

Université de Montréal

**MATURATION ET CIBLAGE DES PROTÉINES
DANS LA VOIE DE SÉCRÉTION RÉGULÉE**

par
Isabelle JUTRAS

Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en biochimie

juin 2000

© Isabelle Jutras, 2000



W
4
US8
2000
v. 054

Université de Montréal

MATURATION ET CIBLAGE DES PROTÉINES
DANS LA VOIE DE SÉCRÉTION RÉGULÉE

par
Léolo JUREAS

Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en biochimie (M.Sc.)
en biochimie



Jan 2000
Léolo Jureas, M.Sc.

Université de Montréal
Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

**MATURATION ET CIBLAGE DES PROTÉINES
DANS LA VOIE DE SÉCRÉTION RÉGULÉE**

présentée par :
Isabelle JUTRAS

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Claude Lazure	Président-rapporteur, Département de médecine Université de Montréal
Dr Timothy L. Reudelhuber	Directeur de thèse, Département de biochimie, Université de Montréal
Dr Robert Ménard	Membre du jury, Département de biochimie Université de Montréal
Dr Richard Leduc	Examineur externe, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke

Thèse acceptée le :

SOMMAIRE

Le compartiment clé de la voie de sécrétion régulée est constitué des granules de sécrétion dont la fonction consiste à entreposer des protéines et à sécréter le contenu stocké, en réponse à un stimulus physiologique approprié. Certains précurseurs protéiques sont maturés en peptides biologiquement actifs de façon spécifique dans ce compartiment. Cet événement implique le ciblage des précurseurs et des enzymes de maturation aux granules de sécrétion. De plus, l'activité de ces enzymes devrait être contrôlée de manière à générer les peptides actifs uniquement dans les granules. Ainsi, la proprotéine convertase PC1 mature plusieurs proprotéines dont la prorénine, spécifiquement dans les granules de sécrétion. Les travaux présentés dans cette thèse visent à comprendre les mécanismes d'activation de PC1, de son ciblage vers les granules de sécrétion et de la maturation de la prorénine en rénine active.

La convertase PC1 subit le clivage de son domaine carboxy-terminal (C-terminal) dans les granules de sécrétion. En utilisant des mutants de délétion, nous avons déterminé que l'enlèvement de la partie C-terminale était nécessaire à l'activation complète de PC1 et que ce segment pouvait inhiber l'activité de PC1 dans les compartiments en amont des granules de sécrétion. D'autre part, nos résultats ont montré que le domaine C-terminal de PC1 était requis pour le ciblage aux granules de sécrétion, par un mécanisme qui impliquerait la structure d'une hélice α dans la partie C-terminale et la capacité de cette structure à induire l'association aux membranes. Le domaine C-terminal de PC1 assurerait donc de deux manières différentes, que l'activité maximale de PC1 se retrouve spécifiquement dans les granules de sécrétion : en inhibant partiellement l'activité de PC1 avant son entrée dans les granules et en induisant le transport de PC1 vers ce compartiment. De plus, nos résultats suggèrent que la proprotéine convertase PC5-A pourrait agir de manière semblable dans la maturation de la prorénine humaine au niveau des granules du cortex de la glande surrénale. D'autre part, l'analyse du clivage de la prorénine humaine par la cathepsine B dans des essais *in vitro* et *in cellulo* a permis de

souligner le rôle possible de cette protéase dans la maturation de la prorénine au niveau des granules lysosomiaux des cellules juxtaglomérulaires du rein.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux	ix
Liste de figures	x
Liste des sigles et abréviations	xiii
Remerciements	xv
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 Mécanisme d'entrée des protéines dans la voie de sécrétion	2
1.2 Repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique	3
1.2.1 Modifications post-traductionnelles	3
1.2.2 Chaperones et rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique	4
1.2.3 Mécanisme du contrôle de la qualité dans le réticulum endoplasmique	5
1.2.3.1 Contrôle du repliement des protéines	6
1.2.3.2 Dégradation des protéines mal repliées	8
1.3 Mécanisme de sortie des protéines du réticulum endoplasmique	8
1.3.1 Transport vésiculaire dans la voie de sécrétion.....	9
1.3.2 Formation des groupements vésiculo-tubulaires.....	11
1.4 Modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi	12
1.5 Transport des protéines dans l'appareil de Golgi	15
1.6 Tri des protéines dans le réseau trans-golgien.....	16
1.6.1 Ciblage vers les lysosomes.....	17
1.6.1.1 Transport du réseau trans-golgien aux lysosomes	17
1.6.1.2 Endocytose	18
1.6.2 Ciblage vers la membrane des cellules polarisées	19
1.6.2.1 Transport vers la membrane apicale	19
1.6.2.2 Transport vers la membrane basolatérale	19
1.6.3 Ciblage vers les granules de sécrétion	21
1.6.3.1 Entrée sélective des protéines dans la voie de sécrétion régulée	21
1.6.3.2 Rétention sélective des protéines dans la voie de sécrétion régulée	23

1.6.3.3 Propriétés des protéines régulées	23
1.7 Maturation des protéines de la voie de sécrétion régulée	25
1.7.1 Clivage par les proprotéine convertases	25
1.7.1.1 Membres et caractéristiques de la famille	25
1.7.1.2 Biosynthèse de PC1	29
1.7.1.3 Biosynthèse de PC2	30
1.7.1.4 Caractéristiques fonctionnelles de PC1 et de PC2	30
1.7.1.5 Perte de la fonction de PC1	31
1.7.1.6 Inactivation des gènes de PC2 et de 7B2	32
1.7.1.7 Biosynthèse de PC5	33
1.7.1.8 Caractéristiques fonctionnelles de PC5-A	33
1.7.2 Clivage par les carboxypeptidases	36
1.7.3 Amidation en carboxy-terminal	37
1.8 Mécanisme de la sécrétion régulée	39
1.8.1 Machinerie d'ancrage et de fusion des granules de sécrétion à la membrane ..	39
1.8.2 Exocytose régulée des lysosomes	41
1.9 Sécrétion régulée de la rénine	42
1.9.1 Fonction et sécrétion de la rénine	42
1.9.2 Caractéristiques des cellules juxtaglomérulaires	44
1.9.3 Modifications post-traductionnelles et maturation de la prorénine	47
1.9.3.1 Enzymes de maturation de la prorénine	50
1.10 Distribution tissulaire de l'expression de la rénine	51
1.11 Objectifs de la thèse	53

CHAPITRE 2

ARTICLE : TWO ACTIVATION STATES OF THE PROHORMONE

CONVERTASE PC1 IN THE SECRETORY PATHWAY	54
Abstract	55
Introduction	55
Experimental Procedures	55
Results	56
Discussion	58
References	59

CHAPITRE 3**ARTICLE : AN α -HELIX MEDIATES TARGETING OF THE****PROPROTEIN CONVERTASE PC1 TO THE REGULATED****SECRETORY PATHWAY60**

Abstract	61
Introduction	62
Materials and Methods	65
Results	69
Discussion	81
Acknowledgements	85
References	86

CHAPITRE 4**ARTICLE : PROHORMONE CONVERTASE PC5 IS A CANDIDATE****PROCESSING ENZYME FOR PRORENIN IN THE HUMAN****ADRENAL CORTEX90**

Abstract	91
Introduction	91
Methods	91
Results	92
Discussion	94
Acknowledgements	96
References	96

CHAPITRE 5**ARTICLE : PRORENIN PROCESSING BY CATHEPSIN B IN VITRO****AND IN TRANSFECTED CELLS 98**

Abstract	99
Introduction	99
Materials and Methods	99
Results	100
Discussion	102

Acknowledgements	103
References	103
CHAPITRE 6 : DISCUSSION	104
6.1 Maturation et ciblage de PC1 dans la voie de sécrétion régulée	105
6.1.1 Inhibition de l'activité de PC1 par son domaine C-terminal	105
6.1.2 Modèle pour l'activation de PC1	107
6.1.3 Modèle pour le ciblage de PC1 vers la voie de sécrétion régulée	110
6.1.4 Interaction de la partie C-terminale de PC1 avec les membranes	112
6.2 Maturation de la prorénine	114
6.2.1 Essais <i>in vitro</i> et <i>in cellulo</i>	114
6.2.2 Localisation des enzymes de maturation de la prorénine <i>in vivo</i>	116
RÉFÉRENCES	120
ANNEXE 1	
ARTICLE : PRORENIN ACTIVATION AND PROHORMONE	
CONVERTASES IN THE MOUSE As4.1 CELL LINE	137
Abstract	138
Introduction	138
Methods	138
Results	139
Discussion	141
Acknowledgements	142
References	142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-I. Liste des précurseurs maturés par les proprotéine convertases de la voie de sécrétion régulée et localisation supposée de la maturation	35
Table 3-I. Stimulated Secretion of Newly Synthesized Fc-PC1 Fusion Proteins from Transfected GH4 Cells	74
Tableau 6-I. Enzymes candidates pour la maturation de la prorénine <i>in vivo</i>	119
Annexe 1	
Table I Amounts of total renin, inactive prorenin and active renin in the incubation medium of As4.1 cells	140

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1

Figure 1-1. Modèle pour le contrôle de la qualité dans le RE	7
Figure 1-2. Modifications post-traductionnelles et transport des protéines dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion.....	14
Figure 1-3. Tri des protéines dans le TGN et les endosomes	20
Figure 1-4. Représentation schématique des membres de la famille des proprotéine convertases	28
Figure 1-5. Représentation de la morphologie ultrastructurale de la voie de sécrétion régulée des cellules juxtaglomérulaires	46
Figure 1-6. Représentation des sites de clivage de la prorénine chez différentes espèces	49

Chapitre 2

Figure 1. Schematic representation of native and mutated PC1	56
Figure 2. The absence of the C-terminal tail of mPC1 enhances PC1 activity in prorenin processing in GH4 cells	57
Figure 3. mPC1- Δ C accelerates the secretion of active renin from GH4 cells	57
Figure 4. Expression of mPC1 proteins in GH4 cells	57
Figure 5. The C-terminally truncated form of mPC1 processes prorenin in the constitutive secretory pathway.....	57
Figure 6. The C-terminal tail of mPC1 directly inhibits PC1 activity	58
Figure 7. Alignment of porcine, human, rat, and mouse PC1 sequences.....	58

Chapitre 3

Figure 3-1 The C-terminal domain of PC1 targets PC1 to the regulated secretory pathway	70
Figure 3-2 Two different regions in the C-terminal domain of PC1 are sufficient to reroute the constitutively secreted Fc protein to the secretory granules	72

Figure 3-3. Formation of an α -helix is required to target an Fc-PC1 fusion protein to the regulated secretory pathway.....	75
Figure 3-4. Intracellular localization of differently sorted Fc-PC1 fusion proteins	76
Figure 3-5. Relationship between dimerization and sorting of Fc-PC1 fusion proteins in the TGN	78
Figure 3-6. Membrane association of Fc-PC1 fusion proteins, which undergo sorting to the secretory granules	80
Figure 3-7. A model for the sorting and activation of PC1 in the regulated secretory pathway	84

Chapitre 4

Figure 1. Schematic diagram of isolated cDNAs encoding human prohormone convertase hPC5	92
Figure 2. Nucleotide and derived protein sequence of human prohormone convertase hPC5	93
Figure 3. Distribution of human prohormone convertase hPC5 RNA in various human tissues.....	94
Figure 4. Human prohormone convertase hPC5 cleaves human prorenin with site and cell specificity	94
Figure 5. Active renin generation in secretory granules of co-transfected GH ₄ C1 cells	94
Figure 6. Immunodetection of human prohormone convertase hPC5 and renin/prorenin in renal cortex.....	95

Chapitre 5

Figure 1. Schematic representation of the alanine scanning mutations of residues around the cleavage site in human prorenin	100
Figure 2. In vitro cleavage of human prorenin by human cathepsin B	100
Figure 3. Time course of activation of mutated prorenins by cathepsin B	101

Figure 4. Processing of human prorenin by human cathepsin B in AtT-20 cells.....	101
Figure 5. Expression of human cathepsin B in transfected AtT-20 cells.....	102

Chapitre 6

Figure 6-1. Modèle pour l'activation et le ciblage de PC1 dans la voie de sécrétion régulée.....	109
---	-----

Annexe 1

Figure 1. Immunoprecipitation of labeled prorenin from the incubation medium of As4.1 cells.....	140
Figure 2. Electron microscopy micrographs of As4.1 cells	141
Figure 3. Northern blot analysis of total RNA from As4.1 cells	141
Figure 4. Secretion of active renin in nontransfected and Ren-2 transfected As4.1 cells	142

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AMPC :	AMP cyclique
Ang II :	angiotensine II
AP :	<i>Adaptor Protein</i>
Ca ²⁺ :	ions calcium
CD-MPR :	<i>Cation-Dependent MPR</i>
CI-MPR :	<i>Cation-Independent MPR</i>
CNX :	calnexine
COPI :	<i>Coat Protein Complex I</i>
COPII :	<i>Coat Protein Complex II</i>
CPD :	carboxypeptidase D
CPE :	carboxypeptidase E
CPZ :	carboxypeptidase Z
CRT :	calréticuline
C-terminal :	carboxy-terminal
EE :	<i>Early Endosomes</i>
GPI :	glycosylphosphatidylinositol
ISG :	<i>Immature Secretory Granule</i>
JG :	juxtaglomérulaire
LE :	<i>Late Endosomes</i>
MPR :	<i>Mannose 6-Phosphate Receptor</i>
N-terminal :	amino-terminal
PAL :	peptidyl α -hydroxyglycine α -amide lyase
PAM :	peptidylglycine α -amide monooxygénase
PHM :	peptidylglycine α -hydroxylmonooxygénase
PC :	proprotéine convertase
PDI :	<i>Protein Disulfide Isomerase</i>
POMC :	proopiomélanocortine
RE :	réticulum endoplasmique
SG :	<i>Secretory Granules</i>

SRP :	<i>Signal Recognition Particle</i>
TGN :	<i>Trans-Golgi Network</i>
t-SNARES :	<i>Target α-SNAP Receptor</i>
UGGT :	UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase
v-SNAREs :	<i>Vesicle α-SNAP Receptor</i>
VTC	<i>Vesiculo-Tubular Clusters</i>

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement Dr Tim Reudelhuber pour son enthousiasme contagieux, son optimisme indéfectible, la grande confiance qu'il m'a accordée et ses encouragements bien sentis tout au long de mes études doctorales. Je tiens aussi à remercier Dr Nabil Seidah pour son support et ses critiques constructives au cours des nombreux projets sur lesquels nous avons collaborés.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance aux personnes suivantes pour le soutien qu'elles m'ont manifesté pendant mes études : Dr Véronique Brechler pour sa patience et sa disponibilité, Chantal Mercure pour son éternel secours, Gary Prescott pour les discussions fructueuses, Dr Danielle Méthot, Vivianne Jodoin et tous les membres actuels ou passés du laboratoire pour leur aide et leur amitié, Christian Charbonneau pour son dévouement.

Enfin, ma reconnaissance va aux organismes qui m'ont subventionnée: le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada, la Fondation des maladies du coeur du Canada, le Fonds de la Recherche en Santé du Québec et le Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche.

À mes parents,
pour leur tolérance, leur générosité et leur affection

Devagar se vai ao longo
(diction portugais)

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Mécanisme d'entrée des protéines dans la voie de sécrétion.

La translocation des protéines néo-synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) constitue la première étape du parcours des protéines dans la voie de sécrétion. La translocation peut s'effectuer de manière post-traductionnelle, i.e. indépendamment des ribosomes et après l'achèvement de la synthèse de la protéine dans le cytosol. Cependant dans la plupart des cellules mammifères, la voie de la translocation co-traductionnelle prédomine nettement (Rapoport et al., 1996).

L'insertion co-traductionnelle des protéines dans le RE implique dans un premier temps, l'association de la particule de reconnaissance du peptide signal (SRP pour *Signal Recognition Particle*) aux ribosomes en cours de traduction de polypeptides qui exposent un peptide signal. Cette portion du polypeptide ne représente pas une séquence conservée mais se caractérise par une séquence hydrophobique de 8 à 12 acides aminés, qui s'associe au domaine riche en méthionine de la SRP. La flexibilité des chaînes latérales des méthionines procurerait une plasticité à la SRP, lui permettant de s'adapter aux différentes structures générées par les diverses séquences composant un peptide signal, tout en créant un environnement hydrophobe propice à la liaison du peptide (Walter et Johnson, 1994).

Suite à l'association de la SRP au ribosome et au peptide signal, l'élongation du polypeptide est arrêtée et la SRP devient chargée de GTP. Le complexe est alors ciblé à la membrane du RE, à laquelle il se lie via deux interactions: d'une part la SRP lie son récepteur membranaire et d'autre part le ribosome s'associe au complexe hétérotrimérique Sec61 (comprenant les sous-unités Sec61 α , Sec61 β et Sec61 γ) qui forme la structure de base du canal de transport des protéines, également nommé translocon (Rapoport et al., 1996). La SRP se dissocie alors du ribosome puis du peptide signal et finalement de son récepteur dans une étape qui implique l'hydrolyse du GTP.

La liaison du ribosome au complexe Sec61p semble faible au départ mais l'interaction devient plus stable à mesure que l'élongation de la chaîne polypeptidique progresse. Dans le cas de certaines protéines, le passage à une interaction stable requiert la protéine TRAM, une dépendance qui serait déterminé par la séquence du peptide signal (Rapoport et al., 1996). Le pore de translocation sert à la fois pour les protéines intrinsèques de la membrane et les protéines solubles, indiquant un accès latéral des protéines en cours de translocation, à la bicouche lipidique. Une fois la translocation achevée, le peptide signal de la plupart des protéines est clivé par la signal-peptidase dans le RE. Les protéines membranaires de type I se caractérisent par une séquence d'arrêt de translocation, laissant leur partie carboxy-terminale (C-terminale) exposée dans le cytoplasme. Les protéines membranaires de type II comportent un peptide signal interne qui n'est pas clivé par la signal-peptidase, résultant en une extrémité amino-terminale (N-terminale) cytoplasmique. Enfin, différentes combinaisons de ces séquences de translocation et d'arrêt de translocation génèrent des protéines avec de multiples segments transmembranaires (Mothes et al., 1997).

1.2 Repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique.

1.2.1 Modifications post-traductionnelles

L'acquisition de la structure naturelle de la protéine est intimement liée aux modifications apportées à la chaîne polypeptidique néo-synthétisée. Les enzymes qui catalysent ces modifications se trouvent en effet au coeur des mécanismes du repliement des protéines. La N-glycosylation, l'isomérisation cis/trans des liens peptidiques avec la proline, la formation des ponts disulfures et l'ajout d'un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont parmi les modifications impliquées dans le processus du repliement. Pour les protéines qui subissent normalement l'une de ces modifications, l'inhibition de la réaction qui la catalyse résulte souvent en la rétention de ces protéines dans le RE. Ainsi l'inhibition des

peptidylprolyl-isomérase prévient la sécrétion de plusieurs protéines (Kern et al., 1995).

Deux principaux groupements peuvent être ajoutés aux protéines dans la lumière du RE. Au cours de la translocation co-translationnelle, la plupart des protéines sont N-glycosylées. Cette modification implique le transfert d'un oligosaccharide, le plus souvent (N-acétylglucosamine)₂(mannose)₉(glucose)₃, du dolichol intermédiaire aux amides des résidus asparagine situés dans la séquence N-X-S/T (où X peut être tout acide aminé sauf la proline) (Suzuki et al., 1998). D'autre part, certaines protéines néo-synthétisées subissent le clivage d'une partie de leur segment transmembranaire en C-terminal et l'ajout d'un groupement GPI préassemblé, par transamidation au groupement carboxyl. La présence d'une séquence hydrophobe comprenant de 15 à 20 acides aminés en C-terminal agit comme un signal pour l'ajout du GPI (Englund, 1993). Le GPI permet l'ancrage des protéines aux membranes et cet ancrage serait essentiel à la sortie de ces protéines du RE (Muniz et Riezman, 2000).

1.2.2 Chaperones et rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique

L'étape limitante dans l'arrivée des protéines aux compartiments distaux de la voie de sécrétion représente généralement le temps requis pour le repliement des protéines dans le RE. Les protéines chaperones contribuent à différencier les protéines dans leur structure naturelle des protéines mal repliées. L'association avec les protéines mal repliées permet aux chaperones de stabiliser les conformères instables de ces protéines, ce qui facilite l'acquisition d'une structure fonctionnelle (Hammond et Helenius, 1994). Le contrôle du repliement par les chaperones semble cependant s'effectuer sur la base de critères structuraux plutôt que fonctionnels (Ellgaard et al., 1999). Il existe en effet des protéines, tel que le régulateur de conductance impliqué dans la fibrose kystique, qui sont retenues dans le RE puis dégradées alors que ces protéines semblent fonctionnelles lorsqu'elles sont par exemple, surexprimées *in cellulo* (Kopito, 1999), (Aridor et Balch, 1999). Ceci

indique que des défauts de repliement mineurs, dans des domaines d'une protéine non-essentiels à sa fonction, sont parfois suffisants pour prévenir sa sécrétion.

Les chaperones et les protéines impliquées dans le repliement sont des protéines résidentes du RE. Leur localisation dans ce compartiment dépend d'un signal de rétention qui, pour la plupart des protéines solubles, consiste en la séquence KDEL et pour les protéines membranaires de type I, en la séquence KKXX en C-terminale (où X représente tout acide aminé) (Ellgaard et al., 1999). La plupart des protéines solubles résidentes du RE comportent des domaines de liaison aux ions calcium (Ca^{2+}), critiques pour leur rétention efficace dans ce compartiment (Ellgaard et al., 1999). La rétention de protéines non-résidentes du RE est déterminée par divers traits communs aux protéines mal repliées comme l'exposition de surfaces hydrophobes, la présence de boucles labiles, le manque de compactage, la présence de groupes sulfhydryls instables, la présence d'oligosaccharides monoglucosylés et la tendance à former des agrégats. Ces critères induisent la liaison des chaperones telles que la protéine BiP, la calnexine (CNX) ou son homologue, la calréticuline (CRT). BiP participe à la translocation des protéines dans le RE en se liant aux surfaces hydrophobes exposées (Hammond et Helenius, 1994; Lyman et Schekman, 1997). La CNX et la CRT interagissent avec les glycoprotéines néo-synthétisées, lors des étapes précoces de leur repliement. Les thiol-oxidoréductases telle que l'isomérase des liens disulfures (PDI pour *Protein Disulfide Isomerase*), qui catalysent la formation et le réarrangement des ponts disulfures sont parfois considérées comme des chaperones. La PDI catalyse en effet ces réarrangements au niveau de protéines mal repliées jusqu'à l'obtention de la structure appropriée, qui s'accompagne d'une résistance au réarrangement (Gilbert, 1997).

1.2.3 Mécanisme du contrôle de la qualité dans le réticulum endoplasmique

L'ensemble des fonctions cellulaires qui assurent le repliement des protéines et la dégradation des protéines mal repliées est souvent désigné comme le mécanisme du contrôle de la qualité (Ellgaard et al., 1999). Les composantes de la machinerie

responsable de ce mécanisme n'ont pas encore été complètement caractérisées et en particulier, le mode de reconnaissance des conformères mal repliés demeure incertain. Le contrôle de la qualité semble cependant se dérouler en deux temps: le temps du repliement et le temps de la dégradation. Un résumé du déroulement supposé des mécanismes du contrôle de la qualité est présenté à la Figure 1-1.

1.2.3.1 Contrôle du repliement des protéines

La CNX et la CRT s'associent à presque tous les polypeptides présents dans la lumière du RE en se liant spécifiquement aux intermédiaires protéiques contenant des oligosaccharides N-liés monoglucosylés (Ellgaard et al., 1999). Cependant, l'importance de ces interactions dans le repliement demeure controversée puisque plusieurs études ont montré que la CNX et la CRT ne pouvaient distinguer entre une protéine mal repliée et sa forme naturelle, ces chaperones s'associant indifféremment aux substrats monoglucosylés (Zapun et al., 1997). Un modèle récent propose que la CNX et la CRT servent plutôt au recrutement des protéines directement impliquées dans le repliement. L'une des protéines recrutées serait la protéine ERp57, un membre de la famille des isomérases des ponts disulfures (Zapun et al., 1998), (Oliver et al., 1999). Le complexe ERp57/CNX/CRT assurerait la rétention dans le RE d'une protéine mal repliée et assisterait à son repliement en sa structure appropriée. Le clivage du glucose par la glucosidase II induirait la relâche de la protéine du complexe et sa sortie du RE. Dans le cas où le repliement de la protéine ne serait pas complété, la UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase (UGGT), une enzyme sensible à la conformation de son substrat, s'associerait à la protéine afin de catalyser l'ajout d'un résidu glucose aux oligosaccharides N-liés du domaine mal replié. La protéine comportant des oligosaccharides monoglucosylés pourrait ainsi de nouveau s'associer avec la CNX ou la CRT et poursuivre son repliement vers sa structure naturelle.

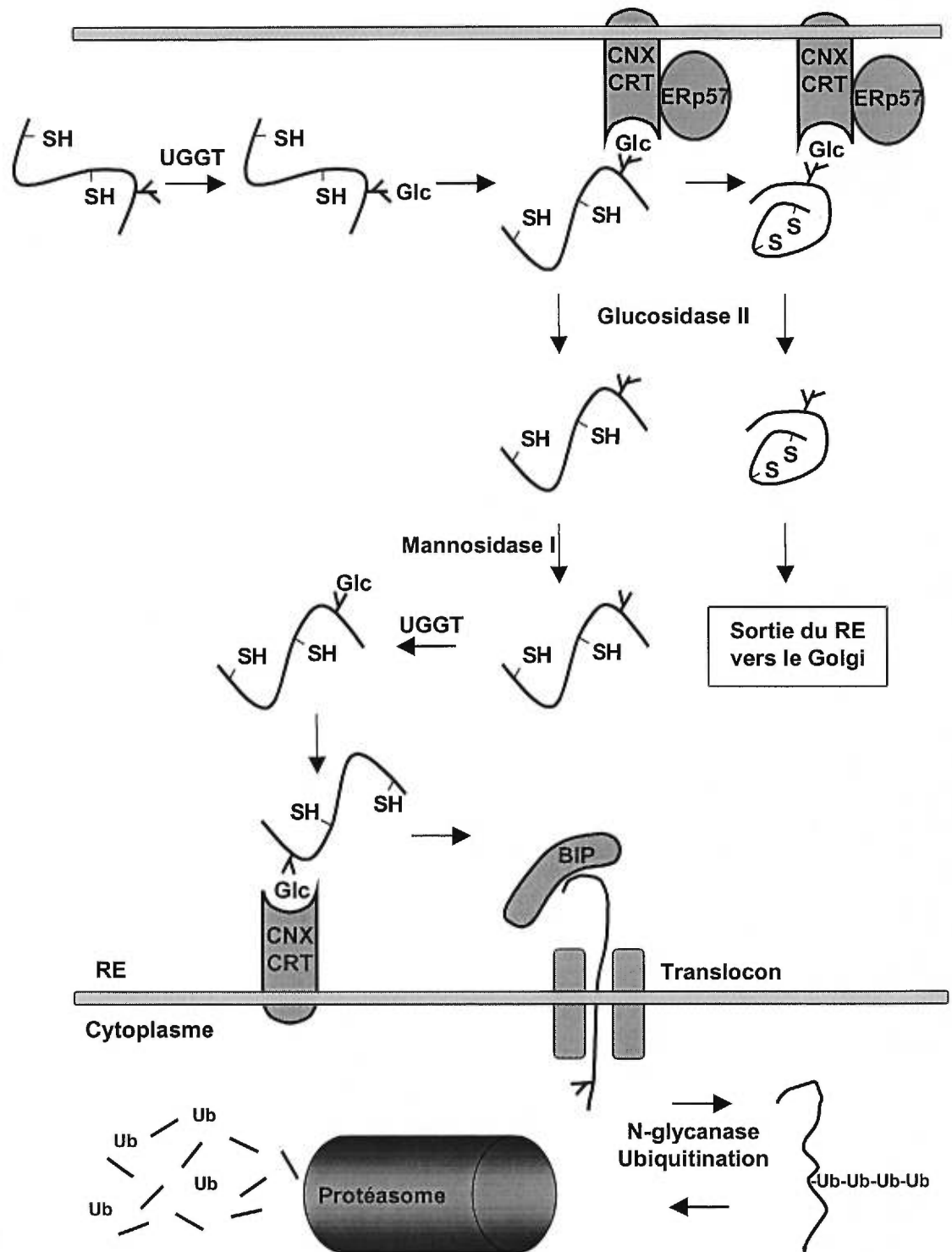


Figure 1-1. Modèle pour le contrôle de la qualité dans le réticulum endoplasmique (RE). Le repliement des protéines implique la calnexine (CNX) ou son homologue la calréticuline (CRT) et le recrutement d'une isomérase des ponts disulfures (ERp57). Les protéines mal repliées sont ciblées pour la dégradation par la protéasome. (Adaptée de Ellgaard et al., 1999 et Oliver et al., 1999)

1.2.3.2 Dégradation des protéines mal repliées

Dans la plupart des cas, la rétention prolongée des protéines dans le RE mène à leur dégradation. Le principal mécanisme de dégradation des protéines du RE implique le protéasome. L'enlèvement de résidus mannose sur les oligosaccharides N-liés, par des mannosidases à action lente, serait impliqué dans l'initiation de ce processus en convertissant les oligosaccharides en de moins bons substrats pour la glucosidase II. La reglucosylation de ces oligosaccharides par l'UGGT permettrait alors l'association stable des protéines avec la CNX. L'association des protéines non-repliées avec la CNX et BiP éviterait la formation d'agrégats et permettrait de garder ces protéines dans un état propice à leur translocation. Plusieurs études indiquent que la rétro-translocation des protéines vers le cytosol s'effectue via le translocon (Ellgaard et al., 1999). Les polypeptides transportés dans le cytoplasme sont déglycosylés par la N-glycanase et liés covalamment à l'ubiquitine, un polypeptide de 76 acides aminés, par les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (Kopito, 1997). L'ubiquitination consiste en une cascade enzymatique qui culmine par la formation d'un lien isopeptidique entre le C-terminal d'une chaîne d'ubiquitine et le groupement ϵ -amine d'un résidu lysine de la protéine. Cette chaîne, minimalement composée de 4 résidus ubiquitine, signale l'envoi de la protéine ainsi marquée vers le protéasome 26S qui contient des sous-unités ayant une haute affinité pour les chaînes d'ubiquitine (Bonifacino et Weissman, 1998). Au creux du canal formé par le protéasome, les activités hydrolytiques de ses différentes sous-unités dégradent les polypeptides.

1.3 Mécanisme de sortie des protéines du réticulum endoplasmique

La plupart des protéines repliées sont acheminées vers le Golgi dans des vésicules qui bourgeonnent à la membrane du RE. Les protéines nécessaires au bourgeonnement ont d'abord été caractérisées chez la levure mais leurs homologues mammifères ont également été isolés. Le bourgeonnement est contrôlé par la GTPase

cytosolique Sar1p qui est recrutée à la membrane du RE par le domaine cytoplasmique de la protéine Sec12p (Schekman et Orci, 1996). Cette dernière assure l'échange du Sar1p-GDP en Sar1p-GTP et permet l'association de la forme activée de Sar1p à la membrane du RE. La Sar1p activée recrute les complexes protéiques COPII (pour *Coat Protein Complex II*) qui recouvrent le bourgeon vésiculaire et permettent la formation d'une vésicule de transport fonctionnelle. L'une des protéines du complexe COPII agit comme protéine activatrice de la GTPase Sar1p qui hydrolyse son GTP pendant ou à la fin du processus de bourgeonnement, ce qui permet la relâche de Sar1p dans le cytosol.

1.3.1 Transport vésiculaire dans la voie de sécrétion

Le modèle général du transport vésiculaire propose que le ciblage et l'ancrage des vésicules de transport à la membrane destinataire appropriée, impliquent l'association spécifique de protéines membranaires présentes sur la vésicule et sur la membrane acceptrice. Les vésicules de transport comportent des protéines nommées v-SNAREs (pour *Vesicle α -SNAP Receptor*), qui se trouvent exposées suite à l'enlèvement des complexes protéiques recouvrant la vésicule, ce qui permet leur association spécifique avec les t-SNAREs (pour *Target α -SNAP Receptor*) de la membrane acceptrice. La reconnaissance d'un t-SNARE par son v-SNARE génère le complexe SNARE et assure au moins une partie de la spécificité de l'ancrage et de la fusion des membranes

Les vésicules synaptiques et la membrane présynaptique cible ont permis d'identifier les premiers SNAREs: la synaptobrevine ou VAMP dans le cas des v-SNAREs, et un complexe formé de la syntaxine 1 et de SNAP-25 dans le cas des t-SNAREs (Hay et Scheller, 1997). Le modèle initial proposait que la synaptobrevine et la syntaxine 1 représentaient deux familles distinctes de protéines, dont les homologues se trouvaient localisés à travers la voie de sécrétion. Certains SNAREs ne sont cependant pas apparentés à ces protéines ou encore, se trouvent à la fois sur des vésicules de transport et les membranes acceptrices (Hay et Scheller, 1997). Il

n'est donc pas certain que les différentes voies de transport vésiculaire impliquent toujours un ensemble de trois protéines fonctionnellement apparentées aux protéines synaptobrevine, syntaxine 1 et SNAP-25. Enfin, la distinction entre les SNAREs sur la base de leur localisation sur les vésicules ou les membranes acceptrices ne permet pas de rendre compte des événements de fusion entre des vésicules, qui se produisent par exemple dans les voies d'endocytose et de sécrétion (décrites plus loin). Une nouvelle classification des SNAREs a donc récemment été proposée sur la base de critères structuraux, déduits des données cristallographiques obtenues sur le complexe SNARE synaptique (Fasshauer et al., 1998). Ces données indiquent que les SNAREs s'associent en un ballot formé de quatre hélices α dont deux proviennent de SNAP25, une de la synaptobrevine et une de la syntaxine. Les SNAREs sont divisés en R-SNAREs et en Q-SNAREs selon le résidu (arginine ou glutamine) dans la séquence formant l'hélice α , qui contribue à la stabilité ionique du complexe. Cependant, l'utilisation des termes v-SNARE et t-SNARE demeure largement répandue.

Enfin, le complexe SNARE lie les protéines α -SNAP et l'ATPase NSF. On a initialement proposé que l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP du NSF servait à la déstabilisation du complexe SNARE et à la fusion subséquente des membranes. Des résultats plus récents montrent que le complexe NSF/ α -SNAP pourrait agir avant la formation du complexe SNARE, possiblement en induisant un changement de conformation du t-SNARE, nécessaire à la liaison du v-SNARE (Hay et Scheller, 1997).

Les SNAREs ne sont pas les seules protéines qui déterminent la spécificité de l'ancrage et de la fusion des vésicules aux membranes appropriées. Les protéines de la famille des GTPases Rab jouent également un rôle central dans ces événements au cours desquels ces GTPases pourraient entre autres, réguler la formation du complexe SNARE (Schimmoller et al., 1998). Au moins quarante différentes protéines de cette famille ont été identifiées et la plupart sont localisées dans des compartiments intracellulaires distincts (Novick et Zerial, 1997). Les Rabs se retrouvent dans le cytosol sous leur forme inactive liée au GDP alors que les membranes des vésicules

de transport comportent des Rabs sous la forme liée au GTP qui est hydrolysé suite à la fusion des membranes. La surexpression de mutants constitutivement activés ou inactivés de ces GTPases a permis d'assigner des fonctions aux différentes Rabs. L'élucidation du mécanisme fonctionnel des Rabs nécessite cependant la découverte des protéines effectrices recrutées par la forme Rab-GTP. Par exemple, la Rab5, dont la surexpression augmente la fusion entre les endosomes, s'associe aux endosomes et recrute le complexe protéique Rabaptin-5/EEA-1 qui comprend les facteurs nécessaires à l'ancrage des endosomes (Novick et Zerial, 1997). La Rabaptin comprend deux sites de liaison à Rab5, ce qui permettrait au complexe de faire un lien entre deux endosomes (Vitale et al., 1998). L'association des endosomes via le complexe Rabaptin-5/EEA1 précéderait la formation du complexe SNARE, ce qui suggère que les SNAREs ne joueraient pas le premier rôle dans le mécanisme de ciblage des vésicules aux membranes appropriées (Christoforidis et al., 1999). La fonction des Rabs entraînerait donc le recrutement de protéines qui facilitent la formation du complexe SNARE. D'autres Rabs seraient plutôt impliquées dans la direction du transport des vésicules sur le cytosquelette microtubulaire ou dans l'inhibition de la fusion des membranes, telle que la Rab3 qui sera décrite plus loin (Schimmoller et al., 1998).

1.3.2 Formation des groupements vésiculo-tubulaires

Les vésicules en provenance du RE, libérées des complexes COPII, fusionnent avec les groupements vésiculo-tubulaires (VTC pour *Vesiculo-Tubular Clusters*), un compartiment intermédiaire entre le RE et le cis-Golgi (Warren et Mellman, 1999). Au niveau de ce compartiment, les protéines résidentes du RE, qui seraient parvenues à s'échapper dans des vésicules de transport antérogrades, en seraient retirées à l'aide de vésicules couvertes de complexes COPI, une machinerie de transport fonctionnellement similaire au complexe COPII. Le complexe de type COPI assure le transport rétrograde des protéines des VTCs et du Golgi vers le RE, protéines qui comprennent les v-SNARES et les composantes de la machinerie nécessaire au transport du RE aux VTCs. Les protéines engagées dans le transport vers le Golgi

semblent spécifiquement exclues des vésicules de transport rétrograde. Un modèle pour expliquer cette exclusion sélective propose que dans les VTCs, les protéines en route vers le Golgi seraient concentrées et ségréguées des protéines engagées dans le transport rétrograde. La condensation de ces protéines serait aidée par l'enlèvement des membranes utilisées pour la formation de vésicules rétrogrades recouvertes des complexes COPI (Martinez-Menarguez et al., 1999). Bien que ce mécanisme de concentration semble fonctionner pour des protéines abondamment exprimées, il est possible que l'entrée de protéines faiblement exprimées dans des vésicules de transport implique un récepteur qui permettrait d'accélérer la sortie de ces protéines du RE (Warren et Mellman, 1999). De plus certaines protéines membranaires pourraient agir comme protéines adaptatrices en faisant le lien entre les protéines transportées dans les vésicules et les complexes protéiques qui les recouvrent. Les protéines de la voie de sécrétion pourraient ainsi contrôler leur exportation en modulant le bourgeonnement de vésicules au niveau du RE (Kuehn et al., 1998).

1.4 Modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi

Au cours de la traversée de l'appareil de Golgi, les surfaces exposées des protéines néo-synthétisées continuent à être modifiées dans la lumière de ce compartiment. Ces modifications impliquent notamment le remodelage des oligosaccharides N-liés, la phosphorylation de résidus thréonine ou sérine (Ma et al., 1999), la sulfatation de résidus tyrosine (Huttner, 1988) et la O-glycosylation via l'ajout de la N-acétylgalactosamine au groupement hydroxyl de résidus sérine ou thréonine (Kornfeld, 1998). Les enzymes qui catalysent ces réactions se trouvent localisées dans des sous-compartiments spécifiques de l'appareil de Golgi.

De multiples structures glycidiques N-liées sont générées par l'ajout et l'enlèvement de différents sucres. Certaines de ces structures sont spécifiques à des protéines ou à des types cellulaires et peuvent exercer des fonctions importantes, à différents stades dans la voie de sécrétion (Kornfeld, 1998). Les oligosaccharides

permettent de moduler l'activité biologique de certaines protéines, protègent les protéines de la dégradation, assurent certaines interactions cellule-cellule et servent comme signaux de reconnaissance pour le ciblage intracellulaire des protéines. Par exemple, la structure du mannose 6-phosphate permet de cibler les protéines lysosomiales aux lysosomes, par un mécanisme qui sera décrit au paragraphe 1.6.1.1. Les résidus mannose 6-phosphate sont ajoutés spécifiquement aux protéines lysosomiales néo-synthétisées dans le cis-Golgi, via une synthèse en deux étapes. Le transfert d'un résidu N-acétylglucosamine phosphorylée au groupement hydroxyl en position 6 des résidus mannose, suivi du clivage du résidu N-acétylglucosamine, génère le marqueur mannose 6-phosphate (Baranski et al., 1992). La base de la reconnaissance des protéines lysosomiales par la phosphotransférase qui catalyse la première étape de la synthèse impliquerait une structure tridimensionnelle retrouvée spécifiquement dans ces protéines (Cuzzo et al., 1995).

Outre la structure glycidique, la sulfatation des résidus tyrosine peut avoir des conséquences importantes sur l'activité biologique des protéines. L'effet de certains peptides hormonaux serait ainsi potentialisé par l'augmentation de leur demi-vie dans la circulation, grâce à la protection contre la dégradation que leur confèrent les groupements sulfates (Huttner, 1988). Cette réaction est catalysée par une tyrosylprotéine sulfotransférase qui reconnaît les résidus tyrosine présents dans des régions acides de la protéine. La sulfatation se produit dans les compartiments tardifs de l'appareil de Golgi et représente l'une des dernières modifications apportées aux protéines sécrétées, avant leur sortie du Golgi (Niehrs et Huttner, 1990).

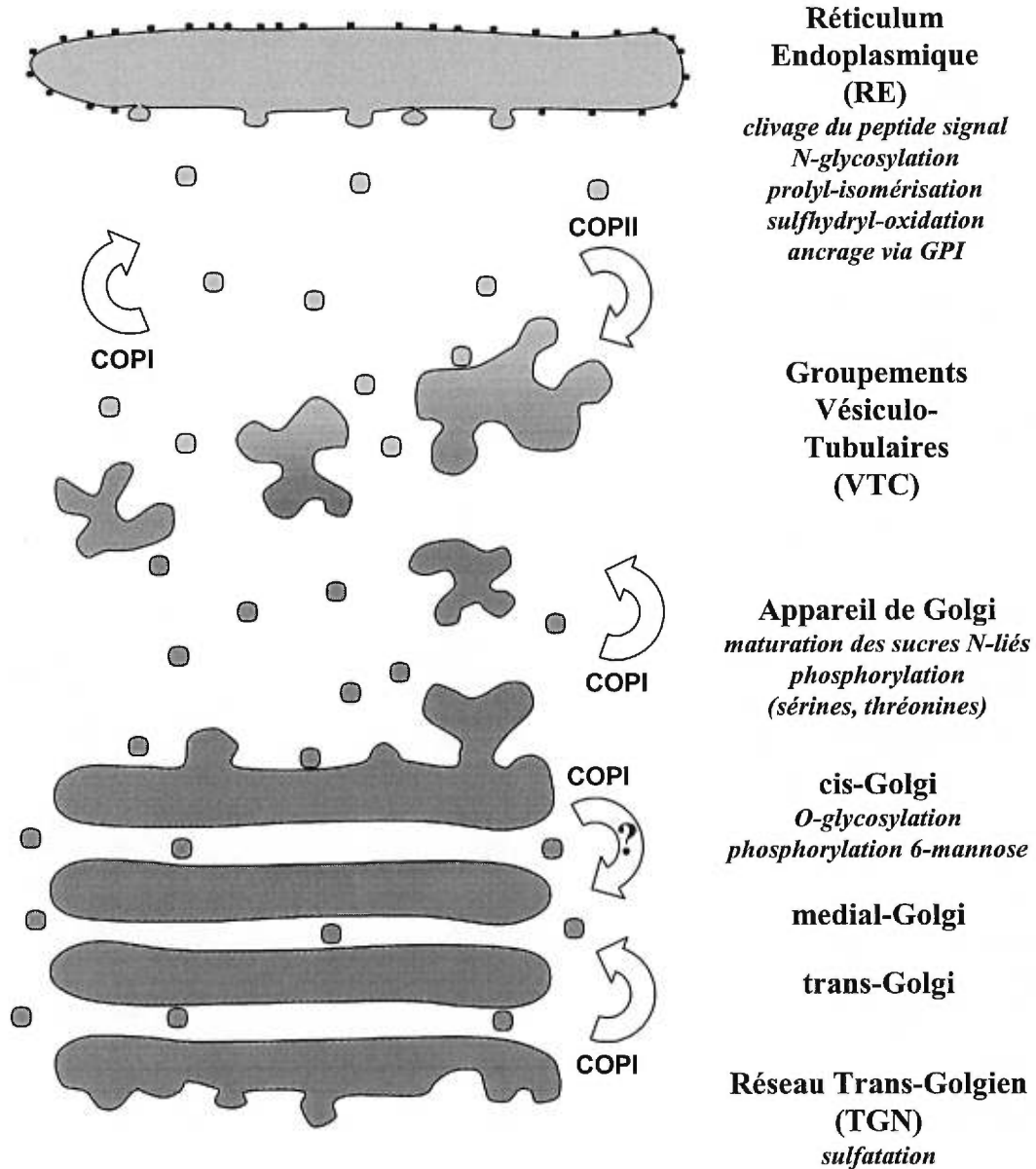


Figure 1-2. **Modifications post-traductionnelles et transport des protéines dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion.** Le transport entre le RE et le Golgi implique des vésicules recouvertes des complexes COPI et COPII. Dans le Golgi, le transport antérograde pourrait s'effectuer par migration des sacs ou par transport vésiculaire associé au complexe COPI.

1.5 Transport des protéines dans l'appareil de Golgi

Le mécanisme de transport des protéines dans l'appareil de Golgi demeure controversé, deux principaux modèles ayant été proposés pour rendre compte du trafic intra-golgien (Allan et Balch, 1999). Le premier modèle implique un transport vésiculaire entre les différents compartiments du Golgi, à la fois dans la direction antérograde et dans la direction rétrograde. Certains résultats suggèrent que ce transport bi-directionnel nécessiterait le complexe COPI, puisque des populations distinctes de vésicules retrouvées dans le Golgi semblent associées au complexe COPI. Les protéines de COPI se trouvent en effet à la fois sur des vésicules transportant des protéines qui contiennent une séquence KDEL, un marqueur des vésicules de transport rétrograde vers le RE, de même que sur des vésicules transportant une protéine sécrétée (l'insuline), considérée comme un marqueur des vésicules de transport antérograde (Orci et al., 1997).

Le deuxième modèle implique plutôt la migration, dans la direction antérograde, des sacs du Golgi, formés par la fusion des vésicules ou des VTCs provenant du RE. L'acquisition des protéines spécifiques à chaque compartiment du Golgi, telles que les enzymes de glycosylation, se ferait par transport rétrograde à partir des sacs distaux, à l'aide de vésicules recouvertes des complexes COPI. La taille de chaque sac serait maintenue par la balance entre l'apport de vésicules provenant des sacs en *trans* et la formation de vésicules destinées aux sacs en *cis*. Le principal argument en faveur de ce modèle est que les vésicules de transport ne peuvent accommoder la taille de complexes protéiques multimériques, telles que les hélices triples de procollagène. Une analyse récente du transport du procollagène a mis en évidence que le complexe traversait l'appareil de Golgi sans jamais sortir des sacs, en accord avec le modèle de la migration des sacs du Golgi (Bonfanti et al., 1998). Il demeure cependant possible que de petites protéines solubles ou membranaires traversent l'appareil de Golgi à l'aide vésicules de transport.

1.6 Tri des protéines dans le réseau trans-golgien

Le réseau trans-golgien (TGN pour *Trans-Golgi Network*) est le principal site de tri des protéines en route vers les lysosomes, la membrane plasmique ou les granules de sécrétion (Allan et Balch, 1999) (Figure 1-3). Les vésicules qui bourgeonnent du TGN sont principalement recouvertes de clathrine, un complexe protéique dont la structure typique à trois bras s'assemble pour former une cage autour de la vésicule (Schmid, 1997). La première étape dans la formation de ces vésicules est le recrutement de complexes de protéines adaptatrices (AP pour *Adaptor Protein*). Plusieurs types de complexes AP ont été identifiés: les complexes AP-1, AP-3 et AP-4 seraient impliqués dans le transport à partir du TGN ou à partir des endosomes, alors que le complexe AP-2 serait impliqué dans l'endocytose à la membrane plasmique (Dell'Angelica et al., 1999). De plus, il existerait des sous-types de complexes AP, formés par l'incorporation de sous-unités exprimées spécifiquement dans des cellules présentant des modes de transport particuliers. Ainsi, le rôle du sous-type AP-1B dans le transport vers la membrane basolatérale de cellules épithéliales polarisées, a récemment été caractérisé (Folsch et al., 1999).

