab45²⁰⁹ est une glycoprotéine de 45 kDa dont la surexpression a été observée dans les tissus adipeux²¹⁰. Cab45 appartient à la famille des CREC (Cab45, reticulocalbin, ERC-45, calumenin) c'est-à-dire une famille protéique ayant un motif d'au moins 6 répétitions de type main-EF composé d'une structure hélice-boucle-hélice. Ce motif en forme de main est connu pour se lier au calcium conférant à cette famille une caractéristique de dépendance au Ca²⁺²¹¹. Le motif HEEF en C-terminal de Cab45 semblerait servir de signal de rétention au Trans-Golgi.

Trois variants de la protéine Cab45 ont été répertoriés. La forme la plus répandue et étudiée correspond à la protéine Cab45-G (Cab45-Golgi). Cab45-G est composée d'un peptide signal en N-terminal et de 6 répétitions du motif EF. Comme son nom l'indique, cette protéine localise dans l'appareil de Golgi au niveau du Trans-Golgi²¹⁰. Le second variant, Cab45-C (Cab45-cytosol) est exprimée dans le cytosol. Ce variant est dépourvu d'un peptide signal et ne peut emprunter la voie sécrétoire²¹². Cab45-C localise dans les cellules du pancréas, où il

régulerait l'exocytose de zymogènes²¹². La troisième forme, Cab45-S (Cab-45 Sécrétée) a un peptide signal en N-terminal mais ne possède pas les répétitions du motif EF²¹² et est donc présente sous forme sécrétée.

Le motif EF en lien avec le calcium est essentiel à la régulation de la concentration de Ca^{2+} dans le Trans-Golgi. La présence de Ca^{2+} médie l'oligomérisation de Cab45 nécessaire à la séquestration puis la sortie de protéines cargo de l'appareil de Golgi (**Figure 1.13**)^{213; 214}. Ainsi, Cab45 N-glycosylée dans le TGN trie et oriente les protéines cargos à leur destination finale¹⁸⁴ et les ions calcium régulent la signalisation et la fonction de transport et de stockage Cab45. La présence de Ca^{2+} et SPCA1 (*secretory pathway calcium ATPase1*) favorisent la rétention de Cab45 dans les membranes du TGN²¹⁵. PC7 est présent à la fois au TGN et à la membrane plasmique il est donc possible que Cab45 régule PC7.

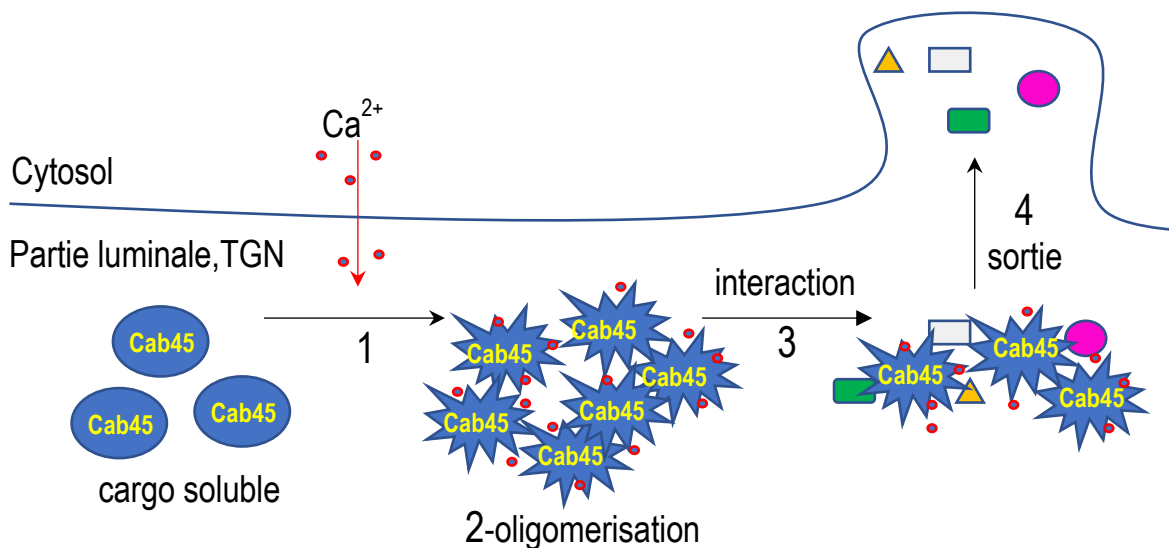


Figure 1.13 : Sortie de protéines cargos du Trans-Golgi par Cab45

Cab45-G est une protéine soluble dans le TGN qui s'oligomérisse en présence de calcium. Cette protéine oligomérique peut ainsi se lier à différentes protéines cargos pour les sortir du TGN. Généralement elles sont envoyées à la membrane plasmique²¹³. (Cette figure est adaptée de Crevenna et al, 2016²¹³).

Hypothèse et objectifs:

Bien que la fonction de sheddase de PC7 soit majoritairement comprise et que sa localisation cellulaire soit connue (Trans-Golgi, endosomes et surface cellulaire) de nombreux points restent encore à élucider sur la biologie cellulaire de PC7. Le but de ce travail de thèse est de caractériser la biologie cellulaire de PC7. Plus précisément, quelles informations essentielles dans la queue cytosolique de PC7 régulent sa biologie cellulaire?

Hypothèse : Des motifs conservés entre les espèces sont reconnus par des partenaires protéiques et régulent le transport et l'activité enzymatique de PC7.

Afin de répondre à cette hypothèse j'ai divisé mon travail en trois principaux objectifs :

- 1- Comprendre l'importance de la queue cytosolique de PC7 dans la régulation de son transport et de son activité de clivage en découvrant de nouveaux motifs présents dans la CT.
- 2- Identifier des partenaires protéiques aidant au transport et à l'activité de sheddase de PC7.
- 3- Comprendre où et comment PC7 se sépare de son pro-segment.

**Chapitre 2 : Le motif ExExxxL de la
queue cytosolique de la proprotéine
convertase sécrétoire humaine 7 régule
son transport et son activité de clivage**

(article soumis dans

Journal of Biological Chemistry

le 12 avril 2019)

The motif ExExxL in the cytosolic tail of the secretory proprotein convertase PC7 regulates its trafficking and cleavage activity

Tracking no: JBC/2019/008621

Author Affiliation:

Lorelei Durand (Clinical Research Institute of Montreal, Canada), Alexandra Evagelidis (Clinical Research Institute of Montreal, Canada), Stéphanie Duval (Clinical Research Institute of Montreal, Canada), Johann Guillemot (Université Claude Bernard Lyon 1, France), Vahid Dianati (University of Sherbrooke, Canada), Emilia Sikorska (University of Gdansk, Poland), Peter Schu (Georg-August University,), Robert Day (Institut de pharmacologie de Sherbrooke, Faculté de médecine et des Sciences de la santé,), Nabil Seidah (Clinical Research Institute of Montreal, Canada)

Abstract:

Many secretory proteins require cleavage at specific sites to become activated. The proprotein convertases (PCs) form a family of 9 secretory subtilisin-like serine proteases, seven of which cleave at specific basic residues within the TGN, granules and/or at the cell surface/endosomes. The seventh member, known as PC7, is a type-I transmembrane (TM) protein with a 97 residues cytosolic tail (CT). PC7 uniquely sheds human transferrin receptor 1 (hTfR1) into soluble shTfR1 in endosomes. To better understand the physiological roles of PC7, we focused on the relationship between the CT-regulated trafficking of PC7 to its ability to shed hTfR1. Deletion of the TM-CT, resulted in a soluble protein and loss of the shedding activity of PC7 on hTfR1. Extensive CT-deletions and mutagenesis analyses led us to zoom on three residues in the CT, namely Leu₇₂₅ and Glu_{719,721} that are part of a novel motif ExExxL₇₂₅, which is critical for PC7 activity on hTfR1. NMR studies of two 18-mer peptides mimicking this region of the CT and its Ala mutant revealed that the three exposed residues are on the same side of the molecule. This led to the identification of AP-2 as an adaptor protein that recognizes the ExExxL₇₂ motif and is thus a potential new regulator of PC7 trafficking and cleavage activity. Immunocytochemistry of the subcellular localization of PC7 and its Ala-mutants of Leu₇₂₅ and E_{719,721} demonstrated that Leu₇₂₅ enhances the localization of PC7 in early endosomes, and together with Glu_{719,721} they increase the endosomal activity of PC7 on hTfR1.

Competing interests:**Author contributions:**

Lorelei Durand: Conceptualization; Formal analysis; Investigation; Methodology; Writing-original draft; Writing-review and editing Alexandra Evagelidis: Resources Stéphanie Duval: Methodology Johann Guillemot: Resources Vahid Dianati: Methodology Emilia Sikorska: Methodology Peter Schu: Resources Robert Day: Resources Nabil Seidah: Formal analysis; Supervision; Funding acquisition; Validation; Methodology; Writing-original draft; Project administration; Writing-review and editing

Funding:[Reviewer Instructions](#)

2.1 Résumé

De nombreuses protéines sécrétoires sont clivées à des sites spécifiques pour être activées. Les proprotéines convertases (PC) forment une famille de 9 sérines protéases sécrétoires analogues à la subtilisine, dont 7 clivent au niveau de motifs composés de résidus basiques dans le TGN, les granules et/ou à la surface des cellules/endosomes. Le septième membre, appelé PC7, est une protéine transmembranaire (TM) de type I avec une queue cytosolique (CT) de 97 résidus. Seule PC7 clive le récepteur 1 de la transferrine humaine (hTfR1) en hTfR1 soluble (shTfR1) dans les endosomes. Pour mieux comprendre les rôles physiologiques de PC7, nous nous sommes concentrés sur la relation entre le trafic de PC7 réglementé par le CT et sa capacité à éliminer hTfR1. La délétion du TMCT confère une protéine soluble et la perte de l'activité de sheddase de PC7 sur hTfR1. Des analyses approfondies de délétions CT et de mutagenèse nous ont amené à zoomer sur trois résidus du CT, à savoir E_{719,721} et L₇₂₅, qui font partie d'un nouveau motif, ExExxxL₇₂₅, essentiel à l'activité de PC7 sur hTfR1. Les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) de deux peptides de 14-mer imitant cette région de la CT ainsi que son homologue muté en Ala ont révélé que les trois résidus étaient exposés du même côté de la molécule. L'ensemble de ces résultats a conduit à l'identification de AP-2, protéine adaptatrice reconnaissant le motif ExExxxL₇₂₅. Ainsi, AP-2 constitue un nouveau régulateur potentiel de l'activité de trafic et de clivage de PC7. L'immunocytochimie de la localisation subcellulaire de PC7 et de ses mutants Ala de L₇₂₅ et E_{719,721} a démontré que L₇₂₅ améliore la localisation de PC7 dans les endosomes précoces et, conjointement avec E_{719,721}, augmente l'activité endosomale de PC7 sur hTfR1.

2.2 Contribution

Conceptualisation: N.G. Seidah. P. Schu pour l'idée de la protéine AP-2.

Réalisation des expériences : L. Durand. Conception de certains mutants : J. Guillemot et A. Evagelidis. Co-IP : S. Duval. NMR : V. Dianati et R. Day

Analyse de résultats : L. Durand sauf pour le NMR : V. Dianati et E. Sikorska.

Écriture du manuscrit : L. Durand et N. G. Seidah

Supervision: N. G. Seidah

2.3 Manuscrit

The motif ExExxxL in the cytosolic tail of the secretory human proprotein convertase PC7 regulates its trafficking and cleavage activity

Lorelei Durand¹, Alexandra Evagelidis¹, Stéphanie Duval¹, Johann Guillemot², Vahid Dianati³, Emilia Sikorska⁴, Peter Schu⁵, Robert Day³ and Nabil G. Seidah*¹

From the ¹Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research of Montreal, affiliated to the Université de Montréal; 110 Pine Ave. West, Montreal, QC, Canada H2W 1R7; ²CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Team Pathogenesis of Legionella, INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Villeurbanne, France; ³Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Department of Surgery/Urology Division, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé; ⁴Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland; ⁵Department of Cellular Biochemistry, University Medical Center, Göttingen, Humboldtallee 23, 37073 Goettingen, Germany.

*Address correspondence to: Nabil G. Seidah, Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research of Montreal, 110 Pine Ave. West, Montréal, QC H2W 1R7, Canada.

Tel: 514- 987-5609; E-mail: seidahn@ircm.qc.ca

2.3.1 Abstract

Many secretory proteins are cleaved at specific sites to be activated. The proprotein convertases (PCs) form a family of 9 secretory subtilisin-like serine proteases, seven of which cleave at specific basic residues within the TGN, granules and/or at the cell surface/endosomes. The seventh member, known as PC7, is a type-I transmembrane (TM) protein with 97 residues cytosolic tail (CT). PC7 uniquely sheds human transferrin receptor 1 (hTfR1) into soluble shTfR1 in endosomes. To better understand the physiological roles of PC7, we focused on the relationship between the CT-regulated trafficking of PC7 to its ability to shed hTfR1. Deletion

of the TMCT, resulted in a soluble protein and the loss of shedding activity of PC7 on hTfR1. Extensive CT-deletions and mutagenesis analyses led us to zoom on three residues in the CT, namely E_{719,721} and L₇₂₅ that are part of a novel motif ExExxxL₇₂₅, which is critical for PC7 activity on hTfR1. NMR studies of two 14-mer peptides mimicking this region of the CT and its Ala mutant revealed that the three exposed residues are on the same side of the molecule. This led to the identification of AP-2 as an adaptor protein that recognizes the ExExxxL₇₂₅ motif and is thus a potential new regulator of PC7 trafficking and cleavage activity. Immunocytochemistry of the subcellular localization of PC7 and its Ala-mutants of L₇₂₅ and E_{719,721} demonstrated that L₇₂₅ enhances the localization of PC7 in early endosomes, and together with E_{719,721} they increase the endosomal activity of PC7 on hTfR1.

Keywords: proprotein convertase type 7 (PC7); proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (PCSK7); transferrin receptor 1 (TfR1); cytosolic tail (CT); adaptor protein 2 (AP-2)

2.3.2 Introduction

Many secretory proteins are synthesized as precursors that are subsequently activated or inactivated by limited proteolysis at specific sites^{10; 51}. Most of these cleavages are achieved along the secretory pathway and/or at the cell surface by the proprotein convertases (PCs), serine proteases related to subtilisin/kexin (PCSKs)¹⁰. The 9-members of the mammalian PC-family are subdivided into three groups: **(i)** the first seven basic amino acid (aa)-specific PCs include the soluble PC1/3, PC2, PC4, PC5/6-A, PACE4 and the type-1 membrane-bound PC5/6-B, Furin and PC7. These proteases cleave their substrates at basic aa within the general motif (K/R)-2(X_n)-(K/R)↓, where X_n = 0, 1, 2, 3 spacers aa¹⁰; **(ii)** the type-I transmembrane protease SKI-1/S1P activates a number of membrane-bound transcription factors such as the sterol regulatory element binding proteins 1 and 2 and the activating transcription factor 6^{10; 25; 216}; **(iii)** the soluble PCSK9 is the last member of the family that is implicated in low density lipoprotein (LDL)-cholesterol regulation *via* its ability to enhance the degradation of the hepatic LDL receptor²¹⁷. All PCs are first synthesized as inactive zymogens (pro) that, except for PC2, are subsequently auto-catalytically cleaved in the endoplasmic reticulum (ER) at the C-terminus of

the inhibitory prodomain (Pro). The resulting non-covalent heterodimeric complex (Pro-Catalytic) then exits the ER and traffics either to the *cis/medial* Golgi (SKI-1) or *trans* Golgi network (TGN)/secretory granules/endosomes where most PCs are activated upon sorting to their final destination. Zymogen activation of the basic-aa specific PCs occurs by either separation of the catalytic subunit from the inhibitory prodomain (e.g., for PC4, PC7) or following a second autocatalytic cleavage within the prodomain thereby liberating this segment from the active protease (e.g., for furin)²¹⁸. PC7 is the most ancient and highly conserved secretory protease of the basic aa-specific PC-family members⁴⁴. Recent behavioral tests showed that PC7 knockout (KO) mice are healthy and have a normal lifespan but exhibit anxiolytic and novelty-seeking behaviors^{47; 219}. In contrast, PC7 knockdown is lethal in non-mammalian species such as *Xenopus*⁹⁸, and Zebrafish⁹⁵. Although mammalian PC7 may exert redundant cleavage activities with some PCs such as Furin¹⁴⁹, it uniquely sheds human transferrin receptor 1 (hTfR1) into soluble sTfR1⁵². It may also participate in the cleavage/activation of pro-epidermal growth factor (proEGF)¹¹³. Cell biology studies revealed that the cytosolic tail (CT; human aa 689-785; **Fig. 2.1 A**) of PC7 likely contains critical motifs for its sorting to endosomes, wherein it is presumably activated, and cleaves hTfR1 and proEGF^{41; 52; 113}. These could be either early or recycling endosomes, from which hTfR1 recycles back to the plasma membrane *via* a fast (early endosomes)²²⁰ or a slow (recycling endosomes) route²²¹. In that context, it was also shown that the aa motif PLC₇₂₆ in the CT of PC7 is essential for its endosomal internalization from the cell surface¹⁴⁶, but whether it also regulates the shedding of hTfR1 by PC7 was not studied. In addition, the same group later showed that a cluster of five basic aa (**HRSRKAK**₇₁₄) close to two reversibly Cys-palmitoylated residues (C_{699,704}) in the CT of PC7 are essential for the TGN localization and endocytic trafficking of PC7¹¹². Like Furin, PC7 is mostly localized to the TGN and may recycle to it from the cell surface, through endosomes^{41; 45; 146; 149}. However, the site of activation where the prodomain of PC7 separates from the catalytic domain, and hence where PC7 gets activated and subsequently cleaves its substrates is not defined but thought to occur in acidic early endosomes^{41; 52}. In that context, it was recently shown that palmitoylation of C_{699,704} in the CT of PC7 is critical for its processing of anthrax toxin by promoting their co-association in uncharacterized plasma membrane microdomains¹¹⁴. However, palmitoylation was not essential for other PC7-substrates such as hTfR1⁵², E-cadherin and insulin-growth factor receptor 1¹¹⁴. In

this work, we present evidence that the shedding of hTfR1 by human PC7 depends on the integrity of a specific motif **E**x**E**xxx**L**₇₂₅ present in its CT, and that Leu in the **P**L**C**₇₂₆ motif is the only critical aa. We also demonstrated that the PC7-mediated hTfR1 shedding is positively regulated by the cytosolic adaptor protein complex AP-2, as evidenced by overexpression and knockdown experiments of its μ -adaptin subunit.

2.3.3 Results

2.3.3.1 Critical CT-residues for the PC7-induced cleavage of hTfR1

In order to better appreciate the critical aa in the CT of PC7 that may regulate its subcellular trafficking and hence its ability to shed hTfR1, we first aligned the transmembrane (TM) and CT segments of human (aa 668-785), rat, mouse and *Xenopus laevis* PC7 (**Fig. 2.1 A**). While the TM is relatively well conserved between these species (85% aa identity to human for mouse and rat and 55% for *Xenopus*), the CT is less so with 58%, 46% and 35% aa identity between human, rat, mouse and *Xenopus laevis* PC7, respectively. To further delineate the critical aa in the CT, we generated chimeric constructs of human (hPC7) or *Xenopus* (xPC7) where their TMCT or CT were interchanged. Co-expression of C-terminally V5-tagged hTfR1-V5 with native hPC7, rat PC7 (rPC7), xPC7 or four selected chimeras was achieved in HEK293 cells (**Fig. 2.1 B**). Western blot analysis of cell lysates and media were analyzed for hTfR1 using a V5 polyclonal antibody (Ab)⁵², and in lysates for PC7 using an *in house* mammalian PC7 polyclonal antibody recognizing its catalytic subunit¹⁰⁴. The data show that PC7 derived from all constructs was able to shed hTfR1-V5 into the medium (shTfR1-V5) to a similar extent as evidenced from the ratio of media levels of shTfR1 to cellular levels normalized to β -actin (**Fig. 2.1 B**). This suggests that some common residues in the CT of these species may be critical for this processing. We also note that the zymogen processing of proPC7 into PC7 occurs, but seems somewhat less efficient in the xPC7, hPC7-xCT and hPC7-xTMCT chimeras. Since our antibody is specific for human, rat and mouse PC7, this may explain why it poorly recognizes xPC7. Finally, similar conclusions were also drawn from co-expression of the above constructs

with mouse pro-epidermal growth factor (mproEGF-V5)¹¹³ (**supporting information Fig. S2.1 A**), suggesting that the conclusions are not substrate specific.

We next generated a number of membrane-bound human PC7 constructs with successively shortened C-terminally truncated segments of its CT, as well a soluble form (shPC7) lacking the TMCT. These included the wild type (WT) sequence with a CT composed of 97 aa and truncated forms containing 88 (L774X), 67 (L753X), 29 (G717X) and ending at S₆₈₉ (Q690X; Δ CT) residues of the CT (**Fig. 2.1 C**). We then co-expressed hTfR1 with each of these constructs in HEK293 (**Fig. 2.1 D**) and hepatic HuH7 (**supporting information Fig. S2.1 B**) cells. As previously shown⁵², soluble PC7 does not shed hTfR1, reinforcing the importance of membrane association of PC7 for such activity (**Fig. 2.1 D; supporting information Fig. S2.1 B**). The lack of either 98% of the CT (Δ CT) or aa 717-785 (G717X) result in an ~80% (\pm 4.1%) reduction of the PC7-shedding of hTfR1, whereas the lack of aa 753-785 (L753X) or aa 774-785 (L774X) does not significantly affect such processing (**Fig. 2.1 D; supporting information Fig. S2.1 B**). We conclude that the most critical information regulating the activity of PC7 on hTfR1 resides in the segment comprising aa 717-752 in the CT (**Fig. 2.1 C; \blacklozenge**), with some remaining information in the membranous segment comprising aa 668-689 present in the Δ CT construct.

2.3.3.2 A new ExExxxL motif in the CT of human PC7 is important for its cleavage activity

Alignment of human aa 717-753 with the equivalent sequences in the CT of rat, mouse and *Xenopus* PC7 revealed that the stretch ESxPL₇₂₅ is absolutely conserved (**Fig. 2.2 A**). The human PLC₇₂₆ motif was previously reported to regulate endosomal entry of PC7¹⁴⁶, but the role of this sequence in regulating PC7 activity was not investigated. Accordingly, Ala replacement of PLC (PLC₇₂₆-AAA) and PL (PL₇₂₅-AA) resulted in ~60% (\pm 3.7%) and ~70% (\pm 8.5%) reduction of PC7 activity on hTfR1 (**Fig. 2.2 B**), suggesting that C₇₂₆ is not critical. Indeed, it is replaced by Phe in *Xenopus*, and the C726F and C726A mutations do not significantly influence the PC7 activity (**Fig. 2.2 C**). Interestingly, while the P724A mutant exhibits similar activity to

WT PC7, the mutant L725A lost ~60% ($\pm 3.7\%$) of the activity, similar to the PL₇₂₅-AA and PLC₇₂₆-AAA mutants (**Fig. 2.2 C**). Thus, L₇₂₅ seems to be the only aa in the PLC motif that is critical for PC7 ability to shed hTfR1.

We next focused on the possible presence of other critical aa preceding L₇₂₅ in the sequence ELESVPL₇₂₅. Since Ala mutation of L₇₂₀, S₇₂₂, V₇₂₃ or the sequence ESV₇₂₃ did not affect the PC7 activity (**supporting information Fig. S2.2 A**), this suggests that they are not critical. Furthermore, individually the E721A or E719A mutations also did not significantly affect the PC7 activity (**Fig. 2.2 C**). Interestingly E₇₁₉ is replaced by Ala in mouse and rat and Gly in *Xenopus* PC7 (**Fig. 2.2 A**), in line with a minor role of this aa residue. In contrast, the double E719A,E721A and the multiple E719A,E721A,PLC₇₂₆-AAA or E719A,E721A,L725A mutations reduced by $\geq 50\%$ (± 4.9 -11.1%) the PC7 activity, similar to the L725A mutation (**Figs. 2.2 B, C**). As controls, our data showed that E733A, E735A did not affect PC7 activity (**Fig. 2.2 B**). Similar results and conclusions were reached from experiments in HuH7 and HeLa cells (**supporting information Figs. S2.2 B, C**). Overall, this suggests that ExExxxL₇₂₅ is the critical motif in the CT of human PC7 that regulates its activity on hTfR1. Because mutations of the ExE₇₂₁ or L₇₂₅ result in similar reductions of activity, this may point to the ExExxxL₇₂₅ as a binding motif recognized by a common putative cytosolic partner.

2.3.3.3 NMR secondary structure prediction of the ExExxxL motif in the CT of human PC7

Due to the theoretically higher mobility of a truncated peptide compared to the same sequence in the native protein, it is difficult to predict the native structure of a motif in the protein from a short peptide structure. However, sequence information of local motifs orchestrates the secondary structure and folding of proteins and give some idea on the native structure of the motif in the protein^{222; 223}. Unavailability of a crystal structure of PC7 or its CT, led us to solve the structure of a chemically synthesized CT 14-mer peptide (aa 717-730) using solution NMR methods to investigate the structure of this part of the CT in human PC7. The results revealed that the side chains of the key Glu and Leu residues in the ExExxxL₇₂₅ motif

are laying on the same side of molecule, where a likely protein-protein interaction (PPI) could happen (**Fig. 2.3**). As anticipated for a short peptide, the two last aa at both ends have more mobility than the rest of the residues, which, however, finely converge in the ensemble. Furthermore, it was found that the peptide does not have a regular secondary structure element (α -helix, β -sheet or turns), confirming the role of this segment as part of an accessible loop, since non-regular secondary structures are found in half of all PPIs as deduced from a survey of protein databanks²²⁴. The data clearly show that the three key residues E_{719,721} and L₇₂₅ lie on the same side of the molecule (**Fig. 2.3 A**) and hence are well poised to interact with a partner/adaptor protein, identified below. It was shown that removal of the side chains from these triad residues (i.e., Ala mutations of E_{719,721} and L₇₂₅) resulted in a substantial reduction in the activity of PC7 on hTfR1, which is likely due to eliminated interactions of these residues with one or more cytosolic adaptor protein. In order to discover more structural elements of the motif, an Ala_{719,721,725} mutated 14-mer peptide was synthesized and the structure was solved by solution NMR. The data revealed that the mutations affected the backbone structure of the peptide (**Fig. 2.3 B**). Although the mutated peptide still has a coiled-coil structure, alignments of the two structures showed that the mutated peptide has more curvature compared to the native PC7-derived peptide (**Fig. 2.3 C**). Altered curvature causes a reorientation and repositioning of A₇₂₅ compared to L₇₂₅, demonstrating a significantly altered peptide structure.

2.3.3.4 Subcellular localization of human PC7 and its CT mutants

The intracellular localization of human PC7 and its CT mutants were best analyzed by fluorescence immunocytochemistry in HeLa cells, compared to HEK293 or HuH7 cells, since HeLa cells have a more visible subcellular distribution of organelles, including its Golgi architecture²²⁵. Furthermore, we reached similar conclusions regarding the effect of the PC7 mutants on hTfR1 cleavage activity in HeLa cells (**supporting information Fig. S2.2 B**). Immunocytochemistry of C-terminally V5-tagged human PC7, its tagged- Δ CT variant or mutants of the critical aa in the ExExxxL motif were analyzed in permeabilized HeLa cells (**Figs. 2.4, 2.5**). Because none of the PC7 antibodies we tested gave a specific strong signal on

immunocytochemistry, we used an Ab to the V5 tag. Accordingly, we visualized the localization of PC7 in these cells and defined its co-localization with a TGN marker Golgin-97 (**Fig. 2.4**) or an early endosomal marker EEA1 (**Fig. 2.5**).

The data show that compared to WT PC7, the loss of the CT (Δ CT) or the mutation L725A that decreased by $\sim 80\%$ the PC7 activity on hTfR1 (**Figs. 2.2 B, C**), also significantly reduced the PC7 localization in the TGN by $\sim 70\text{-}75\%$ ($\pm 5.6\text{-}14.1\%$) (**Fig. 2.4**). In addition, the EEA1 co-localization of PC7- Δ CT and PC7-L725A is reduced by $\sim 80\%$ ($\pm 6\%$) and $\sim 50\%$ ($\pm 14.6\%$), respectively (**Fig. 2.5**). To unravel the preferred localization of PC7-L725A, we analyzed its cell surface localization by immunocytochemistry under non-permeabilizing conditions (**Fig. 2.6**). The data clearly show that the L725A mutant is ~ 2 -fold (± 0.5) enriched at the cell surface and spread all along the plasma membrane, as compared to WT PC7 that seems to localize to discrete areas of the cell surface (**Fig. 2.6**). These results agree with those of a previous report using permeabilizing conditions on a CT-L725A-chimera that is also enriched at the cell surface¹⁴⁶.

