

Université de Montréal

CLONAGE, BIOSYNTÈSE ET CARACTÉRISATION IN VITRO
DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE SKI-1 : UNE NOUVELLE PROTÉASE À
SERINE DE TYPE SUBTILISINE

Par

Bakary-Barry Touré

Institut de Recherches cliniques de Montréal

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (MSc)
en sciences biomédicales

Août, 1999

©Bakary-Barry Touré 1999



W
4
U58
2000
V.009



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Clonage, biosynthèse et caractérisation *in vitro* de l'activité enzymatique de SKI-1 : une nouvelle protéase à sérine de type subtilisine

Présenté par :

Bakary-Barry Touré

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

| | |
|-------------------------|------------------------|
| Guy Boileau | président du jury |
| Nabil G. Seidah | directeur de recherche |
| Thimothy L. Reudelhuber | membre du jury |

Mémoire accepté le

SOMMAIRE

Les hormones peptidiques comme de nombreuses autres protéines sont synthétisées sous forme de précurseur de haut poids moléculaire. Au cours du transport cellulaire, elles subissent de nombreuses modifications biochimiques qui les rendent fonctionnelles. L'une de ces modifications importantes est la protéolyse restreinte en aval de paires d'acides aminés basiques (**Arg(X)_nLys/ArgArg**), d'acides aminés possédant une chaîne latérale courte (**Ala, Ser, Thr**) ou hydrophobe (**Leu, Ile, Met, Val**). Les endoprotéases responsables du premier type de protéolyse, *Proprotein Convertases (PCs)*, ont été identifiées et caractérisées. Sept d'entre elles présentant un recouvrement important au niveau de la spécificité de coupure et de la distribution tissulaire et cellulaire sont aujourd'hui connues (PC1/3, PC2, PC4, PC5/6, PC7, PACE4 et la furine). Le domaine catalytique de ces enzymes présente une grande homologie de séquence par rapport à la subtilisine de la bactérie et à la kexine chez la levure d'où leur classification dans la famille des protéases à serine de type subtilisine. Cependant, les endoprotéases impliquées dans les deuxième et troisième types de protéolyse restent encore à être identifiées. Ce travail décrit le clonage et la caractérisation d'une nouvelle protéase à serine de type subtilisine: **SKI-1** (Subtilisin **K**exin **I**sozyme **1**). Les études d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* démontrent une distribution ubiquiste de ce nouveau gène. Les études de biosynthèse démontrent que SKI-1 est synthétisé sous forme de zymogène qui est rapidement converti en enzyme mature dans le reticulum endoplasmique. Il ressort des études de coexpression que SKI-1 est capable d'hydrolyser le proBDNF (pro-Brain Derived Neurotrophic Factor) en amont d'un résidu **Thr** dans le motif **RGLT ↓SL**. La caractérisation *in vitro* de la spécificité de coupure de l'enzyme et de ses propriétés physico-chimiques sont aussi présentées. Finalement, nous démontrons également que le prosegment de ce nouvel enzyme est un inhibiteur de son activité

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---------------------------|------------|
| <i>SOMMAIRE</i> | <i>I</i> |
| <i>TABLE DES MATIÈRES</i> | <i>II</i> |
| <i>LISTE DES TABLEAUX</i> | <i>IV</i> |
| LISTE DES FIGURES | V |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS | VI |
| <i>REMERCIEMENTS</i> | <i>VII</i> |

PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION GÉNÉRALE

| | |
|--|----|
| 1.1 Les précurseurs polypeptidiques. Prémisses à la recherche des enzymes de conversion | |
| 1.1.1 Classification des précurseurs de proprotéines | 1 |
| 1.1.2 L'identification des convertases de proprotéines | 3 |
| 1.1.2.1 La kexine | 3 |
| 1.1.2.2 Identification des Convertases de Proprotéines de mammifères | 3 |
| 1.2 D'autres enzymes impliquées dans la protéolyse des précurseurs | 4 |
| 1.3 Identification de SKI-1 | 5 |
| 1.4 Analyse comparative de SKI-1 et des PCs. Aspects structuraux et fixation du substrat | 6 |
| 1.4.1 Le propeptide et le mécanisme d'activation | 8 |
| 1.4.2 Le domaine catalytique | 8 |
| 1.4.3 Le domaine P ou Homo B-Domaine | 9 |
| 1.4.4 D'autres éléments dans le domaine C-terminal | 9 |
| 1.4.5 Fixation du substrat aux subtilases | 10 |
| 1.4.6 Liaison du calcium | 12 |
| 1.5 Mécanisme réactionnel des protéases à sérine | 13 |
| 1.6 Inhibition des PCs | 15 |
| 1.7 Protéolyse et niveau de cholestérol cellulaire | 16 |
| 1.7.1 Les protéines liant les éléments de réponse aux stérols | 16 |
| 1.7.2 Clonage de S1P/SKI-1 et S2P : la protéolyse des SREBPs | 17 |
| 1.7.3 La protéolyse des SREBPs et le niveau de cholestérol cellulaire | 18 |
| 1.7.4 SCAP et la régulation du métabolisme du cholestérol | 20 |
| 1.8 SKI-1 et la maturation des précurseurs | 21 |
| 1.9 Buts du projet | 23 |

DEUXIÈME CHAPITRE : PREMIER ARTICLE

« Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1 : A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization »

| | |
|------------------------|------|
| Originalité du travail | 25 |
| 2.1 Sommaire | 25.1 |
| 2.2 Introduction | 25.1 |

| | | |
|-----|------------|------|
| 2.3 | Méthodes | 25.1 |
| 2.4 | Résultats | 25.2 |
| 2.5 | Discussion | 25.5 |
| 2.6 | Références | 25.6 |

TROISIÈME CHAPITRE : DEUXIÈME ARTICLE

« Biosynthesis and Ezymatic Characterization of Human SKI-1 and the Processing of its Inhibitory Prosegment »

| | | |
|-----|--------------|----|
| 3.1 | Sommaire | 28 |
| 3.2 | Introduction | 29 |
| 3.3 | Méthodes | 31 |
| 3.4 | Résultats | 37 |
| 3.5 | Discussion | 52 |
| 3.6 | Références | 57 |

QUATRIÈME CHAPITRE : DISCUSSION GÉNÉRALE

| | | |
|-----|---|----|
| 4.1 | Distribution tissulaire et localisation cellulaire de SKI-1 | 60 |
| 4.2 | Le virus du baculo et l'expression de SKI-1 | 61 |
| 4.3 | Modifications post-traduction et mécanisme d'activation | 61 |
| 4.4 | Les substrats SREBP-2 et proBDNF et le développement de modèle d'étude <i>in vitro</i> de SKI-1 | 62 |
| 4.5 | Développement de substrats fluorescents | 63 |
| 4.6 | Le modèle théorique de fixation du substrat par SKI-1 | 64 |
| 4.7 | Activation de SKI-1 par le pH et la calcium | 65 |
| 4.8 | Inhibiteurs de SKI-1 | 65 |
| 4.9 | Le prosegment est un inhibiteur de l'enzyme <i>in vitro</i> | 66 |

CINQUIÈME CHAPITRE : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES D'AVENIR

| | |
|----------------------|----|
| BIBLIOGRAPHIE | 70 |
|----------------------|----|

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Les acides aminés impliqués dans la fixation du substrat au site actif des subtilases | 12 |
|--|----|

DEUXIÈME ARTICLE

| | |
|---|----|
| Table I : Effect of selected protease inhibitors on BTMD-hSKI-1 activity | 47 |
| Table II-A : Kinetic constants for the hydrolysis of peptide substrates by BTMD-hSKI-1 | 49 |
| Table II-B : Synthetic peptide substrates | 49 |
| Table III : Effect of prosegment peptide constructs on BTMD-hSKI-1 activity | 51 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Divergences évolutives dans la famille des protéases à sérine de type subtilisine | 5 |
| Figure 2 : Représentation schématique de la structure primaire des PCs et de SKI-1 | 7 |
| Figure 3 : Site de liaison du substrat/inhibiteur aux protéases à sérine de type subtilisine | 11 |
| Figure 4 : Mécanisme réactionnel des protéases à sérine | 14 |
| Figure 5 : SKI-1/S1P et la régulation du métabolisme du cholestérol | 19 |
| Figure 6 : Mutagenèse dirigée du site de clivage des SREPBPs | 22 |

ARTICLE 1

| | |
|---|------|
| Figure 1 : Comparative protein sequences of SKI-1 deduced from rat, mouse and human cDNAs. | 25.3 |
| Figure 2 : Northern blot analysis of the expression of SKI-1 in adult rat tissues | 25.3 |
| Figure 3 : <i>In situ</i> hybridization of rSKI-1 mRNA in a 2-day-old rat | 25.4 |
| Figure 4 : Biosynthetic analysis of SKI-1 in LoVo cells overexpressing vv :SKI-1 | 25.4 |
| Figure 5 : hSKI-1 immunoreactivity in stably transfected HK293 cells | 25.4 |
| Figure 6 : Processing of proBDNF by SKI-1 | 25.5 |
| Figure 7 : <i>In vitro</i> processing profile of proBDNF by SKI-1 | 25.5 |

ARTICLE 2

| | |
|---|----|
| Figure 1 : A schematic representation of the structure of FL-SKI-1 and its truncation mutant BTMD-SKI-1 | 39 |
| Figure 2 : Biosynthetic analysis of the rate of zymogen processing and the fate of the prosegment of SKI-1 | 41 |
| Figure 3 : Purification and identification of secreted recombinant proSKI-1 | 43 |
| Figure 4 : Processing of proBDNF and SREBP-2 by BTMD-SKI-1 | 45 |
| Figure 5 : pH and Calcium activation profile of BTMD-SKI-1 | 46 |
| Figure 6 : Purity of pro-SKI-1 constructs | 51 |

Liste des abréviations

| | |
|------------------|--|
| aa | acide aminé |
| A β | amyloid- β |
| ADNc | acide désoxyribonucléique complémentaire |
| ANF | atrial natriuretic factor |
| ARNm | acide ribonucléique messenger |
| BDNF | brain derived neurotrophic factor |
| CHO cells | chinese hamster ovary cells |
| EDTA | Ethylène diamine tétraacétique |
| EGF | epidermal growth factor |
| IC50 | concentration d'inhibiteur à laquelle on observe 50% d'activité de l'enzyme |
| IGF | insulin-like growth factor |
| k | constante de vitesse |
| k _{cat} | constante de catalyse |
| K _d | constante de dissociation |
| kDa | kilodalton |
| K _m | constante de Michaelis-Menten |
| LDL | low density lipoprotein |
| LPH | lipotropine |
| MIS | mullerian inhibiting substance |
| NGF | nerve growth factor |
| PAM | peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase |
| P-CIP1 | PAM COOH-terminal interactor protein 1 |
| PCs | proprotein convertases |
| POMC | pro-opiomelanocortin |
| PP | pancreatic polypeptide |
| RT-PCR | reverse transcriptase polymerase chain reaction |
| SCAP | SREBP cleavage activating protein |
| S1P | site 1 protease |
| S2P | site 2 protease |
| SKI-1 | subtilisin kexin isozyme 1 |
| SREBP | sterol regulatory element binding protein |
| TGN | Trans-Golgi Network |
| V | vitesse |

REMERCIEMENTS

Au moment de conclure ce travail de Maîtrise, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers mon directeur de recherche Nabil G. Seidah pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, mais surtout pour la richesse des interactions que nous avons partagées. Sa grande passion pour la science a été pour moi une source d'inspiration tout au long de ce travail. Au cours de ces dernières années, j'ai eu la chance de partager au quotidien les joies et les peines de vie au laboratoire de Maya, Josée, Nadia, Annie, Mei, Dany, Gilles ainsi que tous mes autres collègues des laboratoires de biochimie neuroendocrinienne, neurobiologie moléculaire et chimie des peptides. A tous un grand merci pour votre soutien constant ainsi que pour l'ambiance que vous avez su faire régner au labo. Un merci spécial au Dr John Scott Munzer pour son encadrement efficace et Jim Rochemont pour son sens de l'humour et surtout pour son expertise en HPLC. Je tiens tout particulièrement à remercier Dr Ajoy Basak pour les nombreuses collaborations et pour les longues et fructueuses discussions concernant la chimie des peptides qui m'ont été très utiles. Mes sincères remerciements s'adressent aussi aux Drs Claude Lazure et Majambu Mbikay pour leur patience, leur soutien constant et le temps qu'ils m'ont consacré. Leurs précieux conseils m'auront été très bénéfiques. Éric Bergeron et Dr Jean Christophe Barale ont été très présents auprès de moi, en particulier au moment de la rédaction de ce manuscrit et je les en remercie infiniment. Je suis également gré au Dr Chrétien d'avoir toujours gardé un regard enthousiasme sur nos travaux. Je ne saurai passer sous silence l'excellent support de Sylvie Emond. Mille merci Sylvie pour ta grande patience et les services rendus. Enfin à ma copine Julie, merci pour ta patience et ton support constant tout au long de ce travail de maîtrise.

Je tiens également à remercier le Conseil de Recherches Médicales du Canada, Merck Frosst Canada à travers l'IRCM, la faculté de médecine de l'université de Montréal et le American Peptide Society pour leur soutien financier.

CE MÉMOIRE EST DÉDIÉ À MARIAM ET SURTOUT À MON PÈRE.

INTRODUCTION

1.1 Les précurseurs polypeptidiques, prémisses à la recherche des enzymes de conversion

Nombre d'hormones, de neuropeptides, de récepteurs ou encore de glycoprotéines d'enveloppes virales sont synthétisés sous forme d'un précurseur inactif. Ces derniers doivent être protéolysés afin de révéler un polypeptide biologiquement actif. Ce mécanisme de régulation de la fonction physiologique de beaucoup de protéines fut d'abord mis en évidence par Neurath (1957). Elle démontrait que les zymogènes du trypsinogène et du chymotrypsinogène devaient subir une protéolyse régiospécifique dans leur domaine N-terminal pour acquérir leur activité biologique. Cette découverte fut par la suite consolidée par les travaux de Takabatake et Sachs (1964) sur une hormone peptidique : la vasopressine. Cependant, il a fallu attendre jusqu'en 1967 pour obtenir les preuves expérimentales de l'existence des précurseurs hormonaux et ainsi élucider les sites de protéolyse. Indépendamment, deux groupes de recherche (Chrétien et Li, 1967 ; Steiner et Oyer, 1967) écrivaient alors une nouvelle page de la recherche neuroendocrinologique. Les premiers purifiaient et caractérisaient chimiquement la γ -lipotropine (γ -LPH). De cette étude, il ressortait que la γ -LPH était dérivée de la β -LPH par coupure spécifique de cette dernière en aval d'une paire d'acides aminés basiques. Les seconds, par des études de biosynthèse, démontraient que l'insuline était le produit de "maturation" d'un précurseur de haut poids moléculaire. La caractérisation de la proinsuline par Chance et al. (1968) a permis de démontrer la présence de paires d'acides aminés basiques aux jonctions des chaînes peptidiques A/C et C/B. Ces deux exemples laissent donc entrevoir l'existence d'un mécanisme commun de génération de polypeptides biologiquement actifs à partir d'un précurseur inactif par protéolyse sélective en C-terminal d'acides aminés basiques. Les jalons de la recherche des enzymes de conversion de proprotéines, présentant une telle spécificité au niveau du substrat, étaient posés.

1.1.1 Classification des précurseurs de proprotéines

La riche diversité des précurseurs polypeptidiques connus aujourd'hui a permis de confirmer l'existence d'un mécanisme commun, mais pas unique, d'activation. L'analyse

comparative de la séquence primaire de ces différents précurseurs protéiques subissant une coupure en aval des aa basiques a permis de répertorier quatre grand types. Cette classification est basée essentiellement sur la nature des aa se retrouvant dans la région immédiate des sites de coupure (Seidah, 1995)

a) Type I : motif RXK/RRXX

Ce type de coupure est défini par la présence d'aa basiques en P1, P2 et P4 (Schechter et Berger, 1967). Très souvent, un aa ayant une chaîne aliphatique tel Val, Leu, Ile est aussi retrouvé en P2'. Ce type de coupure est majoritairement retrouvé dans les protéines synthétisées dans les cellules ne contenant pas de granule de sécrétion tels les facteurs de croissance, mais aussi dans les glycoprotéines de surface des virus et les toxines d'origine bactérienne. Dans cette classe, se retrouve également le 7B2, une protéine qui rentre dans les granules de sécrétion.

b) Type II : motif dibasique K/R K/R

Cette classe regroupe les précurseurs coupés en aval d'une simple paire d'aa basiques. Il est également fréquent de retrouver un aa basique (R, H, K) en position P4 ou P6. La majorité des hormones devant subir une maturation protéolytique comme le POMC (voir liste des abréviations, p.VI), la pro-insuline se retrouve dans cette classe. On peut y inclure également des protéines hépatiques comme la pro-albumine.

c) Type III : motif R(X)_{2n}R

Ces précurseurs sont coupés en C-terminal d'un simple aa basique (R). La présence d'un résidu d'aa basique en P4, P6 ou P8 serait une condition essentielle à la protéolyse de ce type de précurseur (Devi, 1991). Il comprend les peptides hormonaux comme les prodynorphine, prosomatostatine, les facteurs de croissance comme le pro-EGF, IGF I et II.

d) Type IV

L'existence de cette classe fut proposée récemment par Seidah et collaborateurs (1995). Dans ce cas-ci, la coupure apparaît en C-terminal d'une paire ou d'un simple aa basique. Ce qui le différencie des types ci-haut, serait la présence d'un aa basique (K ou R) en P2'. Ce type inclut les précurseurs hormonaux comme le pro-MIS, pro-PP, proglucagon.

1.1.2 L'identification des Convertases de Proprotéines (PCs)

1.1.2.1 La kexine

Les études de complémentation génétique menées par Julius et al. (1984) confirmaient pour la première fois l'existence d'une endoprotéase reconnaissant spécifiquement les paires d'aa basiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Elles établissaient que des cellules déficientes en Kex2 (**k**iller **E**xpression **2**) étaient incapables de produire les formes actives du facteur α d'accouplement et du *killer toxin*. L'analyse de la séquence primaire de Kex2p ou kexine, le produit du gène *kex2*, démontrait que cette protéine contenait un domaine catalytique très similaire à celui retrouvé dans les protéases à serine bactériennes appartenant à la famille des subtilisines (Mizuno et al., 1988; Fuller et al., 1988). Les études *in vitro* et *ex vivo* menées par Tim et al. (1986), Bathurst et al. (1987), et Thomas et al. (1988) montraient que Kex2p était capable de couper correctement après des aa basiques respectivement la proinsuline, la proalbumine et la POMC de mammifère. Cette homologie de séquence entre les domaines catalytiques de la subtilisine et de la kexine de même que les clivages des précurseurs polypeptidiques de mammifère par la kexine laissaient présager que les endoprotéases de mammifère, si elles existent, pouvaient être structurellement reliées à la subtilisine bactérienne et assumer une fonction similaire à la kexine.

1.1.2.2 Identification des Convertases de Proprotéines de mammifères

Utilisant la conservation de séquence dans le domaine catalytique comme critère de recherche dans les banques de données, Fuller et al. (1989) identifiaient une séquence partielle d'ADN codant pour la furine. Cette séquence partielle avait été isolée trois années plus tôt par Roebroek et al. (1986) lors d'études visant à caractériser la région promotrice du proto-oncogène *fos*. La séquence avait alors été appelée *fur* (**f**os **u**pstream **r**egion). L'isolation de l'ADNc et la caractérisation enzymatique de la furine n'allèrent pas tarder. Dès l'année suivante, il fut démontré que la furine était capable de couper les précurseurs du pro-NGF (Bresnahan et al., 1990) et du facteur von Willerbrand (Wise et al., 1990).

L'avènement de la technique de polymérisation en chaîne (PCR) allait permettre à d'autres groupes de recherche de réussir là où ils avaient échoué par les méthodes classiques de la biochimie.

Presqu'au même moment que l'on caractérisait la furine, les clonages de deux autres gènes candidats à titre de PCs de mammifère furent rapportés. Dans les deux cas, la stratégie de clonage consistait à utiliser des oligonucléotides dégénérés complémentaires aux séquences conservées dans le site actif de la subtilisine, de la kexine et de la furine. Ainsi, Seidah et collaborateurs (1990 et 1991) de même que Smeekens et Steiner (1990) ont pu isoler l'ADNc de PC2. Une approche similaire fut utilisée pour identifier d'autres membres de la famille dont PC1 (Seidah et al., 1990 et 1991), PC4 (Seidah et al., 1992; Nakayama et al., 1992), PC5/PC6 (Lusson et al., 1993; Nakagawa et al., 1993); PACE4 (Kiefer et al., 1991) et PC7 (Seidah et al., 1997).

1.2 D'autres enzymes impliquées dans la protéolyse des précurseurs

La protéolyse des précurseurs polypeptidiques en aval des paires d'aa basiques, bien que prépondérante, ne constitue pas le seul mode de génération des peptides biologiquement actifs. La production de SS28 à partir de la prosomatostatine (Mackin et al., 1991) tout comme l'ANF actif (Nakayama et al., 1992) nécessitent par exemple une coupure en aval d'un seul aa basique (Arg). Plus récemment encore, des coupures en aval des aa hydrophobes (Val, Leu, Ile, Met) ou des petits aa (Ala, Thr, Ser) comme moyen d'activation des précurseurs ont été décrits (Seidah et al., 1998). Ces cas incluent les α et γ endorphines (Ling et al., 1976), la métalloprotéase ADAM-10 (Rosendahl et al., 1997), les facteurs de transcription SREBPs (Duncan et al., 1997), les peptides A β 40, 42 et 43 impliqués dans la maladie d'Alzheimer (Checler, 1995) et bien d'autres. Ce répertoire diversifié de types de spécificité de coupure illustre bien l'existence de convertases ne reconnaissant pas les aa basiques. Le rôle important que jouent certaines de ces protéases dans des pathologies humaines de même que dans la physiologie normale explique tout l'intérêt de les identifier et de les caractériser.

Les subtilisines de mammifère peuvent représenter de très bons candidats à titre de protéases présentant de telles spécificités de protéolyse. La conservation de séquence dans le domaine catalytique entre la bactérie, la levure et l'humain les rend plus facilement accessibles. Surtout, l'évolution a permis au site de fixation du substrat des membres de cette famille d'accommoder une plus grande diversité d'aa. Par exemple, les subtilisines

procaryotiques reconnaissent majoritairement des résidus hydrophobes tandis que les homologues de mammifère reconnaissent exclusivement les aa basiques.

1.3 Identification de SKI-1

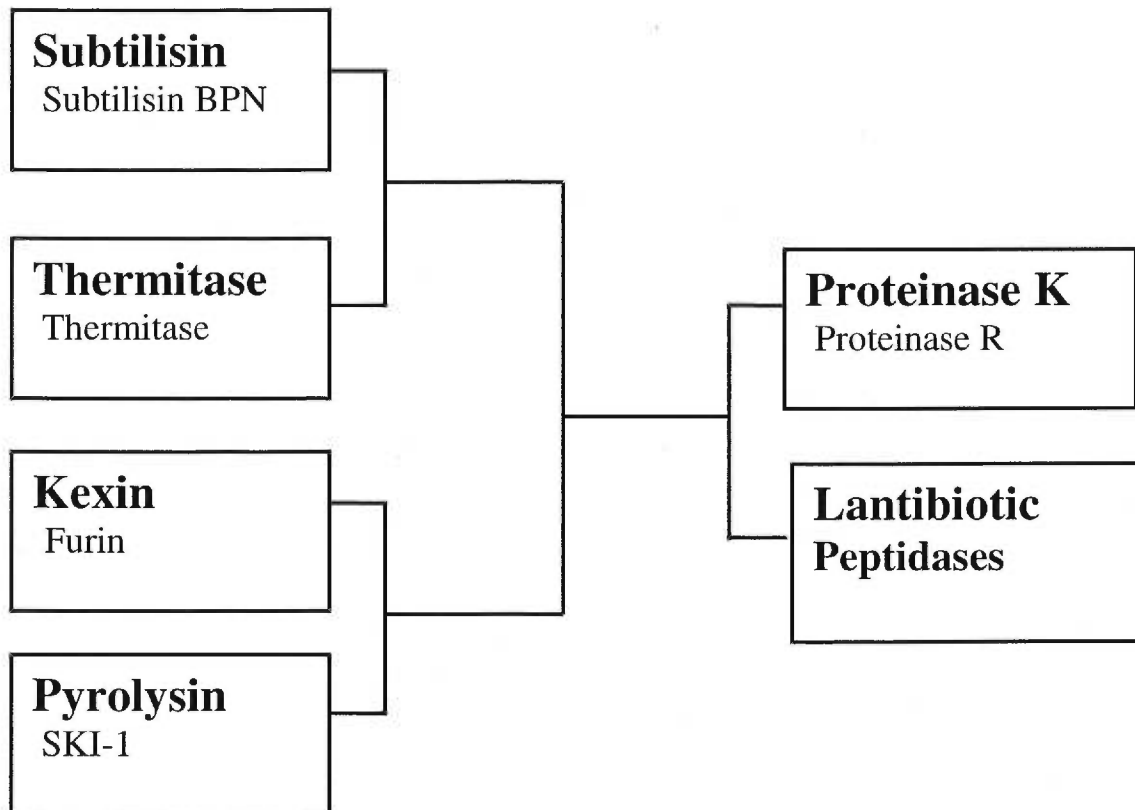


Fig.1: Divergences évolutives dans la famille des protéases à serine de type subtilisine (subtilases). Cette classification est basée sur la conservation de séquence dans le domaine catalytique de l'enzyme entre les membres de la famille. Adaptée de Siezen et Leunissen (1997).

L'expertise acquise par notre laboratoire dans la découverte de nouvelles subtilases a récemment permis de cloner un fragment de 525 paires de base du domaine catalytique d'une nouvelle subtilisine (article 1). Une recherche dans les banques de données révélait que la séquence complète de l'ADNc de cette nouvelle enzyme avait été isolée auparavant à partir

des cellules de myéloïde humaine (Nagase et al., 1995). Ce nouveau gène fut appelé **SKI-1** (Subtilisin/Kexin Isozyme 1).