Les complexes AP interagissent directement avec au moins deux types de séquences présentes dans les segments cytoplasmiques des protéines transmembranaires. Ces séquences comprennent soit le motif YXXØ (où X est tout acide aminé et Ø, tout acide aminé ayant une chaîne latérale hydrophobe et volumineuse) soit le motif LL, qui consiste en un doublet de résidus leucine (Dell'Angelica et al., 1999). La spécificité de la liaison des complexes AP serait de plus modulée par d'autres facteurs telle que la présence de régions acides capables de modifier l'accessibilité aux séquences consensus. Ainsi la protéine PACS-1 qui se lie à un motif de résidus acides phosphorylés présent dans le segment cytoplasmique de la furine (décrite plus loin), recruterait le complexe AP-1 et la clathrine, permettant le transport de la furine, des endosomes au TGN (Wan et al., 1998). Enfin, la liaison des complexes AP aux membranes est contrôlée par les GTPases ARF, de manière analogue aux GTPases des complexes COPI et COPII.

1.6.1 Ciblage vers les lysosomes

1.6.1.1 Transport du réseau trans-golgien aux lysosomes

Les résidus phosphomannosyl présents sur plusieurs enzymes lysosomiales, constituent des ligands de haute affinité pour les récepteurs au mannose 6-phosphate (MPR pour *Mannose 6-Phosphate Receptor*) dans le TGN. Ces récepteurs ont été classés en deux catégories, sur la base de leur fonctionnement accru en présence de cations divalents: le MPR indépendant des cations (CI-MPR pour *Cation-Independent MPR*) et le MPR dépendant des cations (CD-MPR pour *Cation-Dependent MPR*) (Dahms et al., 1989). La voie du CI-MPR semble dominante puisque ce récepteur peut compenser pour la perte du CD-MPR (Kornfeld et Mellman, 1989).

Les enzymes lysosomiales liées aux MPRs sont incorporées dans des vésicules à clathrine qui bourgeonnent du TGN. Ces vésicules pourraient fusionner avec les endosomes précoces (EE pour *Early Endosomes*), dont la maturation génère les endosomes tardifs (LE pour *Late Endosomes*), ou encore directement avec les LEs (Marsh et McMahon, 1999). Le milieu des EEs ne serait cependant pas suffisamment acide pour induire la dissociation des enzymes lysosomiales des MPRs. Cette dissociation semble en effet se produire principalement dans les LEs, où l'accumulation des MPRs est observée. Le processus de maturation des LEs en lysosomes implique le recyclage des MPRs vers le TGN, où les MPRs deviennent de nouveau disponibles pour la liaison de leurs ligands protéiques (Kornfeld et Mellman, 1989). Les protéines recouvrant les vésicules qui bourgeonnent des EEs ou des LEs sont probablement constituées de complexes AP/clathrine (Marsh et McMahon, 1999).

Parallèlement au transport via les MPRs, d'autres mécanismes pourraient jouer un rôle dans l'envoi des enzymes lysosomiales vers leur destination finale. Ainsi, l'inhibition de la N-glycosylation n'empêche pas le transport de la cathepsine D vers

les lysosomes dans une lignée de cellules hépatiques alors que cette inhibition résulte en la sécrétion constitutive des zymogènes lysosomiaux dont la procathepsine D, dans la plupart des cellules (Rijnbout et al., 1991). De plus, dans des fibroblastes dépourvus de la voie de synthèse des résidus mannose 6-phosphate, une faible partie des enzymes lysosomiales néo-synthétisées parviennent aux lysosomes (Pohlmann et al., 1995). Le fonctionnement de ce ciblage résiduel demeure cependant inexplicé.

1.6.1.2 Endocytose

Les endosomes représentent le compartiment intracellulaire où convergent la voie de transport vers les lysosomes et la voie d'endocytose. La plupart des complexes ligands-récepteurs sont internalisés à la membrane plasmique par bourgeonnement de vésicules recouvertes de clathrine (Mellman, 1996). Une fois formées, ces vésicules perdent rapidement la clathrine et fusionnent avec les EEs, où le milieu légèrement acide cause la dissociation du ligand de son récepteur. Les récepteurs se concentrent dans les extensions tubulaires des EEs, qui bourgeonnent éventuellement pour former les vésicules de recyclage, responsables du retour des récepteurs à la membrane. Le mécanisme qui permet de ségréger les récepteurs et autres protéines membranaires recyclées, des autres protéines présentes dans les EEs n'a pas été élucidé. Cet événement pourrait refléter une propriété physique de la membrane des extensions et nécessiter des signaux de recyclage, qui seraient exposés par les protéines membranaires. Ce qui reste des EEs après le départ des vésicules de recyclage, contient surtout les ligands solubles et fusionne avec les LEs dont la maturation en lysosomes, génère un milieu propice à la dégradation des ligands. Par ailleurs, l'observation que l'internalisation de récepteurs membranaires par les cellules se produisait dans des conditions d'inactivation de la clathrine a permis de postuler l'existence d'une voie d'endocytose indépendante de la clathrine (Lamaze et Schmid, 1995). Cette voie n'a cependant pas encore été caractérisée.

1.6.2 Ciblage vers la membrane des cellules polarisées

1.6.2.1 Transport à la membrane apicale

L'ajout d'un groupement GPI suffit pour cibler une protéine à la membrane apicale des cellules épithéliales polarisées (Brown et al., 1989). Les GPI-protéines ont tendance à s'associer avec des microdomaines sphingolipidiques des membranes dans la lumière du Golgi. Les GPI-protéines se retrouvent à la surface cellulaire dans ces microdomaines sphingolipidiques contenant du cholestérol nommés *rafts* (Muniz et Riezman, 2000). Le cholestérol apparaît essentiel au transport des GPI-protéines à la membrane plasmique de même qu'à l'organisation de ces protéines dans les *rafts*. Une hypothèse récente propose que ces domaines recruteraient les GPI-protéines au niveau du TGN et favoriseraient le ciblage des vésicules de transport préférentiellement vers la membrane plasmique apicale. Cependant des résultats récents suggèrent que la présence du groupement GPI ne serait pas suffisante pour cibler une protéine vers la membrane apicale mais que l'ajout d'oligosaccharides N-liés augmenterait considérablement la proportion de protéines retrouvées à la membrane apicale (Benting et al., 1999).

1.6.2.2 Transport à la membrane basolatérale

La présence de signaux capables de diriger les protéines vers la membrane apicale a mené à la proposition que les protéines étaient envoyées par défaut à la membrane basolatérale. Cependant, des résultats plus récents montrent que plusieurs récepteurs membranaires sont dirigés spécifiquement vers la membrane basolatérale dans les cellules polarisées (Monlauzeur et al., 1995). Le mécanisme de ciblage des récepteurs néo-synthétisés vers la membrane basolatérale impliquerait des motifs dans le domaine cytoplasmique des récepteurs, qui contiennent un résidu tyrosine déterminant (Monlauzeur et al., 1995), (Mellman, 1996).

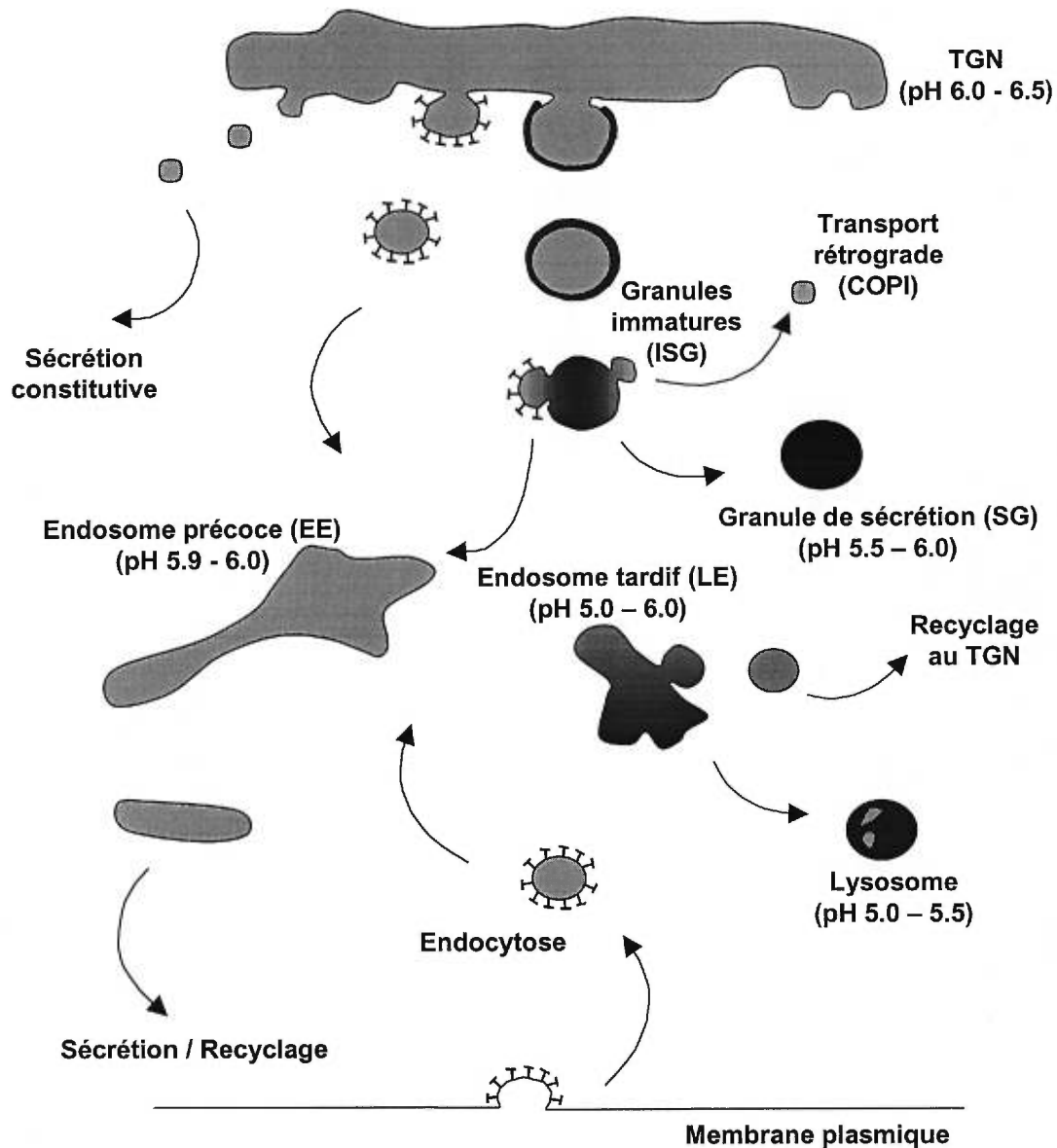


Figure 1-3. Tri des protéines dans le TGN et les endosomes. Les protéines en route vers la membrane plasmique ou les lysosomes se trouvent dans des vésicules recouvertes de clathrine (☞). La clathrine recouvre également les vésicules d'endocytose et celles qui bourgeonnent des endosomes. Au contraire, le transport vers la voie de sécrétion régulée pourrait impliquer un complexe protéique de recouvrement différent (☞).
(Adaptée de Mukherjee et Maxfield, 1999 et de Arvan et Castle, 1998)

1.6.3 Ciblage vers les granules de sécrétion

Les granules de sécrétion (SG pour *Secretory Granules*) constituent un compartiment intracellulaire spécialisé dans le stockage de protéines, telles que les hormones endocriniennes, dont la sécrétion est déclenchée par un stimulus physiologique. Morphologiquement, les SGs se caractérisent par une structure protéique qui apparaît très dense lorsque visualisée par microscopie électronique. Le transport vers les SGs emprunte la voie de sécrétion régulée, par opposition à la voie de sécrétion constitutive qui assure le transport rapide des protéines néo-synthétisées du TGN à la membrane plasmique. Le temps de transit des protéines dans la voie de sécrétion constitutive est typiquement de quelques minutes alors qu'il est de plusieurs heures dans la voie de sécrétion régulée (Halban et Irminger, 1994). Les protéines néo-synthétisées qui sont ciblées aux SGs entrent dans des granules de sécrétion immatures (ISG pour *Immature Secretory Granule*) qui bourgeonnent du TGN. Il n'est pas certain que les complexes protéiques qui recouvrent les ISGs en formation soient constitués de clathrine si bien que des complexes spécifiques à ces organelles pourraient exister. Deux principaux modèles ont été développés pour rendre compte de l'envoi des protéines vers la voie de sécrétion régulée. Il est important de noter que ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs et que le processus de ciblage pourrait intégrer plusieurs des mécanismes proposés (Arvan et Castle, 1998).

1.6.3.1 Entrée sélective des protéines dans la voie de sécrétion régulée

Le premier modèle propose que l'incorporation des protéines dans les ISGs serait contrôlée à l'entrée, lors de la formation de ces vésicules qui bourgeonnent du TGN. Ce modèle implique l'existence d'un récepteur membranaire capable de lier spécifiquement les protéines à destination des SGs et de les entraîner dans les ISGs en formation. Il a récemment été suggéré que la carboxypeptidase E (CPE), une enzyme de maturation qui sera décrite au paragraphe 1.7.2, pouvait agir comme récepteur pour l'entrée des protéines dans les granules. Cette hypothèse se fondait principalement sur la capacité de la CPE à lier spécifiquement des protéines de la

voie de sécrétion régulée, montrant au contraire peu d'affinité pour des protéines sécrétées par la voie constitutive (Cool et al., 1997). De plus, dans les souris Cpe^{fat}/Cpe^{fat} qui sont déficientes en CPE (Naggert et al., 1995), des précurseurs hormonaux comme la proopiomélanocortine (POMC), exhibent une sécrétion constitutive accrue, attribuée au manque de CPE en tant que récepteur de ciblage (Shen et Loh, 1997). Les conclusions de cette étude demeurent cependant controversées puisque dans les souris Cpe^{fat}/Cpe^{fat} , l'entrée de la proinsuline dans les SGs ne semblent pas altérée, bien que sa maturation en insuline soit largement incomplète (Irminger et al., 1997), (Varlamov et al., 1997). Ces résultats indiquent que la CPE est essentielle à la maturation des précurseurs mais n'est probablement pas requise pour leur ciblage dans la voie de sécrétion régulée.

Le corollaire de l'existence d'un récepteur pour l'entrée dans les ISGs est que les protéines ciblées doivent exposer des déterminants capables de lier spécifiquement ce récepteur. Comme aucune séquence consensus ne semble correspondre à la capacité des protéines à être ciblées vers ce compartiment, plusieurs études ont tenté d'identifier des motifs structuraux qui seraient suffisants pour l'entrée dans les ISGs. Ainsi les extrémités N-terminales de la POMC et la chromogranine B, une protéine présente dans les SGs de plusieurs tissus endocriniens, contiendraient une boucle formée par un pont disulfure interne (Chanat et al., 1993), (Cool et al., 1997). Bien que cette structure semble fonctionner pour l'envoi de protéines de fusion vers les SGs, son rôle dans le processus de ciblage reste à démontrer. Des résultats récents indiquent que cette structure pourrait induire l'association aux membranes des ISGs en formation (Glombik et al., 1999). Cependant, d'autres régions de la POMC semblent suffisantes pour induire le ciblage aux SGs (Chevrier et al., 1993). De plus, comme l'ensemble des protéines ciblées vers les SGs ne comporte pas nécessairement une boucle semblable, ce mécanisme ne pourrait expliquer le ciblage de la majorité des protéines vers la voie de sécrétion régulée.

1.6.3.2 Rétention sélective des protéines dans la voie de sécrétion régulée

Le deuxième modèle pour le ciblage des protéines dans la voie de sécrétion régulée propose que les protéines parvenues au TGN entrent sans restriction dans les ISGs mais que les protéines résidentes des SGs sont spécifiquement retenues dans ces organelles (Castle et al., 1997). La maturation des ISGs comprendrait l'enlèvement des protéines non-résidentes des SGs, qui pourrait s'effectuer par un mécanisme sélectif impliquant des récepteurs ou simplement par l'incorporation de protéines solubles dans des vésicules qui s'échapperaient des ISGs. Ainsi dans des cellules β du pancréas, des vésicules qui bourgeonnent des ISGs ont été observées dans plusieurs études : des vésicules recouvertes de clathrine seraient impliquées dans le transport d'enzymes lysosomiales présentes dans les ISGs, vers les lysosomes (Kuliawat et Arvan, 1994), (Klumperman et al., 1998), alors que des vésicules associées aux complexes COPI permettraient le transport rétrograde de protéines résidentes du TGN (Martinez-Menarguez et al., 1999). Dans la plupart des cellules endocrines et exocrines, le flot important de protéines qui entrent dans les ISGs rend probablement nécessaire ces étapes de tri additionnelles au niveau des ISGs. La rétention des protéines serait facilitée par leur condensation progressive qui limiterait leur capacité à être incorporées dans les vésicules qui bourgeonnent des ISGs.

1.6.3.3 Propriétés des protéines régulées

Quel que soit le mécanisme de ciblage vers la voie de sécrétion régulée, certaines caractéristiques physico-chimiques des protéines régulées semblent importantes pour leur stockage dans les SGs. Ainsi, plusieurs hormones ont la capacité de s'agréger dans un milieu légèrement acide aux environs de pH 6 et en présence d'environ 10mM de Ca^{2+} (Colomer et al., 1996), des conditions qui prévalent dans le TGN et les ISGs (Chanat et Huttner, 1991), (Demaurex et al., 1998). La condensation du contenu des ISGs mène à la formation de la structure dense des SGs où les protéines régulées se trouvent en concentration très élevée (jusqu'à 100 mM) (Halban et Irminger, 1994). Cette agrégation pourrait également être induite ou assistée par des membres de la

famille des granines, des protéines de la voie de sécrétion régulée qui lient le Ca^{2+} . Cette famille comprend la chromogranine A, la chromogranine B et la sécrétogranine II, dont l'expression est abondante dans les tissus neuroendocriniens (Huttner et al., 1991). L'expression de la chromogranine B dans un modèle de cellule neuroendocrine augmenterait l'efficacité du ciblage de certains peptides hormonaux dans les SGs (Natori et Huttner, 1996). La co-agrégation de la CPE avec plusieurs précurseurs hormonaux pourrait également indiquer un rôle de la CPE dans ce processus, ce qui expliquerait la condensation incomplète de la proinsuline dans les SGs des souris $\text{Cpe}^{\text{fat}}/\text{Cpe}^{\text{fat}}$ (Naggert et al., 1995), (Rindler, 1998). Par ailleurs, une association homotypique des précurseurs précédant leur entrée dans les ISGs est suggérée par l'observation que certaines cellules de l'hypophyse antérieure, qui expriment à la fois la prolactine et l'hormone de croissance, comportent différentes sortes de granules de sécrétion distinguables par leur contenu (Hashimoto et al., 1987).

L'interaction de certaines protéines de la voie de sécrétion régulée avec la membrane a été proposé comme un mécanisme possible pour la rétention des protéines régulées dans les SGs, via l'association d'agrégats de protéines aux phospholipides de la membrane des ISGs en maturation (Laine et Lebel, 1999), (Glombik et al., 1999). Une portion importante de la CPE se trouve associée à une préparation membranaire et un peptide correspondant à sa région C-terminale se lie aux membranes d'une manière dépendante du pH (Fricker et al., 1990). De plus, l'observation que cette région permettait le ciblage d'une protéine de fusion vers les SGs a permis d'avancer que la région C-terminale était impliquée dans le ciblage de la CPE aux SGs (Mitra et al., 1994). Un motif structural dans la partie C-terminale, la formation d'une hélice α amphipathique, pourrait conférer à la CPE la propriété inductible et modulée par l'acidification du TGN, de s'associer aux membranes. Des résultats plus récents suggèrent cependant que la capacité des protéines à s'associer aux membranes ne serait pas en soit suffisante pour assurer leur ciblage dans les SGs (Varlamov et Fricker, 1996). D'autre part, des résultats présentés au chapitre 3 de cette thèse indiquent qu'une hélice α dans la partie C-terminale de la proprotéine

convertase PC1 (décrite au paragraphe 1.7.1) induirait le ciblage vers la voie de sécrétion régulée.

Enfin, l'association spécifique des précurseurs protéiques avec les enzymes de maturation de la voie de sécrétion régulée pourrait concourir à l'entrée des proprotéines dans les ISGs. Un site de clivage pour la proprotéine convertase PC1 serait en effet suffisante pour le ciblage d'une protéine de fusion dans les SGs (Brechler et al., 1996). Il est possible que d'autres enzymes de maturation comme la CPE, coopèrent de manière semblable dans le processus de ciblage vers la voie de sécrétion régulée (Arvan et Castle, 1998).

1.7 Maturation des protéines de la voie de sécrétion régulée

La majorité des protéines hormonales et des neuropeptides stockés dans les SGs des cellules endocrines ou des neurones sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs. La maturation de ces précurseurs en peptides physiologiquement actifs implique un ensemble de clivages et de modifications qui se produisent spécifiquement dans la voie de sécrétion régulée de ces cellules. Il est à noter que le processus de protéolyse limitée de précurseurs protéiques n'est pas restreint aux prohormones et aux proneuropeptides mais s'applique aussi à plusieurs autres précurseurs protéiques qui sont clivés dans différents compartiments de la voie de sécrétion, notamment des récepteurs, des molécules d'adhésion et des zymogènes (Seidah et Chretien, 1997), telle que la prorénine (décrite au paragraphe 1.9.3).

1.7.1 Clivage par les proprotéine convertases

1.7.1.1 Membres et caractéristiques de la famille

Les proprotéine convertases (PCs) forment une famille d'enzymes composée d'au moins sept membres identifiés : la furine, PC1, PC2, PACE4, PC4, PC5A/B (où A et

B représentent l'épissage alternatif d'un même transcrit) et PC7 (Figure 1-4). L'activité enzymatique des PCs se caractérise par le clivage à un site précédé d'un doublet d'acides aminés basiques. La séquence consensus de clivage par les PCs est généralement défini comme R-X-K/R-R↓-X (où X peut être presque tout acide aminé et ↓ représente le site de clivage), avec des préférences variables entre les PCs pour les résidus autour du site de clivage (Steiner, 1998).

Les PCs sont les homologues mammifères de la protéase kexine exprimée chez la levure. Ces convertases partagent une organisation structurale similaire qui comprend différents domaines : le peptide signal, le prosegment, la partie catalytique, le domaine P et la partie C-terminale. Le peptide signal dirige les PCs en cours de synthèse vers le RE où le segment N-terminal est clivé. Comme pour la plupart des protéases synthétisées sous forme de précurseurs, le prosegment des PCs favoriserait le repliement fonctionnel de la protéine de même que l'inhibiteur de l'activité catalytique dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion (Silen et Agard, 1989), (Zhu et al., 1989). En général, l'activation des PCs comprend une étape autocatalytique qui implique le clivage du prosegment dans le RE. Bien que le mécanisme de cette auto-activation n'ait été caractérisé que pour la furine (Leduc et al. 1992), (Anderson et al., 1997), la séquence des événements déduite de ces résultats pourrait représenter un modèle général pour tous les PCs, excepté PC2. Dans un premier temps, le clivage intramoléculaire du prosegment permet à la furine de sortir du RE. Le prosegment demeure cependant attaché à la furine dont l'activité est ainsi inhibée jusqu'au TGN. L'acidification de même que l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} dans le milieu du TGN seraient essentielles au second clivage que la furine effectue à l'intérieur de son prosegment et qui résulte en l'activation complète de la convertase. (Molloy et al., 1999)

La partie catalytique des PCs s'apparente à celle de la subtilisine, une protéase à sérine bactérienne, et représente la région la plus conservée avec une homologie de séquence d'environ 50% entre les PCs. L'activité enzymatique des PCs est nettement dépendante du Ca^{2+} . La subtilisine et ses homologues contiennent des sites de liaison

au Ca^{2+} (Siezen et Leunissen, 1997) mais le rôle de ces sites potentiels dans l'activation des PCs n'a pas encore été démontré, bien que certains de ces motifs de liaison au Ca^{2+} semblent conservés chez les PCs (Zhou et al., 1998). L'activité des différentes convertases est maximale à des concentrations en Ca^{2+} et à des valeurs de pH qui varient entre les PCs. Ces différences dans leurs conditions enzymatiques optimales reflètent probablement le milieu des compartiments cellulaires où l'activité des différentes convertases se manifeste (Nakayama, 1997). En effet, certaines PCs semblent actives au niveau du TGN et de la membrane plasmique alors que d'autres ciblent des protéines principalement dans les SGs. Ce critère a permis de classer les PCs en deux branches fonctionnelles : la branche des PCs actives dans la voie de sécrétion constitutive inclut la furine, PACE4, PC5-B et PC7 alors que la branche des PCs actives dans la voie de sécrétion régulée comprend PC1, PC2 et PC5-A (Steiner, 1998). L'intégrité du domaine P est cruciale à l'activité enzymatique des PCs (d'où le nom de domaine P pour *Processing*). Un modèle récent propose que le domaine P jouerait un rôle dans la modulation par le Ca^{2+} et le pH, de l'activité catalytique des PCs. (Zhou et al., 1998). Le domaine P comprend la séquence conservée RGD, présente dans tous les PCs à l'exception de PC7 (RGS). La mutation d'un seul résidu dans la séquence RGD de PC1 cause la dégradation de la convertase dans le RE (Lusson et al., 1997), indiquant que l'intégrité de cette séquence est essentielle au repliement approprié des PCs.

Enfin, la partie C-terminale représente la région la moins conservée entre les PCs. Cette région comporte des séquences riches en cystéine dans le cas de la furine, de PACE4, de PC5 et de PC7 et un segment transmembranaire dans le cas de la furine et de PC5-B. Pour plusieurs des PCs, l'information pour leur ciblage vers différents compartiments intracellulaires se trouve dans la région C-terminale. Par exemple, le segment cytosolique à l'extrémité C-terminale de la furine contient des motifs de localisation au TGN, qui induisent l'internalisation de la furine à la membrane plasmique et son recyclage au TGN. Le segment cytosolique de la furine est soit directement soit via le recrutement de PACS-1, impliqué dans la liaison des complexes AP-1/clathrine (Wan et al., 1998). D'autres déterminants du ciblage dans la partie C-terminale des PCs seront décrits plus loin.

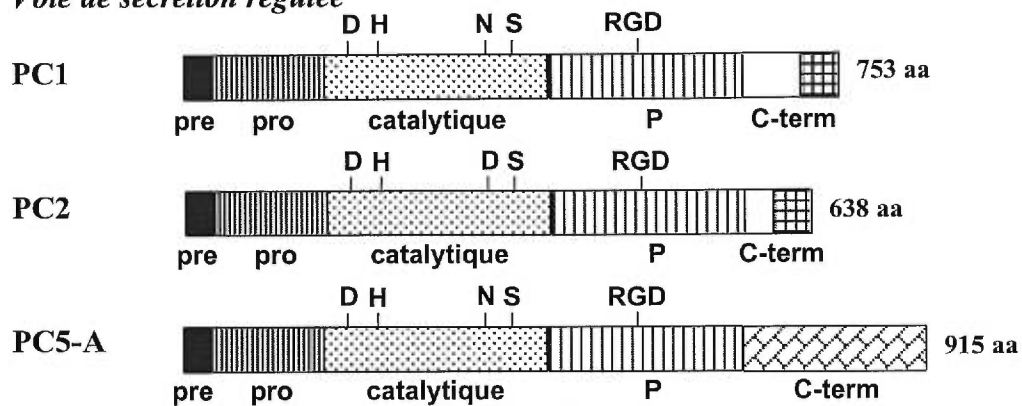
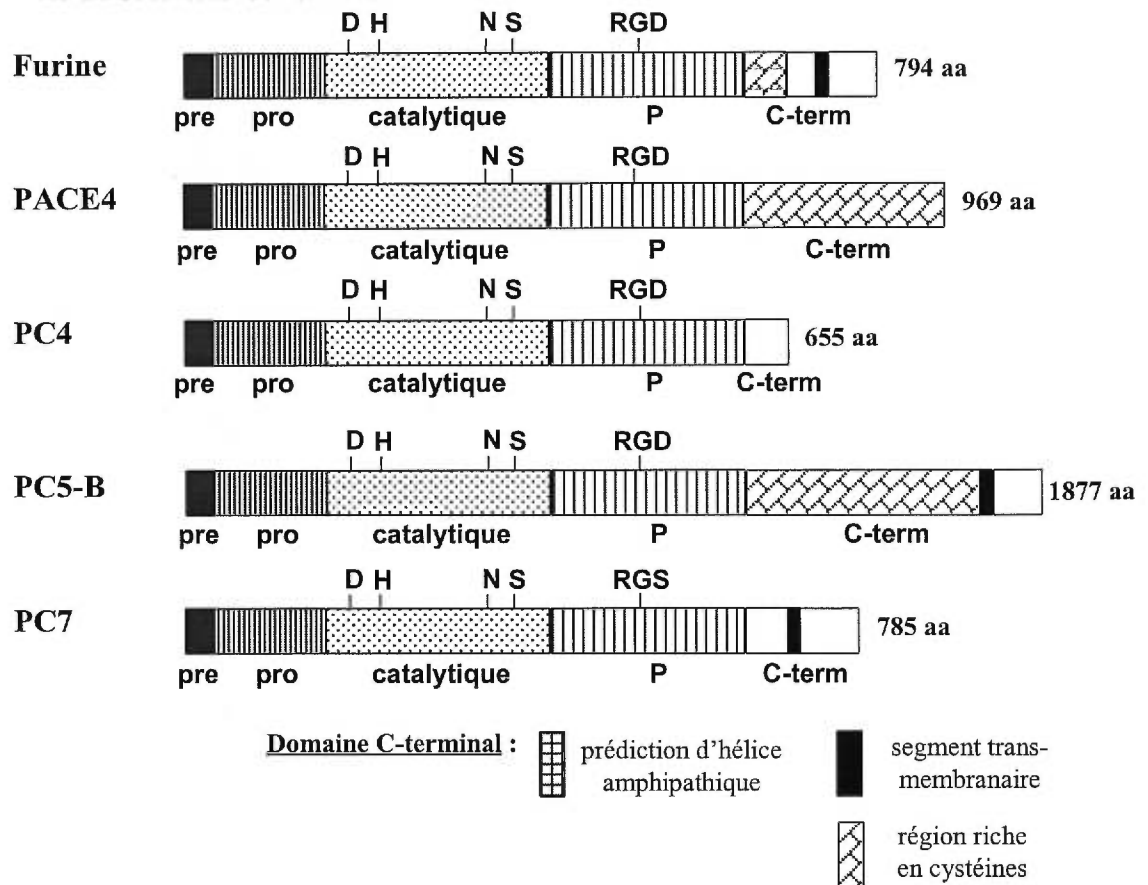
Voie de sécrétion régulée*Voie de sécrétion constitutive*

Figure 1-4. Représentation schématique des membres de la famille des proprotéine convertase. *pre*, peptide signal *pro*, prosegment *catalytique*, région contenant la triade catalytique (D,H,S) et l'oxyanion (N; D pour PC2) *P*, domaine contenant la séquence RGD (RGS pour PC7). À noter, seuls les deux transcrits alternatifs de PC5 sont indiqués. (Adaptée de Steiner, 1998 et de Seidah et Chrétien, 1997)

1.7.1.2 Biosynthèse de PC1

Suite au clivage du peptide signal dans le RE, le prosegment de PC1 est rapidement enlevé dans un compartiment pré-golgien, probablement le RE (Zhou et Lindberg, 1993b), (Benjannet et al., 1993), par un mécanisme autocatalytique (Goodman et Gorman, 1994). Des résultats *in vitro* ont montré que l'activité de PC1 pouvait être inhibée par son propre prosegment mais qu'en présence d'un excès de PC1, le prosegment était clivé en des fragments beaucoup moins inhibiteurs (Boudreault et al., 1998). Ces données suggèrent donc un mécanisme d'activation de PC1 analogue à celui de la furine (Anderson et al., 1997). Contrairement à la furine cependant, l'enlèvement du prosegment ne serait qu'une première étape dans l'activation complète de PC1 (Jutras et al., 1997). En effet, des études *in cellulo* ont montré que PC1 subit un clivage additionnel qui enlève sa partie C-terminale (Vindrola et Lindberg, 1992). Il a initialement été observé que ce clivage survenait surtout dans des cellules pourvues d'une voie de sécrétion régulée, indiquant que cette modification post-traductionnelle se produisait spécifiquement dans les SGs (Vindrola et Lindberg, 1992), (Zhou et Lindberg, 1993b). D'autres études ont montré que le blocage de la sortie de PC1 du TGN, prévenait le clivage de la partie C-terminale (Milgram et Mains, 1994). La capacité de PC1 à générer spontanément sa forme tronquée en C-terminal, suggère que ce clivage se produit de façon autocatalytique (Zhou et Lindberg, 1994a). De plus, une accélération de la production de la forme tronquée est associée à l'augmentation de l'expression de PC1 dans des cellules, ce qui supporte l'hypothèse que le clivage se produit par un mécanisme autocatalytique intermoléculaire (Zhou et Mains, 1994). Des mutants de délétion de la partie C-terminale de PC1 ont par ailleurs montré que cette région n'était pas nécessaire à la formation de PC1 active et que l'activité du mutant tronqué était de surcroît supérieure à celle de la PC1 naturelle. Par ailleurs, le mutant de délétion ne semble plus stocké dans les SGs, indiquant un rôle de cette région dans le ciblage de PC1 vers la voie de sécrétion régulée (Zhou et al., 1995). La fonction de la partie C-terminale d'une part, dans l'inhibition de l'activité enzymatique de PC1 et d'autre part, dans le ciblage de PC1 vers la voie de sécrétion régulée, forment deux

des principaux sujets abordés dans cette thèse et seront traités plus en détail aux chapitres 2 et 3, respectivement.

1.7.1.3 Biosynthèse de PC2

Alors que le prosegment de PC1 est rapidement clivée dans le RE, dans le cas de PC2, ce clivage se produit au niveau du TGN ou des ISGs (Benjannet et al., 1993), (Zhou et Mains, 1994). De plus, la production de la forme active de PC2 nécessite la protéine 7B2, une protéine de 27 kDa qui est co-exprimée avec PC2 dans la plupart des tissus neuroendocriniens. Après le repliement de PC2 dans le RE, 7B2 lie la convertase et cette interaction faciliterait le transport de PC2 jusqu'au TGN (Braks et Martens, 1994). Le clivage en C-terminal de 7B2 par une protéase du TGN, possiblement la furine, libère la partie N-terminale de 21 kDa et le fragment C-terminal de 7B2 (Paquet et al., 1994). Le prosegment de PC2 est ensuite clivé, probablement par un mécanisme autocatalytique intramoléculaire, mais ce clivage génère la forme active de PC2 uniquement en présence du fragment de 21 kDa de 7B2 (Muller et al., 1997). Enfin, le fragment C-terminal de 7B2 inhibe l'activité de PC2 jusqu'au clivage du fragment par la CPE (Zhu et al., 1996).

1.7.1.4 Caractéristiques fonctionnelles de PC1 et de PC2

Dans plusieurs tissus neuroendocriniens, les fonctions de PC1 et de PC2 sont indissociables comme en témoignent souvent leur distribution tissulaire commune et leur rôle complémentaire dans la maturation de nombreux précurseurs hormonaux, présentés dans le Tableau 1-I. L'expression de PC1 de même que celle de PC2 se localisent principalement au niveau du cerveau, particulièrement dans l'hypophyse, et au niveau du pancréas, dans les îlots de Langerhans (Seidah et al., 1991) (Smeekens et al., 1991). La plupart des précurseurs hormonaux exprimés dans ces tissus présentent de multiples sites de clivage, envers lesquels PC1 et PC2 montrent des activités parfois distinctes mais souvent redondantes (Steiner et al., 1992). De plus, des variations dans leur niveau d'expression pourraient expliquer l'apparition de

profils de maturation variés, générés à partir d'un même précurseur dans différents tissus. L'activité des deux convertases permet ainsi de générer tous les produits dérivés de la POMC (hormone mélanotrope et β -endorphine) retrouvés normalement dans l'hypophyse intermédiaire, où PC1 et PC2 sont exprimées (Benjannet et al., 1991), (Thomas et al., 1991). En revanche, l'activité de PC1 seule génère d'autres produits dérivés de la POMC (hormone corticotrope, lipotropine et un peu de β -endorphine) qui correspondent au profil de clivage retrouvé dans l'hypophyse antérieure où PC1 est la principale convertase exprimée (Benjannet et al., 1991), (Thomas et al., 1991). Dans les îlots de Langerhans du pancréas, PC1 et PC2 ont été impliquées dans le clivage préférentiel de l'un ou l'autre des deux sites de clivage de la proinsuline dont la maturation génère l'insuline active et le peptide C (Rhodes et al., 1992), (Furuta et al., 1998). D'autre part, l'activité de PC2 sur les différents sites de clivage du proglucagon permet de générer le glucagon et les autres dérivés de ce précurseur retrouvés dans les cellules α du pancréas, qui expriment de hauts niveaux de PC2 mais faiblement PC1 (Rouille et al., 1995). Le proglucagon est mûri de manière différente par PC1 qui produit les dérivés de ce précurseur (GLP-1, glicentine, oxyntomoduline) retrouvés dans les cellules endocrines L de l'intestin, cellules où PC1 serait la convertase prédominante (Rouille et al., 1997). Enfin, les conditions optimales pour l'activité de PC1 et de PC2 sont en accord avec l'idée que ces convertases exercent leur activité principalement dans les SGs. Ces conditions se situent en effet dans un milieu légèrement acide, idéalement à une valeur de pH entre 5.5 et 6, et une concentration en Ca^{2+} égale ou supérieure à 5 mM (Shennan et al., 1991), (Zhou et Lindberg, 1993b), (Jean et al., 1993), (Rufaut et al., 1993).

1.7.1.5 Perte de la fonction de PC1

Alors que des études *in vitro* et *in cellulo* ont permis d'identifier de nombreux substrats potentiels de PC1 (Tableau 1-I), la confirmation du rôle de PC1 dans ces activités de maturation a été fournie par le cas d'un individu porteur de deux différentes mutations dans les allèles de PC1, causant une déficience complète en PC1 active (Jackson et al., 1997). Le résultat de cette déficience se caractérise par des

symptômes sévères d'obésité, des concentrations plasmatiques élevées de proinsuline, de POMC et d'autres précurseurs intermédiaires dans la production de l'hormone corticotrope. Le symptôme d'hypogonadisme hypogonadotrope a de plus permis de suggérer que les précurseurs des facteurs de relâche des hormones gonadotropes étaient maturés par PC1.

1.7.1.6 Inactivation des gènes de PC2 et de 7B2

La déficience en PC2 chez la souris cause une réduction considérable de la maturation du proglucagon pancréatique et une hypoglycémie chronique à jeun, ce qui concorde avec l'absence de glucagon plasmatique (Furuta et al, 1997). La maturation de la prosomatostatine dans les îlots de Langerhans est également incomplète alors que la concentration de la proinsuline dans la circulation est élevée. Cependant, alors que l'insuline active est indétectable chez le sujet humain déficient en PC1, chez les souris dépourvues de PC2, seulement le tiers de la proinsuline n'est pas maturée en insuline, ce qui souligne le rôle prépondérant de PC1 dans la maturation de la proinsuline (Furuta et al., 1997), (Furuta et al., 1998). Des extraits de cerveaux de souris déficientes en PC2 montrent que la production d'enképhaline de même que celle du neuropeptide E1 sont grandement diminuées, indiquant que PC2 serait la convertase majeure de leurs précurseurs dans le cerveau (Johanning et al., 1998), (Viale et al., 1999).

Le rôle de 7B2 dans la production de formes actives de PC2 a été souligné par les résultats de l'inactivation du gène de 7B2, dont le phénotype comporte plusieurs similitudes avec celui de la déficience en PC2, notamment l'hypoglucagonémie (Westphal et al., 1999). De façon remarquable, les souris déficientes en 7B2 présentent cependant des défauts qui ne se retrouvent pas chez les souris dépourvues de PC2, telle que l'élévation foudroyante de la concentration plasmatique de l'hormone corticotrope. Cet effet serait dû à l'activité de PC1 dans l'hypophyse intermédiaire où, en absence de formes actives de PC2, l'hormone corticotrope deviendrait le principal produit de la maturation de la POMC. Ces résultats suggèrent

que 7B2, en plus de son rôle dans l'activation de PC2, exerce des fonctions supplémentaires, possiblement dans le contrôle de la sécrétion hormonale dans l'hypophyse intermédiaire.

1.7.1.7 Biosynthèse de PC5

Un mécanisme d'épissage alternatif mène à la formation de deux isoformes différents de la convertase PC5, qui se distinguent par leur partie C-terminale : l'isoforme courte PC5-A et l'isoforme PC5-B dont la région C-terminale, beaucoup plus longue que celle de PC5-A, comporte une portion transmembranaire suivi d'un segment cytosolique. Le clivage du prosegment de PC5 semble se produire dans un compartiment précoce de la voie de sécrétion, possiblement dans le RE (De Bie et al., 1996). Les différentes régions C-terminales assureraient le ciblage de chaque isoforme vers deux compartiments intracellulaires différents. L'expression de PC5 dans des cellules d'origine neuroendocrinienne a permis de montrer que PC5-A était acheminée vers les SGs (De Bie et al., 1996), (Barbero et al., 1998). Au cours de son transport dans la voie de sécrétion régulée, possiblement au niveau des ISGs, la partie C-terminale de PC5-A est clivée (De Bie et al., 1996). Les étapes dans la biosynthèse de PC5-A rappellent donc les clivages post-traductionnels de PC1. De plus, la délétion des 38 derniers acides aminés à l'extrémité C-terminale de PC5-A semble altérer son ciblage vers les SGs (De Bie et al., 1996). Pour sa part, PC5-B serait retenue dans la cellule via son segment transmembranaire qui comporte des séquences consensus d'endocytose dont les motifs YXXØ et LL. Par ailleurs, une partie de PC5-B est sécrétée suite au clivage de la région C-terminale, probablement par une protéase du TGN.

1.7.1.8 Caractéristiques fonctionnelles de PC5-A

L'expression de PC5-A est très répandue et se retrouve à la fois dans des tissus endocriniens et non-endocriniens, avec des niveaux particulièrement élevés dans la glande surrénale (Lusson et al., 1993), (Mercure et al., 1996). Cette convertase est

une candidate pour l'activation du facteur inhibiteur de Müller qui est sécrété par les testicules où PC5-A est exprimée durant le développement des gonades (Nachtigal et Ingraham, 1996). PC5-A est également exprimée dans les cellules endocrines gastro-intestinales et dans le pancréas, où la convertase pourrait possiblement être impliquée dans la maturation du proglucagon. Cependant, l'expression faible de PC5-A et l'expression élevée de PC2, du moins dans le pancréas, ne suggère qu'un rôle mineur de PC5-A dans la maturation du proglucagon (Blache et al., 1994). PC5-A clive la proneurotensine dans des cellules transfectées mais cette maturation semble se produire dans des compartiments de la voie de sécrétion en amont des SGs, principalement dans les ISGs (Barbero et al., 1998). De plus, le profil de clivage de la proneurotensine par PC5-A indique que la convertase pourrait être responsable de la maturation de ce précurseur au niveau de la médullosurrénale. Enfin, PC5-A pourrait jouer un rôle dans la maturation de la prorénine humaine dans la glande surrénale (Mercure et al., 1996). Ce sujet sera traité plus en détail au chapitre 4.

Tableau 1-I Liste des précurseurs maturés par les proprotéine convertases de la voie de sécrétion régulée et localisation supposée de la maturation.

Convertase	Précurseur	Localisation tissulaire
PC1		
(Smeekens et al., 1991) (Jackson et al., 1997)	proinsuline	îlots de Langerhans
(Rouillé et al., 1997)	proglucagon	cellules endocrines gastrointestinales
(Thomas et al., 1991) (Benjannet et al., 1991) (Jackson et al., 1997)	proopiomélanocortine	hypophyse
(Galanopoulou et al., 1993)	prosomatostatine	cerveau
(Rovère et al., 1996)	proneurotensine	intestin
(Breslin et al., 1993)	proenképhaline	cerveau
(Schaner et al., 1997)	prothyrotropin releasing hormone (proTRH)	hypothalamus
(Viale et al., 1999)	promelanin concentrating hormone (proMCH)	cerveau
PC2		
(Smeekens et al., 1992) (Bennett et al., 1992) (Furuta et al., 1997)	proinsuline	îlots de Langerhans
(Rouillé et al., 1995) (Furuta et al., 1997)	proglucagon	îlots de Langerhans
(Thomas et al., 1991) (Benjannet et al., 1991)	proopiomélanocortine	hypophyse
(Rovère et al., 1996)	proneurotensine	cerveau
(Breslin et al., 1993)	proenképhaline	cerveau
(Brakch et al., 1995) (Furuta et al., 1997)	prosomatostatine	îlots de Langerhans
(Day et al., 1998)	prodynorphine	cerveau
(Viale et al., 1999)	promelanin concentrating hormone (proMCH)	cerveau
PC5-A		
(Nachtigal et Ingraham, 1996) (Mercure et al., 1996) (Barbero et al., 1998)	facteur inhibiteur de Müller prorénine proneurotensine	testicules glande surrénale glande surrénale

1.7.2 Clivage par les carboxypeptidases

Les fragments protéiques générés par les PCs comportent des résidus arginine en C-terminal, qui sont spécifiquement clivés par des métallocarboxypeptidases de la voie de sécrétion régulée. La CPE est l'une des carboxypeptidases la mieux caractérisée, bien que d'autres carboxypeptidases de la voie de sécrétion aient récemment été identifiées. La distribution tissulaire de la CPE s'apparente à celle de PC1 et de PC2, son expression ayant été co-localisée avec les peptides hormonaux dans les SGs de plusieurs tissus neuroendocriniens (Fricker, 1988). Les conditions optimales de pH pour l'activité de la CPE se situent autour de 5.6, en accord avec une activité protéolytique se produisant principalement dans les SGs.

L'importance de la CPE dans la production d'hormones physiologiquement actives a été démontrée par l'étude des souris CPE^{fat}/CPE^{fat} , un modèle d'obésité chez la souris, qui se caractérise par une hyperinsulinémie chronique. La découverte d'une mutation ponctuelle dans la partie codante de la CPE, mutation qui prévient la synthèse de CPE fonctionnelle, a permis de proposer que le phénotype des souris CPE^{fat}/CPE^{fat} résultait d'un manque de CPE (Naggert et al., 1995), (Fricker et al., 1996). Par la suite, des défauts ont été identifiés dans la maturation de plusieurs précurseurs dont la proneurotensine et le précurseur de l'enképhaline dans le cerveau (Rovere et al., 1996), (Fricker et al., 1996), renforçant l'hypothèse voulant que la CPE joue un rôle majeur dans la maturation des peptides hormonaux. Les bases biochimiques des défauts de maturation causés par l'absence de CPE n'ont cependant pas été complètement élucidées mais pourraient impliquer l'inhibition indirecte de PC1 et de PC2, par l'accumulation de fragments contenant des résidus arginine en C-terminal (Day et al., 1998).

En dépit des effets importants de la déficience en CPE sur la maturation de précurseurs hormonaux et de proneuropeptides, la détection de faibles quantités de peptides correctement maturés chez les souris CPE^{fat}/CPE^{fat} a permis de postuler que d'autres carboxypeptidases agissaient dans les SGs et pouvaient partiellement

compenser pour la perte de CPE (Fricker et al., 1996). Cependant, parmi les carboxypeptidase identifiées plus récemment, aucune ne semble correspondre à une enzyme de la voie de sécrétion régulée. Ainsi, bien que la carboxypeptidase Z (CPZ) entre dans la voie de sécrétion régulée lorsqu'elle est exprimée dans des cellules qui possèdent des SGs, sa distribution tissulaire très répandue ne suggère pas une fonction spécifique dans les tissus neuroendocriniens (Song et Fricker, 1996). De plus l'activité de la CPZ est indétectable à un pH de 5.5 et semble plus élevée à pH neutre, ce qui indique que cette carboxypeptidase n'est pas fonctionnelle dans les SGs (Song et Fricker, 1997). Il a récemment été observé que la CPZ se trouvait associée à la matrice extracellulaire de plusieurs tissus, ce qui suggère que la CPZ serait active principalement après sa sécrétion (Novikova et al., 2000). Au contraire de la CPZ, la carboxypeptidase D (CPD) démontre une activité importante dans des conditions de pH acide, à des valeurs se situant entre 5 et 6, mais sa localisation intracellulaire indique que la CPD se trouve principalement au niveau du TGN (Varlamov et al., 1999). De plus, la CPD possède une région transmembranaire et un segment cytosolique en C-terminal, qui comporterait des motifs induisant son recyclage de la membrane plasmique au TGN (Eng et al., 1999). De nouvelles carboxypeptidases de la voie de sécrétion régulée sont donc toujours susceptibles d'être identifiées.