Interestingly, the P724A mutant is $\sim 50\%$ ($\pm 6.7\%$) less enriched in the TGN (**supporting information Fig. S2.3 A**) but is ~ 1.6 -fold (± 0.25) more enriched at the cell surface (**Fig. 2.6**). The soluble PC7 is not endocytosed, and both PC7-WT and its P724A mutant similarly co-localize with EEA1 (**supporting information Fig. S2.3 B**). These data agree with our observation of the similar hTfR1 shedding activity of PC7-WT or its P724A mutant (**Fig. 2.2 C**). This suggests that PC7 is active if transported into early endosomes, and that it is comparably much less active in the TGN or the cell surface, as previously suggested⁵². Furthermore, our results using the full length PC7 agree with those of an earlier report where the mutant P724A in a Tac-CT-chimera is also enriched at the cell surface¹⁴⁶.

Notably, L725A (**Fig. 2.4**), PLC₇₂₆-AAA, PL₇₂₅-AA and P724A (**supporting information Fig. S2.3 A**) are $\sim 75\%$ ($\pm 5.6\%$), $\sim 50\%$ ($\pm 9.7\%$), $\sim 90\%$ ($\pm 4.8\%$) and $\sim 65\%$ ($\pm 6.7\%$) less co-localized with Golgin-97, respectively. This suggests that the PL₇₂₅ plays a major role for the localization of PC7 in the TGN. In addition, similar to L725A (**Fig. 2.5**), but different from P724A (**supporting information Fig. S2.3 B**), both PLC₇₂₆-AAA and PL₇₂₅-AA are $\sim 50\%$ ($\pm 3\text{-}9.8\%$) less co-localized with EEA1 (**supporting information Fig. S2.3 B**). These

data and those of **Fig. 2.5** demonstrate that L₇₂₅ is the critical residue in the PLC motif for the localization of PC7 in early endosomes, and hence for its activity on hTfR1 (**Fig. 2.2**).

Notably, the absence of E_{719,721} predominates over that of L₇₂₅ in keeping PC7 in the TGN, since E719A,E721A and E719A,E721A,L725A are similarly localized to the TGN as WT (**Fig. 2.4**). However, the reverse is true at the cell surface, where L₇₂₅ predominates over E_{719,721} (**Fig. 2.6**). In contrast, both L₇₂₅ and E_{719,721} are critical for the EEA1 localization of PC7, since their Ala mutants are ~40% (\pm 7.2-14.6%) less co-localized with EEA1 than WT PC7 (**Fig. 2.5**), befitting their ~50% lower activity on hTfR1 (**Fig. 2.2 C**). These results suggest that E_{719,721} and L₇₂₅ are critical for the efficient localization of PC7 in early endosomes, and hence for PC7 activity on hTfR1 (**Fig. 2.2**). In sum, we conclude that the motif ExExxxL₇₂₅ modulates the efficient entry of PC7 into early endosomes and its cleavage activity on hTfR1.

Finally, compared to WT PC7, the PC7- Δ CT exhibits a much lower localization in early endosomes than the L725A and E719A,E721A,L725A mutants (**Fig. 2.5**), and yet the hTfR1 shedding activities of the above mutants are ~2-fold (\pm 0.4) higher than that of PC7- Δ CT (**Fig. 2.2**). This suggests that the CT of PC7 contains motifs other than the ExExxxL₇₂₅ that modulate its efficient entry into early endosomes from the cell surface, its activity and retrograde endocytic trafficking to the TGN *via* endosomes. Indeed, a basic aa cluster HRSRKALK₇₁₄ and two palmitoylated C_{699,704} seem to be critical for this trafficking¹¹².

2.3.3.4 AP-2 is necessary for PC7 endosomal sorting and shedding activity on hTfR1

Selective transport of transmembrane proteins to different intracellular organelles often involves the recognition of sorting signals in their CT by one or more members of a family of heterotetrameric adaptor protein (AP) complexes named AP-1 through AP-5, each composed of four subunits²²⁶. These cytosolic adaptor complexes mediate sorting of cargos from the TGN, cell surface, endosomes and lysosomes. AP-1 is a clathrin-associated complex that, in most cell types, mediates sorting between the TGN and endosomes, whereas AP-2 is involved in clathrin-

dependent cell surface endocytosis in which cargo proteins are incorporated into vesicles destined for fusion with the early endosome²²⁷.

Both AP-1 and AP-2 complexes usually recognize the motifs Yxx-(bulky hydrophobic aa) or [D/E]xxxL[L/I]²²⁷. Since two aa in the deduced critical motif ExExxxL₇₂₅ in the CT of PC7 are absolutely conserved between species (**Fig. 2.1 A**) and resemble partially the [D/E]xxxL[L/I] motif recognized by AP-1 as well as AP-2, we investigated their possible involvement in the sorting and/or sheddase activity of PC7. The hPC7 ExExxxxL₇₂₅ sorting motif appears to belong to the family of sorting motifs recognized by the three σ 1-adaptins of the various AP-1 complexes and by the σ 2-adaptin subunit of the AP-2 complex²²⁸⁻²³⁰. In order to investigate the contribution of AP-1 and AP-2 to hPC7 sorting, and thus hTfR1 shedding, we decided to alter the expression levels of AP-1 and AP-2 *via* overexpression and knock-down of their μ 1 and μ 2 adaptin subunits, because the absence of μ -adaptin renders the remaining trimeric adaptin complex non-functional^{187; 231}. Accordingly, we either overexpressed or silenced the μ subunit of either AP-1 or AP-2 in HeLa and HEK293 cells (**Figs. 2.7, 2.8**).

In view of the critical importance of the localization of PC7 in early endosomes for its activity on hTfR1, we first concentrated on the co-localization of PC7 and its mutants with EEA1 following overexpression of the μ subunit of either AP-1 or AP-2 in HeLa cells (**Fig. 2.7**). The data show that overexpression of the AP-2 μ subunit, but not that of AP-1 μ , results in a significant \sim 1.3-fold (\pm 0.1) higher localization of WT PC7 with EEA1 in HeLa cells (**Figs. 2.7 A, B**), as well as a \sim 1.6-fold (\pm 0.2) higher activity of PC7 on hTfR1 in HEK293 cells (**Fig. 2.8 A**). In agreement, only siRNA treatment (88% efficacy) against AP-2 μ resulted in a significant \sim 30% (\pm 10%) reduction of PC7 activity, whereas siRNA against AP-1 μ (96% efficacy) had no significant effect (**Fig. 2.8B**). We conclude that AP-2 is implicated in the localization of WT PC7 in early endosomes and hence in the upregulation of its activity. This result was supported by the co-immunoprecipitation of PC7 and AP-2 μ in HEK293 cells overexpressing of AP-2 μ -Flag and hPC7-V5, but not when the ExExxxxL₇₂₅ motif is mutated to AxAxxxA₇₂₅ (**Fig. 2.8C**). These results demonstrate a direct binding of AP-2 to the exposed ExExxxxL₇₂₅ motif in the CT. Note that only mature hPC7 co-immunoprecipitates with AP-2, supporting the fact that proPC7 is retained in the ER⁴¹.

We next investigated the effect of overexpression of AP-2 μ on the co-localization of the PC7 mutants in the motif ExExxxL₇₂₅ with EEA1. In all cases we found that overexpression of AP-2 μ does not significantly affect the degree of co-localization of the PC7 mutants E719A,E721A (**Fig. 2.7 C**), L725A (**Fig. 2.7 D**) or E719A,E721A,L725A (**Fig. 2.7 E**) with EEA1. These results support the notion that AP-2 interacts with the critical ExExxxL₇₂₅ motif in the CT of PC7 and regulates its entry into early endosomes and hence its activity on hTfR1. Since the ExExxxL₇₂₅ motif does not play a major role in the TGN localization of PC7 (**Fig. 2.4**), it was of interest to test the possible roles of AP-1 and AP-2 in this process. Our results showed that overexpression of AP-2 μ , but not AP-1 μ , results in ~25% (\pm 8.3%) reduction in the TGN localization of WT PC7 or its E719A,E721A,L725A mutant (**supporting information Fig. S2.4 C**). That altered PC7 TGN localisation induced by AP-2 μ overexpression is independent of the identified ExExxxL₇₂₅ sorting motif, suggests that an AP-2 effect on PC7 TGN localisation is not mediated by this interaction. Increased AP-2 levels may lead to altered trafficking of a yet unknown PC7 partner protein, which could influence PC7 trafficking kinetics.

2.3.4 Discussion

While PC7 is the most conserved member of the secretory basic-aa specific PC family⁴⁴, very little is known about its physiological functions⁴⁷, subcellular trafficking, activation and processing of specific substrates^{10; 41; 49; 112; 113; 146}. The viability of *PCSK7* KO mice and the absence of overt pathological phenotype(s) suggests that this widely expressed convertase is either redundant with other members of the family, such as Furin, or that its absence may actually be beneficial in adult mice^{47; 219}. Indeed, epidemiological data suggested that *PCSK7* rare gain-of-function SNPs or overexpression may be associated with a higher triglyceride phenotype⁸², and biochemical data further provided a possible link between PC7 and cardiovascular diseases^{232; 233}. In addition, gene duplication or deletion of *PCSK7* are associated with a rare congenital heart anomaly known as total anomalous pulmonary venous connection, where pulmonary veins of the left atrium abnormally connect to the right atrium or systemic venous system²³⁴. These epidemiological data suggested that PC7 may play a critical role in the activation of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR-2)²³⁴.

In order to better understand the biology of the secretory membrane-bound PC7, herein we undertook an extensive analysis of the role of its CT in the regulation of its intracellular trafficking and ability to enhance the shedding of hTfR1, the only validated human specific substrate of PC7⁵².

Our extensive mutagenesis and deletion analyses of the CT led to the conclusion of the existence of a specific ExExxxL₇₂₅ motif that modulates the steady-state concentration of PC7 in early endosomes and its cleavage activity on hTfR1 (**Figs. 2.1-2.5**). This was further supported by NMR studies that demonstrated that in this exposed motif the E_{719,721} and L₇₂₅ reside on the same side of the molecule (**Fig. 2.3**), suggesting that they may interact with a specific cytosolic protein. The similarity of the conserved ExxxL part of the critical motif to the di-leucine based recognition sequences for AP-2 led us to demonstrate that AP-2 indeed enhances the subcellular trafficking of PC7 into early endosomes, where it may get activated and thus becomes apt to shed hTfR1 (**Figs. 2.7, 2.8**).

It was suggested that in addition to Furin, mouse PC7-mediates the processing of proNotch-1 in the TGN, based on the fact that the mouse equivalent PLC₇₂₅-AAA mutation in the CT did not affect such processing in mouse melanoma B16F1 cells¹⁴⁹. In contrast, we demonstrated that the TGN localization of human PC7 PLC₇₂₆-AAA is ~50% lower than WT PC7 (**supporting information Fig. S2.3 A**). Thus, it would be informative if the results of proNotch-1 processing by human and mouse PC7 would be compared.

The present results do not exclude the possibility that, aside from hTfR1 or proEGF cleavage, activated PC7 recycles back to the TGN from early endosomes and performs other cleavages therein^{112; 149}. Indeed, it was shown that the human CT segment proximal to the TM (aa 689-714; **Fig. 2.1 A**) contains a non-conserved basic sequence **HRSRKAK**₇₁₄, close to two reversibly Cys-palmitoylated conserved residues (C_{699,704}), that are essential for the TGN localization and endocytic trafficking of human PC7¹¹².

Until recently, the importance of the Cys-palmitoylation in the regulation of the cleavage of physiological substrates of PC7 remained obscure. Indeed, it is dispensable in the processing of many of its substrates, such as hTfR1⁵², mproEGF¹¹³, and the redundant cleavage of E-cadherin and IGF-1 by PC7 and furin^{114; 131}. Interestingly, it was recently shown that the Cys-

palmitoylation of PC7 and of the anthrax toxin protective antigen (PA) is performed by the same protein acyl transferase ZDHHC5¹¹⁴. These Cys-palmitoylations promote the association of both PC7 and PA with plasma membrane microdomains favoring subsequent cleavage of PA by PC7¹¹⁴. It is thus plausible that the Cys-palmitoylation of PC7 mediates the concentration of PC7 and some of its Cys-palmitoylated substrates in membrane microdomains.

While autocatalytic cleavage of proPC7 to PC7 occurs in the ER⁴¹, the non-covalent inactive complex of the prodomain-PC7 exits the ER¹⁰⁴, crosses the TGN and reaches the cell surface, either directly or *via* endosomes. Gradual acidification along the late secretory pathway may lead to the separation of active PC7 from its inhibitory prodomain⁵².

The exact PC7 zymogen activation mechanism and the fate of the prodomain are still unresolved. In cells overexpressing vaccinia virus recombinants of the prodomain of PC7, this segment was secreted intact in the medium, but not that of furin¹⁰⁴. However, under our transfection conditions we could not detect the prodomain derived from full-length PC7 in the medium. We presume that it separates from the main catalytic subunit before or after entry of the prodomain-PC7 complex into early endosomes from the cell surface, whereupon PC7 gets activated and sheds hTfR1. Future studies should address this critical question in detail, as it may lead to the identification of a specific mechanism and/or partners implicated in the activation of PC7.

Finally, it should be mentioned that besides the conventional ER to TGN route, PC7 is the only convertase known to reach the cell surface by an alternative faster unconventional pathway directly from the ER to the cell surface⁴¹. The TM of PC7 (but not that of furin) seems to be critical for the ability of PC7 to traffic through this unconventional route⁴¹. We still do not know if zymogen activation of PC7 traversing this unconventional pathway takes place, or whether this is a source of readily available inactive PC7 for other functions that are independent of its catalytic activity, as proposed for the R504H mutant of PC7 in the regulation of triglycerides^{49; 232}. In conclusion, the data presented in this work better defined the critical elements in the CT of PC7 that regulate its ability to traffic to early endosomes where it is able to shed hTfR1 and also cleaves mEGF. It emerged that the sheddase activity of PC7 critically depends on this sorting motif recognized by AP-2, but that additional proteins are taking part in the regulation of PC7 trafficking kinetics (**Fig. 2.9**).

2.3.5 Experimental procedures

2.3.5.1 Plasmids

All cDNA mutants hPC7, rPC7 and xPC7 were cloned, as reported, on pIRES-2-EGFP vector (Clontech)⁵². Some of them were subcloned at the C-terminal with a V5, Flag or HA tag. Human hTfR1-V5, mouse AP-1, mouse AP-2 and mouse proEGF-V5 were cloned as reported^{52; 113}. Table S1 (**supporting information Table S2.1**) recapitulates all oligonucleotides used in mutant constructions.

2.3.5.2 Cell culture and transfections

HuH7, HEK293 and HeLa cells lines were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen). Cells were incubated in a 6 wells plates (500,000 cells/well) at 37°C under 5% CO₂. HeLa and HuH7 cells were transfected in equimolar quantity of plasmid with a final quantity of 2 µg of cDNA with polyplus reagent (Jetprime). HEK293 cells were transfected in equimolar quantity of plasmid with a final quantity of 1 µg of cDNA using polyplus reagent. Twenty hours after transfection, cells were washed in a serum-free medium and incubated for another 20h, whereupon the cells were collected and lysed with RIPA 1X in order to prepare protein for Western blot analysis.

2.3.5.2 SiRNA and quantitative RT-PCR

Human AP-1 μ , AP-2 μ and scrambled siRNA (Dharmacon; siGENOME SMARTpool) were transfected with a final 50 nM concentration, using DhamaFECT1 transfection reagent (Dharmacon), as recommended by the manufacturer's protocol.

To verify the siRNA efficacy, quantitative RT-PCR were performed on HEK293 cells to measure AP-1 μ and AP-2 μ mRNA levels. Before quantification, total RNA extraction was performed using 1 mL Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. To verify the RNA extraction quality, Superscript II reverse-transcriptase amplification was done, as recommended by Invitrogen. The quality of newly extracted RNA was visualized on a 1% agarose gel. Real-time PCR was carried out using Viia7 System (Applied Biosystems). Reactions were run in duplicate in two independent experiments. Human TATA-box binding protein (TBP) gene was used as an internal control to normalize the variability in expression levels. The sets of primers were as follows: hAP1M1 forward: GAGATCGTGTGGTCCATCAAGTC and reverse: AAGTGGGCCCGCATCA; hAP2M1 forward: CAAGGCCAGCGAGAATGC and reverse: GCGCTGATCTGCGATTCC. TBP gene was used to normalize gene expression and quantify the variability of expression level of AP proteins in the presence of siRNA. Expressions were analyzed using the Δ CT method²³⁵.

2.3.5.3 Western Blot analysis

Cell lysates and media were separated on 8% SDS-PAGE gel. After migration, gels were transferred onto a nitrocellulose membrane (GE healthcare) overnight and blocked 1h at room temperature (RT) with 1:1 blocking buffer (Mandel): PBS 1X. Membranes were incubated overnight at 4°C in 1:1 blocking buffer (Mandel): PBS 1X solution with first antibody (Ab): anti-PC7 polyclonal Ab that recognizes the N-terminal prosegment and the active form (1:10,000), anti-V5 Ab (Invitrogen) (1:3,000), β -actin (Sigma) (1:3,000). Proteins were revealed with a secondary fluorescent anti-mouse Ab 680 (Mandel) (1:10,000) or anti-rabbit Ab 800 (Mandel). Revelation of tagged proteins occurred on an Odyssey Li-Cor imaging machine

and quantification were performed with Image studio lite version 5.2 software. To verify the expression of AP-1 μ -Flag and AP-2 μ -Flag anti-Flag M2 HRP (1:3000) (Sigma-Aldrich) was used.

2.5.3.4 Co-Immunoprecipitation

HEK293 cells were plated in 100 mm² plates and transfected the next day in equimolar quantity of plasmid with a final quantity of 4 μ g of cDNA using Polyplus Reagent®. Forty-eight hours post transfections, cells were lysed in 0.5% CHAPS buffer (5M NaCl, 1M Tris pH 7.5, 0.5% CHAPS) and protein concentration was calculated using Bradford Assay (Bio-Rad). 1 mg protein was incubated with anti-Flag M2 antibody (Sigma-Aldrich) for 2h prior to incubation with protein A/G PLUS-agarose (Santa-Cruz Technologies) for 1h. The samples were washed 3 times with 0.5% CHAPS buffer. The immunoprecipitates were resolved on an 8% SDS-PAGE gel and revealed by a V5-HRP antibody (1:10000; Invitrogen).

2.5.3.5 Peptide Synthesis

Two 14-mer peptides were synthesized: WT PC7 GTELESVPLCSSKD, and its triple mutant GTALASVPACSSKD. The peptides were synthesized either on 2-chlorotriylchloride or TentaGel S RAM resin on an automated peptide synthesizer. The peptide chains elongation were carried out by standard Fmoc solid phase peptide synthesis. Fmoc protected aa were coupled using 5 equivalents of protected aa, 5 equivalents of HATU, and 15 equivalents of DIPEA in DMF. Fmoc group was removed with 20% piperidine in DMF. For synthesis on 2-chlorotriylchloride resin, the first aa was loaded on the resin using 1.2 equivalents of aa, 4 equivalents of DIPEA in DMF for 3h. The unreacted groups were capped with a mixture of DCM/MeOH/DIPEA 85:10:5 and N-terminal acetylation was achieved by a solution of DCM//DIPEA/Ac₂O 85:10:5 for 1h. The global deprotection was achieved using the cocktail TFA/thioanisole/H₂O/phenol/EDT 82.5:5:5:5:2.5 for 2h. After evaporation of 50% of cleaving cocktail, the crude peptide was triturated with diethyl ether (Et₂O), centrifuged, and the

supernatant was discarded. The resulting solid was purified on a Waters preparative HPLC system (autosampler 2707, quaternary gradient module 2535, UV detector 2489 ($\lambda = 214$ and 230 nm), fraction collector WFCIII) equipped with an ACE5 C18 column (250 mm \times 21.2 mm, 5 μ m spherical particle size). The purity of the fractions was determined (more than 95%) by an Agilent Technologies 1100 analytical HPLC system equipped with a diode array detector ($\lambda = 210, 214, 230,$ and 254 nm) and C18 columns of Phenomenex Jupiter (5 mm, 4.6 μ m, 250 mm). ESI-HRMS (TripleTOF 5600, ABSciex; Foster City, CA, USA) was used to confirm the identity of the pure peptides.

2.5.3.6 NMR studies

Samples prepared by solubilizing the peptides in a 10% D₂O/H₂O mixture (2 to 3 mM). For the Cys containing peptide, fully deuterated 1,4-dithiothreitol (DTT) was added at the maximum concentration of 10 mM. The NMR experiments were performed on a Agilent Varian (600 MHz for ¹H) spectrometer at ambient temperature. ¹³C chemical shift assigned by a ¹H-¹³C HSQC and ¹H chemical shifts using a ¹H-¹H TOCSY experiment (mixing time of 50 ms). The interproton distances was assigned based on the ¹H-¹H NOESY (mixing time of 50 ms) and ¹H-¹H ROESY (mixing time 250 ms) experiments.

The program DANGLE was used to predict the Φ and Ψ dihedral angles on the basis of backbone and ¹³C β chemical shift values for both peptides²³⁶. For the native truncated peptide, all NOEs were assigned manually, divided into weak, medium and strong, and converted into distance restraints using CcpNmr Analysis Version 2.4²³⁷. Structure were calculated using the ARIA 2.2 and CNS programs on the CCPN grid server^{238; 239}. After removing the violated NOE, the structures were recalculated on the CCPN grid server (<https://www.ccpn.ac.uk/v2-software/software/web-apps-general>). This server also refined the structures in water. The refined structures were further validated with the program Procheck²⁴⁰ (**Fig. 2.3**).

For the Ala-mutated peptide 3D structure calculations were achieved with AMBER 14.0 package (<http://ambermd.org>). The starting structure of the peptide has been generated with LEaP program embedded in AMBER 14.0. For solvated system, a truncated octahedral box of

water around the peptide structure has been added (2245 TIP3P water residues). The side chains of one lysine and one aspartic acid were defined as positively and negatively charged, respectively, leading to a total peptide charge of 0. The entire system was subjected to dynamics under the constant pressure for 10 ns with time-averaged distance restraints and dihedral restraints derived from NMR spectroscopy. A total of 97 interproton distance restraints (64 intraresidual, 26 sequential, and 7 medium range) and 17 dihedral angles restraints were applied for structure solution. The calibration peaks volume to distance constraints were performed with CALIBA program included in CYANA 2.1 software²⁴¹. The interproton distances and dihedral angles were introduced in the molecular dynamics simulations with the force constants $f = 50 \text{ kcal}/(\text{mol} \times \text{\AA}^2)$ and $10 \text{ kcal}/(\text{mol} \times \text{rad}^2)$, respectively. The geometry of the peptide groups was kept fixed according to NMR data (all *trans*) with the force constant $f = 50 \text{ kcal}/(\text{mol} \times \text{rad}^2)$. MD simulations were performed with a time step 2 fs and 10 Å cutoff radius. Isotropic position scaling was used to maintain the pressure. The system was heated from 10 to 303 K during the first 20 ps of MD and afterwards the temperature was maintained at 303 K. The coordinates were recorded at each 4 picoseconds (2000th step) and 20 conformations obtained in the last steps of MD simulations were chosen for final structure analysis and validated with program Procheck.

2.5.3.7 Immunofluorescence

HeLa cells were transfected with V5-tagged wild type hPC7 or its Ala-mutants. Cells were transfected with 0.5 µg final of cDNA and 1.8 µl of Fugene reagent (Promega). Twenty hours post-transfection, cells were washed in a serum-free medium. Twenty hours post-washed, all treatments, until the first antibody incubation, occur on ice. First, cells were washed 3 times with cold PBS 1X and fixed with fresh formaldehyde 4% during 10 min. After two more washes, the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 7 min. After 3 more washes using cold PBS, blocking was done with PBS containing 1% bovine serum albumin for 30 min. Cells were incubated with primary antibody overnight at 4°C: Anti-V5 ab (1:500, InVitrogen) or anti-V5 ab (1:500, Abcam), anti-Golgin-97 Ab (1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-EEA1 Ab

(1:200, Abcam), anti-HA Ab (1:2000, Cell Signaling Technology). Antigen antibody complexes were revealed by 1h incubation with the corresponding species-specific Alexa fluor (488, 555, or 647)-tagged antibodies (Molecular Probes). The nuclei was stained with Prolong DABCO with DAPI (ThermoFischer). Immunofluorescence analyses were performed on a confocal microscope (Zeiss LSM-710).

2.5.3.8 Statistical immunofluorescence analysis

Co-localization of fluorescently labeled protein was quantified with IMARIS analysis software (8.2.1) along with aXTension script named Colocalize Spots. Fluorescent background was first normalized using empty vector. Positive signals were found using the Imaris function spots from each fluorescent marker images. The spot diameter used was 1.2 μm with the same quality factor for each image. The Colocalize Spots script considers co-localization between two spots when their center to center distance is equal or inferior to 0.8 μm . WT hPC7-V5 co-localization with each marker was used for normalization. Quantification is based on the analysis of 15 cells from a minimum two independent experiments in each condition. Student's *t*-test was used for estimation of the statistical significance.

2.5.3.9 Statistical analysis

Data are reported as mean \pm SEM. Statistical significance was determined using the Student's *t*-test.

2.3.6 Acknowledgements

We would like to thank Sandrine Lacoste for cell biology, Annik Prat for the generation of the Fig. 9 model of PC7 trafficking and functions, Dominic Fillion for microscopy, and Brigitte Mary for editorial assistance.

