

2M11-2590.5

Université de Montréal

**Expression de l'Endopeptidase Neutre dans la levure  
*Schizosaccharomyces pombe* et étude de son interaction avec les  
chaperones du réticulum endoplasmique**

par

Hugues Beaulieu

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)

septembre, 1997

© Hugues Beaulieu, 1997



2. 1972. 11. 2

W

4

U58

1998

V.033

Université de Montréal

Expression de l'Endopeptidase Neutro dans la levure  
Schizosaccharomyces pombe et étude de son interaction avec les  
chaînes du réticulum endoplasmique

par

Hugues Baudou

Département de biochimie

Faculté de médecine

Membre présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)



septembre 1998

à Hugues Baudou 1998

Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Expression de l'Endopeptidase Neutre dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* et étude de son interaction avec les chaperones du réticulum endoplasmique

présenté par  
Hugues Beaulieu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Luc Des Grasseilles  
Louis A. Kereach  
Philippe J. P. Crené  
Pierre Belhumeur

Mémoire accepté le: 11.02.1998

## SOMMAIRE

Le développement et l'étude de nouveaux systèmes d'expression hétérologue occupe un champ d'intérêt majeur dans la recherche biomédicale. La présente étude porte sur l'expression hétérologue de l'endopeptidase neutre (NEP, E.C.3.4.24.11) dans *Schizosaccharomyces pombe*. Dans un premier temps, il s'agit d'évaluer si ce système cellulaire offre les avantages recherchés lors de l'expression hétérologue, c'est-à-dire la production de protéines biologiquement actives, bien ciblées dans la cellule et en quantité importante. Ensuite, l'utilité du système de *S. pombe* dans l'étude de mécanismes cellulaires fondamentaux est évalué, notamment pour le repliement assisté des protéines dans le réticulum endoplasmique via les chaperones moléculaires.

La NEP est impliquée dans de nombreux mécanismes physiologiques, tels le contrôle de la douleur (dégradation des enképhalines) et la régulation de la pression artérielle (dégradation de peptides vasoactifs). Différents systèmes d'expression ont été étudiés au cours des dernières années pour surproduire la NEP à des fins d'études structurales. Celui de la levure *S. pombe* offre-t-il des avantages pour la surproduction de la NEP ? À l'aide de tests d'activité enzymatique et d'études sur le ciblage cellulaire et sur la glycosylation, le système *S. pombe* s'est avéré très intéressant pour l'expression hétérologue.

Les chaperones moléculaires viennent assister les protéines lors de leur repliement dans le réticulum endoplasmique. Par des expériences de co-immunoprécipitations, des interactions entre la NEP (et sNEP) et les

chaperones BiP et calnexine ont été démontrées chez *S. pombe*, suggérant que ce système cellulaire peut être utilisé dans l'étude du repliement.

L'utilisation des levures *S. pombe* pour la surproduction de NEP devient un outil de choix. Grâce à l'utilisation de fermenteurs biologiques à grands volumes, d'importantes quantités de protéines peuvent être facilement obtenues.

Dans l'étude du repliement au réticulum endoplasmique, les cellules *S. pombe* deviennent la scène des interactions entre protéines et chaperones. Les différents mutants disponibles de la NEP et/ou de calnexine permettront d'identifier les structures peptidiques pouvant influencer les interactions entre protéines et chaperones.

Ce projet de recherche s'inscrit donc dans l'effort visant à mieux comprendre la structure tridimensionnelle de la NEP afin d'ouvrir de nouvelles voies dans la synthèse d'inhibiteurs à potentiel thérapeutique. Le projet fournit également de nouvelles données sur l'étude de la chaperone calnexine de *S. pombe* et les mécanismes du repliement.

# TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	iii
Table des matières	v
Liste des figures et tableaux	vi
Liste des abréviations	vii
Remerciements	viii
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
Structure et expression de la NEP	2
Activité catalytique	4
La NEP comme enképhalinase	7
La NEP et la régulation de la pression artérielle	8
Autres rôles de la NEP	10
Études structurales de la NEP	12
Repliement de protéines et chaperones moléculaires	13
BiP, une chaperone qui utilise l'énergie de l'ATP	17
Calnexine, une chaperone avec un "goût pour le sucre"	20
Les systèmes d'expression hétérologue	26
Projet de recherche	29
<b>ARTICLE</b>	<b>32</b>
Summary	33
Introduction	34
Experimental procedures	38
Results	43
Discussion	55
References	61
<b>DISCUSSION ET CONCLUSION</b>	<b>68</b>
Expression hétérologue de la NEP	68
Ciblage cellulaire de la NEP	70
Caractérisation cinétique de la NEP	71
Études d'interactions avec les chaperones	73
Perspectives de recherche	77
<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>80</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

*Les numéros de figures et tableau de l'article sont précédés de la lettre a.*

Figure 1. Structure primaire de la NEP et de la sNEP	3
Figure 2. Modèle du site actif de la NEP	6
Figure 3. Modèle du repliement assisté par les chaperonines	15
Figure 4. Modèle du repliement assisté par BiP	19
Figure 5. Modèle du repliement protéique (calnexine et GT)	24
<i>Figure a1. Analysis of the glycosylation of heterologous proteins</i>	44
<i>Figure a2. Targeting of heterologous NEP</i>	47
<i>Figure a3. Only the ER form co-immunoprecipitates with calnexine</i>	51
<i>Figure a4. Interactions between NEP and the molecular chaperones</i>	53
<i>Figure a5. Co-immunoprecipitations; control conditions</i>	54
<i>Tableau a1. Kinetic Parameters of heterologous proteins</i>	49
Tableau I. Peptides clivables par l'endopeptidase neutre	11
Tableau II. Migration électrophorétique sur gel (SDS-PAGE)	69
Tableau III. Rendement de systèmes d'expression hétérologue	72

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACE: "angiotensin converting enzyme" (enzyme de conversion de l'angiotensine)

ANP: "atrial natriuretic peptide" (peptide natriurétique auriculaire)

APN: aminopeptidase N

ATP: adénosine triphosphate

DTT: dithiothreitol

endo F: endoglucosydase peptide-*N*-glycosydase F

GMP<sub>c</sub>: guanosine mono-phosphate cyclique

GT: UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase

HSP: "heat-shock protein" (protéine du choc thermique)

NEP: "neutral endopeptidase" (endopeptidase neutre)

PAGE: "polyacrylamide gel electrophoresis" (électrophorèse sur gel de polyacrylamide)

PMSF: phénylméthylsulfonyle

POMC: pro-opiomélanocortine

RE: réticulum endoplasmic

sNEP: "secreted neutral endopeptidase" (forme sécrétée de l'endopeptidase neutre)

TBS: "Tris-buffered saline"

TLN: thermolysine

## REMERCIEMENTS

Merci à mes co-directeurs Dr Luis A. Rokeach et Dr Philippe Crine du Département de biochimie, de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal.

Merci à mes collègues de laboratoire, Mehrdad Jannatipour, Jean-Claude Labbé et Steve Titolo. Un merci particulier à Sophie Hein, ma collègue de vie.

*Merci finalement à tous ceux et toutes celles qui ont éveillé ma curiosité et ainsi contribué à nourrir mon intérêt pour la science.*

## INTRODUCTION

Le développement et l'étude de nouveaux systèmes d'expression hétérologue pour la synthèse de protéines d'intérêt prend encore aujourd'hui une place importante dans la recherche fondamentale et biomédicale. De tels systèmes ouvrent des avenues intéressantes pour la surproduction d'une protéine, l'étude de ses caractéristiques biochimiques et la détermination de sa structure par cristallographie. Ils fournissent aussi de nouveaux outils pour l'étude des protéines et des mécanismes cellulaires fondamentaux tels la glycosylation, le repliement au réticulum endoplasmique et le ciblage cellulaire.