1.7.3 Amidation en carboxy-terminal

La maturation des précurseurs en peptides hormonaux et neuronaux comporte souvent une étape d' α -amidation du résidu en C-terminal, qui génère un peptide se terminant par un groupement amide non-ionisable (Eipper et al., 1992). Dans plusieurs cas, cette modification est essentielle à l'activité biologique, en augmentant la résistance du peptide à la dégradation ou l'affinité pour son récepteur. Les peptides qui subissent l'amidation comportent un résidu glycine en C-terminal, précédé du résidu qui devient amidé. Le motif consensus d'amidation dans la séquence du précurseur est donc défini par X-G-B-B (où X est tout acide aminé et B, tout acide aminé basique). Cette réaction est catalysée par la peptidylglycine α -amide monooxygénase (PAM), une enzyme bi-fonctionnelle comprenant deux domaines

catalytiques qui agissent séquentiellement : une monooxygénase (PHM) convertit le peptidylglycine en peptidyl α -hydroxyglycine puis une lyase (PAL) complète la réaction en générant le peptide amidé et le glyoxylate (Eipper et al., 1992). Des formes variées de la PAM sont produits par épissage alternatif à partir d'un seul gène, dans différents tissus. La PAM est co-localisée avec plusieurs peptides hormonaux et neuropeptides dans les tissus neuroendocriniens, bien que son expression ne soit pas restreinte à ces tissus et semble particulièrement abondante dans les oreillettes du coeur (Eipper et al., 1992).

La PAM fournit par ailleurs un modèle intéressant de protéine membranaire qui se trouve ciblée vers la voie de sécrétion régulée. Des études *in cellulo* ont montré que le clivage endoprotéolytique de PAM dans les SGs générait la forme soluble de PHM, de faibles niveaux de la forme soluble de PAL et une majorité de la forme membranaire de PAL. Une proportion importante de PAM non-clivée est sécrétée et recyclée de la membrane plasmique vers le TGN où une accumulation de la protéine est observée. Exprimées sous leur forme soluble, PHM et PAL sont indépendamment capables d'induire leur ciblage vers les SGs (Milgram et al., 1994). La délétion du segment cytoplasmique (en conservant le segment transmembranaire) résulte cependant en une forme de la PAM qui est moins bien clivé en PAL et PHM et qui s'accumule à la membrane plasmique. (Milgram et al., 1993). D'autre part, ce segment cytosolique cause l'internalisation d'une protéine de fusion et son recyclage de la membrane au TGN (Milgram et al., 1996). Ces résultats indiquent donc que les interactions dans la lumière du TGN et des ISGs sont responsables de l'envoi de la protéine membranaire vers les SGs alors que de l'information dans la séquence cytoplasmique induit l'internalisation de la protéine parvenue à la membrane plasmique et son retour au TGN.

1.8 Mécanisme de la sécrétion régulée

1.8.1 Machinerie d'ancrage et de fusion des granules de sécrétion à la membrane

La stimulation de la sécrétion régulée dans la plupart des types cellulaires (neurones, cellules endocrines ou exocrines) provoque généralement une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} libre, via l'ouverture de canaux calciques ou la libération des réserves intracellulaires de Ca^{2+} du RE et même des SGs (Clapham, 1995), (Gerasimenko et al., 1996). Cette élévation du Ca^{2+} libre induit soit une dégranulation partielle, comme pour l'ensemble des cellules neuroendocrines qui ne relâchent qu'une partie de leurs SGs, soit une dégranulation complète telle qu'observée avec les mastocytes (Arvan et Castle, 1998). Le processus de dégranulation implique l'induction de la fusion des membranes des SGs ancrés à la membrane plasmique via un complexe SNARE spécifique aux SGs (Hansen et al., 1999). Le mécanisme par lequel la fusion des membranes est couplée à l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire demeure incertain mais plusieurs protéines sensibles au Ca^{2+} récemment identifiées, pourraient jouer des rôles clé dans le déclenchement de la dégranulation. La synaptotagmine, une protéine transmembranaire des vésicules synaptiques, agirait ainsi dans la sécrétion régulée de neurotransmetteurs possiblement en contribuant au recrutement des protéines nécessaires à la fusion des membranes (Sudhof et Rizo, 1996). La synaptotagmine démontre en effet la capacité de lier la syntaxine de même que SNAP-25 (des composantes du complexe SNARE synaptique) et cette association est modulée par la concentration en Ca^{2+} . Différents isoformes de la synaptotagmine ont été identifiés et, bien que la plupart exhibe une expression prédominante dans les tissus neuronaux (Butz et al., 1999), certains semblent être exprimés au moins faiblement dans d'autres tissus. Ainsi, les isoformes I et II de la synaptotagmine ont été localisés dans le pancréas, au niveau des granules à insuline dont ces isoformes semblent contrôler la sécrétion modulée par l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire (Lang et al., 1997).

La syncolline est une autre protéine qui lie le Ca^{2+} et qui est associée aux membranes des SGs. Elle est plus particulièrement, enrichie dans la fraction membranaire des SGs exocrines du pancréas. Les caractéristiques de la syncolline indiquent que cette protéine pourrait jouer un rôle central dans le déclenchement de l'exocytose. En effet, la syncolline inhibe la fusion des SGs avec la membrane plasmique *in vitro* et l'augmentation du Ca^{2+} permet de lever cette inhibition (Edwardson et al., 1997). De plus, la syncolline s'associe à la syntaxine à des concentrations faibles en Ca^{2+} et s'en dissocie à des concentration plus élevées, suggérant que la répression de la sécrétion des SGs en absence de stimuli, implique l'interaction directe de la syncolline avec la machinerie de fusion.

Les étapes finales de la plupart des événements de sécrétion régulée impliqueraient également des isoformes de la famille des GTPases Rab3 (Novick et Zerial, 1997). Les membres de la famille des Rab3 sont associés aux vésicules synaptiques ainsi qu'aux SGs des cellules endocrines. Plusieurs résultats indiquent que la Rab3a activée agirait comme un inhibiteur de la sécrétion. La surexpression d'une forme de Rab3a constitutivement active inhibe la relâche de SGs des cellules chromaffines alors que la diminution de l'expression de Rab3a augmente le potentiel des cellules à répondre à des stimulations répétées (Johannes et al., 1994). De plus, chez des souris dont le gène de Rab3a a été inactivé, le nombre d'événements de fusion des vésicules synaptiques se produisant en réponse à un influx nerveux est accru (Geppert et al., 1997). Le mécanisme du contrôle de la sécrétion par Rab3a n'a pas encore été établi mais la rabphiline a été identifiée comme l'une de ses protéines effectrices. Contrairement à Rab3, la surexpression de la rabphiline dans des cellules chromaffines augmente la sécrétion régulée (Schluter et al., 1999). La localisation de la rabphiline à la surface cytoplasmique des vésicules synaptiques et sa capacité à interagir avec l' α -actinine a permis de suggérer que le recrutement de la rabphiline induisait le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire à l'exocytose des vésicules (Pfeffer, 1999). Le rôle de la rabphiline dans la sécrétion régulée demeure cependant incertain puisque l'inactivation du gène chez la souris ne cause aucune perturbation dans les propriétés de la transmission synaptique (Schluter et al., 1999).

De plus, Rab3a comporte un domaine de liaison à la calmoduline distinct de son domaine de liaison à la rabphiline et requis pour l'inhibition de la sécrétion induite par Rab3a (Coppola et al., 1999). Il a été suggéré que l'ampleur de la dégranulation serait déterminée par un complexe formé de la calmoduline (liée au Ca^{2+}) et de Rab3a, qui agirait comme intermédiaire dans l'inhibition de l'exocytose (Coppola et al., 1999).

1.8.2 Exocytose régulée des lysosomes

La sécrétion régulée de protéines ne semble pas être une caractéristique stricte des SGs et des vésicules synaptiques. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence une exocytose régulée, suite à l'élévation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire libre, dans différents types de cellules qui ne contiennent pas de SGs. Les résultats de différentes approches expérimentales, dont le dosage d'enzymes lysosomiales dans le milieu de sécrétion, suggèrent que les organelles impliquées dans l'exocytose sont des lysosomes (Rodriguez et al., 1997). Entre 10% et 20 % de la population de lysosomes d'une cellule serait disponible pour la sécrétion régulée. La synaptotagmine VII a récemment été impliquée dans la régulation de l'exocytose des lysosomes par des fibroblastes (Martinez et al., 2000). Ce type de sécrétion pourrait jouer un rôle important dans la réparation de déchirures à la membrane plasmique en permettant de sceller la membrane endommagée (Coorssen et al., 1996).

L'hypothèse voulant que la sécrétion soit une propriété générale des lysosomes demeure controversé bien que des résultats récents suggèrent qu'il n'existerait pas de lysosomes spécialisés dans la sécrétion (Martinez et al., 2000). Cependant dans certains types cellulaires, telles que des cellules de lignées hémoïétiques, la proportion de lysosomes relâchés suite à l'influx de calcium (jusqu'à 60% de la population d'une cellule) semble particulièrement élevée, d'où la dénomination de lysosomes de sécrétion (Stinchcombe et Griffiths, 1999). Dans les mastocytes, différents isoformes de la synaptotagmine semblent s'associer sélectivement avec deux populations différentes de lysosomes : la synaptotagmine I co-fractionne avec les lysosomes de sécrétion qui contiennent l'histamine et la sérotonine ainsi que

plusieurs enzymes lysosomiales, alors que la synaptotagmine II se trouve associée aux lysosomes dépourvues d'amines vasoactives (Baram et al., 1999). Certaines observations sur le syndrome Chediak-Higashi, une maladie autosomale récessive, viennent aussi étayer l'hypothèse voulant que les lysosomes de sécrétion soient fonctionnellement distinguables des lysosomes conventionnels. Alors que le syndrome Chediak-Higashi cause un élargissement des lysosomes dans toutes les cellules, la plupart des défauts associés à cette maladie résulte d'un dysfonctionnement des cellules qui possèdent des lysosomes de sécrétion (Stinchcombe et Griffiths, 1999). C'est le cas des lymphocytes T cytotoxiques dont la fonction altérée résulte en une sensibilité accrue aux infections chez les personnes atteintes du syndrome (Baetz et al., 1995).

1.9 Sécrétion régulée de la rénine

1.9.1 Fonction et sécrétion de la rénine

La rénine est une aspartyl protéase qui catalyse l'étape limitante du système rénine-angiotensine impliqué dans la régulation de la pression sanguine systémique. La rénine clive son unique substrat, l'angiotensinogène, ce qui génère l'angiotensine I, un peptide de dix acides aminés. Deux acides aminés en C-terminal du decapeptide sont ensuite enlevés par l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour générer l'angiotensine II (Ang II). L'Ang II induit une augmentation de la pression sanguine via la constriction des vaisseaux périphériques et la stimulation de la sécrétion d'aldostérone par la glande surrénale. L'aldostérone augmente l'excrétion d'ions potassium par les reins et conséquemment, la réabsorption d'ions sodium et d'eau, ce qui contribue à l'augmentation du volume plasmatique et de la pression.

Le rein est le site de la synthèse, du stockage et de la sécrétion régulée de la rénine. Ces fonctions sont remplies par des cellules spécialisées du rein, les cellules juxtaglomérulaires (JGs), localisées dans l'artériole afférente à l'entrée du glomérule

et dérivées des cellules musculaires lisses de l'artériole (Taugner et Hackenthal, 1988). La différenciation de ces cellules en cellules JGs impliquerait la perte de certaines caractéristiques des cellules musculaires lisses, dont la formation de myofilaments, parallèlement à l'acquisition de SGs. De façon remarquable, la distribution intrarénale de la rénine change dans certaines conditions physiologiques où la stimulation de la sécrétion de la rénine est prolongée. En effet, la déplétion en sel et l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, provoquent une transformation réversible des cellules musculaires lisses en cellules productrices de rénine, au niveau l'artériole afférente en amont du glomérule (Gomez et al., 1990).

Le contrôle de la sécrétion de la rénine par les cellules JGs s'effectue via plusieurs mécanismes homéostatiques dont l'activité sympathique, plus particulièrement l'activité β -adrénergique, la concentration plasmatique de l'Ang II, la pression systémique et la concentration en sel (Wagner et Kurtz, 1998). Cette régulation implique la macula densa qui est composée de cellules modifiées du tubule distal adjacent au glomérule rénal et qui signale aux cellules JGs les changements dans la concentration en sel au niveau du filtrat du tubule. L'existence de barorécepteurs intra-rénaux a été proposée de longue date pour rendre compte du contrôle de la sécrétion par la pression de perfusion du rein. Une hausse de la pression causerait un étirement mécanique des cellules JGs ou des cellules endothéliales qui tapissent la paroi de l'artériole afférente et qui sont bordées par les JGs, résultant en l'inhibition de la sécrétion de la rénine (Carey et al., 1997).

La plupart des études sur le contrôle de la sécrétion de la rénine ont été réalisées sur des reins perfusés, des coupes de cortex rénal, des glomérules isolés avec l'artériole afférente attachée ou des préparations de cellules JGs, qui comprennent des cellules glomérulaires. Ces modèles ne permettent donc pas de caractériser les changements qui se produisent spécifiquement dans les cellules JGs en réponse aux stimuli, en distinguant les influences des cellules localisées à proximité des JGs, telles que les cellules mésangiales, endothéliales ou musculaires lisses (Pinet et al., 1987). Plusieurs groupes ont tenté de développer un modèle de cellules JGs en culture (Pinet

et al., 1985), (Sigmund et al., 1990), (Laframboise et al., 1997) (voir l'Annexe 1), mais aucun ne semble conserver la capacité de produire de la rénine active à partir de son précurseur, la prorénine. Les conclusions sur le contrôle de la relâche de la rénine par les cellules JGs avancées par l'ensemble de ces études demeurent donc incertaines. Il est néanmoins généralement proposé que l'AMP cyclique (AMPc) et le Ca^{2+} représentent les deux principaux intermédiaires dans la sécrétion régulée de la rénine et consistent respectivement en un stimulateur et un inhibiteur de la sécrétion. L'AMPc et le Ca^{2+} agiraient par des voies indépendantes mais l'effet inhibiteur de la hausse du Ca^{2+} intracellulaire sur la sécrétion pourrait être prédominante vis-à-vis de l'effet stimulateur de la hausse de l'AMPc (Pinet et al., 1987). La fonction inhibitrice du Ca^{2+} sur la sécrétion régulée de la rénine contraste donc avec la plupart des événements d'exocytose qui sont généralement déclenchés par l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire.

1.9.2 Caractéristiques des cellules juxtaglomérulaires

L'analyse ultrastructurale des cellules JGs suggère une séquence d'événements menant à la synthèse de la rénine active à partir de son précurseur, la prorénine (Figure 1-5). La première étape dans la formation des granules à rénine est le bourgeonnement des protogranules à partir du TGN. Lorsque visualisés par microscopie électronique, les protogranules apparaissent souvent fusiformes et des études immunohistochimiques indiquent que leur contenu paracrystallin serait composé de prorénine. La formation de granules immatures se produirait par fusion des protogranules. La condensation progressive du contenu des granules immatures résulte en la formation de granules matures denses au microscope. Des études immunohistochimiques ont par ailleurs montré que l'immunoréactivité de la rénine mature augmentait parallèlement à la condensation du contenu des granules alors, que celle de son prosegment déclinait jusqu'à devenir indétectable au niveau des granules matures (Taugner et al., 1987). Ces observations indiquent que la maturation de la prorénine se produirait principalement dans les granules immatures. De plus, comme une concentration importante de prorénine se retrouve dans la circulation, il est

probable qu'une sécrétion basale des protogranules ou des granules immatures se produit.

Des observations sur la morphologie des cellules JGs ont permis de mettre en évidence plusieurs ressemblances entre les granules à rénine de ces cellules et les lysosomes. L'autophagie d'organelles par les lysosomes résultent en la formation d'inclusions multilamellaires, dues aux membranes internalisées. Cette caractéristique ultrastructurale typique des lysosomes n'est pas observée dans les SGs des cellules endocrines mais se retrouvent souvent dans les granules à rénine des cellules JGs (Taugner et al., 1988). Plusieurs études ont montré que l'ensemble des granules à rénine contenait des enzymes lysosomiales dont la phosphatase acide et la cathepsine B, et que des lysosomes distincts des granules à rénine n'étaient pas identifiables dans les JGs (Taugner et al., 1985). L'indication la plus frappante de la nature lysosomiale des granules à rénine vient cependant de l'étude des souris beiges, qui sont atteintes d'une maladie équivalente au syndrome Chediak-Higashi retrouvé chez l'humain. Comme l'ensemble des lysosomes élargis qui caractérisent cette affection, les granules à rénine sont au moins cinquante fois plus volumineux que dans des cellules JGs normales. De plus, la concentration en rénine plasmatique est réduite de moitié par rapport à des souris contrôles, suggérant que la sécrétion des granules à rénine est déficiente chez les souris beiges, un défaut qui caractérise également les lysosomes de sécrétion (Jensen et al., 1997), (Stinchcombe et Griffiths, 1999).

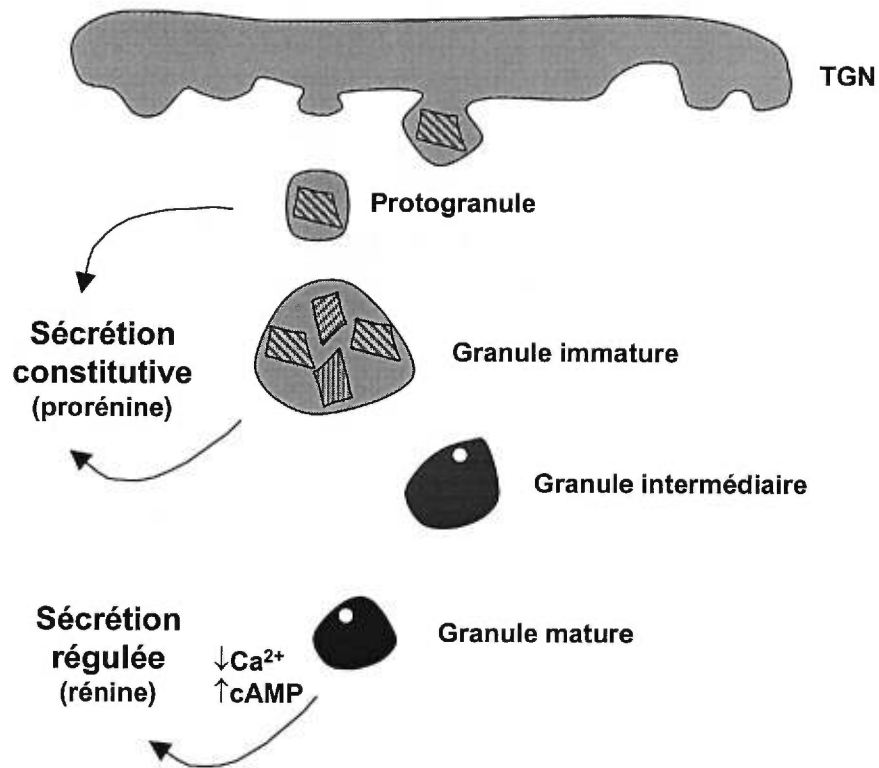


Figure 1-5. Représentation de la morphologie ultrastructurale de la voie de sécrétion régulée des cellules juxtaglomérulaires. La prorénine est présente dans les protogranules et les granules qui pourraient donner lieu à la sécrétion constitutive de la prorénine. La sécrétion régulée est induite par la diminution et l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ et en cAMP, respectivement. (Adaptée de Reudelhuber et al., 1993)

1.9.3 Modifications post-traductionnelles et maturation de la prorénine

Chez l'humain et le rat, il n'existe qu'un seul gène encodant la rénine. Chez la souris cependant, alors que certaines lignées n'ont qu'une seule rénine (rénine-1), d'autres lignées expriment deux types de rénine (rénine-1 et rénine-2) à partir de loci différents (Griendling et al., 1993). En plus d'être exprimée dans le rein, la rénine-2 se trouve en abondance dans la glande sous-maxillaire, d'où sa désignation comme rénine de la glande sous-maxillaire. À l'image de l'ensemble des protéines sécrétées, la prorénine est synthétisée avec un peptide signal qui assure l'insertion de la protéine dans le RE où le peptide signal est clivé. À l'exception de la prorénine-2 qui ne comporte pas de sites potentiels de glycosylation, la prorénine caractérisée chez différentes espèces est N-glycosylée. Ces oligosaccharides peuvent être modifiés de diverses façons ce qui produit différents glycoformes de la protéine. Une fraction (environ 5%) de la prorénine humaine néo-synthétisée comporte des résidus mannose 6-phosphate capable de lier les MPRs, indiquant un mécanisme potentiel de ciblage de la prorénine vers les lysosomes. Cependant, si ce pourcentage est le même dans les cellules JGs, ce mécanisme ne pourrait rendre compte du ciblage quantitatif de la prorénine néo-synthétisée vers les granules à rénine de ces cellules (Faust et al., 1987).

La maturation de la prorénine implique le clivage du prosegment qui se produit probablement dans les granules immatures des JGs pour générer de la rénine active (Figure 1-6). Le séquençage de l'extrémité N-terminale d'une préparation de rénine purifiée de reins humains indique que le site de clivage du prosegment suivrait un doublet d'acides aminés basiques (Do et al., 1987). Le clivage du prosegment de la prorénine-2 dans les glandes sous-maxillaires se produirait à un site analogue (Misono et al., 1982), mais dans un compartiment plus précoce de la voie de sécrétion, probablement au niveau du Golgi (Pratt et al., 1983). Cependant, ce site de clivage ne semble pas être conservé chez les autres espèces pour lesquelles la séquence de la rénine est connue. Ainsi, le séquençage de l'extrémité N-terminale de la rénine de rat indique un site de clivage suivant un résidu thréonine situé à quelques

acides aminés en C-terminal du doublet de résidus basiques (Kim et al., 1991). Dans le cas de la prorénine-1, bien que le résidu qui forme l'extrémité N-terminale de la rénine ne soit pas connu, le doublet homologue dans sa séquence est suivi d'un résidu proline et représente donc un site de clivage peu probable, considérant l'inefficacité de la plupart des protéases à cliver un site précédant cet acide aminé. Un clivage interne additionnel dans la rénine de rat et dans la rénine-2 se produit dans les cellules JGs et forme des protéines à deux chaînes reliées par un pont disulfure (Campbell et al., 1991). L'identité de l'enzyme responsable du clivage de la prorénine dans les cellules JGs n'a pas été établie avec certitude. La diversité des sites de clivage potentiels indiquent cependant que différentes maturases pourraient remplir cette fonction chez différentes espèces.

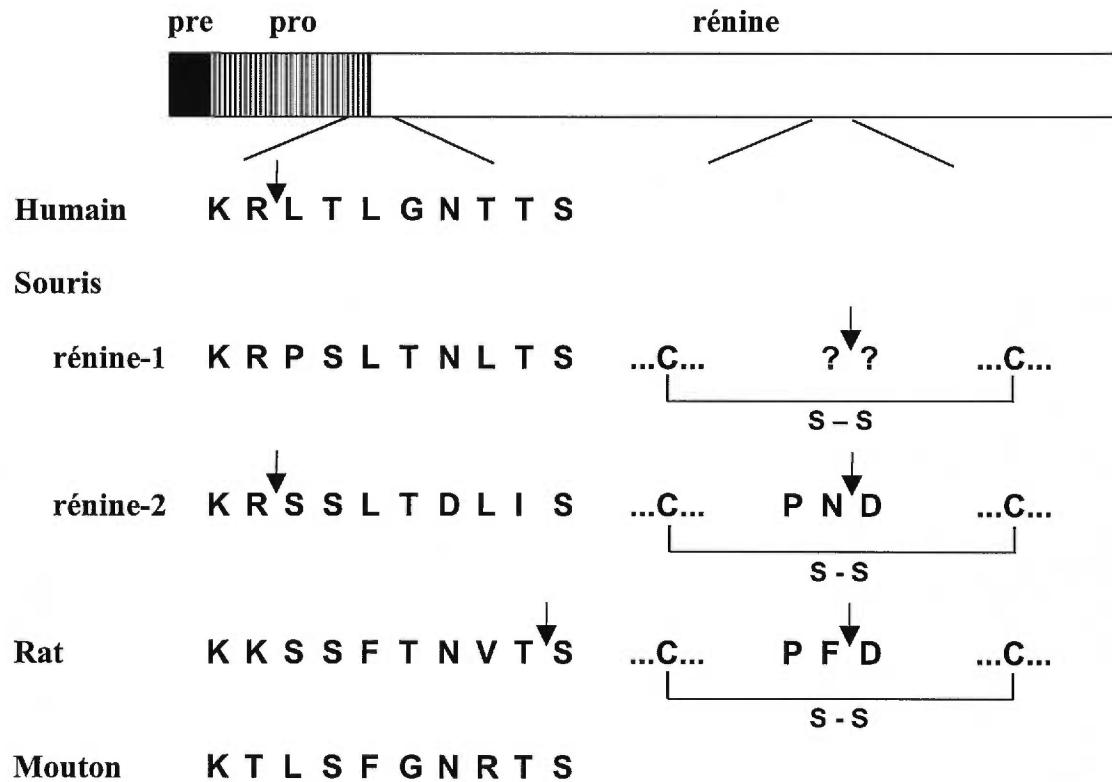


Figure 1-6. Représentation des sites de clivage de la prorénine chez différentes espèces. Un seul site de clivage (\downarrow) est présent dans la prorénine humaine. La prorénine-2 chez la souris et la prorénine de rat subissent un clivage interne qui génère une protéine à deux chaînes reliées par un pont disulfure (S-S). Les sites de clivage de la prorénine-1 et de la prorénine de mouton ne sont pas connus mais plusieurs résidus dans la séquence analogue ne semblent pas conservés. (Adaptée de Reudelhuber et al, 1993)

1.9.3.1 Enzymes de maturation de la prorénine

L'observation que le site de clivage de la prorénine humaine suivait un doublet de résidus basiques a permis d'imaginer un rôle des proprotéine convertases dans ces événements de maturation. Bien que la séquence autour du site de clivage du prosegment, qui comporte un résidu proline en position P4, ne constitue pas une séquence consensus de clivage reconnue par l'ensemble des membres de la famille des PCs, la convertase PC1 mature la prorénine de manière efficace *in cellulo* (Benjannet et al., 1992). De façon remarquable, alors que la prorénine humaine comporte six doublets de résidus basiques, un seul est spécifiquement utilisé comme site de clivage. L'effet de la mutation ponctuelle des résidus autour du site de clivage suggère que la proline en position P4 confère une structure au prosegment qui est nécessaire au clivage par PC1 et qui détermine en partie le choix de ce site par PC1 (Chu et al., 1992). De plus, des études de co-transfection dans différents types cellulaires ont montré que cette activité de maturation se produisait spécifiquement dans des cellules qui contiennent des SGs (Benjannet et al., 1992), vers lesquels la prorénine et PC1 sont toutes les deux ciblées (Fritz et al., 1987), (Zhou et al., 1995). Dans un essai cellulaire semblable, PC2 ne démontre aucune activité de clivage de la prorénine humaine (Benjannet et al., 1992). La prorénine humaine avec son site de clivage unique, constitue donc un modèle de substrat intéressant pour l'étude de l'activité de PC1 dans la voie de sécrétion régulée (Jutras et al., 1997). Cependant, la distribution cellulaire de PC1 ne concorde pas avec un rôle de cette convertase comme enzyme de maturation de la prorénine humaine dans le rein. PC1 n'est d'ailleurs pas exprimée dans un modèle de cellules JGs en culture (Laframboise et al., 1997) (voir l'Annexe 1). Une autre PC capable de cliver le prosegment de la prorénine humaine, quoique de manière moins efficace que PC1, est la convertase PC5-A (Mercure et al., 1996). Chez l'humain, PC5-A est co-localisée avec la rénine dans le cortex surrénalien mais ne se retrouve pas dans les cellules JGs (Mercure et al., 1996). Au contraire chez la souris, PC5-A active faiblement la prorénine-2 dans des essais de co-transfection (Nakagawa et al., 1993) et son transcrite est abondant dans un modèle de cellules JGs en culture (Laframboise et al., 1997), indiquant un

rôle possible de PC5-A dans la maturation de la prorénine-2 dans le rein. L'essentiel des résultats avec PC5-A sera présenté au chapitre 4 et en annexe 1 de cette thèse.

La caractérisation biochimique d'un lysat de glandes sous-maxillaires a permis d'identifier une enzyme nommée PRECE capable de maturer la prorénine-2 dans ce tissu, bien que cette enzyme semble incapable de catalyser le clivage interne de la rénine de souris (Kim et al., 1990a). PRECE, un membre de la famille des kallikréines glandulaires, ne clivent cependant pas le prosegment de la prorénine-1 ou celui de la prorénine humaine (Kim et al., 1990a), (Kim et al., 1991b). En utilisant une approche similaire, la cathepsine B a été identifiée comme une enzyme capable de maturer la prorénine humaine dans le rein (Wang et al., 1991). La cathepsine B a ainsi été postulée comme maturase rénale de la prorénine sur la base de sa co-localisation avec la rénine dans les cellules JGs et sa capacité à cliver le prosegment à la fois *in vitro*, avec une affinité de l'ordre du nanomolaire (Wang et al., 1991), et *in cellulo* (Neves et al., 1996). La maturation de la prorénine humaine par la cathepsine B est un des principaux sujets d'étude de cette thèse, qui sera traité plus en détail au chapitre 5.

1.10 Distribution tissulaire de l'expression de la rénine

La rénine active présente dans la circulation provient principalement sinon exclusivement du rein. En effet, deux jours après une néphrectomie bilatérale, la rénine est indétectable dans le plasma (von Lutterotti et al., 1994). De nombreux tissus autres que les reins semblent cependant en mesure de synthétiser de la prorénine, qui demeure d'ailleurs mesurable dans la circulation longtemps après la néphrectomie. La prorénine ou son transcrite ont été détectés notamment dans l'hypophyse, la glande surrénale, les vaisseaux, les gonades et le coeur, bien que la prorénine cardiaque soit probablement captée de la circulation (von Lutterotti et al., 1994), (Paul et al., 1993). Malgré le fait que ces tissus ne contribuent probablement pas de façon significative à la concentration de rénine dans la circulation, il est

possible que suffisamment de rénine active puisse être produite localement pour jouer un rôle dans la génération locale d'angiotensines. Une autre possibilité est que la prorénine, bien qu'elle soit inactive dans la circulation, parvienne à générer de l'Ang II dans les tissus, tel que démontré par l'expression transgénique de la prorénine humaine dans l'hypophyse (Methot et al., 1999). L'hypothèse de l'existence de systèmes rénine-angiotensine locaux est supportée par la présence, dans plusieurs de ces tissus, des composantes du système dont l'angiotensinogène, l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les récepteurs de l'Ang II (Griendling et al., 1993). Le rôle de ces systèmes rénine-angiotensine locaux demeure incertain mais il est facile d'imaginer l'importance que pourrait avoir des effets paracrines de l'Ang II sur le contrôle de la sécrétion d'aldostérone dans la glande surrénale, par exemple. À ce sujet, PC5-A a été identifiée comme une enzyme de maturation potentielle de la prorénine humaine dans ce tissu (Mercure et al., 1996) dans une étude qui sera présentée au chapitre 4.

1.11 Objectifs de la thèse

Alors que les proprotéines néo-synthétisées traversent les compartiments précoces de la voie de sécrétion en compagnie de la convertase PC1, ce n'est que rendues dans les granules de sécrétion que leur maturation par PC1 est la plus manifeste. Nous avons donc cherché à comprendre le mode de contrôle de l'activité de PC1 dans la voie de sécrétion en amont des granules. La prorénine humaine représente un modèle idéal pour cette étude : le clivage du prosegment par PC1 se produit à un site unique, spécifiquement dans les granules de sécrétion et génère de la rénine active facilement mesurable. D'autre part, l'activité de maturation par PC1 dans les granules de sécrétion implique un mécanisme capable d'assurer le transport de PC1 vers ce compartiment. Un deuxième objectif a donc été de déterminer les régions de PC1 capables d'induire son ciblage aux granules et les caractéristiques biochimiques de ces régions, susceptibles d'être impliquées dans ce processus. Par ailleurs, dans un effort pour caractériser des enzymes de maturation physiologiques de la prorénine humaine, nous avons entrepris de cloner la forme humaine de PC5-A et d'analyser d'une part, sa capacité à cliver le prosegment dans la voie de sécrétion régulée et d'autre part, sa localisation dans les tissus producteurs de rénine active. Enfin, nous avons voulu aborder la spécificité de clivage de la prorénine humaine par la cathepsine B, une enzyme lysosomiale proposée comme maturase de la prorénine dans le rein, à la fois *in vitro* et dans un modèle de cellules capables de sécrétion régulée.

CHAPITRE 2

ARTICLE

**Two Activation States of the Prohormone Convertase PC1
in the Secretory Pathway**

Isabelle Jutras, Nabil G. Seidah, Timothy L. Reudelhuber, Véronique Brechler

Laboratoires de Biochimie Moléculaire de l'Hypertension et de Biochimie
Neuroendocrinienne, Institut de Recherches Cliniques de Montréal

The Journal of Biological Chemistry. 1997; 272: 15184-15188.

Two Activation States of the Prohormone Convertase PC1 in the Secretory Pathway*

(Received for publication, March 3, 1997, and in revised form, April 14, 1997)

Isabelle Jutras‡, Nabil G. Seidah§, Timothy L. Reudelhuber‡¶||, and Véronique Brechler‡**

From the ‡Laboratories of Molecular Biochemistry of Hypertension and §Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal (IRCM), Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

PC1, a neuroendocrine member of the prohormone convertase family of serine proteinases, is implicated in the processing of proproteins in the secretory pathway. PC1 is synthesized as a zymogen and cleaves not only its own profragment in the endoplasmic reticulum, but a subset of protein substrates in the Golgi apparatus and in the Golgi-distal compartments of the regulated secretory pathway. Likewise, mouse PC1 (mPC1) has previously been shown to cleave human prorenin in GH4 cells (that contain secretory granules) while being unable to cleave prorenin in cells, such as Chinese hamster ovary (CHO) or BSC-40, which are devoid of secretory granules. In the current study, we show that removal of a C-terminal tail of mPC1 allows the efficient cleavage of prorenin in the constitutive secretory pathway of CHO cells. The C-terminal tail thus appears to act as an inhibitor of PC1 activity against certain substrates in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and its removal, which occurs naturally in secretory granules, may explain the observed granule-specific processing of certain proproteins. These results also demonstrate that PC1 is present in a partially active state prior to the secretory granules where it is processed to a maximally active state.

Proprotein convertases are serine proteinases that cleave their substrates at specific basic amino acids (1, 2). They share a common domain structure: an N-terminal signal peptide followed by a profragment region, a conserved subtilisin-like catalytic domain, a conserved domain of unknown function named P-domain, and a divergent C-terminal tail. They are differently distributed in tissues and show maximal activity in different cellular compartments. For instance, furin, PACE4, PC5-B, and PC7 are active in the constitutive secretory pathway, whereas PC1 (also named SPC3), PC2, and PC5-A are preferentially expressed in endocrine and neuroendocrine tissues where they are thought to process prohormones in the secretory granules of the regulated secretory pathway (1–4). PC1 has been implicated in the processing of many proproteins including proopiomelanocortin (POMC)¹ and proinsulin.

Whereas proinsulin is only cleaved in secretory granules (5), the processing of POMC begins in the trans-Golgi network (TGN) (6–8), clearly demonstrating that PC1 can be active prior to entering secretory granules. Following its synthesis as a 753-amino acid zymogen (9, 10), PC1 undergoes an autocatalytic intramolecular processing of its N-terminal profragment in the endoplasmic reticulum, resulting in an 87-kDa enzyme (11, 12). This 87-kDa form is targeted to the regulated secretory pathway where it is further shortened by removal of 135 amino acids of its C-terminal tail leading to a 66-kDa form (11–14). The C-terminal cleavage occurs at the dibasic Arg-Arg^{617–618} site (15), possibly by an autocatalytic event (15, 16). The C-terminal tail has been proposed to play a role in sorting of PC1 to the regulated secretory pathway (17), but its exact role on PC1 activity is still poorly understood.

Prorenin is an inactive precursor that is sorted to secretory granules where it is converted to active renin by a unique proteolytic cleavage at a specific pair of basic amino acids (Lys-Arg^{42,43}), resulting in the removal of a 43-amino acid profragment (18–20). Cotransfection of expression vectors for mouse PC1 (mPC1) and human prorenin in cells that contain secretory granules (GH4 cells) leads to the secretion of active renin in the medium (21). In contrast, co-expression of prorenin and mPC1 in cells that are devoid of secretory granules (CHO or BSC-40 cells) does not lead to active renin secretion, suggesting that the environment of the secretory granules is essential for prorenin processing by mPC1 (21). Previous results have shown that the kinetics of the N-terminal prosegment cleavage of mPC1 are similar in the two cell types (21), raising the possibility that the granule dependence of prorenin processing is due to additional granule-induced modifications on prorenin and/or mPC1.

Because of its unique PC1 cleavage site and its granule-dependence for activation, we have used human prorenin as a model to understand how PC1 discriminates between substrates to be cleaved in the early (TGN) and late (secretory granules) compartments of the secretory pathway. Our results suggest that the C-terminal tail of mPC1 has an inhibitory effect on PC1 activity in the constitutive secretory pathway and that the removal of this C-terminal tail in secretory granules is necessary for efficient prorenin processing.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Recombinant Plasmid Construction—Construction of the expression vector for native human prorenin (Proren, also referred to as pRhr1100) under the control of the Rous sarcoma virus promoter/enhancer has been described previously (22). The mutation of lysine to alanine in the native Lys-Arg^{42,43} cleavage site at the junction of the profragment and the renin moiety (Proren-K/A^{42–43} (19); numbering rel-

* This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension and Grant PG 11474 (to N. G. S.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ Recipient of the Merck-Frosst Chair in Molecular and Clinical Pharmacology.

|| To whom correspondence should be addressed: Laboratory of Molecular Biochemistry of Hypertension, IRCM, 110 Pine Ave. West, Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7. Tel.: 514-987-5716; Fax: 514-987-5717; E-mail: reudelt@ircm.umontreal.ca.

** Recipient of a Medical Research Council of Canada fellowship.

¹ The abbreviations used are: POMC, proopiomelanocortin; TGN,

trans-Golgi network; mPC1, mouse PC1; CHO, Chinese hamster ovary; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; mPC1-Cterm, C-terminal tail of mPC1; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis.

ative to amino acid 1 of the prosegment) was carried out by overlap extension polymerase chain reaction (23).

The cDNA for mPC1 (9) was inserted in the expression vector pRSV-globin (22). Site-directed mutagenesis of the C-terminal tail of mPC1 (Fig. 1) was carried out using the following oligonucleotides: mPC1- Δ C (converts Arg⁶¹⁷ to a stop codon), 5'-CGGGATCC CTA GTC ATT CTG GAC TG-3' (antisense primer; generation of a stop codon (underlined) and a *Bam*HI site (bold)); and mPC1-KA⁶¹⁸ (Arg-Arg^{617,618} to Lys-Ala), 5'-G AAT GAC AAG GCA GGA GTG G-3' (sense primer) and 5'-C CAC TCC TGC CTT GTC ATT C-3' (antisense primer).

An expression vector was also generated for the C-terminal tail of mPC1 (see Fig. 1, mPC1-Cterm). A *Bam*HI site was inserted in mPC1 at a site found to correspond to the unique *Bam*HI site of human PC1 (by alignment of both sequences) using the polymerase chain reaction with the following oligonucleotide: 5'-CGGGATCC TGT GGA GAA GCG G-3' (sense primer; *Bam*HI site (bold) and mPC1 sequence starting at Val⁶²⁷).

The expression vector for mPC1 containing the *Bam*HI site was cleaved with *Hind*III and *Bam*HI to delete the N-terminal portion. The coding sequence for the signal peptide followed by 6 amino acids of the prosegment of prorenin was inserted 5' of the C-terminal sequence of mPC1 by a cohesive 5' *Hind*III 3' *Bam*HI ligation to assure effective insertion of the recombinant protein in the endoplasmic reticulum. All recombinant plasmid constructions were verified by sequencing of double-stranded DNA.

Cell Culture—The rat GH4 somatomammotrophic cell line was grown at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal calf serum and 0.1% Serxtend (Irvine Scientific) in a humidified incubator at 5% CO₂, 95% air. CHO cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and 20 μ g/ml proline.

Measurement of Renin and Prorenin—GH4 or CHO cells were plated at a density of 8×10^5 cells in a 6-well dish and were transfected 24 h later with a calcium-phosphate precipitate (300 μ l) containing 2 μ g/ml of the prorenin expression vector and 8 μ g/ml of either the appropriate mPC1 expression vector or a control vector (for transfection experiments with 2 plasmids), or 1 μ g/ml of the prorenin expression vector, 4 μ g/ml of the appropriate mPC1 expression vector, and 5 μ g/ml of the PC1-Cterm expression vector (for transfection experiments with 3 plasmids). In all cases, the control vector consisted of an analogous expression vector, which coded for an inert portion of the mouse immunoglobulin heavy chain constant region (24). Twenty-four h after transfection, the cells were glycerol shocked. After a 16-h secretion period, the supernatants were collected for determination of prorenin and renin levels by the angiotensin I generation assay described previously (19). Briefly, supernatants were incubated with an excess of the renin substrate angiotensinogen either directly (active renin content) or following an incubation with trypsin (total renin content = prorenin + renin). The percentage of active renin was calculated as (active renin content/total renin content) \times 100.

Secretion Kinetics of Active Renin—GH4 cells were plated at a density of 1×10^6 cells in a 6-well dish and were transfected 24 h later with Lipofectin Reagent (Life Technologies, Inc.) using 10 μ g of the prorenin expression vector and 10 μ g of the appropriate mPC1 expression vector. Sixty h after transfection, the cells were depleted of methionine for 1 h, labeled with 300 μ Ci of [³⁵S]methionine/well (pulse), and incubated in complete medium for 15, 30, or 60 min (chase). Culture supernatants were immunoprecipitated with protein G-agarose-coupled anti-human renin antibody as described previously (24). Immunoprecipitated proteins were fractionated by SDS-PAGE (10% acrylamide gel) and gels were subjected to fluorography.

Biosynthetic Labeling of PC1 Proteins—GH4 cells were plated at a density of 8×10^5 cells in a 6-well dish and were transfected 24 h later with a calcium-phosphate precipitate (300 μ l) containing 10 μ g/ml of the appropriate mPC1 expression vector. Twenty-four h after transfection, the cells were glycerol shocked. The next day the cells were depleted of methionine for 1 h in methionine-free DMEM containing 10% dialyzed fetal calf serum and labeled for 2 h with 300 μ Ci of [³⁵S]methionine/well. Culture supernatants were then immunoprecipitated with protein A-Sepharose-coupled anti-N-terminal or C-terminal mPC1 antibody as described previously (11). Immunoprecipitated proteins were fractionated by SDS-PAGE (7.5% acrylamide for mPC1 or related proteins and 12% acrylamide for mPC1-Cterm) and gels were subjected to fluorography.

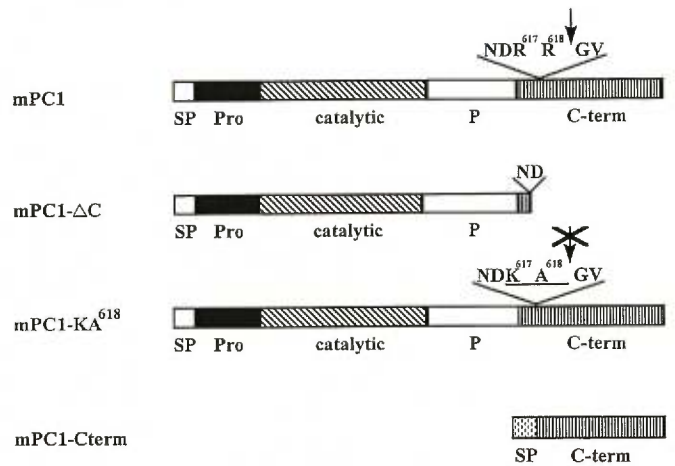


FIG. 1. Schematic representation of native and mutated PC1. Amino acid mutations are underlined. SP, signal peptide; Pro, profragment; catalytic, subtilisin-like catalytic domain; P, P-domain; C-term, C-terminal region. The arrow indicates the site of processing in the C-terminal region, leading to the 66-kDa form.

RESULTS

As shown previously (21), cotransfection of GH4 cells with an expression vector for human prorenin and a control plasmid led to the secretion of inactive prorenin into the medium (see Fig. 2, *prorenin* + *control*), indicating that GH4 cells do not express an endogenous prorenin processing enzyme. In contrast, cotransfection of GH4 cells with expression vectors for both prorenin and mPC1 led to the secretion of about 20% of active renin (see Fig. 2, *prorenin* + *mPC1*) (21). To investigate the dependence of prorenin processing on the secretory granule environment and the role of the C-terminally truncated form of mPC1 in active renin generation, we constructed an expression vector for mPC1 containing a deletion of its C-terminal tail starting at the Arg-Arg^{617,618} cleavage site (Fig. 1, *mPC1-ΔC*). This construct should lead exclusively to the synthesis of the 66-kDa form. Cotransfection of GH4 cells with both prorenin and mPC1- Δ C led to a dramatic increase in the secretion of active renin ($62.6 \pm 2.9\%$ of active renin), suggesting that the absence of the C-terminal tail enhances PC1 activity in prorenin processing. Although mutation of the Arg-Arg^{617,618} cleavage site into the noncleavable Lys-Ala site in the full-length mPC1 (Fig. 1, *mPC1-KA⁶¹⁸*) would have been expected to prevent PC1 activity, transfection of this mutant with prorenin did not significantly decrease prorenin processing activity compared with native mPC1 possibly due to cleavage of the C-terminal tail at alternative dibasic sites (Fig. 4, *mPC1-KA⁶¹⁸*). When mPC1- Δ C was co-expressed with human prorenin mutated at the native profragment cleavage site, no active renin was secreted (Fig. 2, *prorenin-K/A⁴²* + *mPC1-ΔC*), indicating that mPC1- Δ C retained its specificity for the previously reported unique cleavage site at Lys-Arg^{42,43}.

To further investigate the effects of mPC1 and mPC1- Δ C on prorenin processing, pulse-chase experiments were performed on GH4 cells cotransfected with the expression vectors for prorenin and either mPC1 or mPC1- Δ C. Following a 2-h pulse-labeling period with radioactive methionine, the cells were chased by incubation in complete medium for 15, 30, or 60 min. Cell supernatants were immunoprecipitated with an anti-renin antibody and submitted to SDS-PAGE (24). As shown in Fig. 3, while co-expression of mPC1 and prorenin leads to the production of active renin whose relative abundance gradually accumulates over the chase period, the relative amount of active renin generated by mPC1- Δ C has already reached a maximum by the first time point (2 h + 15 min). Thus, removal of the

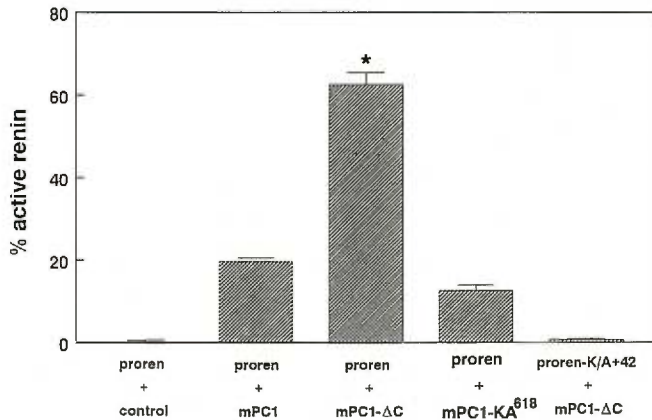


FIG. 2. The absence of the C-terminal tail of mPC1 enhances PC1 activity in prorenin processing in GH4 cells. GH4 cells were cotransfected with expression vectors for the indicated proteins. Overnight supernatants were collected 40 h after transfection and assayed for active renin. Results are expressed as the percentage of active renin (active renin content/total renin content) and represent mean \pm S.E. of three to twelve independent transfections. *, $p < 0.0001$, as compared with proren + mPC1, Student's t test.