2.3.7 Figures

Figure 2.1

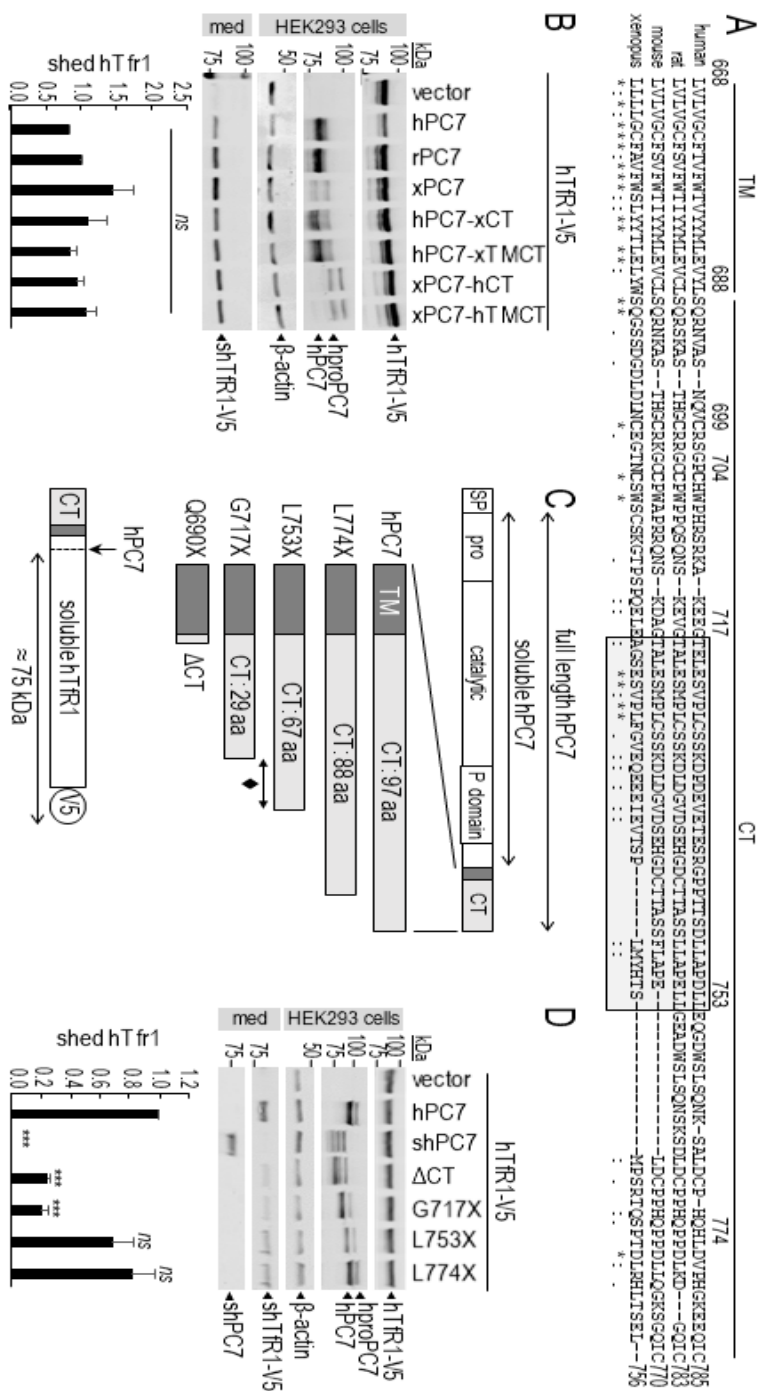


Figure 2.2

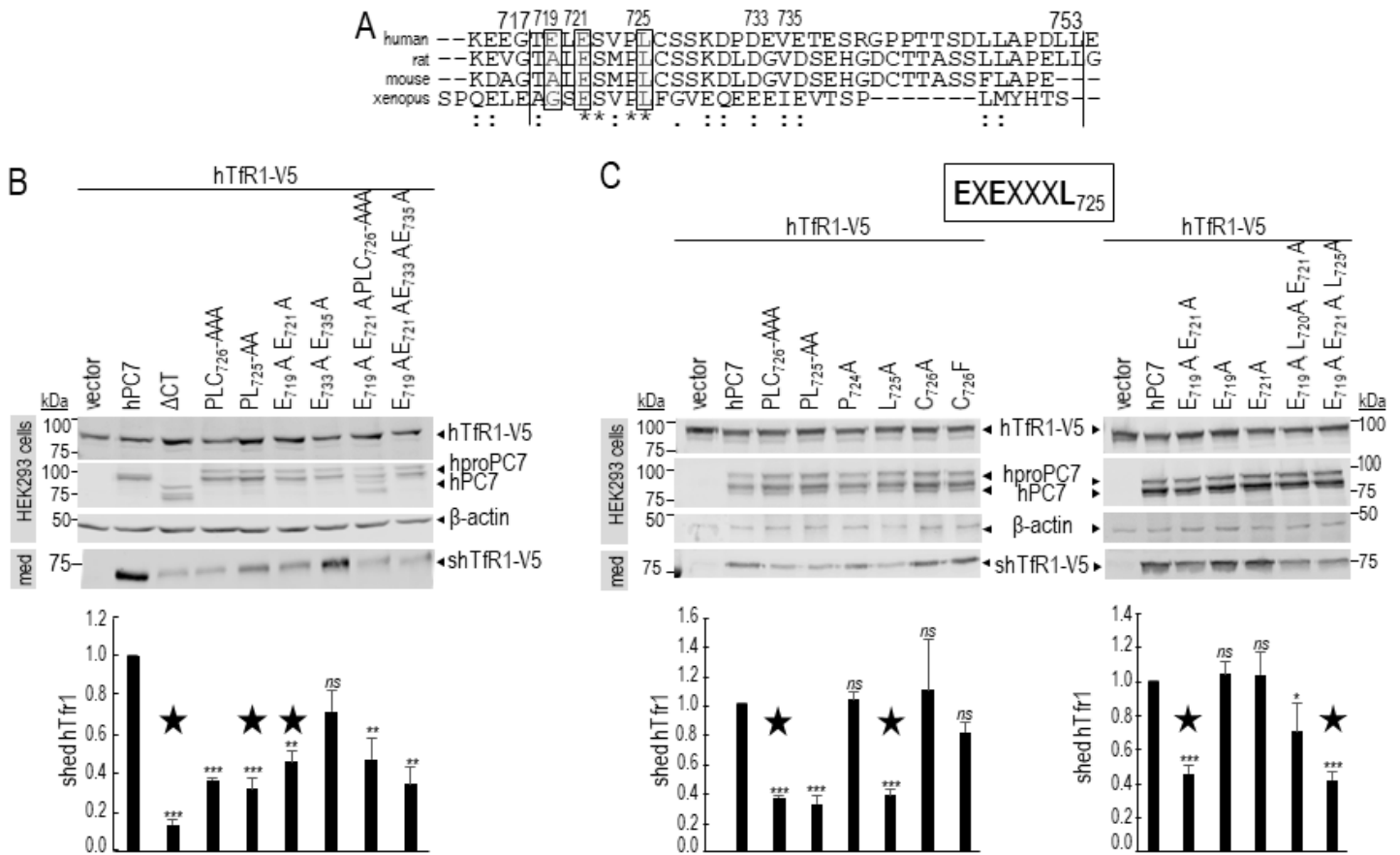


Figure 2.3

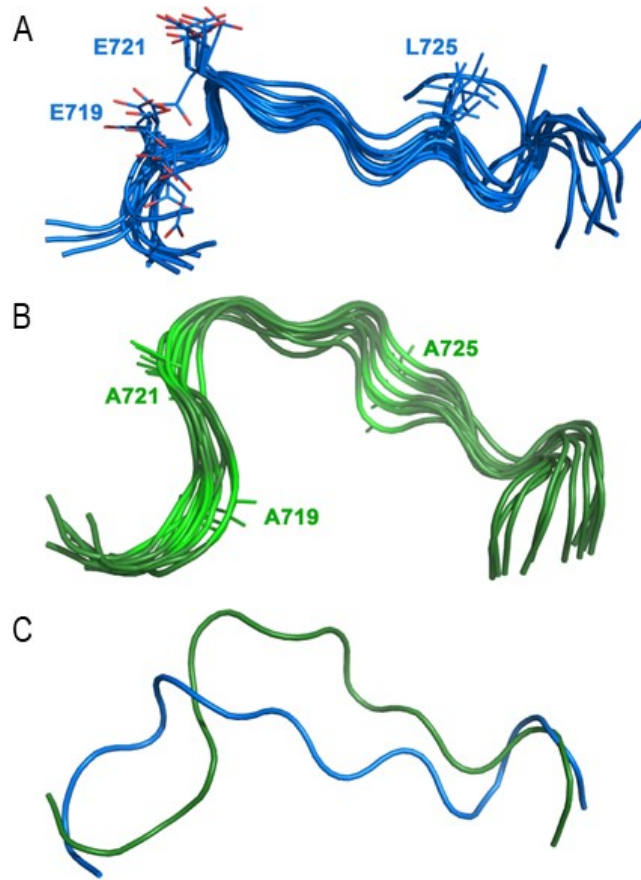


Figure 2.4

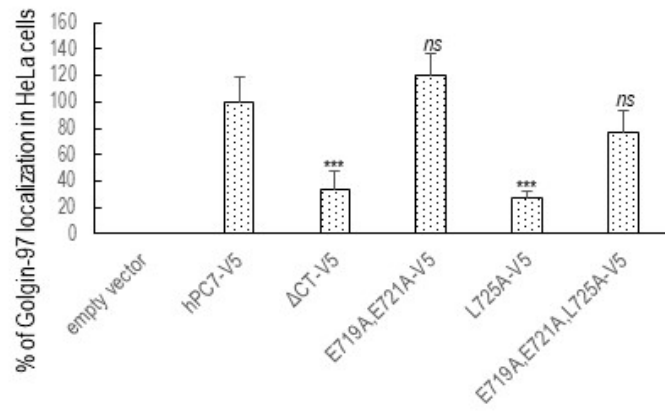
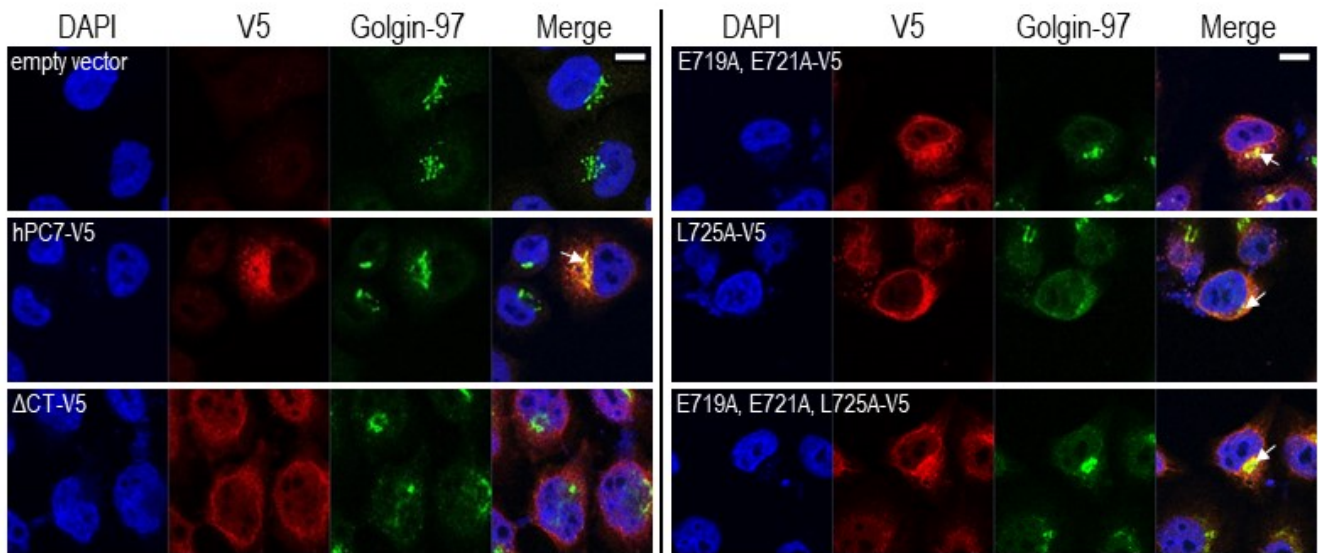


Figure 2.5

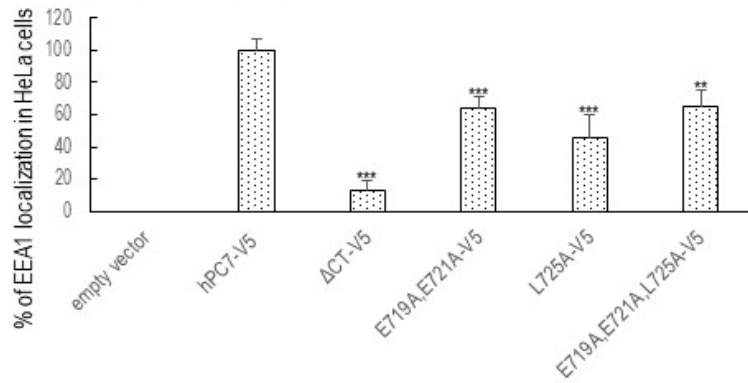
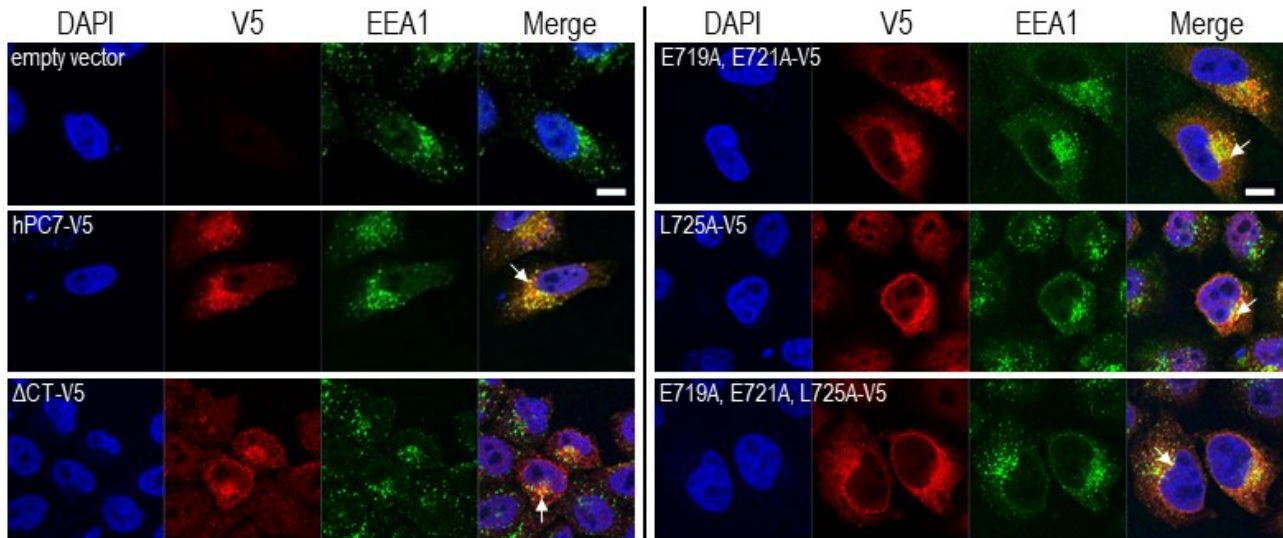


Figure 2.6

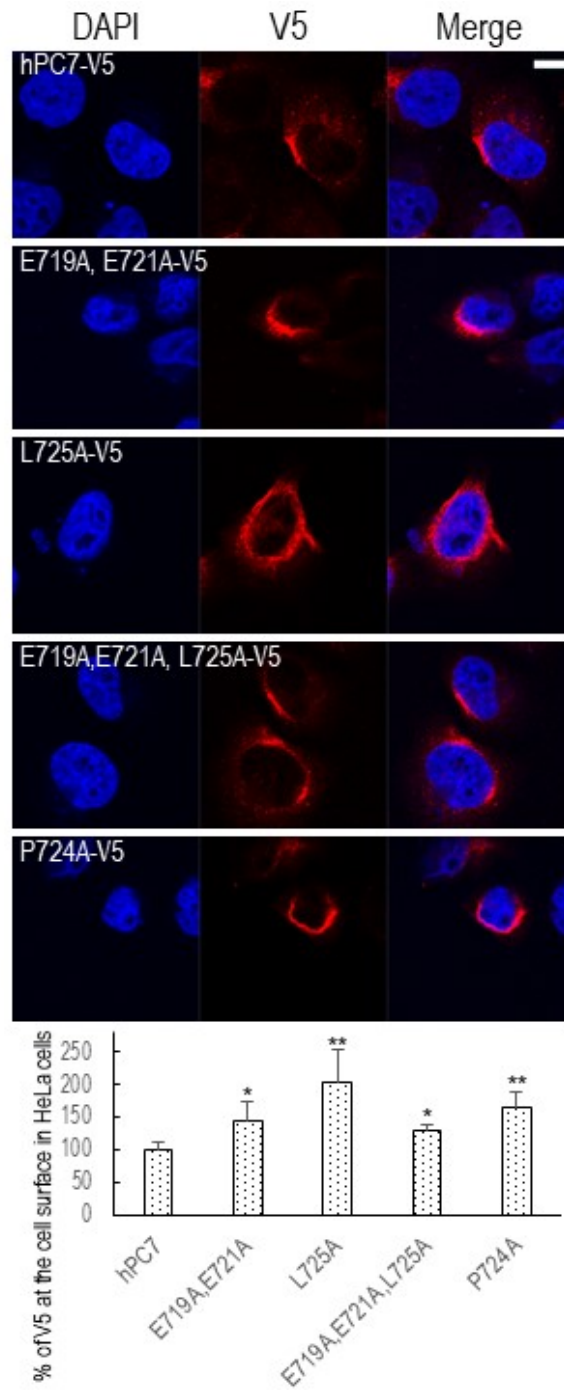


Figure 2.7

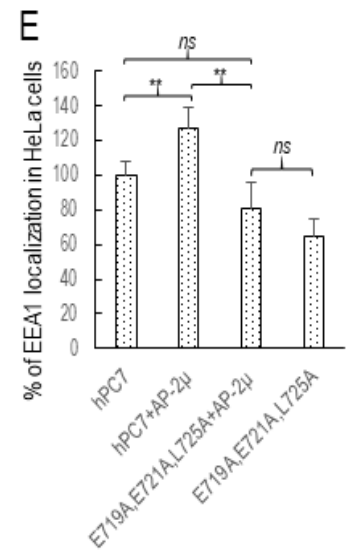
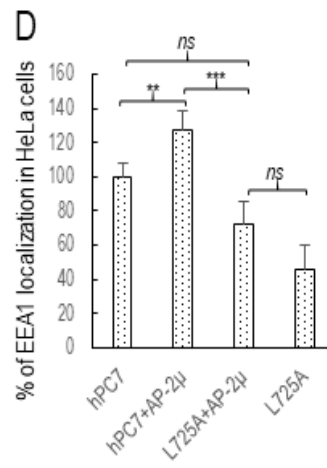
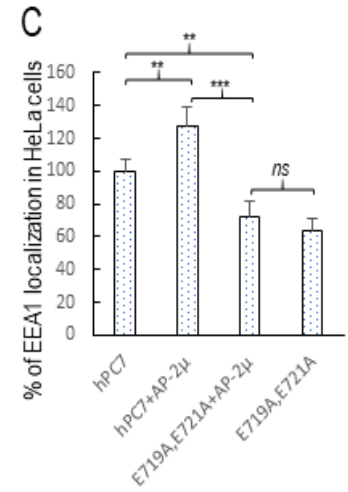
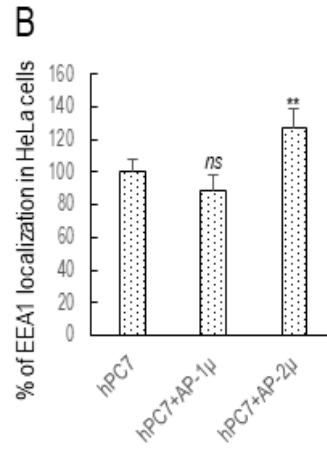
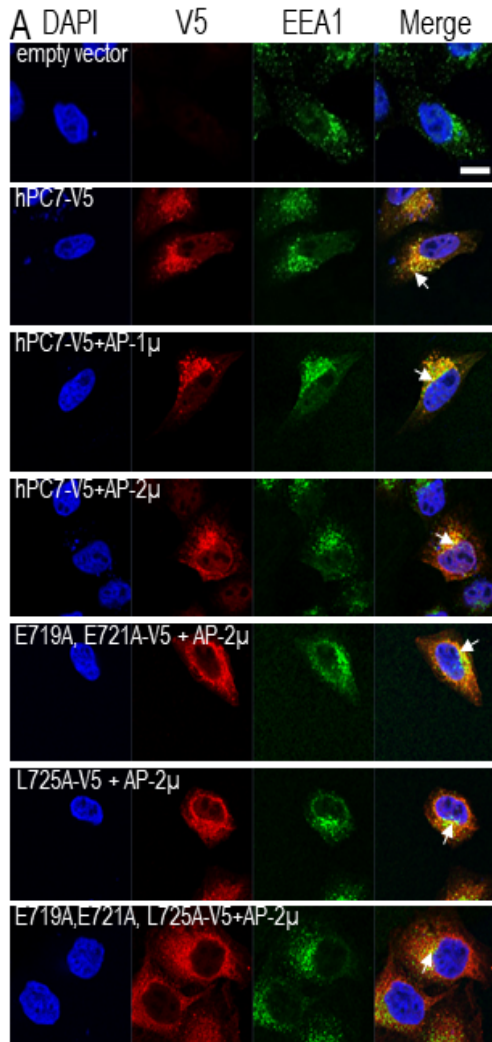


Figure 2.8

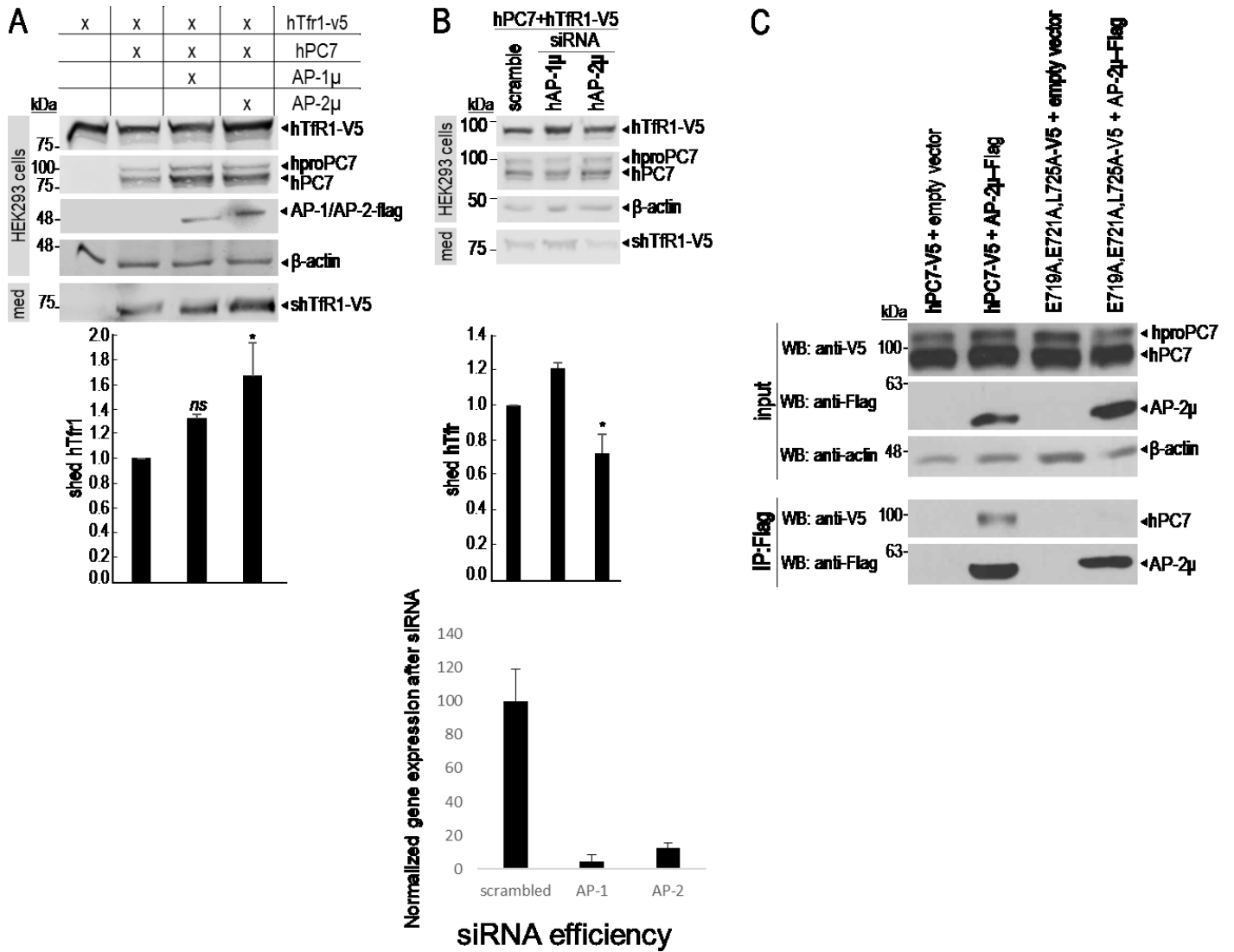
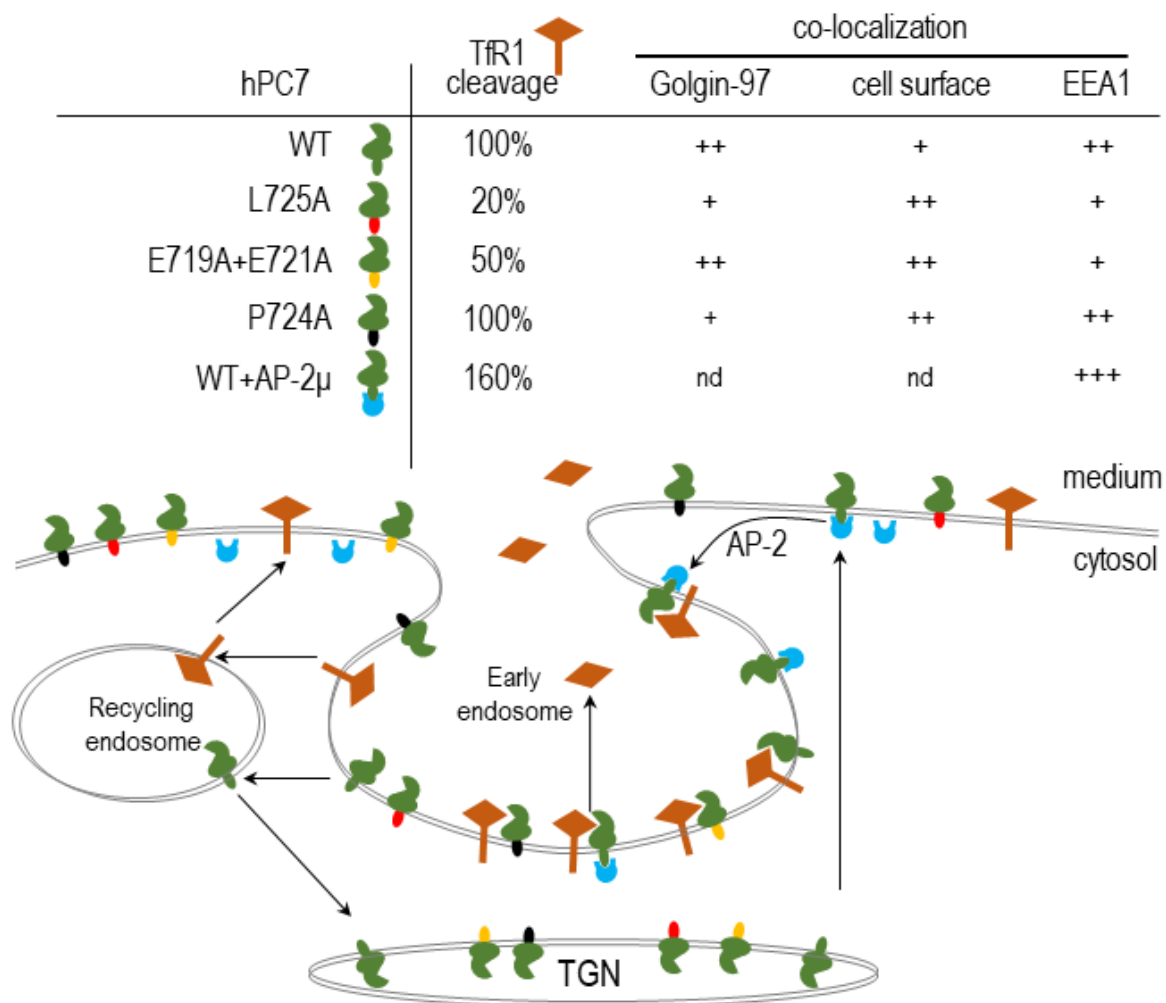
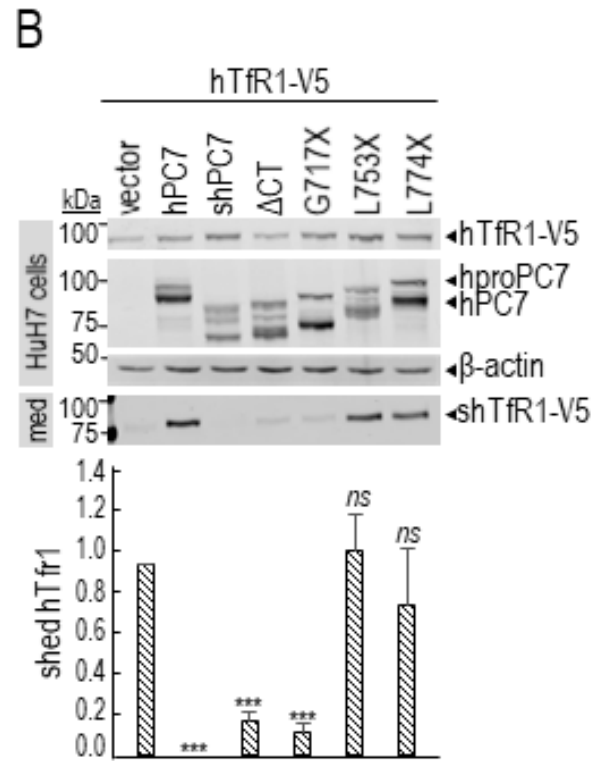
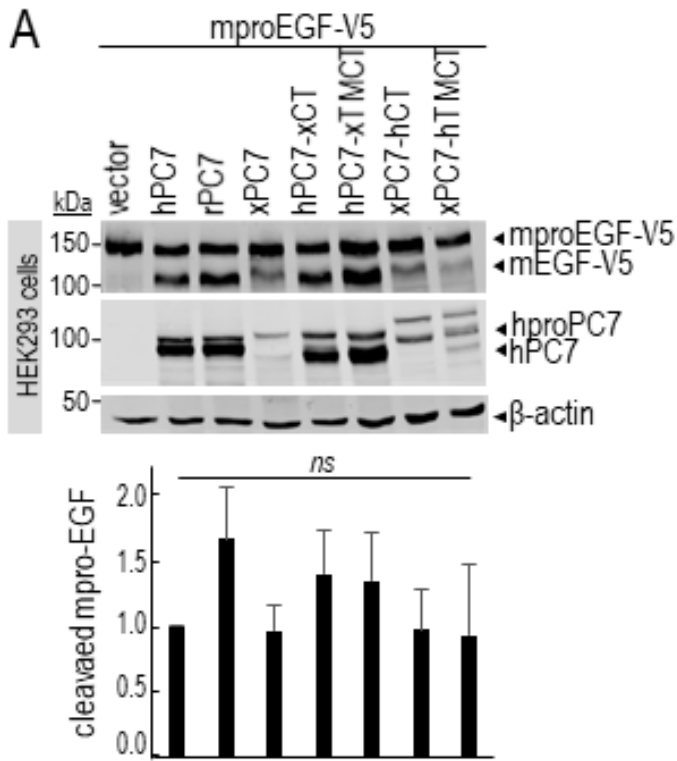