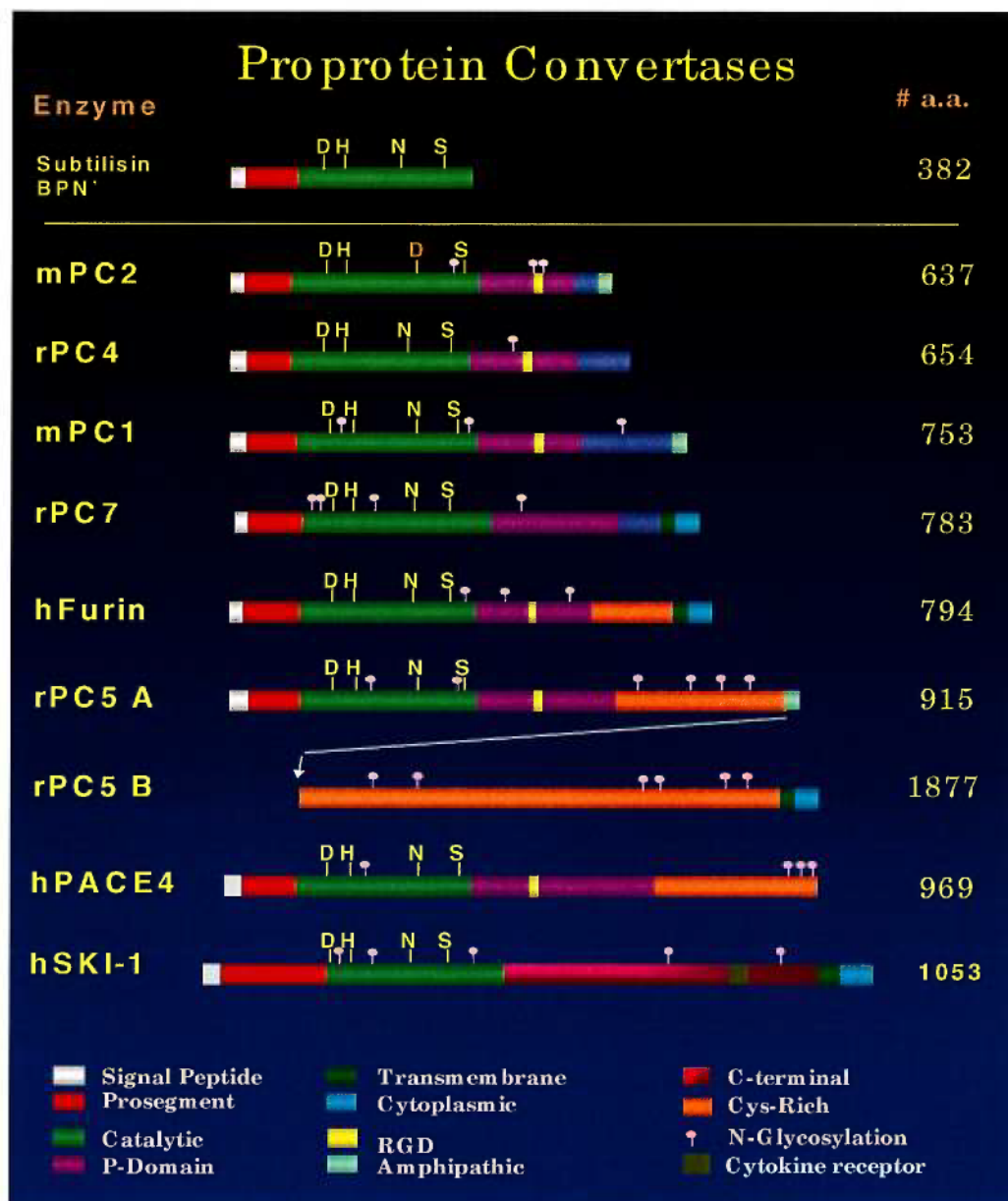
SKI-1 avait été aussi précédemment classé dans la famille des protéases à serine de type subtilisine par Siezen et Leunissen (1997). Cette analyse comparative du domaine catalytique de près de 170 subtilases a permis de les subdiviser en six sous-familles. De cette étude, il ressort que SKI-1 serait plus proche de la pyrolysine que de la kexine. Il serait également phylogénétiquement plus proche de la subtilisine que les PCs (Fig.1). Ces différences étaient de bon augure.

1.4 Analyse comparative de SKI-1 et des PCs. Aspects structuraux et fixation du substrat

Les différents domaines qui caractérisent SKI-1 et d'autres protéases à serine de type subtilisine/kexine sont représentés schématiquement sur la figure 2. On compte aujourd'hui huit enzymes de type subtilisine/kexine chez les mammifères. Elles se caractérisent, dans la plupart des cas, par la présence de quatre grands domaines distincts : i) un peptide signal, ii) un propeptide, iii) un domaine catalytique et iv) le domaine P. Une très grande variabilité des éléments structuraux est également observée dans la région C-terminale. Cette variabilité reflète bien les délétions et les insertions subies au cours de l'évolution. De la subtilisine qui ne compte que 343 aa, on a aujourd'hui des enzymes tels SKI-1 qui compte pas moins de 1053 aa. Ces insertions laissent également apparaître des domaines aussi inusités pour un enzyme que le domaine de récepteur de cytokine chez SKI-1.

La présence de peptide signal laisse clairement supposer l'entrée de ces enzymes dans les voies sécrétoires (constitutives ou régulées).

Fig.2: Représentation schématique de la structure primaire des PCs et de SKI-1



1.4.1 Le propeptide et le mécanisme d'activation

De nombreux rôles ont été proposés pour ce domaine. Dans beaucoup de cas, le prosegment est un chaperon intramoléculaire (Inouye, 1991; Shinde et al., 1993) qui assiste la protéine à atteindre sa conformation finale. Ce domaine est aussi associé au transport et à la sécrétion de certaines hormones (Stoller et al., 1989). Finalement, pour beaucoup de protéases, telles les subtilases, il a été démontré que le propeptide se comporte également comme un inhibiteur intramoléculaire de l'activité de l'enzyme (Ohta et al., 1991; Boudreault et al., 1998). Il serait un substrat compétitif bloquant l'accès au site actif. L'activation de l'enzyme passe donc par une dissociation du complexe enzyme/prosegment (Power et al., 1986; Ikemura, 1988). Il s'agit là d'un événement séquentiel et temporel qui commence par une autoprotéolyse au site primaire d'activation (Ohta et al, 1990; Germain et al, 1992; Leduc et al, 1992; Rehemtulla et al., 1992). En ce qui a trait aux PCs de mammifères, cette coupure au site primaire du propeptide se fait dans le réticulum endoplasmique (RE), à l'exception du proPC2 où il se fait dans le Golgi/ granules de sécrétion immatures. Elle constituerait une condition nécessaire à la sortie de l'enzyme de ce compartiment cellulaire (Benjannet et al, 1993). La dégradation complète du prosegment a lieu dans les compartiments post-RE. Elle est fonction de l'environnement cellulaire et a lieu, en général, dans les compartiments acides tels le Golgi pour la furine (Anderson et al., 1997) ou les granules de sécrétion pour les PC1 et 2 (Benjannet et al., 1993).

1.4.2 Le domaine catalytique

Le domaine catalytique suit directement le propeptide et s'étendrait sur ~330 aa. L'homologie de séquence entre les membres de la famille, particulièrement autour des résidus de la triade catalytique (Ser, Asp, His; Fig.2), semble la plus élevée dans cette région. Une étude comparative de l'homologie de séquence dans cette région a permis à Siezen et al. (1997) de subdiviser les subtilases en six sous-familles (Fig.1). Il ressort de cette classification que SKI-1 serait plus proche de la pyrolysine que de la kexine.

Dans le cas des PCs, un autre résidu l'asparagine du "oxyanion hole" est également très conservé. Ceci inclut également SKI-1. La conservation de ce résidu tiendrait compte du rôle important qu'il joue dans la stabilisation du "oxyanion hole" dans l'état de transition tétraédrique (Fig.5) (Brian et al., 1986). En fait, ce résidu serait impliqué dans la formation

d'un pont hydrogène avec le groupement carbonyle de l'aa en position P1 du substrat. Le remplacement de ce résidu par Leu (Asn → Leu) cause une diminution importante de la constante bimoléculaire k_{cat} / K_m (Brian et al., 1986). Le seul PC à ne pas avoir conservé cet aa demeure PC2. Dans ce dernier, il serait remplacé par un résidu aspartique qui est impliqué dans l'interaction PC2/7B2 (Benjannet et al., 1998). Cette liaison de 7B2 à PC2 pourrait, à certains égards, compenser pour la perte du résidu Asn par rapport à la cinétique d'hydrolyse des substrats. Il est à noter que PC2, le membre de la famille à avoir subi une mutation à cette position, est également le seul qui a besoin d'un partenaire.

1.4.3 Le Domaine P ou Homo B-Domaine

Il s'agit d'une région de ~ 140 aa qui suit immédiatement le domaine catalytique. Ce domaine caractérise les PCs. Pour SKI-1, de même que chez toutes les autres protéases à serine de type subtilisine, il est absent (Lipkind et al., 1997). Il fut identifié chez la kexine et la furine respectivement par Wilcox et Fuller (1991) et Hatsuzawa et collaborateurs (1992). Ce domaine est associé au bon repliement, à la stabilisation de la structure tridimensionnelle, à la liaison du calcium et à la sensibilité aux variations de pH de l'enzyme (Zhou et al., 1998). En ce sens son intégrité serait essentielle à l'activité enzymatique. Ceci fut récemment confirmé dans le cas de PC7 où une délétion de quelques résidus en C-terminal de ce domaine cause une accumulation du zymogène de cet enzyme dans un compartiment cellulaire non encore bien défini.

Un motif RGD de reconnaissance des intégrines est très conservé dans ce domaine pour la plupart des PCs. Cependant, ce motif n'est pas impliqué dans l'interaction avec les intégrines. Plutôt, il joue un rôle important dans le transport cellulaire de l'enzyme (Rovère et al., 1999). À titre d'exemple, une mutation dans ce motif empêche PC1 de rentrer dans les granules de sécrétion. Il en résulte également une dégradation précoce d'une certaine quantité d'enzyme (Lusson et al., 1997). Il est à noter que ce motif n'existe pas chez SKI-1.

1.4.4 D'autres éléments dans le domaine C-terminal

Les PCs se différencient par la très grande diversité des éléments structuraux dans ce domaine. On peut noter la présence chez la furine, PACE4 et PC5 d'un domaine riche en Cys dont l'importance reste encore à être définie. Aussi, certains PCs (Furine, PC7, PC5B) et

SKI-1 contiennent également une séquence riche en aa hydrophobes s'apparentant à un domaine transmembranaire. Ce domaine est en général suivi d'une queue cytoplasmique. Cette queue cytoplasmique serait essentielle à l'entrée de certaines protéines, dont la furine, la PAM, dans les endosomes. Pour la furine, l'internalisation de la surface cellulaire vers les endosomes se fait suite à une phosphorylation dans ce domaine. Un mécanisme différent ramène la PAM dans les endosomes. Dans ce dernier cas, cette queue cytosolique est très riche en aa basiques et interagirait avec P-CIP, une protéine de transport vers les endosomes. Une queue cytosolique riche en aa basiques est aussi constatée chez SKI-1.

On retrouve aussi dans la région C-terminale de SKI-1, un motif de récepteur de cytokine (Nagase et al., 1995; article 1). Pour l'instant, il n'existe pas encore d'évidence que SKI-1 pourrait jouer un rôle de récepteur.

1.4.5 Mécanisme de fixation du substrat aux subtilases

La modélisation moléculaire basée sur l'homologie de séquence dans le domaine catalytique et les structures cristallographiques connues ont permis à Siezen et Leunissen (1997) de définir les sites de liaison du substrat aux subtilases (Fig.3). Ce modèle théorique, si valide, permet de prédire les types d'aa reconnus par les enzymes membres de cette famille. Les résidus formant les sites S1 et S4 de fixation du substrat, pour certains d'entre eux, sont présentés dans le tableau I. Il ressort que la furine possède un grand nombre de résidus négativement chargés au niveau des sites S1 et S4. Ceci est consistant avec les évidences expérimentales qui démontrent que des aa basiques en P1 et P4 (ou P6, P8) sont essentiels à l'hydrolyse d'un substrat par cet enzyme.

SKI-1 se distingue par une prédominance des aa hydrophobes en S4 et des aa ayant une chaîne latérale polaire ou chargée en S1. Il en découle donc que les forces de Van Der Waals seraient responsables de l'interaction substrat/enzyme en S4. Cependant en S1, les ponts hydrogènes et les interactions électrostatiques devraient prédominer. Dans ce cas-ci, une étude extensive de la spécificité de SKI-1 permettra dans un avenir rapproché de tester la validité du modèle.

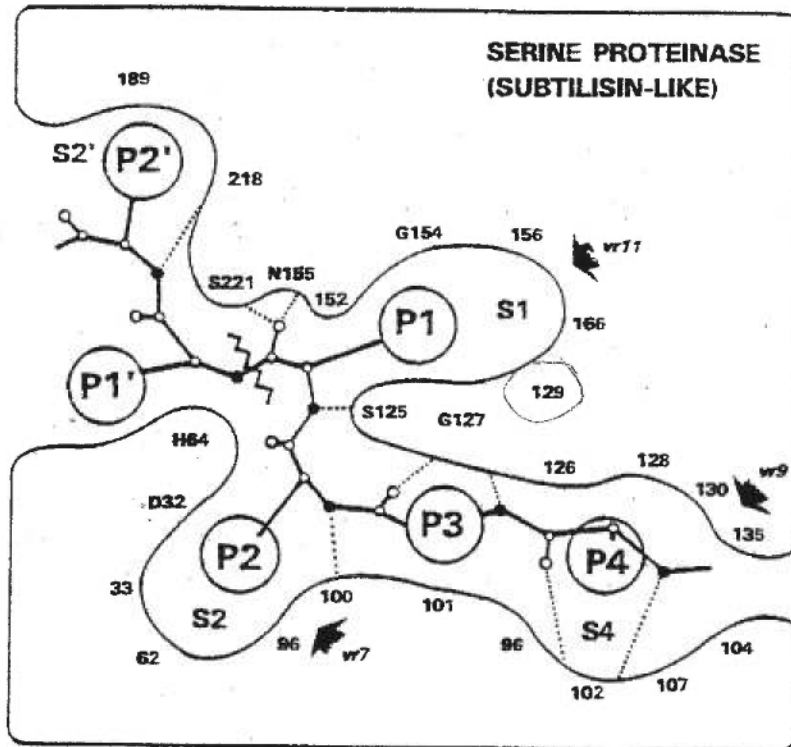


Fig.3: Sites de liaison du substrat/inhibiteur aux protéases à serine de type subtilisine. Les numéros des aa sont ceux de la subtilisine BPN. L'alignement des séquences dans l'article permet de déterminer les aa correspondants chez d'autres subtilases. Représentation adaptée de Siezen et Leunissen (1997).

| Endopeptidases | Sites de fixation du substrat | | | |
|----------------|--|------------------|-------|------------|
| | Triade Catalytique | Oxyanion | S1 | S4 |
| HSKI-1 | D ₂₁₈ H ₂₄₉ S ₄₁₄ | N ₃₃₁ | PGNDN | FSTFIGGPDF |
| Hfurine | D ₄₆ H ₈₇ S ₂₆₁ | N ₁₈₈ | EGNGD | LVDEWGPEDL |
| Kexine | D ₆₆ H ₁₂₉ S ₂₇₅ | N ₂₆₅ | AGNGD | LITEWGPADL |
| Subtilisin BPN | D ₃₂ H ₆₄ S ₂₂₁ | N ₁₅₅ | AGNEG | LGYILGGPSA |

Tableau I: La position des aa en S1 et S4 a été définie selon la subtilisine BPN par alignement des sites catalytiques. Il s'agit respectivement des aa 129, 154-156 et 166 pour S1 et 102, 104, 107, 126-130 et 134 pour S4.

L'alignement des séquences montre également une très grande conservation de résidus ayant une chaîne latérale acide aux positions 33, 61, 97, 104, 107, 129, 130, 131, 161, 166, 191 (par rapport à la subtilisine) chez toutes les subtilases reconnaissant les aa basiques. Les travaux de modélisation (Van de van et al., 1990; Creemers et al., 1993; Siezen et al., 1994; Lipkind et al., 1995 et 97; Perona et Craig, 1995) laissent supposer que ces résidus acides pourraient stabiliser le complexe enzyme/substrat. Cependant, SKI-1 et la subtilisine n'ont conservé aucun de ces résidus acides à des positions correspondantes.

1.4.6 Sites de liaison du Calcium

On a pu dénombrer quatre sites de liaison de calcium aux subtilases à partir des structures cristallines des subtilisine, thermitase et protéinase K (Ca1, Ca2, Ca3, Ca4; Siezen et al., 1997). La constante de dissociation du Ca²⁺ aux sites de type Ca1 est inférieure à 10⁻¹⁰ M. De ce fait, Ca1 est considéré comme un site de forte affinité pour le calcium (Briedigkeit et Frömmel, 1989). La liaison du Ca²⁺ à ce site se fait par l'intermédiaire des groupements carbonyl et carboxy des chaînes latérales de l'asparagine, l'acide aspartique, la glutamine et l'acide glutamique. On retrouve ce site chez toutes les enzymes proches de la kexine dont les PCs. Par contre les enzymes membres de la sous-famille de la pyrrolisine comme SKI-1 ne semblent pas posséder ce genre de site. Les PCs possèdent également des sites d'affinité intermédiaire (Ca2) pour le calcium. En plus des aa cités plus haut, les chaînes latérales des

serine, thréonine sont aussi impliquées dans ce type de liaison. La constante de dissociation du Ca^{2+} de ce site est d'environ 10^{-10} M. Un résidu Lys ou Arg en position 94 stabiliserait cette liaison. L'alignement de séquence ne permet pas non plus d'observer ce genre de site chez les pyrolysines dont SKI-1 fait partie.

Les types Ca3 et Ca4, $10^{-4} \text{ M} < K_D > 10^{-7} \text{ M}$, sont très difficiles à prédire. À ces sites, seulement les chaînes latérales de deux ligands sont responsables de la liaison du Ca^{2+} .

Les études de caractérisation *in vitro* des enzymes recombinantes de la kexine (Mizuno et al., 1989), la furine (Molloy et al., 1992), PC7 (Munzer et al., 1997) ont permis de confirmer l'existence des sites de liaison du calcium chez les protéases à serine de type subtilisine. Dans certains, le calcium est indispensable même à l'activité protéolytique

1.5 Mécanisme réactionnel des protéases à serine

Ce mécanisme est commun à toutes les protéases à serine et implique la participation des trois aa importants du domaine catalytique (Asp, His, Ser). Dans ce mécanisme, l'acide aspartique (à travers son groupement carboxylique) semble essentiellement joué un rôle d'acide et de base. Dans un premier temps, il transfère son ion hydrogène au groupement imidazole de l'histidine. L'histidine ainsi chargée positivement peut activer le groupement carbonyle du substrat. Cette activation du groupement carbonyle le rend beaucoup plus susceptible à une attaque nucléophile. En ce sens, contrairement à ce qui est indiqué sur le schéma, la *déprotonation* de la fonction alcool de la serine ne serait pas une condition nécessaire à l'attaque nucléophile. Cette *déprotonation* nécessite l'utilisation de bases fortes puisque le pKa d'un groupement alcool est d'environ 17. Le rôle véritable de l'imidazole dans ce contexte pourrait être la de-acidification de IT-1. L'attaque du groupement carbonyle activé du substrat par la serine du site actif conduit à la formation d'un intermédiaire tétraédrique très instable dans lequel le lien amide ($-\text{C}(\text{O})-\text{N}-$) du substrat sera détruit. Cet intermédiaire peut, à certains égards, être perçu comme un état de transition. L'ester activé qui en résulte (EA) est par la suite hydrolysé. Cette hydrolyse conduit à la libération du substrat clivé et régénère en même temps l'enzyme actif. Un autre cycle catalytique peut ainsi commencer. Il faut remarquer que toutes les étapes sont réversibles. Le mécanisme présenté ici ne se veut pas parfait. L'objectif était la représentation des grandes étapes de la catalyse enzymatique et définir le rôle des aa clés dans ce contexte.

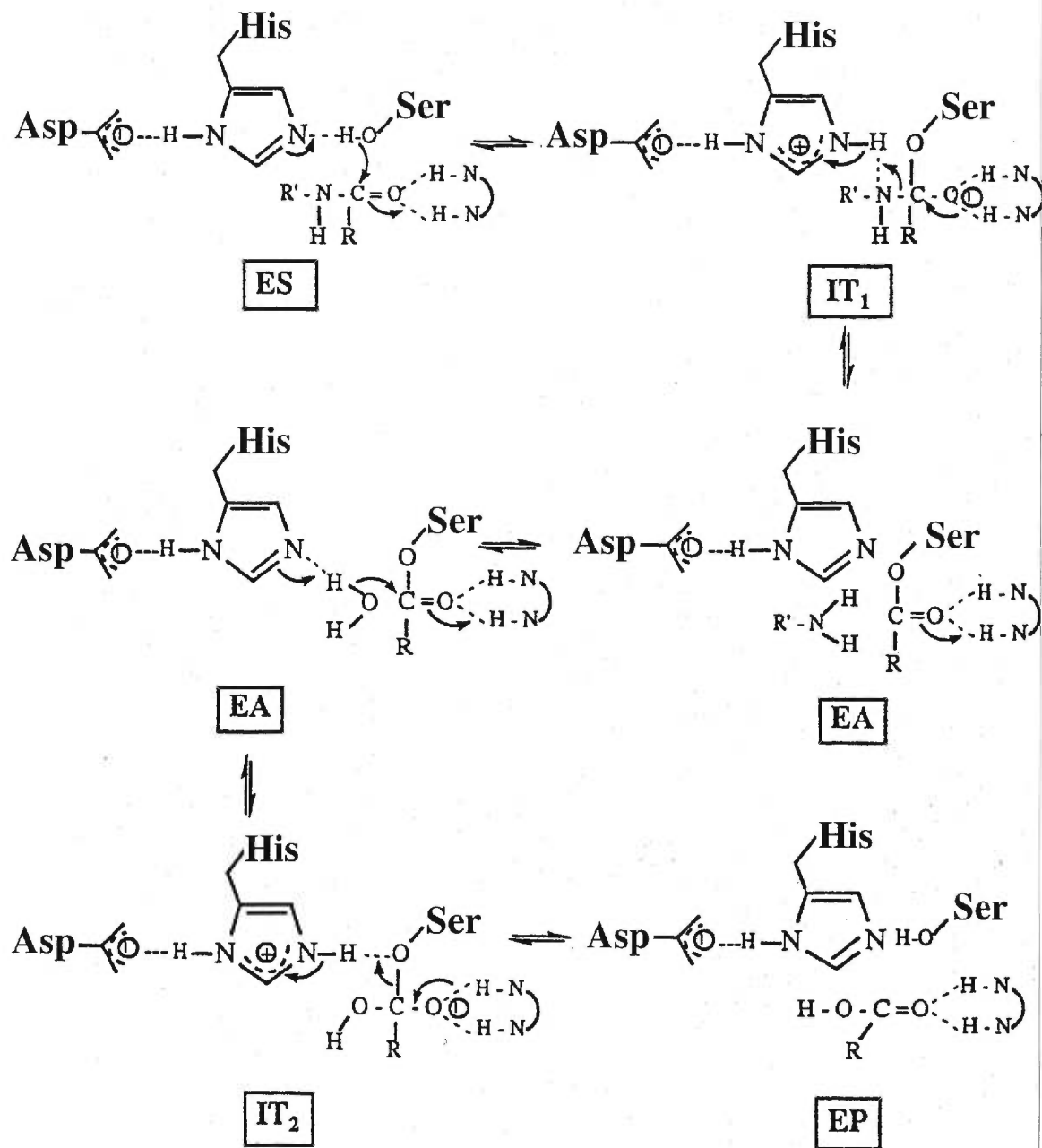


Fig.4 : Mécanisme réactionnel des protéases a serine. Catalyse enzymatique et intermédiaires réactionnels. IT, intermédiaire tétraédrique, ES, complexe enzyme/substrat; EA, acyl-enzyme, EP, complexe enzyme/produit. (Figure tirée de la thèse de François Jean, 1995)

1.6 Inhibition des PCs

Le développement d'inhibiteurs spécifiques aux PCs a été et demeure toujours un domaine intensif de recherche compte-tenu de l'implication de ces enzymes dans certaines pathologies comme les infections virales. Pour ce faire, plusieurs avenues ont été explorées. La première approche développée par Stieneke-Grober et al consistait à modifier de façon irréversible le site actif de l'enzyme. Pour ce faire, ils ont attaché à une séquence consensus reconnue par la furine (Decanoyl-REKR) un groupement chlométhylcétone. Cette classe d'inhibiteurs s'est révélée très utile contre la furine à la fois *in vitro* et *ex vivo*. Cependant certains inconvénients liés à l'irréversibilité du processus d'inhibition, comme la toxicité, étaient prévisibles. Pour palier à ces problèmes, d'autres générations d'inhibiteurs, cette fois-ci réversibles, ont été développés. Ainsi Angliker (1994) a inséré un groupement méthylène à la place du -NH- de l'amide entre le P1 et le P1' du substrat. De même Basak et al. (1994 et 95) ont remplacé le P1' du substrat par un aa non naturel. Si ces inhibiteurs peptidiques se sont révélés utiles pour des études *in vitro*, leur efficacité *ex vivo* reste encore à démontrer.

La seconde grande classe d'inhibiteurs à être étudiée est celle de l'utilisation des protéines entières. Ceci commence par les travaux de Bathurst et al (1987) qui démontraient qu'un mutant du site actif de α_1 -antitrypsin Pittsburgh (α_1 -PIT) (Met en Arg) pouvait inhiber l'activité de Kexp2p *in vitro*. Depuis, un autre mutant de α_1 -PIT (α_1 -PDX, Anderson et al., 1993) s'est révélé très utile dans les études *ex vivo et in vitro* d'inhibition des PCs. Le seul problème associé à cet inhibiteur est celui de la spécificité, en ce sens qu'il peut inhiber plusieurs PCs en même temps (Benjannet et al., 1997, Jean et al., 1998).

La dernière classe d'inhibiteurs présentement à l'étude est celle des prosegments. Certains travaux laissent clairement entrevoir que le prosegment de chaque enzyme pourrait bien être un inhibiteur spécifique de son activité (Boudreault et al., 1998, aussi voir discussion dans l'article 2). On espère donc qu'une meilleure compréhension du mécanisme d'inhibition de l'enzyme par le prosegment permettra éventuellement de développer des inhibiteurs efficaces des PCs sans les inconvénients précédemment évoqués.

1.7 Protéolyse et Niveau de cholestérol cellulaire

1.7.1 Les protéines liant les éléments de réponse aux stérols (SREBPs)

Les SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins) jouent un rôle clé dans la synthèse et le métabolisme du cholestérol. Jusqu'à aujourd'hui, trois d'entre eux ont été identifiés. Il s'agit notamment de SREBP1a, SREBP1c (aussi appelé ADD1) et SREBP-2 (Hua et al., 1995). Les deux premiers sont synthétisés à partir du même gène par utilisation de deux promoteurs différents alors que le deuxième est obtenu à partir d'un autre gène.

Les SREBPs sont des protéines membranaires d'environ 1150 aa. Ils sont composés de trois grands domaines qui, dans le cas de SREBP-2, sont présentés sur la fig.5 (Brown et al., 1997). Ces domaines sont : le N-terminal (~ 480 aa), le C-terminal (~ 590 aa) qui baignent tous les deux dans le liquide cytosolique et le domaine central qui permet à la protéine de s'ancrer dans la membrane. À ce stade, nous allons définir les éléments importants que l'on retrouve dans ces différents domaines :

a) Le domaine N-terminal : Il s'agit du domaine actif de la protéine et serait en fait un facteur de transcription de la famille des *basic-loop-helix-leucine zipper* (bHLH-zip). Il renferme deux éléments importants :

vers son extrémité N-term (donc le N-term du N-term lui même) on retrouve une séquence riche en aa acides qui son impliqués dans le recrutement des co-activateurs de la transcription (CPB par exemple). La longueur de cette séquence varie d'un SREBP à l'autre et elle serait critique. En effet, plus la séquence est longue, meilleure est l'activation de la transcription par le SREBP en question.

Le domaine N-term renferme aussi un motif bHLH-zip qui permet la dimérisation, la translocation dans le noyau et la liaison à l'ADN. À l'intérieur de ce motif, on retrouve chez tous les facteurs de transcription de la famille des bHLH, une séquence riche en aa basiques. Les SREBPs se distinguent des autres par la seule substitution d'un résidu Arg par une Tyr dans cette séquence. Cette substitution permet aux SREBPs de lier spécifiquement une séquence non palindromique d'ADN (TCACCCACT) appelée les éléments de réponse aux stérols (SREs) (Smith et al., 1988). Ce décanucléotide est présent dans les "enhancers" des gènes codant pour les lipoprotéines de faible densité (LDL), le récepteur du 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzymeA (HMG-CoA) synthase (Edwards et al., 1998).

Ce décanucléotide n'est cependant pas la seule séquence reconnue par les SREBPs. En effet dans certains promoteurs ne possédant pas ce type de séquences, les SREBPs se lient à d'autres séquences nucléotidiques qui restent encore à être définies (Magana et al., 1996).

b) Le domaine central : Il est composé de deux séquences d'aa hydrophobes qui permettent à la protéine de s'ancrer dans la membrane du RE en projetant vers le cytoplasme de ce compartiment une boucle de 31 aa. Cette boucle sépare les deux séquences hydrophobiques et contient le site de coupure de S1P/SKI-1. Le site de coupure de S2P, quant à lui, est localisé dans le premier domaine transmembranaire (une prochaine section discutera de ces sites de coupure).

c) Le domaine C-term : Il interagirait avec SCAP. De concert avec ce dernier, il détermine le niveau de cholestérol dans une cellule. Il contiendrait donc des séquences permettant l'interaction protéine-protéine qui ne sont pas encore définies. Tout comme le domaine N-term., ce dernier baigne dans le liquide cytosolique.