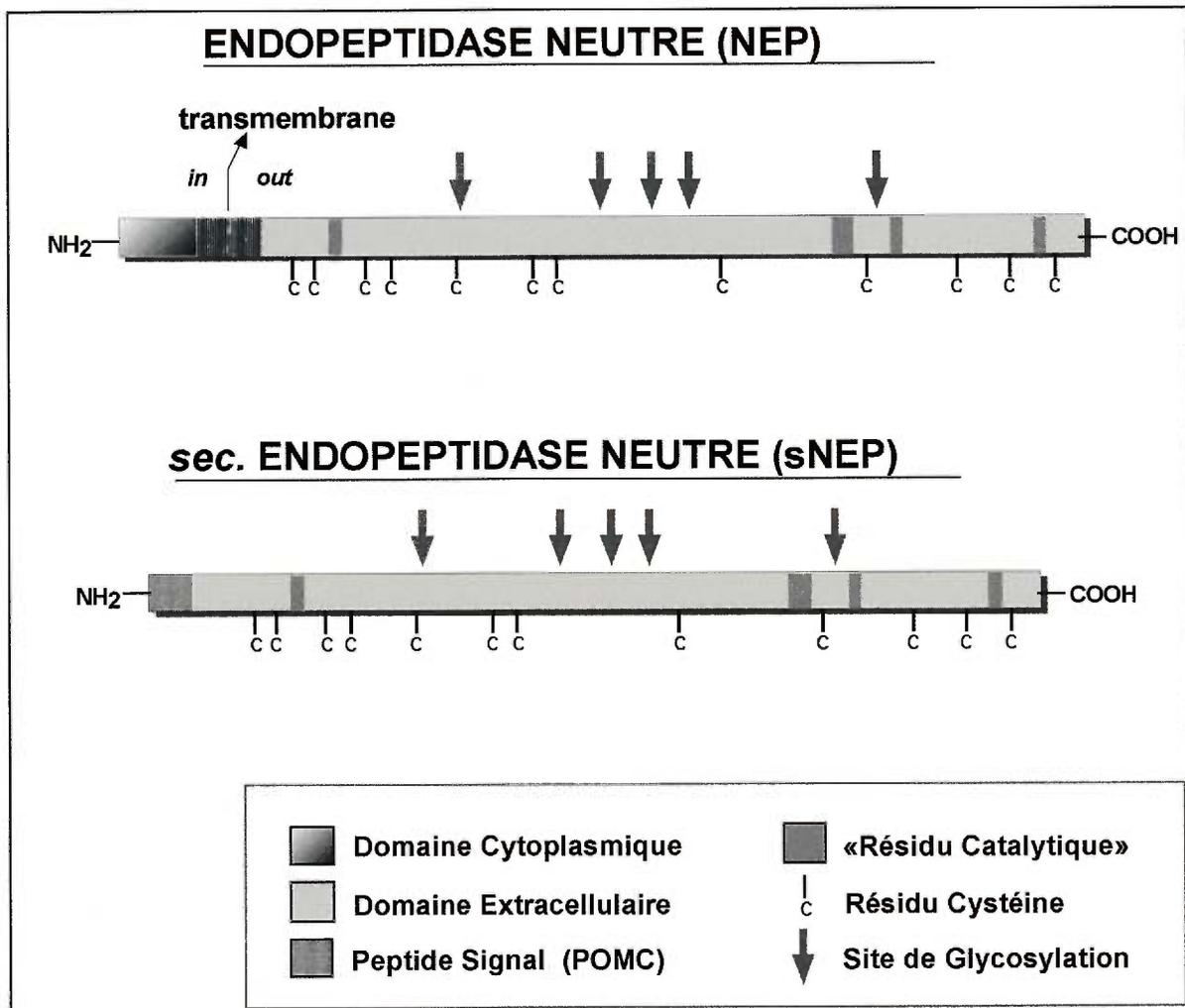
L'expression de l'endopeptidase neutre (NEP) dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) pourrait fournir un système de production de protéine efficace et un modèle intéressant pour d'éventuelles études du repliement des protéines par les chaperones moléculaires du réticulum endoplasmique. D'une part, il serait possible de surproduire la protéine afin d'en purifier ultérieurement de grandes quantités et d'en étudier la structure tridimensionnelle par cristallographie. D'autre part, l'expression de la NEP dans *S. pombe* permettrait d'étudier, à l'aide de différents mutants disponibles tant pour la NEP que pour la chaperone calnexine, les mécanismes du "repliement- *in vivo*" et les éléments de la structure primaire qui influencent l'association entre une chaperone et son substrat, c'est-à-dire la protéine en voie de repliement.

## **STRUCTURE ET EXPRESSION DE LA NEP**

La néprilysine (endopeptidase neutre NEP, E.C.3.4.24.11) est une protéine faisant partie de la famille des métallo-endopeptidases à zinc telles que la thermolysine procaryotique (TLN), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), l'aminopeptidase *N* (APN), les carboxypeptidases *A*, *B*, et *E* (pour une revue de la littérature, voir Vallee et Auld, 1990). La NEP est exprimée de façon quasi-ubiquitaire dans les cellules de mammifères. D'abord identifiée comme la plus abondante métallo-endopeptidase des cellules de la bordure en brosse de l'épithélium rénal (Kerr et Kenny, 1974), la NEP a ensuite été identifiée dans plusieurs tissus, notamment dans les cellules intestinales (Danielsen et *al.*, 1980), les cellules pulmonaires et lymphocytes (Johnson et *al.*, 1985), les neutrophiles (Connelly et *al.*, 1985), les réticulocytes et cellules des glandes surrénales (Gee et *al.*, 1985; Bowes et Kenny, 1986), les cellules du système nerveux central (Malfroy et *al.*, 1978; Matsas et *al.*, 1983) et le placenta (Erdos et Skidgel, 1989) (pour une revue de la littérature, voir Kenny et *al.*, 1987; Sales et *al.*, 1991). La NEP est une glycoprotéine membranaire de type II comportant 749 acides aminés.

Figure 1

Structure primaire de la NEP et de la sNEP, illustrant les éléments importants de la structure.



La NEP est composée d'un segment cytosolique de 27 résidus du côté *N*-terminal, d'une hélice hydrophobe de 22 acides aminés constituant l'unique région transmembranaire ainsi que d'un ectodomaine de plus de 700 résidus du côté *C*-terminal, contenant tous les résidus nécessaires à l'activité enzymatique (Chou et Fasman, 1978; Devault et *al.*, 1987). La structure primaire (Figure 1, p.3) de la protéine comporte 12 résidus cystéines qui sont tous impliqués dans la formation de 6 ponts disulfures. On y retrouve aussi 5 sites de glycosylation sur l'asparagine, tous reconnus, utilisés et requis pour la pleine activité enzymatique (Lafrance et *al.*, 1994). Dans l'ectodomaine, on retrouve certains motifs caractéristiques des membres de la famille des métallo-endopeptidases à zinc, tels que la séquence consensus His-Glu-x-x-His. Les résidus His sont impliqués dans la coordination de l'atome de zinc et le résidu Glu est impliqué dans la catalyse. On retrouve également un troisième résidu coordonnant l'atome de zinc, un acide glutamique situé en aval de la séquence consensus.

### **ACTIVITÉ CATALYTIQUE**

Beaucoup de groupes de recherche ont, au fil des années, exploré le site catalytique de la NEP par mutagénèse dirigée et, comme il a été décrit plus haut, la plupart des résidus importants pour la liaison au substrat et la catalyse sont maintenant connus (Devault et *al.*, 1988; Bateman et *al.*, 1989; LeMoual et *al.*, 1991; Beaumont et *al.*, 1991; Beaumont et *al.*, 1992; Dion et *al.*, 1993). Pour la NEP, les résidus consensus de la famille des métallo-endopeptidases à zinc sont les His 583, His 587 et Glu 646 pour la coordination du zinc, et le résidu Asp 584 pour l'hydrolyse du lien peptidique.

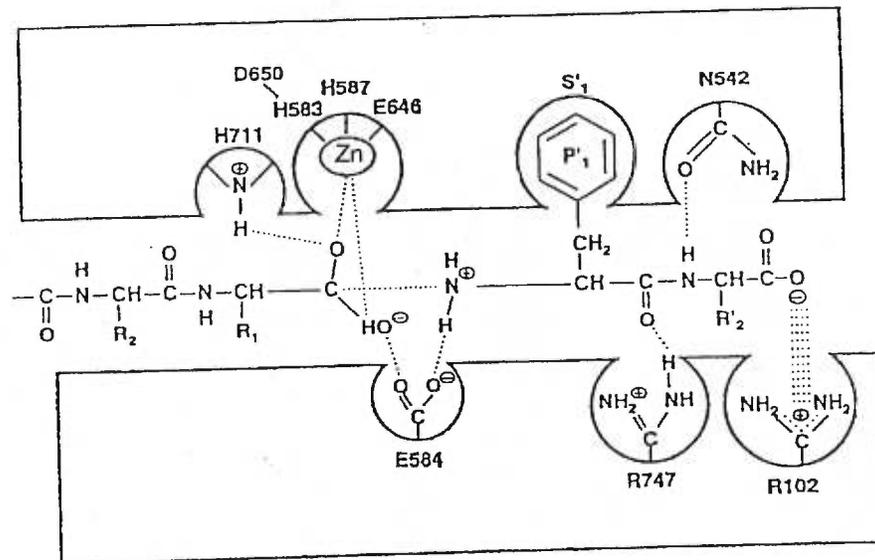
D'autres résidus se sont avérés cruciaux pour l'activité enzymatique de la NEP. C'est le cas par exemple de l'Asp 650, l'His 711 qui stabilise l'état de transition dans la catalyse, et les résidus Arg 747, Arg 102 et Asn 542 qui sont impliqués dans la liaison de la NEP aux substrats.

De façon schématique, l'hydrolyse d'un substrat de la NEP implique la formation d'un complexe pentacoordonné comprenant une molécule d'eau, liée initialement au zinc, les trois résidus de la NEP coordonnés au zinc et l'oxygène du groupement carbonyle du lien peptidique à hydrolyser (Figure 2, p.6). La catalyse passe donc par: *i*) la coordination entre l'oxygène du groupement carbonyle du lien peptidique à hydrolyser et l'atome de zinc de l'enzyme; *ii*) une attaque nucléophile par une molécule d'eau sur le carbone du carbonyle polarisé par l'ion zinc; *iii*) la protonation de l'azote du lien peptidique à hydrolyser; *iv*) la scissure entre le carbone tétraédrique et cet azote protoné, et finalement; *v*) le relargage de deux fragments peptidiques (pour une revue de la littérature, voir Roques et *al.*, 1993).

Il est à noter que l'hydrolyse endopeptidique par la NEP survient en *N*-terminal d'un résidu hydrophobe (Met, Leu et Phe), ce qui en fait une enzyme à très large spectre ayant de l'affinité pour de nombreux peptides.

Les rôles physiologiques de la NEP sont nombreux et variés puisque cette enzyme est capable d'hydrolyser de nombreux substrats. Elle présente cependant une préférence pour les petits peptides plutôt que pour les longues chaînes protéiques (Bowes et Kenny, 1986).

Figure 2  
Modèle du site actif de l'endopeptidase neutre 24.11



RÉSIDUS IMPORTANTS:

En haut, de gauche à droite: H711, D650, H583, H587, E646, S'1, N542

En bas, de gauche à droite: E584, R747, R102

Ce modèle illustre les interactions entre les différents résidus d'acides aminés impliqués dans la catalyse. Le complexe enzyme-substrat est représenté ici par la forme intermédiaire tétraédrique.