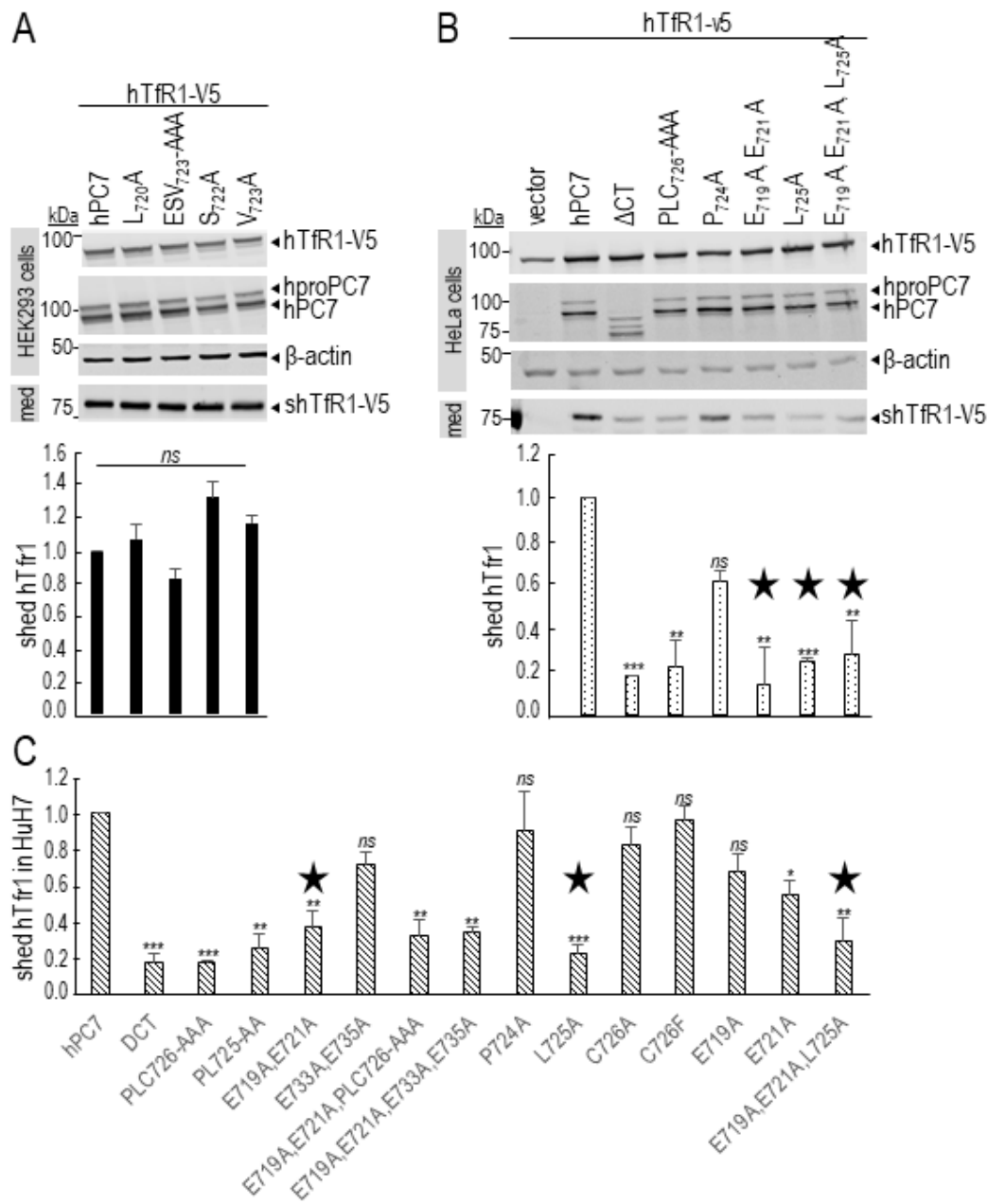
Figure 2.9



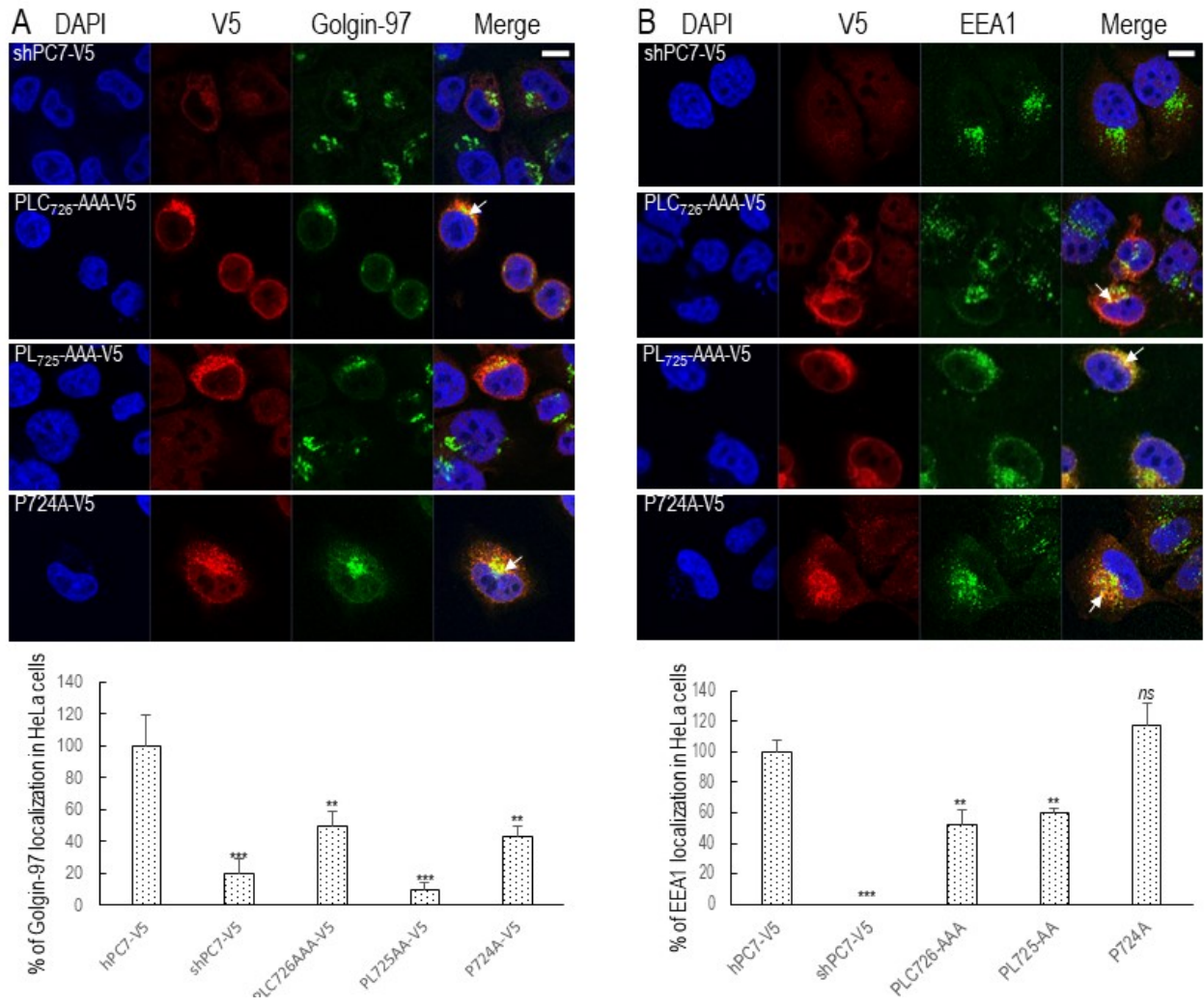
Supporting information figure S2.1



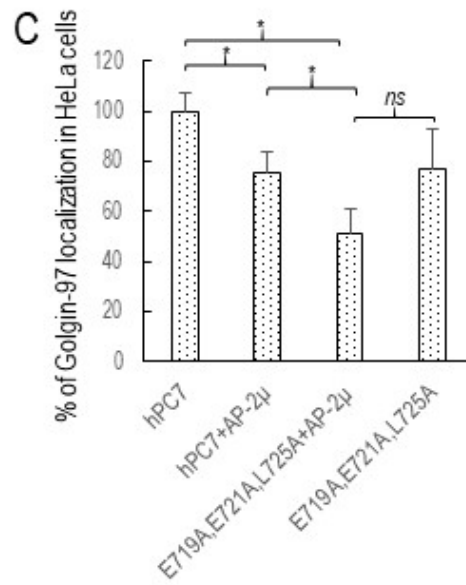
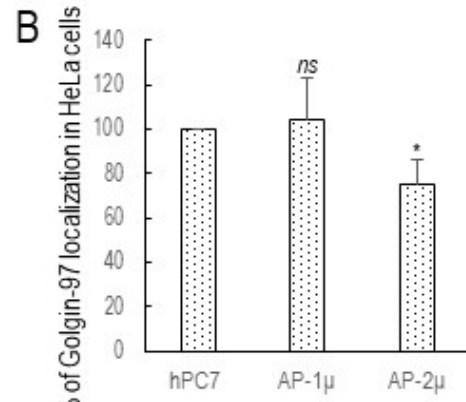
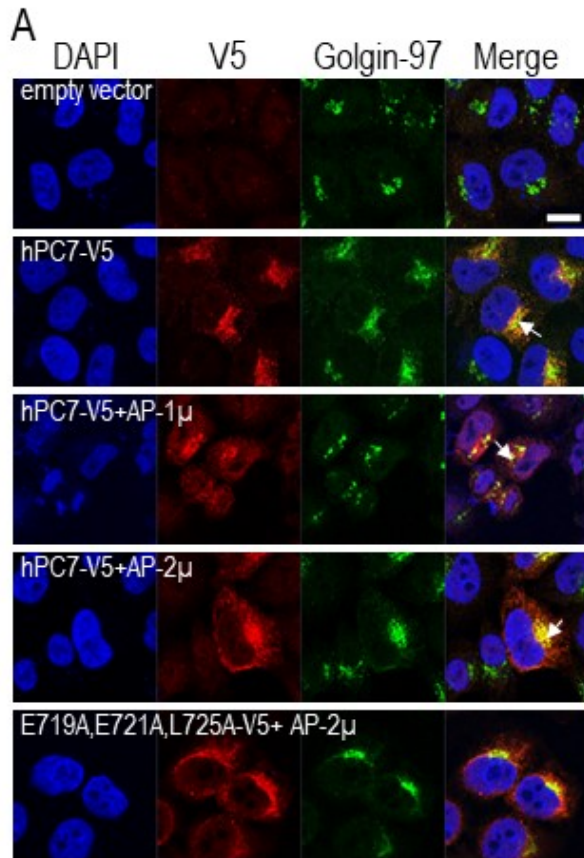
Supporting information figure S2.2



Supporting information Figure S2.3



Supporting information figure S2.4



Supporting information table S1

TABLE S1. Oligonucleotides used in PCR for site-directed mutagenesis of hPC7 and its mutants		
mutants or chimeras	forward	reverse
hPC7+xTMCT	ACCCTCAAGACCTTGTTGCTGTTGGGCTG	GCAACAAGGTCTTGAGGGTGTGGGGG
hPC7+xCT	GGAAGTATATTTGTCTCAGGGTCTAGCGACGG	CCCTGAGACAAATATACTTCCAGCATGTAGTAAAC
xPC7+hTMCT	CACCCCTCGGACACTGGTGTGGTAGGCTGTTTC	GAAACAGCCTACCAGCACCAGTGCCGAAGGGTG
xPC7+hCT	CACATTGGAGTTGTACTGGAGCCAGAGGAATGTGGC	GCCACATTCCTCTGGCTCCAGTACAACCTCAATGTG
L668X (soluble)	GCCACCCGGTATGAGGATCG	GACACCCGGTGGTCTTGAGGGTGTGGGGG
Q690X (Δ CT)	GCCACCCGGTATGAGGATCG	GCGTCGACTCAGCTCAAATATACTTCCAGCATG
G717X	GCCACCCGGTATGAGGATCG	CCCGTCGACTCACTTCCTCCTTGGCTTTC
L753X	GCCACCCGGTATGAGGATCG	CCCGTCGACTCACAGCAGGTCTGGGGC
PLC726-AAA	CTGGCAGCTGCCACTGATTCTAGC	GTGGCAGCTGCCAGCAGCAAGG
P724A	GAATCAGTGGCACTTTGCAG	GCTGCTGCAAAGTGCCACTG
L725A	GAATCAGTGGCACTTTGCAGC	GCTGCTGCAAAGTGCCACTG
C726A	GCCACTTGCCAGCAGCAAGG	CCTTGCTGCTGGCAAGTGCC
C726F	CCACTTTTCAGCAGCAAGGATCC	GGATCCTTGCTGCTGAAAAGTGCCACTG
E719A	AAGGGACAGCGCTAGAATCAGTGCC	CTGATTCTAGCGCTGTCCCTTCTCCTTGGC
E721A	CAGAGCTAGCATCAGTGCCAC	GTGGCACTGATGCTAGCTCTG
E719A,E721A	CACTGATGCTAGCGCTGTCCCTTCC	GACAGCGCTAGCATCAGTGCCACTTTG
E733A,E735A	CTGTTGCCACTGCGTCTGGATCC	CCAGACGCAGTGGCAACAGAGAGC
ELE721-AAA	CCAAGGAGGAAGGGACAGCGGCAGCATCAGTGCCACTTTGCAGC	GCTGCAAAGTGCCACTGATGCTGCCGCTGTCCCTTCTCCTTGG
E719A,E721A,L725A	GAAGGGACAGCGCTAGCATCAGTGCCAGCTTGCAG	CTGCAAAGCTGGCACTGATGCTAGCGCTGTCCCTTC
ESV723-AAA	CAGAGCTAGCAGCAGCGCCACTTTGC	GCAAAGTGCGCTGCTGCTAG
S722A	CAGAGCTAGAAGCAGTGCCACTTTGCAGC	GCTGCAAAGTGCCACTGCTTCTAGCTCTG
V723A	CAGAGCTAGAATCAGCGCCACTTTGCAGC	GCTGCAAAGTGCGCTGATTCTAGCTCTG

2.3.8 Figures legends

Figure 2.1. The cytosolic tail of PC7 is essential for its cleavage activity.

(A) Sequence alignment of PC7 from different species: human, rat, mouse and xenopus. The transmembrane domain (TM) and the cytosolic tail (CT) are indicated by two different horizontal lines. Conserved amino acids between species are noted with stars (identical) and either single dots (similar) or double dots (similar functionality). (B) Western blot analysis of cell lysates (cell) and media (med) after overexpression of hTfR1-V5 with empty vector, human PC7 (hPC7), rat PC7 (rPC7), xenopus PC7 (xPC7) or its chimeric forms (xenopus/human transmembrane domain and cytosolic tail (xTMCT/hTMCT), xenopus/human cytosolic tail (xCT/hCT) in HEK293 cells. Normalization was performed using the hTfR1-V5 shed by hPC7 as a reference. These results are representative of three independent experiments. (C) Schematic representation of hPC7 and its truncated forms. The different domains of the protein are emphasized (SP: signal peptide; Pro: prosegment; TM: transmembrane domain; CT: cytosolic tail). The soluble form of PC7 (shPC7) is devoid of the TM and CT domain. Schematic representation of hTfR1-V5 shed by hPC7. (D) Western blot analysis of cell lysates and media after overexpression of hTfR1-V5, empty vector and PC7 or its truncated forms in HEK293 cells. Normalization was performed using the hTfR1-V5 shed by hPC7 as a reference. These results are representative of three independent experiments. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test).

Figure 2.2. A new ExExxxL motif in the CT of human PC7 is important for its cleavage activity.

(A) Alignment of the CT between aa 717 and 753 (vertical lines) from different species: human, rat, mouse and *Xenopus*. Conserved amino acids between species are noted with stars (identical) and either single dot (similar) or double dots (similar functionality). (B)(C) Western blot analysis of cell lysates (cell) and media (med) after overexpression of hTfR1-V5 with empty

vector, human PC7 (hPC7), its truncated form without the CT (Δ CT) or different CT mutants in HEK293 cells. Normalization was performed using the hTfR1-V5 shed by hPC7 as a reference. The main mutants composing the ExExxxL motif are annotated by a star. These results are representative of three independent experiments. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test).

Figure 2.3. The cartoon representation of solution NMR structure of the human PC7 14-mer CT peptide (aa 717-730) and its Ala mutant.

(A) The ensemble of 10 water refined structures of CT peptide (aa 717-730). The side chains of E719, E721 and L725 are displayed as lines with C atoms in blue and O atoms in red. (B) The ensemble of 10 water refined structures of Ala_{719,721,725} mutated CT peptide (aa 717-730). The side chain of mutated residues is shown as green lines. (C) Alignment of average energy minimized structures of both peptides with the same color code.

Figure 2.4. Localization of human PC7 and its CT mutants with Trans-Golgi Network.

Immunofluorescence of hPC7 or its CT mutants (red labeling) on permeabilized HeLa cells. Cell compartments Golgin-97 marker are labeled in green. Cell nuclei are marked by DAPI (blue labeling). Quantification of co-localization between hPC7 or its mutants with Golgin-97 using IMARIS software. These results are representative of a minimum two independent experiments and quantification represents an average of N=15 cells. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μ m.

Figure 2.5. Localization of human PC7 and its CT mutants with early endosomes.

Immunofluorescence of hPC7 or its CT mutants (red labeling) on permeabilized HeLa cells. The early endosomal marker (EEA1) is labeled in green. Cell nuclei are marked by DAPI (blue labeling). Quantification of co-localization between hPC7 or its mutants with EEA1 using IMARIS software. These results are representative of a minimum two independent experiments and quantification represents an average of N=15 cells. Error bars indicate averaged values \pm

standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μm .

Figure 2.6. Localization of human PC7 and its CT mutants at the cell surface.

Immunofluorescence of hPC7 or its CT mutants (red labeling) on non-permeabilized HeLa cells. Cell nuclei are marked by DAPI (blue labeling). hPC7 or its mutants were quantified at the cell surface using IMARIS software. These results are representative of a minimum two independent experiments and quantification represents an average of $N=15$ cells. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μm .

Figure 2.7. Overexpression of adaptor-proteins (AP) and localization of human PC7 and its CT mutants with early endosomes.

(A) Immunofluorescence of hPC7 or its CT mutants (red labeling) in the presence of AP proteins, on permeabilized HeLa cells. The early endosomal marker (EEA1) is labeled in green. Cell nuclei are marked by DAPI (blue labeling). (B) Quantifications were performed using IMARIS software. Quantification of co-localization of EEA1 with WT hPC7, (C) E719A,E721A mutant, (D) L725A mutant, (E) E719A,E721A,L725A mutant upon overexpression of AP-1 μ (B) or AP-2 μ (B)(C)(D)(E). These results are representative of a minimum two independent experiments and quantification represents an average of $N=15$ cells. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μm .

Figure 2.8. Adaptor-protein 2 regulates the hTfR1 cleavage activity of PC7.

(A) Western blot analysis of cell lysates (cell) and media (med) after overexpression of hTfR1-V5 with hPC7 and AP-1 μ or AP-2 μ in HEK293 cells. Normalization was performed using hTfR1-V5 cleavage by hPC7 as a reference. These results are representative of two independent experiments. (B) Western blot analysis of cell lysates (cell) and media (med) after overexpression of hTfR1-V5 and hPC7 with siRNA control (scramble) or with siRNA against AP-1 μ or AP-2 μ in HEK293 cells. siRNA silencing were quantified by quantitative PCR. These

results are representative of two independent experiments. **(C)** Co-immunoprecipitation assay of HEK293 cells transfected with a plasmid expressing Flag-tagged AP-2 μ and hPC7-V5 or empty vector as a negative control. Immunoprecipitation was performed with beads coupled to an anti-Flag antibody. Cell lysates (input) and immunoprecipitates were analyzed by Western blot with an anti-V5 antibody or anti-Flag antibody. These results are representative of two independent experiments. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.05$, *ns*: not significant (Student's *t*-test).

Figure 2.9. Schematic representation of PC7 trafficking and cleavage activity.

The table summarizes the cleavage activity and trafficking of hPC7 and its mutants to the TGN (Golgin-97), cell surface and early endosomes (EEA1). Results are semi-quantitative and normalized to the WT hPC7 (100%). The cartoon summarizes the localization and cleavage activity of PC7 WT (green CT) and its L725A (red CT), P724A (black) or E719AE721A (orange CT) mutants and the regulation of hPC7 in the presence of AP-2 (blue). *nd*: not determined.

Supporting information Figure S2.1. The cytosolic tail of PC7 is essential for its cleavage activity.

(A) Western blot analysis of cell lysates after overexpression of mouse proEGF (mproEGF) with empty vector, hPC7, rPC7, xPC7 or its truncated forms (xenopus/human transmembrane domain+cytosolic tail (xTMCT/hTMCT), xenopus/human cytosolic tail (xCT/hCT)) in HEK293 cells. Normalization was performed using the mproEGF-V5 cleavage by hPC7 as a reference in HEK293 cells. **(B)** Western blot analysis of cell lysates (cell) and media (med) after overexpression of hTfR1-V5, empty vector and PC7 or its truncated forms in HuH7 cells. Normalization was performed using the hTfR1-V5 shed by hPC7 as a reference. These results are representative of three independent experiments. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test).

Supporting information Figure S2.2. The cytosolic tail of PC7 is essential for its cleavage activity.

(A) Western blot analysis of cell lysates (cell) and media (med) after overexpression of hTfR1-V5, empty vector, human PC7 (hPC7), L720A, ESV₇₂₃-AAA, S722A and V723A mutants in HEK293 cells. Normalization was performed using the hTfR1-V5 shed by hPC7 as a reference. These results are representative of three independent experiments. (B) Western blot analysis of cell lysates (cell) and media (med) after overexpression of hTfR1-V5, empty vector, human PC7 (hPC7), its truncated form without the CT (Δ CT) and different CT mutants in HeLa cells. Normalization was performed using the hTfR1-V5 shed by hPC7 as a reference in HeLa cells or (C) in HuH7 cells. The main mutants composing the ExExxxL motif are annotated by a star. These results are representative of three independent experiments. All error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test).

Supporting information Figure S2.3. Localization of human PC7-CT mutants in the Trans-Golgi network or early endosomes.

(A)(B) Immunofluorescence of CT mutants (red labeling) on permeabilized HeLa cells in the presence of (A) Cell compartments Golgin-97 marker or (B) Early Endosomal marker are labeled in green. Cell nuclei are marked by DAPI (blue labeling). Quantification of co-localization between hPC7 mutants and Golgin-97 (A) or with EEA1 (D) was performed using IMARIS software. These results are representative of minimum two independent experiments and quantification representative of N=15 cells. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: not significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μ m.

Supporting information Figure S2.4. Overexpression of adaptor-proteins (AP) and localization of human PC7 or its CT mutant with TGN.

(A) Immunofluorescence of hPC7 or its CT mutant (red labeling) in the presence of AP proteins, on permeabilized HeLa cells. Cell compartments Golgin-97 marker (TGN marker) are labeled in green. Cell nuclei are marked by DAPI (blue labeling). (B) Quantification, using IMARIS software, of the co-localization between hPC7 or (C) its mutant E719A,E721A L725A and

Golgin-97 in the presence of overexpressed AP-1 μ (B) or AP-2 μ (B) (C). These results are representative of at least two independent experiments and quantification is representative of N=15 cells. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, P < 0.1, **, P < 0.01, ***, P < 0.001, *ns*: not significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μ m.

Chapitre 3:

**Régulation du trafic et de l'activité de
PC7 par Cab45 et le calcium**

(article en préparation)

3.1 Résumé

La famille des proprotéines convertases (PCs) se compose de neuf protéases sécrétoires à sérine. Les sept premières clivent des substrats à des sites de reconnaissance composés de résidus basiques au sein du TGN, des granules de sécrétion et/ou à la surface cellulaire/endosomes. Les PCs sont, dans un premier temps, synthétisées sous forme de zymogène auto-catalytiquement clivés dans le réticulum endoplasmique. Le pro-domaine reste cependant attaché à la protéine en N-terminal. L'activation de ces protéases s'effectue grâce à un second clivage et/ou une séparation de leur pro-domaine dans des organelles spécifiques. Dans ce chapitre, nous avons démontré que le septième membre, PC7, semble se séparer de son pro-domaine à la surface cellulaire. Subséquemment, il est l'unique PC clivant, dans les endosomes, le récepteur de la transferrine humaine (hTfR1) en une forme soluble (shTfR1). Étonnement, la protéine calcium-dépendante Cab45 réduit la localisation de PC7 dans le TGN et régule négativement le clivage de PC7 sur hTfR1.

3.2 Contribution

Conceptualisation: N. G Seidah et M. Kebede pour l'idée de Cab45

Réalisation des expériences : L. Durand. Sauf pour l'hybridation *in situ* : J. Marcinkiewickz

Analyse de résultats : L. Durand sauf pour l'hybridation *in situ* : J. Marcinkiewickz

Écriture du manuscrit : Lorelei Durand et Nabil G. Seidah

Supervision: Nabil G. Seidah

3.3 Manuscript

Regulation of PC7 trafficking and activity by Cab45 and calcium

Lorelei Durand¹, Jadwiga Marcinkiewickz¹, Alexandra Evagelidis¹, Melkam Kebede² and Nabil G. Seidah*¹

From the ¹Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, affiliated to the Université de Montréal; 110 Pine Ave. West, Montreal, QC, Canada H2W 1R7; ²Charles Perkins Centre, School of Life and Environmental Sciences, University of Sydney, Sydney, Australia

*Address correspondence to: Nabil G. Seidah, Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 Pine Ave. West, Montréal, QC H2W 1R7, Canada. Tel: (514) 987-5609; E-mail: seidahn@ircm.qc.ca

3.3.1 Abstract

The secretory proprotein convertases (PCs) belong to a family of nine serine proteases. The first seven cleave substrates at specific basic residues within the TGN, granules and/or at the cell surface/endosomes. The PCs are first synthesized as zymogens that are auto-catalytically cleaved in the endoplasmic reticulum but remain associated with their inhibitory N-terminal prodomain. Their activation occurs following a second cleavage and/or separation from their prodomain in specific organelles. Herein, we demonstrate that the seventh member, known as PC7, seems to separate from its prodomain at the cell surface or beyond. Subsequently, it uniquely sheds human transferrin receptor 1 (hTfR1) into soluble shTfR1 in endosomes. Unexpectedly, the calcium-binding protein Cab45 reduces the TGN localization of PC7 and

negatively regulates the PC7 cleavage of hTfR1 as evidenced by overexpression and siRNA analyses.

Keywords: proprotein convertase type 7 (PC7); proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (PCSK7); transferrin receptor 1 (TfR1); cytosolic tail (CT); calcium-binding protein 45 (Cab45); prodomain; calcium (Ca^{2+})

3.3.2 Introduction

Proteins convertases (PCs) comprise a family of nine secretory serine proteases that cleave and activate/inactivate precursor proteins within the secretory pathway or at the cell surface¹⁰. The first seven members, soluble PC1/3, PC2, PC4, PC5/6-A, PACE4 and the type-1 membrane-bound PC5/6-B, Furin and PC7 cleave their substrates at a basic motif (K/R)-2(Xn)-(K/R)↓, where Xn = 0, 1, 2, 3 spacers amino acid (aa). The structural domains of these enzymes consist of an N-terminal signal peptide, followed by a chaperone/inhibitory prodomain (pro), a catalytic domain, a P-domain and C-terminal domains specific to each PC. All PCs are first synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) as inactive zymogens³⁴, that, except for PC2^{35; 36}, are subsequently auto-catalytically cleaved at the C-terminus of the prodomain (pro). The prodomain acts as an intra-molecular chaperone that keeps the calcium-dependant proteases inactive during their folding and their maturation⁸¹. Subsequently, the inactive prodomain-enzyme complex traffics from the ER to different intracellular compartments via the *cis/medial* Golgi (SKI-1)⁴⁰ or *trans* Golgi network (TGN), immature secretory granules, cell surface or endosomes where a critical zymogen activation step occurs in before the PCs reach their final destination¹⁰⁹. This activation usually occurs by a second autocatalytic cleavage event within the prodomain thereby liberating this inhibitory prodomain. This secondary cleavage occurs in the TGN for Furin^{34; 37}, and at the cell surface for the heparan sulfate proteoglycan (HSPG)-bound PACE4 and PC5^{38; 39}. In the case of PC4 and PC7, activation occurs following the physical separation of the mature enzyme from its inhibitory prodomain^{41; 42}. The details of the latter mechanism are currently unknown, nor is the subcellular site where such separation

occurs. Interestingly, overexpression of the PC7 prodomain alone inhibits the intracellular protease activity PC7 and results in the secretion of the unprocessed protein^{41; 104}.