1.7.2 Clonage de S1P/SKI-1 et S2P : la protéolyse des SREBPs

Comme illustré à la fig.5, la translocation du domaine N-terminal des SREBPs dans le noyau nécessite la protéolyse à deux sites distincts. Les coupures ont lieu respectivement au site 1 dans la boucle de 31 aa à l'intérieur du RE et au site 2 dans le premier domaine transmembranaire. Dans les deux cas, il s'agit de protéolyse spécifique en aval de résidus Leu. La protéase responsable de la coupure au site 2 (S2P) a été identifiée en utilisant des approches génétiques par Rawson et al (1997). Le gène de S2P code pour une protéine de 519 aa contenant la séquence consensus HEXXH. Cette séquence forme en général le site actif des métalloprotéases. Cependant il n'existe pas encore d'évidence biochimique que S2P peut couper SREBP au site 2. L'implication de S2P dans la protéolyse au site 2 des SREBPs repose sur le fait qu'un mutant des cellules M19 manquant une copie fonctionnelle de ce gène peut couper les SREBPs au site 1 mais pas au site 2. La coupure des SREBPs à ces deux sites étant nécessaires à la biosynthèse du cholestérol, ces cellules ne peuvent donc survivre en l'absence de cholestérol exogène.

Le gène codant pour la protéase clivant au site 1 (S1P) fut isolé en soumettant les cellules CHO transfectées avec l'ADNc de S2P à une double ronde de mutations. Après une première ronde de mutation, les cellules ne possédant qu'une seule copie de S1P (suite à

l'inactivation de la deuxième) étaient sélectionnées en les incubant avec du LDL dans lequel un rapporteur fluorescent (pyrène-méthyl cholestéryloleate; PMCA-oléate) avait été incorporé. Les cellules présentant un taux faible d'endocytose des LDL (voir section 1.6.1), donc une fluorescence moins intense liée à la présence d'une seule copie active de S1P, étaient sélectionnées et soumises à une deuxième ronde de mutation. À cette deuxième étape, les cellules étaient traitées à l'amphotéricine, un antibiotique formant un complexe avec le cholestérol membranaire. Les cellules résistantes à ce traitement étaient alors soumises à des transfections avec une banque d'ADNc visant à restaurer l'activité S1P. Pour mesurer l'activité de S1P, une protéine de fusion du domaine C-terminal de SREBP-2 contenant le site RSVL de coupure et de l'akaline phosphatase du placenta (PALP) était utilisée. Cette approche permet l'isolation d'un ADNc codant pour S1P et dont la séquence en nucléotide était à 97% identique à SKI-1.

1.7.3 La protéolyse des SREBPS et le niveau de cholestérol cellulaire :

Lorsque le niveau de stérols est très bas dans la cellule, le domaine N-terminal des SREBPs est relâché de la membrane par protéolyse séquentielle aux deux sites définis plus haut (Sakai et al., 1996). Ce fragment N-terminal chemine alors vers le noyau où il va se lier aux SREs et active la synthèse de multiple gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol, des acides gras, des triglycérides et l'endocytose du cholestérol. L'activation de la synthèse du HMG-CoA synthase, HMG-CoA réductase, farnésyl diphosphate synthase et squalene synthase sont parmi les mieux caractérisés (Edwards et al., 1998). La surexpression des SREBPs augmente également le niveau d'ARNm des enzymes impliqués dans la synthèse des lipides comme celles générant l'acetyl CoA ou les pyridines réduits (Shimomura et al., 1998).

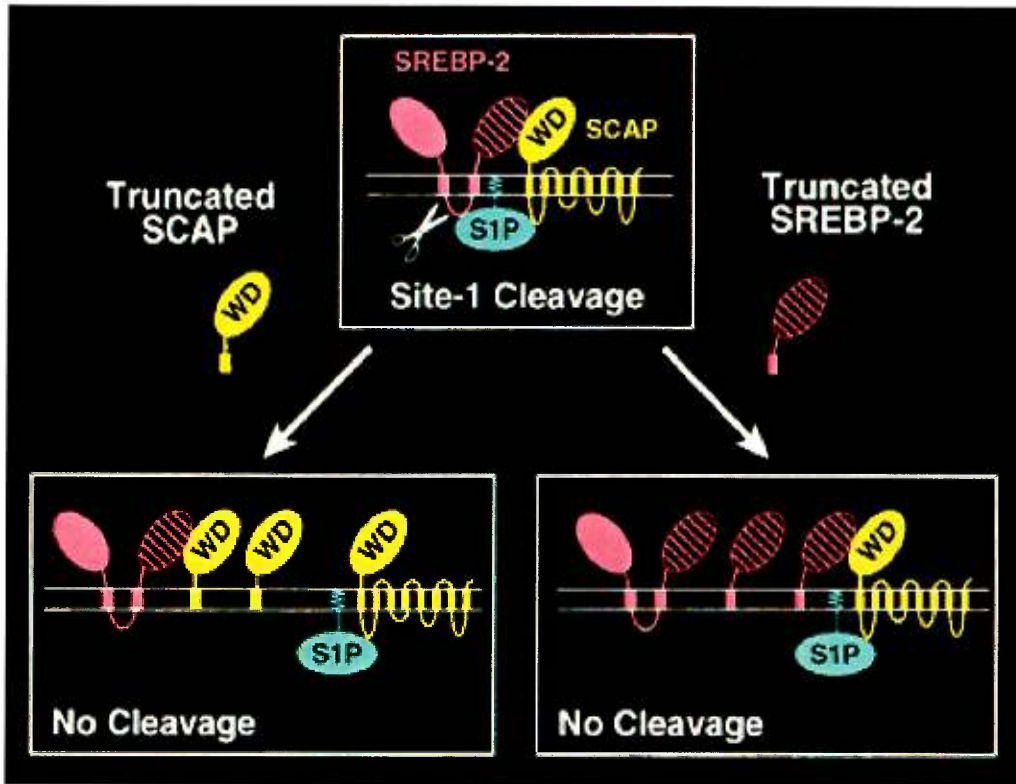


Fig.5: SKI-1/ S1P et la régulation du métabolisme du cholestérol. Cette figure montre le rôle crucial joué par les domaines C-term des SREBPs et de SCAP dans la régulation du métabolisme du cholestérol. Les domaines des SREBPs ainsi les sites de coupure y sont également représentés. Représentation adaptée de Sakai et al. (1998)

Lorsqu'il y a accumulation de cholestérol dans la cellule, les SREBPs ne sont plus coupés. Ils restent donc ancrés dans la membrane. En même temps on assiste également à une dégradation de toutes les régions N-terminales ayant déjà été relâchées. Cependant, un niveau basal des enzymes impliqués dans la biosynthèse des acides gras est maintenu (Wang et al.1994).

1.7.4 SCAP et le mécanisme d'arrêt de la biosynthèse du cholestérol

Ni SREBP, ni les protéases impliquées dans sa relâche de la membrane ne contiennent de domaines de senseurs du niveau de cholestérol. Pourtant, comme on l'a vu dans la section précédente, l'accumulation d'un certain niveau de cholestérol dans la cellule inhibe la protéolyse des SREBPs et par là même la biosynthèse du cholestérol. Alors comment ce principe fonctionne?

a) SCAP : structure et fonction

SCAP est une autre protéine membranaire de 1276 aa constituée de deux domaines distincts (Hua et al., 1996) (Fig.5) :

Une région N-terminale de ~730 aa constituée de huit séquences riches en aa hydrophobes. Ces séquences, à l'instar de la protéine G par exemple, permettent à SCAP de s'ancrer dans la membrane du ER.

La région C-terminale de ~ 550 aa, quand à elle, contient des "WD-repeat". Ces "WD-repeat" sont généralement impliqués dans l'interaction protéine-protéine. Dans ce cas, certaines expériences suggèrent qu'ils sont responsables de la formation d'un complexe stable SCAP/SREBPs (Sakai et al., 1998). En effet, la surexpression d'un mutant de SREBP ou de SCAP dans lequel le domaine C-terminal a été enlevé prévient la protéolyse des SREBPs (Fig.5). À l'issue de ce résultat, l'hypothèse fut émise par le groupe de Brown que les domaines C-term de SREBP et de SCAP interagissent. Cette interaction permettrait aux SREBPs d'adopter une conformation qui peut être reconnue par S1P/SKI-1. Le modèle (Fig.5) laisse également supposer que S1P/SKI-1, afin d'hydrolyser les SREBPs au site 1, doit également interagir avec SCAP. Le motif qui médierait l'interaction dans ce dernier cas reste encore à être défini. Mais si ce modèle s'avérait vrai, le domaine de récepteur de cytokine dans le C-term de SKI-1 pourrait bien jouer un rôle.

b) Le cholestérol et la modulation de l'interaction SCAP/SREBPs :

Les oxystérols, comme le 25-hydroxycholestéol, ont permis d'établir un lien direct entre SCAP et le niveau de cholestérol cellulaire. Les oxystérols sont en fait des inhibiteurs efficaces de la synthèse du cholestérol (Brown et al., 1997). Par ce fait, ils causent facilement la mort des cellules. Cependant deux souches de mutants génétiques des cellules CHO de hamster ont acquis la capacité de survivre en présence de ces oxystérols (Metherall et al., 1991). Le mécanisme de survie du premier type de mutant repose sur le fait qu'il exprime un mutant du domaine C-terminal de SREBP. Ce mutant qui ne possède ni un domaine c-term., ni de domaine transmembranaire est directement acheminé vers le noyau où il active constitutivement la synthèse de cholestérol. La caractérisation du deuxième type de mutant fut des plus utiles (Hua et al., 1996). Dans ce cas ci, il fut découvert qu'une mutation de l'Asp 443 en Asn dans SCAP était à l'origine de la résistance aux oxystérols. À l'image du premier type, ces cellules synthétisaient également constitutivement le cholestérol. Ces résultats suggèrent que SCAP contiendrait un élément de sensibilité aux stérols lui permettant d'activer la synthèse de cholestérol lorsque le niveau cellulaire est bas et de la réprimer lorsqu'il y a accumulation.

1.8 SKI-1 et la maturation des précurseurs

Très peu de données sont à présent disponibles sur la spécificité de SKI-1. Les seuls résultats disponibles proviennent du travail de Duncan et collaborateurs (1997) sur la mutagenèse du site de maturation de SREBP-2 bien avant le clonage de SKI-1. À la lumière de cette étude dont les résultats sont présentés à la fig.6, il apparaît que le P1 Leu peut-être remplacé par des aa tels Ala, Arg mais pas par Val ou Glu. Seules la Lys et Arg sont acceptables en P4. Cependant des traces d'activité sont observables en présence d'aa acides comme Asp, Glu en P4. L'aa en P1' ne semble pas jouer un rôle important dans le clivage puisqu'il peut-être remplacé par un certain nombre de résidus sans affecter l'activité.

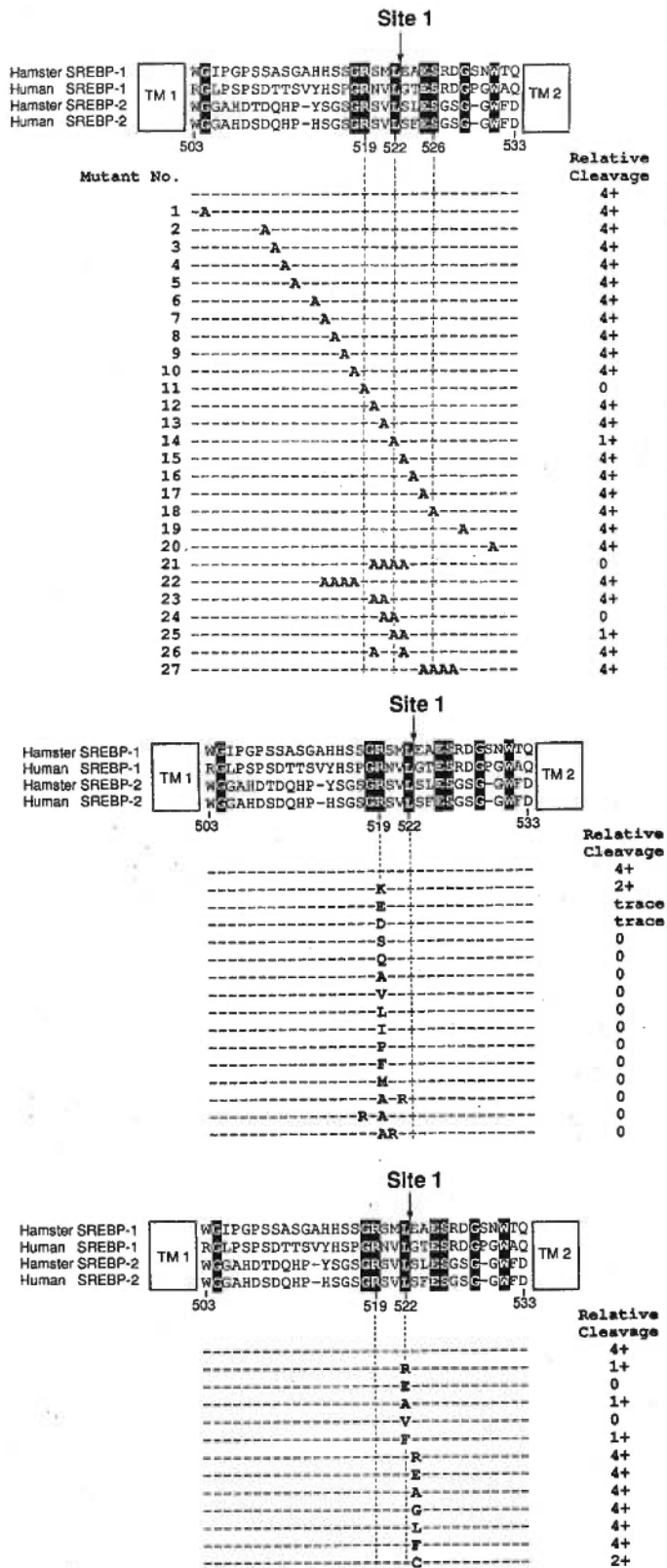


Fig.6: Mutagenèse dirigée du site clivage des SREBPs. Adaptée de Duncan et al. (1998)

1.8 BUTS DU PROJET

Comme indiqué plus haut, le cDNA de SKI-1 fut isolé en 1995 par Nagase et collaborateurs. L'analyse comparative de la séquence primaire en aa par ce groupe, de même que par Siezen et Leunissen (1997) indiquait que SKI-1 pouvait-être une protéase de type subtilisine. Cependant, au moment d'entreprendre ce travail, il n'existait pas d'évidences expérimentales pouvant corroborer cette hypothèse. Les objectifs de ce projet étaient donc les suivants :

- 1- Démontrer clairement que SKI-1 est un enzyme et déterminer sa spécificité de coupure.
- 2- Par des études *in vitro*, déterminer certaines propriétés physico-chimiques importantes (dépendance au pH et au calcium, profile d'inhibiteur..)
- 3- Étudier la localisation cellulaire afin d'élucider des substrats potentiels.
- 4- Étudier la distribution tissulaire afin d'obtenir de l'information sur le rôle potentiel de l'enzyme dans la physiologie normale.
- 5- Étudier le mécanisme d'activation de l'enzyme.
- 6- Établir le rôle du prosegment.

L'atteinte de ces objectifs a nécessité la collaboration de plusieurs autres membres du groupe. Comme le témoigne les articles présentés dans ce mémoire

PREMIER ARTICLE

Originalité du travail

La réalisation de ce travail (premier article) a nécessité des contributions directes ou indirectes de plusieurs membres du laboratoire. Ma participation à la publication de cet article se résume en ces points :

- Contribution à la préparation des vecteurs d'expression de l'enzyme.
- Montrer *in vitro* que le proBDNF est un substrat de SKI-1 et établir un profil préliminaire d'inhibiteurs (Fig.7 A et B) .
- Purification de tous les peptides synthétiques et test enzymatique. Ce travail n'est pas présenté sous forme de tableau mais il est largement discuté dans la section **DISCUSSION**.

Ces deux derniers points ont été déterminants. Ils permettaient de conclure clairement que SKI-1 est un enzyme. De plus ils établissaient de façon claire le rôle que jouait SKI-1 dans la coupure du pro-BDNF en 28 kDa.

Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization

NABIL G. SEIDAH*[†], SEYED J. MOWLA*[‡], JOSÉE HAMELIN*, AIDA M. MAMARBACHI*, SUZANNE BENJANNET[§], BARRY B. TOURÉ*, AJAY BASAK*[¶], JON SCOTT MUNZER*, JADWIGA MARCINKIEWICZ[§], MEI ZHONG*, JEAN-CHRISTOPHE BARALE*^{||}, CLAUDE LAZURE***, RICHARD A. MURPHY[‡], MICHEL CHRÉTIEN^{§¶}, AND MIECZYSLAW MARCINKIEWICZ[§]

Laboratories of *Biochemical and [§]Molecular Neuroendocrinology and **Structure and Metabolism of Neuropeptides, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West, Montreal, QC, Canada H2W 1R7; and [‡]Center for Neuronal Survival, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada H3A 2B4

Communicated by Henry G. Friesen, Medical Research Council of Canada, Ottawa, Canada, December 16, 1998 (received for review October 2, 1998)

ABSTRACT Using reverse transcriptase–PCR and degenerate oligonucleotides derived from the active-site residues of subtilisin/kexin-like serine proteinases, we have identified a highly conserved and phylogenetically ancestral human, rat, and mouse type I membrane-bound proteinase called subtilisin/kexin-isozyme-1 (SKI-1). Computer databank searches reveal that human SKI-1 was cloned previously but with no identified function. *In situ* hybridization demonstrates that SKI-1 mRNA is present in most tissues and cells. Cleavage specificity studies show that SKI-1 generates a 28-kDa product from the 32-kDa brain-derived neurotrophic factor precursor, cleaving at an RGLT↓SL bond. In the endoplasmic reticulum of either LoVo or HK293 cells, proSKI-1 is processed into two membrane-bound forms of SKI-1 (120 and 106 kDa) differing by the nature of their N-glycosylation. Late along the secretory pathway some of the membrane-bound enzyme is shed into the medium as a 98-kDa form. Immunocytochemical analysis of stably transfected HK293 cells shows that SKI-1 is present in the Golgi apparatus and within small punctate structures reminiscent of endosomes. *In vitro* studies suggest that SKI-1 is a Ca²⁺-dependent serine proteinase exhibiting a wide pH optimum for cleavage of pro-brain-derived neurotrophic factor.

Limited proteolysis of inactive precursors to produce active peptides and proteins generates biologically diverse products from a finite set of genes. Most often, such processing occurs at either monobasic or dibasic residues as a result of cleavage by mammalian serine proteinases related to bacterial subtilisin and yeast kexin (1, 2). These enzymes, known as proprotein convertases (PCs), cleave a variety of precursors at the consensus (R/K)-(Xaa)_n-R↓ sequence, where Xaa is any amino acid except Cys and *n* = 0, 2, 4, or 6 (1–3).

Less commonly than cleavage at basic residues, bioactive products also can be produced by limited proteolysis at amino acids such as L, V, M, A, T, and S (3). This type of cellular processing has been implicated in the generation of bioactive peptides such as α- and γ-endorphin (4), the C-terminal glycopeptide fragment 1–19 of provasopressin (5), platelet factor 4 (6), the metalloprotease ADAM-10 (7), site 1 cleavage of the sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) (8), as well as in the production of the Alzheimer's amyloidogenic peptides Aβ40, -42, and -43 (9). Processing of this type occurs either in the endoplasmic reticulum (ER) (8), late along

the secretory pathway, within secretory granules (4, 5), at the cell surface, or in endosomes (6, 7, 9). The proteinases responsible for these cleavages are not yet identified.

We hypothesized that an enzyme (or enzymes) distinct from, but related to, PCs may generate polypeptides by cleavage at nonbasic residues. To test that idea, we employed a reverse transcriptase–PCR (RT-PCR) strategy similar to the one used to identify the PCs (10), except that we used degenerate oligonucleotides closer to bacterial subtilisin than to yeast kexin. This resulted in the isolation of a cDNA fragment encoding a putative subtilisin-like enzyme from human cell lines. This partial sequence was identical to a segment of a human myeloid cell-derived cDNA reported by Nagase *et al.* (11). Preliminary results demonstrated that this putative proteinase cleaves pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) (ref. 12; S.J.M. N.G.S., and R.A.M., unpublished results).

In this paper, we show that the sequences of rat, mouse, and human orthologues of this putative type I membrane-bound subtilisin-kexin-isozyme, which we called SKI-1, exhibit a high degree of sequence conservation. Tissue distribution analysis by both Northern blots and *in situ* hybridization revealed that SKI-1 mRNA is widely expressed. A vaccinia virus recombinant and a stable transfectant of human SKI-1 in HK293 cells allowed the analysis of its biosynthesis and intracellular localization. Finally, we present data demonstrating that SKI-1 cleaves at a specific T↓ residue within the N-terminal segment of proBDNF. SKI-1 is thus identified as a mammalian secretory subtilisin/kexin-like enzyme capable of cleaving a proprotein at nonbasic residues.

MATERIALS AND METHODS

PCR and Sequencing. Most RT-PCRs were performed using a Titan One Tube RT-PCR system (Boehringer Mannheim) on 1 μg of total RNA isolated from a human neuronal cell line (IMR-32), mouse corticotrophic cells (AtT20), or rat adrenal

Abbreviations: SKI-1, subtilisin/kexin-isozyme-1; PC, proprotein convertase; ER, endoplasmic reticulum; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; RT-PCR, reverse transcriptase–PCR; vv, vaccinia virus; PDX, α1-antitrypsin Portland; WGA, wheat germ agglutinin; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride.

Data deposition: The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database (accession nos. AF094820 and AF094821).

[†]To whom reprints requests should be addressed.

[¶]Present address: Loeb Health Research Institute, 725 Parkdale Avenue, Ottawa, ON, Canada K1Y 4K9.

^{||}Present address: Unité de Biologie des Interactions Hôtes-Parasites, Unité de Recherche Associée–Centre National de la Recherche Scientifique 1960, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

PNAS is available online at www.pnas.org.

glands. The active-site degenerate primers were as follows: His (sense) 5'-GGICA(C,T)GGIACI(C,T)(A,T)(C,T)(G,T)(T,G)IGCIGG-3' and Ser (antisense) 5'-CCIG(C,T)IACI(T,A)(G,C)IGGI(G,C)(T,A)IGCIACI(G,C)(A,T)IGTICC-3', based on the sequences GHGT(H,F)(V,C)AG and GTS-(V,M)A(T,S)P(H,V)V(A,T)G, respectively. The amplified 525-bp products were sequenced on an automated laser fluorescence DNA sequencer (Pharmacia). To obtain the full-length sequence of rat and mouse SKI-1, we used PCR primers based on the human (11) and mouse sequences, in addition to 5' (13) and 3' (14) RACE amplifications. At least three clones of the amplified cDNAs were sequenced. The GenBank accession numbers of the 3,788-bp mouse mSKI-1 cDNA and 3,895-bp rat rSKI-1 are AF094820 and AF094821, respectively.

Infection, Transfection, and Metabolic Labeling. Human SKI-1 (nucleotides 1–4338) (11) in Bluescript (a generous gift from N. Nomura, Kazusa DNA Research Institute, Chiba, Japan; accession no. D42053) was digested with *Sac*II (nucleotides 122–4338) and inserted into the vector PMJ602, and a vaccinia virus recombinant was isolated. The PMJ602 construct was also digested with 5' *Kpn*I/3' *Nhe*I and cloned into the *Kpn*I/*Xba*I sites of pcDNA3 (Invitrogen), and the cDNA was transfected into HK293 cells by using Lipofectin. A number of stable transfectants resistant to G418 and positive on Western blots using an SKI-1 antiserum (see below) were isolated, and one of them (clone 9), was investigated further. Either vaccinia virus-infected or -transfected cells were pulsed for 20 min with [³⁵S]cysteine and then chased for various times in the presence or absence of either tunicamycin (5 μg/ml) or brefeldin A (2.5 μg/ml). Media and cell lysates were immunoprecipitated with SKI-1 antisera directed against either amino acids 634–651 or 217–233, or a pro-SKI-1 antiserum directed against the prosegment comprising amino acids 18–188 (Fig. 1). Immune complexes were resolved by SDS/PAGE on an 8% polyacrylamide/*N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine gel (15).

Northern Blots, *in Situ* Hybridizations, and Immunocytochemistry. Northern blot analyses (16) were done on total RNA from adult male rat tissues by using either a TRIzol reagent kit (Life Technologies, Gaithersburg, MD) or a Quick Prep RNA kit (Pharmacia) and on poly(A)⁺ RNA of (male + female) rat adult tissues (BIO/CAN, Montreal). The blots were hybridized overnight at 68°C in the presence of [³²P]UTP SKI-1 cRNA probes, which consisted of the antisense of nucleotides 655–1249 of rat SKI-1. For *in situ* hybridization on newborn rats, the same rat sense and antisense cRNA probes were labeled with uridine and cytosine 5'-[γ-³⁵S]thio]triphosphate (1, 16). For immunofluorescence staining we used a rabbit anti-SKI-1 antiserum at a 1:100 dilution and rhodamine-labeled goat anti-rabbit IgGs diluted 1:20 (16). Red SKI-1 immunostaining was compared with green-staining patterns of both fluorescein-labeled concanavalin A (Con A; Molecular Probes), an ER marker, or fluorescein-conjugated wheat germ agglutinin (WGA; Molecular Probes), a Golgi marker (17).

Ex Vivo and *in Vitro* proBDNF Processing. A vaccinia virus recombinant of human SKI-1 (vv:SKI-1) was isolated as described for human proBDNF (vv:BDNF) (15). The vaccinia virus recombinants of α1-antitrypsin Pittsburgh (α1-PIT; vv:PIT) and α1-antitrypsin Portland (α1-PDX; vv:PDX) (18) were generous gifts from G. Thomas (Vollum Institute, Portland, OR). COS-7 cells (4 × 10⁶) were coinfecting with 1 plaque-forming unit (pfu) per cell of vv:BDNF and either the wild-type virus (vv:WT) alone at 2 pfu per cell or with 1 pfu per cell of each virus in the combinations [vv:SKI-1+vv:WT], [vv:SKI-1+vv:PIT], and [vv:SKI-1+vv:PDX]. At 10 h postinfection, cells were pulsed for 4 h with 0.2 mCi of [³⁵S]cysteine/[³⁵S]methionine (DuPont). Media and cell extracts were immunoprecipitated with a BDNF antiserum (ref. 19; provided by Amgen) at 0.5 μg/ml, and the proteins were resolved on SDS/PAGE 13–22% gradient gels (15). [³⁵S]Met-labeled 32-kDa proBDNF and [³H]Leu-labeled 28-kDa BDNF were sequenced as described (20). For *in vitro*

analysis, 32-kDa proBDNF obtained from the media of LoVo cells infected with vv:BDNF was incubated overnight with the shed form of SKI-1 obtained from cells coinfecting with vv:SKI-1 and vv:PDX, either at different pH values or at pH 6.5 in the presence of selected inhibitors: pepstatin (1 μM), antipain (50 μM), cystatin (5 μM), E64 (5 μM), soybean trypsin inhibitor (SBTI, 5 μM), 0.5 M phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) + 50 μM *para*-amino-PMSF (pAPMSF), *o*-phenanthroline (5 mM), and EDTA (10 mM). The products were resolved by SDS/PAGE on a 15% polyacrylamide gel, blotted, and then probed with a BDNF antiserum (Santa Cruz Biotechnology) at a dilution of 1:1,000.