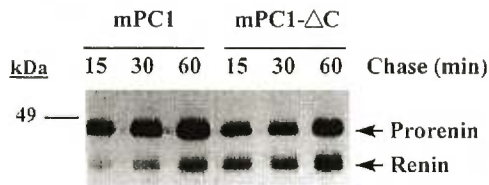


FIG. 3. mPC1-ΔC accelerates the secretion of active renin from GH4 cells. GH4 cells were cotransfected with expression vectors for prorenin and either mPC1 or mPC1-ΔC. Sixty h later, cells were labeled for 2 h with [³⁵S]methionine and chased in complete medium for 15, 30, or 60 min. Chase media were then immunoprecipitated with an anti-renin antibody, and samples were analyzed by SDS-PAGE (10% acrylamide gel). Renin (43 kDa) and Prorenin (47 kDa) represent the predicted size of the two proteins based on co-electrophoresis of molecular weight markers.

C-terminal tail of mPC1 accelerates the generation and secretion of active renin from transfected GH4 cells.

To exclude the possibility that the differences observed in the efficiency of prorenin processing resulted from differential expression of the various mPC1 proteins (mPC1, mPC1-ΔC, and mPC1-KA⁶¹⁸), GH4 cells were transfected with the expression vectors for the mPC1 proteins and were pulse-labeled for 2 h with radioactive methionine. Media were immunoprecipitated with an anti-mPC1 antibody directed against the N-terminal part of the protein (11), and proteins were fractionated by SDS-PAGE. As expected, pro-mPC1 was cleaved to the 87-kDa form (mPC1) and to the 66-kDa C-terminally truncated form that were both secreted in the medium (Fig. 4, mPC1). In contrast, transfection of GH4 cells with mPC1-ΔC resulted in the secretion of the 66-kDa form only. Mutation of the dibasic Arg-Arg^{617,618} site prevented the formation of the 66-kDa form, indicating that the double point mutation was effective in inhibiting the cleavage of the C-terminal tail. However, two minor bands were also detected, probably resulting from alternative cleavages at the Lys-Arg^{629,630} and Arg-Arg^{654,655} dibasic sites (Fig. 4, mPC1-KA⁶¹⁸). Thus, C-terminal processing at these alternative sites results in active mPC1 since mPC1-KA⁶¹⁸ was able to cleave prorenin in GH4 cells (Fig. 2, proren + mPC1-KA⁶¹⁸).

To investigate the role of the C-terminal tail on PC1 activity in the constitutive secretory pathway, transfection experiments were performed in CHO cells that are devoid of secretory granules and a regulated secretory pathway. The 87-kDa form

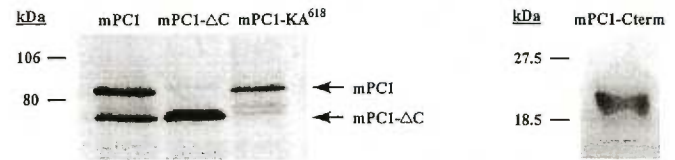


FIG. 4. Expression of mPC1 proteins in GH4 cells. GH4 cells were transfected with the expression vectors mPC1, mPC1-ΔC, mPC1-KA⁶¹⁸, and mPC1-Cterm. Forty h later, cells were labeled for 2 h with [³⁵S]methionine. Culture supernatants were then immunoprecipitated with an mPC1 antibody directed against the N-terminal part of the protein (for mPC1, mPC1-ΔC, and mPC1-KA⁶¹⁸) or the C-terminal part (for mPC1-Cterm), and samples were analyzed by SDS-PAGE (7.5% acrylamide for mPC1 or related proteins and 12% acrylamide for mPC1-Cterm). PC1 (87 kDa) and PC1-ΔC (66 kDa) represent the predicted size of the two proteins based on co-electrophoresis of molecular weight markers.

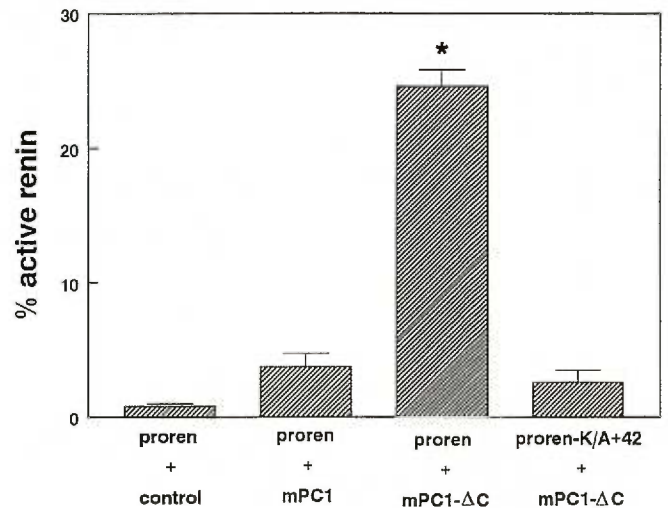


FIG. 5. The C-terminally truncated form of mPC1 processes prorenin in the constitutive secretory pathway. CHO cells were cotransfected with expression vectors for the indicated proteins. Overnight supernatants were collected 40 h after transfection and assayed for active renin. Results are expressed as the percentage of active renin (active renin content/total renin content) and represent mean \pm S.E. of three to eight independent transfections. *, $p < 0.0001$, as compared with proren + mPC1, Student's t test.

of mPC1 has been shown to be the predominant form present in constitutive cells, whereas the 66-kDa form is not detected (25). As described previously (21), PC1 was virtually unable to process prorenin in these cells (Fig. 5, proren + mPC1), confirming that prorenin processing by PC1 does not occur in cells lacking secretory granules. Interestingly, secretion of about 25% of active renin was observed when CHO cells were cotransfected with expression vectors for both prorenin and mPC1-ΔC (Fig. 5), indicating that the C-terminally truncated PC1 is active in the constitutive secretory pathway. Similar to the results obtained in GH4 cells, mPC1-ΔC specifically cleaved the prorenin processing site (Fig. 5, proren-K/A⁴² + mPC1-ΔC). These results demonstrate that PC1 deleted of its C-terminal tail can cleave prorenin in the constitutive secretory pathway.

An expression vector for the C-terminal tail of mPC1 was next constructed to test its effect on the activity of mPC1 (Fig. 1, mPC1-Cterm). The design of this construct assured targeting of the protein to the secretory pathway. Transfection of GH4 cells with the mPC1-Cterm expression vector led to the secretion of a protein having the expected molecular mass of 20 kDa (Fig. 4, mPC1-Cterm). Fig. 6A shows that transfection of GH4 cells with mPC1-Cterm caused a 2.5-fold decrease in the level of active renin generated by mPC1-ΔC, resulting in a level of active renin similar to the one observed with native PC1 (from

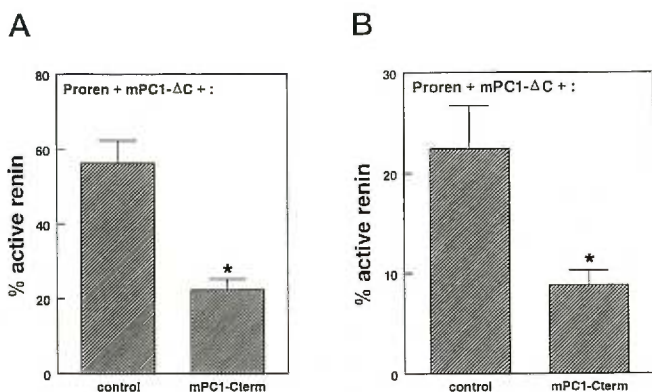


FIG. 6. The C-terminal tail of mPC1 directly inhibits PC1 activity. GH4 cells (A) or CHO cells (B) were cotransfected with expression vectors for prorenin, mPC1- Δ C, and either a control plasmid or mPC1-Cterm, and assayed for active renin. Results represent mean \pm S.E. of 8–12 independent transfections. *, $p < 0.0005$, as compared with control, Student's t test.

56.3 \pm 6 to 22.3 \pm 2.9% of active renin). Likewise, the C-terminal tail of mPC1 was able to inhibit processing of human prorenin in the constitutive secretory pathway of CHO cells (Fig. 6B). The same inhibitory effect was obtained using an expression vector coding for the C-terminal tail of human PC1 (hPC1) (not shown). These results provide the evidence that the C-terminal tail of PC1 has an inhibitory effect on PC1 activity in the constitutive secretory pathway.

DISCUSSION

Previous cotransfection studies conducted with different cell lines have shown that prorenin processing by the prohormone convertase mPC1 could occur only in cells containing secretory granules (21). Following the cleavage of its profragment in the endoplasmic reticulum, mPC1 undergoes an additional cleavage in the secretory granules that results in the removal of its C-terminal tail (11–13). In this study, we have investigated the role of the C-terminal tail of mPC1 on prorenin processing. We show that truncation of the C-terminal tail of mPC1 (mPC1- Δ C) greatly augments the cleavage of prorenin in GH4 cells and allows PC1 to cleave prorenin in CHO cells, which are devoid of secretory granules. Moreover, pulse-chase experiments in GH4 cells indicate that processed renin is secreted more rapidly when mPC1- Δ C is coexpressed compared with native mPC1, consistent with processing in the rapidly secreting constitutive secretory compartment. These results suggest that the environment of the secretory granules is not essential for the activity of mPC1- Δ C. However, in CHO cells, mPC1- Δ C generates less active renin than in GH4 cells (24.6 \pm 1.2 versus 62.6 \pm 2.9%) although the mPC1- Δ C protein is as efficiently expressed (not shown). This observation suggests that the environment of the TGN or of the immature granules is more favorable for the activity of mPC1- Δ C in GH4 cells. It is also possible that a portion of mPC1- Δ C is sorted to the secretory granules of GH4 cells; however, pulse-chase experiments show that the bulk of mPC1- Δ C is secreted constitutively and thus never reaches the mature secretory granules (not shown).

The current study demonstrates that the C-terminal tail of mPC1 can inhibit PC1 activity in the constitutive secretory pathway by an intermolecular mechanism. Our results do not allow us to determine whether in the natural state the C-terminal tail inhibits PC1 activity via an intra- or intermolecular mechanism or, in fact, if this inhibition is directly on PC1 or on a necessary cofactor for its action. However, these results and the proposed implication of the C-terminal tail of mPC1 in the sorting of the 87-kDa form to the regulated secretory pathway (17) raise the possibility that the C-terminal tail contrib-

Alignment of porcine, human, rat and mouse PC1 sequences following the P-domain

	551	End of P-domain	600	66 kDa ↓
pPC1	WDFMSVHTWG	ENPIGTNTL	ITDMSGRMQN	EGRIVNNKLI
hPC1	WDFMSVHTWG	ENPIGTNTL	ITDMSGRMQN	EGRIVNNKLI
rPC1	WDFMSVHTWG	ENPVGNTL	ITDMSGRMQN	EGRIVNNKLI
mPC1	WDFMSVHTWG	ENPVGNTL	ITDMSGRMQN	EGRIVNNKLI
Consensus	WDFMSVHTWG	ENP-GTNTL-	-TMSGR-QN	EGRIVNNKLI

	621								
pPC1	EKRVdseEQ	PTQEnLnesp	LVSkspsGsa	VgGRREELae	GAPSeAHLRL	LQSAFSKNSa	pKQSPKKSaS		
hPC1	EKRIVdsgEQ	PTQEnpkeNt	LVSkspsSSS	VgGRREdele	GAPSeAHLRL	LQSAFSKNSP	pKQSPKKSps		
rPC1	EKRIVVVEEK	PTQnsLNqNL	LVPknsSSSn	VeGRRDEqVq	GAPSKAHLRL	LQSAFSKNSP	sKQSS.klPpS		
mPC1	EKRIVVVEEK	PTQksLNqNL	LVPknsSSSn	VeGRRDEqVq	GPFSKAHLRL	LQSAFSKNSa	sKQSPKKSps		
Consensus	EK-V---E--	PTQ-----	LV-K--S-S-	V-GRR-E----	G-PS-AHLRL	LQSAFSKN--	E-KS--K--S		

	691								
pPC1	vKLnIPYENF	YEALEKLNqP	SQLkDSEDSL	YndYVDVFN	TKPKYKRRDR	LQALvDILc	EEh		
hPC1	AKLnIPYENF	YEALEKLNKP	SQLkDSEDSL	YndYVDVFN	TKPKYKRRDR	LQALvDILN	EEh		
rPC1	AKLsIPYegL	YEALEKLNKP	SQLeDSEDSL	YsdYVDVFN	TKPKYKRRDR	LQALvDILN	EEh		
mPC1	AKLsIPYEsF	YEALEKLNKP	SLkEGSEDSL	YsdYVDVFN	TKPKYKRRDR	LQALvDILN	EEh		
Consensus	-KL-IPYE--	YEALEKLN-P	S-L--SEDSL	Y-DYVDVFN	TKPKYKRRDR	LQALvDIL-	EEh		

FIG. 7. Alignment of porcine, human, rat, and mouse PC1 sequences. Consensus amino acids between porcine, human, rat, and mouse PC1 sequences (pPC1, hPC1, rPC1, and mPC1, respectively) are shown. The C-terminal domain begins following the conserved GT residues (*bold*). The arrow indicates the dibasic cleavage site (*bold*) that generates the 66-kDa form. Potential alternative dibasic cleavage sites (*bold*) are also shown.

utes significantly to targeting the maximal activity of PC1 to the secretory granules.

Using AtT-20 cells transfected with human prorenin, we have previously shown that the processing site for a granule-specific endoprotease between the profragment and the renin molecule seems necessary for appropriate prorenin sorting to the regulated secretory pathway (24). This result suggests that prorenin can be driven in the regulated secretory pathway by binding to the active site of the processing enzyme prior to sorting. As prorenin activation occurs only in the secretory granules, it is possible that prorenin binds mPC1 in the TGN but is not immediately processed due to the inhibition of mPC1 by its C-terminal tail. The complex could then be targeted to the regulated secretory pathway where the environment of the secretory granules might favor the cleavage and dissociation of the C-terminal tail rendering mPC1 capable of processing prorenin.

The mechanism by which the C-terminal tail inhibits PC1 activity could involve the entire tail or a more specific region. The region between amino acids 625–660 shows an important divergence between species; for instance, only 48.8% identity is found between mPC1 and hPC1 compared with 92.7% identity in the total amino acid sequence (Fig. 7). Nevertheless, the C-terminal tail of human PC1 was effective in inhibiting the activity of mPC1- Δ C (not shown). A possible inhibitory mechanism could involve binding of the C-terminal tail to the active site of mPC1 by one of the several dibasic residues present in the C-terminal region. However, site-directed mutagenesis of the conserved dibasic Arg-Arg site at position 654–655 did not prevent the inhibitory effect of mPC1-Cterm on mPC1- Δ C (not shown), making it unlikely that such a mechanism accounts for the inhibition of PC1 by its C-terminal tail. Another possible mechanism could involve induction of a conformational change around the active site by binding of the C-terminal tail elsewhere on the mPC1 protein. Future studies will be necessary to test this and other possible mechanisms.

The functional importance of the 66-kDa C-terminally truncated form of mPC1 has been investigated in various systems. *In vitro* studies have shown that the 66-kDa form of mPC1 was more active against fluorogenic peptide substrates but less stable than the nontruncated mature form (15). In addition, the C-terminally truncated form of mPC1 requires calcium concentrations above 20 mM and pH values between 5.0 and 5.5 for maximal enzymatic activity, conditions compatible with an optimal activity in mature secretory granules. Zhou *et al.* (15) have reported that the 66-kDa form of PC1 was more active than the 87-kDa form in generating certain products of prourenin in secretory granule-containing PC12 cells. Moreover,

expression of a C-terminally truncated form of mPC1 in AtT-20 cells that endogenously express POMC and mPC1 greatly accelerated POMC conversion to its smaller products (17). However, it is important to note that POMC processing is not strictly restricted to the secretory granules since processing at the junction between the 23-kDa fragment and β -LPH begins in the TGN (8). This suggests that, in the context of the TGN, the 87-kDa form of PC1 may have a high enough affinity for certain substrates such as POMC to overcome the inhibition by its C-terminal tail. In contrast, processing of other substrates such as prorenin and proinsulin by mPC1 apparently requires the removal of the C-terminal tail within the granules, thereby limiting the activity of the processing protease to this compartment.

Two other prohormone convertases, PC2 and PC5-A, are also preferentially active in the regulated secretory pathway (1-3). In contrast to PC1, pro-PC2 slowly exits the endoplasmic reticulum and is processed to PC2 only in the TGN where its activity is regulated by the binding protein 7B2. It has been suggested that binding of PC2 to 7B2 may prevent premature activation of PC2 in the regulated secretory pathway (26-28). Similar to PC1, PC5-A has been shown to carry out granule-specific processing of human prorenin in transfected cells (29). In addition to the rapid removal of an N-terminal prosegment in the early compartments of the secretory pathway, PC5-A undergoes truncation of its C-terminal tail in secretory granules (3). We may thus speculate that the C-terminal tail of PC5-A also inhibits PC5 in the constitutive secretory pathway.

In conclusion, our results suggest that the C-terminal tail of mPC1 could act as a partial inhibitor of mPC1 activity in the constitutive secretory pathway and that maximal activity of mPC1 requires the removal of its C-terminal tail. PC1 activity is thus dependent on two different sequential processing steps: first, the N-terminal profragment is processed in the endoplasmic reticulum, and second, the C-terminal tail is cleaved in secretory granules. Such a mechanism may explain the observed secretory granule-specific processing of certain prohormones or proproteins such as prorenin.

REFERENCES

- Seidah, N. G., Chretien, M., and Day, R. (1994) *Biochimie (Paris)* **76**, 197-209
- Rouille, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A. A., Jr., Chan, S. J., and Steiner, D. F. (1995) *Front. Neuroendocrinol.* **16**, 322-361
- De Bie, I., Marcinkiewicz, M., Malide, D., Lazure, C., Nakayama, K., Bendayan, M., and Seidah, N. G. (1997) *J. Cell. Biol.* **135**, 1261-1275
- Seidah, N. G., Hamelin, J., Mamarbachi, M., Dong, W., Tardos, H., Mbikay, M., Chretien, M., and Day, R. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3388-3393
- Smeeckens, S. P., Montag, A. G., Thomas, G., Albiges-Rizo, C., Carroll, R., Benig, M., Phillips, L. A., Martin, S., Ohagi, S., Gardner, P., and *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 8822-8826
- Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chretien, M., and Seidah, N. G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3564-3568
- Thomas, L., Leduc, R., Thorne, B. A., Smeeckens, S. P., Steiner, D. F., and Thomas, G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 5297-5301
- Schmidt, W. K., and Moore, H. P. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 1271-1285
- Seidah, N. G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M. G., Lazure, C., Mbikay, M., and Chretien, M. (1991) *Mol. Endocrinol.* **5**, 111-122
- Smeeckens, S. P., Avruch, A. S., LaMendola, J., Chan, S. J., and Steiner, D. F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 340-344
- Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, A., Lazure, C., Chretien, M., and Seidah, N. G. (1993) *Biochem. J.* **294**, 735-743
- Zhou, A., and Mains, R. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 17440-17447
- Vindrola, O., and Lindberg, I. (1992) *Mol. Endocrinol.* **6**, 1088-1094
- Goodman, L. J., and Gorman, C. M. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 795-804
- Zhou, Y., Rovere, C., Kitabgi, P., and Lindberg, I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24702-24706
- Zhou, Y., and Lindberg, I. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18408-18413
- Zhou, A., Paquet, L., and Mains, R. E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 21509-21516
- Fritz, L. C., Haidar, M. A., Arfsten, A. E., Schilling, J. W., Carilli, C., Shine, J., Baxter, J. D., and Reudelhuber, T. L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12409-12412
- Chu, W. N., Mercure, C., Baxter, J. D., and Reudelhuber, T. L. (1992) *Hypertension* **20**, 782-787
- Reudelhuber, T. L., Mercure, C., Ramla, D., Methot, D., and Postnov, A. Y. (1995) in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management* (Laragh J. H., and Brenner B. M., eds) pp. 1621-1636, Raven Press, New York
- Benjannet, S., Reudelhuber, T., Mercure, C., Rondeau, N., Chretien, M., and Seidah, N. G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 11417-11423
- Chu, W. N., Baxter, J. D., and Reudelhuber, T. L. (1990) *Mol. Endocrinol.* **4**, 1905-1913
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) *Gene* **77**, 61-68
- Brechler, V., Chu, W. N., Baxter, J. D., Thibault, G., and Reudelhuber, T. L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20636-20640
- Zhou, Y., and Lindberg, I. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 5615-5623
- Braks, J. A., and Martens, G. J. (1994) *Cell* **78**, 263-273
- Zhu, X., and Lindberg, I. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 1641-1650
- Benjannet, S., Savaria, D., Chretien, M., and Seidah, N. G. (1995) *J. Neurochem.* **64**, 2303-2311
- Mercure, C., Jutras, I., Day, R., Seidah, N. G., and Reudelhuber, T. L. (1996) *Hypertension* **28**, 840-846

CHAPITRE 3

ARTICLE

An α -Helix Mediates Targeting of the Proprotein Convertase PC1 to the Regulated Secretory Pathway.

Isabelle Jutras, Nabil G. Seidah, Timothy L. Reudelhuber

Laboratoires de Biochimie Moleculaire de l'Hypertension et de Biochimie
Neuroendocrinienne, Institut de Recherches Cliniques de Montréal

soumis au *Journal of Cell Biology*, mai 2000

ABSTRACT

The proprotein convertase PC1 is a protease whose activity is largely confined to the dense core secretory granules of neuroendocrine cells. Efficient processing of PC1 substrates in granules requires a mechanism that will both limit the activity of the enzyme to these organelles and promote its targeting to the nascent secretory granules. In the current study, we provide evidence that targeting of PC1 to secretory granules is mediated by α -helical structures in its C-terminal tail and, at least in part, dependent on interactions with specific components of the secretory granule membrane.

INTRODUCTION

Proprotein convertases (PCs)¹ form a family of serine endoproteases comprised of seven identified members: furin, PACE4, PC1, PC2, PC4, PC5A/B (where PC5-A and PC5-B are two splicing variants of the same mRNA transcript) and PC7, as reviewed previously (Nakayama, 1997; Seidah and Chrétien, 1997; Steiner, 1998). The activity of these enzymes is thought to be crucial for the appropriate processing of numerous proprotein and prohormone precursors before their secretion from synthesizing cells. Whereas some proprotein convertases (furin, PACE4, PC5-B and PC7) process proteins in the constitutive secretory pathway, others (PC1, PC2 and PC5-A) exhibit their greatest activity in the maturing granules of the regulated secretory pathway (De Bie et al., 1996; Jutras et al., 1997; Shennan et al., 1995; Zhu and Lindberg, 1995). PCs characteristically cleave their substrates right after a pair of basic amino acids and share a common domain structure that includes an N-terminal signal peptide, a profragment region, a conserved subtilisin-like catalytic domain, a conserved region named P-domain, which possibly regulates the calcium and pH dependencies of the processing activity (Zhou A. et al., 1998), and a C-terminal region, in which the greatest divergence between PCs occurs.

The expression of PC1 (also known as SPC3) is restricted to endocrine and neuroendocrine tissues where it is responsible for the processing of several prohormones, as is strikingly demonstrated by the recent finding of naturally occurring mutations in the PC1 gene in a patient with severe obesity associated with elevated plasma levels of proinsulin and pro-opiomelanocortin levels (Jackson et al., 1997). Like the prohormones it activates, PC1 is synthesized as an inactive precursor, proPC1. Although the prosegment of PC1 is rapidly removed in early compartments of the secretory pathway (Benjannet et al., 1993; Zhou and Lindberg, 1993), the additional cleavage of the 135 amino acid long C-terminal domain of PC1, which occurs specifically in secretory granules, has been shown to dramatically increase the

¹ Abbreviations used. PC, proprotein convertase; CPE, carboxypeptidase E; DSS, disuccinimidyl suberate.

activity of the enzyme for certain substrates (Jutras et al., 1997; Zhou A. et al., 1995; Zhou and Lindberg, 1994). This finding has led to a model whereby the C-terminal domain would, at least in part, inhibit PC1 activity in early compartments of the secretory pathway, thereby preventing activation of certain substrates prior to entry in the secretory granules (Jutras et al., 1997). For this model to be valid, however, PC1 (with its C-terminal tail attached) would have to be efficiently targeted to secretory granules where it could subsequently be activated and cleave its substrate. Indeed, the C-terminal domain has been suggested to play a role in proper sorting of PC1 to the secretory granules (Zhou A. et al., 1995).

The mechanism of protein sorting to the regulated secretory pathway remains a matter of debate and, in contrast to many cellular sorting events that take place throughout the secretory pathway (Letourneur et al., 1994; Munro and Pelham, 1987; Schafer et al., 1995), a consensus signal sequence has not been identified for sorting of proteins to the secretory granules. The mechanisms that result in protein storage in mature granules are thought to occur at the level of the trans-Golgi network (TGN) and nascent immature secretory granules. Hypotheses for sorting can be summarized by two models that are not mutually exclusive (reviewed by Arvan and Castle, 1998): the first model proposes the existence of sorting receptors, capable of specifically binding to a putative structural sorting domain and capable of pulling sorted proteins into immature secretory granules. It was recently proposed that carboxypeptidase E (CPE) was just such a sorting receptor for a wide variety of prohormones including proinsulin (Cool et al., 1997) but this model has been challenged by the finding that proinsulin storage was not impaired in pancreatic islets from CPE deficient (CPE^{fat}/CPE^{fat}) mice (Irminger et al., 1997) or in cell lines derived from pancreatic β -cells of these mice (Varlamov et al., 1997). The second model predicts non-restricted or bulk-flow entry of proteins into immature granules and subsequent removal of proteins destined to other cellular compartments, paralleled with specific retention of proteins stored in mature granules. Extrusion of proteins from immature granules could occur by a receptor-mediated mechanism or result from capture of soluble proteins in small vesicles budding from the immature granules (Klumperman et al.,

1998; Kuliawat and Arvan, 1994). Several stored proteins have been shown to aggregate under the calcium and pH conditions that prevail in sorting compartments (Chanat and Huttner, 1991; Colomer et al., 1996)) or to associate with phospholipids of the granule membrane (Laine and Lebel, 1999). These characteristics are postulated to be important in removing regulated secretory proteins from the soluble phase and consequently for efficient retention of these proteins in maturing granules.

Irrespective of the sorting mechanism, the proposed models are compatible with the existence of specific sorting domains in regulated secretory proteins. Thus, in the current study, we have investigated the function of the C-terminal domain of PC1 in protein sorting to the regulated secretory pathway. Our results suggest that a predicted α -helix in the structure of the C-terminal region is important in protein sorting to secretory granules, possibly by mediating protein binding to membrane components in the sorting compartments of the secretory pathway.

MATERIALS AND METHODS

Recombinant Plasmid Construction

Numbers in the following constructs correspond to amino acids in native mouse PC1 beginning at the initial methionine. Construction of expression vectors for native mouse PC1 and PC1ΔC under the control of the Rous sarcoma virus promoter has been described previously (Jutras et al., 1997). Expression vectors containing portions of the C-terminal domain of mouse PC1 fused to a portion of the Fc fragment of the mouse immunoglobulin IgG2b heavy chain (preceded by the signal peptide and 6 amino acids of the prosegment of prorenin (Brechler et al., 1996)) were constructed as follows. The stop codon of the IgG2b heavy chain was deleted by polymerase chain reaction with the following oligonucleotide: 5'-CGAGATCTTTACCCGGAGAC-3' antisense primer preceding the stop codon (generation of a BglIII site [underlined]). The C-terminal portions of mouse PC1 were added in frame by cohesive ligation of BglIII/BamHI sites using the following oligonucleotides (generation of a BamHI site is underlined): 5'-CGGGATCCTGTGGAGAAGCG-3' sense primer for Fc-PC1(627-753) and Fc-PC1(627-670); 5'-CGGGATCCCATGCTGCGAC-3' sense primer for Fc-PC1(667-713) and Fc-PC1(667-753); 5'-CGGGATCCCTCCAAGCT-3' sense primer for Fc-PC1(711-753); 5'-**GCGGATCCTAGAGTCGCAGCATGG**-3' antisense primer for Fc-PC1(627-670) (generation of a stop codon in bold); 5'-GCGGATCCTAAAGCTTGGAGGGCTT-3' antisense primer for Fc-PC1(667-713) (generation of a stop codon in bold). Mutations in the Fc-PC1[P⁷⁴⁵,P⁷⁴⁹] construct were inserted using the following overlapping oligonucleotides: 5'-CATGGACATCCcAAATGAG-3' sense primer and 5'-GGATGTCCATGgGAGCTT-3' antisense primer (mutated nucleotides are in small characters). All recombinant plasmid constructions were verified by sequencing of double stranded DNA.

Cell Culture and Transient or Stable Transfections

The rat somatomammotrophic GH4 and mouse corticotrophic AtT-20 cell lines were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum in an humidified incubator at 5% CO₂ and 10% CO₂ respectively. Stably transfected GH4 cells were established by transfecting 2x10⁶ cells with 2 µg of the PSVneo expression vector (GIBCO-BRL) and 18 µg of the appropriate expression vector in a calcium-phosphate precipitate. Stably transfected cells were selected by incubating in 0.8 mg/ml of Geneticin (GIBCO-BRL) for 5 days. For transient transfections, 5x10⁶ AtT-20 cells were mixed with 50 µg of the appropriate plasmid construct and electroporated as described previously (Brechler et al., 1996). GH4 cells were plated at a density of 1x10⁶ cells in 35 mm wells and transfected 6 hours later with 20 µg of the appropriate expression vector using the Lipofectin Reagent method (GIBCO-BRL).

Biosynthetic Labeling of Proteins

Transiently transfected AtT-20 and GH4 cells were replated in 25 mm wells 24 and 48 hours after transfection, respectively. The next day, the cells were depleted of methionine for one hour in methionine-free DMEM containing 10% dialyzed FCS, labeled with 300 µCi of ³⁵S-methionine per well (pulse) and incubated in complete medium for the indicated times (chase). At the end of the chase period, GH4 cells were incubated for 20 minutes in medium containing 50 mM NaCl (basal secretion) following which the medium was replaced and the cells were further incubated for 20 minutes in medium containing 50 mM KCl (stimulation of granule release). Stimulated release from AtT-20 cells was assessed by incubating parallel wells in the presence or in the absence of 10 µM forskolin. Culture supernatants were then immunoprecipitated with protein A-sepharose alone or with protein A sepharose-coupled anti-N-terminal PC1 antibody as described previously (Benjannet et al, 1993). Immunoprecipitated proteins were fractionated by SDS-PAGE and gels were subjected to fluorography. Intensity of the bands was estimated by scanning

densitometry of autoradiograms using an Alpha Imager 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation).

Immunocytofluorescence

Transiently transfected AtT-20 cells, grown on glass slides, were fixed and permeabilized as previously described (Brechler et al., 1996). The cells were stained with an anti-mouse IgG antibody conjugated to fluorescein (Boehringer Mannheim) in a 1:50 dilution (1% milk in PBS). Labeled cells were mounted using the *SlowFade Light* Antifade Kit (Molecular Probes) and visualized using a Zeiss Axiophot microscope (Carl Zeiss Inc.) Digital images were prepared using Adobe Photoshop.

Crosslinking of cellular proteins

GH4 cells transiently transfected with the appropriate expression vector were labeled 30 minutes with ³⁵S-methionine and incubated for 2 hours in fresh medium at 20°C. The cells were then rinsed twice in cold PBS and incubated on ice for 15 minutes with 0.25 mM of disuccinimidyl suberate (DSS) (Pierce Chemical Co.) in PBS. The cross-linking reaction was stopped by the addition of 20 mM Tris pH 7.5 and the cells were lysed in 0,1 % SDS and 1 % NP-40 in PBS. Cell lysates were subjected to immunoprecipitation with protein A-sepharose.

Analysis of protein associated with membranes

GH4 cells stably transfected with the appropriate expression vector were rinsed twice and scraped in cold PBS. All the subsequent steps were performed at 4°C. The cells were pelleted, washed once with homogenization buffer (10 mM Hepes pH 6, 0.25 M sucrose, 2 mM CaCl₂, 0.5 mM PMSF) and homogenized in a Dounce homogenizer, in five times the volume of the cell pellet. Post nuclear supernatants were obtained by spinning in a microfuge at 4500 rpm for 15 minutes and were incubated with 0.03% saponin (to permeabilize membranes (Chanat and Huttner,

1991)) and 100 mM NaCl for 15 minutes with gentle agitation. Samples were sonicated twice for 10 seconds at maximal intensity and spun in a microfuge at maximum speed for 30 minutes. The supernatants (soluble fraction) were removed and the pellets (membrane fraction) were washed once in homogenization buffer containing 100 mM NaCl. Fc-containing proteins in supernatants, rinse buffer and pellets were immunoprecipitated with protein A-sepharose. Proteins were separated on SDS-PAGE followed by immunoblotting with an anti-mouse IgG antibody coupled to horseradish peroxidase (Amersham).

Protein structural predictions

Protein structure predictions according to the Chou-Fasman and Garnier-Osguthorpe-Robson algorithms were carried out using the Genetics Computer Group sequence analysis program.

RESULTS

The C-terminal tail of PC1 contains a sorting domain for the regulated secretory pathway

To investigate the role of the C-terminal domain of PC1 in sorting to the regulated secretory pathway, we tested whether its complete deletion would impair the storage of PC1 in secretory granules and alter its stimulated release from cells. GH4 cells were transfected with either native PC1 or PC1 Δ C, a C-terminally truncated PC1 construct (Fig. 3-1). Transfected cells were labeled with ^{35}S -methionine, chased for two hours, incubated in the presence of NaCl to estimate basal protein secretion and subsequently, in the presence of KCl to stimulate the release of secretory granule content. Expression of native PC1 in GH4 cells resulted in the appearance of the 87 kDa and 66 kDa forms corresponding to C-terminally uncleaved and C-terminally cleaved PC1 respectively. The 66 kDa form underwent stimulated release from the cells with a 5.3 fold stimulation, indicating sorting of PC1 to the regulated secretory pathway. This result also indicates exhaustive PC1 C-terminal cleavage within secretory granules since the 66 kDa form represents the only detectable form stored in this compartment. Transfection of GH4 cells with PC1 Δ C lead to direct expression of the 66 kDa form but in contrast to native PC1, the 66 kDa form was no longer sorted to the regulated secretory pathway as judged from the very modest 1.7 fold stimulated secretion. Instead, PC1 Δ C appeared to undergo rapid constitutive secretion from GH4 cells. These results indicate that targeting of PC1 to the regulated secretory pathway is dependent on its C-terminal tail, which can thus be considered as the major granule-sorting domain of PC1.

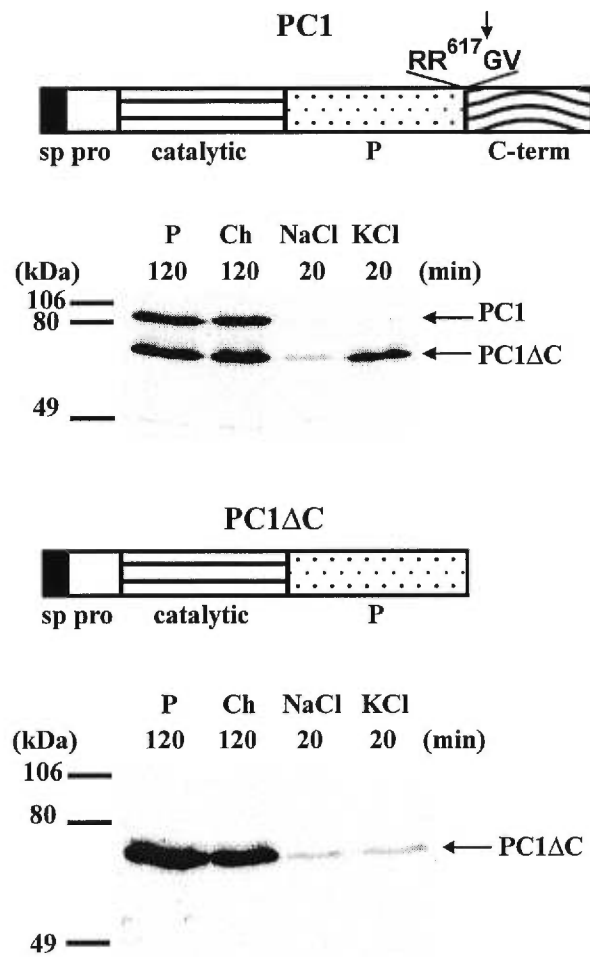
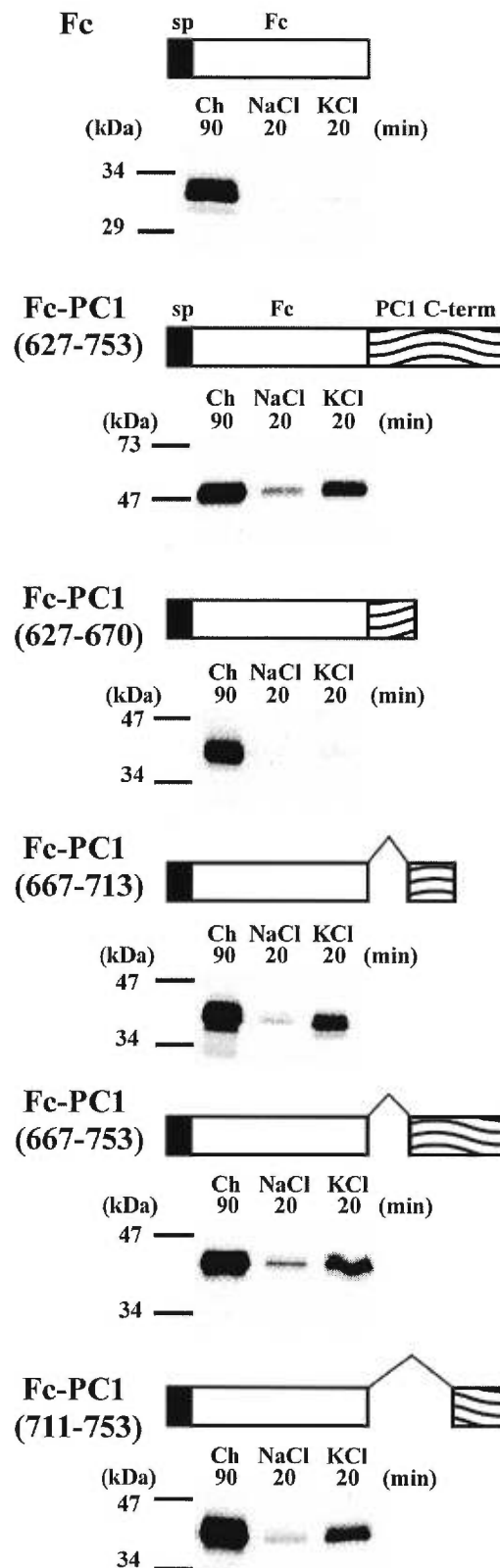


Figure 3-1. The C-terminal domain of PC1 targets PC1 to the regulated secretory pathway. Stimulated release from GH4 cells was assessed in cells transfected with expression vectors for native PC1 or the C-terminally deleted PC1ΔC. A schematic representation is shown for each construct, indicating the signal peptide (*sp*), the proregion (*pro*), the subtilisin-like catalytic domain (*catalytic*), the P domain (*P*), the C-terminal domain (*C-term*) and its cleavage site (*arrow*). The cells were labeled with ³⁵S-methionine for 2 hours, chased in complete medium for 2 hours and incubated during two subsequent 20 minute periods, first in 50 mM NaCl and then in 50 mM KCl. Labeled PC1 proteins were immunoprecipitated from the supernatants with an antibody directed against the N-terminal portion of PC1 and separated on SDS-PAGE. Representative data are shown from one of four to six independent experiments.

To further characterize the sequences in the C-terminal tail of PC1 that are responsible for its sorting to the regulated secretory pathway, various portions of the C-terminal domain were fused to a segment of mouse immunoglobulin 2b heavy chain (corresponding to part of the Fc fragment). We then tested whether the C-terminal tail of PC1 could function in rerouting the constitutively secreted Fc protein to the regulated secretory pathway (Fig. 3-2). While the Fc fragment alone (Fc) was not apparently sorted in secretory granules in transfected GH4 cells, as evidenced by the weak stimulation of its secretion by potassium, a significant proportion of an Fc fusion protein containing the entire C-terminal tail of PC1 (Fc-PC1 627-753) underwent stimulated release from the cells. These results demonstrate that the C-terminal region of PC1 can function as a dominant sorting domain in the context of the Fc fusion protein.

Fc fusion proteins containing various portions of the C-terminal domain of PC1 were expressed in GH4 cells in order to identify the minimal sorting domain (Fig. 3-2). Results indicate that all the fusion proteins were expressed at comparable levels in the transfected cells, suggesting that mis-folding was not a major problem. The mean values of stimulus-dependent secretion demonstrate that the peptide region spanning amino acids 627-670 was inefficient in sorting the Fc fusion protein to secretory granules (Table 3-I). In contrast, portions spanning either amino acids 667-713 or 711-753 of the C-terminal domain resulted in stimulation folds comparable to that obtained with the entire C-terminal tail. Therefore, the C-terminal region of PC1 contains at least two minimal sorting domains (amino acids 667-713 and 711-753) which do not act additively since their combined presence did not augment the sorting efficiency of the fusion protein containing both regions (Fc-PC1 667-753). Efficient retention of Fc-PC1 proteins was not a particularity of GH4 cells since the same fusion proteins were also sorted into secretory granules of AtT-20 cells from which stimulated release of the labeled proteins could still be observed after an overnight chase period (Fig. 3-3C and data not shown).

Figure 3-2. Two different regions in the C-terminal domain of PC1 are sufficient to reroute the constitutively secreted Fc protein to the secretory granules. GH4 cells were transfected with Fc alone or with Fc fused to portions of the C-terminal domain of PC1. A schematic representation is shown for each construct, indicating the signal peptide (*sp*), the fragment of mouse immunoglobulin heavy chain (*Fc*) and the C-terminal region of PC1 (*PC1 C-term*). Numbers correspond to amino acids in native PC1 as in Figure 3-1. Pulse-labeled GH4 cells were chased for 90 minutes and incubated for 20 minutes in 50 mM NaCl and subsequently for 20 minutes in 50 mM KCl. Fc containing proteins were immunoprecipitated from the supernatants with protein A-sepharose. Representative data are shown from one of six independent experiments.



A potential structure involved in sorting of Fc-PC1 fusion proteins to the regulated secretory pathway

While primary sequence comparison of the two minimal sorting domains of the PC1 C-terminal tail did not reveal an apparent homologous peptide sequence, secondary structure predictions indicated that both the 667-713 and 711-753 regions were expected to contain an α -helix. In addition, nuclear magnetic resonance and circular dichroism spectroscopy of a peptide comprising amino acids 727-753, indicate that this peptide indeed forms an amphipathic α -helix (Dr. Claude Lazure, personal communication). To test whether this structure could be involved in sorting of the fusion protein to the regulated secretory pathway, we altered this structure in Fc-PC1(711-753) by converting two leucine residues at positions 745 and 749 to proline residues. Structural algorithms predict that this change will specifically disrupt the predicted α -helix in the C-terminal portion of the resulting Fc-PC1(711-753) fusion protein (Fig. 3-3A). As shown in Figure 3-3B, the proline mutations did not reduce expression of the fusion protein in GH4 cells but dramatically reduced sorting to secretory granules. Indeed, Fc-PC1[P⁷⁴⁵,P⁷⁴⁹] showed a mean value of stimulus-dependent secretion comparable to the Fc protein alone (Table 3-I), indicating constitutive secretion of the mutated fusion protein. After an overnight chase period in labeled AtT-20 cells, a good proportion of Fc-PC1(711-753) could still be released from the cells (Fig. 3-3C); however Fc-PC1[P⁷⁴⁵,P⁷⁴⁹] was undetectable in the supernatant, consistent with the absence of storage of this fusion protein in secretory granules. Immunofluorescence labeling carried out to confirm the intracellular localization of the fusion proteins was consistent with the results obtained from stimulated-release assays in transfected cells. In AtT-20 cells transfected with Fc-PC1(711-753), fluorescence could be detected at the tips of the cellular processes where the secretory granules are known to be localized (Fig. 3-4). However, in AtT-20 cells expressing the mutant Fc-PC1[P⁷⁴⁵,P⁷⁴⁹] construct, the bulk of the fluorescence was observed in a para-nuclear region consistent with localization of the protein passing through the Golgi apparatus (Fig. 3-4). Taken together, these results suggest that sorting of Fc-PC1 fusion proteins to the secretory granules is

achieved by a mechanism dependent on the presence of an α -helical structure in the sorted protein.

Table 3-I. Stimulated Secretion of Newly Synthesized Fc-PC1 Fusion Proteins from Transfected GH4 Cells

Construct	Stimulus-dependent Secretion*
Fc	1.58 \pm 0.33
Fc-PC1 (627-753)	3.25 \pm 0.38 [‡]
Fc-PC1 (627-670)	1.88 \pm 0.50
Fc-PC1 (667-713)	3.53 \pm 0.73 [‡]
Fc-PC1 (667-753)	3.39 \pm 0.43 [‡]
Fc-PC1 (711-753)	4.12 \pm 0.63 [‡]
Fc-PC1 (711-P ⁷⁴⁵ , P ⁷⁴⁹ -753)	1.89 \pm 0.59

*Stimulus-dependent secretion values correspond to the ratio of the band intensity obtained with KCl-stimulated release to the band intensity obtained with NaCl-basal release. The data represent the mean values of six independent experiments (\pm standard deviation). [‡] $P < 0.001$ relative to the stimulated release value of Fc using Student's *t* test.

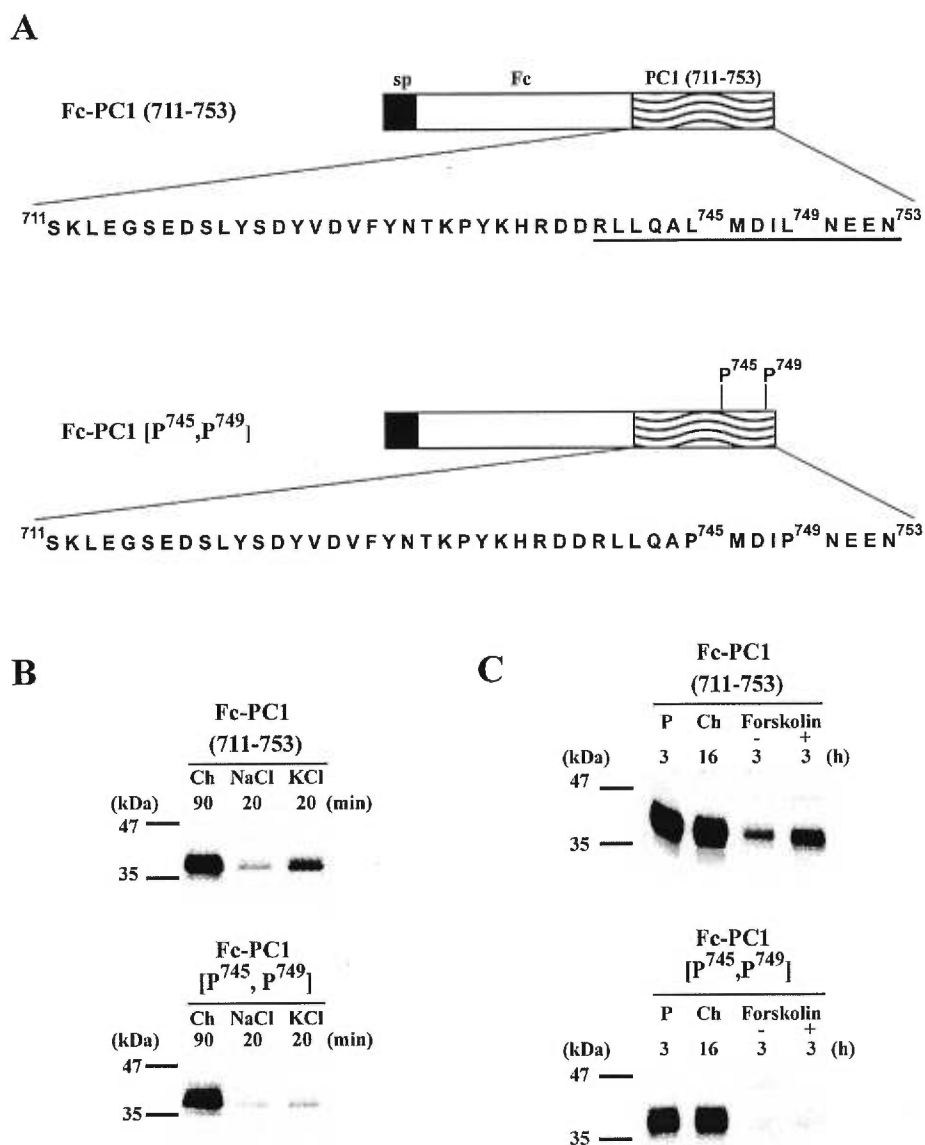


Figure 3-3. Formation of an α -helix is required to target an Fc-PC1 fusion protein to the regulated secretory pathway. (A) Schematic representation of constructs Fc-PC1(711-753) and Fc-PC1[P⁷⁴⁵,P⁷⁴⁹] showing the amino acid sequence of portion 711 to 753, which comprises a region predicted to form an α -helix (*underlined*) in native PC1 but not in the sequence containing the L⁷⁴⁵P and L⁷⁴⁹P mutations. (B) GH4 cells were transfected with the appropriate construct. Pulse-chase experiments, stimulated-release assays and immunoprecipitations were performed as in Figure 2. (C) AtT-20 cells were transfected with the appropriate construct, pulse-labeled for three hours and chased overnight. Parallel wells were incubated in the presence or in the absence of 10 μ M forskolin for three hours. Immunoprecipitations were carried out as in Figure 2. Note that the apparent unstimulated secretion of Fc-PC1(711-753) probably results from the basal release of secretory granules. Representative data are shown from one of six independent experiments.