(Source: Crine, 1997)

## **LA NEP COMME "ENKÉPHALINASE"**

La NEP est impliquée dans les mécanismes moléculaires de la douleur au niveau du système nerveux central (SNC). D'abord, on a observé que les enképhalines, les "morphines endogènes" du SNC, étaient rapidement dégradées dans des homogénats de tissus cérébraux. Cette observation a permis de découvrir l'implication d'une "enképhalinase" dans l'inactivation des neurotransmetteurs de type enképhaline. La présence de cette enképhalinase expliquait d'ailleurs la faible et brève action analgésique résultant de l'injection d'enképhalines (pour une revue de la littérature, voir Roques et *al.*, 1993). De plus, l'effet analgésique (antinociceptif) résultant de l'injection de l'inhibiteur spécifique de l'enképhalinase, le thiorphan, et la réversion de cet effet par le naloxone (antagoniste des récepteurs opioïdes) ont confirmé l'implication de l'enképhalinase dans le contrôle physiologique de la douleur (Roques et *al.*, 1980).

Ce n'est qu'en 1983 que la co-identité entre l'enképhalinase et la NEP fut établie (Matsas et *al.*, 1983). On a ensuite démontré *in vitro* et *in vivo* que la NEP hydrolyse le lien Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup> des neuromédiateurs *Met*-enképhaline et *Leu*-enképhaline (pour une revue de la littérature, voir Roques et *al.*, 1993). Par ailleurs, la distribution de la NEP dans le cerveau est semblable à celle des récepteurs  $\mu$  et  $\gamma$  opioïdes, cibles des enképhalines (Waksman et *al.*, 1986; Waksman et *al.*, 1987). Ceci vient encore confirmer l'implication de la NEP dans le contrôle de la douleur au SNC.

Ce rôle physiologique de la NEP en fait une excellente candidate pour le développement de nouvelles avenues dans le traitement de la douleur. Il devient donc théoriquement possible de potentialiser l'effet des enképhalines

endogènes par l'inhibition spécifique de la NEP. Des inhibiteurs spécifiques de cette dernière représentent donc une nouvelle classe d'agents anti-douleurs, agissant sur des sites distincts des analgésiques opiacés classiques, tels les morphines. Les études cliniques semblent confirmer l'intérêt des inhibiteurs de la NEP pour un traitement de la douleur. En fait, dans ces études, deux métallo-peptidases sont ciblées, la NEP et l'aminopeptidase neutre (APN). Cette dernière est, comme la NEP, responsable de l'inactivation des enképhalines cérébrales (pour des revues de la littérature, voir Roques et *al.*, 1993; Roques et *al.*, 1995). C'est en inhibant les deux enzymes, avec un "inhibiteur mixte", que l'effet analgésique est le plus significatif. Plusieurs inhibiteurs différents sont étudiés et certains inhibent complètement la dégradation des enképhalines *in vitro* comme *in vivo*. C'est le cas des inhibiteurs kélalthorphan et le RB 38A qui inhibent la NEP et l'APN fortement et spécifiquement (Fournié-Zaluski et *al.*, 1984; Waksman et *al.*, 1985; Bourgoïn et *al.*, 1986).

### **LA NEP ET LA RÉGULATION DE LA PRESSION ARTÉRIELLE**

La NEP est également impliquée dans le métabolisme de certains agents régulateurs de la tension artérielle, tel que le peptide natriurétique auriculaire (ANP) et ce, tant aux niveaux rénal que circulatoire (pour des revues de la littérature, voir Seymour et *al.*, 1995; Roques et *al.*, 1995; Corvol et *al.*, 1995). L'ANP est une hormone cardiaque exprimée et sécrétée dans la circulation sanguine par les cardiocytes auriculaires suite au stimulus résultant d'une extension des oreillettes. Des récepteurs à ANP sont principalement exprimés au niveau des épithélia des artères, des veines et

des reins. L'ANP participe à la régulation du bilan hydrosodé et de la pression artérielle; il est natriurétique et vasodilatateur et son action cellulaire s'exerce par l'intermédiaire de la guanosine 3'-5' monophosphate cyclique (GMPc). L'ANP serait le principal "antagoniste" du système rénine/angiotensine (pour une revue de la littérature, voir Dussaule, 1994). Le catabolisme de l'ANP est assuré par deux acteurs principaux: des récepteurs de clairance (récepteur de type C) et des ectoenzymes comme la NEP. Il a été démontré que des inhibiteurs de la NEP, comme le thiorphan, augmentent la natriurèse et la diurèse par la potentialisation de l'ANP. Les effets du thiorphan sur la pression artérielle sont cependant mineurs (Northridge et al., 1989; Kahn et al., 1990). Afin d'obtenir de véritables agents antihypertenseurs, l'utilisation d'inhibiteurs mixtes de la NEP et de l'ACE pourrait être avantageuse puisque cette dernière est impliquée dans l'activation de l'angiotensine I, inactive, en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur agissant principalement sur les cellules musculaires lisses vasculaires. Ces inhibiteurs mixtes seraient aussi en mesure de préserver de la dégradation un substrat commun aux NEP et ACE, la bradykinine. La bradykinine provoque une vasorelaxation des cellules musculaires lisses vasculaires via deux importants médiateurs, la prostacycline et le monoxyde d'azote. L'ACE/NEP est donc une cible majeure dans le traitement de l'hypertension. En utilisant un inhibiteur mixte à l'ACE/NEP, la bradykinine est protégée contre ses deux importantes protéases, l'ANP est potentialisé et l'angiotensine II n'est plus produite. Ce concept d'inhibition mixte a servi de base pour la synthèse de nouveaux agents antihypertenseurs fort prometteurs (Roques et Beaumont, 1990).

## **AUTRES RÔLES DE LA NEP**

La NEP peut véritablement être qualifiée d'enzyme multifonctionnelle. Les deux précédents exemples sont certainement les plus documentés et ceux dont les applications cliniques sont les plus avancées. Cependant, la NEP semble agir à plusieurs autres niveaux. Par exemple, au niveau gastro-intestinal, des inhibiteurs de la NEP potentialisent la présence des enképhalines et leur effet sur la motilité gastro-intestinale (Shang et *al.*, 1986). L'inhibiteur acétorphan est d'ailleurs actuellement commercialisé (Tiorphan™) et utilisé dans le traitement de la diarrhée (Bergman et *al.*, 1992).

La NEP agit aussi au niveau de l'épithélium pulmonaire en inactivant la substance P. Ce neurotransmetteur agit notamment sur la sécrétion de mucus pulmonaire et provoque la contraction des muscles lisses des voies respiratoires. L'asthme et des réponses bronchoconstrictrices comme la toux pourraient être, au moins en partie, causées par une augmentation de substance P due à une trop faible activité de la NEP (Dusser et *al.*, 1989; Nadel et Bolson, 1988; Nadel, 1990). Dans ce dernier cas, on peut envisager une application clinique en utilisant de la NEP exogène vaporisée en aérosol dans les voies respiratoires afin de contrôler l'accumulation néfaste de substance P.

Tableau I

Peptides clivables par l'endopeptidase neutre  
(inspiré de Boileau et *al.*, 1989).

<b>SUBSTRAT</b>	<b>RÉFÉRENCE</b>
Angiotensines (I et II)	Gafford et <i>al.</i> , 1983
ANP	Stephenson et Kenny, 1987
Bradykinine	Gafford et <i>al.</i> , 1983
Cholecystokinine	Matsas et <i>al.</i> , 1984
Dynorphine (1-9)	Matsas et <i>al.</i> , 1984
Endorphines ( $\gamma$ et $\beta$ )	Hersh, 1984
Endothéline	Fagny et <i>al.</i> , 1991
Enképhalines (Leu-, Met-, Met-E.-Arg-Phe)	Malfroy et Schwartz, 1984; Benuck et Marks, 1980
Gastrine	Matsas et <i>al.</i> , 1984
Insuline-B	Kerr et Kenny, 1974
Interleukine $\alpha_1$	Pierart et <i>al.</i> , 1988
Neurokinines (A et B)	Hooper et <i>al.</i> , 1985; Hooper et Turner, 1985
Neurotensine	Checler et <i>al.</i> , 1984
Oxytocine	Almenoff et Orłowski, 1983
Substance P	Matsas et <i>al.</i> , 1984

Toujours dans les voies respiratoires, la NEP intervient aussi dans le contrôle des niveaux d'ANP présents. Les inhibiteurs de la NEP peuvent être d'une grande utilité dans le traitement de l'hypertension d'origine pulmonaire en potentialisant l'ANP qui s'y trouve, diminuant ainsi la pression du lit vasculaire (pour une revue de la littérature, voir Thompson et Morice, 1996).

Finalement, la pléiade de substrats que la NEP hydrolyse *in vitro* laisse entrevoir la possibilité que cette enzyme soit impliquée dans de nombreux autres mécanismes physiologiques, peut-être tout aussi importants que ceux précédemment cités (Tableau I).

## **ÉTUDES STRUCTURALES DE LA NEP**

Afin de synthétiser de nouveaux inhibiteurs spécifiques modelés sur la structure de l'enzyme, des études structurales ont été entreprises. Les études structurales réalisées sur d'autres métallo-peptidase à zinc telles la carboxypeptidase A et la thermolysine procaryotique ont fourni les premières informations sur la structure tridimensionnelle du site catalytique de ces enzymes (Christianson et Lipscomb, 1985; Holmes et Matthews, 1981; Benchetrit et *al.*, 1988). Un modèle sur le mécanisme de la catalyse par la NEP a été élaboré (Figure 2, p.6). Ces renseignements sur la structure du site actif permettent et facilitent le *design* d'inhibiteurs à haute affinité. Certains inhibiteurs de la NEP furent conçus selon cette stratégie (Roques et Fournié-Zaluski, 1985).

De façon à concevoir des inhibiteurs spécifiques, il serait cependant intéressant de déterminer la structure de la NEP elle-même. Afin de faciliter la mise au point des conditions de cristallisation de la NEP, une forme sécrétée (et non plus membranaire) de la protéine a été produite en fusionnant un peptide signal clivable (celui du gène POMC) à l'ectodomaine de la NEP. Sans domaines transmembranaire ni cytosolique, la NEP soluble, ou sNEP, conserve toute son activité catalytique et est sécrétée dans le surnageant des cellules qui l'expriment (Lemay et *al.*, 1989). Sans les contraintes de solubilité infligées par un domaine transmembranaire hydrophobe, la purification et la cristallisation s'en retrouvent facilitées. De plus, cette sNEP peut être facilement recueillie dans de nombreux types de culture cellulaire en étant directement sécrétée dans le milieu de culture.