RESULTS

Protein Sequence Analysis of SKI-1. We first aligned the protein sequences within the catalytic domain of PC7 (21), yeast subtilases, and bacterial subtilisins, together with that of a novel *Plasmodium falciparum* subtilisin-like enzyme called pf-SUB2 (J.-C.B., unpublished results). This led to the choice of conserved amino acids GHGT(H/F)(V/C)AG and GTS(M/V)A(T/S)P(H/V)V(A/T)G around the active sites His and Ser, respectively. Thus, using degenerate oligonucleotides coding for the sense His and antisense Ser consensus sequences, we initiated a series of RT-PCRs on total RNA and isolated a 525-bp cDNA fragment from the human neuronal cell line IMR-32. This sequence was found to be 100% identical to that reported for a human cDNA called KIAA0091 obtained from a myeloid KG-1 cell line (11) and 88% identical to that of a 324-bp expressed sequence tag (accession no. H31838) from rat PC12 cells. The full-length rat and mouse cDNA sequences were obtained after RT-PCR amplifications of total RNA isolated from rat adrenal glands and PC12 cells and from mouse AtT20 cells. As shown in Fig. 1, alignment of the protein sequence deduced from the cDNAs revealed that rat and mouse SKI-1 share 98% sequence identity and a 96% identity to human SKI-1. Interestingly, within the catalytic domain (Asp²¹⁸ → Ser⁴¹⁴) the sequence similarity between the three species is 100%. Analysis of the predicted amino acid sequence suggests a 17-aa signal peptide, followed by a putative prosegment beginning at Lys¹⁸ and extending for some 160–180 aa. The proposed catalytic domain encompasses the typical active sites Asp²¹⁸, His²⁴⁹, and Ser⁴¹⁴ and the oxyanion hole Asn³³⁸. This domain is followed by an extended C-terminal sequence characterized by the presence of a conserved growth factor/cytokine receptor family motif C849LDDSHROKDCFW⁸⁶¹. This sequence is followed by a potential 24-aa hydrophobic transmembrane segment and a less-conserved 31-aa cytosolic tail that, remarkably, consists of 35% basic residues. Some of the clones isolated from rat adrenal glands suggested the existence of alternatively spliced rSKI-1 mRNAs in which the segments coding for amino acids 430–483 or 858–901 are absent. Finally, the phylogenetic tree derived from the alignment of the catalytic domain of SKI-1 with subtilases (22) suggests that it is an ancestral protein that is closer to plant and bacterial subtilases than to either yeast or mammalian homologues (not shown).

Tissue Distribution of SKI-1 mRNA. Northern blot analyses of SKI-1 mRNA in adult male rat reveal that rSKI-1 mRNA is widely expressed and is particularly rich in anterior pituitary, thyroid, and adrenal glands (Fig. 2A). A Northern blot of poly(A)⁺ RNA obtained from mixed adult male and female rat tissues also showed a wide distribution and a particular enrichment in liver (Fig. 2B). Similarly, analysis of 24 different cell lines (23) revealed a ubiquitous expression of SKI-1 mRNA (not shown).

In situ hybridization data obtained in a day 2 postnatal rat also provided evidence of a widespread, if not ubiquitous, distribution of rSKI-1 mRNA. Fig. 3 shows at the anatomical level the presence of SKI-1 mRNA in developing skin, striated

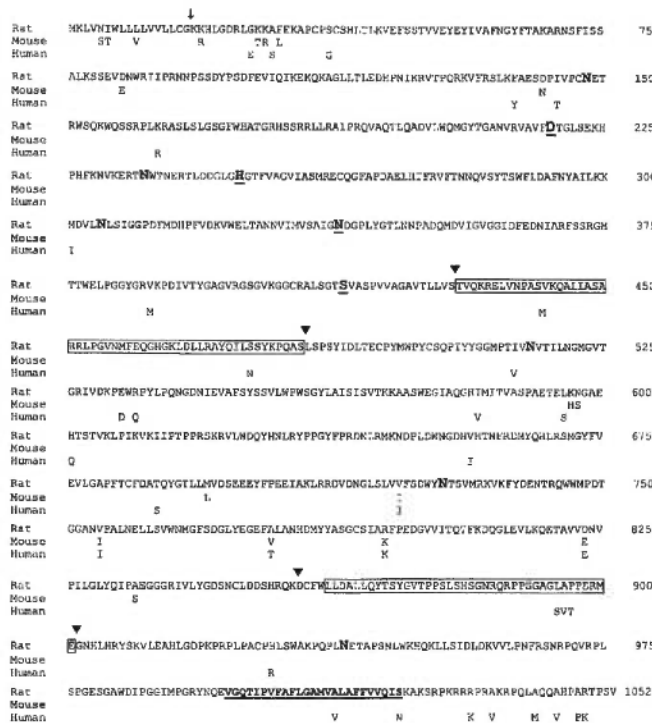


FIG. 1. Comparative protein sequences of SKI-1 deduced from rat, mouse, and human cDNAs. The position of the predicted end of the 17-aa signal peptide is shown by an arrow. The active sites Asp²¹⁸, His²⁴⁹, and Ser⁴¹⁴ as well as the oxyanion hole Asn³³⁸ are shown as bold, shaded, and underlined characters. The positions of the six potential N-glycosylation sites are emphasized in bold. The conserved shaded sequence fits the consensus signature for growth factors and cytokine receptor family. Each of the two boxed sequences was absent (▼) in a number of rat clones. The predicted transmembrane segment is in bold and underlined.

muscles, cardiac muscles, bones, and teeth as well as brain and many internal organs. Strong hybridization signals were detectable in the retina, cerebellum, pituitary, submaxillary, thyroid, and adrenal glands, molars, thymus, kidney, and intestine. Evidence for the cellular expression of rSKI-1 mRNA was obtained from analysis of the relative labeling densities per cell in selected tissues, based on a semiquantitative analysis of emulsion autoradiographs (not shown). In the central nervous system rSKI-1 mRNA labeling was mostly confined to neurons, whereas ependymal cells and supportive glial cells, such as presumed astrocytes, oligodendrocytes, and microglia, exhibited 5- to 30-fold-less labeling per cell. In addition, within the peripheral nervous system, trigeminal ganglia revealed a 5- to 10-fold greater expression in neurons as compared with presumptive Schwann cells. Labeling was observed in most of the glandular cells in the anterior and intermediate lobes of the pituitary as well as in the pituicytes of the pars nervosa. A semiquantitative comparison in the adult and newborn rat pituitary gland, submaxillary gland, thymus, and kidney demonstrated an overall 2-fold-decreased labeling of rSKI-1 mRNA with age (not shown).

Biosynthesis of hSKI-1. To define the molecular forms of human SKI-1 we generated both a vaccinia virus recombinant (vv:SKI-1) and a stable transfectant in HK293 cells. Three antisera were produced against amino acids 18–188 (prosegment), 217–233, and 634–651 of SKI-1. Expression of vv:SKI-1 in four different cell lines revealed that the enzyme is synthesized as a 148-kDa proSKI-1 zymogen, which is processed progressively into 120-, 106-, and 98-kDa proteins (Fig. 4). Only the 148-kDa form is recognized by the prodomain antiserum, whereas all four forms react with the other two antisera. Processing of the 148-kDa proSKI-1 into the 120- and 106-kDa forms occurs in the

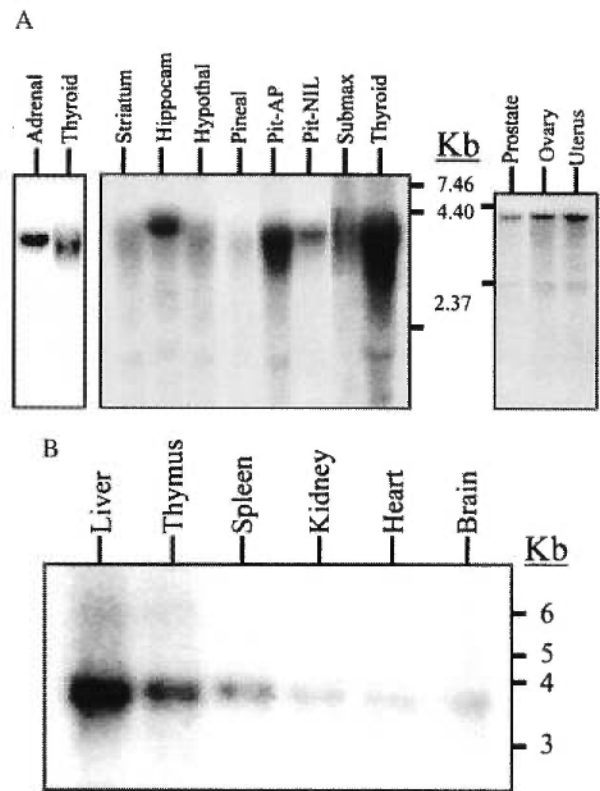


FIG. 2. Northern blot analysis of the expression of SKI-1 in adult rat tissues. (A) Five micrograms of male rat total RNA was loaded in each lane: pituitary anterior (AP) and neurointermediate (NIL) lobes and submaxillary gland (submax). (B) Two micrograms of poly(A)⁺ RNA of (male + female) Sprague-Dawley rat adult tissues. The estimated size of rat SKI-1 mRNA is about 3.9 kb.

ER based on the presence of these proteins in cells preincubated with the fungal metabolite brefeldin A (Fig. 4; ref. 24). Furthermore, preincubation with tunicamycin revealed only two bands (Fig. 4), suggesting that the presumably membrane-bound 106- and 120-kDa forms differ by their N-glycosylation. At the 3-h chase time, results reveal the secretion of a 98-kDa shed form (sSKI-1) recognized by both SKI-1 antisera (Fig. 4) but not by the proSKI-1 antiserum (not shown). Similar SKI-1-related forms were seen in stably transfected HK293 cells after a 4-h pulse labeling with [³⁵S]methionine (not shown).

Intracellular Localization of SKI-1. Double-staining immunofluorescence was used to compare the intracellular localization of the stably transfected human SKI-1 in HK293 cells with that of either the ER or Golgi markers Con A and WGA (17), respectively. The data show that SKI-1 exhibits (i) perinuclear staining, colocalizing with Con A fluorescence, presumably corresponding to the ER (not shown); (ii) paranuclear staining colocalizing with WGA fluorescence, suggesting the presence of SKI-1 in the Golgi (Fig. 5 A and B), and (iii) punctate staining observed in the cytoplasm and within extensions of a few cells (Fig. 5A). Some, but not all, of the punctate immunostaining matched that observed with WGA. This suggests that SKI-1 localizes in the Golgi but may sort to other organelles, including lysosomal and/or endosomal compartments. An indication of lysosomal/endosomal localization was provided by the analysis of SKI-1 immunofluorescence within cells preincubated for 4 h with 10 mM leucine methyl ester, a specific lysosomal/endosomal protease inhibitor (25). The results showed a net increase in the proportion of cells exhibiting punctate staining as compared with control cells (Fig. 5 A and B). The relative proportions of SKI-1 in cellular organelles and their dependence on culture conditions are now amenable to evaluation by subcellular fractionation and electron microscopy.

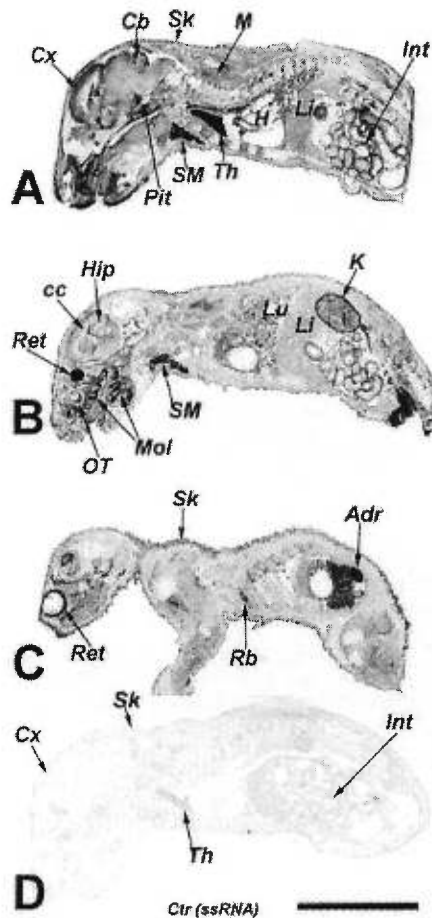


FIG. 3. *In situ* hybridization of rSKI-1 mRNA in a 2-day-old rat. *In situ* hybridization is shown at anatomical resolution on x-ray film using an ^{35}S -labeled antisense riboprobe (A–C) and sense control riboprobe (D). *Adr*, adrenal gland; *Cb*, cerebellum; *cc*, corpus callosum; *Cx*, cerebral cortex; *H*, heart; *Int*, intestine; *K*, kidney; *Li*, liver; *Lu*, lungs; *M*, muscles; *Mol*, molars; *OT*, olfactory turbinates; *Pit*, pituitary gland; *Rb*, ribs; *Ret*, retina; *Sk*, skin; *SM*, submaxillary gland; *Th*, thymus. [$\times 4$; bar (D) = 1 cm.]

Enzymatic Activity and Cleavage Specificity of SKI-1. To prove that SKI-1 is a proteolytic enzyme we examined its ability to cleave five different potential precursor substrates, including pro-opiomelanocortin, pro-atrial natriuretic factor, HIV gp160, pro-nerve growth factor, and proBDNF. Cellular coexpression of vv:SKI-1 with the vaccinia virus recombinants of each of the above precursors revealed that only proBDNF was cleaved intracellularly by SKI-1. Thus, upon expression of vv:BDNF alone in COS-7 cells we observed a partial processing of proBDNF (32 kDa) into the known, major 14-kDa BDNF product (15) and the minor production of a previously observed (ref. 16; S.J.M., N.G.S., and R.A.M., unpublished results) but still undefined 28-kDa product (Fig. 6A). Upon coexpression of proBDNF and SKI-1, a net increase in the level of the secreted 28-kDa BDNF is evident, without significant alteration in the amount of 14-kDa BDNF (Fig. 6A). To examine whether the 28-kDa product results from cleavage at a basic residue or at an alternative site, we first coexpressed proBDNF, SKI-1, and either $\alpha 1$ -PIT or $\alpha 1$ -PDX, which are inhibitors of thrombin and PC cleavages, respectively (18, 26). The results show that different from $\alpha 1$ -PIT, the serpin $\alpha 1$ -PDX selectively blocks the production of the 14-kDa BDNF and that neither $\alpha 1$ -PIT nor $\alpha 1$ -PDX affects the level of the 28-kDa product. This finding shows that $\alpha 1$ -PDX effectively inhibits the endogenous furin-like enzyme(s) responsible for the production of the 14-kDa BDNF (15), but does not inhibit the ability of SKI-1 to generate the 28-kDa product. Thus, it is likely that the generation of the 28-kDa BDNF takes place via an

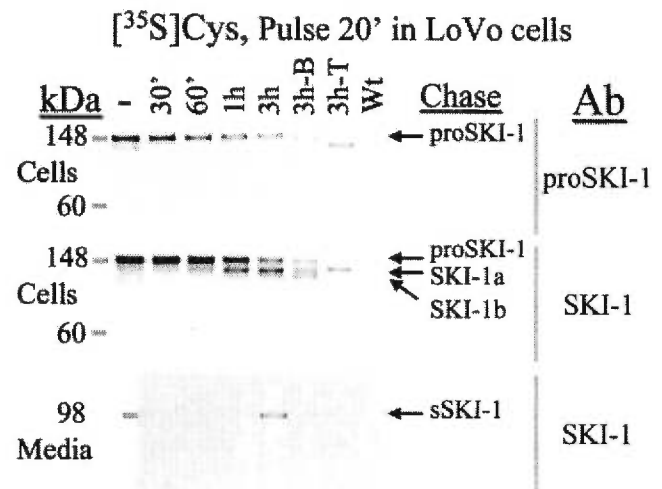


FIG. 4. Biosynthetic analysis of SKI-1 in LoVo-C5 cells overexpressing vv:SKI-1. Cells were pulsed for 20 min with ^{35}S cysteine and chased for 30 min, 1 h, and 3 h in the absence or presence of either brefeldin A (3h-B) or tunicamycin (3h-T). The control represents the 3-h chase period for cells infected with the wild-type virus (Wt). Media and cell lysates were immunoprecipitated with either a SKI-1 antiserum (Ab: SKI-1; against amino acids 634–651) or a proSKI-1 antiserum. The arrows point to the 148-, 120-, 106-, and 98-kDa forms immunoprecipitated.

alternate cleavage. Incubation of the cells with brefeldin A or the Ca^{2+} ionophore A23187 revealed that the 28-kDa proBDNF is

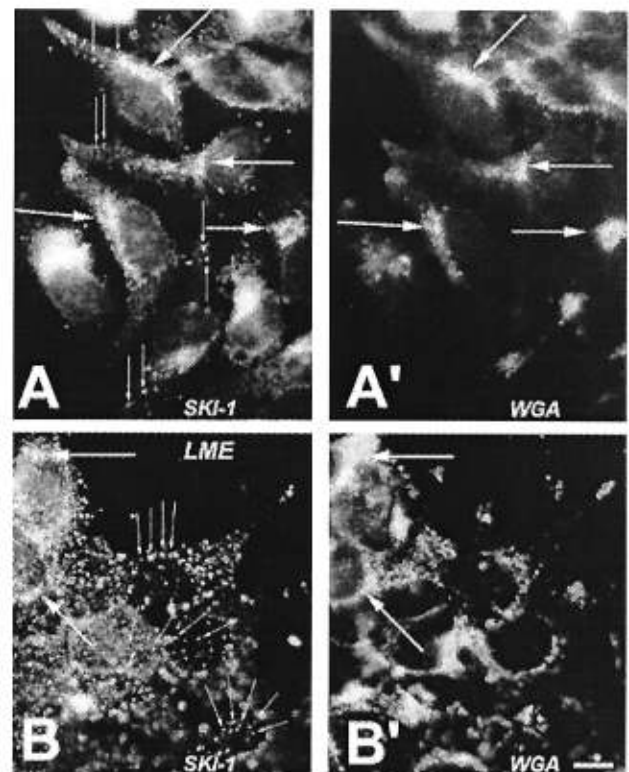


FIG. 5. hSKI-1 immunoreactivity in stably transfected HK293 cells. Black and white representation of the comparative double (red and green) fluorescence staining using an SKI-1 antiserum (directed against amino acids 634–651) (A and B) and fluorescein isothiocyanate-labeled WGA (A' and B') in control (A and A') and leucine methyl ester (LME)-treated (B and B') cells. Thin arrows emphasize the observed punctate staining, which is enhanced in the presence of LME. Large arrows point to the coincident staining of SKI-1 and WGA. [$\times 900$; bar (B') = 10 μm .]

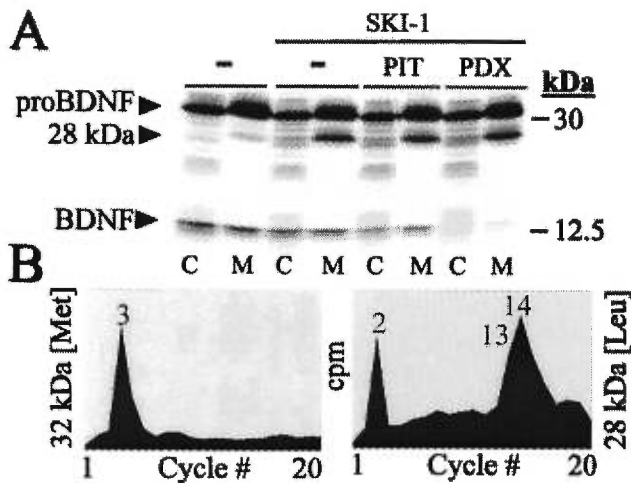


FIG. 6. Processing of proBDNF by SKI-1. (A) COS-7 cells were infected with vv:BDNF and either vv:WT (-) or vv:SKI-1 in the presence of either vv:PIT or vv:PDX. The cells were labeled metabolically with [³⁵S]cysteine/[³⁵S]methionine for 4 h, and the media (M) and cell lysates (C) were immunoprecipitated with a BDNF antiserum before SDS/PAGE analysis. The autoradiogram shows the migration positions of proBDNF (32 kDa), the 28-kDa BDNF produced by SKI-1, and the 14-kDa BDNF. (B) Microsequence analysis of the [³⁵S]Met-labeled 32-kDa proBDNF (maximal scale, 1,000 cpm) and [³H]Leu-labeled 28-kDa BDNF (maximal scale, 250 cpm).

formed in the ER and that this cleavage is Ca²⁺-dependent (not shown).

In Fig. 6B, we present the N-terminal microsequence analysis of [³⁵S]Met-labeled 32-kDa proBDNF and [³H]Leu-labeled 28-kDa BDNF. The sequence of the 32-kDa form revealed the presence of an [³⁵S]Met at position 3 (Fig. 6B), which is in agreement with the proposed sequence of human proBDNF (27) resulting from the removal of an 18-aa signal peptide cleaved at GCMLA¹⁸ ↓ APMK site. The N-terminal sequence of the 28-kDa product revealed a [³H]Leu at positions 2, 13, and 14 (Fig. 6B). This result demonstrates that the 28-kDa BDNF is generated by a unique cleavage at Thr⁵⁷ in the sequence RGLT⁵⁷ ↓ SLADTFEHVIEELL (27).

To prove that SKI-1 is directly responsible for the production of the 28-kDa BDNF at the novel Thr-directed cleavage, proBDNF was incubated at various pH values with concentrated medium of vv:SKI-1-infected Schwann cells. A similar preparation obtained from wild-type vaccinia virus-infected cells served as control. The data show that SKI-1 exhibits a wide pH-dependence profile revealing activity at both acidic and neutral pH values from pH 5.5 to 7.3 (Fig. 7A). Analysis

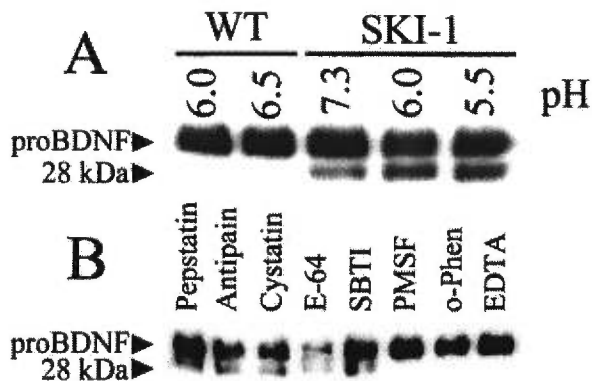


FIG. 7. *In vitro* processing profile of proBDNF by SKI-1. (A) pH dependence of the processing of proBDNF by SKI-1. (B) Inhibitor profile of the processing of proBDNF to the 28-kDa BDNF by the same SKI-1 preparation as in A. The reaction was performed overnight at 37°C, pH 6.0.

of the inhibitory profile of this reaction revealed that metal chelators such as EDTA and *o*-phenanthroline or a mixture of the serine proteinase inhibitors PMSF and pAPMSF effectively inhibits the processing of proBDNF by SKI-1. The inhibition by EDTA is expected because, like all PCs, SKI-1 is a Ca²⁺-dependent enzyme. The unexpected inhibition by 5 mM *o*-phenanthroline may be a result of excess reagent because at 1 mM only 25% inhibition is observed (not shown). All other class-specific proteinase inhibitors (aspartyl-, cysteinyl-, and serine proteases- of the trypsin type) proved to be inactive.

DISCUSSION

This work provides evidence for the existence of a mammalian secretory Ca²⁺-dependent serine proteinase of the subtilisin/kexin type that selectively cleaves at nonbasic residues. Thus, SKI-1 processes the 32-kDa human proBDNF at an KAGSRGLT ↓ SL sequence, generating a 28-kDa form, which may have its own biological activity (S.J.M., N.G.S., and R.A.M., unpublished results). Such a cleavage site is close to the consensus site deduced from a large body of work done with the PCs, whereby an (R/K)-(X)_n-R ↓ X-(L/I/V), (where *n* = 0, 2, 4, or 6) motif is favored by most PCs (1–3, 28). Note that in the SKI-1 site, P1 Arg is replaced by Thr and an aliphatic Leu is present at P2', an amino acid also favored by PCs (1–3, 28). Several proteins are known to be cleaved after Thr. These include human antiangiogenic platelet factor 4 (ref. 6; QCLCVKTT ↓ SQ), the neuroendocrine α-endorphin (ref. 4; KSQTPLV ↓ LF), and ADAM-10 metalloprotease (ref. 7; LLRKKRTT ↓ SA).

Interestingly, comparison of the phylogenetically highly conserved sequence of proBDNF revealed an insertion of hydroxylated amino acids (threonine and serine) just after the identified SKI-1 cleavage site of human proBDNF. Thus, in rat and mouse proBDNF, two threonines are inserted (RGLTTT—SL), and in porcine proBDNF, five serines are added (RGLTSSSS—SL) (27). These observations raise a number of questions: (i) Do these insertions affect the kinetics of proBDNF cleavage by SKI-1? In that context, it was published recently that rat proBDNF is also cleaved into a 28-kDa protein (29). (ii) Does SKI-1 recognize both single and pairs of Thr and Ser and combinations thereof? (iii) Is the presence of a basic residue at P4, P6, or P8 critical for cleavage?

Another question that arises is whether SKI-1 can cleave at residues other than Thr. In that context, after submission of this manuscript, Sakai *et al.* demonstrated that the sequence of hamster S1p responsible for the site 1 cleavage of SREBPs is almost identical to the presently reported human, mouse, and rat SKI-1 (30). In this model, within the lumen of the ER, S1p cleaves SREBP-2 at an RSVL ↓ SF sequence, where Arg at P4 is very critical, whereas the P1 Leu could be replaced by a number of other amino acids (8). Our *in vitro* data show that sSKI-1 does not cleave small fluorogenic substrates of sequence RGLT-MCA, RGLTTT-MCA, or RSVL-MCA (MCA is 4-methylcoumaryl-1-amide), suggesting that it has an extended substrate-specificity pocket. In agreement, preliminary data show that SKI-1 specifically cleaves at neutral pH a 27-mer synthetic peptide of sequence GGAHDSQHPHSGSGRSVL ↓ SFESGG, representing the luminal amino acids 504–530 of human SREBP-2 (8) (B.B.T. and N.G.S., unpublished data). We have shown that this synthetic peptide is efficiently processed by SKI-1 *in vitro*, paving the way for refined kinetic analyses.

Biosynthetic analysis of the zymogen processing of proSKI-1 demonstrated an ER-associated removal of the prosegment (Fig. 4). Furthermore, analysis of the ³⁵SO₄-labeled SKI-1 demonstrated the presence of only sulfated 106- and 98-kDa forms but not that of either the 148 proSKI-1 or the 120-kDa SKI-1a forms (not shown). Because sulfation occurs in the trans-Golgi network, this confirms that the removal of the prosegment occurs in the ER. As with furin and PC5-B (1–3,

24) the membrane-bound 106-kDa SKI-1 is transformed into a soluble 98-kDa form. The secreted 98-kDa sSKI-1 is enzymatically active because it processes proBDNF *in vitro* (Fig. 7). Attempts to sequence the SDS/PAGE-purified [³H]Leu- and Val-labeled 148- and 98-kDa forms resulted in ambiguous results, suggesting that SKI-1 is refractory to N-terminal Edman degradation. Presently, we are unable to define the zymogen cleavage site leading to the formation of the 120-kDa SKI-1a and 106-kDa SKI-1b deduced by pulse-chase studies (Fig. 4). Examination of the prosegment sequence (Fig. 1), the species-specific proBDNF motif potentially recognized by SKI-1, the sequence of the luminal portion of SREBP-2 (see above), and the alignment of SKI-1 with other subtilases (22) suggests three possible conserved sites: **RASL**¹⁶⁷ ↓ **SLGS**, **RHSS**¹⁸² ↓ **RRL**, and **RRL**¹⁸⁶ ↓ **RAIP**. These predict cleavages at motifs containing a P4 Arg and a P1 either Leu or Ser.