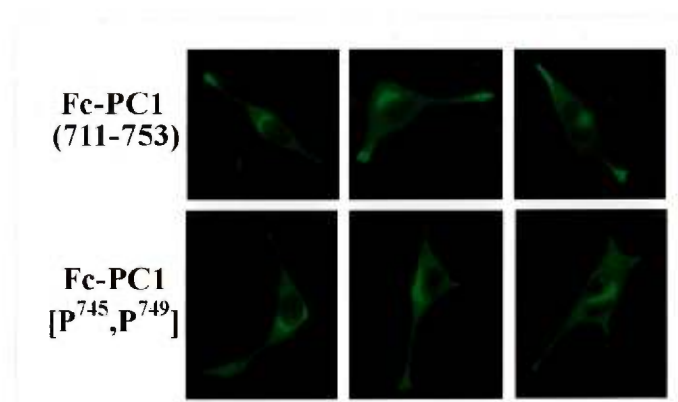


Figure 3-4. Intracellular localization of differently sorted Fc-PC1 fusion proteins. AtT-20 cells transfected with either the Fc-PC1(711-753) or Fc-PC1[P⁷⁴⁵,P⁷⁴⁹] fusion proteins were labeled with a fluorescein-coupled antibody directed against mouse IgG. Results are representative of three independent experiments.

Role of protein-protein interactions in sorting Fc-PC1 fusion proteins to the regulated secretory pathway.

While an α -helix appears to be necessary for sorting of the Fc-PC1 fusion proteins to the regulated secretory pathway, it is unclear whether this structure confers some necessary property to the protein itself (such as aggregation) or whether it enables the PC1 C-terminal domain to interact with other proteins that contribute to PC1 entry in nascent secretory granules. To test if specific protein-protein interactions were involved in selective sorting of Fc-PC1 fusion proteins, intracellular cross-linking in transfected GH4 cells was performed. Following a short labeling period, GH4 cells were chased for 1 hour at 20°C to block protein export from the TGN, the intracellular compartment where the sorting mechanism is expected to be functional. The cells were then incubated with a membrane permeable cross linker (DSS) on ice for 15 minutes. Following lysis of the cells, the different species of Fc-containing proteins produced from the cross-linking reaction were immunoprecipitated. As shown in Figure 3-5, a very small proportion of Fc appeared as a protein species of higher molecular weight, indicating little proximal protein association with Fc. In contrast, at least a third of the immunoprecipitated Fc-PC1 proteins were present as protein species of higher molecular weight, corresponding to the sizes expected for dimers of each fusion proteins. Cross-linked Fc-PC1(667-753) and Fc-PC1(711-753) proteins were also observed when the chase was performed at 37°C, indicating the protein complex was stable following entry in secretory granules (not shown). However, a good proportion of Fc-PC1(627-670), which is not efficiently sorted to secretory granules (Table 3-I), appeared incorporated in cross-linked protein species, indicating that this characteristic could not discriminate between fusion proteins sorted to the constitutive or regulated secretory pathways. Although portions of the C-terminal region of PC1 mediate close protein interactions, most probably the formation of dimers, these interactions do not correlate with protein sorting to the secretory granules.

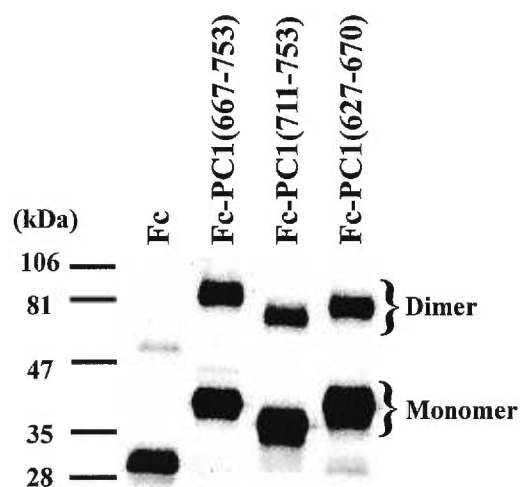


Figure 3-5. Relationship between dimerization and sorting of Fc-PC1 fusion proteins in the TGN. GH4 cells were transfected with the indicated construct, labeled for 30 minutes and chased at 20°C for 1 hour. The cells were incubated on ice in 0.25 mM DSS for 15 minutes. Fc-containing proteins were immunoprecipitated from the cell lysates. Representative data are shown from one of three independent experiments.

Membrane-Binding Properties of Fc-PC1 Proteins Sorted to Secretory Granules.

To determine if sorting of Fc-PC1 fusion proteins involved specific membrane association of the stored proteins, a crude membrane fraction was prepared from GH4 cells stably transfected with the appropriate construct. Cells were homogenized in pH and calcium conditions resembling those present in the trans-Golgi network (Chanat and Huttner, 1991; Demaurex et al., 1998) and the post-nuclear supernatants were sonicated in the presence of saponin, to favor complete disruption of vesicles, before pelleting the membranes. As shown in Figure 3-6, at least half of the total immunoprecipitated Fc-PC1(667-713) and Fc-PC1(711-753) proteins, which are sorted to secretory granules (Table 3-I), were found associated with the membrane pellet. In contrast, Fc-PC1(627-670) and Fc-PC1[P⁷⁴⁵,P⁷⁴⁹], which are not sorted to the secretory granules (Table 3-I), were mostly found in the supernatant with approximately 20% of the total immunoprecipitated proteins in the membrane pellet. In addition, preparation of the membrane fractions at near neutral pH, without calcium, lead to increased membrane association of the constitutively secreted fusion proteins (not shown), suggesting that the specificity of membrane binding requires slightly acidic and elevated calcium conditions. These results indicate that the portions of the C-terminal region of PC1 capable of targeting an Fc fusion protein to the secretory granules, also mediate binding of the fusion protein to membrane components within the sorting compartments of the secretory pathway.

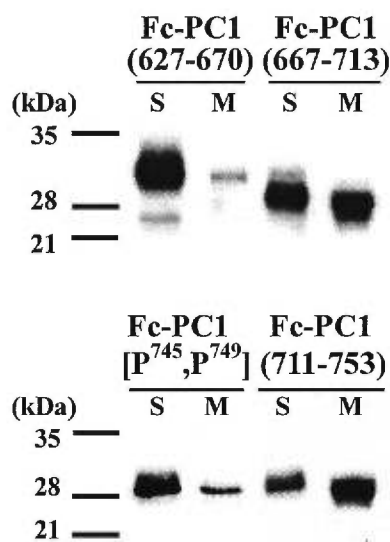


Figure 3-6. Membrane association of Fc-PC1 fusion proteins, which undergo sorting to the secretory granules. GH4 cells stably transfected with the indicated constructs were homogenized at pH 6 and in 2 mM CaCl₂. The post-nuclear supernatants were incubated in 0.03% saponin to perforate membrane vesicles, sonicated and centrifuged. Fc-containing proteins were immunoprecipitated from supernatant (*S*) and membrane pellet (*M*). The proteins were separated by SDS-PAGE followed by immunoblotting with an anti-mouse IgG antibody. Representative data are shown from one of three independent experiments.

DISCUSSION

The present results provide clear evidence that the C-terminal region of PC1 contains one or more peptide sequences capable of acting as sorting domains to the regulated secretory pathway. These results are in agreement with a previous report in which a C-terminally truncated form of PC1 was shown to undergo constitutive secretion from transfected AtT-20 cells (Zhou A. et al., 1995). While mutations in the conserved RRGDL motif in the P domain of the PC1 convertase also result in impaired sorting of the protein (Lusson et al., 1997; Rovère et al., 1999), these mutations lead to substantial degradation of the mutant PC1 proteins in the endoplasmic reticulum, suggesting that the mutant proteins are improperly folded. In contrast, several studies have shown that C-terminal deletions do not lead to improper folding of PC1 but rather to efficient expression of a form of the enzyme with enhanced proteolytic activity (Jutras et al., 1997; Zhou A. et al., 1995; Zhou Y. et al., 1995). Thus, the inefficient sorting of PC1 missing its C-terminal tail is not likely due to improper folding of the protein.

We have previously shown that the C-terminal domain of PC1 partially inhibits the activity of PC1 in the constitutive secretory pathway, a mechanism that could explain the observed secretory granule-specific processing of certain proproteins by PC1 (Jutras et al., 1997). The C-terminal domain thus ensures targeting of PC1 activity to the regulated secretory pathway by two mechanisms both presumed to occur in the TGN: first by partially inhibiting its catalytic activity prior to PC1 entry in the secretory granules and secondly by mediating sorting of the protein to the secretory granules.

The search for the minimal sorting domain in the C-terminal region of PC1 revealed that two independent segments were sufficient to target an Fc fusion protein to the regulated secretory pathway. Both of these segments contained regions predicted to form α -helices. Disruption of the predicted α -helix in the sorting domain which comprises the last forty amino acids of the C-terminal region, resulted in

constitutive secretion of the fusion protein, suggesting that the helical structure is crucially important for protein targeting to the secretory granules and that this α -helix could represent the minimal requirement for granule sorting to occur. Insertion of the L⁷⁴⁵P and L⁷⁴⁹P mutations in the entire PC1 resulted in premature cleavage of the C-terminal region in the secretory pathway, making it impossible to judge the role of this α -helix on the sorting of native PC1 because the sorting domain is lost prematurely (data not shown). Data on the three-dimensional structure of PC1 protein will evidently be informative in defining the multiple interactions involving the C-terminal domain as well as the functional importance of these interactions.

The reaction of Fc-PC1 fusion proteins with cross-linking agents in the TGN did not reveal specific associations with other proteins residing in the TGN such as chromogranins, which have been shown to enhance the storage of endogenous hormones in AtT-20 cells (Natori and Huttner, 1996). In addition, if a specific sorting receptor contributes to protein entry in nascent secretory granules, an expected Fc-PC1/receptor complex should have been observed with fusion proteins undergoing sorting to secretory granules. In line with this, when a fusion protein containing the entire C-terminal tail of PC1 was overexpressed in AtT-20 cells, the sorting to the secretory granules of both the fusion protein and PC1 (which is endogenously expressed in these cells) appeared unaltered, indicating that the sorting mechanism was not easily saturable (not shown). Our results are thus consistent with the sorting of PC1 not occurring by a saturable protein-receptor mediated mechanism.

Our analysis of membrane preparations demonstrated that the fusion proteins, which had been shown to undergo efficient sorting to secretory granules, were consistently found associated with the membrane pellet. In addition, this feature could clearly distinguish proteins sorted to secretory granules from constitutively secreted proteins. Based on these observations, we propose that the amphipathic α -helix in the C-terminal region of PC1 mediates binding to membrane components of the TGN or of the immature granules in a pH and calcium-dependent manner (Fig. 3-7). Association with membranes could serve in removing PC1 from the soluble phase

and preventing its entry in constitutive-like vesicles budding from immature granules (Arvan and Castle, 1998). The interaction of the C-terminal domain with membranes might induce a conformational change, which possibly triggers the C-terminal autocatalytic cleavage and subsequent maximal activation of the enzyme, events known to occur in the secretory granules (Fig. 3-7).

The C-terminal domain has been postulated to be involved in membrane binding of the protein because of the predicted amphipathic helical segment near its extremity (Seidah et al. 1991; Smeekens et al. 1991). Previous studies that have investigated the association of PC1 with the membrane fraction have not found a requirement of the C-terminal domain for membrane association (Hill et al., 1995; Vindrola and Lindberg, 1992). However, it is possible that some of the methods used to prepare membrane fractions lead to incomplete lysis of the secretory granules in which the C-terminally-truncated form of PC1 would then remain trapped. Studies with carboxypeptidase E (CPE) have suggested a link between the capacity of the protein to associate with membranes and CPE targeting to the secretory granules since the C-terminal region of CPE, which also contains a putative amphipathic α -helix, has been shown to mediate membrane binding of both CPE and an albumin fusion protein (Mitra et al., 1994). Yet the role of membrane binding in targeting CPE to the secretory granules was recently questioned because fusion proteins containing portions of the C-terminal of CPE underwent constitutive secretion even though they appeared to associate with membranes (Varlamov and Fricker, 1996). Although the correlation we have observed between the association of Fc-PC1 fusion proteins with membranes and their sorting to secretory granules could be circumstantial, the dramatic effect of the L⁷⁴⁵P and L⁷⁴⁹P mutations in disrupting both membrane binding and protein sorting, suggests that these interactions are indeed involved in the sorting process. Binding of regulated secretory proteins to the phospholipid constituents of membranes has been shown to occur in an acidic pH-dependent manner (Laine and Lebel, 1999). Whether the interaction of the C-terminal domain of PC1 with specific lipid microdomains is involved in the retention of PC1 in secretory granules remains to be determined.

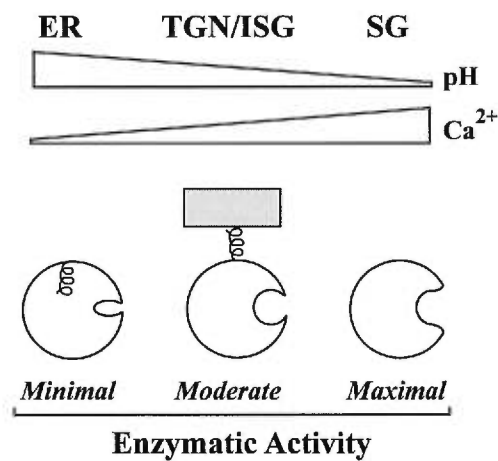


Figure 3-7. A model for the sorting and activation of PC1 in the regulated secretory pathway. The association of the amphipathic α -helix in the C-terminal domain of PC1 with membrane components is postulated to be involved in the efficient retention and subsequent activation of the convertase in maturing granules. PC1 activity is minimal in the endoplasmic reticulum (ER). The acidic and elevated calcium conditions in the trans-Golgi network (TGN) and immature secretory granules (ISG) could induce membrane association and moderate PC1 activity. In maturing granules, the C-terminal domain of PC1 undergoes cleavage, generating maximal PC1 activity in the secretory granules (SG).

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Véronique Brechler for initiating these studies by preparing the PC1ΔC construct and to Dr. Christian Deschepper for critical reading of the manuscript. The infographic advice and assistance of Christian Charbonneau are greatly appreciated. This work was supported by grants from the Medical Research Council. I.J. is the recipient of a graduate scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

REFERENCES

- Arvan, P. and D. Castle. 1998. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem. J.* 332:593-610.
- Benjannet, S., N. Rondeau, L. Paquet, A. Boudreault, C. Lazure, M. Chrétien, and N.G. Seidah. 1993. Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* 294:735-743.
- Brechler, V., W.N. Chu, J.D. Baxter, G. Thibault, and T.L. Reudelhuber. 1996. A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 271:20636-20640.
- Chanat, E. and W.B. Huttner. 1991. Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* 115:1505-1519.
- Colomer, V., G.A. Kicska, and M.J. Rindler. 1996. Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. *J. Biol. Chem.* 271:48-55.
- Cool, D.R., E. Normant, F. Shen, H.C. Chen, L. Pannell, Y. Zhang, and Y.P. Loh. 1997. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell.* 88:73-83.
- De Bie., I., M. Marcinkiewicz, D. Malide, C. Lazure, K. Nakayama, M. Bendayan, and N.G. Seidah. 1996. The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J. Cell Biol.* 135:1261-1275.
- Demaurex, N., W. Furuya, S. D'Souza, J.S. Bonifacino, and S. Grinstein. 1998. Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J. Biol. Chem.* 273:2044-2051.
- Hill, R.M., E.C. Ledgerwood, S.O. Brennan, L.P. Pu, Y.P. Loh, D.L. Christie, and N.P. Birch. 1995. Comparison of the molecular forms of the Kex2/subtilisin-like serine proteases SPC2, SPC3, and furin in neuroendocrine secretory vesicles reveals differences in carboxyl-terminus truncation and membrane association. *J. Neurochem.* 65:2318-2326.
- Irminger, J.C., C.B. Verchere, K. Meyer, and P.A. Halban. 1997. Proinsulin targeting to the regulated pathway is not impaired in carboxypeptidase E-deficient Cpefat/Cpefat mice. *J. Biol. Chem.* 272:27532-27534.

- Jackson, R.S., J.W. Creemers, S. Ohagi, M.L. Raffin-Sanson, L. Sanders, Montague, CT, J.C. Hutton, and S. O'Rahilly. 1997. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* 16:303-306.
- Jutras, I., N.G. Seidah, T.L. Reudelhuber, and V. Brechler. 1997. Two activation states of the prohormone convertase PC1 in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 272:15184-15188.
- Klumperman, J., R. Kuliawat, J.M. Griffith, H.J. Geuze, and P. Arvan. 1998. Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J. Cell Biol.* 141:359-371.
- Kuliawat, R. and P. Arvan. 1994. Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J. Cell Biol.* 126:77-86.
- Laine, J. and D. Lebel. 1999. Efficient binding of regulated secretory protein aggregates to membrane phospholipids at acidic pH. *Biochem. J.* 338:289-294.
- Letourneur, F., E.C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S.D. Emr, H. Riezman, and P. Cosson. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell.* 79:1199-1207.
- Lusson, J., S. Benjannet, J. Hamelin, D. Savaria, M. Chrétien, and N.G. Seidah. 1997. The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem. J.* 326:737-744.
- Mitra, A., L. Song, and L.D. Fricker. 1994. The C-terminal region of carboxypeptidase E is involved in membrane binding and intracellular routing in AtT-20 cells. *J. Biol. Chem.* 269:19876-19881.
- Munro, S. and H.R. Pelham. 1987. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* 48:899-907.
- Nakayama, K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* 327:625-635.
- Natori, S. and W.B. Huttner, 1996. Chromogranin B (secretogranin I) promotes sorting to the regulated secretory pathway of processing intermediates derived from a peptide hormone precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:4431-4436.
- Rovère, C., J. Luis, J.C. Lissitzky, A. Basak, J. Marvaldi, M. Chrétien, N.G. Seidah. 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 $\alpha 5 \beta 1$. *J. Biol. Chem.* 274:12461-12467.
- Schafer, W., A. Stroh, S. Berghofer, J. Seiler, M. Vey, M.L. Kruse, H.F. Kern, H.D. Klenk, and W. Garten. 1995. Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 14:2424-2435.
- Seidah, N.G., M. Marcinkiewicz, S. Benjannet, L. Gaspar, G. Beaubien, M.G. Mattei, C. Lazure, M. Mbikay, M. Chrétien M. 1991. Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol. Endocrinol* 5:111-22.
- Seidah, N.G. and M. Chrétien. 1997. Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr. Opin. Biotech.* 8:602-607.
- Shennan, K.I., N.A. Taylor, J.L. Jermany, G. Matthews, and K. Docherty. 1995. Differences in pH optima and calcium requirements for maturation of the prohormone convertases PC2 and PC3 indicates different intracellular locations for these events. *J. Biol. Chem.* 270:1402-1407.
- Smeekens, S.P., A.S. Avruch, J. LaMendola, S.J. Chan, and D.F. Steiner. 1991. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:340-344.
- Steiner, D.F. 1998. The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:31-39.
- Varlamov, O. and L.D. Fricker. 1996. The C-terminal region of carboxypeptidase E involved in membrane binding is distinct from the region involved with intracellular routing. *J. Biol. Chem.* 271:6077-6083.
- Varlamov, O., L.D. Fricker, H. Furukawa, D.F. Steiner, S.H. Langley, and E.H. Leiter. 1997. Beta-cell lines derived from transgenic Cpe(fat)/Cpe(fat) mice are defective in carboxypeptidase E and proinsulin processing. *Endocrinology* 138:4883-4892.
- Vindrola, O. and I. Lindberg. 1992. Biosynthesis of the prohormone convertase mPC1 in AtT-20 cells. *Mol. Endocrinol.* 6:1088-1094.
- Zhou, A., S. Martin, G. Lipkind, J. LaMendola, and D.F. Steiner. 1998. Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 273:11107-11114.
- Zhou, A., L. Paquet, and R.E. Mains. 1995. Structural elements that direct specific processing of different mammalian subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 270:21509-21516.

- Zhou, Y. and I. Lindberg. 1993. Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J. Biol. Chem.* 268:5615-5623.
- Zhou, Y. and I. Lindberg. 1994. Enzymatic properties of carboxyl-terminally truncated prohormone convertase 1 (PC1/SPC3) and evidence for autocatalytic conversion. *J. Biol. Chem.* 269:18408-18413.
- Zhou, Y., C. Rovère, P. Kitabgi, and I. Lindberg. 1995. Mutational analysis of PC1 (SPC3) in PC12 cells. 66-kDa PC1 is fully functional. *J. Biol. Chem.* 270:24702-24706.
- Zhu, X. and I. Lindberg. 1995. 7B2 facilitates the maturation of proPC2 in neuroendocrine cells and is required for the expression of enzymatic activity. *J. Cell Biol.* 129:1641-1650.

CHAPITRE 4

ARTICLE

Prohormone Convertase PC5 Is a Candidate Processing Enzyme for Prorenin in the Human Adrenal Cortex

Chantal Mercure, Isabelle Jutras, Robert Day, Nabil G. Seidah,
Timothy L. Reudelhuber

Laboratoires de Biochimie Moléculaire de l'Hypertension et de Biochimie
Neuroendocrinienne, Institut de Recherches Cliniques de Montréal

Contribution personnelle: Analyse des caractéristiques de maturation de la prorénine humaine par PC5-A dans un modèle de cellules co-transfectées.

Hypertension. 1996; 28: 840-846.

Prohormone Convertase PC5 Is a Candidate Processing Enzyme for Prorenin in the Human Adrenal Cortex

Chantal Mercure, Isabelle Jutras, Robert Day, Nabil G. Seidah, Timothy L. Reudelhuber

Abstract We isolated a cDNA clone encoding the human prohormone convertase PC5 from human adrenal gland mRNA. The deduced protein sequence would encode a 915 amino acid preproPC5 that shares a very high degree of homology with previously cloned rat and mouse homologues. PC5 mRNA was detected in multiple human tissues, including the brain, adrenal and thyroid glands, heart, placenta, lung, and testes. PC5 mRNA was undetectable in the liver and was present at lower levels in skeletal muscle, kidney, pancreas, small intestine, and stomach. Co-transfection of human PC5 and human prorenin expression vectors in cultured GH₄C1 cells led to secretion of active renin. The

activation of human prorenin by PC5 depended on a pair of basic amino acids at positions 42 and 43 of the prorenin prosegment and occurred only in cells containing dense core secretory granules. Human PC5 was colocalized with renin by immunohistochemistry in the zona glomerulosa of the adrenal gland, suggesting that it could participate in the activation of a local renin-angiotensin system in the human adrenal cortex. (*Hypertension*. 1996;28:840-846.)

Key Words • renin-angiotensin system • renin • adrenal glands

Renin is an aspartyl protease that contributes importantly to cardiovascular physiology and pathophysiology through its key role in the synthesis of the vasoactive octapeptide angiotensin II. Although the kidney is the primary source of circulating active renin, several additional tissues, including the pituitary and adrenal glands, placenta, uterus, ovary, testes, heart, vasculature, and brain, express the renin gene (reviewed in References 1 through 4). The presence of additional components of the RAS in these tissues, including angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptors, has led to the proposal that certain tissues might contain a locally active tissue RAS, although the actual function of the tissue RAS is still largely a matter of conjecture. Renin is first synthesized as an enzymatically inactive precursor, prorenin, which is converted to active renin by the proteolytic removal of a 43-amino acid amino terminal prosegment. The activity of the RAS within any given tissue would therefore depend on the existence of proteolytic enzymes capable of converting prorenin to active renin and on the expression of such PPEs in the same cells that express prorenin. The identity of the enzyme or enzymes responsible for the proteolytic activating human prorenin *in vivo* is still uncertain. Furthermore, it is possible that multiple PPEs exist in humans, and these may differ among renin-producing tissues. Biochemical and microscopic studies of renin in the kidney suggest that candidate PPEs should be selective for cleavage of human prorenin at Lys⁴², Arg⁴³ of the

prosegment⁵ and would be active in secretory granules of the juxtaglomerular cells.⁶ The lysosomal enzyme cathepsin B has been colocalized with human renin/prorenin in the secretory granules of juxtaglomerular cells and human pituitary lactotrophs^{7,8} and has been shown to cleave human prorenin *in vitro* with a high affinity and selectivity for the proper cleavage site.⁹ The prohormone convertase PC1 has also been shown to cleave human prorenin with the correct site and organelle specificity in transfected cells¹⁰ and to colocalize with renin in the adrenal medulla and derived tumors¹¹ but not in juxtaglomerular cells.¹²

In an effort to identify novel PPEs, we recently determined the distribution of processing enzymes in an established renin-expressing tissue culture cell line derived from an oncogene-induced mouse tumor (As4.1 cells¹³). We found one such enzyme, the mouse prohormone convertase PC5, to be capable of partially activating human prorenin (I.J. and T.L.R., unpublished data, 1996). In the current study, we describe the isolation and characterization of a human homologue of this enzyme, hPC5. We demonstrate that hPC5 proteolytically activates human prorenin with the expected site and organelle specificity and that it is coexpressed with prorenin in the zona glomerulosa of the adrenal cortex.

Methods

cDNA Library Construction and Screening

A cDNA library derived from total human adrenal RNA was constructed by Stratagene in the phage vector Uni-Zap XR. Six hundred thousand phage plaques were screened initially with the use of radioactive probes and standard methodologies.¹⁴ The initial hybridization probe was a 320-bp DNA fragment derived from RT-PCR of human brain RNA using information derived from an unidentified human cDNA sequence tag in GenBank (accession No. M85522) with a high degree of similarity to the previously cloned mouse PC5.¹⁵ Fragment labeling was carried out with [³²P]dCTP and a random primer labeling kit (Boehringer-Mannheim Canada) according to the manufacturer's in-

Received February 23, 1996; first decision April 10, 1996; revision accepted June 25, 1996.

From the Laboratory of Molecular Biochemistry of Hypertension (C.M., I.J., T.L.R.) and the JA DeSève Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology (R.D., N.G.S.), Clinical Research Institute of Montreal (Quebec, Canada).

Reprint requests to Timothy L. Reudelhuber, IRCM, 110, avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec, H2W 1R7 Canada.

© 1996 American Heart Association, Inc.

Selected Abbreviations and Acronyms

PCR = polymerase chain reaction
 PPE = prorenin processing enzyme
 RAS = renin-angiotensin system
 RT = reverse transcriptase

structions. One positive hybridizing phage (hPC5A) was identified. Its insert was sequenced in its entirety with the dideoxy-chain termination method and found to code for a 1150-bp cDNA with a high degree of sequence similarity to mouse PC5 (data not shown). A 1070-bp fragment (excluding the polyadenylate tail) was excised from hPC5A, labeled, and used to rescreen an additional 600 000 phages from the cDNA library. A second phage clone (hPC5B) was isolated and found to contain a 1807-bp cDNA insert overlapping hPC5A and extending toward the 5' end of the cDNA (Fig 1).

RT-PCR

One microgram of polyA⁺ RNA from total human adrenal (Clontech Laboratories) was subjected to RT-PCR with the use of a published procedure¹⁶ and the following oligonucleotides: The forward oligonucleotide was derived from a region corresponding to the signal peptide of mouse PC5.¹⁵ An artificial *Hind*III restriction enzyme cleavage site added to the 5' end of the amplified fragment for the purpose of cloning is underlined: 5'-CCAAGCTTGGCTGCTGTGCGTGCTGGC-3'. The reverse oligonucleotide was derived from the 5' end of the phage hPC5B. An internal *Bgl*II restriction enzyme site is underlined: 5'-CTGCCTCAGATCTGTAGTG-3'.

The entire RT-PCR reaction was repeated four times, and four independently derived clones of the amplified fragment were sequenced and the sequences compared. The sequence submitted to GenBank (accession No. U49114) represents the consensus sequence, defined as any nucleotide appearing in three of four clones.

Northern Blot Analysis

Tissue distribution of PC5 mRNA was determined by hybridization of commercially purchased nitrocellulose filters containing aliquots (2 µg) of polyadenylate RNA from various human tissues (Clontech Laboratories). The probe used was a complementary RNA derived from the full-length hPC5 cDNA. Probe labeling and hybridization were carried out as previously described.¹⁷

Expression Vector Construction

A cDNA fragment from the *Kpn* I site (Fig 1) to just past the stop codon was excised from the phage hPC5B and combined with a *Kpn* I to *Hind*III (see above) fragment derived from portions of two independent RT-PCR clones (so as to eliminate errors arising from the *Taq* polymerase). A region corresponding to the first 12 amino acids of the signal peptide derived from mouse PC5 was attached to the 5' end by overlap-extension PCR.¹⁸ Thus, the entire cDNA, encoding amino acids 1 through 16 derived from the mouse PC5 signal peptide and the remainder from hPC5, was subcloned into the expression vector RSV globin,¹⁹ which places the cDNA under the control of the Rous sarcoma virus promoter and provides a 3' intron and polyadenylation signal from the rabbit β-globin gene. The entire subcloned fragment was subsequently verified by DNA sequencing.

Cell Culture and Transfection

GH₄C1 cells were plated in six-well culture dishes at a density of 5 × 10⁵ cells per well. Twenty-four hours later, the medium was changed, and the cells were transfected by the (diethylamino)ethyl-dextran method with the use of a commercial kit (CellPfect Transfection kit, Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions. Each well received 0.18 µg of either

the hPC5 expression vector or a neutral plasmid vector (pUC18) and 0.18 µg of an expression vector for human prorenin (pRHR1100) or its equivalents in which amino acids 42 or 43 of the prorenin prosegment were mutated to alanine (K/A-2 and R/A-1, respectively²⁰). Supernatants were collected 30 hours after transfection and assayed for prorenin and renin content as previously described.²⁰ To verify that conversion of the prorenin occurred in the secretory granules, we stimulated GH₄C1 cells transfected with the human prorenin and hPC5 expression vectors to release secretory granules by depolarization using a previously published technique.²¹ Forty hours after cotransfection, the culture medium in parallel wells of transfected cells was replaced with prewarmed medium supplemented to a final concentration of 50 mmol/L with either NaCl (control) or KCl (secretagogue). The media were collected after 20 minutes and assayed for renin/prorenin. A potassium-dependent increase in the percentage of active renin contained in cell supernatants was taken as an indication of active renin release from the secretory granules of the transfected cells. Results shown in Fig 5 represent the mean of three independent transfection experiments.

Immunolocalization of hPC5 in Human Tissues

Human tissue was obtained postmortem (kidney and adrenal gland) or postpartum (placental cotyledon), fixed in Bouin's solution, and embedded in paraffin. For immunolocalization, 5-µm sections were mounted on gelatin-coated slides, deparaffinized, and incubated with a 1:50 dilution of a polyclonal rabbit antiserum raised against a peptide corresponding to the N-terminal 16 amino acids of rat PC5 (PC5.MAP antibody) or a 1:200 dilution of a polyclonal rabbit antiserum against recombinant human prorenin. For kidney and placental specimens, immune complexes were revealed by incubation with protein A-colloidal gold (15-nm particles) synthesized from tetrachloroauric acid (BDH) according to the method of Ghitescu and Bendayan.²² Gold particles were enhanced for viewing in the light microscope by incubation with silver (IntenSEM Silver Enhancement kit, Amersham Life Science), and sections were counterstained with hematoxylin and methyl green. Immune complexes on human adrenal sections were detected with a 1:200 dilution of biotin-labeled donkey anti-rabbit IgG and a 1:300 dilution of streptavidin-horseradish peroxidase complex (Amersham Life Science) and were incubated with diaminobenzidine and hydrogen peroxide (Sigma Chemical Co) as chromogen. All positive staining patterns were subsequently verified for specificity by omission of the first antibody.

Results

The primary sequence of hPC5 is shown in Fig 2. We were unable to clone the extreme 5' end of the cDNA either by the RACE protocol¹⁶ or by using oligonucleo-

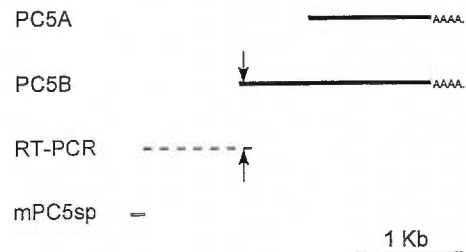


Fig 1. Schematic diagram of isolated cDNAs encoding human prorenin convertase hPC5. Restriction enzyme sites used in subcloning are denoted. Solid lines represent clones isolated from a phage library; hatched lines denote the portion of the cDNA isolated by RT-PCR of human adrenal mRNA; double line represents the portion of the mouse PC5 cDNA (corresponding to the amino terminus of the signal peptide) used to complete the cDNA for expression. The arrow shows the location of a unique *Kpn* I restriction site used to join the 2 cDNA fragments for construction of the expression vector.

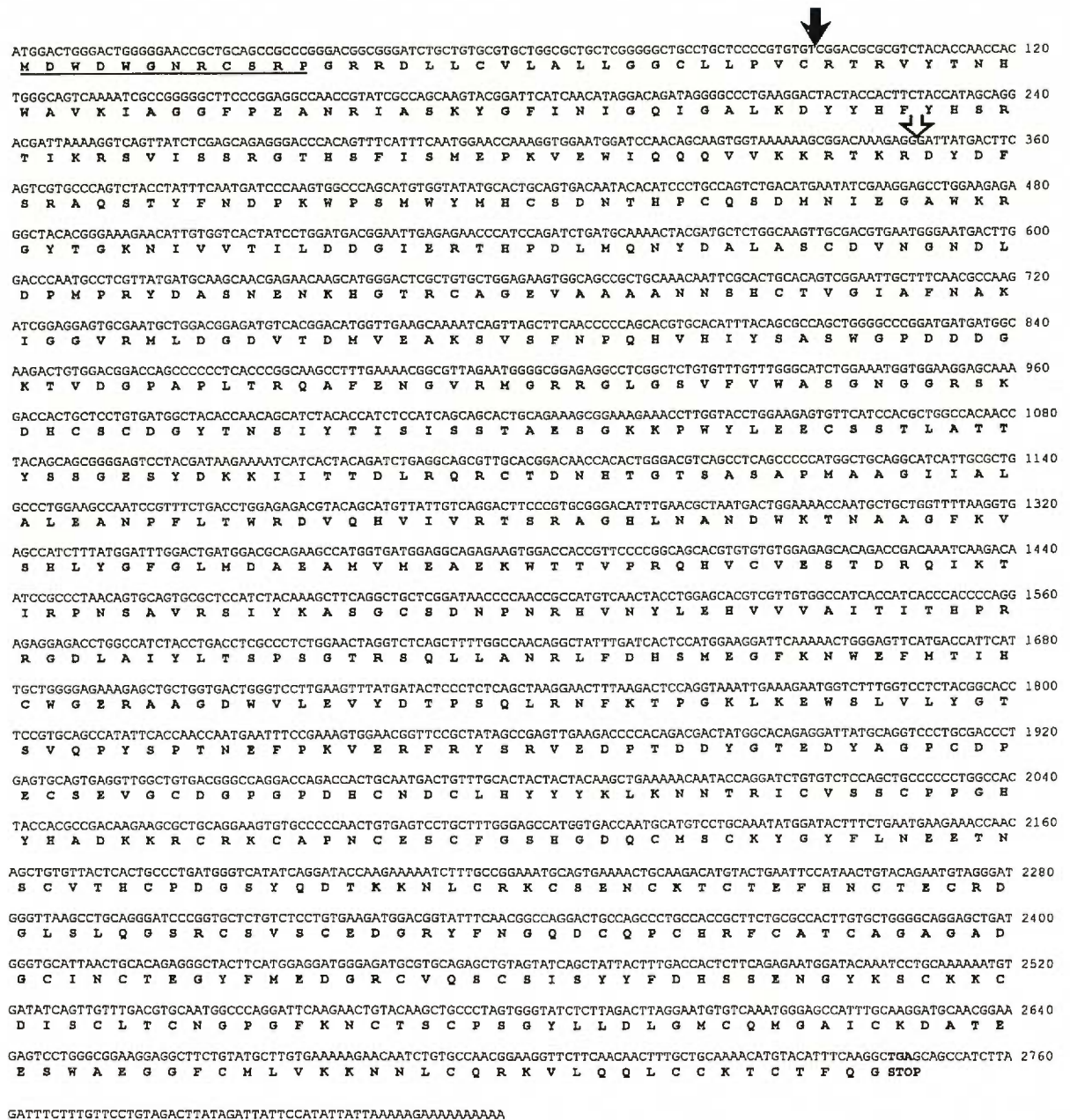


Fig 2. Nucleotide and derived protein sequence of human prohormone convertase hPC5. Proposed signal peptide (solid arrow) and prosegment (open arrow) cleavage sites are denoted based on data from mouse PC5.¹⁵ The underlined sequence represents the portion of the signal peptide from mouse PC5 used in expression vector construction.

tides based on the published sequence of mouse PC5,^{15,23} possibly because of a high G/C content of the cDNA in this region. However, on the basis of the published cDNA sequences for rat and mouse PC5,¹⁵ we are confident that we isolated all but the 5'-most portion of the cDNA corresponding to the first 12 amino acids of the signal peptide. By comparison with the published sequence of mouse PC5, we predicted that the cDNA isolated would code for a preproPC5 of 915 amino acids, including a signal peptide and a prosegment of 32 and 84 amino acids, respectively. The deduced sequence of hPC5 was 88% identical to the previously published mouse PC5 cDNA and 96% identical to the mouse PC5 protein.

Northern analysis of mRNA from a variety of human tissues revealed a major band of approximately 6.6 kb and

a minor band of approximately 3.8 kb (Fig 3). PC5 RNA was detected in the brain, heart, placenta, lung, thyroid gland, and testes and at lower levels in the skeletal muscle, kidney, pancreas, small intestine, and stomach. In the adrenal gland, PC5 was particularly enriched in the cortex (Fig 3).

Because PC5 RNA appears to be expressed in a number of tissues previously reported to contain active renin, we tested the ability of hPC5 to cleave human prorenin in a cell cotransfection assay (Fig 4A). As has been previously reported,¹⁰ when cultured rat somatotrophic GH₄C1 cells were cotransfected with an expression vector encoding human prorenin and a neutral plasmid vector, only unprocessed prorenin was secreted into the culture supernatant. In contrast, if the human prorenin expression vector was

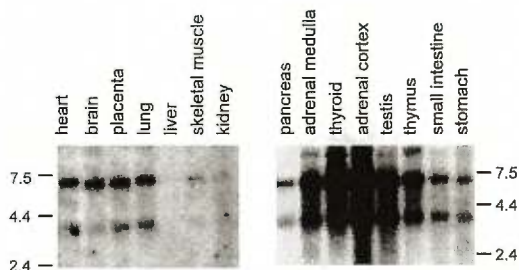


FIG 3. Distribution of pro-hormone convertase PC5 RNA in various human tissues. Each lane contains 2 μ g polyadenylate RNA. Filters were hybridized with a radiolabeled probe for human PC5 as described in "Methods." Shown at left is the migration of single strand size standards in kilobases. Note that the absolute signal cannot be compared between the two filters as they were of different ages and hybridized at different times.

cotransfected with an expression vector encoding hPC5, a portion of the expressed prorenin was secreted as active renin. Coexpression of hPC5 with prorenin mutated at either of the basic residues forming the native cleavage site (lysine 42 or arginine 43) prevented activation. These results suggest that hPC5 activates human prorenin by proteolytic cleavage at the site previously reported for activation of renin in humans.⁵ Although hPC5 cleaved human prorenin in GH₄C1 cells, there was no apparent increase in active renin secretion when cotransfections were carried out in Chinese hamster ovary (CHO) cells (Fig 4B). One obvious difference in the CHO cell line compared with GH₄C1 cells is their lack of secretory granules, suggesting that either hPC5, human prorenin, or both require the secretory granule environment for this proteolytic step. This conclusion is supported by the acute increase in active renin detected in the supernatants of cotransfected GH₄C1 cells treated for 20 minutes with potassium chloride (Fig 5), a depolarizing agent that causes the release of secretory granules.²¹

Using a polyclonal antibody raised against a peptide derived from mouse PC5, we studied the distribution of hPC5 in several human tissues (Fig 6). To date, we have been unable to detect staining for PC5 in the human kidney, although our sections stained positively for renin. In the placental cotyledon, PC5 was located in the syncytiotrophoblast layer of the chorionic villi, and antibody against renin stained primarily the chorionic mesoderm. In the adrenal gland, the antibodies against both renin and PC5 showed a preferential staining of zona glomerulosa cells in the adrenal cortex, with very little staining of the capsule and zona fasciculata. No staining was evident with omission of the first antibody (data not shown). Thus, our immunohistochemical studies would suggest that of the three tissues studied, it is likely that prorenin and PC5 are clearly colocalized only in the zona glomerulosa of the human adrenal cortex.

Discussion

In the present study, we describe the cloning and expression of the human pro-hormone convertase PC5 and its activity as a human PPE. Cotransfection assays in cultured cells demonstrated that hPC5 activates human prorenin with the expected site specificity and that this cleavage most likely occurs in dense core secretory granules. In addition, immunohistochemistry of human tissues showed colocalization of hPC5 with renin in the

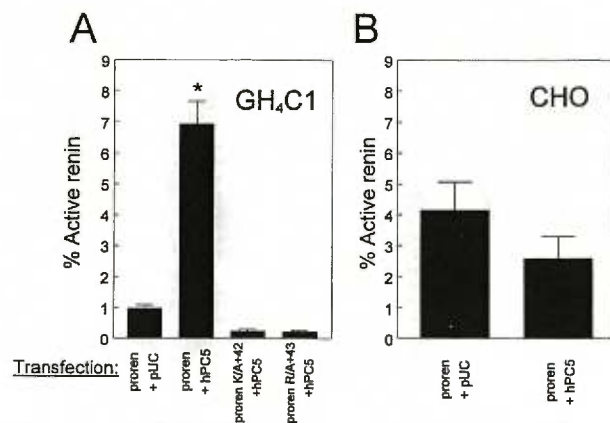


FIG 4. Human pro-hormone convertase hPC5 cleaves human prorenin with site and cell specificity. A, GH₄C1 cells were cotransfected with expression vectors for the indicated proteins. Supernatants were collected 30 hours after transfection and assayed for percent active renin [(Active Renin/Total Renin)×100]. Bars represent mean±SE of nine independent transfections. **P*<.0001 compared with prorenin+pUC, as determined by the Mann-Whitney nonparametric test. B, Resulting secretion of active renin after cotransfection of Chinese hamster ovary (CHO) cells with an expression vector for prorenin and either a control plasmid (pUC) or hPC5. Bars represent mean±SE of three independent transfections.

zona glomerulosa of the adrenal cortex. Several lines of evidence suggest that the human adrenal gland contains a physiologically important local RAS. First, RNA encoding angiotensinogen and renin has been detected in preparations from the human adrenal zona glomerulosa, fasciculata, and medulla,^{24,25} confirming that both renin and its substrate are synthesized within the human adrenal gland. Second, angiotensin-converting enzyme inhibition or blockade of angiotensin receptors inhibits aldosterone release from human adrenal tissue explants,²⁶ suggesting that the local RAS plays an active role in the regulation of aldosterone secretion from the adrenal gland. Third, tissue explants of human adrenal cortex and aldosterone-secreting adenomas secrete small quantities of active renin,^{24,26,27} suggesting that the adrenal cortex expresses a PPE capable of activating human prorenin. Our current results suggest that PC5 could be the PPE responsible for activation of renin in

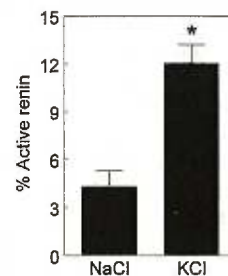


FIG 5. Active renin generation in secretory granules of cotransfected GH₄C1 cells. Parallel wells of GH₄C1 cells cotransfected with expression vectors for human prorenin and human PC5 were incubated for 20 minutes in medium containing either 50 mmol/L NaCl (control) or 50 mmol/L KCl (a depolarizing agent that causes acute release of secretory granules). Percent active renin was calculated as described in Fig 4 legend. Bars represent mean±SE of three independent transfections. **P*<.005, Student's *t* test.

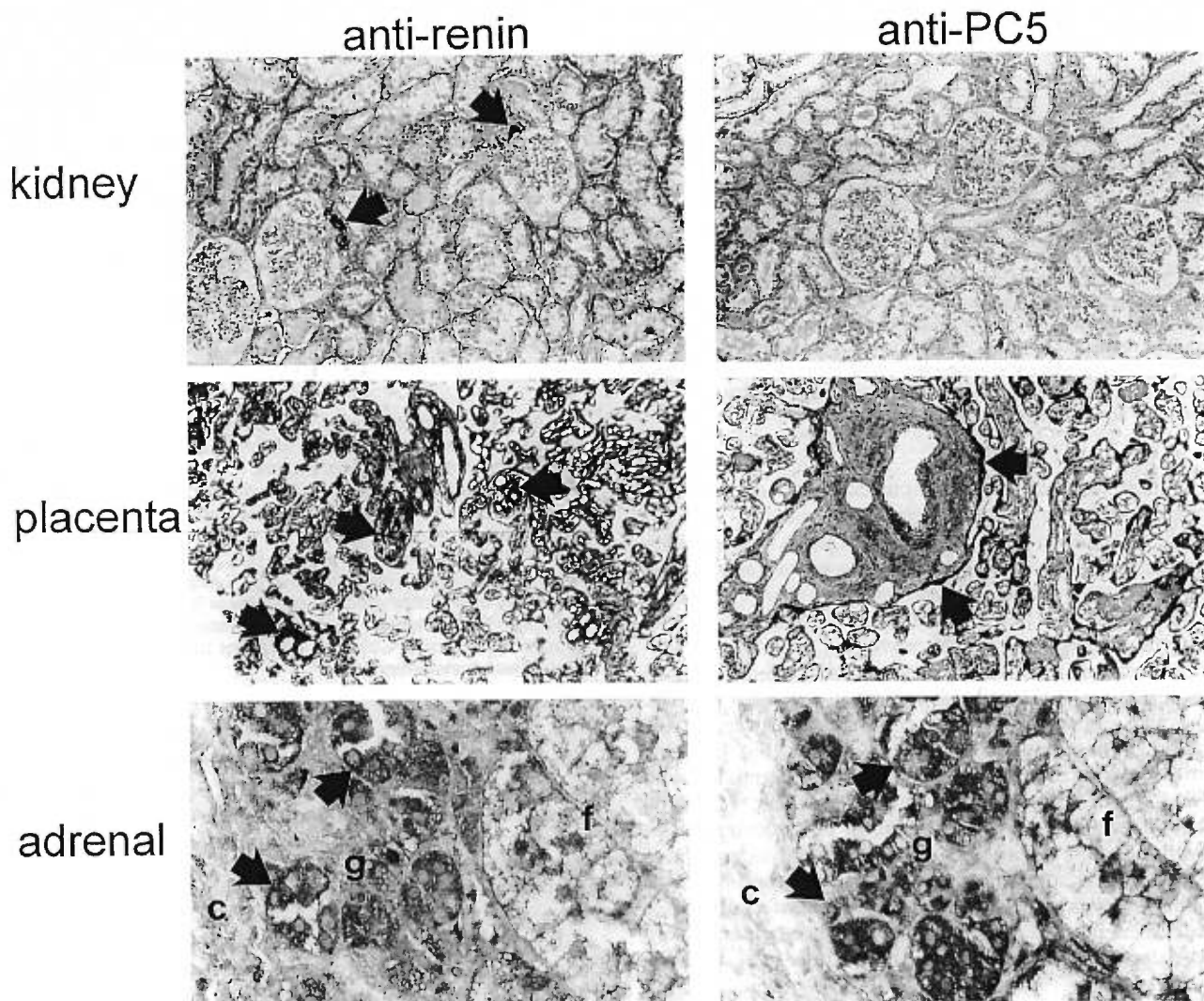


FIG 6. Immunodetection of human prohormone convertase hPC5 and renin/prorenin in renal cortex, human placental cotyledon, and adrenal gland. Positively stained areas are denoted by solid arrows. Sections in adrenal cortex are separated by $5 \mu\text{mol/L}$ to show colocalization in cells of the zona glomerulosa (g) and absence of staining in the capsule (c) and zona fasciculata (f). Magnifications $\times 25$ (kidney and placenta) and $\times 80$ (adrenal gland).

the human adrenal cortex, as both renin and hPC5 were immunodetectable in the zona glomerulosa. Additional circumstantial evidence supports this conclusion. First, centrifugal fractionation of adrenal cortical cells has revealed that renin is contained in the "granular" fraction, which is of intermediate density between vesicles and lysosomes.²⁸ As our current study suggests that PC5 cleaves human prorenin only in cells containing secretory granules, renin would be in the appropriate intracellular compartment to be activated by PC5 in the adrenal cortex. Second, rats transgenic for mouse *Ren-2* renin [TGR(mRen-2)27] display fulminant hypertension,²⁹ which correlates best with the expression of the mouse prorenin in the adrenal gland.³⁰⁻³² As previous studies have demonstrated that PC5 is capable of activating mouse *Ren-2* prorenin but not rat prorenin (Reference 23 and data not shown), it is possible that the TGR(mRen-2)27 transgenic rat is a model for activation of a tissue RAS by the fortuitous juxtaposition of prorenin with an appropriate PPE in the adrenal cortex. These results also raise the possibility that the tissue

distribution of PPEs and their apparent selectivity in activating prorenin from different species could lead to differing functions of the tissue RAS in rodents and humans.