PC7 is the most ancient and highly conserved PC. In non-mammalian species such as *Xenopus*⁹⁸ and Zebrafish⁹⁵, the knockdown of its mRNA results in lethality in early stages of development. In contrast, PC7 KO mice are healthy and have a normal lifespan but exhibit anxiolytic and novelty-seeking behaviors^{47; 219}. Cleavage redundancy with others PCs on different substrates could explain this difference between species¹⁴⁹. Although PC7 can cleave many substrates *in vitro*, it is the only convertase that sheds human transferrin receptor 1 (hTfR1) into soluble shTfR1⁵². The C-terminal domain of membrane-bound PC7 is composed of a transmembrane domain (TM) and a cytosolic tail (CT). The TMCT of PC7 is essential for its cleavage activity and regulate its trafficking^{41; 52}. PC7 is mostly localized to the TGN and may recycle to it from the cell surface, through endosomes^{41; 45; 146; 149}. Its traffic is regulated by different motifs present in its CT. In fact, cell biology studies revealed the presence in the CT of human PC7 (hPC7) of a Pro-Leu-Cys₇₂₆ (PLC) sorting motif important for the cell surface to endosomes entry¹⁴⁶. Furthermore, the presence of a second basic motif (**HRSRKAK**₇₁₄) in the CT together with two palmitoyled cysteines (Cys_{699,704}) are critical for TGN localization of hPC7 and its endocytic trafficking¹¹².

In this study, in an effort to elucidate where PC7 separates from its prodomain we found a new partner that regulates PC7 trafficking and activation. Our results showed that mature PC7 (without its prodomain) seems to separate from its prodomain at the cell surface, wherein PC7 is still not enzymatically active until it reaches endosomes. We hypothesized that a putative cell surface regulating factor could bind mature PC7 and/or its prodomain at the cell surface. This led us to investigate the calcium-dependant Cab45, known to release soluble cargo proteins from the TGN to the cell surface^{210; 242}. Calcium ions (Ca²⁺) are involved in many processes as secretion, signaling or contraction²¹⁰. Currently, no report appeared on a possible role of Cab45 on membrane-bound cargo proteins. We hypothesized that Cab45 and/or Ca²⁺ could regulate the traffic and/or activity/activation of PC7 by modulating the separation of PC7 from its prodomain. Cab45 is a member of a calcium-binding superfamily named CREC (Cab45, Reticulocalbin, ERC-45, Calumenin)²¹¹. These proteins are composed of EF-hand motifs comprising a helix-loop-helix structure²¹¹.

In this work, we showed that separation of mature PC7 from its prodomain occurs at the cell surface. In addition, the shedding of hTfR1 by hPC7 is reduced by ~50% upon overexpression of Cab45, without affecting the hTfR1 trafficking, and the reverse is true upon siRNA silencing of Cab45 expression. Finally, Ca^{2+} dispersed the immunoreactivity of the prodomain at the cell surface into punctuate-like structure, without affecting that of mature PC7. Thus, we demonstrated that Cab45 and Ca^{2+} are involved in PC7 regulation at the cell surface.

3.3.3 Results

3.3.3.1 Human mature PC7 separates from its prodomain at the cell surface

To better understand where mature human PC7 (hPC7) separates from its prodomain (pro), we tagged the full length hPC7 with a C-terminal V5 tag and its N-terminus just after the signal peptide with an HA tag. This would allow us to follow respectively the mature form (hPC7-V5) and its inactive form (HApro) (**Fig. 3.1 A**). Immunocytochemistry of C-terminally V5-tagged human PC7, and its HApro were analyzed in permeabilized and non-permeabilized HeLa cells (**Figs. 3.1 B, C**). Under permeabilizing conditions, using a polyclonal antibody (Ab) to the V5 and HA tags, we visualized the localization of the C-terminal and N-terminal PC7 and estimated that ~70% ($\pm 2\%$) of their immunoreactivities co-localize in HeLa cells (**Fig. 3.1 C**). In non-permeabilized cells, this co-localization is only ~30% ($\pm 6\%$). Such ~40% decreased cell surface co-localization between hPC7 and its prodomain suggests that they separate from each other at the cell surface and/or in a compartment close to the cell surface. Active PC7 is known to localize to endosomes where it sheds its substrate hTfR1⁵². To investigate the possibility that separation occurs in endosomes, we treated permeabilized cells with dynasore that prevents endocytosis by inhibiting dynamin GTPase activity¹⁵⁶ (**Fig. 3.1 B**). Under these conditions, hPC7 and its prodomain immunoreactivities are ~60% ($\pm 3\%$) co-localized (**Fig. 3.1 C**). This result is similar to the co-localization of both proteins in permeabilized cells, suggesting that this treatment has no impact on the separation of mature hPC7 from its prodomain. However, this result is significantly different from analysis in non-permeabilized cells, suggesting that the prodomain separates from its mature form at the cell surface. Note that hPC7 seems to localize

to specific cell surface microdomains distinct from those of the prodomain (**Fig. 3.1 A**), suggesting the implication of some cell surface protein(s) in this separation.

3.3.3.2 Cab45 and PC7 localize in the same mouse tissues

PC7 is a ubiquitous protein mainly present in lymphoma tissues, germinal cells, liver and brain⁴⁴. Cab45 is a soluble protein reported to be involved in the sorting of soluble proteins from the Golgi apparatus to the cell surface²¹⁴. Accordingly, we investigated the possibility that Cab45 could regulate PC7 trafficking to the cell surface. In order to better appreciate the tissue-localization of Cab45, we analyzed by *in situ* hybridization histochemistry the distribution of Cab45 mRNA in a 31-tissues array in adult mice, following antisense (as) and sense (s) cRNA hybridizations (**Figs. 3.2 A, B**). Interestingly, similar to PC7, Cab45 is widely expressed in various tissues with a high level of expression in pituitary gland, intestine, ovary and epididymis, a moderate level of expression in brain, spinal cord, testis and liver and a low expression levels in lung and pancreas (**Fig. 3.2 A**). This wide tissue distribution overlaps in many cases with that of PC7⁴⁴, suggesting a possible functional connection between Cab45 and PC7.

3.3.3.3 Cab45 regulates hPC7 cleavage activity

PC7 regulates iron homeostasis by shedding hTfR1 and releasing a soluble shTfR1⁵². To validate a possible link between Cab45 and PC7, we first overexpressed in HEK293 cells hTfR1 and hPC7 in the presence or absence of the HA-tagged human Cab45 (hCab45-HA) (**Fig. 3.3 A**). As control, we used hTfR1 cleavage by hPC7 and normalized this result by quantifying shTfR1 levels in the medium. Surprisingly, the cleavage of hTfR1 by hPC7 decreased by ~50% ($\pm 5\%$) in the presence of overexpressed hCab45 (**Fig. 3.3 A**). Similar results were obtained with mouse Cab45 (mCab45) (**Fig. 3.3 B**). To confirm this result, we overexpressed hPC7 with hTfR1 in HEK293 cells and silenced the endogenous expression of hCab45 by siRNA (~70% silencing) (**Fig. 3.3 C**). Upon reducing endogenous Cab45 levels, shTfR1 levels in the media

increased by ~1.8-fold (± 0.25) compared to the scramble (control) siRNA. These results indicate a link between Cab45 and PC7, and more precisely that Cab45 reduces hPC7 activity on hTfR1.

3.3.3.4 PC7 is released from the TGN by Cab45

Since Cab45 can escort proteins from the TGN toward different subcellular compartments^{214; 215}, it could affect the localization of hPC7 or hTfR1 or both. Thus, we first analyzed by immunocytochemistry the co-localization of hTfR1 with a TGN marker Golgin-97 (**Fig. 3.4 A**) or with an early endosomal (EEA1) marker (**Fig. 3.4 B**). Overexpression of mCab45 did not affect the localization of hTfR1 in either compartment (**Fig. 3.4**), suggesting that Cab45 rather acts only on PC7 activity and/or its trafficking.

Accordingly, we next focused on the possible change of localization of hPC7 in the TGN (**Fig. 3.5 A**) or in endosomes (**Fig. 3.5 B**) upon overexpression of mCab45. Interestingly, hPC7-V5 is ~55% ($\pm 10\%$) less enriched in the TGN in the presence of Cab45 (**Fig. 3.5 A**), but its localization is not affected in early endosomes (**Fig. 3.5 B**). Paradoxically, PC7 cleavage activity of hTfR1 in endosomes is decreased in the presence of Cab45 cells, but PC7 and hTfR1 localizations are similar in this compartment in the absence or presence of Cab45. This result suggests that hPC7 could be inactive in endosomes with the prodomain remaining associated to the mature form in the presence of Cab45. Alternatively, Cab45 could favor the localization of hPC7 at the cell surface and inhibits its activity.

3.3.3.5 Cab45 and Ca²⁺ regulate the localization and activation of PC7 at the cell surface

To investigate the possible localization of PC7 by Cab45 to the cell surface, in non-permeabilized HeLa cells, we transfected the cDNA of HApro-PC7-V5 with that of Cab45 or incubated the cells overexpressing HApro-PC7-V5 with 1 mM Ca²⁺²¹³ (**Fig. 3.6 A**). We then quantified the percent co-localization of HApro with hPC7-V5. The data showed that co-localization of HApro with the mature form is not affected by either Cab45 overexpression or Ca²⁺ treatment (**Fig. 3.6 B**). However, Ca²⁺ treatment reduced of ~18% ($\pm 9\%$) the co-

localization of hPC7-V5 with HApro compared to untreated cells (**Fig. 3.6 B**), suggesting a greater separation of mature hPC7 from its prodomain at the cell surface in presence of 1 mM Ca^{2+} . In addition to the observed reduced co-localization, we also noted the widespread punctuated presence of HApro-immunoreactivity at the cell surface (**Fig. 3.6 A**). This unexpected result led us to suggest that PC7 requires extracellular Ca^{2+} at the cell surface to separate from its prodomain, which might result in a more efficient PC7-activation. More experiments are needed to validate this novel mechanism and the role of Ca^{2+} in hPC7 activation.

3.3.4 Discussion

In this report, we demonstrated that hPC7 prodomain separates from its mature form at the cell surface. Cab45 and Ca^{2+} seem to be involved in a, yet, poorly defined mechanism. Past results showed that Cab45 delivers proteins from the TGN to others compartments²⁴³. Here, we provide evidence for the first time that Cab45 can enhance the exit of a type I membrane-bound protein out of the TGN resulting in negative regulation of PC7 cleavage activity. However, we still do not know if this interaction is direct or not. Future experiments using co-immunoprecipitation between Cab45 and PC7 will confirm this hypothesis.

Currently, Cab45 is known to localize in the ER, at the cell surface and in the TGN. Many results support that in addition to cell surface, PC7 also localizes in the TGN, endosomes and in some undefined plasma membrane microdomains^{114; 127}. Interestingly, overexpressed Cab45 does not increase the presence of PC7 at the cell surface (**Fig. 3.6**). It is still possible that Cab45 may modulate the PC7 enrichment in these microdomains just under the plasma membrane¹²⁷. Another possibility is that overexpressed Cab45 blocks HApro separation and thus, endosomal PC7 could remain inactive as a complex with its inhibitory pro¹⁰⁴ and hence exhibit reduced activity on hTfR1.

Cab45 has three isoforms and in our study, we focused on the most common isoform, secretory Cab45-G (Cab45-Golgi) enriched in the TGN²¹⁰. Cab45-G releases cargo proteins from the TGN to the cell surface. This isoform is more expressed in metastatic cells lines and

enhances cell migration²⁴⁴. The second isoform Cab45-C (Cab45-cytosol), lacking the signal peptide, is only present in the cytosol²¹². The third one, Cab45-S (Cab-45 secreted) enters the secretory pathway but lacks the EF-hand motif repetitions that bind Ca²⁺²¹². These three isoforms are not well characterized but it will be interesting to test whether other Cab isoforms, e.g., Cab45-C or Cab45-S could affect PC7 traffic and/or activation/cleavage as is the case for Cab45-G. The main difference between Cab45-G and Cab45-S is the presence of EF-hand motifs which could bind Ca²⁺ and hence regulate Ca²⁺ concentration. This Ca²⁺-binding promotes Cab45-G oligomerization in the TGN and, thus, enhances and guides the sorting of cargo proteins to their final destination^{213;214}.

Calcium ions are involved in signaling, transport and storage of Cab45. Ca²⁺ and SPCA1 (*secretory pathway calcium ATPase1*) retain Cab45 in TGN membranes²¹⁵. To confirm and investigate about the importance of Ca²⁺ in the trafficking and activation of PC7, treatment of cells with 1 mM with Ca²⁺ showed a reduction of co-localized mature hPC7 at the cell surface with its pro, suggesting that Ca²⁺ enhances the separation of hPC7 from its prodomain. Another possibility is that Ca²⁺ sequesters pro at the cell surface (punctuated structures containing pro at the cell surface), thereby liberating mature hPC7. EGTA treatment²⁴⁵ to sequester extracellular Ca²⁺, may support this hypothesis. It will be necessary to investigate if the cleavage activity of PC7 on its substrate is affected by Ca²⁺ or EGTA treatment. It is possible that Ca²⁺ recognizes and binds the unique negatively charged segment **ESLEGDGEEETLE**₇₁ present in the prodomain of hPC7, thereby promoting its separation. Note that this segment is possibly Ser-phosphorylated (pS) because it exhibits an SXE motif recognized by the secretory kinase Fam20C²⁴⁶. Furthermore, Ca²⁺ can bind a negatively charged DxDxDG motif²⁴⁷, which is similar to the above pSxExDG motif in the prodomain of PC7. Thus, the binding of Ca²⁺ to the prodomain of PC7 will need to be carefully investigated.

In vitro experiment, using an overexpressed vaccinia virus recombinant of the prodomain of PC7, showed that this pro is secreted into the medium, but not that of Furin¹⁰⁴. However, when we transfected our constructions, we never detected this pro in the medium. This mechanism and potential partners need to be tested upon Ca²⁺ treatment and/or Cab45 overexpression.

Heparin sulfate proteoglycans (HSPGs) are known to bind and enhance the activation of PC5 and PACE4 at the cell surface³⁹. This likely causes separation of the carboxypeptidase E

(CPE)¹¹⁰, that recognizes the basic motif at the autocatalytic cleavage site of PCs and hence would liberate the prodomain. Whether this mechanism applies to PC7 separation from its pro *via* a CPE removal of the C-terminal basic residues of the PC7 prodomain Arg-Arg-Ala-Lys-Arg₁₄₁↓^{41; 44} needs to be investigated. Heparin treatment and an inhibitor of CPE could be used to test this hypothesis. Finally, PC7 can traffic to the cell surface by the conventional secretory pathway and an unconventional pathway⁴¹. In this second case, PC7 (but not Furin) reaches the cell surface in 10 minutes and this traffic depends on its transmembrane domain⁴¹. This unconventional pathway is poorly understood, and we do not know if PC7 reaches the cell surface by this route as an active enzyme or an inactive zymogen. This unknown pathway opened the possibility that PC7 can have a non-enzymatic function, e.g., in regulating triglyceride homeostasis⁴⁹.

In sum, we conclude that the prodomain separates from its mature form at the cell surface, but not in endosomes. A new regulator of PC7, the calcium-binding protein Cab45 reduced PC7 cleavage activity on its substrate and re-localizes PC7, but not its substrate hTfR1, from the TGN to another compartment. Cab45 and Ca²⁺ influence the localization of active and inactive forms of hPC7 at the cell surface, but the details of this mechanism are still not defined.

3.3.5 Experimental procedures

3.3.5.1 Plasmids

Human PC7, human TfR1, mouse and human Cab45 cDNA were cloned on pIRES-2-EGFP vector, as reported (Clontech)⁵². V5 and/or HA tag were cloned in the N-terminal or C-terminal of constructions, as reported^{52; 113}.

3.3.5.2 Cell culture and transfections

HEK293 cells were cultivated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) at 37°C under 5% CO₂ and plated in a 6 wells plates (500,000 cells per well). The day after, plasmids were transfected in equimolar quantity with a 1 µg final quantity of cDNA using Polyplus Reagent® (Jetprime). Twenty hours post-transfection, cells were washed in a serum-free medium. Two days post-transfection, cells were collected and lysed with RIPA 1X supplemented by a protease complete inhibitor. Protein lysates and media were prepared for Western blot analysis.

3.3.5.3 SiRNA and quantitative RT-PCR

In addition of transfected plasmids, 50 nM final concentration of scramble siRNA or Cab45 siRNA (Dharmacon; scramble: siGENOME SMARTpool) was transfected using DhamaFECT1 transfection reagent (Dharmacon), as recommended by the manufacturer's protocol. SiRNA efficiency was verified by quantitative RT-PCR in HEK293 cells to measure Cab45 mRNA levels. RNA extraction was obtained as reported by the manufacturer's instruction using Trizol reagent (Invitrogen). RNA extraction was validated on agarose gel 1% after use of Superscript II reverse-transcriptase amplification, as reported by Invitrogen. We used Vii7 System (Applied Biosystems) to perform real-time PCR. Results were obtained from two independent experiments ran in duplicate. The set of primers was as follows: Cab45 forward: CGGAGGAAGCTGATGGTCAT and reverse: TGCATCTCCTTGGCACTGATC. As control and to normalize the variability of expression levels, we used the house-keeping human TATA-box binding protein (TBP). The Δ CT method was applied to quantify our siRNA silencing²³⁵.

3.3.5.4 Western Blot analysis

SDS-PAGE gel of 8% or 12% were used to separate proteins from cell lysates and media. Transfer was performed on a nitrocellulose membrane (GE healthcare) overnight at 4°C. Then, membranes were blocked 1 hour (h) at room temperature (RT) with 1:1 blocking buffer (Mandel): PBS 1X. An overnight incubation at 4°C with primary antibody (Ab) was carried out:

anti-PC7 Ab which recognizes the N-terminal prodomain and the active form (1:10,000), anti-V5 Ab (In Vitrogen) (1:3,000), β -actin (Sigma) (1:3,000). A secondary fluorescent Ab was used to reveal proteins: anti-mouse Ab 680 (Mandel) (1:10,000) or anti-rabbit Ab 800 (Mandel) (1:10,000). The revelation of tag proteins occurred with Odyssey Li-Cor imaging machine and quantification were performed with Image studio lite version 5.2 software. Expression of Cab45-HA was revealed with anti-HA HRP (1:3000) (Abcam).

3.3.5.5 *In situ* hybridization

Glass slides containing fixed whole body P10, or adult liver tissues 10 μ m-thick cryosections were hybridized with mouse antisense and sense (negative control) cRNA riboprobes as previously described ²⁴⁸. The [³⁵S]-labeled (PerkinElmer) cRNA probes were synthesized *in vitro* and corresponded to mouse coding region (aa 1-362) of the whole mRNA of mouse Cab45, also known as stromal cell derived factor 4 (Sdf4) (NM_001302467.1).

3.3.5.6 Immunofluorescence

HApr-hPC7-V5 was transfected in 24 wells plates, beforehand plated with HeLa cells (50,000 cells per well). Transfection was performed using 0.5 μ g final of cDNA, or in equimolar quantity with mCab45, and 1.75 μ l of Fugene reagent (Promega). One day post-transfection, dynasore treatment (80 μ M final in DMEM without FBS) was performed for 1 hour, then, cells treated or no, were washed in a serum-free medium. Two days, post-transfection, calcium treatment (Ca^{2+} 1 mM final concentration in DMEM without FBS) was done at room temperature 15 min. All next steps were performed on ice. First, cells were washed with cold PBS 1X 3 times. Cells fixation was carried out with fresh formaldehyde 4% during 10 min. Then, cells were washed 2 more times. To permeabilized cells, treatment with 1% Triton X-100 for 7 minutes (min) was performed. Cells were washed 2 more times with cold PBS 1x and blocked with PBS containing

1% bovine serum albumin was for 30 min. An overnight incubation of cells with the first ab was completed at 4°C: Anti-V5 ab (1:500, InVitrogen) or anti-V5 ab (1:500, Abcam), anti-Golgin-97 Ab (1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-EEA1 Ab (1:200, Abcam), anti-HA Ab (1:2000, Cell Signaling Technology). Fluorescent secondary ab were incubated 1h to reveal antigen-ab complexes: Alexa fluor (555 or 647)-tagged antibodies (Molecular Probes). The nuclei were stained with Prolong DABCO with DAPI (ThermoFisher). We used the confocal microscope (Zeiss LSM-710) for all immunofluorescence experiments.

3.3.5.7 Statistical immunofluorescence analysis

IMARIS analysis software (8.2.1) was used to determine the co-localization of fluorescently labeled protein. To detect spots, we used an aXTension script named Colocalize Spots. We first used empty vector as control to fix background fluorescence. The software IMARIS detected positive fluorescent spots in each condition.

3.3.6 Acknowledgements

We would like to thank Sandrine Lacoste for cell biology. Dominic Filion for microscopy, and Brigitte Mary for her expert secretarial assistance.