Comme la cristallographie nécessite de grandes quantités de protéines pures, la surproduction et la purification de la protéine à peu de coût sont importantes. La surexpression de la NEP et de la sNEP dans une levure comme *Schizosaccharomyces pombe* s'inscrit certainement dans cet objectif.

### **REPLIEMENT DE PROTÉINES ET CHAPERONES MOLÉCULAIRES**

Au début des années 70, Anfinsen proposait que toute l'information nécessaire pour l'atteinte de la structure tridimensionnelle d'une protéine est contenue dans la séquence d'acides aminés de cette dernière, et qu'une protéine dont la conformation a été dénaturée peut se replier par elle-même et retrouver ainsi sa conformation lorsque l'agent dénaturant est éliminé (Anfinsen, 1973). Par contre, si cela était vrai pour la ribonucléase d'Anfinsen, la recherche scientifique portant sur le repliement des protéines qui a suivi a remis en question ce principe de "l'auto-repliement". Le repliement d'une protéine passe en effet par différents intermédiaires de repliement acquérant peu à peu une conformation se rapprochant de la conformation finale. D'un intermédiaire à un autre, la formation de ponts disulfures, de structures secondaires et tertiaires stables et l'internalisation des portions hydrophobes seront réalisés tour à tour. Cependant, *in vivo* ce processus ne se réalise pas sans l'action de protéines qui viennent assister le repliement peptidique en venant favoriser les interactions productives qui stabilisent ces intermédiaires. Ces protéines sont baptisées *chaperones moléculaires*. Les chaperones moléculaires sont donc des protéines qui se lient aux polypeptides nouvellement synthétisés et qui en assurent le bon

repliement et l'assemblage. Certaines chaperones moléculaires (notamment celles de la famille HSP70, comme BiP) vont aussi faciliter la translocation des protéines en s'associant à la chaîne peptidique naissante. Finalement, en gardant les protéines non correctement repliées prisonnières du réticulum endoplasmique, certaines chaperones sont ainsi indirectement responsables de leur dégradation dans ce compartiment cellulaire.

L'étude des chaperones moléculaires procaryotiques telles que le complexe GroEL-GroES ont permis de caractériser et définir les chaperones moléculaires. GroES et GroEL font partie de la grande famille des protéines du choc thermique, les chaperonines-60 (*Heat-Shock Protein*- ou HSP60) et ont été attentivement étudiées au cours des dix dernières années.

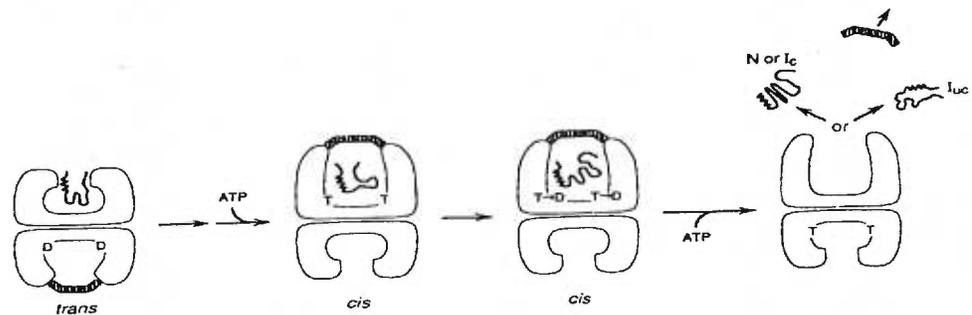
L'expression de ces chaperonines est induite lors de chocs thermiques. En effet, dans une condition de choc thermique, l'accroissement de l'énergie libre peptidique amène une difficulté supplémentaire au repliement des protéines. Pour pallier à cette difficulté, la cellule produit une plus grande quantité de chaperonine.

Composé de 2 sous-unités heptamériques, GroEL peut avoir de l'affinité pour GroES, l'ATP et des protéines non-repliées. L'hydrolyse de l'ATP induit des changements conformationnels au complexe et permet le relargage de la protéine en repliement. Par de successifs cycles de liaison-relargage ATP-dépendants, le complexe GroES-GroEL accomplit sa fonction de chaperone en assistant les protéines dans leur repliement (Baneyx, 1994). On peut retrouver le complexe GroEL-GroES sous deux conformations (*cis* et *trans*). Selon le modèle proposé (Figure 3, p.15), la protéine en repliement se fixe d'abord à la configuration *trans* du complexe *GroEL-GroES-ADP* pour former un complexe *GroEL-GroES-ADP-peptide*. La

liaison d'ATP permet à la sous-unité GroES de se dissocier puis redonne au complexe *GroEL-ATP-peptide* de l'affinité pour GroES. Lorsque le complexe *GroEL-GroES-ATP-peptide* s'est formé, le complexe est alors sous une conformation *cis*. Cette nouvelle conformation entraîne le polypeptide en repliement plus au centre de l'anneau que forme GroEL et en promouvoit le repliement. L'hydrolyse de l'ATP diminue l'affinité du complexe pour GroES et permet le relâchement du complexe vers la conformation *trans*. Finalement, la liaison d'ATP à ce complexe *GroEL-GroES-ADP-peptide* permet le relargage de GroES et du peptide en repliement (Figure 3).

Figure 3

Modèle du repliement assisté par les chaperonines.



D, ADP; T, ATP; N, Native; I<sub>c</sub>, Intermédiaire non reconnu par la chaperonine, I<sub>uc</sub>, Intermédiaire non-replié qui devra interagir à nouveau avec les chaperonines.

(source: Rye et al., 1997)

Le cytoplasme eucaryotique, la mitochondrie, le chloroplaste, le noyau et le réticulum endoplasmique renferment eux aussi des chaperones apparentées aux familles des HSP. Toutes n'agissent pas exactement de la même façon, mais leurs modes d'action demeurent semblables: les chaperones moléculaires ne reconnaissent pas de séquences d'acides aminés précises. Les chaperones seraient plutôt en mesure de reconnaître des portions peptidiques hydrophobes de protéines en voie de repliement, qui devraient normalement se loger à l'intérieur de la structure tridimensionnelle pour une protéine correctement repliée. Sur ces intermédiaires de repliement, des portions hydrophobes demeurent à l'extérieur et accessibles aux chaperones (pour une revue de la littérature: voir Gething et Sambrook, 1992). Ainsi, les chaperones empêchent des interactions intermoléculaires et la formation d'agrégats.

Le réticulum endoplasmique est le site de maturation des protéines destinées à la voie de sécrétion. En plus de la machinerie translocationnelle qu'on y retrouve, le réticulum endoplasmique renferme aussi des chaperones moléculaires. L'environnement *redox* que fournit cet organite est d'ailleurs particulièrement approprié pour la formation de ponts disulfures. Les chaperones qu'on y retrouve constituent l'appareillage assurant la bonne maturation, l'assemblage quaternaire et le repliement des protéines de la voie de sécrétion. En reconnaissant et s'associant à des protéines non-repliées, les chaperones deviennent un véritable système de *contrôle de la qualité* qui gardent ces protéines captives dans le réticulum endoplasmique tant qu'elles n'ont pas atteint leur conformation tridimensionnelle finale (Hurtley et Helenius, 1989). Les chaperones préviennent aussi l'aggrégation des protéines en repliement. En fait, sans les chaperones, les

concentrations élevées de protéines que l'on retrouve dans le réticulum endoplasmique et l'accessibilité de portions hydrophobes de ces protéines favoriseraient l'aggrégation non-spécifique de celles-ci. L'atteinte de la correcte conformation tertiaire et quaternaire devient donc déterminante pour le transport intracellulaire d'une protéine du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et l'extérieur de la cellule. De nombreuses protéines sont impliquées dans le repliement des protéines, comme l'isomérase des ponts disulfures (PDI), l'isomérase de la conformation *cis* ou *trans* des résidus prolines (peptidyl prolyl *cis-trans* isomérase), l'UDP-glucose:glycoprotéine glucosyltransférase, *etc.* D'autres, telles que l'HSP90, la calréticuline, BiP et la calnexine sont des chaperones associées au système du contrôle de qualité du réticulum endoplasmique. Les chaperones BiP et calnexine sont exprimées chez *S.pombe*, et nous les examinerons plus en détail dans les sections qui suivent.