The principal source of circulating active renin in humans is the juxtaglomerular cells of the kidney. Although low levels of hPC5 RNA were detected by Northern blot analysis in a sample of total kidney mRNA (Fig 3), we were unable to localize PC5 immunostaining in kidney sections (Fig 6), raising the possibility that PC5 is expressed at low levels in diffuse cell types in the kidney. Thus, although these results do not formally rule out PC5 as a PPE in the kidney, our inability to detect it in juxtaglomerular cells makes it unlikely that it plays a major role in the production of renal renin. In contrast, relatively abundant amounts of PC5 mRNA and protein were detected in the placenta although evidence suggests that placental cells in culture³³ and in vivo³⁴ secrete only prorenin. However, immunostaining revealed that the cells producing PC5 and prorenin in the human placenta are distinct. It is also unlikely that PC5 would activate prorenin once

the two proteins are secreted because of the apparent requirement of a granular environment for the cleavage of prorenin by hPC5 in transfected cells. Thus, in contrast to the case in the adrenal gland, it is unlikely that PC5 expressed in the human placenta would activate placental prorenin. In the mouse, two forms of PC5 have been predicted on the basis of cloned cDNAs. The first would be analogous to the hPC5 cDNA described in the present study and to that cloned from rat tissues,^{15,23} and the second, called PC6B, would be extended at its 3' end because of a differential RNA splicing event.³⁵ Although the hPC5 cDNA we have cloned is only roughly 3 kb in length, the major RNA band seen in human tissues is approximately 6.6 kb long. The identity of the longer band hybridizing to the hPC5 probe is currently unknown. It should be noted that neither of the cDNA clones isolated from a screening of 1.2 million phages from the adrenal library was extended at its 3' end (Fig 1), although the probes used in their isolation cover the region of homology with the mouse PC6B variant.³⁵ In mouse tissues, expression of the PC6B variant is restricted to few tissues,³⁵ whereas the abundance of the 6.6-kb variant detected with the hPC5 probe is directly proportional to the abundance of the 3.8-kb band. Hybridization of RNA blots from rodent tissues with a PC5 probe also has revealed RNA bands of 3.8, 6.5, and 7.5 kb,^{15,35} and the use of a PC5-specific probe has revealed a band of 6.5 kb. Thus, it is possible that additional PC5 RNA species exist in mammals that are extended at their 5' ends. Alternatively, human tissues may be particularly enriched in a homologue to PC6B that was not picked up in our screenings. Recent data suggest that the alternate C-terminal tail present on PC6B may serve to retain the enzyme in the Golgi network, whereas the "short" form of mouse PC5 is targeted to dense core secretory granules (N.G.S., unpublished observations, 1996). These data and the results of our cotransfection assays (Fig 4) would suggest that the "short" form of hPC5 described here is the form that would be active in renin processing in secretory granules. The PC5 enzymes isolated from humans and mice show a remarkably high degree of conservation at the nucleotide and protein sequence levels. This degree of similarity is higher than that seen for the other mammalian prohormone convertase enzymes that seem to diverge in the C-terminal half of the enzyme.^{36,37} This high degree of sequence conservation may reflect an essential function of PC5 (and the C-terminus of PC5) in mammals.

Acknowledgments

These studies were supported by grants from the Medical Research Council of Canada to T.L.R., N.G.S., and R.D. T.L.R. is the recipient of the Merck-Frosst Chair in Clinical and Molecular Pharmacology. I.J. is funded by a graduate studentship from the National Science and Engineering Research Council of Canada. R.D. is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). The authors wish to thank Drs C.F. Deschepper and G. Thibault for a critical reading of the manuscript and V. Jodoin for secretarial assistance.

References

1. Frohlich ED, Iwata T, Sasaki O. Clinical and physiologic significance of local tissue renin-angiotensin systems. *Am J Med.* 1990;87(suppl 6B):6B-19S-6B-23S.
2. Johnston CI, Burrell LM, Perich R, Jandeleit K, Jackson B. The tissue renin-angiotensin system and its functional role. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1992;19:1-5.
3. Gardner DG, Gertz BJ, Deschepper CF, Kim DY. Gene for the rat atrial natriuretic peptide is regulated by glucocorticoids in vitro. *J Clin Invest.* 1988;82:1275-1281.
4. Lee MA, Bohm M, Paul M, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: their role in cardiovascular disease. *Circulation.* 1993;87(suppl IV):IV-7-IV-13.
5. Do YS, Shinagawa T, Tam H, Inagami T, Hsueh WA. Characterization of pure human renal renin. *J Biol Chem.* 1987;262:1037-1043.
6. Taugner R, Kim SJ, Murakami K, Waldherr R. The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells: immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment. *Histochemistry.* 1987;86:249-253.
7. Taugner R, Hackenthal E. On the character of the secretory granules in juxtaglomerular epithelioid cells. *Int Rev Cytol.* 1988;110:93-131.
8. Saint-Andre JP, Rohmer V, Pinet F, Rousselet MC, Bigorgne JC, Corvol P. Renin and cathepsin B in human pituitary lactotroph cells: an ultrastructural study. *Histochemistry.* 1989;91:291-297.
9. Wang PH, Do YS, Macaulay L, Shinagawa T, Anderson PW, Baxter JD, Hsueh WA. Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J Biol Chem.* 1991;266:12633-12638.
10. Benjannet S, Reudelhuber T, Mercure C, Rondeau N, Chretien M, Seidah NG. Proprotein conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity, and intracellular environment: cell type-specific processing of human prorenin by the convertase PC1. *J Biol Chem.* 1992;267:11417-11423.
11. Konoshita T, Gasc JM, Villard E, Takeda R, Seidah NG, Corvol P, Pinet F. Expression of PC2 and PC1/PC3 in human pheochromocytomas. *Mol Cell Endocrinol.* 1994;99:307-314.
12. Reudelhuber TL, Ramla D, Chiu L, Mercure C, Seidah NG. Proteolytic processing of human prorenin in renal and non-renal tissues. *Kidney Int.* 1994;46:1522-1524.
13. Sigmund CD, Okuyama K, Ingelfinger J, Jones CA, Mullins JJ, Kane C, Kim U, Wu CZ, Kenny L, Rustum Y, Dzau VJ, Gross KW. Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J Biol Chem.* 1990;265:19916-19922.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
15. Lussion J, Vieau D, Hamelin J, Day R, Chretien M, Seidah NG. cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:6691-6695.
16. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York, NY: John Wiley & Sons, Inc; 1996.
17. Day R, Schafer MK, Watson SJ, Chretien M, Seidah NG. Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol Endocrinol.* 1992;6:485-497.
18. Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* 1989;77:61-68.
19. Chu WN, Baxter JD, Reudelhuber TL. A targeting sequence for dense core secretory granules resides in the protein moiety of human prorenin. *Mol Endocrinol.* 1990;4:1905-1913.
20. Chu WN, Mercure C, Baxter JD, Reudelhuber TL. Molecular determinants of human prorenin processing. *Hypertension.* 1992;20:782-787.
21. Scammell JG, Burrage TG, Dannies PS. Hormonal induction of secretory granules in a pituitary tumor cell line. *Endocrinology.* 1986;119:1543-1548.
22. Ghitescu L, Beldayan M. Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes. *J Histochem Cytochem.* 1990;38:1523-1530.
23. Nakagawa T, Hosaka M, Torii S, Watanabe T, Murakami K, Nakayama K. Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE-4. *J Biochem.* 1993;113:132-135.
24. Racz K, Pinet F, Gasc JM, Guyene TT, Corvol P. Coexpression of renin, angiotensinogen, and their messenger ribonucleic acids in adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75:730-737.
25. Paul M, Wagner J, Dzau VJ. Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues: quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J Clin Invest.* 1993;91:2058-2064.
26. Fallo F, Pistorello M, Pedini F, D'Agostino D, Mantero F, Boscaro M. In vitro evidence for local generation of renin and angiotensin III/III immunoreactivity by the human adrenal gland. *Acta Endocrinol.* 1991;125:319-330.
27. Sarzani R, Fallo F, Dessi-Fulgheri P, Pistorello M, Lanari A, Paci VM, Mantero F, Rappelli A. Local renin-angiotensin system in human adrenals and aldosteronomas. *Hypertension.* 1992;19:702-707.

28. Mizuno K, Hoffman LH, McKenzie JC, Inagami T. Presence of renin secretory granules in rat adrenal gland and stimulation of renin secretion by angiotensin II but not by adrenocorticotropin. *J Clin Invest.* 1988;82:1007-1016.
29. Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature.* 1990;344:541-544.
30. Yamaguchi T, Tokita Y, Franco-Saenz R, Mulrow PJ, Peters J, Ganten D. Zonal distribution and regulation of adrenal renin in a transgenic model of hypertension in the rat. *Endocrinology.* 1992;131:1955-1962.
31. Rocco S, Rebuffat P, Cimolato M, Opocher G, Peters J, Mazzocchi G, Ganten D, Mantero F, Nussdorfer GG. Zona glomerulosa of the adrenal gland in a transgenic strain of rat: a morphologic and functional study. *Cell Tissue Res.* 1994;278:21-28.
32. Tokita Y, Franco-Saenz R, Mulrow PJ, Ganten D. Effects of nephrectomy and adrenalectomy on the renin-angiotensin system of transgenic rats TGR(mRen2)27. *Endocrinology.* 1994;134:253-257.
33. Duncan KG, Haidar MA, Baxter JD, Reudelhuber TL. Regulation of human renin expression in chorion cell primary cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:7588-7592.
34. Lenz T, James GD, Laragh JH, Sealey JE. Prorenin secretion from human placenta perfused in vitro. *Am J Physiol.* 1991;260:E876-E882.
35. Nakagawa T, Murakami K, Nakayama K. Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. *FEBS Lett.* 1993;327:165-171.
36. Seidah NG, Hamelin J, Gaspar AM, Day R, Chretien M. The cDNA sequence of the human pro-hormone and pro-protein convertase PC1. *DNA Cell Biol.* 1992;11:283-289.
37. Seidah NG, Day R, Marcinkiewicz M, Chretien M. Mammalian paired basic amino acid convertases of prohormones and proproteins. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;680:135-146.

CHAPITRE 5

ARTICLE

Prorenin Processing by Cathepsin B *in vitro* and in Transfected Cells.

Isabelle Jutras, Timothy L. Reudelhuber

Laboratoire de Biochimie Moléculaire de l'Hypertension
Institut de Recherches Cliniques de Montréal

FEBS Letters. (1999); 443: 48-52.

Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells

Isabelle Jutras, Timothy L. Reudelhuber*

Laboratory of Molecular Biochemistry of Hypertension, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West, Montreal, Que. H2W 1R7, Canada

Received 14 December 1998

Abstract Renin, which catalyzes the initial proteolytic cleavage reaction in the production of angiotensins, is first synthesized as a zymogen, prorenin, and requires the proteolytic removal of an amino-terminal prosegment for activation in vivo. The lysosomal hydrolase cathepsin B has been proposed as a prorenin processing enzyme based on reports of its co-localization with renin in the secretory granules of certain tissues and its ability to activate prorenin in vitro. In the current study, scanning mutagenesis was used to identify the amino acids which determine the site selectivity of prorenin cleavage by human cathepsin B in vitro. Co-expression assays in AtT-20 cells were also used to test for the ability of cathepsin B to cleave human prorenin within cells. Our results suggest that a basic lysine residue at the –2 position from the cleavage site is required for cathepsin B cleavage of prorenin in vitro and that the structure of prorenin itself may account for the selection of the proper cleavage site. In addition, although cathepsin B appears to be correctly sorted to lysosomes, the enzyme exhibits prorenin processing activity in transfected AtT-20 cells, raising the question of the cellular localization in which the processing event occurs.

© 1999 Federation of European Biochemical Societies.

Key words: Prorenin; Renin; Cathepsin B; Protein processing

1. Introduction

The aspartyl protease renin catalyzes the rate-limiting step in the generation of angiotensins by cleaving circulating angiotensinogen in the renin angiotensin system (RAS). Although the main source of plasma active renin is the kidney [1], many other tissues express the renin gene [2–5]. Some of these tissues have been shown to express the other components of the RAS suggesting the existence of locally active tissue RASs. Like many proteases, renin is first synthesized as a larger inactive precursor, prorenin. In humans, processing of prorenin to active renin involves the proteolytic cleavage of a 43 amino acid prosegment following a pair of basic amino acids (Lys-Arg) and occurs specifically in secretory granules [6]. Indeed, cultured cells devoid of these organelles are unable to process prorenin in transfection assays [7]. In vivo, it is possible that multiple prorenin processing enzymes (PPE) exist and are active in different renin-producing tissues [8,9].

Cathepsin B was first proposed as a renal PPE on the basis of its ability to cleave prorenin in vitro [10] and more recently, on its capability to process prorenin co-transfected with cathepsin B in GH₃C1 cells [11]. Immunohistochemistry studies have also indicated that renin and cathepsin B are co-localized in granules of different tissues: epithelial cells of the renal

proximal tubule [12], human pituitary lactotrophs [13], mouse adrenocortical cells [14] and submandibular gland [15], rat anterior pituitary gonadotrophs [16] and juxtaglomerular cells [17]. Cathepsin B is most commonly known as a lysosomal cysteine protease of the papain superfamily that possesses endopeptidase as well as exopeptidase activities with complex pH dependencies [18]. Its endopeptidase activity was reported to show broad specificity with a preference for basic (particularly Arg) and aromatic (particularly Phe) residues at the –2 position from the cleavage site [19]. However, these data have mostly been established using synthetic peptide substrates and little evidence exists regarding the amino acids important for the selection of the proper cleavage site by cathepsin B with protein substrates like prorenin.

Cathepsin B is synthesized as a glycosylated zymogen of 39 kDa that is converted to a 33 kDa active form by the proteolytic removal of the prosegment. The activation of procathepsin B has been proposed to result from an intramolecular autocatalytic event that occurs primarily within the lysosome in the pH range of 4–6 [20]. Additional processing of active cathepsin B involves an internal cleavage that generates the active two-chain form containing a heavy chain of 27 kDa and a light chain of 5 kDa, linked by a disulfide bridge [21]. In order to act as a PPE, cathepsin B would need to be capable of sufficient autoactivation within the secretory pathway to be active on the prorenin in the secretory granules.

In the current study we have sought to identify the protein sequences which dictate the cleavage specificity of human cathepsin B on prorenin and to test whether cathepsin B is capable of cleaving human prorenin when co-expressed in cells containing secretory granules.

2. Materials and methods

2.1. Recombinant plasmid construction

Construction of the expression vectors for native human prorenin and for prorenins generated by site-directed mutagenesis around the Lys-Arg cleavage site have been described previously [22]. The expression vector for human procathepsin B was generated by overlap extension polymerase chain reaction (PCR) [23] of the human cathepsin B cDNA ([24]; a gift from Dr. D. Steiner) using the following oligonucleotides: forward: 5'-CGCGATATCGAGTAGTGGATCTAGG-3'; reverse: 5'-GCGGGATCCAGGACTGGCAGCAG-3'. The amplified fragment was digested with the restriction enzymes *EcoRV* and *BamHI* (recognition sites underlined in the amplifying oligonucleotides) and was inserted into the RSV globin expression vector [25]. The entire coding sequence of cathepsin B was verified by DNA sequencing.

2.2. Cell culture

GH₃C1 and AtT-20 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 0.1% SerXtend (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) and 10 µg/ml gentamicin.

*Corresponding author. Fax: (1) (514) 987-5717.
E-mail: reudelt@ircm.umontreal.ca

2.3. Assay of prorenin processing by cathepsin B *in vitro*

GH₄C1 cells were plated at a concentration of 10⁶ cells per 35 mm well and transfected 24 h later with 20 µg of an expression vector for native prorenin or a mutated prorenin using the lipofectin reagent method (Gibco-BRL). After 48 h of incubation, the transfected cells were transferred to 25 mm wells; 24 h later the transfected cells were incubated 2 h with methionine-free DMEM and labeled overnight with 300 µCi of [³⁵S]methionine per well in serum-free medium. Culture supernatants containing labeled native prorenin or mutated prorenins constitutively secreted by the transfected cells, were collected and their pH was lowered by the addition of MES buffer (pH 6.0) to a final concentration of 100 mM MES with 1 mM EDTA, 5 mM dithiothreitol and 0.001% BSA. Buffered supernatants were incubated with or without 0.4 units of cathepsin B purified from human liver (Calbiochem) at 37°C for up to 6 h. The supernatants were subsequently immunoprecipitated with an anti-human renin antibody and analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography as previously described [25]. The relative intensities of the bands corresponding to prorenin and renin were evaluated by scanning densitometry of autoradiograms using an IS-1000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation).

2.4. Transient expression in AtT-20 cells

Purified expression vectors for native or mutated prorenin and for cathepsin B or a control plasmid (50 µg total DNA) were mixed with 10⁷ AtT-20 cells and electroporated with a single pulse of 300 V/4 mm, 1000 µF. Electroporated cells were then transferred to 25 cm² flasks; the next day, the cells were transferred to 12 well plates at a concentration of 5 × 10⁵ cells per well. Twenty-four hours later, cells were incubated for 2 h with methionine-free DMEM containing 10% dialysed FBS, followed by a 5 h labeling period using 300 µCi of [³⁵S]methionine per well. Tunicamycin treated cells were incubated 3 h with methionine-free DMEM with or without tunicamycin at a dose of 15 µg/ml, labeled for 2 h and chased overnight in complete DMEM with or without tunicamycin.

2.5. Detection of renin and prorenin

Supernatants from labeled AtT-20 cells were immunoprecipitated using an anti-human renin antibody as described above; in parallel, secreted prorenin and renin were dosed using an angiotensin I generation assay followed by an angiotensin I radioimmunoassay described previously [22]. Briefly, supernatants were incubated with an excess angiotensinogen either directly (active renin content), or following an incubation with trypsin (total renin content=prorenin+renin). The percentage of active renin was calculated as (active renin content/total renin content) × 100.

2.6. Immunoprecipitation of human cathepsin B

Culture supernatants from labeled AtT-20 cells were collected and the cells were lysed in 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 2% NP-40. Cell lysates and supernatants were immunoprecipitated with an anti-human cathepsin B antibody and analyzed by SDS-PAGE followed by fluorography as previously described [25].

3. Results

Determinants of cathepsin B cleavage of prorenin were evaluated using mutated prorenins, shown in Fig. 1, generated by alanine scanning mutagenesis in the region of the reported cleavage site [26]. The vectors expressing the native or mutated prorenins were transfected in GH₄C1 cells. These cells lack the capacity to process prorenin and constitutively secrete the unprocessed protein in the medium [7,27]. Following transfection, the cells were labeled overnight using [³⁵S]methionine. The next day, supernatants were collected and then incubated with purified human liver cathepsin B for up to 6 h at 37°C in a pH 6 buffer [26]. The generation of active renin was quantitated by scanning densitometry of autoradiograms. Digestion of native (non-mutated) human prorenin with cathepsin B under these conditions leads to a

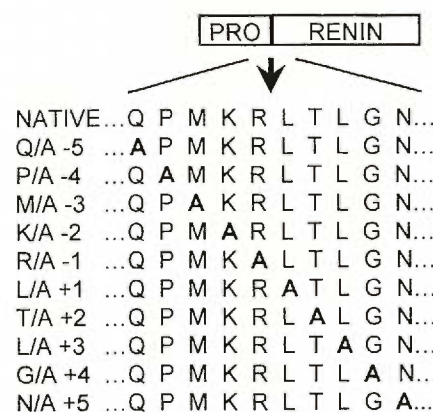


Fig. 1. Schematic representation of the alanine scanning mutations of residues around the cleavage site in human prorenin. Amino acids are represented by their one-letter code. Arrow indicates native processing site in human prorenin. Numbering is relative to amino acid 1 of active renin.

slow generation of active renin as confirmed by electrophoretic migration (Fig. 2) and renin activity assay (data not shown). In the time course of the digestion, no other degradation products appeared and no cleavage occurred in the absence of added cathepsin B (Fig. 2, –Cathepsin B). These results confirm that under the conditions used, human cathepsin B displays a high degree of cleavage site selectivity on human prorenin [10].

Fig. 3 shows the time course of cathepsin B cleavage of prorenins mutated at single amino acids in the region of the reported cleavage site. As with native prorenin, cathepsin B processed all of the mutated prorenins slowly and without showing any signs of non-specific degradation (data not shown). The overall effect of mutating residues to alanine on the amino-terminal side of the reported cleavage site was to diminish the processing efficiency by cathepsin B (Fig. 3, N-term.; dashed lines). Mutations on the carboxy-terminal side of the cleavage site (Fig. 3, C-term.; dashed lines) resulted in cleavage efficiencies that were equal to or greater than those obtained with native prorenin. The most marked effect on cleavage efficiency was observed with the mutation of the lysine at position –2 (K/A–2; numbering relative to the reported cathepsin B cleavage site) which virtually abolished cleavage by cathepsin B. The dependence of prorenin cleavage on the presence of the lysine residue was also observed using crystallographic grade recombinant human cathepsin B purified from yeast (a gift from Dr. John S. Mort) that efficiently processed native prorenin but showed no activity towards the

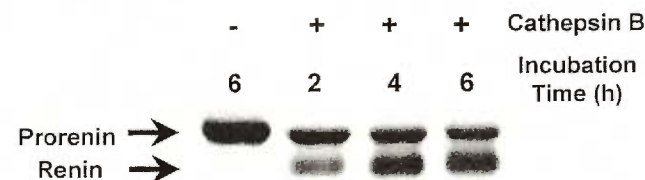


Fig. 2. *In vitro* cleavage of human prorenin by human cathepsin B. Tissue culture supernatant containing native (non-mutated) recombinant human prorenin was incubated with purified human cathepsin B for the indicated times and was immunoprecipitated with anti-renin/prorenin antibody. The expected migration for prorenin and renin was determined by co-electrophoresis of size markers.

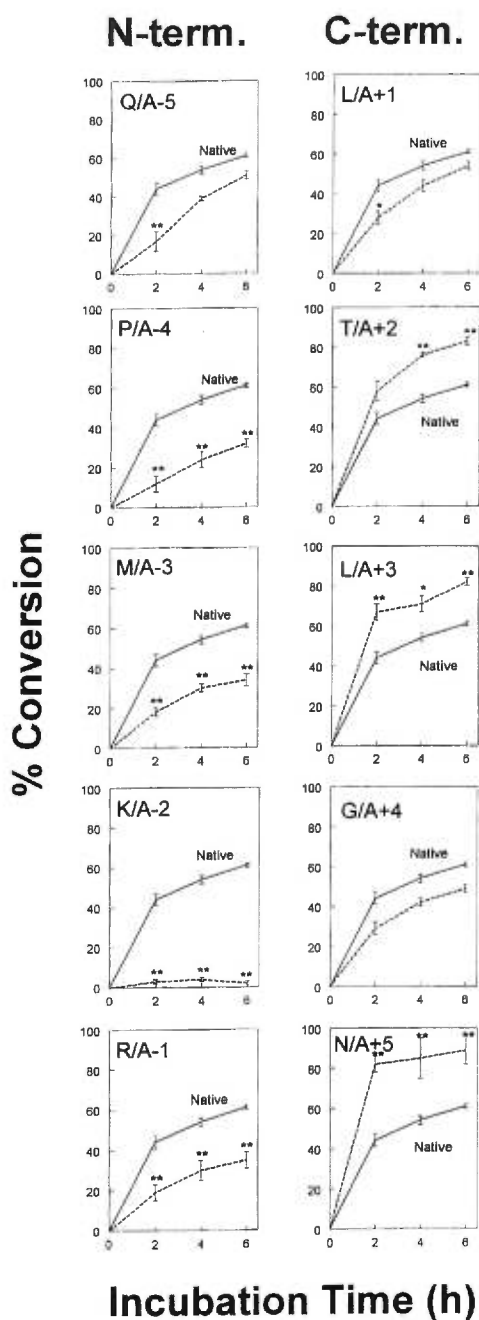


Fig. 3. Time course of activation of mutated prorenins by cathepsin B. Culture supernatants containing recombinant human mutated prorenins were subjected to limited digestion by human cathepsin B as shown in Fig. 1. Scanning densitometry was used to determine the percentage conversion to active renin. Solid lines and dashed lines represent the average time course of activation of native and the corresponding mutated prorenins, respectively. Nomenclature represents the mutation induced (e.g., K/A means a Lys is replaced with an Ala) and the position of the mutation with reference to the reported cleavage site for cathepsin B [26]. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ as compared to native prorenin using Dunn's multiple comparisons test. Data are derived from 3–4 independent assays.

K/A–2 mutant (data not shown), confirming that the cleavage of prorenin was not due to a contamination of the commercial preparation of cathepsin B.

To test if the processing activity observed *in vitro* could also take place in cultured cells, AtT-20 cells were used for

co-transfection assays of prorenin and cathepsin B, since these cells represent an appropriate model to study prorenin processing [28]. AtT-20 cells contain an endogenous protease capable of activating native human prorenin ([28] and Fig. 4A), but this enzyme is incapable of cleaving prorenin mutated at the –1 position from the cleavage site ([22] and Fig. 4A). Since this mutated prorenin is processed by cathepsin B *in vitro* (Fig. 3, R/A–1), AtT-20 cells were co-transfected with the expression vectors for the mutated R/A–1 prorenin and human cathepsin B. Whereas expression of the R/A–1 mutant prorenin alone leads to the secretion of the unprocessed form only (Fig. 4A), co-transfection of cathepsin B and R/A–1 prorenin results in the secretion of the lower molecular weight form corresponding to active renin (Fig. 4A). It is noteworthy that the endogenous cathepsin B in AtT-20 cells, which is of murine origin, is incapable of processing the R/A–1 mutant prorenin, possibly indicating that murine and human cathepsins B have a different substrate specificity. The activity of the secreted R/A–1 renin was assessed using an angiotensin I generation assay which indicated that AtT-20 cells secreted 33% active renin when co-transfected with the R/

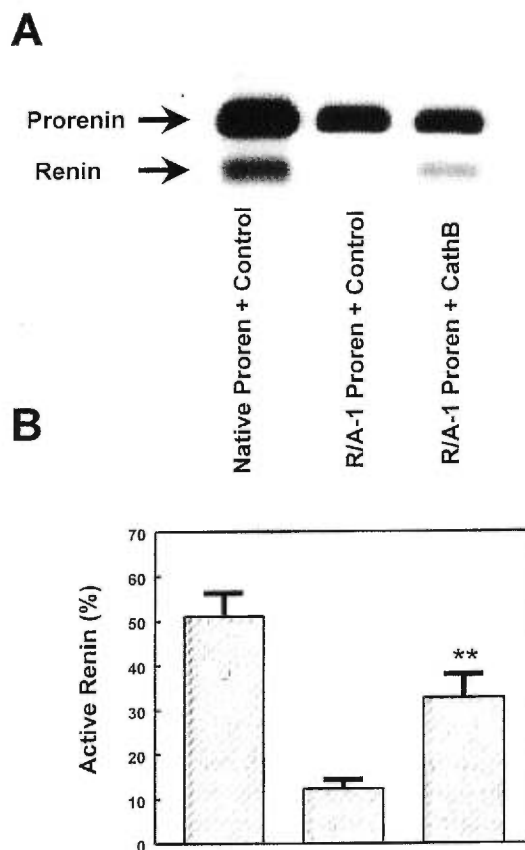


Fig. 4. A: Processing of human prorenin by human cathepsin B in AtT-20 cells. AtT-20 cells were electroporated with expression vectors for the indicated proteins. Following labeling of the cells, supernatants were immunoprecipitated with anti-renin/prorenin antibody. Protein bands corresponding to prorenin and renin are marked by arrows. Representative data are shown from one of six such experiments. B: Secretion of active renin by AtT-20 cells co-transfected with human prorenin and human cathepsin B. Prorenin and renin secreted in the supernatants of AtT-20 cells electroporated with expression vectors for the indicated proteins were dosed using an angiotensin I generation assay. ** $P < 0.01$ as compared to R/A–1 Proren+Control using Student's *t*-test.

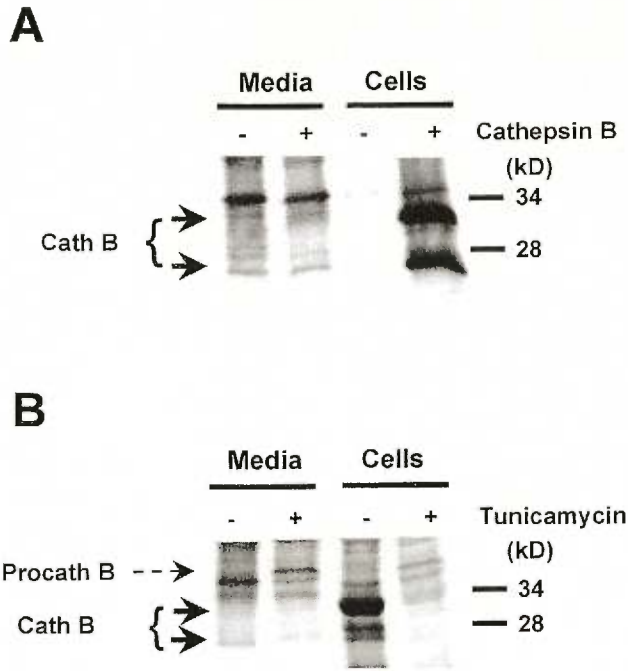


Fig. 5. A: Expression of human cathepsin B in transfected AtT-20 cells. AtT-20 cells were electroporated with an expression vector for human cathepsin B (+) or a control plasmid (-). Following pulse labeling of the cells for 5 h, cathepsin B was immunoprecipitated from supernatants (Media) and cell lysates (Cells) using an antibody specific for human cathepsin B. B: Sorting of human cathepsin B in AtT-20 cells. AtT-20 cells transfected with cathepsin B were pulse-labeled for 2 h and chased overnight, in the absence (-) or presence (+) of tunicamycin. Cathepsin B was immunoprecipitated as described above. Active forms of cathepsin B are indicated by arrows and the precursor form by a dashed arrow. Numbers at the left of the autoradiogram represent the apparent molecular weights (in kDa) of co-electrophoresed size markers. The data shown are from a representative experiment (of three).

A-1 mutant prorenin and cathepsin B (Fig. 4B). Thus cathepsin B exhibits prorenin processing activity both in vitro and in transfected AtT-20 cells.

Since procathepsin B is normally sorted to lysosomes while prorenin enters the regulated secretory pathway, the capacity of cathepsin B to process prorenin raises the question of the organelle localization in which the processing event occurs. As shown in Fig. 5A, AtT-20 cells transfected with human cathepsin B expressed abundant amounts of the enzyme in the active form as demonstrated by the presence of the 33 kDa single chain form and the 27 kDa subunit of the active enzyme. Labeled cathepsin B also appeared to be retained in the cell since no significant accumulation of the enzyme could be observed in the supernatant even after a 5 h secretion period (Fig. 5A). As lysosomal targeting of cathepsin B is mediated by modified mannose residues in the glycoprotein, cells were treated with tunicamycin, an inhibitor of glycosylation, to confirm that such a treatment would prevent human cathepsin B export to the lysosomes and therefore determine if the expressed protein was correctly sorted. The results demonstrate that tunicamycin treatment leads to a dramatic decrease of the active forms of human cathepsin B within the cell and the appearance of a higher molecular weight form in both the cells and the supernatant (Fig. 5B). This slower migrating form possibly corresponds to unglycosylated procathepsin B expected to be around 35 kDa. The levels of cathepsin B that

could be immunoprecipitated both intracellular and extracellular were also markedly decreased and could reflect degradation of cathepsin B retained in the secretory pathway. In addition, when AtT-20 cells co-expressing the R/A-1 prorenin and human cathepsin B were treated with tunicamycin, only prorenin was found to be secreted in the medium (data not shown). Thus, human cathepsin B expressed in AtT-20 undergoes intracellular sorting in a glycosylation-dependent manner consistent with its sorting to the lysosomal compartment.

4. Discussion

Our current results support the previously reported role of cathepsin B in site-selective cleavage of human prorenin in vitro [26] and demonstrate that this cleavage is critically dependent on the lysine at position 42 in the prorenin prosegment. Based on the proposed mechanism of cathepsin B action on synthetic substrates [19], the resulting scissile bond would follow Arg-43, consistent with the reported amino-terminus of the renin produced after cathepsin B digestion of human prorenin [26]. Cathepsin B cleavage of substrates containing Arg at the -2 position (relative to the cleavage site) depends on a group with pK_a of 5.1 (suggested to be Glu-245) that has been proposed to interact with the Arg side chain and stabilize the transition state [19]. Similarly, crystal structure modeling predicts Glu-245 could also achieve efficient electrostatic interaction with Lys at the -2 position from the cleavage site [29]. Although human prorenin contains several other basic residues which could serve as potential cathepsin B cleavage sites [30] its preferential cleavage at position 43 in the prosegment reflects that of numerous other proteases including trypsin, thermolysin, kallikrein, plasmin and pepsin [31,32]. This site selectivity is thus quite likely to be a result of a combination both of site preference by cathepsin B and of the masking of additional cleavage sites due to the conformation of prorenin.

Comparison of the known protein sequences for prorenin indicates that the critical lysine in human prorenin cleavage by cathepsin B is conserved between species in the homologous proteins. In addition, this lysine is found at the -2 position from the cleavage site of mouse submaxillary prorenin [33,34]. However, N-terminal sequencing of rat renal renin has indicated cleavage at a site further C-terminal relative to the conserved lysine [35,36]. Thus it is still uncertain if the identity of the renal PPE is conserved between species.

Procathepsin B activation has been shown to occur preferentially in an acidic pH range of 4–6 and may be the result of an intramolecular autoactivation mechanism [20]. Denaturation of active cathepsin B increases exponentially with increasing pH and the enzyme is irreversibly inactivated at pH 7.0 [37]. Tumor-derived endocrine cell lines and particularly AtT-20 cells are known to exhibit a high rate of basal unstimulated release of granule content [38]. However, when AtT-20 cells were transfected with human cathepsin B, the mature enzyme could not be detected in the supernatant making it unlikely that the expressed protein was routed to the secretory pathway to be co-secreted with renin. Furthermore, retention of cathepsin B in the cells was dramatically decreased when glycosylation of the protein was inhibited indicating normal trafficking of cathepsin B to the lysosomes. These results raise the question of how cathepsin B could cleave prorenin if the two proteins are not co-resident within the cells.

In pancreatic β -cells, proinsulin and procathepsin B have been shown to be transiently associated in the immature secretory granules and to segregate to their respective cellular destinations as the secretory granule matures [39]. As the environment progressively acidifies in the *trans*-Golgi and in budding immature granules [40], it is possible that some degree of cathepsin B activation occurs before it is sorted to the lysosomes. In the context of an overexpression system such as transfected AtT-20 cells, this might generate sufficient active cathepsin B to process prorenin. It is unclear, however, if such a process is responsible for prorenin processing in renin-producing tissues. The granules of renal juxtaglomerular cells have been reported to contain numerous lysosomal enzymes and autophagic particles [17]. Prolonged storage of prorenin in these granules in the presence of an active form of cathepsin B could overcome the limitation of the apparently slow kinetics of cathepsin B action on prorenin seen *in vitro* [26].

Immunohistochemical studies have shown renin and cathepsin B co-staining in subcellular compartments of numerous tissues. In some cases, this possibly represents cathepsin B colocalization with renin in late endosomes or lysosomes which have taken up prorenin from the extracellular space. For example, the cortical proximal tubules of the kidney contain significant amounts of immunoreactive renin [12], although they appear to synthesize very little renin mRNA [41]. Immunoelectron microscopy of proximal tubular cells suggests that this renin is in lysosomes, consistent with its absorption from the lumen of the collecting duct [12]. Indeed, studies of monkeys injected with purified labeled human prorenin demonstrate that both the kidney and liver are involved in clearing the protein from the circulation and that the initial step in its degradation in the lysosomes involves an apparent removal of the prosegment [42]. While such a process would not be likely to play a major role in the generation of active renin for secretion, its importance in the generation of angiotensins within tissues or cells [43] remains an interesting topic for further study.

Acknowledgements: The authors wish to thank Dr. John S. Mort for helpful discussions and Vivianne Jodoin for secretarial assistance. This work was supported by a grant from the Medical Research Council of Canada to the Multidisciplinary Research Group on Hypertension. I.J. is the recipient of a graduate fellowship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. T.L.R. is the recipient of the Merck-Frosst Chair in Molecular and Clinical Pharmacology.

References

- [1] Sealey, J.E. and Rubattu, S. (1989) *Am. J. Hypertens.* 2, 358–366.
- [2] Frohlich, E.D., Iwata, T. and Sasaki, O. (1990) *Am. J. Med.* 87, (Suppl. 6B) 19S–23S.
- [3] Johnston, C.I., Burrell, L.M., Perich, R., Jandeleit, K. and Jackson, B. (1992) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19, 1–5.
- [4] Gardner, D.G., Gertz, B.J., Deschepper, C.F. and Kim, D.Y. (1988) *J. Clin. Invest.* 82, 1275–1281.
- [5] Lee, M.A., Bohm, M., Paul, M. and Ganten, D. (1993) *Circulation* 87, IV7–13.
- [6] Taugner, R., Kim, S.J., Murakami, K. and Waldherr, R. (1987) *Histochemistry* 86, 249–253.
- [7] Benjannet, S., Reudelhuber, T., Mercure, C., Rondeau, N., Chretien, M. and Seidah, N.G. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 11417–11423.
- [8] Reudelhuber, T.L., Ramla, D., Chiu, L., Mercure, C. and Seidah, N.G. (1994) *Kidney Int.* 46, 1522–1524.

- [9] Mercure, C., Jutras, I., Day, R., Seidah, N.G. and Reudelhuber, T.L. (1996) *Hypertension* 28, 840–846.
- [10] Wang, P.H., Do, Y.S., Macaulay, L., Shinagawa, T., Anderson, P.W., Baxter, J.D. and Hsueh, W.A. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 12633–12638.
- [11] Neves, F.A., Duncan, K.G. and Baxter, J.D. (1996) *Hypertension* 27, 514–517.
- [12] Taugner, R., Hackenthal, E., Inagami, T., Nobiling, R. and Poulsen, K. (1982) *Histochemistry* 75, 473–484.
- [13] Saint-Andre, J.P., Rohmer, V., Pinet, F., Rousselet, M.C., Bigorgne, J.C. and Corvol, P. (1989) *Histochemistry* 91, 291–297.
- [14] Kon, Y., Hashimoto, Y., Sugimura, M. and Murakami, K. (1993) *Anat. Histol. Embryol.* 22, 324–327.
- [15] Sano, K., Waguri, S., Sato, N., Kominami, E. and Uchiyama, Y. (1993) *J. Histochem. Cytochem.* 41, 433–438.
- [16] Uchiyama, Y., Nakajima, M., Watanabe, T., Waguri, S., Sato, N., Yamamoto, M., Hashizume, Y. and Kominami, E. (1991) *J. Histochem. Cytochem.* 39, 1199–1205.
- [17] Taugner, R. and Hackenthal, E. (1988) *Int. Rev. Cytol.* 110, 93–131.
- [18] Koga, H., Yamada, H., Nishimura, Y., Kato, K. and Imoto, T. (1991) *J. Biochem.* 110, 179–188.
- [19] Hasnain, S., Hirama, T., Huber, C.P., Mason, P. and Mort, J.S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 235–240.
- [20] Mach, L., Mort, J.S. and Glossl, J. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13030–13035.
- [21] Hanewinkel, H., Glössl, J. and Kresse, H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12351–12355.
- [22] Chu, W.N., Mercure, C., Baxter, J.D. and Reudelhuber, T.L. (1992) *Hypertension* 20, 782–787.
- [23] Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) *Gene* 77, 61–68.
- [24] Chan, S.J., San Segundo, B., McCormick, M.B. and Steiner, D.F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7721–7725.
- [25] Chu, W.N., Baxter, J.D. and Reudelhuber, T.L. (1990) *Mol. Endocrinol.* 4, 1905–1913.
- [26] Shinagawa, T., Do, Y.S., Baxter, J.D., Carilli, C., Schilling, J. and Hsueh, W.A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1927–1931.
- [27] Mercure, C., Thibault, G., Lussier-Cacan, S., Davignon, J., Schiffrin, E.L. and Reudelhuber, T.L. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 16355–16359.
- [28] Fritz, L.C., Haidar, M.A., Arfsten, A.E., Schilling, J.W., Carilli, C., Shine, J., Baxter, J.D. and Reudelhuber, T.L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12409–12412.
- [29] Jia, Z., Hasnain, S., Hirama, T., Lee, X., Mort, J.S., To, R. and Huber, C.P. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 5527–5533X.
- [30] Murakami, K., Hirose, S., Miyazaki, H., Imai, T., Hori, H., Hayashi, T., Kageyama, R., Ohkubo, H. and Nakanishi, S. (1984) *Hypertension* 6, 195–1100.
- [31] Higashimori, K., Mizuno, K., Nakajo, S., Boehm, F.H., Marcotte, P.A., Egan, D.A., Holleman, W.H., Heusser, C., Poisner, A.M. and Inagami, T. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 14662–14667.
- [32] Hsueh, W.A. and Baxter, J.D. (1991) *Hypertension* 17, 469–479.
- [33] Misono, K.S., Chang, J. and Inagami, T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4858–4862.
- [34] Corvol, P., Panthier, J.J., Foote, S. and Rougeon, F. (1983) *Hypertension* 5, 13–19.
- [35] Campbell, D.J., Valentijn, A.J. and Condron, R. (1991) *J. Hypertens.* 9, 29–33.
- [36] Kim, S., Hosoi, M., Kikuchi, N. and Yamamoto, K. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 7044–7050.
- [37] Turk, B., Dolenc, I., Zerovnik, E., Turk, D., Gubensek, F. and Turk, V. (1994) *Biochemistry* 33, 14800–14806.
- [38] Matsuuchi, L. and Kelly, R.B. (1991) *J. Cell Biol.* 112, 843–852.
- [39] Kuliawat, R. and Arvan, P. (1994) *J. Cell Biol.* 126, 77–86.
- [40] Halban, P.A. and Irminger, J.C. (1994) *Biochem. J.* 299, 1–18.
- [41] Deschepper, C.F., Mellon, S.H., Cumin, F., Baxter, J.D. and Ganong, W.F. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7552–7556.
- [42] Kim, S., Hosoi, M., Ikemoto, F., Murakami, K., Ishizuka, Y. and Yamamoto, K. (1990) *Am. J. Physiol.* 258, E451–E458.
- [43] Ganong, W.F. (1994) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205, 213–219.

CHAPITRE 6

DISCUSSION

6.1 Maturation et ciblage de PC1 dans la voie de sécrétion régulée

6.1.1 Inhibition de l'activité de PC1 par son domaine C-terminal

Le rôle inhibiteur du domaine C-terminal de PC1 a été mis en évidence premièrement, par l'augmentation substantielle de l'activité de PC1 observée avec la délétion du domaine (PC1 Δ C) et deuxièmement, par l'effet inhibiteur de l'expression en *trans* de la partie C-terminale (PC1-Cterm) sur l'activité de PC1 Δ C. Des études antérieures aux travaux présentés au chapitre 2 avaient permis de montrer que le clivage du prosegment de la prorénine par PC1 se produisait spécifiquement dans des cellules ayant une voie de sécrétion régulée (Benjannet et al., 1992). L'analyse de la maturation post-traductionnelle de PC1 avait par ailleurs indiqué que le clivage de la partie C-terminale de PC1 était dépendant des SGs. La forme tronquée en C-terminal semblait en effet abondante dans des cellules pourvues de SGs telles que les cellules GH4, alors que le clivage en C-terminal semblait largement incomplet dans des cellules dépourvues de SGs telles que les cellules CHO (Vindrola et Lindberg, 1992) (Zhou et Lindberg, 1993b). Nos résultats suggèrent que ce clivage qui se produit spécifiquement dans les SGs, assure le ciblage de l'activité de PC1 aux SGs et permettent donc de faire un lien entre ces observations initiales. Cette proposition est de plus supportée par des études *in vitro* qui ont montré que l'activité spécifique de la forme tronquée en C-terminal était quatre fois supérieure à celle de son précurseur (Zhou et Lindberg, 1994a).

Étonnamment la délétion du domaine C-terminal de PC1 génère non seulement une activité enzymatique accrue dans des cellules GH4 mais également une activité enzymatique dans des cellules CHO dépourvues de SGs, indiquant que la forme tronquée est active dans la voie de sécrétion constitutive. En accord avec cette proposition, la rénine active apparaît plus rapidement dans le surnageant des cellules GH4 co-transfectées avec la prorénine et PC1 Δ C. Ces résultats pourraient suggérer que dans les cellules GH4, l'activité plus précoce de PC1 Δ C dans la voie de sécrétion est responsable de l'augmentation de la production de rénine active observée,

augmentation qui représenterait l'addition de la rénine produite en amont des SGs à celle normalement produite dans les SGs. Or, l'étude présentée au chapitre 3 montre que PC1ΔC n'est pas retenue dans les SGs et semble essentiellement sécrétée par la voie de sécrétion constitutive des cellules GH4. Ces résultats indiquent donc que dans les GH4 comme dans les CHO, la maturation de la prorénine par PC1ΔC devrait se produire principalement dans la voie de sécrétion constitutive. Si cette conclusion est exacte, pour quelle raison PC1ΔC génère-t-elle davantage de rénine active dans les cellules GH4 que dans les cellules CHO? L'explication la plus évidente est que le niveau d'expression de PC1ΔC dans ces deux types cellulaires varie. Bien que nous n'ayons pas dosé la quantité protéique de PC1 exprimée dans chaque lignée cellulaire, le marquage métabolique de PC1ΔC indique des niveaux d'expression comparables dans les cellules GH4 et les cellules CHO (seuls les résultats avec les cellules GH4 ont été présentés). Plutôt que la quantité de PC1ΔC exprimée, l'environnement de la voie de sécrétion constitutive des GH4 serait possiblement plus favorable au clivage de la prorénine par PC1ΔC. L'activité de PC1 est modulée par la concentration en Ca^{2+} et la valeur du pH mais il semble peu probable que le TGN des cellules GH4 démontre des caractéristiques physico-chimiques différentes de ce même compartiment dans les cellules CHO. Une autre possibilité est que des protéines auxiliaires ou des co-facteurs nécessaires à l'activité de PC1 se trouvent spécifiquement exprimés ou plus abondants dans la voie de sécrétion constitutive des cellules GH4. Par exemple, l'activité carboxypeptidasique (CPE, CPD ou autre) est possiblement plus importante dans les GH4, ce qui empêcherait une accumulation du prosegment de la prorénine, avec son résidu arginine en C-terminal, potentiellement inhibiteur de l'activité de PC1. Un effet inhibiteur semblable a en effet été observé avec des fragments générés de la prodynorphine lors de sa maturation par PC2 *in vitro* (Day et al., 1998). Une dernière explication pour l'activité accrue de PC1ΔC dans les cellules GH4, serait que PC1ΔC entre dans les granules immatures (potentiellement plus acides que le TGN et plus propices à l'activité enzymatique de PC1) mais que la convertase est subséquentement retirée de ce compartiment pour être sécrétée.