3.3.7 Figures

Figure 3.1

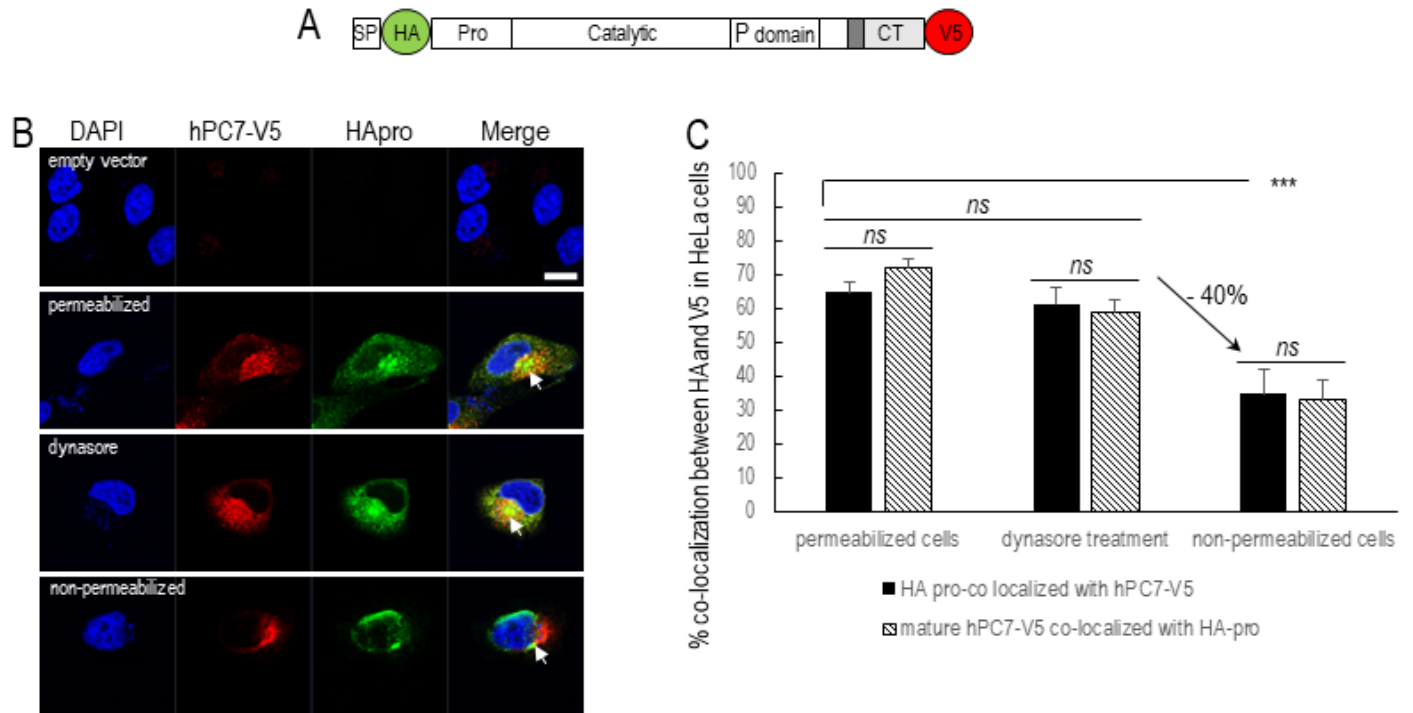


Figure 3.2

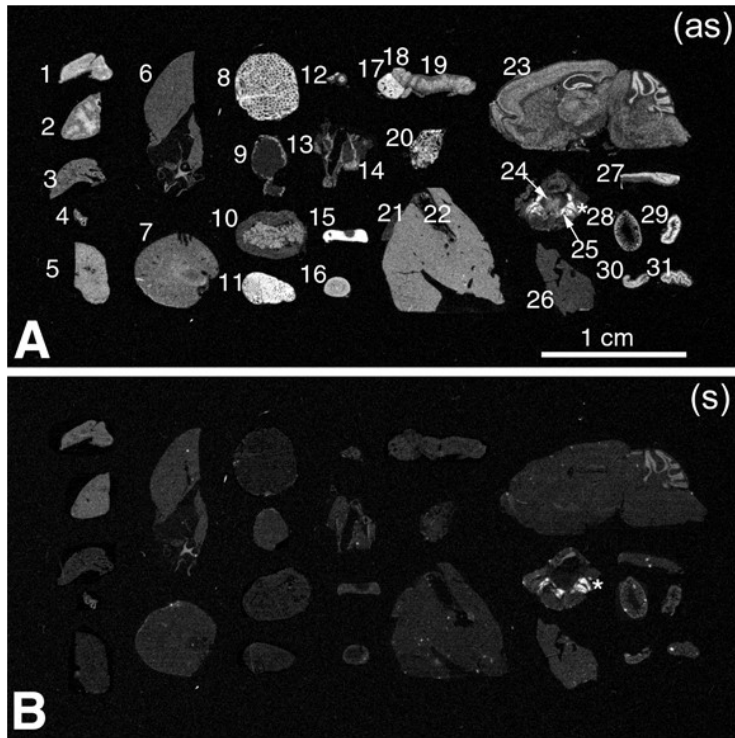


Figure 3.3

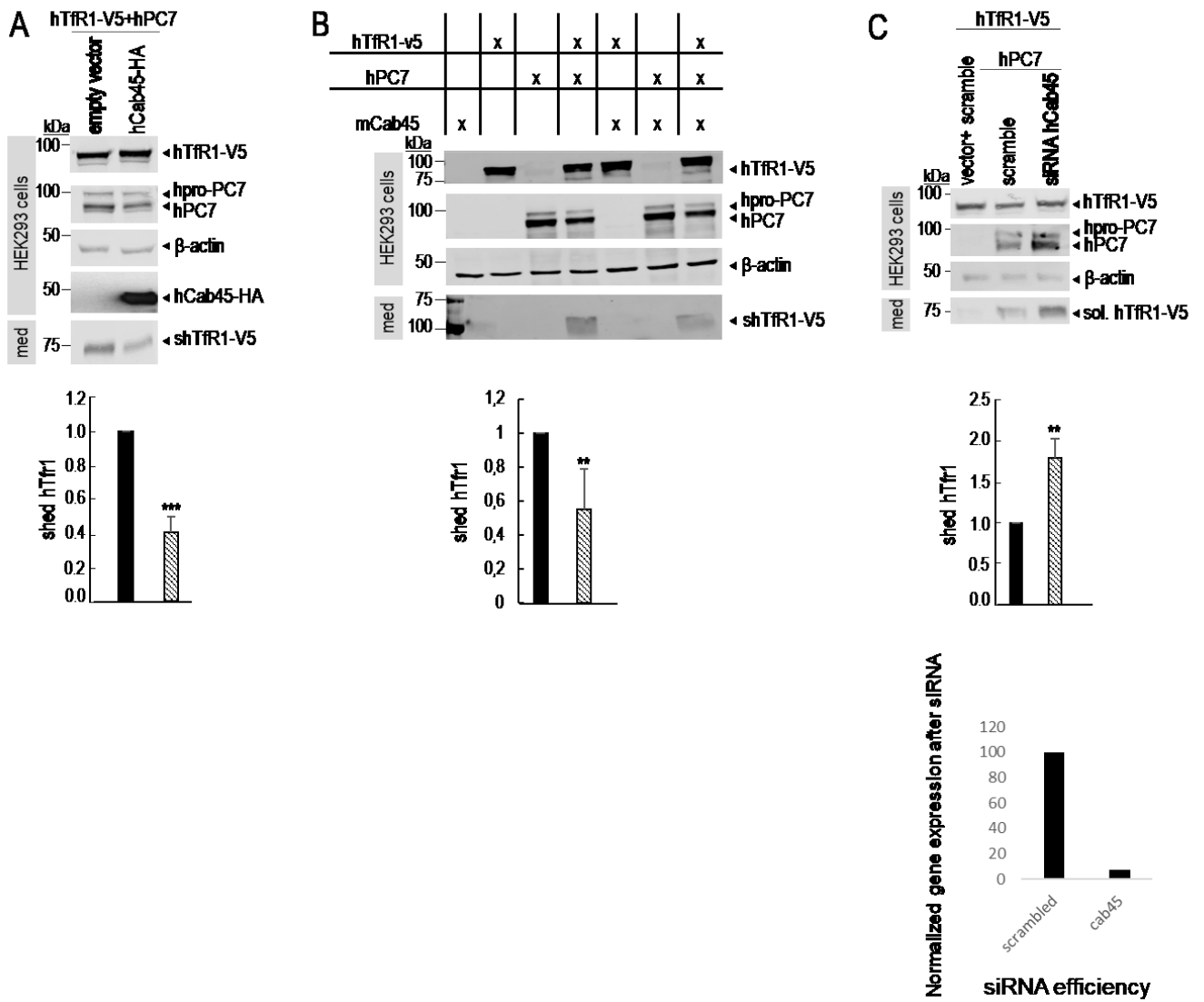


Figure 3.4

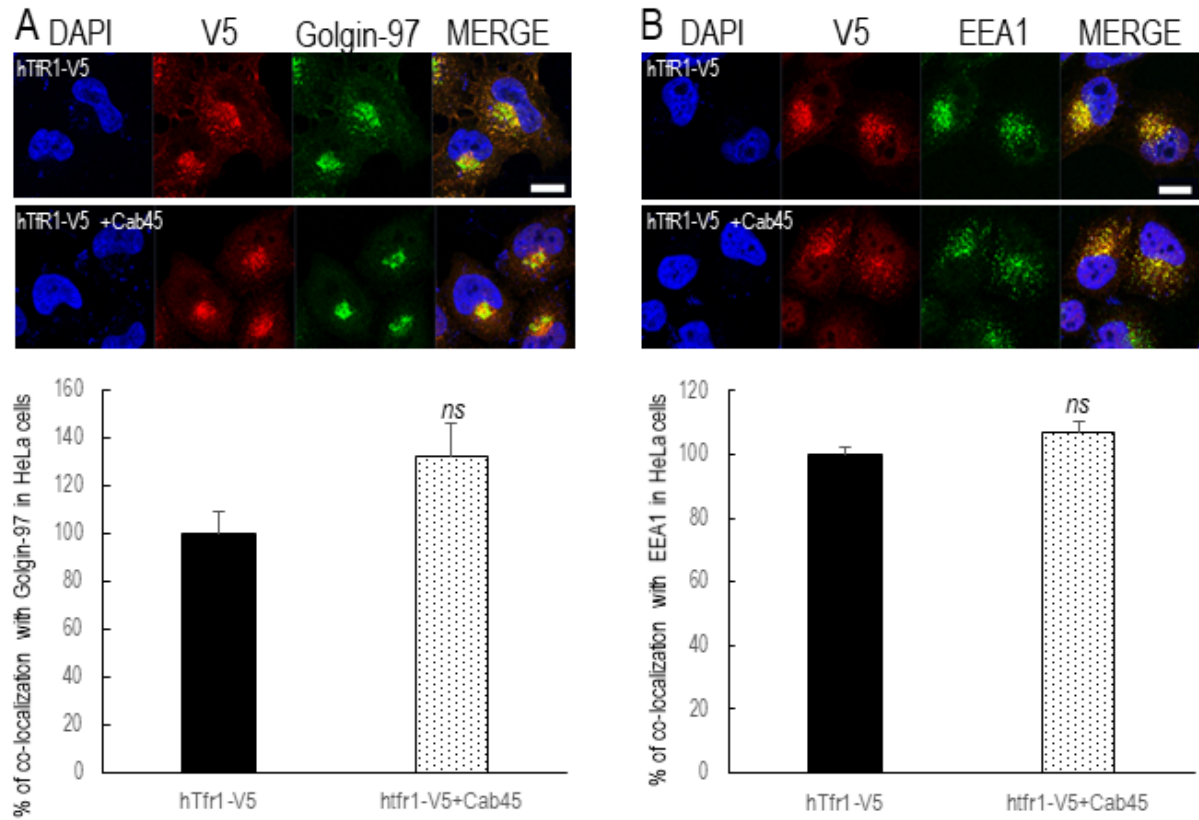


Figure 3.5

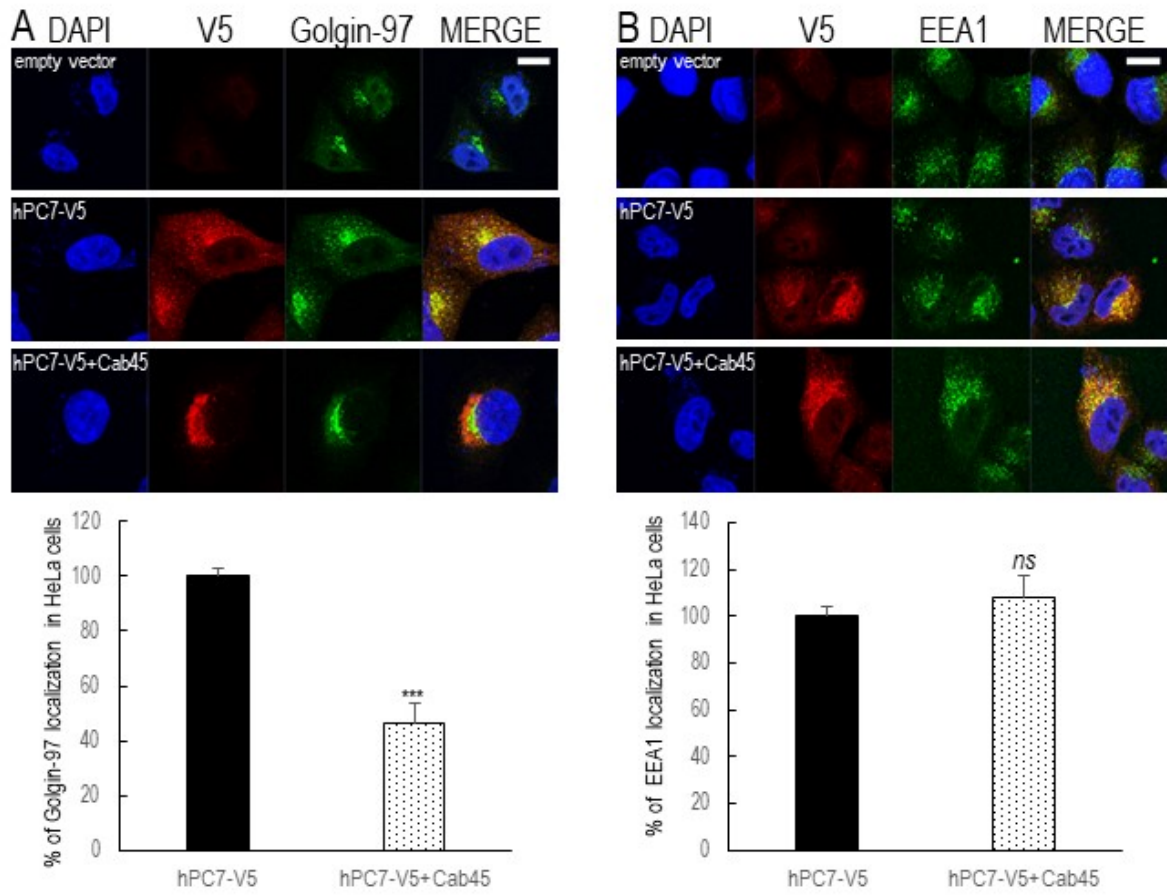
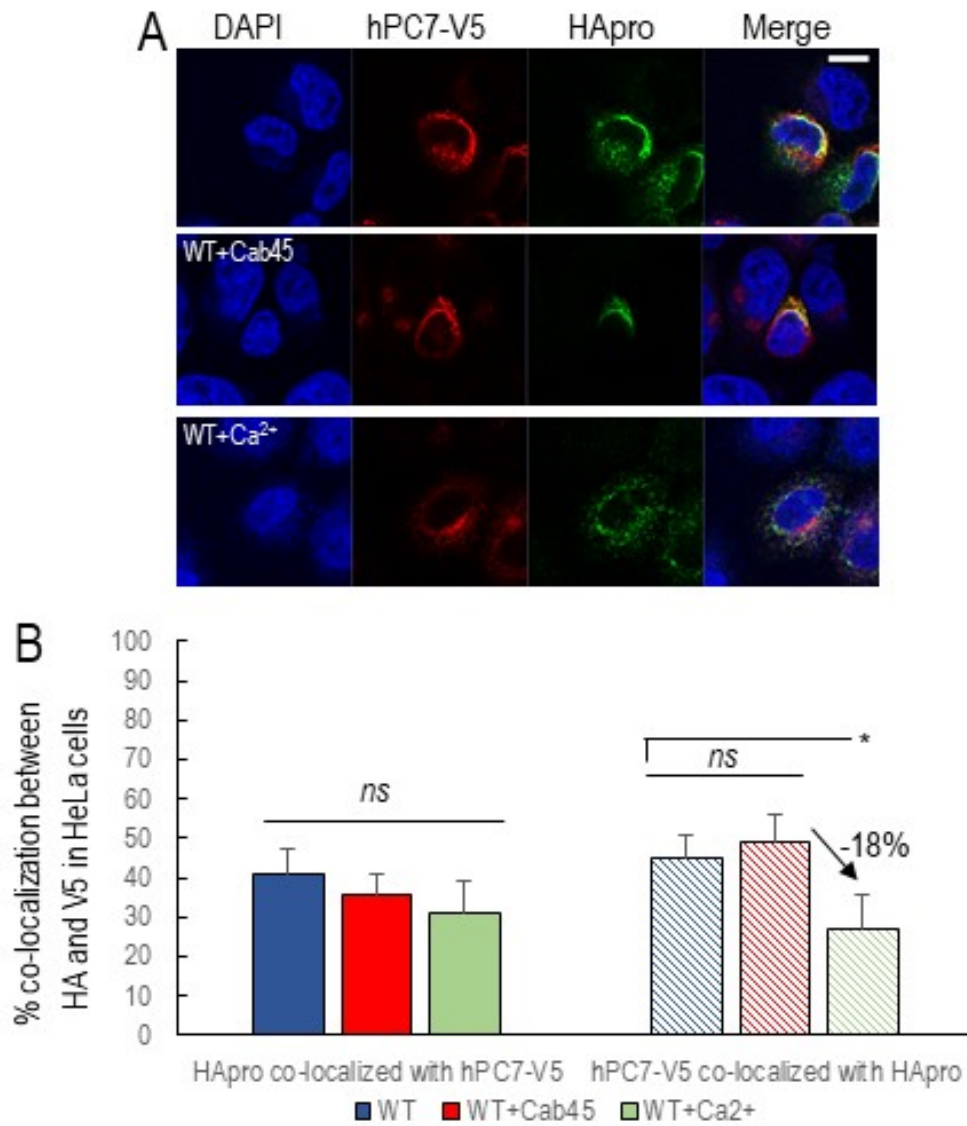


Figure 3.6



3.3.8 Figure legends

Figure 3.1. Human mature PC7 separates from its prodomain at the cell surface for its cleavage activity.

(A) Schematic representation of hPC7 with its composed domains (SP: signal peptide; Pro: prodomain; TM: transmembrane domain; CT: cytosolic tail). In N-terminal, HA-tag is represented in green and in C-terminal V5-tag is represented in red. (B) Immunofluorescence of HApro-hPC7-V5 in permeabilized cells with or without dynasore and in non-permeabilized conditions in HeLa cells. HApro is labeled in green and hPC7-V5 in red. DAPI was used to mark cell nuclei in blue. (C) Quantification of co-localization between HApro and PC7-V5 was performed with IMARIS software. These results are representative of N=15 cells, in at least two independent experiments. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). ***, $P < 0.001$, *ns*: non significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μ m.

Figure 3.2. Cab45 and PC7 localize in the same tissues.

(A) X-ray film autoradiography with frozen tissue cryostat sections following antisense hybridization and 4 days exposure. Ubiquitous pattern of Cab45 mRNA labelling is detected in most tissues. 1: thymus, 2: spleen, 3: lung, 4: aorta, 5: submaxillary gland, 6: heart, 7: kidney, 8: testis, 9: coagulating gland, 10: urinary bladder, 11: epididymis, 12: esophagus, 13: trachea, 14: thyroid gland, 15: pituitary, 16: adrenal gland, 17: ovary, 18: oviducts, 19: uterus, 20: prostate, 21: liver, 22: gallbladder, 23: brain, 24: spinal cord, 25: dorsal root ganglion, 26: pancreas, 27: stomach, 28: duodenum, 29: jejunum, 30: ileum, 31: colon. (B) Control (sense) hybridization performed in adjacent cryostat sections showing a level of non-specific labelling. Magnification x 3.2.

Figure 3.3. Cab45 regulates hPC7 cleavage activity.

(A) Overexpression of hTfR1-V5 with hPC7 in the presence or absence of human Cab45 or mouse Cab45 (B) and analysis by Western blot of cell lysates (cell) and media (med) in HEK293 cells. HTfR1-V5 cleavage by hPC7 was used as reference for normalization. These results are

representative of three independent experiments. **(C)** Overexpression of hTfR1-V5 and hPC7 with siRNA control (scramble) or with siRNA against hCab45 and analysis by Western blot of cell lysates (cell) and media (med) in HEK293 cells. HTfR1-V5 cleavage by hPC7 was used as reference for normalization. Quantification of siRNA silencing was performed by quantitative PCR. These results are representative of two independent experiments. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$ (Student's *t*-test).

Figure 3.4. Localization of hTfR1 is not impaired by Cab45.

(A) Immunofluorescence of co-localized hTfR1 (red labeling), in the presence or not of an overexpressed Cab45, with Golgin-97 marker (green labeling) or **(B)** Early Endosomal marker (EEA1) in permeabilized HeLa cells. Quantification of co-localization between hPC7-V5 and its marker was performed with IMARIS software. These results are representative of N=15 cells, in minimum two independent experiments. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: non significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μ m.

Figure 3.5. PC7 localization in the TGN is affected in the presence of Cab45.

(A) Immunofluorescence of co-localized hPC7 (red labeling), in the presence or not of an overexpressed Cab45, with Golgin-97 marker (green labeling) or **(B)** Early Endosomal marker (EEA1) in permeabilized HeLa cells. Quantification of co-localization between hPC7-V5 and its marker was performed with IMARIS software. These results are representative of N=15 cells, in minimum two independent experiments. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, $P < 0.1$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$, *ns*: non significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μ m.

Figure 3.6. Localization of HApro-hPC7-V5 at the cell surface is influenced by Cab45 and Ca²⁺.

(A) Immunofluorescence of HApro-hPC7-V5 in non-permeabilized HeLa cells with or without Cab45 or Ca²⁺ treatment. HApro is labeled in green and hPC7-V5 in red. DAPI was used to mark cell nuclei in blue. (B) Quantification of co-localization between HApro and PC7-V5. All these data were quantified with IMARIS software and are representative of N=15 cells, in minimum two independent experiments, except for Ca²⁺ treatment results are based on N=7 cells from one experiment. Error bars indicate averaged values \pm standard error of the mean (SEM). *, P < 0.1, **, P < 0.01, ***, P < 0.001, *ns*: non significant (Student's *t*-test). Bar = 1 μ m.

Chapitre 4:

Discussion et conclusion

4.1 Discussion

PC7 est le membre le plus conservé de la famille des proprotéines convertases²⁴⁹. Bien que la fonction de sheddase de PC7 soit en grande partie comprise et que sa localisation cellulaire soit connue (Trans-Golgi, endosomes et surface cellulaire) de nombreux points restent encore à élucider et beaucoup d'interrogations subsistent quant à ses fonctions physiologiques, la régulation de son transport ou encore son activation et activité de clivage^{10; 41; 47; 52; 112; 113; 146}.

4.1.1 PC7 et le métabolisme lipidique

De nombreux SNP ont mis en évidence un lien entre *PCSK7* et la régulation des triglycérides (TG). Pour rappel, le variant rs508487 est relié à la dyslipidémie²³³ qui se caractérise par une augmentation du niveau de sdLDL⁸⁹. Ce variant est également lié à un déséquilibre de la protéine ApoA5, qui dans ce cas, est associée à un niveau élevé de TG^{89; 250}. Il est possible que cette régulation soit transcriptionnelle puisque les gènes *PCSK7* et *APOA5* sont à proximité l'un de l'autre sur le chromosome 11q23 et *APOA5* appartient à un groupe de gènes impliqués dans la régulation des lipoprotéines (**Figure 1.6**). De plus des études *in vitro* renforcent l'idée que PC7 régule la voie lipidique associée à la production d'acides gras puisque plusieurs PCs (PACE4, PC5, PC7, Furine) clivent et activent l'angiopoietine 4 (ANGLTL-4)²⁵¹, protéine inhibitrice de la lipoprotéine lipase catalysant l'hydrolyse des TG. De façon très intéressante, le variant PC7 rs142953140 associé à la mutation R504H chez les américains d'origine africaine provoque une diminution de 30% du niveau des TG. Toutefois, les clivages de la sortiline et hTfR1 ne sont pas affectés par cette mutation, suggérant pour la première fois une activité non-enzymatique de cette PC. Afin de comprendre les mécanismes alliant PC7 et la régulation lipidique riche en TG, il serait intéressant de comparer le métabolisme lipidique de souris WT et KO PC7 en se penchant sur la production de TG dans le foie mais aussi les variations éventuelles de l'ensemble des lipoprotéines. Cette première expérience nous indiquerait si PC7 favorise ou non la production de TG. De plus, il a également été suggéré que PC7 était lié à la régulation d'insuline

chez les personnes obèses^{86; 90}. Pour comprendre le mécanisme impliquant PC7 dans la régulation lipidique liée à l'obésité, l'ingestion sur plusieurs semaines de diètes de type *chow* et *Western* chez les souris WT et KO PC7 permettrait de comparer les phénotypes de ces souris et d'observer l'effet activateur ou inhibiteur de PC7. Finalement, des études ont déjà montré que ApoA5 favorise la production et sécrétion de VLDL (*Very Low Dense Lipoprotein*)²⁵² promue par l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans le foie^{253; 254}. L'observation de ces gouttelettes (taille et nombre) chez les souris WT et KO PC7, selon les types de diètes, pourrait être un excellent indicateur d'accumulation de TG^{253; 254}. D'un point de vue biochimique, une surexpression de ces deux protéines nous indiquerait si ApoA5 est clivée par PC7 ou régule l'activité de clivage de PC7. Il est possible que cette interaction ne soit pas enzymatique ainsi, une co-immunoprécipitation entre PC7 et ApoA5 pourrait valider ou réfuter cette interaction protéique.

4.1.2 La duplication de PCSK7 et son effet sur VEGFR-2

Une étude récente a montré que la duplication ou délétion génétique de *PCSK7* était associée à une maladie rare congénitale du cœur, la RVPAT²³⁴. L'analyse de prédictions d'interactions génétiques et protéiques de la base de données STRING (Cf 1.2.3 **Étude d'association pangénomique (GWAS) et découverte de nouvelles associations avec *PCSK7***) suggère que PC7 est critique pour l'activation de VEGFR-2. Or, VEGFR-2 est le récepteur associé au ligand VEGF-C²⁵⁵ qui semble être clivé par PC7, Furine et PC5. Cependant, aucune étude n'indique actuellement si son récepteur est aussi un substrat des PCs. Afin de vérifier s'il existe un lien direct entre VEGFR-2 et PC7, une co-transfection de ces deux protéines permettrait de valider un clivage de ce récepteur par PC7. En effet, de nombreux sites de reconnaissance de clivage potentiels, conservés chez le rat et la souris, sont présents dans la séquence protéique de VEGFR-2 humain parmi lesquels : **RGQR**₅₇; **RYPEKR**₁₇₁; **KKLVNR**₂₇₅; **KKNSTFVR**₃₂₃; **KVGR**₅₃₈. PC7 pourrait ainsi à la fois cliver le ligand et son récepteur pour favoriser la prolifération et migration cellulaire.

4.1.3 D'autres motifs potentiels dans la CT de PC7

Actuellement, PC7 est connue pour localiser à la surface cellulaire, dans le TGN et les endosomes. Plus précisément, PC7 est présente à la fois dans les endosomes précoces, tardifs et de recyclage. Ces différentes localisations sont régulées par des motifs présents dans la CT de PC7. Ainsi, le motif ExExxxL, reconnu par AP-2, amène PC7 dans les endosomes précoces. Le motif basique (HRSRKAK₇₁₄) couplé aux deux cystéines (C_{699,704}) favorise le transport rétrograde des endosomes tardifs au TGN. Enfin, le transport de PC7 entre le TGN et la surface cellulaire pourrait, être régulé par Cab45. Cependant, le trafic entre les endosomes de recyclages et le TGN reste méconnu et aucune analyse quantitative de PC7 dans les différents endosomes n'a été effectuée. Un certain nombre d'expériences permettraient de mieux caractériser le trafic cellulaire de PC7 et d'identifier de nouveaux partenaires. Ainsi, une immunocytochimie de PC7 avec les marqueurs des différents compartiments endosomaux (Rab7, Rab9, Rab11) nous indiquerait les préférences de localisation de PC7 et ainsi de mieux cerner son trafic cellulaire. De plus, la technique de Bio-ID²⁵⁶ permettrait d'obtenir une liste potentielle de nouveaux partenaires se liant à la CT de PC7. Finalement, l'utilisation d'un mutant du motif basique hPC7 en alanine (HAAAAAA₇₁₄) couplé à cette technique révélerait le(s) partenaire(s) possible(s) régulant le transport rétrograde *via* ce motif.

Il est possible que certains motifs dans la CT de PC7 n'aient pas encore été mis en évidence. En effet, si on regarde de plus près la séquence protéique, deux motifs di-leucine (LL₇₄₈APDLL₇₅₃)⁴⁵ sont présents chez l'humain et intégralement conservés chez le rat. Cette conservation entre les deux espèces suggère que ces motifs sont critiques à la régulation de PC7. Pour comprendre leur importance, une future étude pourrait muter l'ensemble de ces quatre leucines et d'observer l'impact du clivage de PC7 sur ses substrats ainsi qu'une potentielle relocalisation de l'enzyme par immunocytochimie. En effet, les motifs di-leucine sont reconnus par les protéines GGA et ces protéines pourraient favoriser le transport de PC7 du TGN aux endosomes à la suite du recyclage de PC7 au TGN²⁵⁷.

4.1.4 Des modifications post-traductionnelles encore incomprises

Lors de son passage dans la voie sécrétoire conventionnelle, PC7 est modifiée post-traduction. Parmi ces modifications, deux résidus cystéines palmitoylés dans la CT de PC7 semble être liés au motif basique afin de favoriser la localisation de PC7 dans le TGN sans pour autant être essentiels à ce transport¹¹². Actuellement, la séparation du pro-domaine de PC7 ainsi que l'activation de l'enzyme sont encore des mécanismes inconnus, mais ces deux cystéines sont physiquement proches du domaine transmembranaire (10 aa en aval du TM) et il est possible qu'elles servent de support d'ancrage à la membrane pour favoriser la localisation de PC7 dans les microdomaines de la membrane plasmique²⁵⁸ et ainsi activer la séparation du pro-segment à la surface cellulaire. Cette hypothèse devra toutefois être confirmée, par exemple par localisation immunocytochimie du pro-domaine (HApro) et de PC7 mature (hPC7-V5) en mutant les cystéines.

Présentement, aucune étude n'a mis en évidence la phosphorylation de PC7⁴⁵. Cependant, quatre sites motifs SXE reconnus par la kinase Fam20C²⁴⁶, sont présents aux positions S₆₀, S₂₆₈, S₅₀₅, S₅₄₁. L'ensemble de ces quatre motifs SXE sont conservés chez l'humain, le rat et la souris. De plus, fait intéressant, le site S₆₀ localise dans le pro-domaine au niveau du motif potentiel de liaison au calcium (Cf **3.3.4 Discussion**). Le résidu S₅₀₅ est, quant à lui, adjacent au résidu R504⁸² et, puisque le variant R504H est associé à une diminution des TG, pourrait influencer régulation du niveau des TG²³². Une surexpression de Fam20C, dans des cellules HEK293 dépourvue de Fam20C endogène, avec la protéine PC7 de type sauvage ou mutée sur chacune de ces quatre serines validerait ces sites potentiels de phosphorylation.

4.1.5 La voie non conventionnelle

En plus d'utiliser la voie sécrétoire conventionnelle, PC7 peut atteindre la surface cellulaire en utilisant une voie non conventionnelle directement du RE à la membrane plasmique en 10 minutes⁴¹. Le domaine transmembranaire de PC7 est essentiel à ce cheminement puisque

l'inversion des TM de PC7 et de la Furine bloque PC7 dans le RE tandis que la Furine emprunte ce chemin. Comme énoncé dans l'introduction (Cf **1.2.5.3 Les modifications post-traductionnelles de PC7**) il serait intéressant de muter les aa non identiques entre les deux TM (Trp₆₇₈, Tyr₆₈₁, Tyr₆₈₂, Tyr₆₈₇ et Glu₆₈₅), chez PC7 et d'observer un blocage éventuel de PC7 dans le RE⁴¹.

Il existe actuellement plusieurs mécanismes de transport par la voie non conventionnelle. Un premier mécanisme correspond à la fusion du RE directement avec la membrane plasmique afin de relocaliser les protéines à la membrane ou de les larguer dans le milieu extracellulaire. Ce mécanisme est connu chez la plante, mais aussi chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour le trafic de la protéine Ist2 (*increased sodium tolerance*)²⁵⁹. Dans ce cas, deux modèles ont été développés. Le premier suggère que cette protéine est présente dans des vésicules bourgeonnant et fusionnant avec la membrane plasmique. Le second propose l'intervention d'un lipide auprès d'Ist2 et de la membrane plasmique afin de déstabiliser cette dernière et faciliter une interaction avec un motif de reconnaissance d'Ist2²⁶⁰.

D'autres modèles ont été découverts tel que transport de la protéine FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) recrutée à la membrane plasmique dépendamment de l'HSPG²⁶¹ ou encore l'autophagie qui favorise la fusion du RE avec la membrane plasmique afin de relarguer son contenu à l'extérieur de la cellule^{261; 262}. En cas d'inflammation, la protéine IL-2 utilise la voie non conventionnelle caractérisée par la formation d'un autophagosome, lui permettant ainsi d'agir rapidement²⁶⁰. Il est possible que PC7 utilise ce système pour arriver à la surface en 10 minutes afin de répondre à une réponse immunitaire. Toutefois, bien que PC7 soit en lien avec l'inflammation par sa fonction de sheddase (Cf **1.2.6.1 L'inflammation et la neurogénèse**), rien n'indique actuellement que son action passe par la voie non conventionnelle.

La voie conventionnelle est généralement utilisée en raison d'un stress dans le RE ou d'un mauvais repliement protéique. C'est le cas pour la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)²⁶³ qui, lorsqu'elle est mutée au site F508, est relocalisée dans la voie non conventionnelle par la protéine GRASP55 (*Golgi reassembly stacking proteins*) préalablement recrutée par un stress au RE, afin d'être sécrétée^{264; 265}.