### ***BIP, UNE CHAPERONE QUI UTILISE L'ÉNERGIE DE L'ATP***

La chaperone BiP est une chaperone moléculaire qui suscite beaucoup d'intérêt (pour une récente revue de la littérature, voir Haas, 1994). Appartenant à la famille des HSP70, BiP fut d'abord identifiée comme une protéine du réticulum endoplasmique liant la chaîne lourde des immunoglobulines (Haas et Wabl, 1983). Des études ont ensuite démontré l'association transitoire de BiP avec d'autres protéines nouvellement synthétisées (Blount et Merlie, 1991). Également, BiP est en mesure de s'associer avec différentes composantes de complexes protéiques prévenant leur sortie du réticulum endoplasmique et permettant ainsi l'assemblage de

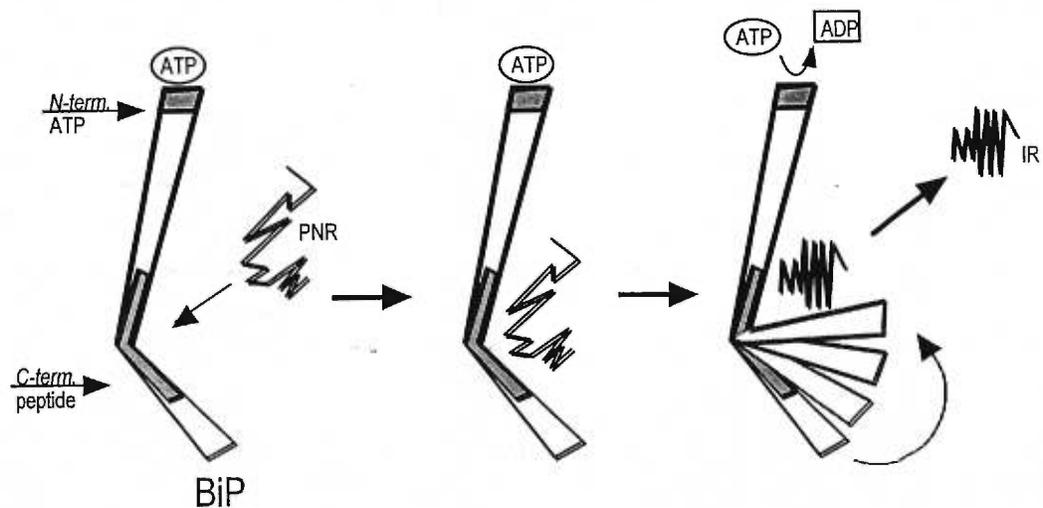
ces complexes (Hurtley et Helenius, 1989). Des homologues de cette chaperone sont aussi retrouvés chez les levures *S. cerevisiae* (Normington et al., 1989; Rose et al., 1989) et *S. pombe* (Pidoux et Armstrong, 1992). Chez *S. pombe*, BiP est glycosylée, contrairement à d'autres systèmes cellulaires tels que *S. cerevisiae*, le lapin et l'humain. Mais rien ne démontre encore clairement que cette glycosylation influence l'action de la chaperone dans le repliement des protéines. Comme la plupart des protéines du réticulum endoplasmique, la chaperone BiP possède en C-terminal un signal de rétention lui permettant d'y demeurer captive. Ce signal de rétention est constitué des tétrapeptides KDEL chez les mammifères (Pelham, 1990), de HDEL chez *S. cerevisiae* (Pelham, 1988) et de ADEL chez *S. pombe* (Pidoux et Armstrong, 1992).

La chaperone BiP a la capacité de replier dynamiquement ses substrats via l'hydrolyse d'ATP par des cycles successifs de liaison-relargage (Knittler and Hass, 1992). BiP possède en effet deux régions bien distinctes: en C-terminal un site de liaison avec le substrat (la protéine en repliement) et en N-terminal un site de liaison à l'ATP (Figure 4, p.19). Pour que BiP ait de l'affinité pour une protéine en repliement, elle doit être liée à l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP, stimulée par la liaison du polypeptide en repliement, induit ensuite des changements conformationnels chez la chaperone qui sont finalement transmis à la protéine en repliement. Ces changements pourront donc induire un certain repliement avant que le complexe chaperone-protéine en repliement ne puisse se dissocier (Pelham, 1986). *In vitro*, l'hydrolyse de l'ATP par la chaperone requiert la liaison d'un peptide et cette hydrolyse est nécessaire pour le relargage de ce même peptide (Flynn et al., 1989). Ainsi libérée de BiP, la protéine en repliement peut donc poursuivre

son cycle de repliement soit en se reliant à BiP si une affinité est toujours existante, soit en se liant à une autre chaperone, simultanément ou non à une liaison à BiP. Au terme du processus, la protéine a acquis sa conformation finale et, par le fait même, est en mesure de quitter le réticulum endoplasmique.

Figure 4

Modèle du repliement assisté par la chaperone BiP.



Le modèle illustre les trois grandes étapes du repliement d'un polypeptide par BiP. L'ATP est nécessaire pour l'affinité entre BiP et un peptide non-replié. L'hydrolyse de l'ATP induit le repliement et relargage du peptide. Plusieurs cycles de liaison-relargage peuvent être nécessaires pour le repliement complet.

PNR, peptide non replié; IR, intermédiaire de repliement.

### **CALNEXINE, UNE CHAPERONE AVEC UN "GOÛT POUR LE SUCRE"**

Une nouvelle chaperone de plus en plus étudiée présentement est certainement la calnexine (pour une récente revue de la littérature, voir Williams, 1995). Cette protéine membranaire de type I, d'abord identifiée comme se liant à des complexes d'histocompatibilité de classe I (Degen et Williams, 1991) dans le réticulum, constitue une véritable chaperone moléculaire s'associant à plusieurs protéines nouvellement synthétisées. Des co-immunoprécipitations spécifiques à un sérum anti-calnexine démontrent que la chaperone est associée à plus d'une centaine de protéines, et que ces associations sont transitoires comme l'indique des expériences de "pulse-chase" (David et al., 1993). Cette technique permet de visualiser dynamiquement l'association entre une chaperone et une protéine en repliement grâce à un marquage métabolique pulsé ("pulse-chase"). Comme seules les protéines marquées sont détectées, il devient possible de suivre la dissociation des protéines en repliement de la chaperone par des co-immunoprécipitations réalisées à différents temps après le pulse.

On retrouve des homologues de la calnexine dans de nombreux organismes, tels que l'humain, la souris, le chien, le rat, les plantes (pour une revue, voir Williams, 1995), ainsi que dans les levures *S. cerevisiae* (deVirgilio et al., 1993) et *S. pombe* (Jannatipour et Rokeach, 1995; Parlati et al., 1995). La calnexine est une protéine membranaire de type I non glycosylée chez les mammifères, tandis que son homologue de *S. pombe* est une glycoprotéine *N*-glycosylée. Chez *S. cerevisiae*, on retrouve plusieurs sites potentiels pour la *N*-glycosylation. Une autre particularité de la calnexine de *S. pombe* par rapport à *S. cerevisiae* est son caractère

essentiel pour la viabilité (Jannatipour et Rokeach, 1995; Parlati et *al.*, 1995). Chez les cellules de mammifères, la délétion de la calnexine ne semble pas induire de difficultés autres qu'une sécrétion moins efficace des glycoprotéines, suggérant que les autres chaperones du réticulum endoplasmique seraient en mesure de compenser cette délétion (Scott et Dawson, 1995). Le degré d'identité entre la calnexine de levure et celle de mammifère est plus important pour *S. pombe* (entre 37,3 et 40,1%) que pour *S. cerevisiae* (35,2%). La calnexine de *S. pombe* comporte aussi plusieurs caractéristiques comparables à son homologue eucaryotique de mammifères. Notamment, on retrouve chez *S. pombe* une portion cytosolique potentiellement phosphorylable qui est absente de la structure de sa contre-partie de *S. cerevisiae*. Globalement, les deux calnexines lévuriennes (*S. pombe* et *S. cerevisiae*) sont de plus courte taille que celle de mammifères.

Une des caractéristiques principales de la chaperone calnexine est sa spécificité pour des protéines glycosylées (Hammond et Helenius, 1993). Par exemple, si on lui présente deux protéines de structure globale semblable, l'albumine et la  $\alpha$ -fétoprotéine, seule celle qui est glycosylée - la  $\alpha$ -fétoprotéine - est reconnue comme un ligand par la calnexine. Également, en traitant des lignées cellulaires humaines avec l'inhibiteur de la glycosylation tunicamycine avant le marquage métabolique de ces cellules et la co-immunoprécipitation avec des anticorps dirigés contre la calnexine, le nombre de protéines nouvellement synthétisées associées avec la chaperone diminue significativement. En fait, bien que la calnexine ne possède pas de similarité de séquence avec le domaine de reconnaissance des saccharides trouvés chez les lectines, elle est quand même considérée

comme étant une lectine. En effet, la presque totalité des protéines nouvellement synthétisées co-immunoprécipitant avec la calnexine sont aussi reconnues par la lectine concanavaline A, démontrant que ces protéines seraient *N*-glycosylées (Ou et *al.*, 1993). Finalement, des expériences réalisées avec des lignées cellulaires déficientes en glucosidase ont démontré l'importance des saccharides dans l'association avec la calnexine (Ora et Helenius, 1995).