6.1.2 Modèle pour l'activation de PC1

Nos résultats ne nous permettent pas de déterminer si le mécanisme d'inhibition de l'activité de PC1 par la partie C-terminale est le même lorsque l'inhibition s'effectue en *trans* sur PC1 Δ C ou en *cis* avec la forme non-tronquée de PC1. Dans l'une ou l'autre de ces deux situations, la partie C-terminale de PC1 pourrait interagir directement avec le domaine catalytique ou une autre région de la protéine, de manière intra- ou intermoléculaire, ou encore recruter un co-facteur de la voie de sécrétion nécessaire à l'inhibition. Quoiqu'il en soit, l'activation de PC1 doit de toute évidence, comporter une étape où la partie C-terminale est associée au domaine catalytique puisque son clivage se produit par un mécanisme autocatalytique. Il est donc plausible que l'association de la partie C-terminale entraîne le domaine catalytique à adopter une structure peu propice à la liaison et au clivage de la prorénine. De plus, il a été proposé que le clivage de la partie C-terminale se produisait par un mécanisme autocatalytique intermoléculaire, puisque la vitesse d'enlèvement apparaît sensible à la concentration en PC1 (Zhou et Mains, 1994). La séquence d'événements suivante bien que spéculative, est donc proposée pour rendre compte du ciblage de l'activité maximale de PC1 dans la voie de sécrétion régulée (Figure 6-1). Premièrement, le prosegment de PC1 est clivé dans le RE mais demeure inhibiteur jusqu'au TGN, où les changements de pH et de Ca²⁺ induisent des clivages dans le prosegment qui génèrent des fragments moins inhibiteurs et leur dissociation du domaine catalytique (Boudreault et al., 1998), par un mécanisme semblable à celui décrit pour la furine (Anderson et al., 1997). Le domaine catalytique de PC1 serait alors en mesure de lier la partie C-terminale d'une autre molécule de PC1, formant complexe PC1-PC1. Cependant dans l'environnement du TGN, la structure du complexe ou les interactions ioniques dans la poche catalytique seraient peu propices à la réaction de protéolyse. Cette association inhiberait donc l'activité de PC1 vis-à-vis de la plupart des précurseurs hormonaux et des proprotéines telle que la prorénine. L'affinité de PC1 pour certains substrats telle que la POMC pourrait cependant être suffisamment élevée pour surmonter l'effet inhibiteur de la partie C-terminale. L'abaissement du pH et l'augmentation de la concentration en Ca²⁺ dans les granules

induiraient un changement conformationnel ou de nouvelles interactions dans la poche catalytique qui favoriseraient le clivage de la partie C-terminale. Comme la partie C-terminale de PC1 comprend des doublets de résidus basiques (trois doublets dans le cas de la PC1 de souris utilisée dans cette étude), elle pourrait rester associée au domaine catalytique jusqu'à son clivage en des fragments moins inhibiteurs. Ces clivages internes expliqueraient d'ailleurs la difficulté à détecter la partie C-terminale générée du clivage de PC1 (Coates et Birch, 1997). Par ce mode d'inhibition, le domaine C-terminal de PC1 agirait alors comme un deuxième prosegment.

Récemment, la caractérisation du précurseur protéique proSAAS exprimé principalement dans les tissus neuroendocriniens, a révélé que cette protéine pourrait représenter un inhibiteur endogène de PC1 dans ces tissus (Fricker et al., 2000). En effet, la surexpression de proSAAS dans des cellules AtT-20 inhibe partiellement la maturation de la POMC endogène et l'incorporation de proSAAS dans un essai enzymatique *in vitro*, inhibe l'activité de PC1 sur un peptide synthétique. Il n'est cependant pas clair si l'inhibition par proSAAS, qui est également un substrat de PC1, résulte d'un effet de saturation de la convertase dans les conditions de surexpression. Il serait également intéressant d'évaluer le rôle des résidus arginine, qui forment le C-terminal des fragments générés par le clivage de proSAAS, dans l'inhibition de l'activité de PC1, en incluant de la CPE dans l'essai d'inhibition *in vitro*. Ces résultats indiquent néanmoins que proSAAS pourrait également contribuer au ciblage de l'activité maximale de PC1 aux SGs, en limitant son activité dans les compartiments précoces de la voie de sécrétion régulée.

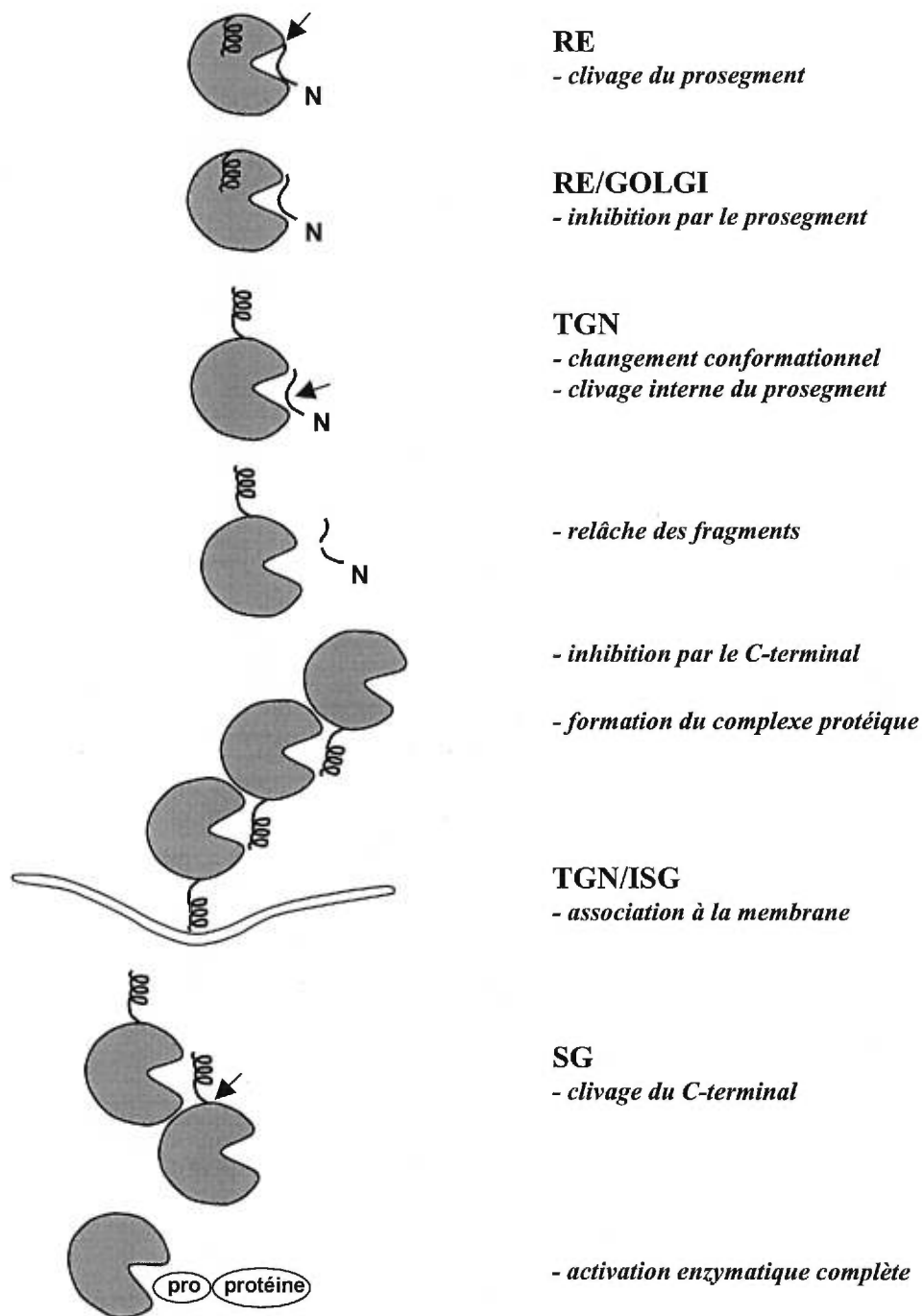


Figure 6-1. Modèle pour l'activation et le ciblage de PC1 dans la voie de sécrétion régulée. Les différentes étapes seraient modulées par les changements graduels (acidification et augmentation de la concentration en calcium) dans la lumière des compartiments: réticulum endoplasmique (RE), appareil de Golgi (Golgi), réseau trans-golgien (TGN), granules de sécrétion immatures (ISG), granules de sécrétion (SG).

6.1.3 Modèle pour le ciblage de PC1 vers la voie de sécrétion régulée

Les résultats présentés au chapitre 3 montrent que la partie C-terminale agit comme le domaine qui détermine le ciblage de PC1 vers la voie de sécrétion régulée, par un mécanisme qui pourrait impliquer la liaison de la partie C-terminale aux membranes via une hélice α . Dans le contexte de son activité inhibitrice, comment la partie C-terminale parvient-elle à induire le ciblage? Si le modèle de la liaison intermoléculaire du domaine catalytique au domaine C-terminal est exact, cette association indiquerait un moyen par lequel PC1 pourrait former des complexes protéiques (Figure 6-1). L'association d'une molécule de PC1 avec la membrane faciliterait alors le ciblage de tout un complexe de molécules de PC1 accrochées les unes aux autres par le biais de la partie C-terminale. À ce sujet, il a déjà été montré que le transport de la prorénine vers la voie de sécrétion régulée dans les cellules AtT-20 (qui possèdent une expression endogène de PC1) nécessitait la présence d'un site de clivage reconnu par PC1 (Brechler et al., 1996). L'enlèvement prématuré du prosegment de la prorénine par la modification du site de clivage naturel en site clivé par la furine (active dans le TGN), de même que la mutation du doublet de résidus basiques normalement clivé par PC1, empêchaient en effet la rétention de la prorénine dans les SGs de ces cellules. Le complexe protéique de PC1 pourrait donc incorporer également des proprotéines, par leur association au domaine catalytique de PC1, ce qui fournirait un mécanisme pour leur rétention dans les SGs en formation. Ce modèle de ciblage via la liaison du domaine catalytique, ne pourrait cependant expliquer la capacité de la partie C-terminale à fonctionner dans le ciblage de protéines de fusion en absence du domaine catalytique de PC1. Il est probable que dans ces conditions, le critère prépondérant pour le ciblage soit l'association aux membranes (discuté plus loin).

Une des prédictions de ce modèle est que la mutation du site de clivage de la partie C-terminale (PC1-K⁶¹⁸A) devrait altérer l'entrée de cette protéine mutante dans les SGs. Les résultats présentés au chapitre 2 montrent que la protéine mutante PC1-K⁶¹⁸A est faiblement clivée, probablement par l'utilisation des autres doublets de

résidus basiques présents dans la partie C-terminale. Seules ces quantités de formes clivées de PC1-K⁶¹⁸A devraient donc être retrouvées dans un surnageant de sécrétion stimulée. Par ailleurs, nous avons trouvé que la mutation de l'hélice α en C-terminal de PC1 (PC1-L⁷⁴⁵P, L⁷⁴⁹P) causait le clivage précoce de la partie C-terminale dans la voie de sécrétion, rendant cette protéine mutante inutilisable pour évaluer le rôle de cette structure dans le ciblage de la protéine (Jutras et Reudelhuber, résultats non-publiés). Par contre, l'importance de l'hélice α dans le contexte de PC1 complet, pourrait être testée en insérant la mutation [L⁷⁴⁵P, L⁷⁴⁹P] dans la protéine mutante PC1-KA⁶¹⁸. Une autre prédiction du modèle est qu'un complexe de PC1 devrait pouvoir être détecté. En empêchant la sortie des protéines du TGN, les protéines de PC1 pourraient être fixées dans ce complexe par l'emploi d'agents *cross-linker* par exemple.

Par ailleurs, il est possible que les protéines de PC1 s'agrègent d'une manière dépendante de la concentration en Ca²⁺ et du pH acide, une qualité qui pourrait contribuer à la formation de complexes protéiques dans le TGN et les granules. Cette propriété a été démontrée pour PC2 qui possède d'ailleurs une hélice α amphipathique en C-terminal, similaire à celle de PC1 (Smeeckens et al., 1991), (Shennan et al., 1994). La capacité de la partie C-terminale de PC2 à induire l'association de cette convertase aux membranes (Shennan et al., 1994) pourrait d'ailleurs indiquer que ce domaine joue un rôle important dans le ciblage de PC2 aux SGs à la manière de PC1, bien que son mode d'activation diffère considérablement de celui de PC1 et n'implique pas le clivage du segment C-terminal (Benjannet et al., 1993). L'effet de la délétion de la partie C-terminale de PC2 sur son ciblage aux SGs ne semble pas avoir été évalué mais l'échange du domaine C-terminal de la furine par celui de PC2 résulte en l'envoi d'une faible proportion de la protéine chimérique vers la voie de sécrétion régulée (Creemers et al., 1996).

Les modifications post-traductionnelles que subit PC5-A s'apparentent de plusieurs manières à ceux de PC1 et pourraient suggérer des modes d'activation et de ciblage similaires. Ainsi, PC5-A subit les clivages de son prosegment et de sa partie

C-terminale dans le RE et les SGs respectivement, bien que le caractère autocatalytique de ces événements n'ait pas été vérifié (De Bie, et al., 1996). La partie C-terminale de PC5-A semble également contenir des déterminants du ciblage puisque la délétion des 38 derniers acides aminés de cette région diminue l'envoi de la protéine dans la voie de sécrétion régulée (De Bie et al., 1996). Comme PC1, quoique de manière moins efficace, la partie C-terminale de PC5-A démontre la capacité de cibler une protéine de fusion vers la voie de sécrétion régulée dans les cellules GH4 (Jutras et Reudelhuber, résultats non-publiés). Cependant, au contraire de PC2, PC5-A ne démontre aucune homologie de séquence avec PC1 au niveau de sa partie C-terminale qui contient plutôt des séquences riches en résidus cystéine. De plus, la prédiction de structure selon l'algorithme de Chou-Fasman ne propose pas la formation d'une hélice α dans les derniers 38 acides aminés de PC5-A. Le mécanisme de ciblage de PC5-A pourrait donc faire appel à un mécanisme différent de celui de PC1.

6.1.4 Interaction de la partie C-terminale de PC1 avec les membranes

Les deux portions du domaine C-terminal de PC1 capables d'induire le ciblage d'une protéine de fusion vers la voie de sécrétion régulée, démontrent également une plus grande affinité pour la fraction membranaire, suggérant un lien entre le ciblage et l'association aux membranes. La caractéristique commune la plus évidente entre ces deux domaines de ciblage consiste en la formation d'une hélice α , dont la mutation dans l'un de ces domaines abolit à la fois l'association aux membranes et la rétention dans les SGs. Bien que nous ayons vérifié l'effet de la mutation dans un seul des deux domaines de ciblage identifiés, ces résultats suggèrent que la structure hélicoïdale induit la liaison aux membranes et que cette liaison est directement impliquée dans le mécanisme de ciblage.

Pour les protéines dépourvues de segment transmembranaire, les modes d'association aux membranes les mieux caractérisés, impliquent l'ajout de chaînes lipidiques capables d'ancrer les protéines aux membranes. Ainsi, la prénylation

permet à plusieurs protéines cytosoliques de s'associer aux membrane de différents compartiments alors que l'ajout d'un groupement GPI peut servir de mécanisme de ciblage des protéines vers la membrane apicale, via l'association sélective du GPI à des microdomaines lipidiques. La liaison des protéines aux membranes peut également se produire en absence des ces groupements lipidiques comme dans le cas de la CPE, une protéine de la voie de sécrétion régulée, qui se retrouve en grande partie dans la fraction membranaire. L'association de la CPE aux membranes semblent d'ailleurs être modulée par le pH et il a été proposé que cette association dépendait d'une hélice amphipathique à l'extrémité C-terminale de la CPE (Fricker et al., 1990). Comme la liaison de la CPE aux membranes implique des interactions polaires et hydrophobes, en accord avec le caractère amphipathique de l'hélice, l'on peut postuler que cette structure interagirait à la fois avec les têtes polaires et le corps des acides gras de la bicouche lipidique.

De quelle manière la structure hélicoïdale dans la partie C-terminale de PC1 parviendrait-elle à faciliter l'association des protéines aux membranes? Une possibilité est que la partie C-terminale s'associe à une protéine membranaire qui reconnaît des déterminants structuraux ou des résidus exposés dans une conformation spécifique, et qui agirait donc comme un récepteur pour l'entrée de PC1 dans les granules immatures. Cette explication semble peu probable car les expériences de *cross-link* présentées au chapitre 3 n'ont révélé aucune protéine présente spécifiquement dans un complexe avec les protéines de fusion envoyées dans les SGs. Nous postulons donc que la partie C-terminale de PC1 s'associe principalement aux composantes lipidiques. Dans le cas de l'hélice α située à la toute fin du C-terminale de PC1, son caractère amphipathique pourrait impliqué des interactions avec les membranes semblables à celles proposées pour la CPE. Une des conséquences de ce postulat est que la spécificité du ciblage serait en partie assurée par la composition des lipides des granules. Un rôle des composantes lipidiques dans le contrôle du ciblage d'autres lipides et de protéines a été proposé pour plusieurs voies de transport (Mukherjee et Maxfield, 1999). Des membranes riches en cholestérol seraient impliquées dans le trafic vers la membrane apicale des cellules

polarisées (Muniz et Riezman, 2000) et dans la formation de vésicules synaptiques à la membrane plasmique (Thiele et al., 2000). La capacité du cholestérol à lier des protéines membranaires enrichies dans les vésicules synaptiques, telles que la synaptophysine et la synaptotagmine, pourrait contribuer à ségréger les protéines résidentes des vésicules et les protéines de la membrane plasmique, au moment de la formation des vésicules (Thiele et al., 2000). La principale caractéristique des protéines associées aux microdomaines riches en cholestérol et en sphingolipides (*rafts*) est leur insolubilité en présence de Triton X-100. Il serait donc intéressant d'évaluer la solubilité de la partie C-terminale associée aux membranes dans différentes conditions. De plus, l'affinité de la partie C-terminale pour le cholestérol pourrait être évaluée en utilisant du cholestérol photoactivable, une approche qui permet de marquer les protéines associées au cholestérol (Thiele et al., 2000).

D'autre part, la capacité des fragments C-terminaux de PC1 à induire la dimérisation des protéines de fusion pourrait fournir un moyen à l'hélice α de former une surface hydrophobe propice à son insertion dans les membranes. Malgré le fait qu'une corrélation entre la dimérisation et le ciblage n'ait pas été mise en évidence, il demeure possible que l'absence de dimérisation diminue l'efficacité de la rétention des protéines de fusion dans les SGs. À ce sujet, il serait intéressant d'évaluer si la protéine de fusion contenant l'hélice mutée (Fc-PC1[P⁷⁴⁵,P⁷⁴⁹]) conserve la capacité de former des dimères. Il est possible que l'association aux membranes et la dimérisation agissent en synergie pour le ciblage des protéines de fusion, à la manière du modèle pour le ciblage de PC1 exposé plus haut.

6.2 Maturation de la prorénine

6.2.1 Essais *in vitro* et *in cellulo*

En utilisant un essai *in vitro*, nous avons déterminé quels étaient les résidus autour du site de clivage de la prorénine humaine importants pour l'enlèvement du prosegment par la cathepsine B. Bien que l'identité du résidu à l'extrémité N-

terminale de la rénine générée n'ait pas été vérifiée, la préférence de l'activité endopeptidasique de la cathepsine B pour un résidu basique en position P2 (Jia et al., 1995) de même que l'abolition de la maturation de la prorénine observée avec la mutation du résidu lysine en position -2 du site de clivage présumé, suggèrent fortement que la cathepsine B clive après le doublet d'acides aminés basiques, proposé comme site de clivage de la prorénine *in vivo* (Do et al., 1987). De plus, des études de modélisation à partir de données cristallographiques sur un complexe cathepsine B-inhibiteur prévoit des interactions électrostatiques favorables entre le résidu Glu²⁴⁵ de la cathepsine B et un résidu lysine en P2 du substrat (Jia et al., 1995). Nous n'avons pas observé que la cathepsine B générerait des fragments de différentes tailles de la prorénine, indiquant l'absence d'une activité de dégradation par le clivage d'autres sites internes ou d'une activité carboxypeptidasique. Nous proposons que la structure de la prorénine favorise le clivage du prosegment à un site unique, comme le suggère également l'étude de la maturation par PC1 (Chu et al., 1992). Enfin, la maturation lente et incomplète de la prorénine humaine par la cathepsine B est en accord avec son activité endopeptidasique faible, imputable à la boucle d'occlusion de la cathepsine B qui limite l'accès de macromolécules au site de liaison du domaine catalytique (Illy et al., 1997).

La co-transfection d'une enzyme de maturation et de son substrat potentiel dans un type cellulaire analogue à celui où se déroule l'événement de maturation *in vivo*, constitue une approche largement utilisée pour obtenir une indication du rôle physiologique d'une maturase. Afin de déterminer l'efficacité de maturation de la prorénine par différentes convertases, nous avons utilisé des lignées cellulaires d'origine neuroendocrinienne (cellules GH4 et AtT-20), à défaut de modèles cellulaires qui s'apparentent aux cellules JGs, le site majeur de cette maturation *in vivo*. Parmi les membres de la famille des proprotéines convertases, nous avons trouvé que seules les convertases PC1 et PC5-A démontraient une activité de maturation de la prorénine humaine (Jutras et Reudelhuber, résultats non-publiés). Alors que PC1 et PC5-A maturent également la prorénine-2 (Nakagawa et al., 1993), ces convertases ne clivent pas le prosegment de la prorénine de rat ou la prorénine-1

(Jutras et Reudelhuber, résultats non-publiés). Par ailleurs, la capacité de clivage de la prorénine par la cathepsine B chez ces différentes espèces n'est pas connu et pourrait donc être testée.

En plus de la capacité à cliver spécifiquement le prosegment de la prorénine humaine *in vitro*, la cathepsine B, pour être considérée comme sa maturase physiologique, devrait aussi pouvoir générer de la rénine active dans la voie de sécrétion régulée. Étonnamment, la cathepsine B se montre en effet capable d'activer la prorénine humaine dans des types cellulaires neuroendocriniens (Neves et al., 1996), (Jutras et Reudelhuber, 1999). Notre connaissance du ciblage et de l'activation de ces deux protéines indique que les compartiments de la voie de sécrétion où ces protéines pourraient être co-localisées de façon transitoire, impliquent qu'elles seraient toutes les deux dans un état inactif. La procathepsine B est en effet ciblée aux lysosomes où le zymogène est activé alors que la prorénine est envoyée et maturée principalement dans les SGs de ces cellules. Bien que la faible quantité de prorénine qui subit l'ajout de résidus mannose 6-phosphate (Faust et al., 1987) pourrait se retrouver dans les lysosomes et y être clivée, nous n'avons trouvé aucune indication d'une sécrétion de ce stock potentiel de rénine active. L'absence de cathepsine B dans le surnageant cellulaire souligne en effet qu'aucune sécrétion de lysosomes ne se produit. La maturation de la cathepsine B semble donc se produire dans la voie de sécrétion de ces cellules.

6.2.2 Localisation des enzymes de maturation de la prorénine *in vivo*

La co-localisation de la rénine et d'une enzyme de maturation candidate dans un tissu appuie évidemment l'hypothèse voulant que cette enzyme joue un rôle dans la maturation *in vivo*. Cependant la confirmation de cette fonction nécessite l'inhibition spécifique de l'activité de la maturase dans le tissu approprié. Ainsi la co-localisation de la convertase PC5 et de la rénine dans le cortex surrénalien chez l'humain suggère une fonction de cette convertase dans la maturation de la prorénine dans ce tissu (Mercure et al., 1996). Afin d'étayer davantage le rôle postulé, il serait intéressant

d'évaluer l'effet de l'inhibition de PC5 sur la sécrétion de rénine active à partir d'explants de la surrénale, en testant différents inhibiteurs des PCs. De même, les résultats présentés en annexe indiquent que le transcrit de PC5 est abondant dans un modèle de cellules JGs de souris capable de maturer la prorénine-2. La localisation intracellulaire de cet événement dans ce type cellulaire n'a cependant pas été définie et il est possible que dans les cellules JGs comme dans la glande sous-maxillaire (Pratt et al., 1983), la prorénine-2 soit maturée dans des compartiments en amont des granules. En effet, bien que l'inactivation du gène de la rénine-1 abolit la formation des granules dans les cellules JGs, la rénine-2 active continue néanmoins à être sécrétée dans la circulation de ces souris (Clark et al., 1997). Un modèle d'inactivation du gène de PC5 chez la souris pourrait servir à évaluer le rôle de PC5 dans la maturation de la prorénine-2 des cellules JGs. La culture d'explants de surrénales de ces souris pourraient également être utilisée pour évaluer si l'absence de PC5 altère les niveaux de rénine active sécrétée par ce tissu. De plus, l'expression "tissu-spécifique" de la prorénine humaine dans les surrénales de ces souris permettrait de déterminer la présence de protéases alternatives capables de compenser pour l'absence de PC5.

Dans le cas de la cathepsine B, au moins deux possibilités, autres qu'un rôle de cette protéase dans la maturation de la prorénine, peuvent être avancées pour expliquer les observations de co-localisation avec la rénine dans plusieurs tissus. Premièrement, la prorénine et la rénine pourraient être captées de la circulation par certains tissus et transportées vers la voie lysosomiale pour y être dégradées. Certains résultats suggèrent ainsi que dans le coeur, la prorénine et la rénine seraient internalisées par le biais de la liaison de leurs résidus mannose 6-phosphate, aux MPRs à la surface des cardiomyocytes (van Kesteren et al., 1997). Deuxièmement, dans des cellules ayant une voie de sécrétion régulée, telles que les cellules hypophysaires où une co-localisation de la cathepsine B et de la rénine a été observée, le flot important de protéines qui entrent dans les granules pourraient entraîner des enzymes lysosomiales vers ce compartiment. Cette hypothèse est supportée par des résultats dans les cellules β des îlots de Langerhans, qui montrent

que la cathepsine B est co-localisée avec la proinsuline au niveau des granules immatures mais que l'essentiel de la cathepsine B est retiré des granules au cours de leur maturation et envoyé au lysosomes (Kuliawat et Arvan, 1994). Il est cependant possible que cet enlèvement soit parfois incomplet et que de petites quantités de cathepsine B active se retrouvent dans les granules matures (Docherty et al., 1984). Dans les cellules JGs, la nature lysosomiale des granules à rénine suggère que la prorénine et la cathepsine B néo-synthétisées sont toutes les deux ciblées vers ce compartiment et concorde davantage avec un rôle de la cathepsine B dans la maturation de la prorénine humaine dans ces cellules. L'activité de maturation de la prorénine par la cathepsine B dans cette sorte de granule lysosomiale est possiblement supérieure à celle observée *in vitro*, grâce à la concentration plus élevée des deux protéines et au pH possiblement plus près des valeurs optimales pour la cathepsine B. Ces conditions pourraient accélérer l'activation de la prorénine, qui semble être exhaustive dans les granules matures des JGs (Taugner et al., 1987). Encore une fois, la confirmation du rôle de la cathepsine B viendrait de l'étude de la biosynthèse de la prorénine en absence de cathepsine B *in vivo*. Il existe plusieurs maladies qui se caractérisent par divers types de défauts dans le mécanisme de glycosylation (par exemple les cas de mucopolysaccharidose II et III) résultant en l'abolition de la formation de résidus mannose 6-phosphate sur les oligosaccharides des zymogènes lysosomiaux, qui ne sont donc pas envoyés aux lysosomes (Kornfeld, 1998). Ces maladies représentent possiblement des modèles humains d'inactivation de la fonction de la cathepsine B, dont le rôle dans la maturation de la prorénine pourrait être testé en dosant la concentration plasmatique de la rénine active chez les sujets atteints.

Tableau 6-I Enzymes candidates pour la maturation de la prorénine *in vivo*

Espèce	Enzyme de maturation	Localisation tissulaire
humain		
(Mercure et al., 1996)	PC5-A	glande surrénale (cortex)
(Wang et al., 1991) (Neves et al., 1996) (Jutras et al., 1999)	cathepsine B	rein (cellules juxta- glomérulaires)
souris ren-2		
(Kim et al., 1991)	PRECE (kallikréine)	glande sous- maxillaire
(Nakagawa et al., 1993) (Laframboise et al., 1997)	PC5-A	rein (cellules juxta- glomérulaires)

RÉFÉRENCES

- Allan, B.B. et Balch, W.E. (1999). Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science* 285, 63-66.
- Anderson, E.D., VanSlyke, J.K., Thulin, C.D., Jean, F., et Thomas, G. (1997). Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process: requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J.* 16, 1508-1518.
- Aridor, M. et Balch, W.E. (1999). Integration of endoplasmic reticulum signaling in health and disease. *Nat. Med.* 5, 745-751.
- Arvan, P. et Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem. J.* 332, 593-610.
- Baetz, K., Isaaz, S., et Griffiths, G.M. (1995). Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. *J. Immunol.* 154, 6122-6131.
- Baram, D., Adachi, R., Medalia, O., Tuvim, M., Dickey, B.F., Mekori, Y.A., and Sagi-Eisenberg, R. (1999). Synaptotagmin II negatively regulates Ca²⁺-triggered exocytosis of lysosomes in mast cells. *J. Exp. Med.* 189, 1649-1658.
- Baranski, T.J., Cantor, A.B., et Kornfeld, S. (1992). Lysosomal enzyme phosphorylation. I. Protein recognition determinants in both lobes of procathepsin D mediate its interaction with UDP-GlcNAc:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* 267, 23342-23348.
- Barbero, P., Rovere, C., De, B., I, Seidah, N., Beaudet, A., et Kitabgi, P. (1998). PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 273, 25339-25346.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chretien, M., Seidah, N.G. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3564-3568.
- Benjannet, S., Reudelhuber, T., Mercure, C., Rondeau, N., Chretien, M., et Seidah, N.G. (1992). Proprotein conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity, and intracellular environment. Cell type-specific processing of human prorenin by the convertase PC1. *J. Biol. Chem.* 267, 11417-11423.
- Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, A., Lazure, Chretien, M., et Seidah, N.G. (1993). Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone

convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem. J.* 294, 735-743.

- Bennett, D.L., Bailyes, E.M., Nielsen, E., Guest, P.C., Rutherford, N.G., Arden, S.D., Hutton, J.C. (1992) Identification of the type 2 proinsulin processing endopeptidase as PC2, a member of the eukaryote subtilisin family. *J. Biol. Chem.* 267, 15229-15236.
- Benting, J.H., Rietveld, A.G., et Simons, K. (1999). N-Glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell. Biol.* 146, 313-320.
- Blache, P., Le-Nguyen, D., Boegner-Lemoine, C., Cohen-Solal, A., Bataille, D., et Kervran, A. (1994). Immunological detection of prohormone convertases in two different proglucagon processing cell lines. *FEBS Lett.* 344, 65-68.
- Bonfanti, L., Mironov, A.A.J., Martinez-Menarguez, J.A., Martella, O., Fusella, A., Baldassarre, M., Buccione, R., Geuze, H.J., Mironov, A.A., et Luini, A. (1998). Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell* 95, 993-1003.
- Bonifacino, J.S. et Weissman, A.M. (1998). Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 14, 19-57.
- Boudreault, A., Gauthier, D., et Lazure, C. (1998). Proprotein convertase PC1/3-related peptides are potent slow tight-binding inhibitors of murine PC1/3 and Hfurin. *J. Biol. Chem.* 273, 31574-31580.
- Brakch, N., Galanopoulou, A.S., Patel, Y.C., Boileau, G., Seidah, N.G., (1995) Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett.* 362, 143-146.
- Braks, J.A. et Martens, G.J. (1994). 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* 78, 263-273.
- Brechler, V., Chu, W.N., Baxter, J.D., Thibault, G., Reudelhuber, T.L. (1996). A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 20636-20640.
- Breslin MB. Lindberg I. Benjannet S. Mathis JP. Lazure C. Seidah NG. (1993) Differential processing of proenkephalin by prohormone convertases 1(3) and 2 and furin. *J. Biol. Chem.* 268, 27084-27093.

- Brown, D.A., Crise, B., et Rose, J.K. (1989). Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* 245, 1499-1501.
- Butz, S., Fernandez-Chacon, R., Schmitz, F., Jahn, R., Sudhof, and TC (1999). The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI. Synaptotagmin III is enriched in synapses and synaptic plasma membranes but not in synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 274, 18290-18296.
- Campbell, D.J., Valentijn, A.J., et Condron, R. (1991). Purification and amino-terminal sequence of rat kidney renin: evidence for a two-chain structure. *J. Hypertens.* 9, 29-33.
- Carey, R.M., McGrath, H.E., Pentz, E.S., Gomez, R.A., et Barrett, P.Q. (1997). Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J. Clin. Invest.* 100, 1566-1574.
- Castle, A.M., Huang, A.Y., et Castle, J.D. (1997). Passive sorting in maturing granules of AtT-20 cells: the entry and exit of salivary amylase and proline-rich protein. *J. Cell. Biol.* 138, 45-54.
- Chanat, E. et Huttner, W.B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* 115, 1505-1519.
- Chanat, E., Weiss, U., Huttner, W.B., et Tooze, S.A. (1993). Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. *EMBO J.* 12, 2159-2168.
- Chevrier, D., Fournier, H., Nault, C., Zollinger, M., Crine, P., et Boileau, G. (1993). Targeting of pro-opiomelanocortin to the regulated secretory pathway may involve cooperation between different protein domains. *Mol. Cell. Endocrin.* 94, 213-221.
- Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., et Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397, 621-625.
- Chu, W.N., Mercure, C., Baxter, J.D., et Reudelhuber, T.L. (1992). Molecular determinants of human prorenin processing. *Hypertension* 20, 782-787.
- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268.
- Clark, A.F., Sharp, M.G.F., Morley, S.D., Fleming, S., Peters, J., et Mullins, J.J. (1997). Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J. Biol. Chem.* 272, 18185-18190.

- Coates, L.C. et Birch, N.P. (1997) Posttranslational maturation of the prohormone convertase SPC3 in vitro. *J. Neurochem.* 68, 828-836.
- Colomer, V., Kicska, G.A., et Rindler, M.J. (1996). Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. *J. Biol. Chem.* 271, 48-55.
- Cool, D.R., Normant, E., Shen, F., Chen, H.C., Pannell, L., Zhang, et Loh, Y.P. (1997). Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* 88, 73-83.
- Coorsen, J.R., Schmitt, H., et Almers, W. (1996). Ca²⁺ triggers massive exocytosis in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* 15, 3787-3791.
- Coppola, T., Perret-Menoud, V., Luthi, S., Farnsworth, C.C., Glomset, J.A., et Regazzi, R. (1999). Disruption of Rab3-calmodulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis. *EMBO J.* 18, 5885-5891.
- Creemers, J.W., Usac, E.F., Bright, N.A., Van de Loo, J.W., Jansen, Van, d., V, et Hutton, J.C. (1996). Identification of a transferable sorting domain for the regulated pathway in the prohormone convertase PC2. *J. Biol. Chem.* 271, 25284-25291.
- Cuozzo, J.W., Tao, K., Wu, Q.L., Young, W., et Sahagian, G.G. (1995). Lysine-based structure in the proregion of procathepsin L is the recognition site for mannose phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270, 15611-15619.
- Dahms, N.M., Lobel, P., et Kornfeld, S. (1989). Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* 264, 12115-12118.
- Day, R., Lazure, C., Basak, A., Boudreault, A., Limperis, P., Dong, W., et Lindberg, I. (1998). Prodynorphin processing by proprotein convertase 2. Cleavage at single basic residues and enhanced processing in the presence of carboxypeptidase activity. *J. Biol. Chem.* 273, 829-836.
- De Bie, I., Marcinkiewicz, M., Malide, D., Lazure, C., Nakayama, Bendayan, M., et Seidah, N.G. (1996). The isoforms of proprotein convertase PC5 are sorted to different subcellular compartments. *J. Cell. Biol.* 135, 1261-1275.
- Dell'Angelica, E.C., Mullins, C., et Bonifacino, J.S. (1999). AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J. Biol. Chem.* 274, 7278-7285.
- Demaurex, N., Furuya, W., D'Souza, S., Bonifacino, J.S., et Grinstein, S. (1998). Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J. Biol. Chem.* 273, 2044-2051.

- Do, Y.S., Shinagawa, T., Tam, H., Inagami, T., et Hsueh, W.A. (1987). Characterization of pure human renal renin. Evidence for a subunit structure. *J. Biol. Chem.* 262, 1037-1043.
- Docherty, K., Hutton, J.C., et Steiner, D.F. (1984). Cathepsin B-related proteases in the insulin secretory granule. *J. Biol. Chem.* 259, 6041-6044.
- Edwardson, J.M., An, S., et Jahn, R. (1997). The secretory granule protein syncollin binds to syntaxin in a Ca²⁺(+)-sensitive manner. *Cell* 90, 325-333.
- Eipper, B.A., Stoffers, D.A., et Mains, R.E. (1992). The biosynthesis of neuropeptides: peptide alpha-amidation. *Ann. Rev. Neurosci.* 15, 57-85.
- Ellgaard, L., Molinari, M., et Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888.
- Eng, F.J., Varlamov, O., et Fricker, L.D. (1999). Sequences within the cytoplasmic domain of gp180/carboxypeptidase D mediate localization to the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* 10, 35-46.
- Englund, P.T. (1993). The structure et biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62, 121-138.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., et Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15781-15786.
- Faust, P.L., Chirgwin, J.M., et Kornfeld, S. (1987). Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *J. Cell. Biol.* 105, 1947-1955.
- Folsch, H., Ohno, H., Bonifacino, J.S., et Mellman, I. (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* 99, 189-198.
- Fricker, L.D. (1988). Carboxypeptidase E. *Ann. Rev. Physiol.* 50, 309-321.
- Fricker, L.D., Berman, Y.L., Leiter, E.H., et Devi, L.A. (1996). Carboxypeptidase E activity is deficient in mice with the fat mutation. Effect on peptide processing. *J. Biol. Chem.* 271, 30619-30624.
- Fricker, L.D., Das, B., et Angeletti, R.H. (1990). Identification of the pH-dependent membrane anchor of carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10). *J. Biol. Chem.* 265, 2476-2482.
- Fricker, L.D., McKinzie, A.A., Sun, J., Curran, E., Qian, Y., Yan, Patterson, S.D., Courchesne, P.L., Richards, B., Levin, N., Mzhavia, N., Devi, LA, et Douglass, J. (2000). Identification and characterization of proSAAS, a granin-

like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J. Neuroscience*. 20, 639-648.

- Fritz, L.C., Haidar, M.A., Arfsten, A.E., Schilling, J.W., Carilli, C., Shine, J., Baxter, J.D., et Reudelhuber, T.L. (1987). Human renin is correctly processed and targeted to the regulated secretory pathway in mouse pituitary AtT-20 cells. *J. Biol. Chem.* 262, 12409-12412.
- Furuta, M., Carroll, R., Martin, S., Swift, H.H., Ravazzola, M., Orci, L., et Steiner, D.F. (1998). Incomplete processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of Des-31,32 proinsulin intermediates in islets of mice lacking active PC2. *J. Biol. Chem.* 273, 3431-3437.
- Furuta, M., Yano, H., Zhou, A., Rouille, Y., Holst, J.J., Carroll, Ravazzola, M., Orci, L., Furuta, H., et Steiner, D.F. (1997). Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 6646-6651.
- Galanopoulou AS. Kent G. Rabbani SN. Seidah NG. Patel YC. (1993) Heterologous processing of prosomatostatin in constitutive and regulated secretory pathways. Putative role of the endoproteases furin, PC1, and PC2. *J. Biol. Chem.* 268, 6041-6049.
- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C.F., et Sudhof, T.C. (1997). The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 387, 810-814.
- Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Belan, P.V., et Petersen, O.H. (1996). Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell* 84, 473-480.
- Gilbert, H.F. (1997). Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 272, 29399-29402.
- Glombik, M.M., Kromer, A., Salm, T., Huttner, W.B., et Gerdes, H.H. (1999). The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules. *EMBO J.* 18, 1059-1070.
- Gomez, R.A., Chevalier, R.L., Everett, A.D., Elwood, J.P., Peach, M.J., Lynch, K.R., et Carey, R.M. (1990). Recruitment of renin gene-expressing cells in adult rat kidneys. *Am. J. Physiol.* 259, F660-F665
- Goodman, L.J. et Gorman, C.M. (1994). Autoproteolytic activation of the mouse prohormone convertase mPC1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 795-804.

- Griendling, K.K., Murphy, T.J., et Alexander, R.W. (1993). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 87, 1816-1828.
- Halban, P.A. et Irminger, J.C. (1994). Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* 299, 1-18.
- Hammond, C. et Helenius, A. (1994). Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell. Biol.* 126, 41-52.
- Hansen, N.J., Antonin, W., et Edwardson, J.M. (1999). Identification of SNAREs involved in regulated exocytosis in the pancreatic acinar cell. *J. Biol. Chem.* 274, 22871-22876.
- Hashimoto, S., Fumagalli, G., Zanini, A., et Meldolesi, J. (1987). Sorting of three secretory proteins to distinct secretory granules in acidophilic cells of cow anterior pituitary. *J. Cell. Biol.* 105, 1579-1586.
- Hay, J.C. et Scheller, R.H. (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 505-512.
- Huttner, W.B. (1988). Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Ann. Rev. Physiol.* 50, 363-376.
- Huttner, W.B., Gerdes, H.H., et Rosa, P. (1991). The granin (chromogranin-secretogranin) family. *TIBS* 16, 27-30.
- Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T., Mort, et JS (1997). Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J. Biol. Chem.* 272, 1197-1202.
- Irminger, J.C., Verchere, C.B., Meyer, K., et Halban, P.A. (1997). Proinsulin targeting to the regulated pathway is not impaired in carboxypeptidase E-deficient Cpefat/Cpefat mice. *J. Biol. Chem.* 272, 27532-27534.
- Jackson, R.S., Creemers, J.W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.L., Sanders, L., Montague, CT, Hutton, J.C., et O'Rahilly, S. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Gen.* 16, 303-306.
- Jean, F., Basak, A., Rondeau, N., Benjannet, S., Hendy, G.N., Seidah, N.G., Chretien, M., et Lazure, C. (1993). Enzymic characterization of murine and human prohormone convertase-1 (mPC1 and hPC1) expressed in mammalian GH4C1 cells. *Biochem. J.* 292, 891-900.
- Jensen, B.L., Rasch, R., Nyengaard, J.R., et Skott, O. (1997). Giant renin secretory granules in beige mouse renal afferent arterioles. *Cell Tissue Res.* 288, 399-406.

- Jia, Z., Hasnain, S., Hiramata, T., Lee, X., Mort, J.S., To, R., et Huber, C.P. (1995). Crystal structures of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. *J. Biol. Chem.* 270, 5527-5533.
- Johannes, L., Lledo, P.M., Roa, M., Vincent, J.D., Henry, J.P., et Darchen, F. (1994). The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 13, 2029-2037.
- Johanning, K., Juliano, M.A., Juliano, L., Lazure, C., Lamango, NS, Steiner, D.F., et Lindberg, I. (1998). Specificity of prohormone convertase 2 on proenkephalin and proenkephalin-related substrates. *J. Biol. Chem.* 273, 22672-22680.
- Jutras, I. et Reudelhuber, T.L. (1999). Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett.* 443, 48-52.
- Jutras, I., Seidah, N.G., Reudelhuber, T.L., et Brechler, V. (1997). Two activation states of the prohormone convertase PC1 in the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 15184-15188.
- Kern, G., Kern, D., Schmid, F.X., et Fischer, G. (1995). A kinetic analysis of the folding of human carbonic anhydrase II and its catalysis by cyclophilin. *J. Biol. Chem.* 270, 740-745.
- Kim, S., Hosoi, M., Kikuchi, N., et Yamamoto, K. (1991). Amino-terminal amino acid sequence and heterogeneity in glycosylation of rat renal renin. *J. Biol. Chem.* 266, 7044-7050.
- Kim, W.S., Hatsuzawa, K., Ishizuka, Y., Hashiba, K., Murakami, K., et Nakayama, K. (1990a). A processing enzyme for prorenin in mouse submandibular gland. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 265, 5930-5933.
- Kim, W.S., Nakayama, K., Nakagawa, T., Kawamura, Y., Haraguchi, K., et Murakami, K. (1991b). Mouse submandibular gland prorenin-converting enzyme is a member of glandular kallikrein family. *J. Biol. Chem.* 266, 19283-19287.
- Klumperman, J., Kuliawat, R., Griffith, J.M., Geuze, H.J., et Arvan (1998). Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J. Cell. Biol.* 141, 359-371.
- Kopito, R.R. (1997). ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88, 427-430.
- Kopito, R.R. (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol. Rev.* 79, S167-S173

- Kornfeld, S. (1998). Diseases of abnormal protein glycosylation – An emerging area. *J. Clin. Invest.* 101, 1293-1295.
- Kornfeld, S. et Mellman, I. (1989). The biogenesis of lysosomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5, 483-525.
- Kuehn, M.J., Herrmann, J.M., et Schekman, R. (1998). COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* 391, 187-190.
- Kuliawat, R. et Arvan, P. (1994). Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J. Cell. Biol.* 126, 77-86.
- Laframboise, M., Reudelhuber, T.L., Jutras, I., Brechler, V., Seidah, N.G., Day, R., Gross, K.W., et Deschepper, C.F. (1997). Prorenin activation and prohormone convertases in the mouse As4.1 cell line. *Kidney International* 51, 104-109.
- Laine, J. et Lebel, D. (1999). Efficient binding of regulated secretory protein aggregates to membrane phospholipids at acidic pH. *Biochem. J.* 338, 289-294.
- Lamaze, C. et Schmid, S.L. (1995). The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 573-580.
- Lang, J., Fukuda, M., Zhang, H., Mikoshiba, K., et Wollheim, C.B. (1997). The first C2 domain of synaptotagmin is required for exocytosis of insulin from pancreatic beta-cells: action of synaptotagmin at low micromolar calcium. *EMBO J.* 16, 5837-5846.
- Leduc, R., Molloy S.S., Thorne B.A., Thomas G. (1992) Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* 267, 14304-14308.
- Lusson, J., Benjannet, S., Hamelin, J., Savaria, D., Chretien, M., et Seidah, N.G. (1997). The integrity of the RRGDL sequence of the proprotein convertase PC1 is critical for its zymogen and C-terminal processing and for its cellular trafficking. *Biochem. J.* 326, 737-744.
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chretien, M., Seidah, N.G. (1993). cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6691-6695.
- Lyman, S.K. et Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88, 85-96.
- Ma, J., Simonovic, M., Qian, R., et Colley, K.J. (1999). Sialyltransferase isoforms are phosphorylated in the cis-medial Golgi on serine and threonine residues in their luminal sequences. *J. Biol. Chem.* 274, 8046-8052.