Phylogenetic structural analysis of the predicted amino acid sequence of SKI-1 reveals that this serine proteinase is closer to plant and bacterial subtilases than it is to yeast and mammalian PCs. The 100% conservation of the catalytic domain sequence, although striking and suggestive of an important function, is not far from the 98% similarity between human and rat PC7 (3, 21). The sequence C-terminal to the catalytic domain of SKI-1 is very different from that of any of the known PCs. In fact, although PCs have a typical P-domain critical for the folding of these enzymes (for reviews see refs. 1–3), we did not find the hallmark sequences (3, 31) of the P-domain within the SKI-1 structure. Instead, different from the PCs, we find a conserved growth factor/cytokine receptor motif of which functional importance will need to be addressed, especially because this motif is partly missing in alternatively spliced forms (Fig. 1). Finally, the highly basic nature of the cytosolic tail of SKI-1 (Fig. 1) may be critical for its probable cellular localization within endosomal/lysosomal compartments (Fig. 5), similar to the importance of basic residues for the accumulation of the α -amidation enzyme PAM in endosomal compartments (S. L. Milgram, personal communication).

The wide tissue distribution of SKI-1 mRNA transcripts suggests that this enzyme processes numerous precursors in various tissues. Furthermore, the observed developmental down-regulation of the level of its transcripts also suggests a functional importance during embryonic development. That SKI-1 can cleave C-terminal to Thr, Leu, and, possibly, Ser residues suggests that, like the combination of PCs and carboxypeptidases E and D (32), a specific carboxypeptidase also may be required to trim out the newly exposed C-terminal hydroxylated or Leu residues.

SKI-1 is closest to the pyrolysins branch of the six-membered family of subtilisin-like proteinases (22) and we believe is the first known mammalian subtilase cleaving at sites other than basic amino acids. That other eukaryotic subtilases exist is supported by a recent report on the structure of a soluble subtilisin-like enzyme called PfSUB-1 found in *Plasmodium falciparum* (33) and exhibiting a 29% sequence identity to SKI-1. This enzyme, which is closest to the subtilisin branch of subtilases (22), localizes to granular-like compartments and presumably cleaves at a Leu ↓ Asn bond (33). Therefore, because only mammalian members of the kexin (PCs) and pyrolysins (SKI-1) subfamilies have been identified, could it be that the other four subtilase subfamilies (22) have their mammalian counterparts?

We thank Dr. N. Nomura (Kazusa DNA Research Institute, Chiba, Japan) for the generous gift of human SKI-1 cDNA. We acknowledge the technical help of A. Lemieux, O. Théberge, J. Rochemont, A. Chen, M. V. Seidah, A. V. Seidah, C. Lefebvre, and S. Emond. We thank A. Prat, J. Cromlish, and M. Mbikay for reading the manuscript and G. Langsley (Pasteur Institute) for discussions. This work was supported in part by group Grant GR11474 (to N.G.S., M.C., and M.M.) and Grants MT-14766 (to C.L.) and MT-14216 (to R.A.M.)

from the Medical Research Council of Canada and from the Protein Engineering Network Centres of Excellence (PENEC). S.J.M. was supported by a studentship from the Iranian Ministry of Culture and Higher Education. The Clinical Research Institute of Montreal is affiliated with the University of Montreal and PENEC.

- Seidah, N. G., Day, R., Marcinkiewicz, M. & Chrétien, M. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **839**, 9–24.
- Steiner, D. F. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 31–39.
- Seidah, N. G., Mbikay, M., Marcinkiewicz, M. & Chrétien, M. (1998) in *Proteolytic and Cellular Mechanisms in Prohormone and Neuropeptide Precursor Processing*, ed. Hook, V. Y. H. (Landes, Georgetown, TX), pp. 49–76.
- Ling, N., Burgus, R. & Guillemin, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3042–3046.
- Burbach, J. P. H., Seidah, N. G. & Chrétien, M. (1986) *Eur. J. Biochem.* **156**, 137–142.
- Gupta, S. K., Hassel, T. & Singh, J. P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7799–7803.
- Rosendahl, M. S., Ko, S. C., Long, D. L., Brewer, M. T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S. M., Moreland, J., Meyers, M. A., *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24588–24593.
- Duncan, E. A., Brown, M. S., Goldstein, J. L. & Sakai, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12778–12785.
- Checler, F. (1995) *J. Neurochem.* **65**, 1431–1444.
- Seidah, N. G. (1995) *Methods Neurosci.* **23**, 3–15.
- Nagase, T., Miyajima, N., Tanaka, A., Suzuki, T., Seki, N., Sato, S., Tabata, S., Ishikawa, K.-I., Kawarabayashi, Y., Kotani, H. & Nomura, N. (1995) *DNA Res.* **2**, 37–43.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Hamelin, J., Mamarbachi, A. M., Basak, A., Marcinkiewicz, J., Mbikay, M., Chrétien, M. & Marcinkiewicz, M. (1999) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, in press.
- Edwards, J. B. D. M., Delort, J. & Mallet, J. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 5227–5232.
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chrétien, M. & Seidah, N. G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6691–6695.
- Seidah, N. G., Benjannet, S., Pareek, S., Chrétien, M. & Murphy, R. A. (1996) *FEBS Lett.* **379**, 247–250.
- Marcinkiewicz, M., Savaria, D. & Marcinkiewicz, J. (1998) *Mol. Brain Res.* **59**, 229–246.
- Lippincott-Schwartz, J., Youan, L. C., Bonifacino, J. S. & Klausner, R. D. (1989) *Cell* **56**, 801–813.
- Anderson, E. D., Thomas, L., Hayflick, J. S. & Thomas, G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24887–24891.
- Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., Lopez, O. T., Bennett, L. & Welcher, A. A. (1997) *Neuroscience* **78**, 431–448.
- Paquet, L., Bergeron, F., Seidah, N. G., Chrétien, M., Mbikay, M. & Lazure, C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 19279–19285.
- Seidah, N. G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tadros, H., Mbikay, M., Chrétien, M. & Day, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3388–3393.
- Siezen, R. J. & Leunissen, J. A. M. (1997) *Protein Sci.* **6**, 501–523.
- Seidah, N. G., Day, R. & Chrétien, M. (1994) *Biochimie* **76**, 197–209.
- de Bie, I., Marcinkiewicz, M., Malide, D., Lazure, C., Nakayama, K., Bendayan, M. & Seidah, N. G. (1996) *J. Cell Biol.* **135**, 1261–1275.
- Reeves, J. P., Decker, R. S., Crie, J. S. & Wildenthal, K. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4426–4429.
- Benjannet, S., Savaria, D., Laslop, A., Chrétien, M., Marcinkiewicz, M. & Seidah, N. G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26210–26218.
- Maisonpierre, P. C., Le Beau, M. M., Espinosa, R., Ip, N. Y., Belluscio, L., de la Monte, S. M., Squinto, S., Furth, M. E. & Yancopoulos, G. D. (1991) *Genomics* **10**, 558–568.
- Nakayama, K. (1997) *Biochem. J.* **327**, 625–635.
- Haubensak, W., Narz, F., Heumann, R. & Lessmann, V. (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 1483–1493.
- Sakai, J., Rawson, R. B., Espenshade, P. J., Cheng, D., Seegmiller, A. C., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. (1998) *Mol. Cell* **2**, 505–514.
- Lipkind, G. M., Zhou, A. & Steiner, D. F. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7310–7315.
- Varlamov, O. & Fricker, L. D. (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 78–85.
- Blackman, M. J., Fujioka, H., Stafford, W. H. L., Sajid, M., Clough, B., Fleck, S. L., Aikawa, M., Grainger, M. & Hackett, F. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 23398–23409.

DEUXIÈME ARTICLE

Biosynthesis and Enzymatic Characterization of Human SKI-1 and the Processing of its Inhibitory Prosegment*

Bakary B. Touré‡, Ajoy Basak§¶, Jon Scott Munzer‡, Suzanne Benjannet§, Jim Rochemont‡, Claude Lazurell, Michel Chrétien§¶, and Nabil G. Seidah‡ ‡‡,

From the Laboratories of ‡Biochemical and §Molecular Neuroendocrinology and ¶Structure and Metabolism of Neuropeptides, the Protein Engineering Network of Centres of Excellence and the Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Ave West, Montreal, QC H2W 1R7
Canada

Short title: ***In vitro* characterization of human SKI-1**

Key words: SKI-1, S1p, Proprotein Convertase, Precursor Processing, Biosynthesis, Prosegment, Cleavage Selectivity, Vaccinia Virus Overexpression, Cholesterol and Fatty Acids Synthesis, SREBP, BDNF.

¶¶Present address: Loeb Health Research Institute, Ottawa Civic Hospital, 725 Parkdale Ave. Ottawa, ON K1Y 4K9 Canada.

‡‡To whom correspondence should be addressed:

Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West, Montreal, QC H2W 1R7
Canada. Tel: (514)987-5609; Fax: (514)987-5542; XXXXXXXXXX

Abbreviations: VV, Vaccinia Virus; PC, Precursor Convertase; ER, endoplasmic reticulum; TGN, *trans* Golgi network; SREBP, sterol regulatory element binding protein; BDNF, brain derived neurotrophic factor; BTMD, before transmembrane domain; PVDF, polyvinylidene fluoride, amino acid, aa; base pair, bp; nucleotides, nts.

ABSTRACT

Biochemical and enzymatic characterization of the novel human subtilase hSKI-1 was carried out in three different cell lines. Within the endoplasmic reticulum of LoVo cells proSKI-1 is converted to SKI-1 by processing of its prosegment into 26, 24, 14, 10 and 8 kDa products, some of which remain tightly associated to the enzyme. N-terminal sequencing and mass spectral analysis were used to map the cleavage sites of the most abundant fragments. To characterize its *in vitro* enzymatic properties, a secreted form of SKI-1 was generated. Our data demonstrated that SKI-1 is a Ca^{2+} -dependent serine proteinase exhibiting optimal cleavage at pH 6.5. We present evidence that SKI-1 is responsible for the processing of peptides mimicking the cleavage sites of pro-brain derived neurotrophic factor and the sterol regulatory element binding protein SREBP-2. Among three candidate peptides encompassing sections of the SKI-1 prosegment, only the RRL¹⁸⁶-containing peptide can be cleaved by this enzyme. Mutagenesis of this peptide allowed us to develop an efficiently processed SKI-1 substrate and to assess the importance of several P and P' residues. Finally, we demonstrate that *in vitro*, recombinant prosegments of SKI-1 inhibit its activity with apparent inhibitor constants of 100-200 nM.

Over the last thirty years (1,2) our understanding of the complex cellular processing by limited proteolysis of inactive secretory precursors into active polypeptides and proteins has greatly expanded. It is now becoming clear that following removal of the signal peptide, precursor cleavage can occur intracellularly, at the cell surface or within the extracellular milieu. The sites of cleavage are composed of either (i) single or pairs of basic residues (Lys or Arg) within the general motif $(\mathbf{R/K})-(\mathbf{X})_n-(\mathbf{K/R})\downarrow$, where $n = 0, 2, 4, \text{ or } 6$ and X is any amino acid (aa) except Cys; or (ii) hydrophobic aa (e.g., Leu, Phe, Val or Met) and small aa residues such as Ala, Thr or Ser (3). The former cleavage type occurs in most growth factors and their receptors, polypeptide hormone precursors, surface glycoproteins (including adhesion and viral envelope glycoproteins), as well as a host of other secretory proteins (1,2). The latter type of cellular processing has been implicated in the generation of bioactive peptides (4-6), proteins (7) and transcription factors (8).

Some of the proteinases involved in intracellular endoproteolytic events that result in cleavage at specific single or paired basic residues are members of a family of calcium-dependent serine proteinases related to the yeast subtilase kexin (1-3,9). These dibasic- and monobasic-specific "Precursor Convertases" (PCs), of which 7 mammalian members are known so far, comprise PC1 (PC3), PC2, furin (PACE), PC4, PC5 (PC6), PACE4, and PC7 (LPC,PC8). Each of these kexin-like subtilases contains a unique N-terminal prosegment which seems to have the dual role of an intramolecular chaperone and a proteinase inhibitor (1-3). Acting in concert, these enzymes determine the cellular location and time at which biologically active products are derived from inactive precursor proteins (1-3).

Efforts to identify the proteinases responsible for the intracellular processing of precursors at hydrophobic or small aa have led to the recent cloning of a new subtilase called SKI-1 (10)

or S1p (11) which exhibits a highly conserved sequence between human, rat, mouse and hamster. Unlike PCs, this enzyme belongs to the pyrolysins branch of subtilases according to Siezen and Leunissen's classification (9). Tissue distribution analyses by both Northern blots and *in situ* hybridization revealed that SKI-1 mRNA is widely expressed (10,12). We reported previously that human SKI-1 (hSKI-1) generates a 28 kDa product from the 32 kDa brain-derived neurotrophic factor precursor (proBDNF) via selective cleavage within the sequence **RGLT↓SL** (10). Independently, Sakai *et al.* demonstrated that hamster SKI-1/S1p is responsible for the site 1 cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) (11), highlighting the critical role of SKI-1/S1p in the regulation of the synthesis and metabolism of cholesterol and fatty acids. In their model, SKI-1/S1p cleaves SREBP-2 at an **RSVL↓SF** sequence within the lumen of the endoplasmic reticulum (ER). Mutational analyses demonstrated that Arg at the P4 position of the substrate is critical, whereas the P1 Leu could be replaced by a number of other aa (8).

In this work, we first present data regarding the cellular biosynthesis of membrane-bound hSKI-1 and its zymogen processing. Then, based on our original discovery of a secreted (shed) form of hSKI-1 (10), we produced a vaccinia virus recombinant of a soluble form of this enzyme which, by analogy to rPC7 (13), we called BTMD-SKI-1. This isoform, collected from cell media, was used to study the *in vitro* cleavage properties of this enzyme on a number of synthetic substrates. In addition, we present data on the *in vitro* inhibitory character of the prosegment of SKI-1, which we obtained as bacterial recombinant proteins. Moreover, we examined the processing of hSKI-1 in LoVo cells infected with a vaccinia virus recombinant and in a stable transfectant in HK293 cells (10).

absence of 5 µg/ml of the fungal metabolite brefeldin A (BFA) as described (10,14). Media and cell lysates were immunoprecipitated with SKI-1 antisera directed against either aa 634-651, or the prosegment comprising aa 18-188 (10). Immune complexes were resolved by SDS-PAGE on an 8% or 14% polyacrylamide/Tricine gel (10) and the dried gels autoradiographed (10,14). All biosynthesis experiments were performed at least twice.

Isolation and Purification of Recombinant hSKI-1 Prosegments – Three N-terminal fragments of hSKI-1 were isolated by PCR using a common (s) oligonucleotide [5' GGATCCGAAGAAACATCTGGGCGACAGA 3'] and one of three (as) oligonucleotides [5' CTCGAGGGAGAGGCTGGCTCTTCG3'], [5'CTCGAGGGCTCTCAGCCGTGTGC3'], or [5' CTCGAGTGTCTGGGCAACCTGGCGCGGG 3']. These prosegment fragments, ending at aa 169, 188, and 196 (10), were cloned in the PCR 2.1 TA cloning vector for sequencing. Then they were transferred into the BamHI / XhoI sites of the bacterial expression vector pET 24b (Novagen). These recombinants were transformed into the *E. coli* strain BL21. Protein expression was induced with 1mM isopropyl β-D-thiogalactoside and the cultures were grown for 3h at 37°C. The cell pellets were sonicated on ice in a binding buffer containing 6M guanidine-HCl (Novagen) until a clear solution was obtained. The clarified and filtered solution was then applied to a nickel affinity column (Novagen) and eluted with 500 mM imidazole. The eluates were dialysed overnight against 50 mM sodium acetate pH 7.0 at 4°C. The protein precipitate was solubilized with glacial acetic acid, filtered through a 0.45 µm disk and further purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a 5 µm C4 column (0.94 x 25 cm; Chromatographic Sciences Company Inc; CSC). The purity was assessed by Coomassie staining and mass spectrometry on a Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight (MALDI-TOF) Voyager DE-Pro instrument (PE

PerSeptive Biosystems). The amounts of prosegments were estimated by quantitative amino acid analysis (13).

Expression and Purification of Recombinant BTMD-SKI-1 – Following infection of BSC40 cells with 2 pfu of recombinant VV:BTMD-SKI-1, the cells were washed and incubated at 37°C for 18h in a serum-free minimal essential medium (MEM; Life Technologies). Media were then dialysed, concentrated on Centriprep-30's (Amicon) and stored at –20°C in 40% glycerol. For purification, the concentrated medium was applied to a Ni²⁺ affinity resin as described by the manufacturer (Novagen). After two washes with 5 mM imidazole, the protein was eluted with 200 mM imidazole and tested for enzymatic activity and immunoreactivity by Western blot (see below).

Western Blot Analyses – Aliquots of partially purified BTMD-SKI-1 were run on 8% or 12% SDS-PAGE and the separated proteins electrotransferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Schleicher and Schuell). The membranes were probed with antisera directed against either aa 217-233 (Ab:N), 634-651 (Ab:S) or pro-SKI-1 (aa 18-188; Ab:P). Protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL) (Boehringer Mannheim).

Purification, N-terminal Sequencing and Mass Spectrometric Analysis of the Secreted Recombinant Prosegment(s) of hSKI-1 – Concentrated media obtained from either VV:BTMD-SKI-1 infected BSC40 cells or from a stable transfectant of full length hSKI-1 in HK293 cells (10) were chromatographed on an RP-HPLC 5 µm C8 column (0.94 x 25 cm) (Vydac). Proteins were eluted with a 1%/min linear gradient (20% to 80%) of 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA)/CH₃CN at 2 ml/min and monitored at 210 nm. Proteins were submitted to Western blot analysis and the immunoreactive fractions further purified on a

Chromatographic Sciences Company Inc.(CSC) 5 μ m C4 column (0.2 x 25 cm). Mass values were obtained by MALDI-TOF spectrometry using a 3,5 dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid matrix (Aldrich Chemical Co). For N-terminal sequencing, fraction IV proteins (Fig. 2B) were separated by SDS-PAGE, transferred to Immobilon-P membranes, and stained with Ponceau Red. The 14- and 5-kDa bands were excised, cut into small pieces and the proteins sequenced using an Applied Biosystems Model 477 sequenator operating in the gas-phase mode (15).

Synthesis of SKI-1 Peptide Substrates – All Fmoc protected amino acid derivatives (L-form), the coupling reagents, and the solvents for peptide synthesis were purchased from PE PerSeptive Biosystems Inc. (Framingham, Mass, USA), Calbiochem (San Diego, Ca, USA), or Richelieu Biotechnologies (Montréal, Québec, Canada). The various synthetic peptides reported in this article are: (I) **hproBDNF(50-63)**: KAGSRGLTSLADTF, (II) **hSREBP-2(504-530)**: GGAHDSQHPHSGSGRSVLSFESGSGG, (III) **hSKI-1(174-191)**: WHATGRHSSRLLRAIPR, (IV) **hSKI-1(174-188+LE)**: WHATGRHSSRLLRALE, (V) **hSKI-1(182-188+LE)**: SRLLRALE, (VI) **hSKI-1(156-172)**:WQSSRPLRRASLSLGSG, (VII) **hSKI-1(187-201)**: RAIPRQVAQTLQADV. Except for the first two peptides, which were purchased from the Sheldon Biotechnology Institute (McGill University, QC, Canada), all other peptides were synthesized with the carboxy-terminus in the amide form. Syntheses of peptides III-VII were performed on a solid phase automated peptide synthesizer (Pioneer model, PE PerSeptive Biosystems) using either 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) / N-hydroxybenzotriazole (HOBT) or HATU (O-[7-azabenzotriazol-1-yl]-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate) / Diisopropyl ethyl amine (DIEA)- mediated FastMoc chemistry in NN' dimethyl formamide.

All peptides were prepared using an unloaded Poly Amino Linker Poly Ethylene Glycol (PAL-PEG) resin. The following side-chain protecting groups were used: t-butyloxycarbonyl (Boc) for Lys; 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl (Pmc) or 2, 2, 4, 6, 7-pentamethyldihydrobenzofuran 5-sulphonyl (Pbf) for Arg; t-butyl (But) for Ser, Thr, Asp and Tyr and trityl (trt) for His, Asn and Gln respectively. The syntheses were terminated before the removal of the N-terminal Fmoc-protecting group, which was finally removed following treatment with 20% piperidine in NN' dimethyl formamide.

RP-HPLC Purification and Analysis of Synthetic Peptide Substrates and their SKI-1 Digests – The crude peptides were purified by RP-HPLC using a semi-preparative or CSC-Exsil C18 column (2.5 x 25 cm). The peptides were eluted with a 1%/min linear gradient (5% to 60%) of aqueous 0.1% TFA/CH₃CN at 2 ml/min and monitored at 210 nm. The peptide purity and concentration were determined by quantitative amino acid analysis (16). The identity of each purified peptide was confirmed by MALDI-TOF spectrometry using the matrix α -Cyano 4-hydroxycinnamic acid (Aldrich Chemical Co).

For digestions, each peptide was reacted at 37°C with 10 μ l of the concentrated enzyme preparation in a buffer consisting of 50mM HEPES (N-2-Hydroxyethyl Piperazine-N'-2 EthaneSulfonic acid) (ICN Biomedicals Inc), 50mM MES (2-[N-Morpholino] EthaneSulfonic acid) (Sigma Chem Co.), and 3mM Ca²⁺-acetate, pH 6.5. The digestion products were separated by RP-HPLC on a Beckman 5 μ m Ultrasphere C18 column (0.2 x 25 cm), and eluted with a 1%/min linear gradient of aqueous 0.1%TFA/CH₃CN (5-45%) at a flow rate of 1ml/min. The collected peptides were characterized by mass spectrometry and by amino acid composition, which was also used to quantitate the amount of various substrates and products.

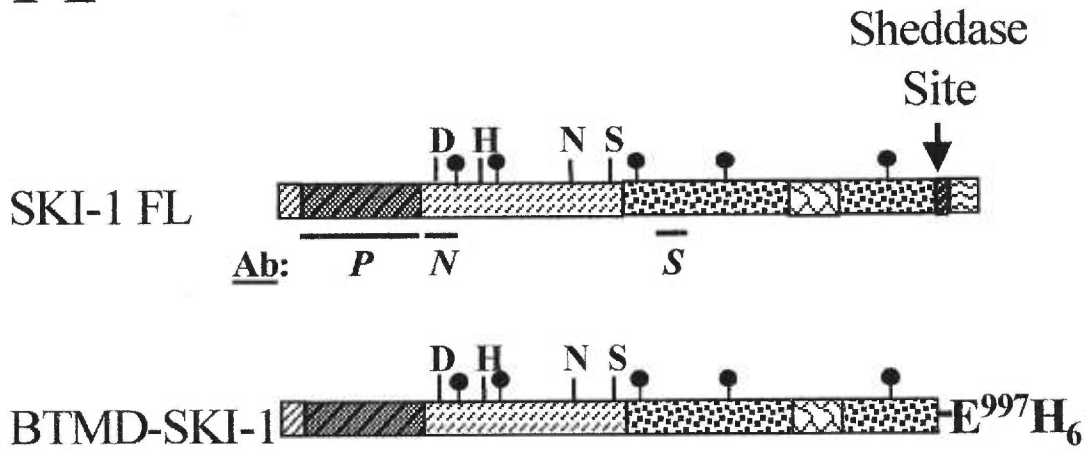
pH Optimum, Calcium-Dependence and Inhibitor Profile – The protocols used were essentially the same as reported (13). Buffers covering a range of pHs from 5.0 to 8.5 with an increment of 0.5 pH units were adjusted to the desired value by addition of either acetic acid or sodium hydroxide. In order to estimate the calcium requirement, increasing concentrations of calcium acetate were used ranging from 0 to 10 mM. For inhibition studies, the enzyme was incubated with the agents for 30 min prior to addition of the 27 aa SREBP-2 peptide substrate.

K_m, V_{max} and K_{i(app)} determinations – Following incubations of increasing substrate concentration with the enzyme, the digestion products were separated by RP-HPLC. The rate of substrate hydrolysis was obtained from the integrated peak areas of the chromatograms. K_m and V_{max} values were estimated using nonlinear regression analysis (Enzfitter software; Elsevier Biosoft, Cambridge, UK) of plots of the hydrolysis rate vs the substrate concentration. For apparent inhibitor constant [K_{i(app)}] determinations, variable inhibitor concentrations yielding a range of 15-70% inhibition were used at three substrate concentrations ranging from 0.6 to 3.5 times the K_m value. The K_{i(app)} values were estimated from Dixon plots as described (16).