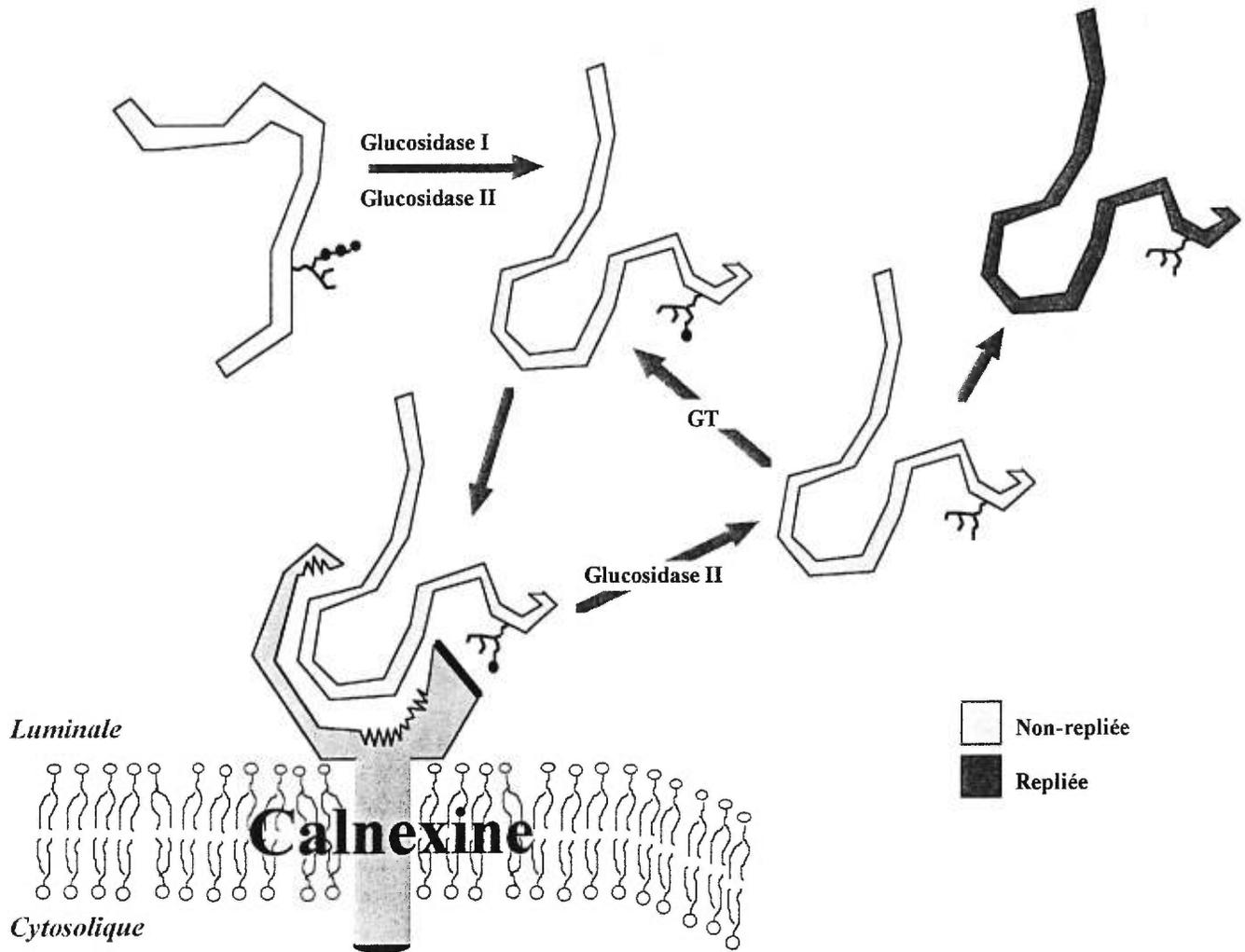
Plus précisément, plusieurs groupes ont démontré que cette affinité de type lectine serait spécifique à des substrats monoglucosylés ( $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) de chaînes oligosaccharidiques *N*-liées. Ces substrats apparaissent après que deux des trois glucoses du squelette de glycosylation ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) ont été clivés par les glucosidases I et II du réticulum endoplasmique (Hammond et *al.*, 1994; Hebert et *al.*, 1995; Ora et Helenius, 1995; Nauseef et *al.*, 1995; Peterson et *al.*, 1995; Ware et *al.*, 1995; McDonnell et *al.*, 1996; et Otteken et Moss, 1996). Par exemple, il a été démontré que certaines protéines, comme les récepteurs des cellules-T (TCR)  $\alpha$  et  $\beta$ , ne peuvent désormais plus être des substrats de la calnexine lorsque l'inhibiteur de la glucosidase I castanospermine est présent dans la culture cellulaire. Ainsi, lorsque l'on prévient l'enlèvement des premiers glucoses, l'association entre la calnexine et ces glycoprotéines  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  devient impossible (Kearse et *al.*, 1994).

En se basant sur les découvertes de l'équipe du docteur Parodi sur la spécificité que l'UDP-Glucose:glycoprotéine glucosyltransférase (GT) a pour les glycoprotéines non-repliées *in vitro* (Trombetta et Parodi, 1992; Sousa et Parodi, 1995), le groupe de recherche du docteur Ari Helenius a présenté un "séduisant" modèle de repliement des glycoprotéines (voir Figure 5, p.24).

Ce modèle comprend l'action de deux éléments clé: la calnexine et la GT. L'activité catalytique de cette dernière consiste en la mono-reglucosylation de glycoprotéines ( $\text{Glc}_0\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2 \rightarrow \text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) n'ayant pas atteint leur conformation tridimensionnelle finale. On suggère donc que la GT serait possiblement elle aussi une chaperone moléculaire du réticulum endoplasmique qui reconnaît des glycoprotéines nouvellement synthétisées et encore non correctement repliées.

Figure 5

Modèle du repliement protéique assisté par les chaperones calnexine et l'UDP-Glucose:glycoprotéine glucosyltransférase (GT).



La protéine en repliement interagit successivement avec l'AGT et la calnexine jusqu'à l'atteinte de sa structure native. Les points sur le squelette polypeptidique représentent des glucoses.

Le modèle de Helenius suggère donc qu'une glycoprotéine en repliement sera reconnue par la calnexine lorsqu'elle aura perdu deux de ses glucoses par l'action des glucosidases I et II du réticulum endoplasmique; la calnexine serait alors en mesure de l'assister dans son repliement puis de la relarguer. Si la protéine n'a pas atteint sa conformation native avant d'avoir perdu son dernier glucose, la GT la reconnaîtra et lui rajoutera un glucose la rendant ainsi à nouveau mono-glucosylée et donc reconnaissable par la calnexine. La glycoprotéine en repliement pourra échapper à ces cycles de glucosylation-repliement seulement lorsqu'elle ne sera plus reconnue par la GT, c'est-à-dire lorsqu'elle aura atteint une conformation tridimensionnelle finale et adéquate (Hammond et Helenius, 1993). Bien qu'appuyé par de nombreuses publications, ce modèle de repliement par la calnexine et la GT ne fait pas l'unanimité. Plusieurs exceptions ont été rapportées. Ainsi, des études ont démontré que certaines protéines non-glycosylées s'associent avec la calnexine, comme notamment, la thyroglobuline (Kim et Arvan, 1995), le récepteur  $\epsilon$  des cellules-T (Rajagopalan et *al.*, 1994), et gp80 des cellules MDCK (Wada et *al.*, 1994). Ces nombreuses observations viennent remettre en question la "glycospécificité" de substrat de la calnexine. Les études faites dans le laboratoire du docteur Rokeach au Département de biochimie vont aussi dans ce sens. En effet, à l'aide de culture cellulaire incubée en présence de tunicamycine, l'inhibiteur de la glycosylation, il a été démontré que la calnexine de *S. pombe* est en mesure de reconnaître ses ligands même non-glycosylés. Également, la présence de l'inhibiteur 1-déoxynojirimycine de la glucosidase I et II ne vient pas prévenir l'association entre la chaperone et son substrat (Jannatipour et *al.*, Beaulieu et *al.*, données non publiées, et DISCUSSION du présent mémoire). En collaboration avec le groupe du docteur Parodi, le laboratoire du docteur Rokeach a aussi démontré que chez *S. pombe*, le gène de la GT, *gpt1*, n'est pas essentiel pour la viabilité (Fernandez et *al.*, 1996). Ceci vient confirmer que la Gpt1 n'exerce pas une fonction vitale ou exclusive sur le mécanisme de reconnaissance de protéines nouvellement synthétisées par la calnexine.

Il est finalement à noter qu'on ne retrouve pas d'homologue de la GT chez *S. cerevisiae*.

On peut alors conclure que la calnexine est en mesure de replier les protéines nouvellement synthétisées selon au moins deux mécanismes pas exclusifs, le premier nécessitant la présence d'un oligosaccharide monoglucosylé, et l'autre, d'une façon "plus classique", probablement par la reconnaissance de domaines hydrophobes, tel que décrit au préalable pour BiP. Finalement, contrairement à la chaperone BiP, il est à noter que bien que la calnexine possède un site de liaison à l'ATP, aucune activité ATPasique n'est détectable (Ou et *al.*, 1994; Ou et *al.*, 1995).

### **LES SYSTÈMES D'EXPRESSION HÉTÉROLOGUE**

Le choix d'un système d'expression hétérologue approprié est d'une importance fondamentale pour le présent projet de recherche. Une section de la discussion comparera les avantages et limitations de différents systèmes d'expression hétérologue ayant été utilisés pour la sNEP. Les résultats de l'expression de celle-ci dans la levure *S. pombe* y seront aussi discutés afin de conclure sur l'utilité et les applications potentielles de ce système hétérologue.

*E. coli* fut l'un des premiers systèmes d'expression hétérologue utilisés pour la surexpression d'une protéine d'intérêt (revue: Stader et *al.*, 1995). La rapidité de croissance de cet organisme en culture représente le principal avantage du système bactérien. Cependant, *E. coli* ne peut devenir un système d'expression hétérologue adéquat pour l'étude complète (structure, fonctions, ...) de certaines protéines. En effet, l'absence de glycosylation est

souvent néfaste pour le repliement et/ou l'activité enzymatique de la protéine hétérologue (exemple de la sNEP, Lafrance et *al.*, 1994). La surproduction de protéines transmembranaires chez *E. coli* peut aussi s'avérer difficile. La littérature compte très peu d'exemples d'expression hétérologue de protéines transmembranaires qui ont réussi (exemple de la 17 $\alpha$ -hydroxylase du cytochrome P-450, Barnes et *al.*, 1991). De façon générale, la surproduction résulte souvent en l'aggrégation des protéines par leurs domaines hydrophobes et la formation de corps d'inclusion (Fiermonte et *al.*, 1993). L'état de phosphorylation des protéines hétérologues est aussi différent lorsque produites chez *E. coli* et peut avoir des conséquences négatives sur l'intérêt de ce système (Stader et *al.*, 1995). Il faut noter finalement que l'environnement *redox* intracellulaire de *E. coli* ne permet pas la formation de ponts disulfures, ce qui vient limiter l'utilisation de ce système pour plusieurs protéines.

Les systèmes d'expression de cellules de mammifère ne partagent évidemment pas ces difficultés inhérentes à l'absence d'un réticulum endoplasmique chez les procaryotes. Les cellules de mammifères offrent les systèmes d'expression hétérologue les plus sûrs. Elles permettent une production de protéines hétérologues correctement repliées et actives et facilitent l'étude des interactions polypeptidiques, du ciblage cellulaire et des autres mécanismes fondamentaux (Stader et *al.*, 1995, Hinnen et *al.*, 1992). Les limites de ce système d'expression hétérologue sont liées aux efforts nécessaires pour surproduire une protéine d'intérêt. L'établissement de lignées stables nécessaires pour la surproduction de protéine peut nécessiter beaucoup de temps à réaliser. Les cellules en culture demandent beaucoup d'attention et leur temps de génération est beaucoup moins rapide que ce

qu'on retrouve avec les systèmes procaryotiques et de la levure (Goeddel et *al.*, 1991).