- Marsh, M. et McMahon, H.T. (1999). The structural era of endocytosis. *Science* 285, 215-220.
- Martinez-Menarguez, J.A., Geuze, H.J., Slot, J.W., et Klumperman, J. (1999). Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* 98, 81-90.
- Martinez, I., Chakrabarti, S., Hellevik, T., Morehead, J., Fowler, K., Andrews, N.W., Synaptotagmin VII regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 148, 1141-1149.
- Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 12, 575-625.
- Mercure, C., Jutras, I., Day, R., Seidah, N.G., et Reudelhuber, T.L. (1996). Prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex. *Hypertension* 28, 840-846.
- Methot, D., Silversides, D.W., et Reudelhuber, T.L. (1999). In vivo enzymatic assay reveals catalytic activity of the human renin precursor in tissues. *Circ. Res.* 84, 1067-1072.
- Milgram, S.L., Eipper, B.A., et Mains, R.E. (1994). Differential trafficking of soluble and integral membrane secretory granule-associated proteins. *J. Cell. Biol.* 124, 33-41.
- Milgram, S.L. et Mains, R.E. (1994). Differential effects of temperature blockade on the proteolytic processing of three secretory granule-associated proteins. *J. Cell Science* 107, 737-745.
- Milgram, S.L., Mains, R.E., et Eipper, B.A. (1993). COOH-terminal signals mediate the trafficking of a peptide processing enzyme in endocrine cells. *J. Cell. Biol.* 121, 23-36.
- Milgram, S.L., Mains, R.E., et Eipper, B.A. (1996). Identification of routing determinants in the cytosolic domain of a secretory granule-associated integral membrane protein. *J. Biol. Chem.* 271, 17526-17535.
- Misono, K.S., Chang, J.J., et Inagami, T. (1982). Amino acid sequence of mouse submaxillary gland renin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 4858-4862.
- Mitra, A., Song, L., et Fricker, L.D. (1994). The C-terminal region of carboxypeptidase E is involved in membrane binding and intracellular routing in AtT-20 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 19876-19881.

- Molloy, S.S., Anderson, E.D., Jean, F., Thomas, G. (1999) Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis. *Trends Cell Biol.* 9, 28-35.
- Monlauzeur, L., Rajasekaran, A., Chao, M., Rodriguez-Boulan, E., et Le Bivic, A. (1995). A cytoplasmic tyrosine is essential for the basolateral localization of mutants of the human nerve growth factor receptor in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 270, 12219-12225.
- Mothes, W., Heinrich, S.U., Graf, R., Nilsson, I., von Heijne, G., Brunner, J., et Rapoport, T.A. (1997). Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89, 523-533.
- Mukherjee, S. et Maxfield, F.R. (1999). Cholesterol: stuck in traffic. *Nat. Cell Biol.* 1, E37-E38.
- Muller, L., Zhu, X., et Lindberg, I. (1997). Mechanism of the facilitation of PC2 maturation by 7B2: involvement in ProPC2 transport and activation but not folding. *J. Cell. Biol.* 139, 625-638.
- Muniz, M. et Riezman, H. (2000). Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J.* 19, 10-15.
- Nachtigal, M.W. et Ingraham, H.A. (1996) Bioactivation of Mullerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 7711-7716.
- Naggert, J.K., Fricker, L.D., Varlamov, O., Nishina, P.M., Rouille, Steiner, D.F., Carroll, R.J., Paigen, B.J., et Leiter, E.H. (1995). Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat. Genet.* 10, 135-142.
- Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K., et Nakayama, K. (1993). Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J. Biochem.* 113, 132-135.
- Nakayama, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* 327, 625-635.
- Natori, S. et Huttner, W.B. (1996). Chromogranin B (secretogranin I) promotes sorting to the regulated secretory pathway of processing intermediates derived from a peptide hormone precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4431-4436.
- Neves, F.A., Duncan, K.G., et Baxter, J.D. (1996). Cathepsin B is a prorenin processing enzyme. *Hypertension* 27, 514-517.

- Niehers, C. et Huttner, W.B. (1990). Purification and characterization of tyrosylprotein sulfotransferase. *EMBO J.* 9, 35-42.
- Novick, P. et Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 496-504.
- Novikova, E.G., Reznik, S.E., Varlamov, O., et Fricker, L.D. (2000). Carboxypeptidase Z is present in the regulated secretory pathway and extracellular matrix in cultured cells and in human tissues. *J. Biol. Chem.* 275, 4865-4870.
- Oliver, J.D., Roderick, H.L., Llewellyn, D.H., et High, S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol. Biol. Cell* 10, 2573-2582.
- Orci, L., Stannes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Sollner, T.H., et Rothman, J.E. (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90, 335-349.
- Paquet, L., Bergeron, F., Boudreault, A., Seidah, N.G., Chretien, Mbikay, M., et Lazure, C. (1994). The neuroendocrine precursor 7B2 is a sulfated protein proteolytically processed by a ubiquitous furin-like convertase. *J. Biol. Chem.* 269, 19279-19285.
- Paul, M., Wagner, J., et Dzau, V.J. (1993). Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest.* 91, 2058-2064.
- Pfeffer, S.R. (1999). Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nat. Cell Biol.* 1, E17-E22
- Pinet, F., Corvol, M.T., Dench, F., Bourguignon, J., Feunteun, J., Menard, J., et Corvol, P. (1985). Isolation of renin-producing human cells by transfection with three simian virus 40 mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 8503-8507.
- Pinet, F., Mizrahi, J., Laboulandine, I., Menard, J., et Corvol, P. (1987). Regulation of prorenin secretion in cultured human transfected juxtaglomerular cells. *J. Clin. Invest.* 80, 724-731.
- Pohlmann, R., Boeker, M.W., et von Figura, K. (1995). The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 27311-27318.
- Pratt, R.E., Ouellette, A.J., et Dzau, V.J. (1983). Biosynthesis of renin: multiplicity of active and intermediate forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 6809-6813.

- Rapoport, T.A., Rolls, M.M., et Jungnickel, B. (1996). Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 499-504.
- Reudelhuber, T.L., Mercure, C., Th  roux, L.L., Chu, W.N., Baxter, J.D., Seidah, N.G. (1993). Subcellular sorting and processing of prorenin. *Cellular and molecular biology of the renin-angiotensin system*. CRC Press, Inc.
- Rhodes, C.J., Lincoln, B., et Shoelson, S.E. (1992). Preferential cleavage of des-31,32-proinsulin over intact proinsulin by the insulin secretory granule type II endopeptidase. Implication of a favored route for prohormone processing. *J. Biol. Chem.* 267, 22719-22727.
- Rijnbouts, S., Kal, A.J., Geuze, H.J., Aerts, H., et Strous, G.J. (1991). Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 23586-23592.
- Rindler, M.J. (1998). Carboxypeptidase E, a peripheral membrane protein implicated in the targeting of hormones to secretory granules, co-aggregates with granule content proteins at acidic pH. *J. Biol. Chem.* 273, 31180-31185.
- Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J., et Andrews, N.W. (1997). Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 137, 93-104.
- Rouille, Y., Martin, S., et Steiner, D.F. (1995). Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J. Biol. Chem.* 270, 26488-26496.
- Rouille Y., Kantengwa S., Irminger JC., Halban PA. (1997). Role of the prohormone convertase PC3 in the processing of proglucagon to glucagon-like peptide 1. *J. Biol. Chem.* 272, 32810-32816.
- Rovere, C., Viale, A., Nahon, J., et Kitabgi, P. (1996). Impaired processing of brain proneurotensin and promelanin-concentrating hormone in obese fat/fat mice. *Endocrinology* 137, 2954-2958.
- Rufaut, N.W., Brennan, S.O., Hakes, D.J., Dixon, J.E., et Birch, N.P. (1993). Purification and characterization of the candidate prohormone-processing enzyme SPC3 produced in a mouse L cell line *J. Biol. Chem.* 268, 20291-20298.
- Schekman, R. et Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271, 1526-1533.
- Schimmoller, F., Simon, I., et Pfeffer, S.R. (1998). Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273, 22161-22164.

- Schluter, O.M., Schnell, E., Verhage, M., Tzonopoulos, T., Nicoll, RA, Janz, R., Malenka, R.C., Geppert, M., et Sudhof, T.C. (1999). Rabphilin knock-out mice reveal that rabphilin is not required for rab3 function in regulating neurotransmitter release. *J. Neuroscience* 19, 5834-5846.
- Schmid, S.L. (1997). Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Ann. Rev. Biochem.* 66, 511-548.
- Seidah, N.G. et Chretien, M. (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr. Opin. Biotech.* 8, 602-607.
- Seidah, N.G., Marcinkiewicz, M., Benjannet, S., Gaspar, L., Beaubien, G., Mattei, M.G., Lazure, C., Mbikay, M., et Chretien, M. (1991). Cloning and primary sequence of a mouse candidate prohormone convertase PC1 homologous to PC2, Furin, and Kex2: distinct chromosomal localization and messenger RNA distribution in brain and pituitary compared to PC2. *Mol. Endocrin.* 5, 111-122.
- Shen, F.S. et Loh, Y.P. (1997). Intracellular misrouting and abnormal secretion of adrenocorticotropin and growth hormone in cpefat mice associated with a carboxypeptidase E mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 5314-5319.
- Shennan, K.I., Seal, A.J., Smeekens, S.P., Steiner, D.F., et Docherty (1991). Site-directed mutagenesis and expression of PC2 in microinjected *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 266, 24011-24017.
- Shennan, K.I., Taylor, N.A., et Docherty, K. (1994). Calcium- and pH-dependent aggregation and membrane association of the precursor of the prohormone convertase PC2. *J. Biol. Chem.* 269, 18646-18650.
- Siezen, R.J. et Leunissen, J.A. (1997). Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science* 6, 501-523.
- Sigmund, C.D., Okuyama, K., Ingelfinger, J., Jones, C.A., Mullins, JJ, Kane, C., Kim, U., Wu, C.Z., Kenny, L., et Rustum, Y. (1990). Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J. Biol. Chem.* 265, 19916-19922.
- Silen, J.L. et Agard, D.A. (1989). The alpha-lytic protease pro-region does not require a physical linkage to activate the protease domain in vivo. *Nature* 341, 462-464.
- Smeekens, S.P., Avruch, A.S., LaMendola, J., Chan, S.J., Steiner, et DF (1991). Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 340-344.

- Song, L. et Fricker, L.D. (1996). Tissue distribution and characterization of soluble and membrane-bound forms of metallo-carboxypeptidase D. *J. Biol. Chem.* 271, 28884-28889.
- Song, L. et Fricker, L.D. (1997). Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metallo-carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 272, 10543-10550.
- Steiner, D.F. (1998). The proprotein convertases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 31-39.
- Steiner, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S., et Chan, S.J. (1992). The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J. Biol. Chem.* 267, 23435-23438.
- Stinchcombe, J.C. et Griffiths, G.M. (1999). Regulated secretion from hemopoietic cells. *J. Cell. Biol.* 147, 1-6.
- Sudhof, T.C. et Rizo, J. (1996). Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* 17, 379-388.
- Suzuki, T., Yan, Q., et Lennarz, W.J. (1998). Complex, two-way traffic of molecules across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 273, 10083-10086.
- Taugner, R. et Hackenthal, E. (1988). On the character of the secretory granules in juxtaglomerular epithelioid cells. *Int. Rev. Cytol.* 110, 93-131.
- Taugner, R., Kim, S.J., Murakami, K., et Waldherr, R. (1987). The fate of prorenin during granulopoiesis in epithelioid cells. Immunocytochemical experiments with antisera against renin and different portions of the renin prosegment. *Histochemistry* 86, 249-253.
- Taugner, R., Metz, R., et Rosivall, L. (1988). Macroautophagic phenomena in renin granules. *Cell Tissue Res.* 251, 229-231.
- Taugner, R., Whalley, A., Angermuller, S., Buhle, C.P., et Hackenthal, E. (1985). Are the renin-containing granules of juxtaglomerular epithelioid cells modified lysosomes? *Cell Tissue Res.* 239, 575-587.
- Thiele, C., Hannah, M.J., Fahrenholz, F., et Huttner, W.B. (2000). Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles. *Nat. Cell Biol.* 2, 42-49.
- Thomas, L., Leduc, R., Thorne, B.A., Smeekens, S.P., Steiner, D.F., Thomas, G. (1991) Kex2-like endoproteases PC2 and PC3 accurately cleave a model prohormone in mammalian cells: evidence for a common core of neuroendocrine processing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5297-5301.

- van Kesteren, C.A., Danser, A.H., Derkx, F.H., Dekkers, D.H., Lamers, J.M., Saxena, P.R., et Schalekamp, M.A. (1997). Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension* 30, 1389-1396.
- Varlamov, O., Eng, F.J., Novikova, E.G., et Fricker, L.D. (1999). Localization of metallocarboxypeptidase D in AtT-20 cells. Potential role in prohormone processing. *J. Biol. Chem.* 274, 14759-14767.
- Varlamov, O. et Fricker, L.D. (1996). The C-terminal region of carboxypeptidase E involved in membrane binding is distinct from the region involved with intracellular routing. *J. Biol. Chem.* 271, 6077-6083.
- Varlamov, O., Fricker, L.D., Furukawa, H., Steiner, D.F., Langley, SH, et Leiter, E.H. (1997). Beta-cell lines derived from transgenic Cpe(fat)/Cpe(fat) mice are defective in carboxypeptidase E and proinsulin processing. *Endocrinology* 138, 4883-4892.
- Viale, A., Ortola, C., Hervieu, G., Furuta, M., Barbero, P., Steiner, D.F., Seidah, N.G., et Nahon, J.L. (1999). Cellular localization and role of prohormone convertases in the processing of pro-melanin concentrating hormone in mammals. *J. Biol. Chem.* 274, 6536-6545.
- Vindrola, O. et Lindberg, I. (1992). Biosynthesis of the prohormone convertase mPC1 in AtT-20 cells. *Mol. Endocrin.* 6, 1088-1094.
- Vitale, G., Rybin, V., Christoforidis, S., Thornqvist, P., McCaffrey, M., Stenmark, et Zerial, M. (1998). Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *EMBO J.* 17, 1941-1951.
- von Lutterotti, N., Catanzaro, D.F., Sealey, J.E., et Laragh, J.H. (1994). Renin is not synthesized by cardiac and extrarenal vascular tissues. A review of experimental evidence. *Circulation* 89, 458-470.
- Wagner, C. et Kurtz, A. (1998). Regulation of renal renin release. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7, 437-441.
- Walter, P. et Johnson, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10, 87-119.
- Wan, L., Molloy, S.S., Thomas, L., Liu, G., Xiang, Y., Rybak, S.L., et Thomas, G. (1998). PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* 94, 205-216.
- Wang, P.H., Do, Y.S., Macaulay, L., Shinagawa, T., Anderson, P.W., Baxter, J.D., et Hsueh, W.A. (1991). Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J. Biol. Chem.* 266, 12633-12638.

- Warren, G. et Mellman, I. (1999). Bulk flow redux?. *Cell* 98, 125-127.
- Westphal, C.H., Muller, L., Zhou, A., Zhu, X., Bonner-Weir, S., Schambelan, M., Steiner, D.F., Lindberg, I., et Leder, P. (1999). The neuroendocrine protein 7B2 is required for peptide hormone processing in vivo and provides a novel mechanism for pituitary Cushing's disease. *Cell* 96, 689-700.
- Zapun, A., Darby, N.J., Tessier, D.C., Michalak, M., Bergeron, J.J., et Thomas, D.Y. (1998). Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J. Biol. Chem.* 273, 6009-6012.
- Zapun, A., Petrescu, S.M., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Thomas, D.Y., et Bergeron, J.J. (1997). Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. *Cell* 88, 29-38.
- Zhou, A. et Mains, R.E. (1994). Endoproteolytic processing of proopiomelanocortin and prohormone convertases 1 and 2 in neuroendocrine cells overexpressing prohormone convertases 1 or 2. *J. Biol. Chem.* 269, 17440-17447.
- Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J., et Steiner, D.F. (1998). Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 273, 11107-11114.
- Zhou, A., Paquet, L., et Mains, R.E. (1995). Structural elements that direct specific processing of different mammalian subtilisin-like prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 270, 21509-21516.
- Zhou, Y. et Lindberg, I. (1993b). Purification and characterization of the prohormone convertase PC1(PC3). *J. Biol. Chem.* 268, 5615-5623.
- Zhou, Y. et Lindberg, I. (1994a). Enzymatic properties of carboxyl-terminally truncated prohormone convertase 1 (PC1/SPC3) and evidence for autocatalytic conversion. *J. Biol. Chem.* 269, 18408-18413.
- Zhu, X., Rouille, Y., Lamango, N.S., Steiner, D.F., et Lindberg, I. (1996). Internal cleavage of the inhibitory 7B2 carboxyl-terminal peptide by PC2: a potential mechanism for its inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4919-4924.
- Zhu, X.L., Ohta, Y., Jordan, F., et Inouye, M. (1989). Pro-sequence of subtilisin can guide the refolding of denatured subtilisin in an intermolecular process. *Nature* 339, 483-484.

ANNEXE 1

ARTICLE

Prorenin Activation and Prohormone Convertases in the Mouse As4.1 Cell Line

Mireille Laframboise, Timothy L. Reudelhuber, Isabelle Jutras, Véronique Brechler,
Nabil G. Seidah, Robert Day, Kenneth W Gross, Christian F. Deschepper

Laboratoires de Neurobiologie et des Peptides Vasoactifs,
de Biochimie Moleculaire de l'Hypertension, et de Biochimie Neuroendocrinienne,
Institut de Recherches Cliniques de Montréal
Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute,
Buffalo, New York USA

Prorenin activation and prohormone convertases in the mouse As4.1 cell line

MIREILLE LAFRAMBOISE, TIMOTHY L. REUDELHUBER, ISABELLE JUTRAS, VÉRONIQUE BRECHLER, NABIL G. SEIDAH, ROBERT DAY, KENNETH W. GROSS, and CHRISTIAN F. DESCHEPPER

Laboratories of Neurobiology and Vasoactive Peptides, Molecular Biochemistry of Hypertension, and Neuroendocrine Biochemistry, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada, and Department of Molecular and Cellular Biology, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York, USA

Prorenin activation and prohormone convertases in the mouse As4.1 cell line. The precise identification of prorenin-processing enzymes has been hampered by the very low abundance of juxtaglomerular cells in the kidney. Recently, an immortalized renin-producing renal tumor cell line (As4.1) has been proposed as a model to carry out such studies. Despite the fact that they contain secretory granules, we found no evidence (on the basis of enzymatic assays of renin activity in the supernatant of the cells and of immunoprecipitations experiments) that the As4.1 cells can secrete active renin through the regulated pathway. As4.1 cells produce only renin-1, as they derive from a strain of mice expressing only one renin gene. However, stable transfection of these cells with a renin-2 expression plasmid increased the capacity of this cell line to secrete active renin in the regulated pathway. Northern blot and reverse transcriptase-polymerase chain reaction amplification (RT-PCR) assays revealed that furin, PACE4 and PCS were the only members of the proprotein convertase (PC) family to be present in these cells. As PCS is the only such enzyme with the demonstrated ability to process mouse prorenin 2, it may constitute a candidate enzyme for the processing of prorenin-2 in mouse juxtaglomerular cells. However, it is not likely to be involved in the processing of mouse prorenin 1.

The activity of the renin-angiotensin system (RAS) has been implicated in the pathogenesis of numerous cardiovascular diseases including hypertension (either essential or pregnancy-induced), cardiac hypertrophy and myocardial infarction. Renin, an aspartyl protease secreted by the kidney, catalyzes the rate-limiting step in the RAS. Renin, itself, is first synthesized as an inactive precursor, or zymogen, called prorenin. In humans, generation of circulating active renin occurs by the proteolytic removal of a 43 amino acid peptide from the amino terminus of prorenin [1, 2] within the dense core secretory granules of the renal juxtaglomerular (JG) cells. Active rat renin has a different amino terminus than human renin [3, 4], suggesting that different proteases may be involved in its generation. In the mouse there are two main isoforms of renin. While all strains of mice express the *Ren-1* gene in the kidney, most mouse strains express another renin gene (called *Ren-2*). The *Ren-2* gene is expressed primarily in the submaxillary gland (SMG), so that its protein product is

often referred to as “SMG renin.” However, *Ren-2* is also expressed in kidneys and in other tissues [2]. In particular, the kidneys of mice expressing both renin genes contain equal amounts of *Ren-1* and *Ren-2* mRNA [5]. While cleavage of SMG renin occurs at a position analogous to that of human renin [reviewed in 2], it is not yet known whether the product of the *Ren-1* gene is cleaved like human or rat renal renin.

Several enzymes capable of cleaving mouse SMG renin have been identified, including PRECE, glandular kallikreins, cathepsins and convertases [6–8]. In humans, three particular enzymes (PC1, PCS and Cathepsin B) have been proposed as prorenin processing enzymes (PPEs) [9–11]. Surprisingly, none of the enzymes identified to date are capable of activating either mouse *Ren-1* or rat prorenin. These results might indicate that different proteases activate prorenin in different species. Alternatively, the PPE active in the JG cells of the kidney might not correspond to any of the proteases identified to date. A severe impediment to the identification of candidate PPEs in JG cells is the lack of established JG cells in culture which have retained the differentiated characteristics of the JG apparatus *in vivo*. Recently, Sigmund et al [12] reported the isolation of an immortalized renin-secreting cell line (As4.1) from the kidney of mice in which tumors were targeted to renin-expressing cells by transgenesis. This cell line is unique in that it is the only established cell line reported to retain characteristics of differentiated JG cells. In an effort to identify candidate PPEs in JG cells, we sought to determine which of the known prohormone processing enzymes were present in the As4.1 cell line, and correlate these data to the ability of As4.1 cells to process prorenin.

Methods

Cell culture

As4.1 cells [12] were grown in a 37°C humidified incubator in 5% CO₂, 95% air, and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 10 µg/ml gentamicin. For either secretion or immunoprecipitation experiments, the cells (between passages 5 and 40) were replated in 24 well dishes at a density of 1.4 × 10⁴ cells/cm², and used five days after plating.

Enzymatic renin assays

For secretion experiments, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), then incubated in DMEM supplemented

Received for publication April 19, 1996
and in revised form July 30, 1996
Accepted for publication August 5, 1996

© 1997 by the International Society of Nephrology

with 5% FCS for various periods of time. The supernatants were then collected, and prorenin and renin contents were determined by the angiotensin I (Ang I) generation assay, as described previously [13]. Briefly, aliquots of supernatant were incubated in the presence of excess semipurified sheep angiotensinogen, either directly (active renin content) or after incubation with trypsin to cleave prorenin into active renin (total renin content = prorenin + renin). Percent renin activity was calculated as: (active renin content/total renin content) \times 100. It was verified that no renin activity could be detected in the medium prior to incubation on the cells. The values of renin were expressed as the amounts of Ang I generated in one hour of incubation. To correct renin content in the supernatant for the number of cells present in each well, the cells were sonicated in buffer and the amount of DNA present in the homogenates was determined by ethidium bromide fluorescence as described previously [14].

Immunoprecipitation of renin/prorenin

As4.1 cells were replated in 24 well dishes at a density of 1.4×10^4 cells/cm². Five days after replating, the cells were rinsed twice with 0.5 ml of methionine-free medium (90% methionine-free DMEM, 10% complete DMEM, 10% dialyzed FCS) and were incubated for times ranging from 15 minutes to 16 hours in methionine-free medium containing 300 μ Ci [³⁵S] methionine (600 Ci/mmol; Dupont NEN, Boston, MA, USA). Culture supernatants were then collected either immediately (overnight labeling) or after a further incubation in nonradioactive complete DMEM for a period of two hours (pulse-chase). After the labeling period, medium was collected and adjusted to 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 1% Nonidet P-40 (NP-40), sequentially. Immunoprecipitation was carried out as previously described [15] using 5 μ l/ml of a goat antiserum raised against purified mouse SMG renin (strain SWR). This antibody (gift of Dr. Carol Wilson, Southwestern Medical Center, U. of Texas, Dallas, TX, USA) also immunoprecipitates mouse Ren-1 and human prorenin (data not shown).

Both inhibition of endogenous glycosylation (by tunicamycin) and enzymatic removal of glycosyl residues in immunoprecipitated renin (using endoglycosidase F) were used to determine the glycosylation state of the renin expressed in As4.1 cells. For inhibition of glycosylation, the cells were pre-incubated for three hours prior to labeling in methionine-free medium containing 5 μ g/ml tunicamycin and all subsequent labeling steps were carried out in the presence of tunicamycin. For enzymatic deglycosylation, protein A sepharose/antibody/renin complexes were re-suspended in endoF buffer (50 mM sodium acetate pH 5.2, 10 mM EDTA, 1% NP-40) and were incubated for 16 to 20 hours at 37°C with 0.1 units of a mixture of endoglycosidase F and N-glycosidase F (Boehringer Mannheim).

Immunoprecipitates were fractionated by SDS-PAGE using 12% acrylamide and radiolabeled proteins were detected by fluorography, as described previously [15].

Electron microscopy

As4.1 cells were replated at a density of 7800 cells/cm² in a 35 mm culture dish. Five days later, the medium was removed, the cells were rinsed once in phosphate buffered saline (PBS) and were fixed for one hour at 25°C in cacodylate buffer (0.1 M sodium cacodylate, pH 7.1) containing 2% glutaraldehyde. The cell monolayer was post-fixed in 2% osmium tetroxide and embedded

in LX112 resin (Ladd Research Industries, Burlington, VT, USA) for electron microscopic observation according to standard methodologies.

Analysis of RNA

Total RNA was isolated from As4.1 cells by the guanidinium-cesium chloride method [16]. Ten micrograms of total RNA was separated by denaturing agarose gel electrophoresis, transferred to a nylon membrane and hybridized to antisense [³²P]-labeled cRNA radiolabeled probes for the various possible convertases, as previously described [17]. The probes used were the same as described previously [18], and corresponded to 590 bases of rat PC1, 425 bases of rat PC2, 1232 bases of rat furin, 390 bases of rat PC4, 534 bases of rat PACE4 and 837 bases of rat PC5. RNA size was approximated by comigration of a 0.24 to 9.5 Kb RNA ladder (Gibco BRL).

Reverse transcriptase polymerase chain reaction amplifications

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of RNA samples was performed with the GeneAmp RNA PCR kit (Perkin Elmer Cetus). Briefly, either 2.5 μ g of total RNA or 1 μ g of polyA(+) RNA isolated from As4.1 cells were reverse transcribed using oligo-dT as a primer and Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase for 50 minutes at 42°C. The resulting material was heat-denatured for five minutes at 99°C and PCR-amplified using two degenerate oligonucleotides representing the consensus sequence based on the alignment of the convertases catalytic subunits [19]. The sense oligonucleotide was ATC TAC AG(T,C) GC(A,C) AG(C,T) TGG GGC CC. The antisense oligonucleotide was CAG (A,G)TG (C,T)TG CAT GTC (T,C)C(T,G) CCA GGT. PCR amplification was performed for 35 cycles on a Perkin-Elmer model 9600 turbo PCR cycler, using a program consisting of 20 seconds at 94°C, one minute at 50°C and one minute at 72°C. The 450 bp reaction products were purified by agarose and cloned into a PCRII vector. One hundred ninety-seven different individual clones were isolated in this manner, and each was analyzed by automatic sequencing, as described previously [19].

Transfection of As4.1 cells with an expression plasmid for mouse Ren-2

An expression vector was constructed by inserting the coding sequence of mouse Ren-2 cDNA into the expression plasmid pCEP4 (In Vitrogen, San Diego, CA, USA), which contains the CMV promoter and an hygromycin resistance gene. Aliquots of 5×10^6 As4.1 cells were transfected with 20 μ g of this plasmid by electroporation and plated in 35 mm-diameter Petri dishes. Selection of transfected cells was then performed in the presence of 20 μ g/ml of hygromycin B.

Results

As4.1 cells secrete Ren-1 prorenin

Cell culture supernatants from As4.1 cells were assayed for prorenin and renin by the angiotensin I generation assay. While the supernatants contained abundant quantities of prorenin, they contained only very small amounts of renin enzymatic activity (corresponding to \pm 5% of total renin; Table 1). To test whether this apparent renin activity could correspond to material released by renin-containing secretory granules from within As4.1 cells, we

Table 1. Amounts of total renin, inactive prorenin and active renin in the incubation medium of As4.1 cells

Treatment	Total renin	Prorenin	Active renin	% Active renin
Control	4.4 ± 0.5	4.2 ± 0.5	0.22 ± 0.03	5 ± 1
db-cAMP	4.5 ± 0.4	4.2 ± 0.4	0.27 ± 0.02	6 ± 1

After washing, cells were incubated in medium for a total of 2 hours in the absence (control) or in the presence of 10^{-3} M dibutyryl-cyclic AMP (db-cAMP). Each value corresponds to mean ± SD ($N = 6$), and are expressed as ng Ang I/hr/μg DNA.

tested the effect of the secretagogue dibutyryl-cAMP (Table 1). This treatment did not significantly increase the amount of active renin in the supernatant of As4.1 cells. Likewise, no effect was observed when treating the cells with either 10 μM forskolin or 65 mM KCl (data not shown).

To determine whether the trace amounts of renin activity detected in our enzymatic assay corresponded to *bona fide* active renin of the expected molecular weight, As4.1 cells were metabolically labeled and the supernatants of these cultures were immunoprecipitated with an antiserum to mouse renin (Fig. 1). Immunoprecipitation of supernatants from As4.1 cells labeled for 15 minutes and subsequently chased for two hours reveals a broad complex of bands of approximately 44 to 48 kDa. To obtain a better resolution of the proteins present in this complex, we treated immunoprecipitated supernatant with a mixture of endoglycosidase F and N-glycosidase F. As the first enzyme cleaves the second bond of asparagine-linked oligosaccharides, and the second one cleaves the bond between the oligosaccharide and the asparagine residue, this combination of enzymes has the capability of cleaving most asparagine-linked oligosaccharides. This enzymatic treatment converts the initial broad renin band to a smaller triplet of bands between 38 and 44 kDa. Treatment of the As4.1 cells with tunicamycin results in the secretion of a single protein band of 38 kDa molecular weight. Longer labeling periods up to 16 hours in the presence of tunicamycin failed to reveal any additional lower molecular weight (< 38 kDa) bands which would be expected if prorenin had been converted to active renin by proteolysis (data not shown). Therefore, the major metabolic product in the incubation medium of As4.1 cells is prorenin.

As4.1 cells contain dense core secretory granules

Previous studies have suggested that the proteolytic activation of prorenin takes place in the dense core secretory granules of JG cells [20]. As4.1 cells have previously been shown to contain such granules [12], but it was important to verify that the cells in our hands had not lost this important characteristic. We therefore performed an electron microscopy analysis, which confirmed that cytoplasmic dense core secretory granules were indeed present in all cells observed (Fig. 2), although the abundance of granules per cell varied greatly.

Expression of processing enzymes in As4.1 cells

A Northern blot of As4.1 RNA was hybridized with probes specific for different members of the prohormone/proprotein convertase (PC) family of enzymes (Fig. 3). No expression of either PC1 or PC2 was detectable, whereas PC5, furin and PACE-4 were abundantly expressed in As4.1 cells. To test whether other, previously uncharacterized but related members of the PC family might be expressed in these cells, we carried out

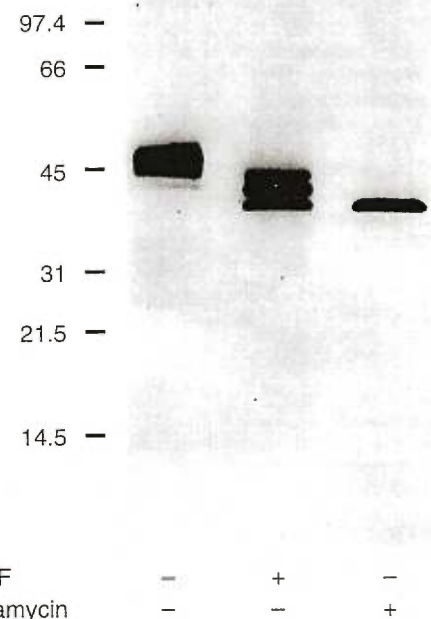


Fig. 1. Immunoprecipitation of labeled prorenin from the incubation medium of As4.1 cells. Cells were pulse-labeled with [35 S]-methionine for 15 minutes and chased with complete medium for two hours. In the second lane, the immunoprecipitated material was treated for 18 hours at 37°C with the mixture of Endoglycosidase F/N-Glycosidase F (Endo F) before being loaded on the gel. For the third lane, tunicamycin (5 μg/ml) was added to the cells 15 minutes before the pulse, and maintained in the medium during the pulse and the chase periods.

RT-PCR using degenerate oligonucleotides derived from conserved sequences near the active site of this family of enzymes [19]. In analysis of 197 clones, we did not identify any potentially new sequence for related members of the PC family of proteases (data not shown). Taken together, these results show that PC5, furin and PACE-4 are the major proprotein convertases expressed in the As4.1 cells. Within the limits of the degenerate oligonucleotides used here [19], we did not find any evidence that these cells express a novel convertase related to the PC family.

Active and total renin in the supernatant of As4.1 cells stably transfected with an expression plasmid for Ren-2

We compared the active renin secretion ability of As4.1 cells stably transfected with either pCEP4 (control cells) or pCEP4 containing the mouse *Ren-2* cDNA insert (Fig. 4). Basal levels of active renin were higher in the supernatants of cells transfected with the *Ren-2* expression plasmid than in cells transfected with the control plasmid. Addition of 10^{-5} M forskolin did increase the amount of active renin in the incubation medium of cells transfected with *Ren-2* expression plasmid, but not in that of control cells. The higher levels of active renin did not appear to be an artifactual consequence of higher secretion of total renin, since total renin secretion was actually lower in cells transfected with *Ren-2* than in control cells transfected with pCEP4 (Fig. 4). Likewise, forskolin had no effect on total renin secretion.

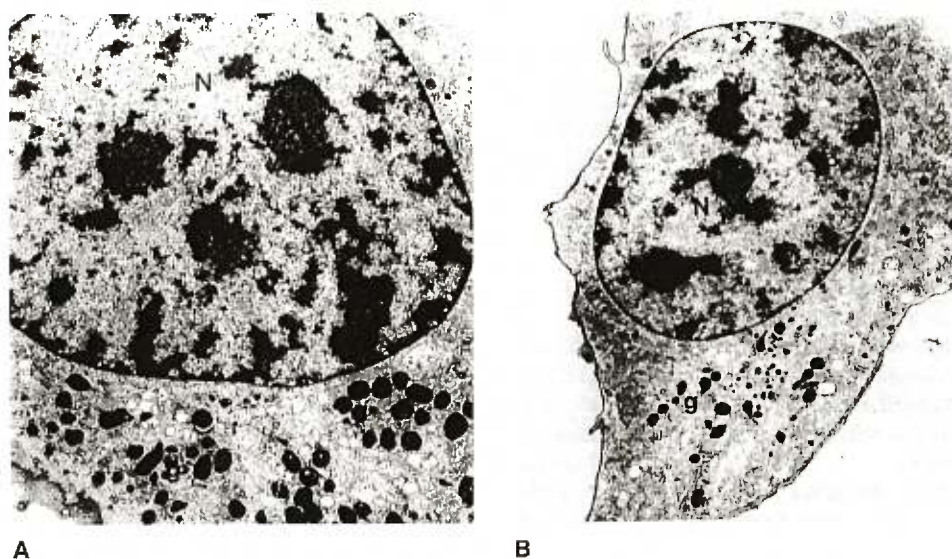


Fig. 2. Electron microscopy micrographs of *As4.1* cells. Nuclei are marked with the letter N. Dense core secretory granules are labeled with the letter g. The Magnifications were $\times 4,500$ (left micrograph) and $\times 3,600$ (right micrograph).

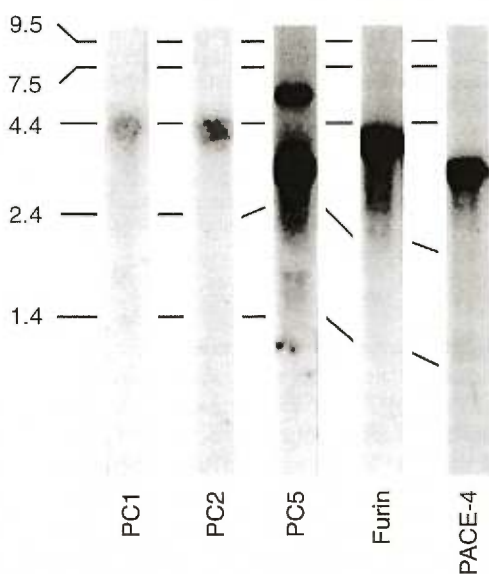


Fig. 3. Northern blot analysis of total RNA from *As4.1* cells. This is a composite from five different blots, hybridized to labeled probes for either PC1, PC2, PC5, furin or PACE4; the letter "r" corresponds to nonspecific hybridization to ribosomal RNA. Ten micrograms of total RNA were used in each lane.

Discussion

The primary source of circulating active renin in mammals is the JG apparatus of the renal cortex. Biochemical characterization of the JG cell has been hampered by the lack of sufficient quantities of these cells. Although it is possible to prepare primary cultures of JG cells [21], their low abundance in the kidney (0.1% of the total renal cell mass) makes this approach impractical for most biochemical techniques. In the current study, we have sought to characterize the prorenin processing activity in the *As4.1* cell line, which may constitute the only cell line available which retains

(at least some) characteristics of differentiated JG cells [12]. Our results confirm that these cells express glycosylated forms of prorenin. However, only low amounts of renin enzymatic activity were detected in the incubation medium, and treatment of the cells with agents known to stimulate secretion of products from the regulated pathway [22] did not increase renin activity in the supernatants. Furthermore, pulse-chase experiments were repeated more than three different times and never detected forms of renin whose size might be comparable to that expected from proteolytically activated renin. Altogether, these data provide no indication that *As4.1* cells can secrete any significant amount of active renin via the regulated pathway. The low amounts of renin activity detected in the supernatant might be attributed to prorenin itself, as this protein can exhibit low levels of basal activity in the absence of cleavage of the prosegment [13]. Previous studies had shown that treatment of the cells with 8-bromo-cAMP increased the amount of renin activity in the supernatant [12]. However, the cAMP analog was applied for times ranging from 4 to 15 hours. It is therefore likely that the previous results are a consequence of the activation of the expression of the renin gene rather than the induction of the release of active renin.

Mouse Ren-2 prorenin does not contain potential glycosylation sites [23]. *As4.1* cells do not secrete any unglycosylated amounts of prorenin, and thus do not appear to produce any Ren-2 prorenin, which is consistent with the fact that the mouse lines used to derive the *As4.1* cells express only the Ren-1 gene [12]. *As4.1* cells also appear to have lost the ability to secrete significant amounts of active renin in the extracellular medium. This could be due to a number of factors, including the loss of dense core secretory granules, the loss of expression of the appropriate prorenin processing enzyme or some other defect in the release of the active renin from the cells. Loss of secretory granules from immortalized human reninoma cell line has been reported and correlates with the loss of active renin secretion [24]. However, electron microscopy confirmed that the *As4.1* cells used in this study clearly contain dense core secretory granules, which rules out the lack of granules as a possible explanation for the inability

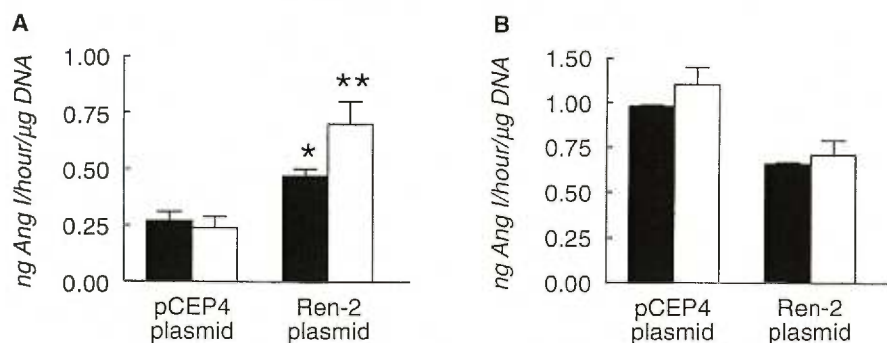


Fig. 4. Secretion of active renin in nontransfected and Ren-2 transfected As4.1 cells. Active and total renin in the supernatants of As4.1 cells stably transfected with either pCEP4 or a mouse Ren-2 expression plasmid (see Methods). After washing, supernatants were collected from the cells after five minutes of incubation. Values are expressed as ng Ang I/hr/ μ g DNA, and correspond to mean \pm SD ($N = 6$). A. Secretion of active renin. * $P < 0.05$ versus cells transfected with the control pCEP4 plasmid; ** $P < 0.05$ versus cells incubated in the absence of forskolin (as determined by one-way ANOVA followed by Neuman-Keul's post-hoc test). B. Secretion of total renin. Forskolin had no effect on total renin secretion. Symbols are: (■) control; (□) forskolin.

of As4.1 cells to secrete active renin-1 via the regulated pathway. Furthermore, transfection of As 4.1 cells with an expression plasmid for mouse Ren-2 showed that the cell line had conserved the ability to process Ren-2 and to release it via the regulated pathway (Fig. 4).

The defect in secretion of active renin by As4.1 cells might be more readily explained (at least in part) by the loss of expression of the necessary processing enzyme within the regulated pathway. A family of mammalian proteases involved in the processing of protein and peptide precursors has recently been identified as prohormone/proprotein convertases (PCs) [reviewed in 25]. As some of these (PC1, PC5) have been shown to be capable of activating human prorenin and/or mouse Ren-2 prorenin [10, 11, 26], we sought to determine which of these particular processing enzymes are produced by As4.1 cells. Northern blot and RT-PCR analysis revealed that furin, PACE4 and PC5 were the only convertases expressed in these cells, and PC5 is the only one among these that has been shown to be capable of activating some forms of prorenin [11, 26]. Since As 4.1 cells do not secrete any significant amounts of active Ren-1, it is unlikely that Ren-1 could be activated by PC5 within the regulated pathway. However, one can postulate that expression of PCs found in As4.1 cells would be retained in the juxtaglomerular cells of mice expressing both renin genes, and may also be retained in the juxtaglomerular cells of other species such as rats and humans. It has been shown previously that PC5 could process mouse Ren-2 [26], and our own data show that As 4.1 can process Ren-2 when it is transfected in these cells (Fig. 4). As most strains of mice express both Ren-1 and Ren-2 in the JG cells of the kidney, it is quite probable that PC5 would contribute to the secretion of active renin from the JG cells in these strains. Likewise, PC5 can activate human prorenin, and has recently been proposed as a candidate processing enzyme of prorenin in the human adrenal gland [11]. PC5 is expressed in many endocrine tissues [27], although its expression does not appear to be distributed as widely as other convertases [18]. Taken together, these data indicate that PC5 is a candidate enzyme for the processing of mouse Ren-2 and human renin (either in kidneys or other tissues), but that the enzyme that processes prorenin-1 in mouse JG cells may be another, as yet undefined member of the PC gene family.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada to the MRC Multidisciplinary Research Group on Hyperten-

sion and from the Heart and Stroke Foundation of Canada (C.F.D. and T.L.R.). N.G.S. and R.N.D. are supported by MRC MT13196 and MRC Program Grant PG11474. K.W.G. is supported in part by National Institutes of Health Grants HL35792 and HL48459. C.F.D. and R.D. are recipients of "chercheur-boursier" awards from the FRSQ.

Reprint requests to Christian F. Deschepper, IRCM, 110, Pine Ave West, Montreal, QC H2W 1R7, Canada.

E-mail: deshec@IRCM.UMontreal.CA

References

- DO YS, SHINAGAWA T, TAM H, INAGAMI T, HSUEH WA: Characterization of pure human renal renin. *J Biol Chem* 262:1037-1043, 1987
- REUDELHUBER TL, MERCURE C, RAMLA D, METHOT D, POSTNOV AY: Molecular mechanisms of processing and sorting in renin secretion, in *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*, edited by LARAGH JH, BRENNER BM, New York, Raven Press, 1995, pp 1621-1636
- KIM S, HOSOI M, KIKUCHI N, YAMAMOTO K: Amino-terminal amino acid sequence and heterogeneity in glycosylation of rat renal renin. *J Biol Chem* 266:7044-7050, 1991
- CAMPBELL DJ, VALENTIJN AJ, CONDRON R: Purification and amino-terminal sequence of rat kidney renin: Evidence for a two-chain structure. *J Hypertens* 9:29-33, 1991
- FIELD LJ, GROSS KW: Ren-1 and Ren-2 loci are expressed in mouse kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6196-6200, 1985
- KIM WS, HATSUZAWA K, ISHIZUKA Y, HASHIBA K, MURAKAMI K, NAKAYAMA K: A processing enzyme for prorenin in mouse submandibular gland. Purification and characterization. *J Biol Chem* 265:5930-5933, 1990
- KIM WS, NAKAYAMA K, NAKAGAWA T, KAWAMURA Y, HARAGUCHI K, MURAKAMI K: Mouse submandibular gland prorenin-converting enzyme is a member of glandular kallikrein family. *J Biol Chem* 266:19283-19287, 1991
- WATANABE T, NAKAGAWA T, IKEMIZU J, NAGAHAMA M, MURAKAMI K, NAKAYAMA K: Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 267:8270-8274, 1992
- WANG PH, DO YS, MACAULAY L, SHINAGAWA T, ANDERSON PW, BAXTER JD, HSUEH WA: Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. *J Biol Chem* 266:12633-12638, 1991
- BENJANNET S, REUDELHUBER T, MERCURE C, RONDEAU N, CHRETIEN M, SEIDAH NG: Proprotein conversion is determined by a multiplicity of factors including convertase processing, substrate specificity, and intracellular environment. Cell type-specific processing of human prorenin by the convertase PC1. *J Biol Chem* 267:11417-11423, 1992
- MERCURE C, JUTRAS I, DAY R, SEIDAH NG, REUDELHUBER TL: The prohormone convertase PC5 is a candidate processing enzyme for prorenin in the human adrenal cortex. *Hypertension* (in press)
- SIGMUND CD, OKUYAMA K, INGELFINGER J, JONES CA, MULLINS JJ, KANE C, KIM U, WU C, KENNY L, RUSTUM Y, DZAU VJ, GROSS KW:

- Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J Biol Chem* 265:19916–19922, 1990
13. MERCURE C, THIBAUT G, LUSSIER-CACAN S, DAVIGNON J, SCHIFFRIN EL, REUDELHUBER TL: Molecular analysis of human prorenin prosegment variants *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 270:16355–16359, 1995
 14. DESCHEPPER CF, PICARD S: Effects of C-type natriuretic peptide on rat astrocytes: Regional differences and characterization of receptors. *J Neurochem* 62:1974–1982, 1994
 15. CHU WN, BAXTER JD, REUDELHUBER TL: A targeting sequence for dense secretory granules resides in the active renin protein moiety of human preprorenin. *Mol Endocrinol* 4:1905–1913, 1990
 16. MACDONALD RJ, SWIFT GH, PRZYBYLA AE, CHIRGWIN JM: Isolation of RNA using guanidinium salts. *Meth Enzymol* 152:219–227, 1987
 17. DAY R, SCHAFER MK, WATSON SJ, CHRÉTIEN M, SEIDAH NG: Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary. *Mol Endocrinol* 6:485–497, 1992
 18. SEIDAH NG, CHRÉTIEN M, DAY R: The family of subtilisin/kexin-like proprotein and pro-hormone convertases: Divergent or shared functions. *Biochimie* 76:197–209, 1994
 19. SEIDAH NG: Molecular strategies for identifying processing enzymes. *Meth Neurosci* 23:3–15, 1995
 20. TAUGNER R, KIM SJ, MURAKAMI K, WALDHERR R: The fate of prorenin during granulopoiesis in epitheloid cells. *Histochemistry* 86:249–253, 1987
 21. DELLA BRUNA R, KURTZ A, CORVOL P, PINET F: Renin mRNA quantification using polymerase chain reaction in cultured juxtaglomerular cells. *Circ Res* 73:639–648, 1993
 22. BURGESS TL, KELLY RB: Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann Rev Cell Biol* 3:243–293, 1987
 23. MURAKAMI K, HIROSE S, MIYASAKI H, IMAI T, HORI H, HAYASHI T, KAGEYAMA R, OHKUBO H, NAKANISHI S: Complementary DNA sequences of renin. State-of-the-art review. *Hypertension* 6:195–1100, 1984
 24. PINET F, CORVOL MT, DENCH F, BOURGUIGNON J, FEUNTEUN J, MENARD J, CORVOL P: Isolation of renin-producing human cells by transfection with three simian virus 40 mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:8503–8507, 1985
 25. SEIDAH NG, DAY R, MARCINKIEWICZ M, CHRÉTIEN M: Mammalian paired basic amino acid convertases of prohormones and proproteins. (Review) *Ann NY Acad Sci* 680:135–146, 1993
 26. NAKAGAWA T, HOSAKA M, TORII S, WATANABE T, MURAKAMI K, NAKAYAMA K: Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: Its striking structural similarity to PACE-4. *J Biochem* 113:132–135, 1993
 27. LUSSON J, VIEAU D, HAMELIN J, DAY R, CHRÉTIEN M, SEIDAH NG: cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: A candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6691–6695, 1993