L'ensemble de ces possibilités devront être prises en considération pour investiguer le mécanisme de régulation du transport de PC7 par la voie non conventionnelle. Par exemple, l'observation du trafic de PC7 lors d'une surexpression de de la protéine GRASP55 couplée à un traitement à la BFA qui bloque l'entrée des protéines dans la voie conventionnelle (fusion de RE avec les régions *Cis* et *médial* de l'appareil de Golgi) nous indiquera si cette protéine favorise la présence de PC7 à la membrane *via* l'utilisation de cette voie atypique. Finalement, beaucoup d'interrogations subsistent sur cette voie puisque nous ne savons pas si PC7 peut se séparer de son pro-segment et être actif lorsqu'il atteint la membrane par la voie non conventionnelle. En effet, cette protéine dépourvue de MPT dans cette voie peut-elle exercer une fonction de sheddase ou intervient-elle uniquement en tant que protéine de liaison? Une étude, *in vitro*, a montré qu'il existe deux isoformes de PC7 à partir des méthionines aux positions 1 et 36 de la protéine. Toutefois, la préférence des isoformes pour la voie non conventionnelle et la voie sécrétoire n'a pas été déterminée. Une localisation par immunocytochimie de ces deux protéines (en mutant l'une ou l'autre de ces méthionines), couplée à un traitement à la BFA serait une expérience préliminaire pour comprendre la fonction de ces deux protéines dans la voie non conventionnelle⁴⁵.

4.1.6 PC7, un potentiel candidat comme cible thérapeutique

Le clivage de précurseurs par les PCs engendre leur activation. Cette activité est détournée par certains virus pour leur réplication (gp160 pour le VIH)¹²¹ ou contribue au développement de cancer (VEGF et la migration cellulaire)¹³⁶. Ainsi, les PCs représentent une excellente cible thérapeutique pour ces maladies et infections. Il est/serait possible de développer des inhibiteurs, composés de résidus basiques afin de cibler le site actif des PCs, pour compétitionner avec les substrats des PCs et ainsi bloquer l'activité de protéase de ces dernières^{266; 267}. Cependant, la redondance entre ces enzymes et leur reconnaissance de sites de clivage identique rend développement d'inhibiteurs efficaces et spécifiques très complexe. De plus, l'activité de ce type d'inhibiteur devra être tissu-spécifique. Actuellement, il existe déjà des inhibiteurs de PCs (Cf 1.1.2.5 Rôle physiologique et physiopathologique des PCs), cependant, de ceci n'a encore

été élaboré pour PC7 qui reste tout de même une excellente cible thérapeutique puisqu'il permettrait de traiter à la fois des troubles du métabolisme lipidique et l'anxiété.

4.2 Conclusion

En conclusion, les résultats obtenus lors de mon doctorat ont permis d'approfondir la biologie cellulaire de PC7. Mon premier objectif était de comprendre l'importance de la queue cytosolique de PC7 dans la régulation de son transport et de son activité de clivage en découvrant de nouveaux motifs présents dans la CT. Mes résultats ont mis en évidence que chez l'humain, un motif ExExxxL₇₂₅ présent dans la CT de PC7, régule l'activité de clivage et le trafic endosomal de PC7. La découverte du motif intégré ExExxxL₇₂₅ nous a amené vers le deuxième objectif qui était d'identifier des partenaires protéiques impliqués dans le transport et l'activité de sheddase de PC7. La protéine adaptatrice AP-2 reconnaît le motif ExExxxL₇₂₅, et régule la localisation endosomale de PC7 et subséquemment favorise l'activité de protéase de PC7 dans les endosomes. Finalement le dernier objectif était de comprendre où et comment PC7 se sépare de son pro-segment. Des résultats préliminaires suggèrent que cette séparation s'effectue à la surface cellulaire. Une protéine calcium dépendante, Cab45, ayant une localisation tissulaire similaire à PC7, ainsi que le calcium semblent être impliqués dans cette régulation. L'ensemble de ces résultats ont ainsi permis d'approfondir la biologie cellulaire de PC7 et d'en démystifier certains aspects.

Bibliographie

1. Khoury, G.A., Baliban, R.C., and Floudas, C.A. (2011). Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Scientific reports* 1.
2. Ponomarenko, E.A., Poverennaya, E.V., Ilgisonis, E.V., Pyatnitskiy, M.A., Kopylov, A.T., Zgoda, V.G., Lisitsa, A.V., and Archakov, A.I. (2016). The Size of the Human Proteome: The Width and Depth. *Int J Anal Chem* 2016, 7436849.
3. Zhou, A., Webb, G., Zhu, X., and Steiner, D.F. (1999). Proteolytic processing in the secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 274, 20745-20748.
4. Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet* 4, 544-558.
5. Lopez-Otin, C., and Bond, J.S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *The Journal of biological chemistry* 283, 30433-30437.
6. Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290 (Pt 1), 205-218.
7. Puente, X.S., Gutierrez-Fernandez, A., Ordonez, G.R., Hillier, L.W., and Lopez-Otin, C. (2005). Comparative genomic analysis of human and chimpanzee proteases. *Genomics* 86, 638-647.
8. Rogers, L.D., and Overall, C.M. (2013). Proteolytic post-translational modification of proteins: proteomic tools and methodology. *Mol Cell Proteomics* 12, 3532-3542.
9. Badgujar, R.T.M.a.S.B. (2010). Biological aspects of proteolytic enzymes: A Review. *Journal of Pharmacy Research* 3, 2048-2068.
10. Seidah, N.G., and Prat, A. (2012). The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov* 11, 367-383.
11. Khokha, R., Murthy, A., and Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology* 13, 649.
12. Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29, 258-289.
13. Verma, S., Dixit, R., and Pandey, K.C. (2016). Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. *Front Pharmacol* 7, 107.

14. Miller, D.K. (1997). The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 9, 35-49.
15. Klein, T., Eckhard, U., Dufour, A., Solis, N., and Overall, C.M. (2018). Proteolytic Cleavage-Mechanisms, Function, and "Omic" Approaches for a Near-Ubiquitous Posttranslational Modification. *Chem Rev* 118, 1137-1168.
16. Tang, J., and Wong, R.N. (1987). Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem* 33, 53-63.
17. Siezen, R.J., and Leunissen, J.A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci* 6, 501-523.
18. Seidah, N.G., and Chretien, M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 848, 45-62.
19. Carter, P., and Wells, J.A. (1988). Dissecting the catalytic triad of a serine protease. *Nature* 332, 564-568.
20. Seidah, N.G., Chretien, M., and Day, R. (1994). The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* 76, 197-209.
21. Fuller, R.S., Brake, A.J., and Thorner, J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* 246, 482-486.
22. Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., and Chretien, M. (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol* 9, 415-424.
23. Abifadel, M., Varret, M., Rabes, 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, 154-156.
24. Hatsuzawa, K., Murakami, K., and Nakayama, K. (1992). Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem* 111, 296-301.
25. Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6, 1355-1364.

26. Pasquato, A., Pullikotil, P., Asselin, M.C., Vacatello, M., Paolillo, L., Ghezzi, F., Basso, F., Di Bello, C., Dettin, M., and Seidah, N.G. (2006). The proprotein convertase SKI-1/S1P. In vitro analysis of Lassa virus glycoprotein-derived substrates and ex vivo validation of irreversible peptide inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 281, 23471-23481.
27. Marschner, K., Kollmann, K., Schweizer, M., Braulke, T., and Pohl, S. (2011). A key enzyme in the biogenesis of lysosomes is a protease that regulates cholesterol metabolism. *Science* 333, 87-90.
28. Benjannet, S., Rhoads, 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. *The Journal of biological chemistry* 279, 48865-48875.
29. Seidah, N.G., and Prat, A. (2007). The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med (Berl)* 85, 685-696.
30. 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, 413-419.
31. 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., et al. (2003). Functional characterization of Narc 1, a novel proteinase related to proteinase K. *Arch Biochem Biophys* 420, 55-67.
32. Nguyen, T.H., Law, D.T., and Williams, D.B. (1991). Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1565-1569.
33. Creemers, J.W., van de Loo, J.W., Plets, E., Hendershot, L.M., and Van De Ven, W.J. (2000). Binding of BiP to the processing enzyme lymphoma proprotein convertase prevents aggregation, but slows down maturation. *The Journal of biological chemistry* 275, 38842-38847.
34. Vey, M., Schafer, W., Berghofer, S., Klenk, H.D., and Garten, W. (1994). Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol* 127, 1829-1842.

35. Paquet, L., Bergeron, F., Boudreault, A., Seidah, N.G., Chretien, M., Mbikay, M., and Lazure, C. (1994). The neuroendocrine precursor 7B2 is a sulfated protein proteolytically processed by a ubiquitous furin-like convertase. *The Journal of biological chemistry* 269, 19279-19285.
36. Benjannet, S., Savaria, D., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1995). 7B2 is a specific intracellular binding protein of the prohormone convertase PC2. *J Neurochem* 64, 2303-2311.
37. Rouille, Y., Duguay, S.J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A.A., Jr., Chan, S.J., and Steiner, D.F. (1995). Proteolytic processing mechanisms in the biosynthesis of neuroendocrine peptides: the subtilisin-like proprotein convertases. *Front Neuroendocrinol* 16, 322-361.
38. 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, 1111-1125.
39. Mayer, G., Hamelin, J., Asselin, M.C., Pasquato, A., Marcinkiewicz, E., Tang, M., Tabibzadeh, S., and Seidah, N.G. (2008). The regulated cell surface zymogen activation of the proprotein convertase PC5A directs the processing of its secretory substrates. *The Journal of biological chemistry* 283, 2373-2384.
40. Burri, D.J., Pasqual, G., Rochat, C., Seidah, N.G., Pasquato, A., and Kunz, S. (2012). Molecular characterization of the processing of arenavirus envelope glycoprotein precursors by subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease. *J Virol* 86, 4935-4946.
41. Rousselet, E., Benjannet, S., Hamelin, J., Canuel, M., and Seidah, N.G. (2011). The proprotein convertase PC7: unique zymogen activation and trafficking pathways. *The Journal of biological chemistry* 286, 2728-2738.
42. Gyamera-Acheampong, C., Sirois, F., Denis, N.J., Mishra, P., Figeys, D., Basak, A., and Mbikay, M. (2011). The precursor to the germ cell-specific PCSK4 proteinase is inefficiently activated in transfected somatic cells: evidence of interaction with the BiP chaperone. *Mol Cell Biochem* 348, 43-52.
43. Thomas, G. (2002). Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766.
44. Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M., and Day, R. (1996). cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3388-3393.

45. van de Loo, J.W., Creemers, J.W., Bright, N.A., Young, B.D., Roebroek, A.J., and Van de Ven, W.J. (1997). Biosynthesis, distinct post-translational modifications, and functional characterization of lymphoma proprotein convertase. *The Journal of biological chemistry* 272, 27116-27123.
46. Pullikotil, P., Benjannet, S., Mayne, J., and Seidah, N.G. (2007). The proprotein convertase SKI-1/S1P: alternate translation and subcellular localization. *The Journal of biological chemistry* 282, 27402-27413.
47. Wetsel, W.C., Rodriguiz, R.M., Guillemot, J., Rousselet, E., Essalmani, R., Kim, I.H., Bryant, J.C., Marcinkiewicz, J., Desjardins, R., Day, R., et al. (2013). Disruption of the expression of the proprotein convertase PC7 reduces BDNF production and affects learning and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17362-17367.
48. Munck Petersen, C., Nielsen, M.S., Jacobsen, C., Tauris, J., Jacobsen, L., Gliemann, J., Moestrup, S.K., and Madsen, P. (1999). Propeptide cleavage conditions sortilin/neurotensin receptor-3 for ligand binding. *EMBO J* 18, 595-604.
49. Guillemot, J., Essalmani, R., Hamelin, J., and Seidah, N.G. (2014). Is there a link between proprotein convertase PC7 activity and human lipid homeostasis? *FEBS Open Bio* 4, 741-745.
50. Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G., and Murphy, R.A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *The Journal of biological chemistry* 276, 12660-12666.
51. Seidah, N.G., Sadr, M.S., Chretien, M., and Mbikay, M. (2013). The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *The Journal of biological chemistry* 288, 21473-21481.
52. Guillemot, J., Canuel, M., Essalmani, R., Prat, A., and Seidah, N.G. (2013). Implication of the proprotein convertases in iron homeostasis: proprotein convertase 7 sheds human transferrin receptor 1 and furin activates hepcidin. *Hepatology* 57, 2514-2524.
53. Saavedra, Y.G., Day, R., and Seidah, N.G. (2012). 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. *The Journal of biological chemistry* 287, 43492-43501.
54. Scamuffa, N., Calvo, F., Chretien, M., Seidah, N.G., and Khatib, A.M. (2006). Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J* 20, 1954-1963.

55. Farooqi, I.S., Volders, K., Stanhope, R., Heuschkel, R., White, A., Lank, E., Keogh, J., O'Rahilly, S., and Creemers, J.W. (2007). Hyperphagia and early-onset obesity due to a novel homozygous missense mutation in prohormone convertase 1/3. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 3369-3373.
56. Zhu, X., Zhou, A., Dey, A., Norrbom, C., Carroll, R., Zhang, C., Laurent, V., Lindberg, I., Ugleholdt, R., Holst, J.J., et al. (2002). Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10293-10298.
57. Rouille, Y., Westermark, G., Martin, S.K., and Steiner, D.F. (1994). Proglucagon is processed to glucagon by prohormone convertase PC2 in alpha TC1-6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3242-3246.
58. Peinado, J.R., Laurent, V., Lee, S.N., Peng, B.W., Pintar, J.E., Steiner, D.F., and Lindberg, I. (2005). Strain-dependent influences on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis profoundly affect the 7B2 and PC2 null phenotypes. *Endocrinology* 146, 3438-3444.
59. Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J., and Constam, D.B. (1998). Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 125, 4863-4876.
60. Constam, D.B., and Robertson, E.J. (2000). SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev* 14, 1146-1155.
61. Susan-Resiga, D., Essalmani, R., Hamelin, J., Asselin, M.C., Benjannet, S., Chamberland, A., Day, R., Szumska, D., Constam, D., Bhattacharya, S., et al. (2011). Furin is the major processing enzyme of the cardiac-specific growth factor bone morphogenetic protein 10. *The Journal of biological chemistry* 286, 22785-22794.
62. Essalmani, R., Zaid, A., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Pasquato, A., Seidah, N.G., and Prat, A. (2008). In vivo functions of the proprotein convertase PC5/6 during mouse development: Gdf11 is a likely substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5750-5755.
63. Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C.P., De Lamirande, E., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N.G., Chretien, M., et al. (1997). Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6842-6846.
64. Benjannet, S., Hamelin, J., Chretien, 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. *The Journal of biological chemistry* 287, 33745-33755.

65. 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, 349-353.
66. Demidyuk, I.V., Shubin, A.V., Gasanov, E.V., Kurinov, A.M., Demkin, V.V., Vinogradova, T.V., Zinovyeva, M.V., Sass, A.V., Zborovskaya, I.B., and Kostrov, S.V. (2013). Alterations in gene expression of proprotein convertases in human lung cancer have a limited number of scenarios. *PLoS One* 8, e55752.
67. Senzer, N., Barve, M., Kuhn, J., Melnyk, A., Beitsch, P., Lazar, M., Lifshitz, S., Magee, M., Oh, J., Mill, S.W., et al. (2012). Phase I trial of "bi-shRNAi(furin)/GMCSF DNA/autologous tumor cell" vaccine (FANG) in advanced cancer. *Mol Ther* 20, 679-686.
68. Ozden, S., Lucas-Hourani, M., Ceccaldi, P.E., Basak, A., Valentine, M., Benjannet, S., Hamelin, J., Jacob, Y., Mamchaoui, K., Mouly, V., et al. (2008). Inhibition of Chikungunya virus infection in cultured human muscle cells by furin inhibitors: impairment of the maturation of the E2 surface glycoprotein. *The Journal of biological chemistry* 283, 21899-21908.
69. Olmstead, A.D., Knecht, W., Lazarov, I., Dixit, S.B., and Jean, F. (2012). Human subtilase SKI-1/S1P is a master regulator of the HCV lifecycle and a potential host cell target for developing indirect-acting antiviral agents. *PLoS Pathog* 8, e1002468.
70. Gorski, J.P., Huffman, N.T., Vallejo, J., Brotto, L., Chittur, S.V., Breggia, A., Stern, A., Huang, J., Mo, C., Seidah, N.G., et al. (2016). Deletion of Mbtps1 (Pcsk8, S1p, Ski-1) Gene in Osteocytes Stimulates Soleus Muscle Regeneration and Increased Size and Contractile Force with Age. *The Journal of biological chemistry* 291, 4308-4322.
71. Seidah, N.G., Abifadel, M., Prost, S., Boileau, C., and Prat, A. (2017). The Proprotein Convertases in Hypercholesterolemia and Cardiovascular Diseases: Emphasis on Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9. *Pharmacol Rev* 69, 33-52.
72. Sabatine, M.S., Giugliano, R.P., Wiviott, S.D., Raal, F.J., Blom, D.J., Robinson, J., Ballantyne, C.M., Somaratne, R., Legg, J., Wasserman, S.M., et al. (2015). Efficacy and safety of evolocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med* 372, 1500-1509.
73. Robinson, J.G., Farnier, M., Krempf, M., Bergeron, J., Luc, G., Averna, M., Stroes, E.S., Langslet, G., Raal, F.J., El Shahawy, M., et al. (2015). Efficacy and safety of alirocumab in reducing lipids and cardiovascular events. *N Engl J Med* 372, 1489-1499.

74. Essalmani, R., Weider, E., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Susan-Resiga, D., Roubtsova, A., Seidah, N.G., and Prat, A. (2018). A single domain antibody against the Cys- and His-rich domain of PCSK9 and evolocumab exhibit different inhibition mechanisms in humanized PCSK9 mice. *Biol Chem* 399, 1363-1374.
75. Weider, E., Susan-Resiga, D., Essalmani, R., Hamelin, J., Asselin, M.C., Nimesh, S., Ashraf, Y., Wycoff, K.L., Zhang, J., Prat, A., et al. (2016). Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) Single Domain Antibodies Are Potent Inhibitors of Low Density Lipoprotein Receptor Degradation. *The Journal of biological chemistry* 291, 16659-16671.
76. Weider, E., Susan-Resiga, D., Essalmani, R., Hamelin, J., Asselin, M.C., Nimesh, S., Ashraf, Y., Wycoff, K.L., Zhang, J., Prat, A., et al. (2016). Proprotein convertase subtilisin/Kexin type 9 (PCSK9) single domain antibodies are potent inhibitors of low density lipoprotein receptor degradation. *The Journal of biological chemistry* 291, 26586.
77. Meerabux, J., Yaspo, M.L., Roebroek, A.J., Van de Ven, W.J., Lister, T.A., and Young, B.D. (1996). A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res* 56, 448-451.
78. Bruzzaniti, A., Goodge, K., Jay, P., Taviaux, S.A., Lam, M.H., Berta, P., Martin, T.J., Moseley, J.M., and Gillespie, M.T. (1996). PC8 [corrected], a new member of the convertase family. *Biochem J* 314 (Pt 3), 727-731.
79. Constam, D.B., Calfon, M., and Robertson, E.J. (1996). SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J Cell Biol* 134, 181-191.
80. Bae, J.A., Park, H.J., Seo, Y.M., Roh, J., Hsueh, A.J., and Chun, S.Y. (2008). Hormonal regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 expression during ovarian follicle development in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 289, 29-37.
81. Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Hendy, G.N., Benjannet, S., Chretien, M., et al. (1997). In vitro characterization of the novel proprotein convertase PC7. *The Journal of biological chemistry* 272, 19672-19681.
82. Peloso, G.M., Auer, P.L., Bis, J.C., Voorman, A., Morrison, A.C., Stitzel, N.O., Brody, J.A., Khetarpal, S.A., Crosby, J.R., Fornage, M., et al. (2014). Association of low-frequency and rare coding-sequence variants with blood lipids and coronary heart disease in 56,000 whites and blacks. *Am J Hum Genet* 94, 223-232.

83. Lecointe, N., Meerabux, J., Ebihara, M., Hill, A., and Young, B.D. (1999). Molecular analysis of an unstable genomic region at chromosome band 11q23 reveals a disruption of the gene encoding the alpha2 subunit of platelet-activating factor acetylhydrolase (Pafah1a2) in human lymphoma. *Oncogene* 18, 2852-2859.
84. Goodge, K.A., Thomas, R.J., Martin, T.J., and Gillespie, M.T. (1998). Gene organization and alternative splicing of human prohormone convertase PC8. *Biochem J* 336 (Pt 2), 353-359.
85. Oexle, K., Ried, J.S., Hicks, A.A., Tanaka, T., Hayward, C., Bruegel, M., Gogele, M., Lichtner, P., Muller-Myhsok, B., Doring, A., et al. (2011). Novel association to the proprotein convertase PCSK7 gene locus revealed by analysing soluble transferrin receptor (sTfR) levels. *Hum Mol Genet* 20, 1042-1047.
86. Huang, T., Huang, J., Qi, Q., Li, Y., Bray, G.A., Rood, J., Sacks, F.M., and Qi, L. (2015). PCSK7 genotype modifies effect of a weight-loss diet on 2-year changes of insulin resistance: the POUNDS LOST trial. *Diabetes Care* 38, 439-444.
87. Stickel, F., Buch, S., Zoller, H., Hultcrantz, R., Gallati, S., Osterreicher, C., Finkenstedt, A., Stadlmayr, A., Aigner, E., Sahinbegovic, E., et al. (2014). Evaluation of genome-wide loci of iron metabolism in hereditary hemochromatosis identifies PCSK7 as a host risk factor of liver cirrhosis. *Hum Mol Genet* 23, 3883-3890.
88. Pelucchi, S., Galimberti, S., Greni, F., Rametta, R., Mariani, R., Pelloni, I., Girelli, D., Busti, F., Ravasi, G., Valsecchi, M.G., et al. (2016). Proprotein convertase 7 rs236918 associated with liver fibrosis in Italian patients with HFE-related hemochromatosis. *J Gastroenterol Hepatol* 31, 1342-1348.
89. Hoogeveen, R.C., Gaubatz, J.W., Sun, W., Dodge, R.C., Crosby, J.R., Jiang, J., Couper, D., Virani, S.S., Kathiresan, S., Boerwinkle, E., et al. (2014). Small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 1069-1077.
90. Shin, K., Pandey, A., Liu, X.Q., Anini, Y., and Rainey, J.K. (2013). Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity. *FEBS Open Bio* 3, 328-333.
91. Gombojav, B., Lee, S.J., Kho, M., Song, Y.M., Lee, K., and Sung, J. (2016). Multiple susceptibility loci at chromosome 11q23.3 are associated with plasma triglyceride in East Asians. *J Lipid Res* 57, 318-324.

92. Reaven, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.
93. Kurano, M., Tsukamoto, K., Kamitsuji, S., Kamatani, N., Hara, M., Ishikawa, T., Kim, B.J., Moon, S., Jin Kim, Y., and Teramoto, T. (2016). Genome-wide association study of serum lipids confirms previously reported associations as well as new associations of common SNPs within PCSK7 gene with triglyceride. *J Hum Genet* 61, 427-433.
94. Hirayama, S., and Miida, T. (2012). Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 414, 215-224.
95. Turpeinen, H., Oksanen, A., Kivinen, V., Kukkurainen, S., Uusimaki, A., Ramet, M., Parikka, M., Hytonen, V.P., Nykter, M., and Pesu, M. (2013). Proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (PCSK7) is essential for the zebrafish development and bioavailability of transforming growth factor beta1a (TGFbeta1a). *The Journal of biological chemistry* 288, 36610-36623.
96. Jena, N., Martin-Seisdedos, C., McCue, P., and Croce, C.M. (1997). BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res* 230, 28-37.
97. Dubois, C.M., Blanchette, F., Laprise, M.H., Leduc, R., Grondin, F., and Seidah, N.G. (2001). Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* 158, 305-316.
98. Senturker, S., Thomas, J.T., Mateshaytis, J., and Moos, M., Jr. (2012). A homolog of Subtilisin-like Proprotein Convertase 7 is essential to anterior neural development in *Xenopus*. *PLoS One* 7, e39380.
99. Govindarajan, A., Rao, B.S., Nair, D., Trinh, M., Mawjee, N., Tonegawa, S., and Chattarji, S. (2006). Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13208-13213.
100. Pardon, M.C. (2010). Role of neurotrophic factors in behavioral processes: implications for the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders. *Vitam Horm* 82, 185-200.
101. Anyetee-Anum, E.N., Blum, A., Seidah, N.G., and Beinfeld, M.C. (2017). Prohormone convertase 7 is necessary for the normal processing of cholecystokinin in mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 482, 1190-1193.
102. Weller, A., Tsitlovskya, L., Gispan, I.H., and Rabinovitz, S. (2001). Examining the role of cholecystokinin in appetitive learning in the infant rat. *Peptides* 22, 1317-1323.

103. Lofberg, C., Agren, H., Harro, J., and Oreland, L. (1998). Cholecystokinin in CSF from depressed patients: possible relations to severity of depression and suicidal behaviour. *Eur Neuropsychopharmacol* 8, 153-157.
104. Zhong, M., Munzer, J.S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S.J., Decroly, E., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1999). The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. In vitro and ex vivo assessment of their efficacy and selectivity. *The Journal of biological chemistry* 274, 33913-33920.
105. Salvas, A., Benjannet, S., Reudelhuber, T.L., Chretien, M., and Seidah, N.G. (2005). Evidence for proprotein convertase activity in the endoplasmic reticulum/early Golgi. *FEBS Lett* 579, 5621-5625.
106. Creemers, J.W., Vey, M., Schafer, W., Ayoubi, T.A., Roebroek, A.J., Klenk, H.D., Garten, W., and Van de Ven, W.J. (1995). Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 270, 2695-2702.
107. Powner, D., and Davey, J. (1998). Activation of the kexin from *Schizosaccharomyces pombe* requires internal cleavage of its initially cleaved prosequence. *Mol Cell Biol* 18, 400-408.
108. Bhattacharjya, S., Xu, P., Zhong, M., Chretien, M., Seidah, N.G., and Ni, F. (2000). Inhibitory activity and structural characterization of a C-terminal peptide fragment derived from the prosegment of the proprotein convertase PC7. *Biochemistry* 39, 2868-2877.
109. Anderson, E.D., VanSlyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F., and Thomas, G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* 16, 1508-1518.
110. Fricker, L.D. (1988). Carboxypeptidase E. *Annu Rev Physiol* 50, 309-321.
111. van de Loo, J.W., Teuchert, M., Pauli, I., Plets, E., Van de Ven, W.J., and Creemers, J.W. (2000). Dynamic palmitoylation of lymphoma proprotein convertase prolongs its half-life, but is not essential for trans-Golgi network localization. *Biochem J* 352 Pt 3, 827-833.
112. Declercq, J., Ramos-Molina, B., Sannerud, R., Brouwers, B., Pruniau, V., Meulemans, S., Plets, E., Annaert, W., and Creemers, J.W.M. (2017). Endosome to trans-Golgi network transport of Proprotein Convertase 7 is mediated by a cluster of basic amino acids and palmitoylated cysteines. *Eur J Cell Biol* 96, 432-439.

113. Rousselet, E., Benjannet, S., Marcinkiewicz, E., Asselin, M.C., Lazure, C., and Seidah, N.G. (2011). Proprotein convertase PC7 enhances the activation of the EGF receptor pathway through processing of the EGF precursor. *The Journal of biological chemistry* 286, 9185-9195.
114. Sergeeva, O.A., and van der Goot, F.G. (2019). Anthrax toxin requires ZDHHC5-mediated palmitoylation of its surface-processing host enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 1279-1288.
115. Grisel, L.S.Y. (2013). Étude de la structure fonction du prosegment et du domaine CHR1 de la PCSK9 humaine. Université de Montréal.
116. Lu, W., Chen, S., Yu, J., Behrens, R., Wiggins, J., Sherer, N., Liu, S.L., Xiong, Y., Xiang, S.H., and Wu, L. (2019). The Polar Region of the HIV-1 Envelope Protein Determines Viral Fusion and Infectivity by Stabilizing the gp120-gp41 Association. *J Virol* 93.
117. Decroly, E., Wouters, S., Di Bello, C., Lazure, C., Ruyschaert, J.M., and Seidah, N.G. (1996). Identification of the paired basic convertases implicated in HIV gp160 processing based on in vitro assays and expression in CD4(+) cell lines. *The Journal of biological chemistry* 271, 30442-30450.
118. Decroly, E., Benjannet, S., Savaria, D., and Seidah, N.G. (1997). Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett* 405, 68-72.
119. Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.D., and Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360, 358-361.
120. Kim, W., Zekas, E., Lodge, R., Susan-Resiga, D., Marcinkiewicz, E., Essalmani, R., Mihara, K., Ramachandran, R., Asahchop, E., Gelman, B., et al. (2015). Neuroinflammation-Induced Interactions between Protease-Activated Receptor 1 and Proprotein Convertases in HIV-Associated Neurocognitive Disorder. *Mol Cell Biol* 35, 3684-3700.
121. Wouters, S., Decroly, E., Vandenbranden, M., Shober, D., Fuchs, R., Morel, V., Leruth, M., Seidah, N.G., Courtoy, P.J., and Ruyschaert, J.M. (1999). Occurrence of an HIV-1 gp160 endoproteolytic activity in low-density vesicles and evidence for a distinct density distribution from endogenously expressed furin and PC7/LPC convertases. *FEBS Lett* 456, 97-102.
122. Basak, A., Zhong, M., Munzer, J.S., Chretien, M., and Seidah, N.G. (2001). Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with fluorogenic peptides. *Biochem J* 353, 537-545.