Pour permettre la surproduction d'une protéine d'intérêt, l'utilisation d'un vecteur viral peut s'avérer une excellente alternative. Par exemple, le système de baculovirus a été largement utilisé dans la surproduction de protéines d'intérêt dans de nombreux systèmes cellulaires (Summers et *al.*, 1987). Les nombreux succès obtenus avec baculovirus infectant des cellules d'insectes ont engendré une étude plus approfondie de ce système d'expression hétérologue. Ces études ont démontré que les modifications posttraductionnelles comme l'hydrolyse du peptide signal et la glycosylation entre mammifères et insectes sont relativement similaires. Toutefois, l'état de glycosylation entre les deux systèmes a souvent présenté des différences notables; les carbonhydrates post-traductionnellement ajoutés chez les insectes sont de type riche en mannose (Butters et *al.*, 1981, Domingo et *al.*, 1988). L'impact de ces glycosylations sur l'activité enzymatique demeure non significatif. Il sera discuté plus loin de l'exemple de la NEP (Discussion et conclusion). Un autre avantage du système de baculovirus est la facilité avec laquelle il est possible de co-exprimer deux ou plusieurs gènes ... avantage d'ailleurs partagé avec les systèmes de levures.

La levure devient une alternative de plus en plus utilisée pour la surexpression hétérologue (revue: Romanos et *al.*, 1992). Les levures présentent les avantages de la culture cellulaire simple et rapide retrouvés chez les procaryotes et permettent aussi l'expression d'une ou plusieurs protéines. La présence de toute la machinerie cellulaire nécessaire pour la glycosylation en fait un système également utile pour les glycoprotéines. Toutefois, certaines levures telle *S. cerevisiae* peuvent parfois

hyperglycosyler certaines glycoprotéines (exemple, gp350 de EBV, Schultz et *al.*, 1987), ou aussi glycosyler des protéines qui ne le sont normalement pas dans leur système d'expression original (exemple IL-1 $\alpha$ , Livi et *al.*, 1990). Bien que l'activité de l'enzyme semble généralement conservée, ces hyperglycosylations peuvent entraîner des difficultés au niveau de la reconnaissance de la protéine hétérologue par des anticorps spécifiques (Schultz et *al.*, 1987). L'utilisation d'autres espèces de levure peut aussi être envisagée. *S.pombe* est certainement, avec *S.cerevisiae*, le système cellulaire le plus étudié et le mieux caractérisé. Un des avantages principaux de *S.pombe* est la possibilité d'effectuer des expériences de complémentation (voir Lee et *al.*, 1987). Il sera discuté à la fin du mémoire des avantages qui ont été constatés lors de la surproduction de la sNEP dans ce système. D'autres systèmes hétérologues chez la levure prennent avantage de la possibilité de produire de grandes quantités de protéines. La levure méthylotropique *P. pastoris*, par exemple, peut donner des rendements jusqu'à 10X plus important que dans la levure *S.cerevisiae* (Romanos et *al.*, 1992). Dans la levure, l'utilisation de promoteur inductible représente aussi un puissant outil facilitant l'expression de différentes protéines (thiamine, Maundrell, 1990; méthanol, Cregg et *al.*, 1993).

## **PROJET DE RECHERCHE**

Comme mentionné au début de ce chapitre introductif, le projet de recherche **Expression de l'Endopeptidase Neutre dans la levure *Schizosaccharomyces pombe* et étude de son interaction avec les chaperones du réticulum endoplasmique** présente un double intérêt. Tout

d'abord, s'inscrivant dans les efforts de recherche investis pour l'élaboration d'un modèle structural pour cette protéine, la surproduction de la sNEP dans un système de levure est à l'étude.

La culture de *S. pombe* est non seulement peu coûteuse pour une large production, mais aussi, elle nécessite peu de soin et de manipulation délicate. De plus, bien que peu de protéines sécrétées soient caractérisées chez *S. pombe*, cette dernière représente un excellent organisme-modèle pour l'étude des mécanismes cellulaires des eucaryotes. Les organites, la glycosylation et la sécrétion protéique sont très semblables à ce qu'on retrouve chez les cellules de mammifères (Kukuruzinska et al., 1987; Romanos et al., 1992). *S. pombe* présente donc un système d'expression pratique en ce qui concerne les manipulations génétiques et cellulaires. De plus, *S. pombe* constitue aussi un système cellulaire utile pour l'étude de phénomènes eucaryotiques fondamentaux. Une fois qu'une souche de levure transformée par un vecteur d'expression est préparée, les seules manipulations nécessaires sont la culture de grandes quantités de cellules dans des contenants de plusieurs litres et la récolte de protéines sécrétées dans le surnageant. Une culture cellulaire de *S. pombe* est tout aussi simple à réaliser qu'une culture bactérienne d'*E. coli*, par exemple. Pour produire encore davantage de sNEP, le recours à l'utilisation de fermenteurs industriels est même facilement envisageable.

D'un autre côté, l'expression de la NEP dans un tel système offre un modèle intéressant d'étude des interactions entre une protéine en repliement et des chaperones moléculaires du réticulum endoplasmique. En effet, tout d'abord, la NEP comporte de nombreux éléments à sa structure primaire, tels des sites de glycosylation et des ponts disulfures venant compliquer et

ralentir son processus de repliement, rendant ainsi les intermédiaires du repliement plus facilement immuno-déTECTABLES par la pléiade d'anticorps disponibles pour la NEP. De plus, on peut étudier l'effet de mutations à ces sites de modification sur le repliement et les interactions avec les chaperones moléculaires. Aussi, l'activité enzymatique de cette protéine, dépendante de sa bonne conformation tridimensionnelle, peut être très rapidement et facilement caractérisée. Il devient donc possible d'évaluer l'efficacité du bon repliement de la protéine non seulement par le temps de passage et la sortie du réticulum endoplasmique, mais aussi, par le pourcentage d'activité catalytique récupéré. Enfin, l'existence d'une forme sécrétée de la NEP (la sNEP) permettra de pouvoir discerner - s'il y a lieu - des différences dans les mécanismes de repliement entre une protéine membranaire et une protéine soluble et sécrétée. Ce dernier point pourra fournir de nouvelles observations permettant de mieux connaître et caractériser les mécanismes fondamentaux sous-jacents au système de contrôle de la qualité du réticulum endoplasmique.

Nous espérons donc que grâce à l'utilisation des nombreux mutants de la NEP, notamment les mutants des sites de glycosylation et des résidus cystéines, nous pourrons utiliser *S. pombe* comme système expérimental pour une étude approfondie du repliement de la NEP. Ce modèle d'étude permettra d'identifier les éléments d'une structure primaire importants pour atteindre la configuration native et pour définir les interactions avec les chaperones moléculaires.

Interaction of mammalian neutral  
endopeptidase 24.11 with the endoplasmic  
reticulum chaperones BiP and calnexin in  
*Schizosaccharomyces pombe*

**Hugues Beaulieu, Philippe Crine, and Luis A. Rokeach\*\***

Département de biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal,

Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

RUNNING TITLE:

**NEP interacts with BiP and calnexin in *S. pombe***

## SUMMARY

Neutral endopeptidase (E.C. 3.4.24.11) is a zinc-metallo-endopeptidase expressed in many eukaryote cell types and displaying several important physiological roles. In the brain (CNS), this enzyme is involved in the molecular mechanism of pain by its action in the degradation of enkephalin molecules. In the kidney NEP, is implicated in the degradation of regulatory factors involved in the control of arterial pressure, including ANP (atrial natriuretic peptide) and bradykinin.

To facilitate their biochemical and structural characterization, we have overproduced rabbit NEP and sNEP (a soluble recombinant derivative of this integral membrane protein) in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Both heterologous NEP and sNEP were produced at high levels (5 mg per liter per day) in this system. Enzymatic studies have revealed that these recombinant proteins were fully active and exhibit kinetic parameters similar to those of the *bona fide* enzyme. Moreover, immunofluorescence microscopy and enzymatic assays have shown that recombinant NEP is correctly targeted to the cell-membrane. Furthermore, co-immunoprecipitation studies have shown that folding intermediates of NEP and sNEP, produced in *S. pombe*, interact with the endoplasmic reticulum chaperones BiP and calnexin. The amount of sNEP coprecipitated with both chaperones augmented when cells were subjected to various stresses causing the accumulation of unfolded proteins in the ER. The NEP-chaperone interaction was however more refractive to the same stresses. We hypothesized that different mechanisms are involved in the folding of these two versions of the same protein.

## INTRODUCTION

Neutral endopeptidase (NEP, E.C. 3.4.24.11) was first identified as the most abundant Zn-metalloendopeptidase of the brush-border membrane (Kerr & Kenny, 1974). Subsequently, it has been shown that NEP was also expressed in many other mammalian cells types, including the microvilli of the intestine (Danielsen & *al.*, 1980), cells of the lung (Johnson & *al.*, 1985), plasma-cells lymphocytes (Johnson & *al.*, 1985) and neutrophils (Connelly & *al.*, 1985), reticular cells of the lymph (Gee & *al.*, 1985), cells of the adrenal gland (Bowes & Kenny, 1986), and cells of the central nervous system (Malfroy & *al.*, 1978, Matsas & *al.*, 1983). As shown in Figure a1, NEP is a class II integral membrane glycoprotein consisting of a short *N*-terminal cytosolic domain with a length of 27-residues, a single-passage transmembrane domain of 22 hydrophobic amino acids forming a helical secondary structure (Chou & Fasman, 1978), and a 700-residues long ectodomain containing five glycosylated Asn and six disulfide bonds. The catalytic center of this enzyme is located in its large extracellular domain (Devault & *al.*, 1987). Functionally, NEP has been shown to be implicated in the degradation of small bioactive peptides at the cell surface. The ideal substrate for this protease appears to be small peptides rather than proteins (Bowes & Kenny, 1986). Hydrolysis of substrates by NEP is exerted at *N*-terminal side of hydrophobic residues.