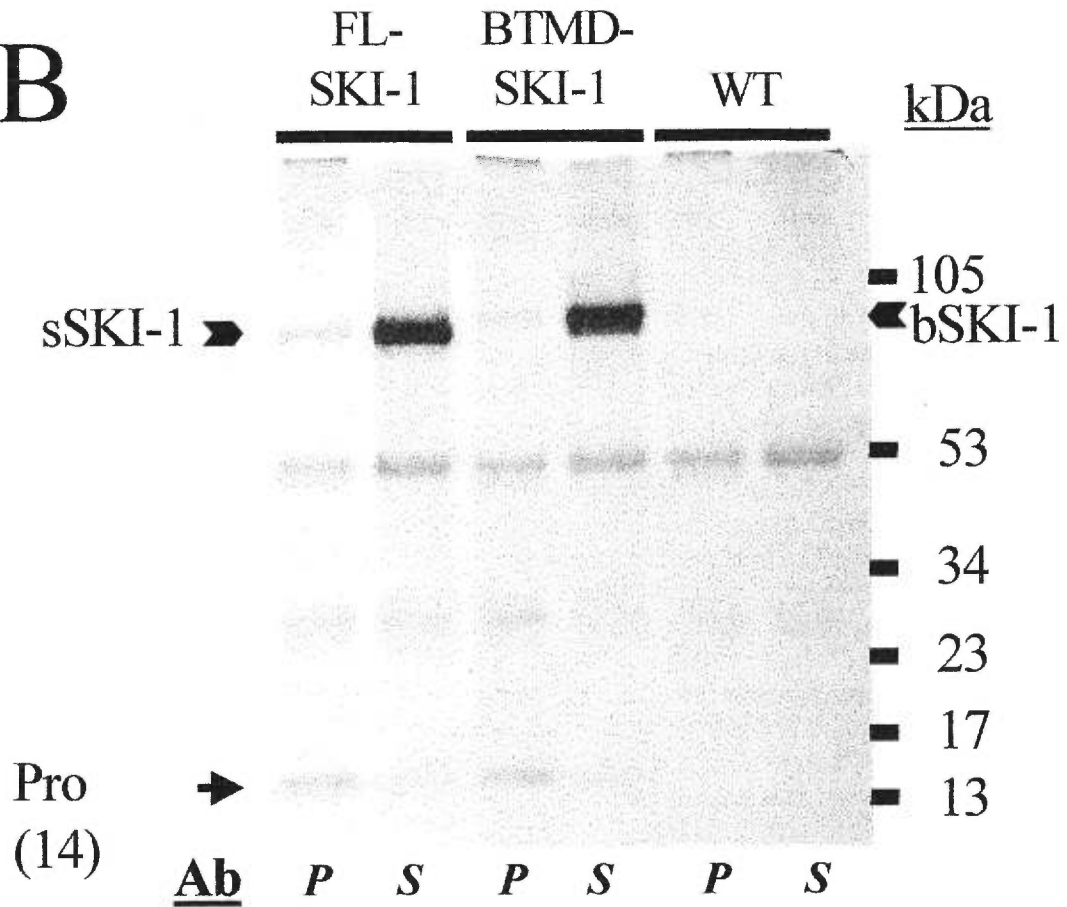
RESULTS

Overexpression, Purification and Biosynthesis of SKI-1 and the Processing of its Prosegment—An earlier report demonstrated that when overexpressed in HK293 cells, a fraction full-length SKI-1 (FL-SKI-1) is shed into the medium as a 98 kDa protein (sSKI-1) (10). In this report, we have engineered a soluble form of this enzyme ending at residue 997, just before the transmembrane domain (BTMD-SKI-1), to which we fused a hexa-His sequence at the C-terminus (Fig. 1A). Following vaccinia virus infection of LoVo cells with VV:FL-SKI-1, VV:BTMD-SKI-1, or wild type virus (VV:WT), a biosynthetic analysis of SKI-1 is shown in Fig. 1B. Here, following labeling of the cells for 3h with [³⁵S]Cys, proteins present in the media were immunoprecipitated with antisera directed against either the prosegment of SKI-1 (aa 18-188; Ab:P) or an internal SKI-1 sequence (aa 634-651; Ab:S). In both cases, and in contrast to the control, a specific 14 kDa protein co-immunoprecipitates with either the 98 kDa sSKI-1 or the 100 kDa BTMD-SKI-1 (bSKI-1; Fig. 1B). This suggests a strong binding between SKI-1 and this 14 kDa polypeptide, which is most likely a fragment of the SKI-1 prosegment against which Ab:P was raised. In addition, we noted that some of the 100 kDa BTMD-SKI-1 is cleaved into a 98 kDa form identical to that observed with FL-SKI-1 (Fig. 1B). Hence, the endogenous sheddase(s) which is presumably at the cell surface (10,17) can act on both forms of the enzyme. Western blots analyses using either an N-terminal antiserum directed against aa 217-233 (Ab:N), or Ab:S, revealed a secreted ~100 kDa BTMD-SKI-1 in media obtained from BSC40 cells infected with VV:BTMD-SKI-1 (Fig. 1C). Furthermore, using a mixture of Ab:S and Ab:P, Western blot analysis of the hexa-His-containing enzyme, purified on a Ni²⁺-affinity resin, demonstrated that the 14 kDa prosegment band remains associated with the 100 kDa enzyme

A



B



C

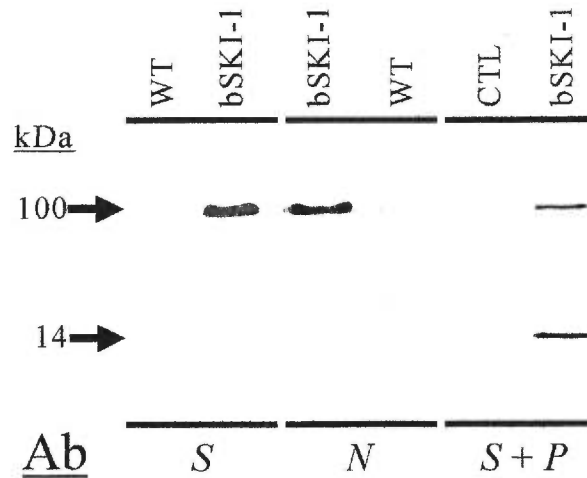


Fig.1, [A] schematic representation of SKI-1 FL and BTMD-SKI-1. Regions against which antibodies have been raised are depicted. [B] BTMD-SKI-1 (bSKI-1) or control VV:WT infected LoVo cells were pulse-labeled for 3h with [³⁵S]Cys. Media were immunoprecipitated with either Ab:S or P and then resolved by SDS-PAGE on an 8% gel followed by autoradiography. Arrows point to the migration positions of the 100 kDa BTMD-SKI-1 (bSKI-1), the 98 kDa shed form (sSKI-1) and the 14 kDa prosegment product. [C] **Western blot analysis of the expressed BTMD-SKI-1.** Samples from VV:WT or BTMD-SKI-1 infected BSC 40cells (left and middle panel) were processed as described under "Experimental Procedures" and run on an 8% SDS-PAGE reducing gel. Following electrotransfer to PVDF membranes, protein bands were visualized via ECL detection using primary rabbit antisera (Ab:S or Ab:N). BTMD-SKI-1 (right panel) was first purified batchwise on a Ni²⁺ affinity resin, then processed as described above. A mixture of Ab:S and Ab:P were used as primary antisera. Elution buffer was used as control (CTL). (Fig. 1C), thus corroborating the biosynthetic observations of a strong association between the two proteins (Fig. 1B).

In order to evaluate the rate of zymogen processing and the fate of the prosegment, LoVo cells overexpressing VV:FL-SKI-1 were pulse-labeled for 15 min with [³H]Leu and then chased for 2h. Figure 2 shows an SDS-PAGE analysis of the cell lysates immunoprecipitated with Ab:P (left panel). Five immunoreactive polypeptides (molecular masses 26, 24, 14, 10 and 8 kDa), which are absent in control cells infected with VV:WT, are detected. In order to further define in which organelle this processing occurs, VV:FL-SKI-1-infected LoVo cells were pulse-labeled for 2h with [³H]Leu in the presence or absence of BFA. The fungal metabolite BFA is known to disassemble the Golgi complex and to cause the fusion of the *cis*, *medial* and *trans* Golgi (but not the *trans* Golgi network, TGN) with the ER (18). As shown in the right panel of Fig. 2, in the absence or presence of BFA, the same five major immunoreactive prosegment forms can still be detected intracellularly. This strongly implies that zymogen processing of proSKI-1 occurs in the ER, as was previously reported (10), and that processing of the prosegment also occurs in this organelle.

In order to eliminate the possibility that the observed truncation of the prosegment is due to vaccinia virus overexpression, we concentrated media from a stable transfectant of FL-SKI-1 in human HK293 cells (10). This material was purified via RP-HPLC using first a semi-preparative C8 column (*not shown*) followed by an analytical C4 column (Fig. 3A). Four fractions were analyzed by Western blot using Ab:P. As shown in Fig. 3B, immunoreactive prosegment products ranging from 24 to 4.5 kDa are apparent. N-terminal sequencing of the 14 kDa protein in fraction IV (Fig. 3C) revealed a major sequence starting at Gly¹⁸ of pre-pro-SKI-1 (10,12). This clearly defines the signal peptidase cleavage site as LVVLLC¹⁷↓GKKHLG, which is one aa before that predicted by signal peptidase cleavage site algorithms (10,11). The N-terminal

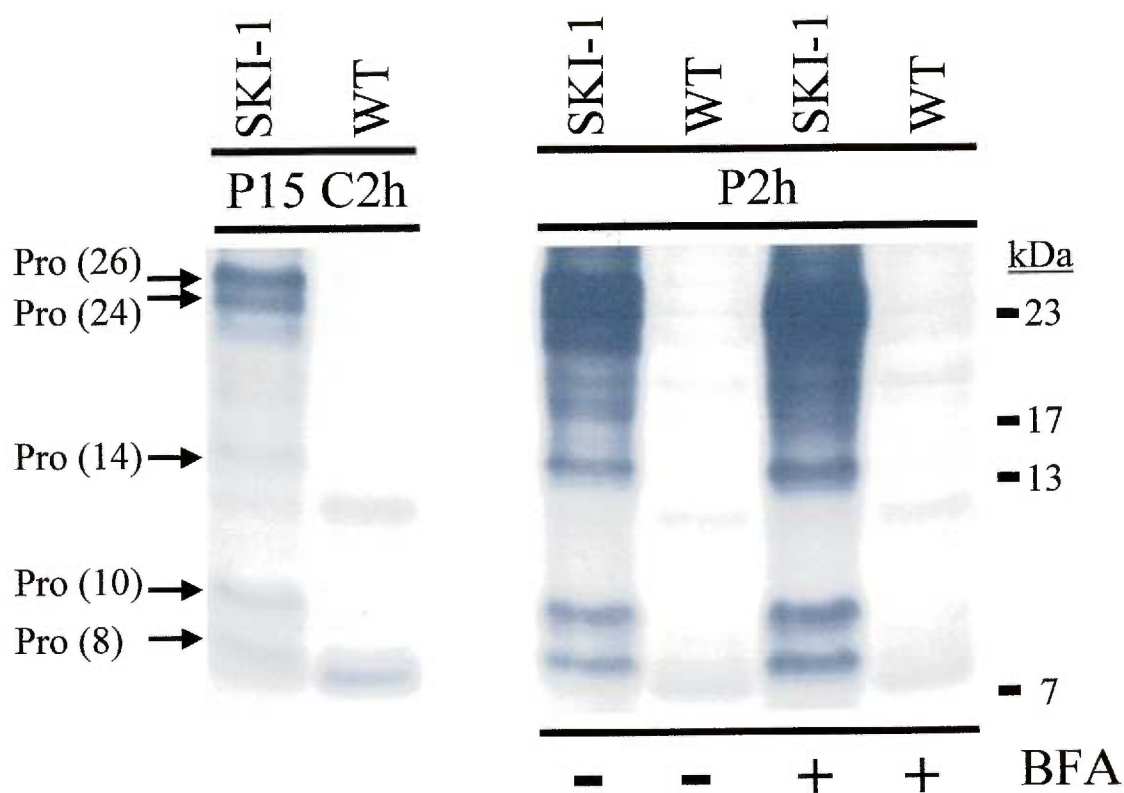


Fig. 2. **Biosynthetic analysis of the rate of zymogen processing and the fate of the prosegment of SKI-1.** LoVo cells overexpressing VV:FL-SKI-1 were pulse-labeled for 15 min with [3 H]Leu and then chased for 2h (P15C2h), or pulsed for 2h in the presence or absence of BFA (P2h). Cell lysates were immunoprecipitated with Ab:P, resolved by SDS-PAGE on a 14% gel and the dried gel autoradiographed. The migration positions of the major 26, 24, 14, 10 and 8 kDa prosegments are emphasized.

sequence of the 4.5 kDa polypeptide revealed that it starts at Pro¹⁴³, indicating a cleavage at the sequence KYAESD¹⁴²↓PTVPCNETRWSQK (Fig. 3D). This fragment may result from an artefactual cleavage between Asp and Pro which is known to occur in some peptides under the acidic conditions used in either RP-HPLC, Edman sequencing (19), or sample preparation for SDS-PAGE analysis (20). Nevertheless, it worth noting that no problems were encountered in the detection of phenylthiohydantoin (PTH)-Asn¹⁴⁸, which occurs in the putative N-glycosylation site AsnGlyThr. This result demonstrates that Asn¹⁴⁸ within the prosegment of SKI-1 is not significantly glycosylated. This was also confirmed by the resistance of the prosegment to endo H and endo F digestions (*not shown*). Interestingly, the only two eukaryotic subtilases exhibiting a potential N-glycosylation AsnGluThr site are kexin (21) and SKI-1 (10), and the latter's prosegment was shown to be non-glycosylated (Fig. 3D). Finally, the separation of the above prosegment fragments from the mature SKI-1, under RP-HPLC (Fig. 3A,B) and non-reducing SDS-PAGE (*not shown*) analysis conditions, suggests that the Cys residues found in the prosegment (10) are not linked by disulfide bridges to the rest of the protein.

The result of MALDI-TOF analysis of the components within fraction IV is shown in Fig. 3E. Three major molecular ions were detected with masses estimated at 13,351, 13,518, and 13,685 Da. The N-terminal sequence of the ~14 kDa protein (Fig. 3C) and the masses estimated above suggest that the immunoreactive 14 kDa prosegments could be derived from C-terminal cleavages at QRKVF↓R↓SL↓KYAE¹⁴⁰. The expected error in the estimation of protein mass within this range is ± 20 Da. As we were unable to obtain consistent mass spectra of the 4.5 kDa polypeptide that was sequenced in Fig. 3D, we still cannot unambiguously determine the C-terminus of this peptide, which presumably corresponds to the primary zymogen cleavage site of SKI-1.

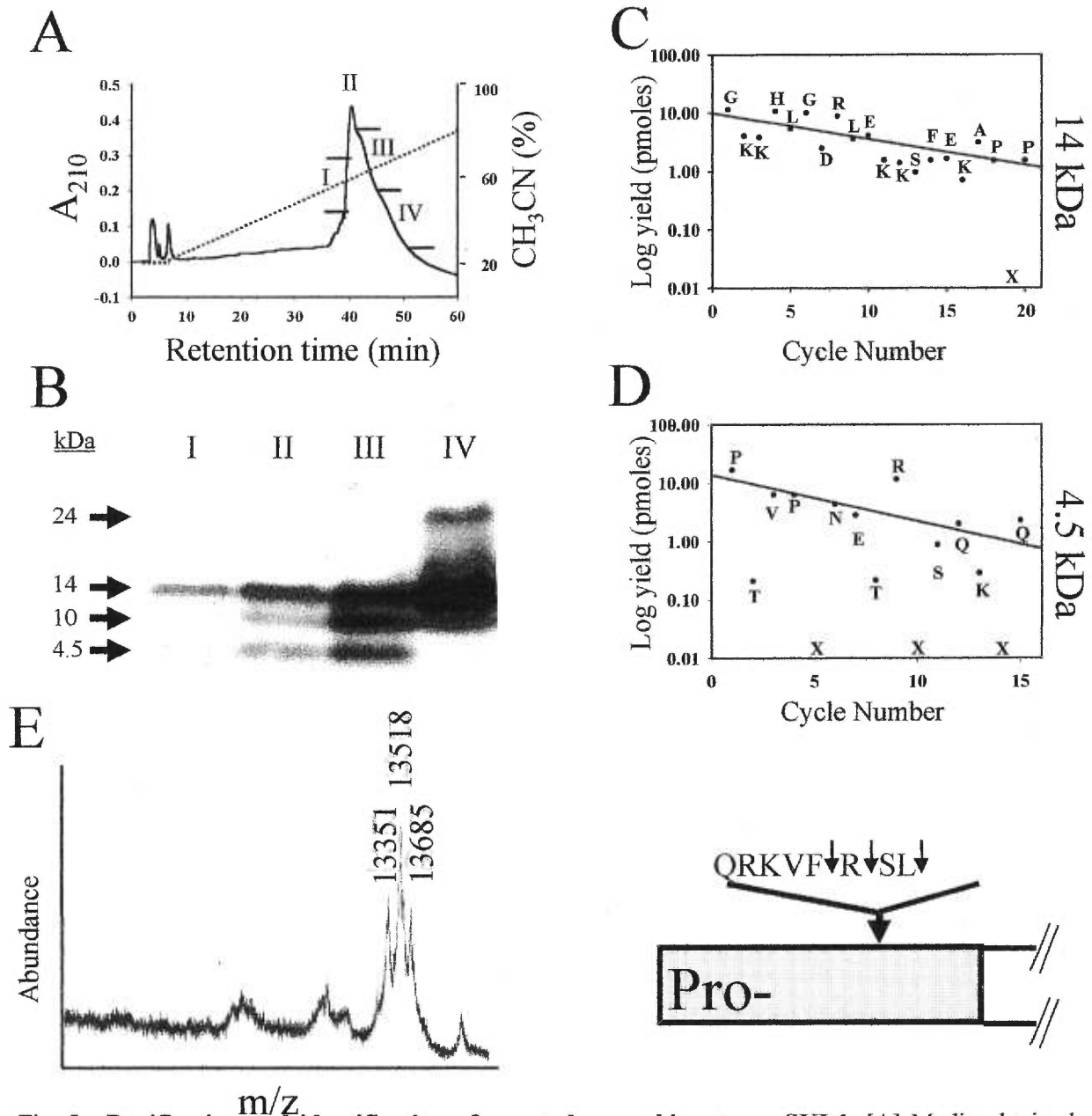


Fig. 3. **Purification and identification of secreted recombinant pro-SKI-1.** [A] Media obtained from HK293 cells stably expressing FL-SKI-1 were concentrated and sequentially applied to C8 semi-preparative (*not shown*) and C4 analytical RP-HPLC columns and eluted by the depicted linear CH₃CN gradient. [B] The designated fractions I-IV were collected and analysed by Western blotting using the primary antiserum Ab:P. [C,D] Proteins contained in fraction IV were separated on a 10% gel by SDS-PAGE under reducing conditions. Following electrotransfer, the proteins were stained with Ponceau Red. The immunoreactive 14 kDa [C] and non-immunoreactive but colored ~4.5 kDa [D] polypeptides were excised and submitted to N-terminal sequencing. (X, represents an undefined residue). [E] Mass spectral analysis by MALDI-TOF of crude fraction IV. The proposed C-terminal processing sites leading to the formation of the three ~14 kDa polypeptides are depicted at the bottom.

In Vitro Kinetic Properties of SKI-1: Comparative Analysis of Substrate Cleavages and Prosegment Inhibition—In a previous report (10), sSKI-1 was shown, *in vitro*, to cleave the 32 kDa pro-BDNF into a 28 kDa form at the **RGLT↓SL** sequence, with a pH optimum close to neutrality. Similar to PCs (1-3), we suggested that SKI-1 may be a Ca²⁺-dependent enzyme since the calcium ionophore A23187 inhibited the *ex vivo* cleavage of proBDNF (10). In this work, we first determined the ability of BTMD-SKI-1 to process two synthetic peptides *in vitro*; a 14 aa peptide spanning the hproBDNF processing site, K⁵⁰AGS**RGLT↓SL**ADTF⁶³ (10) and a 27 aa hSREBP-2-related peptide, G⁵⁰⁴GAHDSQHPHSGSG**RSVL↓SF**ESGG⁵³⁰ (8). Reaction of these peptides with BTMD-SKI-1 at pH 6.5, followed by MALDI-TOF mass spectrometry analysis of the RP-HPLC-purified products confirmed the expected sites of cleavage (Fig. 4). Using these two assays, we also demonstrated that the optimal pH and calcium concentrations for the efficient cleavage of both peptides are approximately pH 6.5 and 2 mM Ca²⁺, respectively (Fig. 5). Higher Ca²⁺ concentrations, up to 10 mM, did not enhance the enzymatic activity. Interestingly, the pH optimum observed with the hSREBP-2 peptide is sharper than that seen with the proBDNF peptide. In the latter case, the enzyme still retains about 30% of its activity at pH 5.0 and 55 % of its activity at pH 8.5 (Fig. 5A). Similar results were also obtained with Ni²⁺ purified BTMD-SKI-1 (*not shown*). Table I shows the inhibitor profile of SKI-1, in which it is clear that this enzyme is most sensitive to metal chelators such as EDTA and to the calcium chelator EGTA. In addition, the transition metals Cu²⁺ and Zn²⁺, but not Ni²⁺ or Co²⁺, inhibit the enzyme at mM concentrations. As was reported with the 32 kDa proBDNF (10), assays with the synthetic SREBP-2 peptide demonstrated that o-phenanthroline becomes inhibitory at concentrations

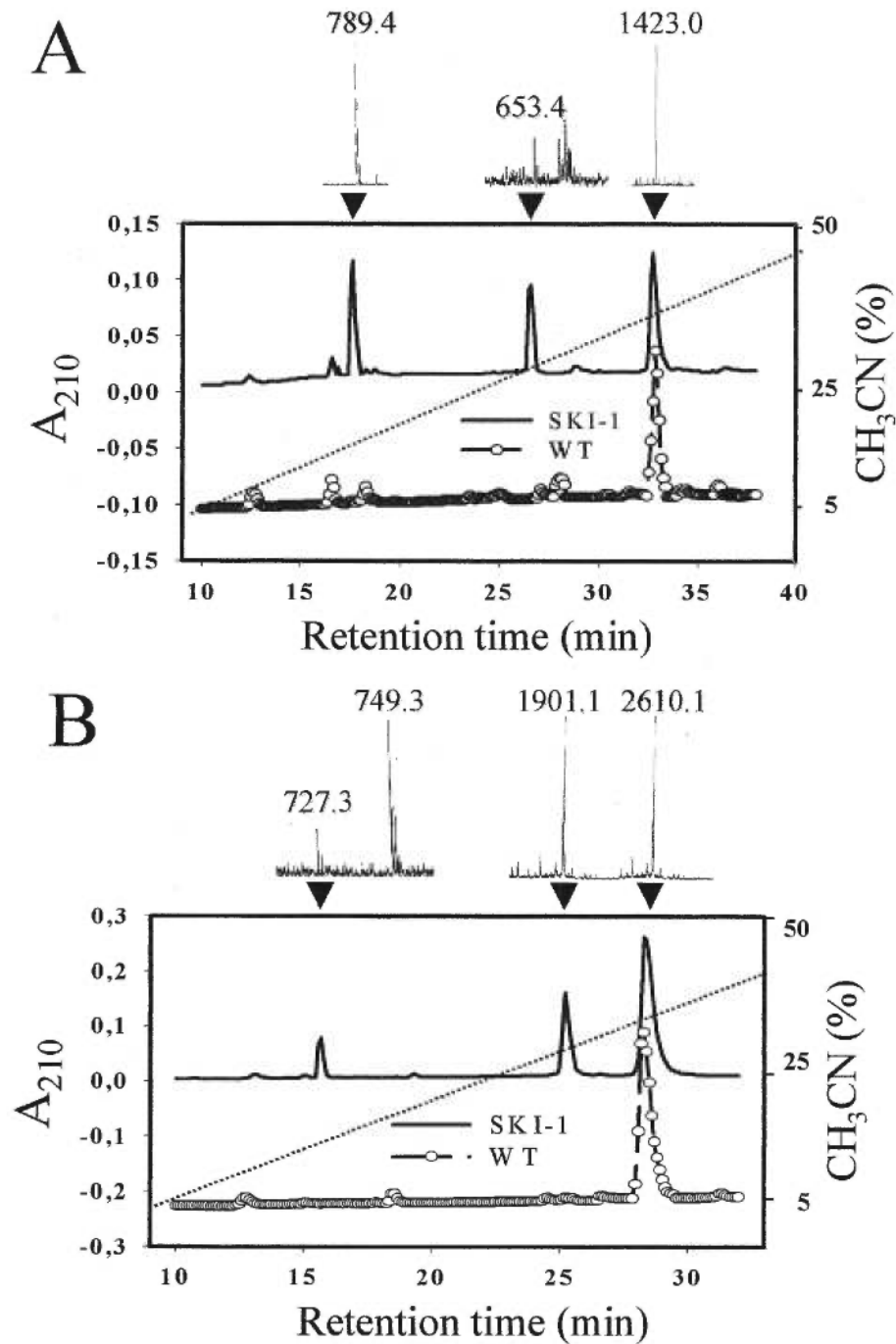
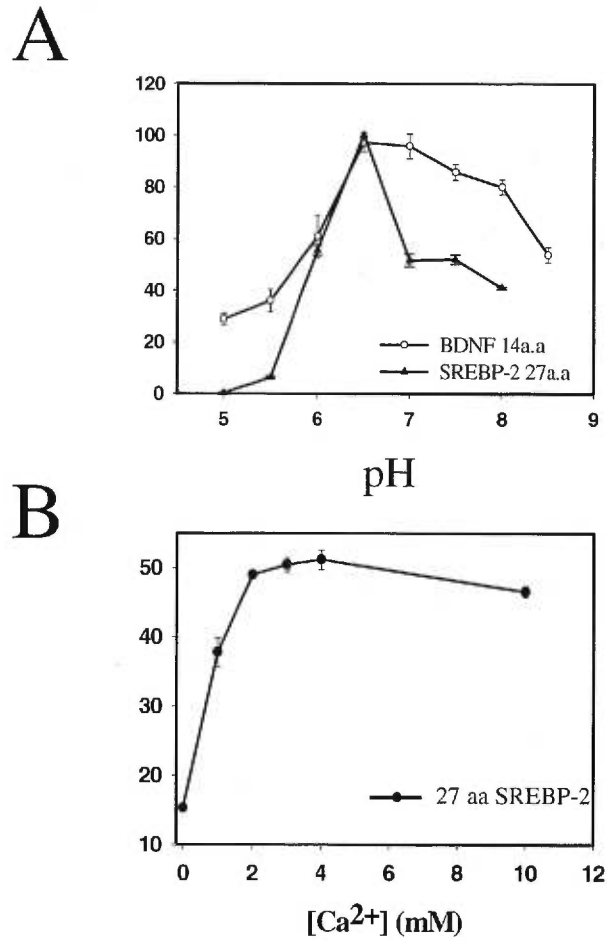


Fig 4. **Processing of proBDNF and SREBP-2 by BTMD-SKI-1.** The 14 aa peptide I [A] and 27 aa peptide II [B] were digested with BTMD-SKI-1 for 150 and 60 min, respectively. The cleavage products were separated by RP-HPLC using a 5 μ m analytical Ultrasphere C18 column (Beckman) as described under "Experimental Procedures". The peptides under the peaks were identified by mass spectrometry (masses above each peak) and amino acid analysis (*not shown*).

Fig 5. pH and Ca²⁺ activation profile of BTMD-SKI-1. Preparation of BTMD-SKI-1 from



infected BSC40 cells was assayed as described under "Experimental Procedures" using a two buffers system consisting of MES and HEPES, along with peptides I or II for the pH profile [A], and peptide II for the Ca²⁺ profile [B]. The results represent the average \pm SD (indicated as error bars) of three separate determinations.

above 1 mM. The other non-chelator inhibitors tested had little or no effect on SKI-1 activity (Table I).

Table I: Effect of selected protease inhibitors on BTMD-hSKI-1 activity

| Inhibitor | Concentration | Hydrolysis of SREBP-2 peptide |
|-------------------|------------------|-------------------------------|
| | (mM) | (% of control) ¹ |
| Control | - | 100 |
| APMSF | 1.0 | 95 |
| PMSF | 1.0 | 85 |
| TPCK | 1.0 | 71 |
| TLCK | 1.0 | 100 |
| SBTI | 0.5 ² | 100 |
| Cystatin | 0.01 | 100 |
| Antipain | 1.0 | 100 |
| Chymostatin | 1.0 | 100 |
| Leupeptin | 1.0 | 100 |
| Pepstatin | 0.1 | 97 |
| E-64 | 0.01 | 100 |
| O-Phenanthroline | 0.05 | 135 |
| o-Phenanthroline | 1.0 | 90 |
| | 5.0 | 0 |
| EDTA | 10.0 | 0 |
| EGTA | 10.0 | 15 |
| Dithiothreitol | 10.0 | 92 |
| CuSO ₄ | 1.0 | 0 |
| ZnSO ₄ | 1.0 | 0 |
| NiSO ₄ | 1.0 | 93 |
| MgCl ₂ | 1.0 | 100 |
| CoCl ₂ | 1.0 | 100 |

¹ Values represent averages of duplicate assays (variation is $\pm 5\%$).

² Concentration in mg/ml.

Digestion reactions using BTMD-SKI-1 medium plus peptide II were carried out as described in "Experimental Procedures". The agents were preincubated with the enzyme for 30 min.

A summary of the kinetic analyses of the synthetic proBDNF (peptide I) and SREBP-2 (peptide II) cleavages by SKI-1 is shown in Table II-A. Both peptides are cleaved at comparable kinetic efficiencies with V_{max}/K_m values of 0.04 and 0.07/h, respectively. In order to extend the analysis of potential SKI-1 substrates, we synthesized a series of peptides which encompass the

predicted autocatalytic (11) prosegment primary cleavage sites. All contain an Arg at P4 and either a Leu or a small amino acid at P1. These choices were based on a mutagenesis study of SREBP-2 cleavage sites (8) and on our detection of 26 and 24 kDa SKI-1 prosegment products (Fig. 2). Accordingly, three potential sites were selected as shown in the sequences of peptides III, VI and VII (Table II-B). Of these, only peptide III (sequence of WHATGRHSSRRLL↓RAIPR) was cleaved, albeit much less efficiently than the proBDNF and SREBP-2 peptides (I and II, *not shown*). This suggested that determinants other than residues occupying the P1 and P4 positions are also important. Based on our previous observation that SKI-1 does not cleave the fluorogenic peptides RGLT-MCA, RGLTT-MCA and RSVL-MCA (10), which lack the P' residues, we attempted to improve the cleavability of peptide III by replacing the Ile and Pro residues at P3' and P4' by Leu and Glu, respectively (peptide IV; Table II-B). This mutation led to a major improvement in the processing of this peptide by SKI-1. In fact the V_{\max}/K_m values are 10 and 6 fold higher (peptide IV; Table II-A) than those obtained with peptides I and II, respectively. N-terminal truncation of this peptide from 17 to 9 aa (peptide V; Table II-B) caused in a 4-fold reduction in catalytic efficiency (Table II-A).