123. Elhage, R., Cherai, M., Levacher, B., Darrasse-Jeze, G., Baillou, C., Zhao, X., Khatib, A.M., Piaggio, E., and Klatzmann, D. (2015). C-terminal cleavage of human Foxp3 at a proprotein convertase motif abrogates its suppressive function. *Scand J Immunol* 81, 229-239.
124. Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R., and Fahrenholz, F. (2001). Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J* 15, 1837-1839.
125. Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F., and Postina, R. (2003). Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem* 270, 2386-2393.
126. Lopez-Perez, E., Seidah, N.G., and Checler, F. (1999). Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive alpha-secretase pathway. *J Neurochem* 73, 2056-2062.
127. Leonhardt, R.M., Fiegl, D., Rufer, E., Karger, A., Bettin, B., and Knittler, M.R. (2010). Post-endoplasmic reticulum rescue of unstable MHC class I requires proprotein convertase PC7. *J Immunol* 184, 2985-2998.
128. Akamatsu, T., Matsuda, Y., Tsumura, K., Tada, J., Parvin, M.N., Wei, W., Kanamori, N., and Hosoi, K. (2000). Highly regulated expression of subtilisin-like proprotein convertase PACE4 (SPC4) during dentinogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 410-415.
129. Bessonard, S., Mesnard, D., and Constam, D.B. (2015). PC7 and the related proteases Furin and Pace4 regulate E-cadherin function during blastocyst formation. *J Cell Biol* 210, 1185-1197.
130. Duguay, S.J., Milewski, W.M., Young, B.D., Nakayama, K., and Steiner, D.F. (1997). Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases. *The Journal of biological chemistry* 272, 6663-6670.
131. Khatib, A.M., Siegfried, G., Prat, A., Luis, J., Chretien, M., Metrakos, P., and Seidah, N.G. (2001). Inhibition of proprotein convertases is associated with loss of growth and tumorigenicity of HT-29 human colon carcinoma cells: importance of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor processing in IGF-1-mediated functions. *The Journal of biological chemistry* 276, 30686-30693.
132. Marcinkiewicz, M., Savaria, D., and Marcinkiewicz, J. (1998). The pro-protein convertase PC1 is induced in the transected sciatic nerve and is present in cultured Schwann cells: comparison

with PC5, furin and PC7, implication in pro-BDNF processing. *Brain Res Mol Brain Res* 59, 229-246.

133. Marcinkiewicz, M., Marcinkiewicz, J., Chen, A., Leclaire, F., Chretien, M., and Richardson, P. (1999). Nerve growth factor and proprotein convertases furin and PC7 in transected sciatic nerves and in nerve segments cultured in conditioned media: their presence in Schwann cells, macrophages, and smooth muscle cells. *J Comp Neurol* 403, 471-485.
134. Stawowy, P., Marcinkiewicz, J., Graf, K., Seidah, N., Chretien, M., Fleck, E., and Marcinkiewicz, M. (2001). Selective expression of the proprotein convertases furin, pc5, and pc7 in proliferating vascular smooth muscle cells of the rat aorta in vitro. *J Histochem Cytochem* 49, 323-332.
135. Yang, M., Lim, Y., Li, X., Zhong, J.H., and Zhou, X.F. (2011). Precursor of brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) forms a complex with Huntingtin-associated protein-1 (HAP1) and sortilin that modulates proBDNF trafficking, degradation, and processing. *The Journal of biological chemistry* 286, 16272-16284.
136. Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J.A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chretien, M., Seidah, N.G., and Khatib, A.M. (2003). The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 111, 1723-1732.
137. McColl, B.K., Paavonen, K., Karnezis, T., Harris, N.C., Davydova, N., Rothacker, J., Nice, E.C., Harder, K.W., Roufail, S., Hibbs, M.L., et al. (2007). Proprotein convertases promote processing of VEGF-D, a critical step for binding the angiogenic receptor VEGFR-2. *FASEB J* 21, 1088-1098.
138. Croissandeau, G., Chretien, M., and Mbikay, M. (2002). Involvement of matrix metalloproteinases in the adipose conversion of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem J* 364, 739-746.
139. Strong, A., Ding, Q., Edmondson, A.C., Millar, J.S., Sachs, K.V., Li, X., Kumaravel, A., Wang, M.Y., Ai, D., Guo, L., et al. (2012). Hepatic sortilin regulates both apolipoprotein B secretion and LDL catabolism. *J Clin Invest* 122, 2807-2816.
140. Chen, C.L., Hou, W.H., Liu, I.H., Hsiao, G., Huang, S.S., and Huang, J.S. (2009). Inhibitors of clathrin-dependent endocytosis enhance TGFbeta signaling and responses. *J Cell Sci* 122, 1863-1871.

141. Pagani, A., Vieillevoye, M., Nai, A., Rausa, M., Ladli, M., Lacombe, C., Mayeux, P., Verdier, F., Camaschella, C., and Silvestri, L. (2015). Regulation of cell surface transferrin receptor-2 by iron-dependent cleavage and release of a soluble form. *Haematologica* 100, 458-465.
142. Feelders, R.A., Kuiper-Kramer, E.P., and van Eijk, H.G. (1999). Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. *Clin Chem Lab Med* 37, 1-10.
143. Beaumont, C. (2004). [Molecular mechanisms of iron homeostasis]. *Med Sci (Paris)* 20, 68-72.
144. Ganz, T., and Nemeth, E. (2012). Hepcidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1434-1443.
145. Wouters, S., Leruth, M., Decroly, E., Vandenbranden, M., Creemers, J.W., van de Loo, J.W., Ruyschaert, J.M., and Courtoy, P.J. (1998). Furin and proprotein convertase 7 (PC7)/lymphoma PC endogenously expressed in rat liver can be resolved into distinct post-Golgi compartments. *Biochem J* 336 (Pt 2), 311-316.
146. Declercq, J., Meulemans, S., Plets, E., and Creemers, J.W. (2012). Internalization of proprotein convertase PC7 from plasma membrane is mediated by a novel motif. *The Journal of biological chemistry* 287, 9052-9060.
147. Bayer, N., Schober, D., Prchla, E., Murphy, R.F., Blaas, D., and Fuchs, R. (1998). Effect of bafilomycin A1 and nocodazole on endocytic transport in HeLa cells: implications for viral uncoating and infection. *J Virol* 72, 9645-9655.
148. Baumann, P.A., Wicki, P., Stierlin, C., and Waldmeier, P.C. (1990). Investigations on GABAB receptor-mediated autoinhibition of GABA release. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 341, 88-93.
149. Ginefra, P., Filippi, B.G.H., Donovan, P., Bessonard, S., and Constam, D.B. (2018). Compartment-Specific Biosensors Reveal a Complementary Subcellular Distribution of Bioactive Furin and PC7. *Cell Rep* 22, 2176-2189.
150. Wan, L., Molloy, S.S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S.L., and Thomas, G. (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* 94, 205-216.
151. Elkin, S.R., Lakoduk, A.M., and Schmid, S.L. (2016). Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. *Wien Med Wochenschr* 166, 196-204.
152. Kirchhausen, T. (1999). Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 705-732.

153. Kirchhausen, T., Owen, D., and Harrison, S.C. (2014). Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6, a016725.
154. McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 517-533.
155. Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 75-88.
156. Preta, G., Cronin, J.G., and Sheldon, I.M. (2015). Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun Signal* 13, 24.
157. Neutra, M.R., Ciechanover, A., Owen, L.S., and Lodish, H.F. (1985). Intracellular transport of transferrin- and asialoorosomuroid-colloidal gold conjugates to lysosomes after receptor-mediated endocytosis. *J Histochem Cytochem* 33, 1134-1144.
158. Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO J* 30, 3481-3500.
159. Seaman, M.N. (2004). Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* 165, 111-122.
160. Falguieres, T., Luyet, P.P., Bissig, C., Scott, C.C., Velluz, M.C., and Gruenberg, J. (2008). In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol Biol Cell* 19, 4942-4955.
161. van Ijzendoorn, S.C. (2006). Recycling endosomes. *J Cell Sci* 119, 1679-1681.
162. Matsudaira, T., Uchida, Y., Tanabe, K., Kon, S., Watanabe, T., Taguchi, T., and Arai, H. (2013). SMAP2 regulates retrograde transport from recycling endosomes to the Golgi. *PLoS One* 8, e69145.
163. Hsu, V.W., and Prekeris, R. (2010). Transport at the recycling endosome. *Curr Opin Cell Biol* 22, 528-534.
164. Edler, E., and Stein, M. (2019). Recognition and stabilization of geranylgeranylated human Rab5 by the GDP Dissociation Inhibitor (GDI). *Small GTPases* 10, 227-242.
165. Kaksonen, M., and Roux, A. (2018). Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 313-326.
166. Roosen, D.A., and Cookson, M.R. (2016). LRRK2 at the interface of autophagosomes, endosomes and lysosomes. *Mol Neurodegener* 11, 73.
167. Srikanth, S., Woo, J.S., and Gwack, Y. (2017). A large Rab GTPase family in a small GTPase world. *Small GTPases* 8, 43-48.

168. Guerra, F., and Bucci, C. (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells* 5.
169. Yokoyama, S. (2006). ABCA1 and biogenesis of HDL. *J Atheroscler Thromb* 13, 1-15.
170. Lopez-Perez, E., Zhang, Y., Frank, S.J., Creemers, J., Seidah, N., and Checler, F. (2001). Constitutive alpha-secretase cleavage of the beta-amyloid precursor protein in the furin-deficient LoVo cell line: involvement of the pro-hormone convertase 7 and the disintegrin metalloprotease ADAM10. *J Neurochem* 76, 1532-1539.
171. Chia, P.Z., Gasnereau, I., Lieu, Z.Z., and Gleeson, P.A. (2011). Rab9-dependent retrograde transport and endosomal sorting of the endopeptidase furin. *J Cell Sci* 124, 2401-2413.
172. Teuchert, M., Berghofer, S., Klenk, H.D., and Garten, W. (1999). Recycling of furin from the plasma membrane. Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. *The Journal of biological chemistry* 274, 36781-36789.
173. Schafer, W., Stroh, A., Berghofer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.L., Kern, H.F., Klenk, H.D., and Garten, W. (1995). Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* 14, 2424-2435.
174. Trowbridge, I.S., Collawn, J.F., and Hopkins, C.R. (1993). Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* 9, 129-161.
175. Voorhees, P., Deignan, E., van Donselaar, E., Humphrey, J., Marks, M.S., Peters, P.J., and Bonifacino, J.S. (1995). An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of trans-Golgi network localization and internalization from the cell surface. *EMBO J* 14, 4961-4975.
176. Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F., and Thomas, G. (1999). Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol* 9, 28-35.
177. Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P.J., and Bonifacino, J.S. (1994). The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the trans-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J Cell Biol* 126, 1157-1172.
178. Chapman, R.E., and Munro, S. (1994). The functioning of the yeast Golgi apparatus requires an ER protein encoded by ANP1, a member of a new family of genes affecting the secretory pathway. *EMBO J* 13, 4896-4907.

179. Jones, B.G., Thomas, L., Molloy, S.S., Thulin, C.D., Fry, M.D., Walsh, K.A., and Thomas, G. (1995). Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J* 14, 5869-5883.
180. Takahashi, S., Nakagawa, T., Banno, T., Watanabe, T., Murakami, K., and Nakayama, K. (1995). Localization of furin to the trans-Golgi network and recycling from the cell surface involves Ser and Tyr residues within the cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* 270, 28397-28401.
181. Teuchert, M., Schafer, W., Berghofer, S., Hoflack, B., Klenk, H.D., and Garten, W. (1999). Sorting of furin at the trans-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. *The Journal of biological chemistry* 274, 8199-8207.
182. Dittie, A.S., Thomas, L., Thomas, G., and Tooze, S.A. (1997). Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 16, 4859-4870.
183. Park, S.Y., and Guo, X. (2014). Adaptor protein complexes and intracellular transport. *Biosci Rep* 34.
184. De Matteis, M.A., and Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 273-284.
185. Hirst, J., Itzhak, D.N., Antrobus, R., Borner, G.H.H., and Robinson, M.S. (2018). Role of the AP-5 adaptor protein complex in late endosome-to-Golgi retrieval. *PLoS Biol* 16, e2004411.
186. Pandey, K.N. (2009). Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14, 5339-5360.
187. Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E.L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K., and Schu, P. (2000). mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *EMBO J* 19, 2193-2203.
188. Tarpey, P.S., Stevens, C., Teague, J., Edkins, S., O'Meara, S., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Butler, A., Cole, J., et al. (2006). Mutations in the gene encoding the Sigma 2 subunit of the adaptor protein 1 complex, AP1S2, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 79, 1119-1124.
189. Lindwasser, O.W., Smith, W.J., Chaudhuri, R., Yang, P., Hurley, J.H., and Bonifacino, J.S. (2008). A diacidic motif in human immunodeficiency virus type 1 Nef is a novel determinant of binding to AP-2. *J Virol* 82, 1166-1174.

190. Trousdale, C., and Kim, K. (2015). Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *Eur J Cell Biol* 94, 513-521.
191. Kim, E., Lee, Y., Lee, H.J., Kim, J.S., Song, B.S., Huh, J.W., Lee, S.R., Kim, S.U., Kim, S.H., Hong, Y., et al. (2010). Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 403, 167-171.
192. Johannes, L., and Popoff, V. (2008). Tracing the retrograde route in protein trafficking. *Cell* 135, 1175-1187.
193. Canuel, M., Lefrancois, S., Zeng, J., and Morales, C.R. (2008). AP-1 and retromer play opposite roles in the trafficking of sortilin between the Golgi apparatus and the lysosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 724-730.
194. Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2008). Retromer. *Curr Opin Cell Biol* 20, 427-436.
195. Popoff, V., Mardones, G.A., Tenza, D., Rojas, R., Lamaze, C., Bonifacino, J.S., Raposo, G., and Johannes, L. (2007). The retromer complex and clathrin define an early endosomal retrograde exit site. *J Cell Sci* 120, 2022-2031.
196. Rojas, R., van Vlijmen, T., Mardones, G.A., Prabhu, Y., Rojas, A.L., Mohammed, S., Heck, A.J., Raposo, G., van der Sluijs, P., and Bonifacino, J.S. (2008). Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* 183, 513-526.
197. Modica, G., Skorobogata, O., Sauvageau, E., Vissa, A., Yip, C.M., Kim, P.K., Wurtele, H., and Lefrancois, S. (2017). Rab7 palmitoylation is required for efficient endosome-to-TGN trafficking. *J Cell Sci* 130, 2579-2590.
198. Arighi, C.N., Hartnell, L.M., Aguilar, R.C., Haft, C.R., and Bonifacino, J.S. (2004). Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* 165, 123-133.
199. Wang, S., and Bellen, H.J. (2015). The retromer complex in development and disease. *Development* 142, 2392-2396.
200. Seaman, M.N. (2007). Identification of a novel conserved sorting motif required for retromer-mediated endosome-to-TGN retrieval. *J Cell Sci* 120, 2378-2389.
201. Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H. (2002). Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature* 415, 933-937.
202. von Einem, B., Wahler, A., Schips, T., Serrano-Pozo, A., Proepper, C., Boeckers, T.M., Rueck, A., Wirth, T., Hyman, B.T., Danzer, K.M., et al. (2015). The Golgi-Localized gamma-Ear-Containing

- ARF-Binding (GGA) Proteins Alter Amyloid-beta Precursor Protein (APP) Processing through Interaction of Their GAE Domain with the Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE1). *PLoS One* 10, e0129047.
203. Bonifacino, J.S., and Traub, L.M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* 72, 395-447.
204. Francis, M.J., Jones, E.E., Levy, E.R., Martin, R.L., Ponnambalam, S., and Monaco, A.P. (1999). Identification of a di-leucine motif within the C terminus domain of the Menkes disease protein that mediates endocytosis from the plasma membrane. *J Cell Sci* 112 (Pt 11), 1721-1732.
205. Francis, M.J., Jones, E.E., Levy, E.R., Ponnambalam, S., Chelly, J., and Monaco, A.P. (1998). A Golgi localization signal identified in the Menkes recombinant protein. *Hum Mol Genet* 7, 1245-1252.
206. Funaki, T., Kon, S., Ronn, R.E., Henmi, Y., Kobayashi, Y., Watanabe, T., Nakayama, K., Tanabe, K., and Satake, M. (2011). Localization of SMAP2 to the TGN and its function in the regulation of TGN protein transport. *Cell Struct Funct* 36, 83-95.
207. Natsume, W., Tanabe, K., Kon, S., Yoshida, N., Watanabe, T., Torii, T., and Satake, M. (2006). SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* 17, 2592-2603.
208. Xiang, Y., Molloy, S.S., Thomas, L., and Thomas, G. (2000). The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol Biol Cell* 11, 1257-1273.
209. Honore, B. (2009). The rapidly expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease. *Bioessays* 31, 262-277.
210. Scherer, P.E., Lederkremer, G.Z., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1996). Cab45, a novel (Ca²⁺)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J Cell Biol* 133, 257-268.
211. Koivu, T., Laitinen, S., Riento, K., and Olkkonen, V.M. (1997). Sequence of a human cDNA encoding Cab45, a Ca²⁺-binding protein with six EF-hand motifs. *DNA Seq* 7, 217-220.
212. Lam, P.P., Hyvarinen, K., Kauppi, M., Cosen-Binker, L., Laitinen, S., Keranen, S., Gaisano, H.Y., and Olkkonen, V.M. (2007). A cytosolic splice variant of Cab45 interacts with Munc18b and impacts on amylase secretion by pancreatic acini. *Mol Biol Cell* 18, 2473-2480.

213. Crevenna, A.H., Blank, B., Maiser, A., Emin, D., Prescher, J., Beck, G., Kienzle, C., Bartnik, K., Habermann, B., Pakdel, M., et al. (2016). Secretory cargo sorting by Ca²⁺-dependent Cab45 oligomerization at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 213, 305-314.
214. Blank, B., and von Blume, J. (2017). Cab45-Unraveling key features of a novel secretory cargo sorter at the trans-Golgi network. *Eur J Cell Biol* 96, 383-390.
215. von Blume, J., Alleaume, A.M., Kienzle, C., Carreras-Sureda, A., Valverde, M., and Malhotra, V. (2012). Cab45 is required for Ca²⁺-dependent secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 199, 1057-1066.
216. Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11041-11048.
217. Seidah, N.G., Awan, Z., Chretien, M., and Mbikay, M. (2014). PCSK9: a key modulator of cardiovascular health. *Circ Res* 114, 1022-1036.
218. Seidah, N.G. (2017). The PCSK9 revolution and the potential of PCSK9-based therapies to reduce LDL-cholesterol. *Glob Cardiol Sci Pract* 2017, e201702.
219. Besnard, J., Ruda, G.F., Setola, V., Abecassis, K., Rodriguiz, R.M., Huang, X.P., Norval, S., Sassano, M.F., Shin, A.I., Webster, L.A., et al. (2012). Automated design of ligands to polypharmacological profiles. *Nature* 492, 215-220.
220. Chamberland, J.P., Antonow, L.T., Dias Santos, M., and Ritter, B. (2016). NECA2 controls clathrin coat recruitment to early endosomes for fast endocytic recycling. *J Cell Sci* 129, 2625-2637.
221. Gu, J., Faundez, V., and Werner, E. (2010). Endosomal recycling regulates Anthrax Toxin Receptor 1/Tumor Endothelial Marker 8-dependent cell spreading. *Exp Cell Res* 316, 1946-1957.
222. Baldwin, R.L., and Rose, G.D. (1999). Is protein folding hierarchic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem Sci* 24, 26-33.
223. Voelz, V.A., Shell, M.S., and Dill, K.A. (2009). Predicting peptide structures in native proteins from physical simulations of fragments. *PLoS Comput Biol* 5, e1000281.
224. Gavenonis, J., Sheneman, B.A., Siegert, T.R., Eshelman, M.R., and Kritzer, J.A. (2014). Comprehensive analysis of loops at protein-protein interfaces for macrocycle design. *Nat Chem Biol* 10, 716-722.
225. Tie, H.C., Chen, B., Sun, X., Cheng, L., and Lu, L. (2017). Quantitative Localization of a Golgi Protein by Imaging Its Center of Fluorescence Mass. *J Vis Exp*.

226. Guardia, C.M., De Pace, R., Mattera, R., and Bonifacino, J.S. (2018). Neuronal functions of adaptor complexes involved in protein sorting. *Curr Opin Neurobiol* 51, 103-110.
227. Dacks, J.B., and Robinson, M.S. (2017). Outerwear through the ages: evolutionary cell biology of vesicle coats. *Curr Opin Cell Biol* 47, 108-116.
228. Kelly, B.T., McCoy, A.J., Spate, K., Miller, S.E., Evans, P.R., Honing, S., and Owen, D.J. (2008). A structural explanation for the binding of dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature* 456, 976-979.
229. Doray, B., Lee, I., Knisely, J., Bu, G., and Kornfeld, S. (2007). The gamma/sigma1 and alpha/sigma2 hemicomplexes of clathrin adaptors AP-1 and AP-2 harbor the dileucine recognition site. *Mol Biol Cell* 18, 1887-1896.
230. Baltés, J., Larsen, J.V., Radhakrishnan, K., Geumann, C., Kratzke, M., Petersen, C.M., and Schu, P. (2014). sigma1B adaptin regulates adipogenesis by mediating the sorting of sortilin in adipose tissue. *J Cell Sci* 127, 3477-3487.
231. Medigeshi, G.R., Krikunova, M., Radhakrishnan, K., Wenzel, D., Klingauf, J., and Schu, P. (2008). AP-1 membrane-cytoplasm recycling regulated by mu1A-adaptin. *Traffic* 9, 121-132.
232. Ashraf, Y., Sachan, V., Essalmani, R., Duval, S., Marcinkiewicz, J., Hamelin, J., Roubtsova, A., Prat, A., and Seidah, N. G. (2018). The Proprotein Convertase 7 Regulates Triglyceride Levels Via Enhanced ApoA5 Degradation. *Atherosclerosis Supplements* 32, 56-56.
233. Dongiovanni, P., Meroni, M., Baselli, G.A., Mancina, R.M., Ruscica, M., Longo, M., Rametta, R., Cespiati, A., Pelusi, S., Ferri, N., et al. (2019). PCSK7 gene variation bridges atherogenic dyslipidemia with hepatic inflammation in NAFLD patients. *J Lipid Res*.
234. Shi, X., Cheng, L., Jiao, X., Chen, B., Li, Z., Liang, Y., Liu, W., Wang, J., Liu, G., Xu, Y., et al. (2018). Rare Copy Number Variants Identify Novel Genes in Sporadic Total Anomalous Pulmonary Vein Connection. *Front Genet* 9, 559.
235. Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
236. Cheung, M.S., Maguire, M.L., Stevens, T.J., and Broadhurst, R.W. (2010). DANGLE: A Bayesian inferential method for predicting protein backbone dihedral angles and secondary structure. *J Magn Reson* 202, 223-233.

237. Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Ionides, J., and Laue, E.D. (2005). The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59, 687-696.
238. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-921.
239. Rieping, W., Habeck, M., Bardiaux, B., Bernard, A., Malliavin, T.E., and Nilges, M. (2007). ARIA2: automated NOE assignment and data integration in NMR structure calculation. *Bioinformatics* 23, 381-382.
240. Laskowski, R.A., Rullmann, J.A., MacArthur, M.W., Kaptein, R., and Thornton, J.M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 8, 477-486.
241. Guntert, P., Mumenthaler, C., and Wuthrich, K. (1997). Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J Mol Biol* 273, 283-298.
242. Pakdel, M., and von Blume, J. (2018). Exploring new routes for secretory protein export from the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell* 29, 235-240.
243. Kienzle, C., and von Blume, J. (2014). Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol* 24, 584-593.
244. Luo, J., Li, Z., Zhu, H., Wang, C., Zheng, W., He, Y., Song, J., Wang, W., Zhou, X., Lu, X., et al. (2016). A Novel Role of Cab45-G in Mediating Cell Migration in Cancer Cells. *Int J Biol Sci* 12, 677-687.
245. Harris, R.A., and Hanrahan, J.W. (1994). Effects of EGTA on calcium signaling in airway epithelial cells. *Am J Physiol* 267, C1426-1434.
246. Tagliabracci, V.S., Engel, J.L., Wen, J., Wiley, S.E., Worby, C.A., Kinch, L.N., Xiao, J., Grishin, N.V., and Dixon, J.E. (2012). Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science* 336, 1150-1153.
247. Rigden, D.J., and Galperin, M.Y. (2004). The DxDxDG motif for calcium binding: multiple structural contexts and implications for evolution. *J Mol Biol* 343, 971-984.
248. 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.
249. Seidah, N.G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M., and Day, R. (1996). cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3388-3393.
250. Pennacchio, L.A., Olivier, M., Hubacek, J.A., Cohen, J.C., Cox, D.R., Fruchart, J.C., Krauss, R.M., and Rubin, E.M. (2001). An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. *Science* 294, 169-173.
251. Lei, X., Shi, F., Basu, D., Huq, A., Routhier, S., Day, R., and Jin, W. (2011). Proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4 by proprotein convertases modulates its inhibitory effects on lipoprotein lipase activity. *The Journal of biological chemistry* 286, 15747-15756.
252. Shu, X., Nelbach, L., Ryan, R.O., and Forte, T.M. (2010). Apolipoprotein A-V associates with intrahepatic lipid droplets and influences triglyceride accumulation. *Biochim Biophys Acta* 1801, 605-608.
253. Sundaram, M., Zhong, S., Bou Khalil, M., Links, P.H., Zhao, Y., Iqbal, J., Hussain, M.M., Parks, R.J., Wang, Y., and Yao, Z. (2010). Expression of apolipoprotein C-III in McA-RH7777 cells enhances VLDL assembly and secretion under lipid-rich conditions. *J Lipid Res* 51, 150-161.
254. Forte, T.M., and Ryan, R.O. (2015). Apolipoprotein A5: Extracellular and Intracellular Roles in Triglyceride Metabolism. *Curr Drug Targets* 16, 1274-1280.
255. Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 15, 290-298.
256. Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 196, 801-810.
257. Waguri, S., Dewitte, F., Le Borgne, R., Rouille, Y., Uchiyama, Y., Dubremetz, J.F., and Hoflack, B. (2003). Visualization of TGN to endosome trafficking through fluorescently labeled MPR and AP-1 in living cells. *Mol Biol Cell* 14, 142-155.
258. Laude, A.J., and Prior, I.A. (2004). Plasma membrane microdomains: organization, function and trafficking. *Mol Membr Biol* 21, 193-205.

259. Staehelin, L.A. (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J* 11, 1151-1165.
260. Nickel, W., and Seedorf, M. (2008). Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 287-308.
261. Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol* 27, 230-240.
262. Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J., and Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131.
263. Noh, S.H., Gee, H.Y., Kim, Y., Piao, H., Kim, J., Kang, C.M., Lee, G., Mook-Jung, I., Lee, Y., Cho, J.W., et al. (2018). Specific autophagy and ESCRT components participate in the unconventional secretion of CFTR. *Autophagy* 14, 1761-1778.
264. Kim, J., Noh, S.H., Piao, H., Kim, D.H., Kim, K., Cha, J.S., Chung, W.Y., Cho, H.S., Kim, J.Y., and Lee, M.G. (2016). Monomerization and ER Relocalization of GRASP Is a Requisite for Unconventional Secretion of CFTR. *Traffic* 17, 733-753.
265. Gee, H.Y., Kim, J., and Lee, M.G. (2018). Unconventional secretion of transmembrane proteins. *Semin Cell Dev Biol* 83, 59-66.
266. Fugere, M., Appel, J., Houghten, R.A., Lindberg, I., and Day, R. (2007). Short polybasic peptide sequences are potent inhibitors of PC5/6 and PC7: Use of positional scanning-synthetic peptide combinatorial libraries as a tool for the optimization of inhibitory sequences. *Mol Pharmacol* 71, 323-332.
267. Komiyama, T., VanderLugt, B., Fugere, M., Day, R., Kaufman, R.J., and Fuller, R.S. (2003). Optimization of protease-inhibitor interactions by randomizing adventitious contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8205-8210.