Table II-A: Kinetic constants for the hydrolysis of peptide substrates by BTMD-hSKI-1

| Peptide | $K_{m(app)}$ (nM*1000) | $V_{max(app)}$ (nmol/h) | $V_{max(app)} / K_{m(app)}$ (h ⁻¹ L ⁻¹) |
|---------|---------------------------|----------------------------|---|
| I | 169 | 0.4 | 0.002 |
| II | 124 | 0.5 | 0.004 |
| IV | 17 | 0.4 | 0.023 |
| V | 109 | 1.1 | 0.010 |

Increasing concentrations of peptides were reacted with identical quantities of BTMD-SKI-1 medium for times chosen to produce 5-30 % substrate hydrolysis. Data analysis was carried out as described in "Experimental Procedures". The values are averages of duplicate assays.

Table II-B: Peptide sequences

TABLE I-A
Synthetic peptide substrates

| Peptide | P16 | P12 | P8 | P4 | P1 | P4' | P8' |
|------------------|-------------|-------------------|--------------------------|--------------------|----|------------------------|-----|
| I | | | K A G S R G L T ↓ | | | S L A D T F | |
| II | G G A H D S | D Q H P H S G S G | R S V L ↓ | | | S F E S G S G G | |
| III | | W H A T G | R H S S R R L L ↓ | | | R A I P R | |
| IV | | W H A T G | R H S S R R L L ↓ | | | R A L E | |
| V | | | | S R R L L ↓ | | R A L E | |
| VI ¹ | | W Q S S | R P L R R A S L | | | - S L G S G | |
| VII ¹ | | | R A I P R Q V A | | | - Q T L Q A D V | |

¹ No cleavage detected even with a 10-fold excess of enzyme.

² Cleavage detected but not attributable to SKI-1.

³ Kinetic determinations of this peptide were not attempted due to the presence of multiple cleavages.

Peptides were first reacted with approximately equal quantities of BTMD-SKI-1 medium for 2-18 h as described in "Experimental Procedures". When cleavage was not detected, a 10-fold concentrated enzyme preparation was tested. Arrow thickness is a qualitative estimate of the cleavage efficacy.

Finally, we asked whether the prosegment of SKI-1 can act as an inhibitor of its activity *in vitro*, as is the case for the prosegments of other subtilases (3,25,28). Due to the refractory nature of the 98 kDa protein to sequencing (10) and of the 4.5 kDa pro-peptide to MALDI-TOF mass spectral analysis, we were unable to directly define the primary cleavage site of the prosegment of SKI-1. As an alternative, we prepared prosegment constructs ending at the three most likely activation sites. The choice of these candidate cleavage sites was based on the observed size of the largest prosegment proteins (~ 26 and 24 kDa) and on the ability of SKI-1 to selectively process peptide III (Table II-B). Hence, three prosegment (PS) constructs ending at aa Leu¹⁶⁹ (PS1), Ala¹⁸⁸ (PS2), and Leu¹⁹⁷ (PS3) and coupled to an hexa-His tag (Fig. 6A) were prepared. These prosegment constructs were expressed in bacteria and purified by Ni²⁺-affinity and RP-HPLC (*see methods*). The purity of these bacterially produced prosegments was confirmed by SDS-PAGE followed by Coomassie staining (Fig. 6B) and aa analysis (*not shown*). A summary of the inhibitory potency of each prosegment using peptide IV as a substrate is shown in Table III. Although PS2 exhibits the best apparent inhibitory constant ($K_{i(\text{app})} = 97 \text{ nM}$), PS3 ($K_{i(\text{app})} = 127 \text{ nM}$) and PS1 ($K_{i(\text{app})} = 182 \text{ nM}$) are also potent inhibitors of SKI-1. When PS2 was digested with carboxypeptidase B to eliminate the His-tag, its inhibitory potency was not affected (*not shown*), confirming that inhibition is not due to the C-terminal tag.

A

DPKK--RASL¹⁶⁷SLEH₆ ...RRL¹⁸⁶RALEH₆ ...RQVA¹⁹⁴QTLEH₆

B

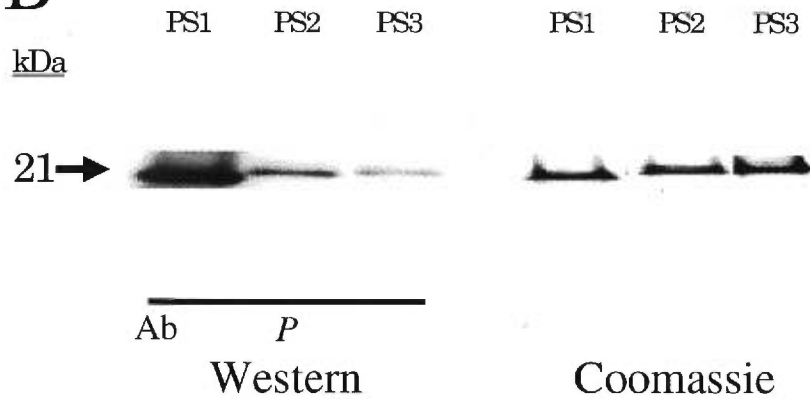


Fig 6. [A] **Purity of pro-SKI-1 constructs.** Three putative primary activation sites, together with the constructs made, are schematically represented. The number above each aa corresponds to the candidate processing site. A hexa-histidine tag is directly fused to each prosegment. [B] The prosegments were purified via Ni²⁺ affinity column chromatography and RP-HPLC as described in "Experimental procedures" and analysed by Western blotting using Ab:P as the primary antibody (left panel). The purity was assessed by Coomassie staining (right panel).

Table III: Effect of pro-segment peptide constructs on BTMD-hSKI-1 activity

| Pro-segment construct | $K_{i(\text{app})}$ (nM) |
|-----------------------|-----------------------------|
| PS1 | 182.0 ± 0.5 |
| PS2 | 97.5 ± 4.5 |
| PS3 | 127.3 ± 6.2 |

DISCUSSION

Limited proteolysis of inactive precursor proteins at sites marked by paired or multiple basic residues is a widespread process (1,2). Less common is the recent finding that bioactive peptides or proteins can also be generated by limited proteolysis after either hydrophobic or small residues (3). SKI-1 represents the first mammalian member of subtilisin-like processing enzymes with such substrate specificity (10,11). It is a widely expressed enzyme (10) implicated in cholesterol and fatty acids metabolism (11). Until now, however, questions related to the fate of its pro-region, its substrate specificity or its enzymatic properties have not been addressed. The present report clearly demonstrates that SKI-1 can cleave substrates C-terminal to Thr and Leu, thus providing the first direct, *in vitro* evidence that it is the converting enzyme responsible for the generation of 28 kDa proBDNF (10) and processing of SREBP-2 at site 1 (11).

The data presented in Fig. 5 demonstrate that BTMD-SKI-1 is a Ca^{2+} -dependent serine proteinase with an optimal Ca^{2+} requirement of 2-3 mM. This is consistent with the conditions that reportedly prevail in the ER (22,23). However, SKI-1 remains significantly active at pH 5, suggesting that it could be active in acidic endosome-like compartments where it was previously localized (10). Altogether the pH and Ca^{2+} profiles of SKI-1 resemble those of the constitutively secreted PCs (1,13). The inhibitor profile of SKI-1 is presented in Table I. While SKI-1 activity is significantly inhibited by EDTA, EGTA and high concentrations of *o*-phenanthroline (10), lower concentrations of the latter compound are beneficial for its activity (Table I). Hence, it is very unlikely that SKI-1 is a transition metal-dependent proteinase. In fact, SKI-1 activity is inhibited by low concentrations of certain transition metals (copper and zinc).

To discriminate between candidate primary processing sites (10) and also to gain more information about substrate specificity, three proregion-derived synthetic peptides (III, VI and VII, Table II-A) were reacted with BTMD-SKI-1. Of these, only peptide III was cleaved, further strengthening the likelihood that RRLL↓RAIP represents the primary autocatalytic cleavage site (10). Replacement of the P3' and P4' residues Ile and Pro by Leu and Glu in peptide IV led to a very efficient SKI-1 substrate. Thus, either the presence of Pro at P4' affects the efficiency of substrate recognition, or the presence of an acidic residue at P4', although not absolutely essential, significantly enhances the rate of substrate hydrolysis. Similar acidic residues are also found at the P3' or P4' position of the two confirmed substrates of SKI-1 (Table II-A). Accordingly, we propose that these residues may play a determining role in SKI-1 substrate cleavage catalysis. In addition, peptide V, which represents an N-terminally truncated form of peptide IV, displays a 4-fold lower V_{max}/K_m value (Table II-B). Thus, residues N-terminal to the aa in P5 are also important catalytic determinants. Together with our previous finding that soluble SKI-1 does not cleave small fluorogenic substrates of sequence RGLT-MCA, RGLTTT-MCA, or RSVL-MCA (10), these data demonstrate the critical importance of aa at the P and P' positions in SKI-1-mediated substrate hydrolysis. Therefore, SKI-1 most likely possesses an extended substrate binding pocket (10) that contributes to its cleavage selectivity.

Many peptidyl hydrolases, including subtilases, possess a pro-domain which acts both as an intramolecular chaperone and a highly potent inhibitor of its associated protease (24,25). Activation of the enzyme typically requires release of the prosegment in an organelle-specific manner. For furin (26) and PC7 (13; *unpublished results*) the release occurs in the TGN, whereas for PC1 and PC2 (27) it occurs in immature secretory granules. SKI-1 is unique

among the mammalian subtilases since multiple cleavages of its prosegment occur in the ER (*this work*) and thus do not require an acidic environment for activation. This work identifies the sequence of events presumably leading to SKI-1 activation. Following the signal peptide removal in the ER by cleavage at LVVLLC¹⁷↓GKKHLG (Fig. 3C), the prosegment is processed into a nonglycosylated polypeptide with an apparent molecular mass of 26 kDa (Fig. 2). The 26 kDa prosegment is further processed into 24, 14, 10 and 8 kDa intermediates (Fig. 2). The primary cleavage occurs within 10 min and the secondary ones within 30 min (*not shown*). Since treatment of cells with BFA did not significantly alter these processing events, they most likely occur in the ER (Fig. 2). We hypothesize that generation of multiple fragments from the 26 kDa pro-form results in the loss of its inhibitory effect (Table III), in a fashion similar to subtilisin E (24,25). Surprisingly, some pro-region-derived polypeptides are found associated with SKI-1 in cell culture media. Thus, in contrast to furin (26), the low pH and high Ca²⁺ concentrations prevailing in the TGN do not lead to propeptide dissociation. High ionic concentrations (up to 1M NaCl) such as those used in immunoprecipitation (Fig. 1B) and affinity protein purification (Fig. 1C) also do not disrupt the complex. It is only during RP-HPLC purification (Fig. 3A), in the presence of strong acids and organic solvents, that the prosegment dissociated from SKI-1. These data suggest that hydrophobic interactions may be critical, as shown for subtilisin (24,25).

In order to examine the cleavage sites involved in the degradation of the prosegment of SKI-1, we purified the major secreted products. Combining N-terminal sequencing data (Fig. 3C) with our mass spectral analysis of the ~14 kDa proteins (Fig. 3E), it appears that this fragment begins at Gly¹⁷, just following the signal peptidase cleavage site, and ends at three different positions within the QRKVF↓R↓SL↓KYAESD¹⁴² sequence. In the case of the 4.5

kDa fragment, our data suggest that it was artificially produced by an N-terminal Asp↓Pro cleavage under acidic conditions (Fig. 3D) and as mentioned above its C-terminus may end at the RRL↓ sequence (Table II). The presence of a basic R or K residue either at the P4 or P6 positions in each case, fits and extends the reported critical presence of a basic aa at P4 (8). The multiple cleavages observed within the pro-region may be catalysed by SKI-1 itself, although the participation of other proteases cannot be excluded.

Inspired by the observation that peptides containing the primary processing site of the prosegment of PC1 are potent inhibitors of its activity, and that the C-terminal basic residues of furin and PC7 are essential for enzyme inhibition (28; M. Zhong and N.G. Seidah, *in preparation*), we assessed the inhibitory potency of three SKI-1 recombinant propeptides (Fig. 6A). These contain putative primary processing sites with a P4 Arg (8). Surprisingly, the three prosegments displayed comparable inhibitory potencies (Table III). Compared to proPC1 (29), pro-furin and proPC7 (M. Zhong and N.G. Seidah, *in preparation*), the $K_{i(app)}$ (Table III) are up to 250 fold higher. This suggests that the prosegment of SKI-1, although potentially inhibitory *in vivo*, may function more as a chaperone, catalyzing the productive folding of SKI-1. Indeed, since SKI-1 is active in the ER (10,11), whereas the PCs are not (13,26), the lower inhibitory potency of the prosegment of SKI-1 may be adapted to the conditions prevailing in this cellular compartment. In the case of PCs, highly effective inhibition by the prosegment may be needed in order to ensure that these enzymes are activated only when they reach the TGN or secretory granules (1-3). The 14 kDa fragment, which represents the major secreted form of the prosegment, is tightly associated with SKI-1 (Fig. 1C) yet is not inhibitory (*not shown*). Accordingly, this segment may serve a

chaperonin-like function similar to that reported for the N-terminal 150 aa of 7B2 towards proPC2 (30,31).

In conclusion, the present work firmly establishes that SKI-1 is a Ca^{2+} -dependent subtilase with a neutral pH optimum. For efficient cleavage, it may be preferable that substrates contain a basic residue at P4 and an aliphatic one at P2 (Table I). Furthermore, aa at the P3' and P4' positions seem to exert an important discriminatory effect. The mechanism of zymogen activation of this phylogenetically ancient enzyme (10) is more akin to that of subtilisin than to that of the dibasic-specific PCs. Finally, it is anticipated that precursor substrates, other than the sterol regulating SREBPs (8) and the neurotrophin proBDNF (10), will be identified, thereby extending the spectrum of activity of this unique and versatile enzyme.

REFERENCES

1. Seidah, N.G., Day, R., Marcinkiewicz, M., and Chretien, M. (1998) *Ann. NY Acad. Sci.* **839**, 9-24
2. Steiner, D.F. (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 31-39
3. Seidah, N.G., Mbikay, M., Marcinkiewicz, M., and Chrétien, M. (1998) In: *Proteolytic and Cellular Mechanisms in Prohormone and Neuropeptide Precursor Processing.* (Hook, V.Y.H, ed.), R.G. Landes Company, Georgetown, TX pp. 49-76
4. Ling, N., Burgus, R., and Guillemin, R. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3042-3046
5. Burbach, J.P.H., Seidah, N.G, and Chrétien, M. (1986) *Eur. J. Biochem.* **156**, 137-142
6. Hudson, P., Haley, J., Cronk, M., Shine, J., and Niall, H. (1981) *Nature* **291**, 127-131
7. Gupta, S.K., Hassel, T., and Singh, J.P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7799-7803
8. Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Sakai, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12778-12785
9. Siezen, R.J. and Leunissen, J.A. (1997) *Protein Sci.* **6**, 501-523
10. Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M., Barale, J.C., Lazure, C., Murphy, R.A., Chretien, M., and Marcinkiewicz, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1321-1326
11. Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1998) *Mol. Cell* **2**, 505-514
12. Nagase, T., Miyajima, N., Tanaka, A., Sazuka, T., Seki, N., Sato, S., Tabata, S., Ishikawa, K., Kawarabayasi, Y., and Kotani, H. (1995) *DNA Res.* **2**, 37-43

13. Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Benjannet, S., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 19672-19681
14. Rovere, C., Luis, J., Lissitzky, J-C., Basak, A., Marvaldi, J., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 12461-12467
15. Basak, A., Boudreault, A., Chen, A., Chrétien, M., Seidah, N.G., and Lazure, C. (1995) *J. Pept. Sci.* **1**, 385-395
16. Basak, A., Ernst, B., Brewer, D., Seidah, N.G., Munzer, J.S., Lazure, C., and Lajoie, G.A. (1997) *J. Pept. Res.* **49**, 596-603
17. Hooper, N.M., Karran, E.H., and Turner, A.J. (1997) *Biochem. J.* **321**, 265-279
18. Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., and Klausner, R.D. (1991) *Cell* **67**, 601-616
19. Gram, H., Ramage, P., Memmert, K., Gamse, R. and Kocher, P. (1994) *Bio/technology*, **12**, 1017-1023
20. Rittenhose, J. and Marcus, F. (1984) *Anal. Biochem.* **138**, 442-448
21. Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S., and Matsuo, H. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 305-311
22. Sambrook, J.F. (1990) *Cell*, **61**, 197-199
23. Kendall, J.M., Badminton, M.N., Dormer, R.L. and Campbell, A.K. (1994) *Anal. Biochem.*, **221**, 173-181
24. Inouye, M. (1991) *Enzyme* **45**, 314-321
25. Gallagher, T., Gilliland, G., Wang, L., and Bryan, P. (1995) *Structure* **3**, 907-914

26. Anderson, E.D., Vanslyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F., and Thomas, G. (1997) *EMBO J.* **16**, 1508-1518
27. Malide, D., Seidah, N.G., Chretien, M., and Bendayan, M. (1995) *J. Histochem. Cytochem.* **43**, 11-19
28. Boudreault, A., Gauthier, D., and Lazure, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 31574-31580
29. Muller, L., Zhu, X.R., and Lindberg, I. (1997) *J. Cell Biol.* **139**, 625-638
30. Benjannet, S., Mamarbachi, A.M., Hamelin, J., Savaria, D., Munzer, J.S., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1998) *FEBS Letters* **428**, 37-42

DISCUSSION GÉNÉRALE

SKI-1 représente l'une des subtilases les mieux conservées entre les espèces au cours de l'évolution. On note une homologie de séquence variant de 96 à 98% entre l'humain et la souris, le hamster et le rat (article 1 ; Sakai et al., 1998). Cette similarité atteint 100% dans le domaine catalytique. Ceci laisse supposer une conservation des propriétés qui caractérisent la protéine.

L'existence d'isoformes d'ARNm pour SKI-1 a cependant été observée. En effet chez certains clones de rat, l'ARNm montre une délétion des nucléotides codant pour les aa 430-483 ou 858-901 (article 1). La première délétion a lieu juste après la région catalytique tandis que la seconde a entraîné la disparition du domaine de récepteur de cytokine. Il reste encore à savoir si ces délétions ont entraîné une quelconque perte ou gain de fonction.

La présence d'une séquence hydrophobe de 24 aa dans le domaine C-terminal suggère que SKI-1 est une protéine transmembranaire de type I. Cette association de SKI-1 à la membrane fut récemment confirmée par des expériences de fractionnement cellulaire (Sakai et al., 1998).

4.1 Distribution tissulaire et localisation cellulaire de SKI-1

Des informations importantes sur le rôle que joue une protéine au cours du développement peuvent être obtenues de ce genre d'étude. De plus, la localisation cellulaire peut se révéler très utile dans l'identification d'éventuels substrats.

Une étude détaillée de la distribution tissulaire et de la localisation cellulaire de SKI-1 est présentée dans l'article 1. Il ressort que, comme PC7 ou la furine (Seidah et al, 1998), l'ARNm de SKI-1 montre une distribution ubiquiste autant chez le rat nouveau-né (hybridation *in situ*) que chez le rat mâle adulte (Northern Blot). Un niveau élevé d'ARNm dans le foie corrobore la fonction primaire identifiée pour cet enzyme c'est-à-dire le métabolisme du cholestérol. Les études d'immunohistochimie démontrent que SKI-1 est présent dans le RE, le Golgi et probablement dans les endosomes. Cette présence de SKI-1 dans les compartiments post-RE de même qu'un niveau élevé d'ARNm dans d'autres organes comme le lobe antérieur du pituitaire suggèrent que l'enzyme pourrait bien être impliqué dans la protéolyse d'autres substrats que les SREBPs.

4.2 Le virus du baculo et l'expression de SKI-1 :

Le virus du baculo est très communément utilisé pour la production à grande échelle de protéines recombinantes de mammifères. Un virus recombinant d'une forme soluble de SKI-1 a été obtenu. Cependant, les cellules Hifive ou Sf9 d'insecte infectées par ce virus ne sécrètent qu'une quantité très faible de protéine. Il est fort probable que ce résultat soit lié à un problème de transport cellulaire plutôt qu'à un problème d'expression. En effet, la protéine est difficilement détectable dans le milieu cellulaire tandis que plusieurs formes de dégradation en plus des formes mature et immature sont observées dans la cellule (*Touré, B.B, non publié*). De plus, la majorité de SKI-1 détecté dans le milieu cellulaire se trouve sous la forme de 148 kDa (proSKI). Les études de biosynthèse ont démontré que le zymogène de l'enzyme ne sort pas du RE (article 1 et 2). Ceci tend à suggérer une relâche de l'enzyme dans le milieu suite à une lyse des cellules. Probablement à cause d'une sursaturation du RE en protéines.

Le meilleur système d'expression de SKI-1 demeure donc les cellules de mammifère à travers le virus de la vaccine et la transfection.

4.3 Modifications Post- traduction et mécanisme d'activation

Comme tous les PCs (Seidah et al, 1998), SKI-1 est synthétisé sous forme d'un précurseur de 148 kDa (Fig.4, article 1). Ce zymogène est converti en formes matures transmembranaire de 106 kDa et soluble 98 kDa de l'enzyme. Un intermédiaire de 120 kDa, qui ne diffère de la forme de 106 kDa que par la N-glycosylation, est aussi observé. En effet, SKI-1 contient six sites potentiels de N-glycosylation (Fig.2). Nos résultats (article 1) de même que les travaux de Sakai et collaborateurs (1998) démontrent clairement que certains de ces sites sont glycosylés dans le RE. La forme de 98 kDa diffère de celle de 106 kDa par la perte de la région transmembranaire. Cette perte est peut-être liée à la protéolyse par des *sheddases* à la surface de la cellule (Hooper et al., 1997).

La conversion du zymogène en forme mature nécessite une coupure aux sites primaire et secondaire d'activation pour la majorité des PCs (Seidah et al., 1998). La première coupure a lieu dans le RE tandis que la deuxième ne se fait que dans les compartiments acides du Golgi. En effet, les résultats des études *in vitro* sur la furine suggèrent qu'un

microenvironnement cellulaire acide et dense en calcium est nécessaire à la fois au clivage au site secondaire d'activation et à la dissociation du prosegment de l'enzyme actif (Anderson et al., 1997). Ce mécanisme général d'activation est vrai pour tous les PCs à quelques petites différences près. Pour PC2 la coupure au site primaire ne se fait que dans le Golgi/granules de sécrétion immatures (Benjannet et al., 1993).

SKI-1 serait cependant très différent des PCs. Même si les sites de coupure restent encore à être clairement définis, nous avons observé de multiples clivages dans le propeptide de ce dernier dans le pH neutre du RE. Nous suggérons que ces coupures affaiblissent l'interaction SKI-1/proSKI et conduisent à son activation. La coupure des SREBPs dans le RE consolide notre hypothèse. Le mécanisme d'activation de SKI-1 ressemble donc beaucoup à celui de l'ancêtre commun (la subtilisine) qu'à celui des PCs (Inouye et al., 1991).

4.4 Les substrats SREBP-2 et proBDNF et le développement de modèles d'étude *in vitro* de SKI-1.

1. Développement de substrats peptidiques

Les études de complémentation génétique ont indiqué que SKI-1 était impliqué dans le clivage de SREBP-2 (Sakai et al., 1998). Le site de coupure de ce dernier avait été déterminé auparavant par Duncan et al. (1997). Il s'agissait d'une coupure après un résidu Leu avec une Arg en P4 (RSVL ↓SL). La mutagenèse dirigée de ce site a permis d'établir que le P1 Leu pouvait être remplacé par un certain nombre d'aa (Fig.6), tandis que le P4 Arginine ne pouvait être véritablement remplacé que par la lysine. Cependant des traces d'activité sont également observées en présence d'aa acides tels Asp, Glu en P4.

La co-expression de SKI-1 avec le proBDNF démontrait également que SKI-1 augmentait significativement l'intensité d'une bande de 28 kDa (article1, fig. 6A). Cette observation fut également confirmée par des études *in vitro* (article 1, fig.7): La séquence N-terminale de cette forme a révélé une coupure de proBDNF en aval d'un résidu Thr dans le motif RGLT ↓SF (Fig 6B).

Dans le but de disposer d'un modèle *in vitro* de caractérisation de l'activité enzymatique de SKI-1, nous avons synthétisé deux peptides de 14 aa et 27 aa correspondant respectivement aux sites de clivage de proBDNF et SREBP-2 (Tableau 1, article 2). Nos

études ont démontré que ces peptides pouvaient être coupés par SKI-1. Ceci validait le modèle selon lequel SREBP-2 et le précurseur de BDNF étaient des substrats de SKI-1. Elles ouvrent également la voie à une étude extensive de la spécificité de l'enzyme. Comme ébauche de ce travail, nous avons synthétisé trois peptides correspondant aux sites prédits d'activation de SKI-1 (peptides III, VI, VII; tableau I, article II) (Seidah et al., 1999). Les critères de sélection de ces peptides étaient la présence d'un résidu Arg en P4 et d'un petit aa ou un aa hydrophobe en P1. Ces critères avaient été définis auparavant par Duncan et al. (1997). Seul le peptide III fut coupé par SKI-1, mais avec une très faible efficacité. Ceci renforçait tout de même l'hypothèse selon laquelle ce site pouvait représenter le site primaire d'activation de l'enzyme. De plus, le fait que les peptides VI et VII n'étaient pas coupés par l'enzyme nous permettait de conclure que les seules présences d'une Arg en P4 et d'une Leu en P1 ne permettaient pas la coupure d'un peptide par SKI-1. En d'autres mots, ceci signifiait que d'autres aa jouaient un rôle important dans la reconnaissance du substrat par l'enzyme. Dans le but d'identifier certains de ces aa, nous avons effectué des délétion et mutation dans le peptide III. Il était surprenant de constater que les seuls remplacements du P3' Leu et P4' Pro du peptide III par Ile et Glu respectivement (peptide IV) augmentaient de façon très significative l'efficacité du clivage de ce peptide par SKI-1. Le V_{max}/K_m pour ce peptide est de 0.4/h, soit près de sept fois supérieur à celui du peptide II dérivé du site de coupure du substrat physiologique. Aussi, malgré toutes les mutations observées dans la boucle de 31 aa des SREBPs (Fig.6), un acide glutamique en P3' a été très conservé (Fig.6). On peut également noter la présence d'un acide aspartique en P4' du site de coupure du 28 kDa de proBDNF. Ces résultats sont de nature à suggérer que la présence d'un résidu Glu ou Asp en P3' ou P4' favorise le clivage d'un substrat par SKI-1. Paradoxalement, la substitution du Glu en P3' par Ala n'affecte pas la cinétique du clivage des SREBPs (Fig.6). En plus des aa en position P3' ou P4', nous avons aussi démontré que les aa situés en amont du P4 Arg jouent également un rôle important. En effet la délétion des aa en P6-P13 du peptide IV (peptide V, tableau IIA, article 2) diminue significativement la valeur du V_{max}/K_m .

4.5 Développement de substrats fluorescents

L'exactitude dans la détermination des constantes cinétiques qui caractérisent un enzyme de même que l'élucidation du mécanisme par lequel un inhibiteur bloque son activité exigent

l'utilisation d'un test enzymatique rapide et sensible. Différents types de rapporteurs peuvent être utilisés à ces fins. Par exemple, un rapporteur fluorescent, 7-amino-4-méthylcoumarine (-MCA), a été couplé avec succès au motif général reconnu par les PCs (RXK/RR) (Jean et al., 1995). Nous avons donc voulu explorer si une méthode similaire pouvait s'appliquer à SKI-1. Pour ce faire, les peptides RGLT-MCA, RGLTTT-MCA et RSVL-MCA issus des sites de coupure des précurseurs de BDNF et de SREBP-2 furent synthétisés. Malheureusement, ils ne furent pas hydrolysés par SKI-1 dans les conditions expérimentales sous lesquelles d'autres substrats l'étaient. Cependant ces peptides sont capables d'inhiber l'activité de l'enzyme (IC_{50} d'environ $100\mu M$ dans les trois cas). Nous interprétons les résultats de la façon suivante :

- a) la présence d'un gros résidu hydrophobe comme le -MCA en P1' empêche l'hydrolyse d'un substrat par SKI-1 ou
- b) Les aa en P' d'un substrat jouent un rôle clé dans son hydrolyse.

La réponse exacte à cette question devra attendre des études extensives de la spécificité de l'enzyme.

Il faut également signaler qu'une stratégie alternative de mise au point d'un substrat fluorescent basée sur le transfert d'énergie de résonance ne s'est pas non plus révélée très utile pour SKI-1 (Jean et al., 1995). En général, un para-nitrobenzène (électro-attracteur) ou une molécule ayant des propriétés similaires est attachée à une extrémité du peptide et à l'autre extrémité, on attache une molécule fluorescente contenant un groupement électro-donneur. Ce système a l'avantage de garder quelques aa en P et P' du substrat. Lorsque de telles molécules furent attachées au peptide V (tableau IIB, article 2), ce dernier ne fut plus coupé par l'enzyme.

4.6 Le modèle théorique de fixation du substrat par SKI-1

Un modèle théorique de liaison du substrat aux subtilases est proposé par Siezen et al (1997). Il ressort de ce modèle que le site S1 de fixation du substrat est majoritairement composé d'aa possédant une chaîne latérale polaire tandis qu'on rencontre essentiellement un mélange d'aa possédant une courte chaîne latérale ou des chaînes latérales aromatiques en S4. À chacun de ces deux sites, on ne retrouve qu'un seul aa acide. De plus, de nombreux résidus acides impliqués dans la stabilisation du complexe enzyme/P1,P2,P4 du substrat chez

les PCs sont absents chez SKI-1 (voir introduction). Il ressort donc que SKI-1 serait beaucoup moins dépendant des aa basiques en P1, P2 ou P4 du substrat que ne le sont les PCs (Seidah et al., 1998.).

Ce modèle fournit une base de compréhension à l'échelle atomique de la spécificité de SKI-1. Très peu d'encombrements stériques sont rencontrés au site S1 comparativement au site S4 où on dénombre pas moins de trois Phe et une Pro (Tableau I). Ceci suggère donc qu'une plus grande diversité d'aa (Ieu, Val, Ser, Thr...) peut se fixer en S1. Les interactions de type van der Waals et des ponts hydrogènes permettront la stabilisation du substrat à ce site. Cependant en position S4, les interactions de nature hydrophobique domineront. De ce fait, un substrat possédant un aa avec une chaîne latérale hydrophobe en P4 sera mieux hydrolysé par l'enzyme que ne le serait un autre ayant un résidu Arg à cette position. En ce sens, le modèle minimise l'importance du groupement guanidinium de cet aa et semble avec en désaccord avec les résultats obtenus par Duncan et al (1997).

4.7 Activation de SKI-1 par le pH et le calcium

SKI-1 est une protéase à serine dépendante en calcium (article 2). La concentration maximale de calcium est de 2-3 mM. Ceci suggère que SKI-1, comme les autres PCs, possède des sites de fixation du calcium en dépit du fait que l'on ne peut le prédire par les méthodes de modélisation moléculaire. La mesure d'énergie de dissociation du calcium devrait permettre de mieux définir la nature de ces sites.

L'activité de l'enzyme est également sensible aux variations du pH. Le pH optimum est proche de la neutralité et est comparable à celui des PCs des voies constitutives de sécrétion (Munzer et al., 1997; Molloy et al., 1992). L'enzyme est également actif à la fois à des pH acides 5,0 que basiques 8,5.

4.8 Inhibiteurs de SKI-1

De tous les inhibiteurs testés au cours de cette étude, il semblerait que seuls certains métaux de transition et de très fortes concentrations d'ortho-phenanthroline peuvent inhiber l'activité de l'enzyme. Comme PC7 (Munzer et al., 1997), l'activité de SKI-1 est inhibée par le zinc et le cuivre. Le principe de cette inhibition n'est pas encore bien compris puisqu'il n'existe pas un nombre impair de cystéine dans le domaine catalytique de SKI-1

contrairement à PC7 (Munzer et al, 1997). Mais l'habileté de ces métaux de transition à former des liens de coordination avec le soufre (venant de Met par exemple) ou les amines primaires, à travers l'azote, pourrait expliquer cette inhibition. Cependant, d'autres métaux comme le cobalt, le nickel n'ont aucun effet sur SKI-1. Ceci suppose donc que des colonnes d'affinité à base de nickel ou de cobalt devront être préférentiellement utilisées pour purifier l'enzyme.

L'ortho-phénanthroline, un chélateur de métal, est aussi un inhibiteur non spécifique de SKI-1. Des faibles concentrations de ce composé n'ont aucun effet sur l'activité de l'enzyme.

4.9 Le prosegment est un inhibiteur de l'enzyme *in vitro*

Le rôle du prosegment de la subtilisine BPN, l'ancêtre commun des PCs, a été bien étudié. Les résultats suggéraient que ce domaine pouvait être à la fois un chaperon moléculaire et un inhibiteur intramoléculaire de l'activité de l'enzyme (Zhu et al., 1989; Hu et al., 1996). Une interaction intime entre le prosegment et l'enzyme fut également confirmée par la structure cristallographique déterminée par Gallagher et collaborateurs (1995). En dépit du fait que très peu de conservation de séquence est observée dans cette région entre les différents membres de la famille, une conservation de la fonction fut rapportée récemment dans le cas de la kexine, furine et PC1. En effet il fut récemment démontré par des approches de biologie moléculaire que les propeptides de la furine (Anderson et al., 1997) et de la kexine (Powner et al., 1998) sont de très bons inhibiteurs de leurs enzymes respectifs. Plus directement, les études *in vitro* de Boudreault et al., (1998) ont démontré que le propeptide de PC1 inhibait efficacement son activité. De plus, ils démontraient que le site primaire d'activation de l'enzyme était directement responsable de cette inhibition. La perte de ce site induisait une diminution très significative de l'inhibition de l'enzyme par le prosegment. L'une des différences majeures entre les PCs et SKI-1 demeure le fait que ces derniers doivent rester inactifs jusqu'à ce qu'ils atteignent le TGN dans le cas de la furine et les granules de sécrétion immatures dans le cas de PC1 (Seidah et al., 1998.). Dans ces conditions, la conservation du rôle inhibiteur de la prorégion paraît justifiée.

Dans le cas de SKI-1, l'activation a lieu aussitôt que dans le RE. De plus, le prodomaine de cet enzyme, contrairement aux PCs, contient pas moins de trois cystéines. Il

était donc intrigant de savoir, si en dépit de toutes ces différences, le mécanisme d'inhibition de l'enzyme par le propeptide avait été conservé au cours de l'évolution. Si oui, cette stratégie pouvait donc être utilisée, à l'instar des travaux de Boudreault et al, pour identifier le site primaire d'activation. Cette information n'a pu être obtenue par la séquence N-terminale de la forme mature de l'enzyme.

Pour répondre à cette question, trois propeptides commençant tous à K17 et se terminant respectivement aux aa 167, 188, et 197 ont été isolés et purifiés par chromatographie d'affinité (Fig.6, article 2). Il fut surprenant de constater que les trois propeptides inhibaient l'activité de l'enzyme presque avec la même efficacité ($K_{i \text{ (app)}} = 97\text{-}190\text{nM}$). Ces résultats suggèrent une conservation de la fonction du propeptide pour SKI-1 également. Cependant la région responsable de cette inhibition pourrait ne pas être le site primaire d'activation dans ce cas-ci comme semble indiquer ces résultats. Aussi, nous avons isolé, purifié et obtenu la séquence N-terminale d'un fragment C-terminal du prosegment. Ce fragment pourrait contenir le site primaire d'activation (article 2). Cependant il ne semble avoir aucun impact sur l'activité de l'enzyme.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES D'AVENIR

Ce travail nous a permis de démontrer que SKI-1 est un enzyme dont l'activité dépend du calcium. Les propriétés physico-chimiques de l'enzyme s'apparentent beaucoup à celles des convertases des voies constitutives de sécrétion (Seidah et al., 1998). Ce type d'étude nous permet de mieux comprendre l'effet du microenvironnement cellulaire sur la protéine. Par exemple le pH optimum pour PC1, PC2 est de ~6.0 (Jean et al., 1993), ce qui reflète les conditions dans les granules de sécrétion où ces enzymes résident. Ce genre d'étude nous a permis de conclure que SKI-1, en dépit du fait qu'il est très actif à des pH proches des microenvironnements du Golgi et du RE, pourrait également couper les substrats dans les compartiments cellulaires acides comme les endosomes.

Nous avons également démontré que SKI-1 pouvait hydrolyser les substrats en C-terminal d'un aa possédant une courte chaîne polaire (Thr) et d'aa ayant une chaîne latérale aliphatique (Leu). La catalyse de ces réactions dépend beaucoup de la nature des aa en position P' si le substrat contient un résidu Arg en P4. Les aa situés avant le P4 Arg semblent seulement avoir un effet sur la vitesse de catalyse. Une étude détaillée de l'importance des aa situés aux positions P4, P1 et P' nous permettra de mieux définir le motif minimal nécessaire au clivage d'un substrat par SKI-1. Les seules données sur l'importance de ces aa proviennent du travail de Duncan et al. (1997) sur la mutagenèse de la boucle de SREBP-2. La très faible sensibilité du test utilisé rend cependant moins convaincant les conclusions de cette étude. À titre d'exemple, il serait surprenant qu'un enzyme qui dépend exclusivement d'un aa basique en P4 puisse couper même faiblement un substrat possédant une chaîne latérale acide comme Asp, Glu à cette même position. Ceci va à l'encontre des règles d'interaction atomique qui sont à la base de la stabilisation de l'interaction substrat/enzyme. La reproduction de ces résultats *in vitro*, en utilisant le modèle développé dans cette étude, de même qu'une étude extensive de la spécificité de l'enzyme s'impose. Les bibliothèques combinatoires de peptides constituent un excellent moyen pour atteindre cet objectif. Une meilleure compréhension de la spécificité de l'enzyme permettra éventuellement de développer un petit inhibiteur spécifique pouvant être utilisé pour titrer le site actif de l'enzyme. Le transfert de telles informations dans le site réactionnel de certains inhibiteurs endogènes nous permettra de bloquer efficacement l'activité de SKI-1 *ex vivo* et

même *in vivo*. Un tel modèle serait très utile dans la définition du rôle exact de SKI-1 dans le métabolisme du cholestérol, voire même l'identification de nouveaux substrats.

Le propeptide demeure également une alternative intéressante de préparation d'inhibiteurs.

La surexpression du prosegment comme moyen d'inhiber l'activité de l'enzyme devrait être explorée.

BIBLIOGRAPHIE :

- Anderson, E.D., Vanslyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F. and thomas, G. (1997) Activation of the furin endoprotease is a multi-step process requirements of acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J.* 16, 1508-1518
- Anderson, E.D., Thomas, L., Hayflick, J.S. and Thomas, G. (1993) Inhibition of HIV-1 gp160-dependent membrane fusion by a furin-directed alpha 1-antitrypsin variant *J. Biol. Chem.* 268, 24887-24891
- Angliker, H. (1995) Synthesis of tight binding inhibitors and their action on the proprotein-processing enzyme furin. *J. Med. Chem.* 38, 4014-4018
- Basak, A., Jean, F., Seidah, N.G. and Lazure, C. (1994) Design and synthesis of novel inhibitors of prohormone convertases. *Int. J. Peptide Prot. Res.* 44, 253-261
- Basak, A., Schmidt, C., Ismail, A.A., Seidah, N.G., Chrétien, M. and Lazure, C. (1995) Peptidyl substrates containing unnatural amino acid at the P'1 position are potent inhibitors of prohormone convertases. *Int. J. Peptide Prot. Res.* 46, 228-237
- Bathurst, I.C., Brenan, S.O., Carrell, R.W., , cousens, L., Brake, A.J. and barr, P.J. (1987) Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science* 235, 348-350
- Benjannet, S., Mamarbachi, M., Hamelin, J., Savaria, D., Munzer, J.S., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (1998) Residues unique to the Proprotein Convertase PC2 modulate its autoactivation, binding to 7B2 and enzymatic activity. *FEBS Lett* 428, 37-42.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Hamelin, J., Savaria, D., Chrétien, M., and Seidah, N.G. (1993) Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2 : glycosylation, sulfatation, and identification of intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* 294 (Pt3), 735-743
- Boudreault, A. Gauthier, D., Lazure, C. (1998) Proprotein Convertase PC1/3-related peptides Are Potent Slow Tight-Binding Inhibitors of Murine PC1/3 and Hfurin. *J. Biol. Chem.*, 273 :47, 31574-31580

- Bresnahan, P.A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H.L., Brake, A.J., Barr, P.J. and Thomas, G. (1990) Human fur gene encodes a yeast KEX2p-like endoprotease that cleave pro- β -NGF in vivo. *J. Cell Biol.*, 111, 2851-2859
- Brian, P., Pantoliano, M.W., Quill, S.G., Hsiao, H.Y. and Poulos, T. (1986) Site directed mutagenesis and the role of oxyanion in subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 3743-45
- Briedigkeit, L., Frömmel, C., (1989) Calcium ion binding by thermitase. *FEBS Lett.*, 253, 83-87
- Briggs, G.E. and Haldane, J.B.S. (1925) *Biochem. J.*, 19, 338-339
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340
- Chance, R.E., Ellis, R.M., Broomer, W.W. (1968) Porcine Proinsulin: characterization and amino acid sequence. *Science* 161, 165-167.
- Checler, F. (1995) Processing of the β -amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer disease. *J. Neurochem.* 65, 1431-1444
- Chen, L., Johnson, R.C., Milgramm, S.L. (1998) P-CIP1, a novel protein that interacts with the cytosolic domain of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase, is associated with the endosomes. *J. Biol. Chem.* 273, 3093-3100.
- Creemer, J.W.M., Siezen, R.J., Roebroek, A.M.J., Ayoubi, T.A.Y., Heylebroeck, D., Van de Ven, W.J.M., (1993) Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 268, 21826-21834
- Chrétien, M., Li, C.H., (1967). Isolation, purification and characterization of γ -lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can. J. Biochem.* 45, 1163-1174
- Cornish-Bowden, A., (1995) *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (Ed.), Portland Press Ltd., London
- Devi L., Consensus sequence of processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS Lett.* 280, 189-194., 1991;
- Dixon, M. (1953) The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem. J.*, 55, 170-171
- Duncan, E.A., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Sakai, J. (1997) Cleavage Site for Sterol-regulated Protease localized to a Leu-Ser Bond in the Lumen Loop of Sterol Regulatory Element-binding Protein-2. *J. Biol. Chem.* 272, 12778-12785.

- Edwards, P.A. and Ericsson, J. (1998) Signalling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway : mechanism of action and possible role in human diseases. *Curr. Opin. Lipidology* 9, 433-440
- Fuller, R.S., Sterne, R.E. and thorne, J. (1988) Enzymes required in yeast prohormone processing *Annu. Rev. Physiol.* 50, 345-62
- Fuller, R.S., Brake, A. and thorne, J. (1989) Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science*, 482-486
- Gallagher, T., Giilliland, G., Wang, L. and Brian, P. (1995) The prosegment-subtilisin BPN complex : crystal structure of a specific foldase. *Structure* 3, 907-914
- Germain, D., Dumas, F., Vernet, T., Bourbonnais, Y., Thomas, D.Y., Boileau, G. (1992). The pro-region of the Kex2 endoprotease of *Saccharomyces cerevisiae* is removed by itself. *FEBS Lett.*, 299, 283-286.
- Hanes, C.S., (1932). CLXVII, Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* 26, 1406-1421
- Hatsuzawa, K., Nagahama, M. and Takahashi, S., Takada, K., Murakami, K. and Nakayama, K. (1992) Purification and characterization of furin a Kex2-like processing endopeptidase produced in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 267, 16094-16099.
- Hooper, N.M., Karran, E.H. and Turner, A.J. (1997) Membrane protein secretases. *Biochem. J.*, 321, 265-279
- Hua, X., Goldstein, M.S., Brown, J.L. and Hobbs, H.H. (1995) Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein (SREBP-1) and localization of SREBP-1 and SREBP-2 to chromosome 17q11.2 and 22q13. *Genomics* 25, 667-673
- Hua, X., Nohturfft, A., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1996) Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage activating protein. *Cell* 87, 415-426
- Hu, Z., Haghjoo, K. and Jordan, F. (1996) further evidence for the structure of the subtilisin propeptide and for its interaction with mature subtilisin. *J. Biol. Chem.* 271, 3375-3384.
- Ikemura, H., Inouye, M., (1988). In Vitro processing of pro-subtilisin produced in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 263, 12959-12963
- Inouye, M., (1991) Intramolecular Chaperone : the role of the propeptide in protein folding *Enzyme* 45, 314-321

- Jean, F., Boudreault, A., Basak, A., Seidah, N.G. and Lazure, C. (1995) Fluorescent Peptidyl Substrates as an Aid in Studying the Substrate Specificity of Human Prohormone Convertase PC1 and Human Furin and Designing a Potent irreversible Inhibitor. *J. Biol. Chem.* 270, 19225-19231
- Jean, F., Basak, A., Rondeau, N., Benjannet, S., Hendy, G.N., Seidah, N.G., Chrétien, M., Lazure, C. (1993) enzymic characterization of murine and human prohormone convertase-1 (mPC1 and hPC1) expressed in mammalian GH4C1 cells. *Biochem. J.*, 292, 892-900
- Julius, D., Brake, A., Blair, L., Kunissawa, R., Thorner, J. (1984). Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endoprotease required for the processing of yeast prepro- α -factor. *Cell*, 37, 1075-1089
- Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Joh, R., Landsberg, K.E., Salman, D., and Bar, P.J. (1991) cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protein with cleavage specificity for paired basic residues. *DNA Cell Biol.* 10, 757-769
- Leduc, R., Molloy, S.S., Thorne, B.A. and Thomas, G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* 267, 14304-14308.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56, 658-666
- Ling, N., Bergus, R. and Guillemin, R. (1976) Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two proteins of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 3042-3046
- Lipkind, G., Cong, Q., Steiner, D.F., (1995) Molecular modeling of the substrate specificity of prohormone convertases SPC2 and SPC3. *J. Biol. Chem.* 270, 13277-13284
- Lipkind, G., Zhou, A. and Steiner, D.F., (1997) A model for the structure of the P domains in the subtilisin-like prohormone convertases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7310-7315
- Lusson, J., Benjannet, S., Savaria, D., Chrétien, M. and Seidah, N.G. (1997) The integrity of the RRGDL sequence of proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and its cellular trafficking. *Biochem. J.*, 326, 737-744
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chrétien, M. and Seidah, N.G. (1997) cDNA structure of mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6691-6695

- Mackin, R.B., Noe, B.D. and Spies, J., (1991) The anglerfish somatostatin-28-generating propeptide converting enzyme is an aspartyl protease. *Endocrinology*, 129, 1951
- Metherall, J.E., Ridgway, N.D., Dawson, P.A., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1991) A 25-hydroxycholesterol-resistant cell line deficient in acyl-CoA cholesterol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 266, 12734-12740
- Mizuno, K., Nakamura, T. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease., Ohshima, T., Tanaka, S. and Matsuo, H. (1988) Characterization of KEX2 encoded endopeptidase from yeast *saccharomyces cerevisiae* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 305-311
- Mizuno, K., Nakamura, T., Ohshima, T., Tanaka, S. and Matsuo, H. (1988) Yeast Kex2 gene encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 156, 246-254
- Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., Thomas, G. (1992) Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* 267, 16396-16402
- Munzer, J.S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Benjannet, S., Chrétien, M. and Seidah, N.G. in *Vitro Characterization of the Novel Proprotein Convertase PC7*, *J. Biol. Chem.* 272, 19672-19681.
- Nagase, T., Miyajima, N., Tanaka, A., Sasuka, T., Seki, N., Sato, S., Tabata, S., Ishikawa, I., Kawarabayashi, Y., Kotani, H. and Nomura, N. (1995) Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. III. The coding Sequences of 40 Genes (KIAA1181-KIAA0120) Deduced by analysis of cDNA Clones from Human Cell Line KG-1. *DNA Res.* 2, 37-43
- Nakagawa, T., Hosaka, M., Torij, S., Watanabe, T., Murakami, K. and Nakayama, K. (1993) Identification and functional expression of a new member of the mammalian kex2-like processing endoprotease family : its striking similarity to PACE4. *J. Biochem. (Tokyo)* 113, 132-135
- Nakayama, K., Kim, W.S., Torij, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikemizu, J., Baba, T. Murakami, K. (1992a) Identification of the fourth member of a mammalian endoprotease family homologous to Kex2 protease. *J. Biol. Chem.* 267, 5897-5900

- Nakayama, K., Watanabe, T., Nakagawa, T., Kim, W.S., Nagahama, M., Hosaka, M., Hatsuzawa, K., Kondoh-Hashiba, K. and Murakami, K. (1992b) Consensus sequence of precursor processing at mono-arginyl sites : Evidence for the involvement of a Kex2-like endoprotease in precursor cleavages at both dibasic and mono arginyl sites *J. Biol. Chem.*, 267, 16335-16340
- Neurath, H. (1957). The activation of zymogens. *Adv. Protein Chem.* 12, 319-386
- Otha, Y., Hojo, H., Aimoto, S., Kobayashi, T., Zhu, X., Jordan, F., Inouye, M. (1991) Propeptide as an intramolecular chaperone : renaturation of denatured Subtilisin E with a synthetic pro-peptide. *Mol. Microbiol.*, 5, 1507-1510
- Otha, Y. and Inouye, M. (1990) Pro-subtilisin E : purification and characterization of its autoprocessing to active subtilisin E in vitro. *Mol. Microbiol.* 4, 295-304
- Parraga, A., Belloleil, L., Ferre-D'Aamare, A.R. and Burley, S.K. (1998) Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution *Structure* 6, 661-6672
- Perona, J.J., Craig, C.S., 1995, Structural basis of substrate specificity in serine proteases, *Protein Sci.*, 4, 337-360
- Power, S.D., Adams, R.M. and Wells, J.A. (1986) Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 3096-3100
- Powner, D. and Davey, J. (1998) Activation of the kexin from *Schizosaccharomyces pombe* requires internal cleavage of its initially cleaved prosequence. *Mol. Cell. Biol.* 18, 400-408
- Rawson, R.B., Zelenski, N.G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M.T., Chang, T.Y., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs *Molecular Cell* 1, 47-57
- Rehemtulla, A., Dorner, A.J. and Kaufman, R.J. (1992) Regulation of PACE propeptide-processing activity : requirement of a prot-endoplasmic reticulum compartment and autoproteolytic activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8235-8239.
- Roebroek, A.J.M., Schalken, J.A., Bussemakers, M.J.G., Van, heerikhuizen, H., Onnekink, C., Debruyne, F.M.J., Bloemers, H.P.J., Van de ven, W.J.M., (1986) Characterization of

- human fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediate upstream region of the proto-oncogene. *Mol. Biol. Rep.* 11, 117-125
- Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S.M., Moreland, J., Meyers, M.A. et al., (1997) Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloprotease. *J. Biol. Chem.* 272, 12778-12785
- Rovère, C., Luis, J., Lissitzki, J.C., Basak, A., Marvaldi, J., Chrétien, M. and Seidah, N.G. (1999) The RGD motif and the C-terminal segment of Proprotein Convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin alpha5beta1. *J. Biol. Chem.* 274, 12461-12467
- Sakai, J., Noturfft, A., Goldstein, J.L., and Brown, M.S., (1998) Cleavage of sterol regulatory element binding protein at site requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from *in vivo* competition studies. *J. Biol. Chem.*, 273, 5785-5593
- Sakai, J., Duncan, E.A., Rawson, R.B., Hua, X., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1996) Sterol regulated release of SREBP-2 from cells membrane requires two sequential cleavages, one within a membrane segment. *Cell* 85, 1037-1046
- Schechter, I. and Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27, 157-162
- Shimomura, I., Shimano, H., Korn, B.S., Bashmakov, Y. and Horton, J.D. (1998) Nuclear sterol regulatory element binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J. Biol. Chem.* 273, 35299-35306
- Seidah, N.G., Mbikay, M., Marcinkiewicz, M. and Chrétien, M., (1998) The mammalian proprotein Convertases: paralogs of the subtilisin/kexin family of calcium-dependent serine proteinases. In: *Proteolytic and cellular mechanisms in Prohormones and Neuropeptide Precursor processing.* (V.Y.H Hook, ed.) pp. 49-76. R.D. Landes Company, Georgetown, TX
- Seidah, N.G. (1995) The mammalian family of subtilisin/kexin Pro-Protein Convertases
Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. In: *Intramolecular Chaperones and Protein Folding*, (U., Shinde and M., Inouye., ed.) pp. 1811-203. R.D. Landes Company, Georgetown, TX

- Seidah N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W., Chrétien, M. (1992) Testicular expression of PC4 in the rat : Molecular diversity of a novel germ line cell specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol. Endocrinol.* 6, 1559-1570
- Seidah N.G., Marcinkiewick, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M.G., Mbikay, M., Chrétien, M. (1991) cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, furin, and Kex2 : distinct chromosomal location and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol. Endocrinol.*, 5, 112-122.
- Seidah N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewick, M., Mbikay, M., Chrétien, M. (1990) cDNA structure of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products : tissue-specific mRNA encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.*, 9, 415-423
- Shinde, U., Li, Y., Chatterjee, S., Inouye, M., (1993). Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6924-6928
- Siezen, R.J. and Leunissen, J.A.M. (1997) Subtilases : The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Prot. Sci.*, 6, 501-523
- Siezen, R.J., Creemers, J.W.M. and Van der Ven, W.J.M. (1994) Homology modeling of the catalytic domain of Furin, a model for the eukaryotic subtilisin-like Proprotein Convertases. *Eur. J. Biochem.*, 222, 255-66
- Smeekens, S.P., Steiner, D.F. (1990). Identification of a human insulinoma cDNA encoding a mammalian protein structurally related to the yeast dibasic protease Kex., *J. Biol. Chem.*, 265, 2997-3000
- Smith, J.R., Osborne, T.F., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Gil, G. (1988) Multiple sterol regulatory elements in promoter for hamster 3-hydroxy-3methylglutaryl-Coenzyme synthase. *J. Biol. Chem.* 263, 18480-18487.
- Steiner, D.F. and Oyer, P.E. (1967). The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 57, 473-480.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Anglikar, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.D. and Garten, W. (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.*, 11, 2407-2414

- Stoller, T.J., and Shields, D. (1989) The propeptide of preprosomatostatin mediates intracellular transport and secretion of alpha-globin from mammalian cells. *J Cell Biol.* 108, 1647-1655
- Takabake, Y. and Sachs, H. (1964). Vasopressin Biosynthesis. *In Vitro Studies. Endocrinology* 75, 934-942.
- Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., Allen, R.G., Hruby, D.E., Fuller, R.S. and Thorne, J., (1988) Yeast Kex2 endoprotease correctly cleaves neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science*, 235, 226-230
- Thim, L., Hansen, M.T., Norris, K., Horgh, I., Boel, E., Frostrom, J., Ammerer, G. and Flil, N.P. (1986) Secretion and processing of insulin in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 6766-6770
- Van de ven, W.J.M., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, K., Ouwelan, A.M.D., Duijnhoven, H.L.P., Roebroek, A.M.J., Siezen, R.J. (1990) Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher Eukaryotes. *Mol. Biol. Rep*, 14, 265-75
- Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X. and Goldstein, J.L. (1994) SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Comment in: Cell*, 77, 53-62
- Wilcox, C.A. and Fuller, R.S. (1991) Post-translational processing of the prohormone cleaving kex2 protease in *saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *J. Cell Biol.* 115, 297-307
- Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., Lamendola, J. and Steiner, D.F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem* 273, 11107-11114
- Zhu, X.L., Otha, Y., Jordan, F. and Inouye, M. (1989) Prosequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intramolecular process. *Nature* 339, 483-484