Clinical interest on NEP has emerged from the biological importance of this enzyme. For example, expression of NEP colocalizes with that of both  $\mu$  and  $\gamma$  opioid receptors (Waksman & *al.*, 1986, Waksman & *al.*, 1987), thus this enzyme is ideally located to control the molecular mechanisms of pain, by degrading neuropeptides at the neuronal synapse (Barnes & *al.*, 1992). In

the mammalian brain, NEP has been reported to inactivate enkephalins. This is supported by the observation that specific inhibition of NEP by thiorphan prevents degradation of enkephalins *in vitro* and causes analgesia *in vivo*, a reversible effect which can be reversed by the opioid receptor antagonist naloxone (Roques & *al.*, 1980). For this reason, NEP has also often been referred as *enkephalinase*. Since the action and effect of enkephalins could be potentiated by inhibition of NEP, inhibitors of this protease are regarded as a new type of analgesic drug, complementary to the classical opiate analgesics, such as morphins, by its acting on another target. Another clinically interesting aspect of NEP is its capacity to cleave and inactivate natriuretic and vasodilatory hormone atrial natriuretic peptide, ANP, a peptide having an important role in the control of arterial pressure (for recent review see Marcil & Anand-Srivastava, 1995). Furthermore, it has been shown that NEP inhibitors potentiate endogenous levels of ANP (for reviews see Seymour & *al.*, 1995, Roques & *al.*, 1995).

The identification of novel inhibitors of NEP is evidently of great interest for their eventual application in clinical treatments. In this respect, structural studies on this protein constitute a major step in this direction as they are a prerequisite for the rational design of drugs. Due to the unavailability of a three-dimensional model for NEP, the structural studies carried to date on this enzyme have been mostly limited to the comparison with the crystallized bacterial Zn-metalloprotease thermolysin. This approach is validated by the fact that thermolysin displays certain structural similarities with NEP, most particularly at the level of the catalytic sites (Benchetrit & *al.*, 1988). To overcome the problems inherent to the purification and crystallization of a membrane-bound protein, a soluble, secreted form of NEP

(designated sNEP) has been engineered and has been overproduced in different expression systems (*sf-9*, Fossiez & *al.*, 1992; *MDCK*, Corbeil & *al.*, 1992; *COS-1*, Howell & *al.*, 1994; *LLC-PK1*, Lanctôt & *al.*, 1995; caterpillar, Gonneville & *al.*, unpublished data)

In the present study, we have investigated the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* as a potential host for the overproduction of NEP and sNEP. As *S. cerevisiae*, *S. pombe* offers the great advantages of easy molecular genetic manipulation along with rapid and inexpensive culture. More interestingly, we speculated that *S. pombe* could be a useful organism for the overproduction of active NEP and sNEP because this fission yeast displays in addition many striking similarities with mammalian cells including protein glycosylation and secretion (for reviews, Kukuruzinska & *al.*, 1987, Romanos & *al.*, 1992). Consequently, *S. pombe* lends itself as an attractive, surrogate organism for the study of protein folding and secretion, except for the paucity of endogenous proteins that could serve to monitor these processes. In this respect, for the following reasons NEP stands out as an ideal protein to examine the mechanisms of folding and secretion: i) it is a glycosylated polypeptide containing several disulfide bridges, that can be expressed as an integral-membrane protein or in a secreted form (sNEP), thus the existence of different folding mechanisms can be explored; ii) the enzymatic activity of NEP can be determined in simple and rapid assays (Crine & *al.*, 1985), thereby detection and correct folding can be assessed quantitatively; iii) both polyclonal (Lemay & *al.*, 1989) and monoclonal (Crine & *al.*, 1985) anti-NEP antibodies are available; iv) a plethora of glycosylation and disulfide-bond mutants, including some that are secretion-impaired, are readily available for the study of the various

aspects of the protein folding and secretion mechanisms. As a first step in this direction, we have explored the possible interaction between NEP and sNEP with the ER molecular chaperones BiP and calnexin.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Strains and media

*E. coli* ES1301 *mutS* and JM109 bacterial strains (Promega) were used for the mutagenesis steps (see the Mutagenesis part of this section). The *S. pombe* strain used was SP556 ( $h^+$  *ade6*-M216 *ura4*-D18 *leu1*-32), and was kindly provided by Dr. Paul Nurse. *S. pombe* minimal medium (MM) was used for the culture of transformed strains, and was prepared as described (Moreno & *al.*, 1991). *S. pombe* transformations were performed by the lithium acetate procedure (Moreno & *al.*, 1991). All liquid culture were carried out in shake flasks.

### Plasmid constructions

Standard DNA manipulations were carried out as described (Sambrook & *al.*, 1989). The cloning of the cDNA encoding rabbit NEP and the engineering of sNEP have been previously reported (Devault & *al.*, 1987, Lemay & *al.*, 1989). To facilitate the subcloning of the rabbit NEP and sNEP coding sequences into various expression vectors, an expression cassette was constructed by creating, by site-directed mutagenesis, the restriction sites *Nde*I (CAT↓ATG) in 5', (NEP: TAG GTG ATG GGA, sNEP: GCT AGC ATG CCG) and *Bam*HI (G↓GATCC) in 3', TGA TCT ACA GAA with mutagenic oligonucleotides, overlapping the ATG initiator and the TGA termination codons. To avoid the requirements of partial restriction for the subcloning, an endogenous *Nde*I (CA↓TATG) site was also removed by mutagenesis (GCA TAT GTG). Site-directed mutagenesis was performed with the *Altered Sites II in vitro Mutagenesis Systems*, using the mutagenesis vector pALTER-1 (Promega), according to the manufacturer's recommendations. Sequences were finally verified by sequencing of the double-stranded DNA with the *T7 sequencing kit* (Pharmacia). The NEP and sNEP

expression cassettes were then cloned in the *S. pombe* vector pREP2 carrying the inducible *nmt1* promoter. To induce heterologous expression of the proteins, cells were twice washed and put in new growth media thiamine-free (Maundrell, 1990, Maundrell, 1993, Basi & *al.*, 1993).

### **SDS-PAGE and Immunoblot analyses**

Protein samples for gel electrophoresis were dissolved in Laemmli 3X sample buffer (Laemmli, 1970) and boiled for 5 min. Separation of proteins were performed on 7.5% SDS-PAGE and proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (Protran, 0.45 mm) overnight. Incubation with anti-NEP monoclonal antibody (Crine & *al.*, 1985) at a 1:200 dilution was performed and immunocomplexes were visualized by chemiluminescence with the ECL kit (Amersham). Quantitation of immunoblots was done by densitometry with soft-LASER densitometry using an LKB 2222-02 Ultro Scan XL instrument (Pharmacia) and comparing with a set of samples of known amounts of purified rabbit kidney NEP, which were simultaneously run on a gel, as standard.

### **Endoglycosydase digestion**

Heterologous NEP and sNEP from cell extracts or supernatants and purified rabbit NEP were boiled for 5 min. in denaturation buffer (50mM Na-acetate pH 5.5, 25 mM EDTA, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.02% SDS, 0.5mM PMSF) and incubated with 1 unit of peptide-N-glycosidase F (PNGase F; Boehringer Mannheim) overnight at 37°C, according to the manufacturer's recommendations. Digestion products were loaded on SDS-PAGE and subjected to Immunoblot analysis as described above.

### Enzyme assays

From a 1 OD culture, heterologous *S. pombe* NEP or intracellular sNEP was solubilized in breakage buffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 20% glycerol, 1 mM NaF, 1 mM NaHSO<sub>3</sub>, 2 mM PMSF). Samples from the secreted form of sNEP were from the yeast culture supernatants (MM). The secreted proteins were concentrated and the culture medium was exchanged with 50mM MES pH 6.5 buffer using *Centriprep-30* tubes (Amicon). Enzymatic activity was measured essentially as described previously (Crine & *al.*, 1985) except that incubations were carried at 37°C in 50mM MES-NaOH pH 6.5, instead of 50mM Tris-HCl pH 7.4, at room temperature. Catalysis was followed by using 50 nM of the tritiated substrate [tyrosyl-(3,5-<sup>3</sup>H)](D-Ala<sup>2</sup>)-Leu-Enkephaline (50 Ci/mmol; Commissariat à l'Énergie Atomique, Gif-sur-Yvette, France), and metabolites separation from substrate was performed by chromatography on *Sep-Pak C<sub>18</sub>* cartridges (Waters Associates, Milford, MA). The IC<sub>50</sub> values were calculated for thiorphan inhibitor, the  $K_m$  values were determined isotopic dilution and the  $k_{cat}$  were established with the densitometric dosage of the proteins after western blotting, as described above.

### Immunoprecipitations

Exponential cultures of *S. pombe* cells expressing NEP or sNEP were prepared starting from an 0.05 OD culture inoculum for an overnight preculture. When the cultures reached OD<sub>595</sub> of 0.4, they were subdivided and cells were subjected to different treatments for two hours: control condition (30°C); heat shock (39°C); reducing conditions, to inhibit the formation of disulfide bridges (+ 10 mM DTT); inhibition of *N*-glycosylation (+ 10 µg/mL tunicamycine); and inhibition of glucosidases (+ 1 mM deoxynojmyrinomycin). Samples

containing  $10^8$  cells were taken for each immunoprecipitation and washed in ice-cold PBS containing 10 mM  $\text{NaN}_3$ . Cells were resuspended in 150  $\mu\text{L}$  of immunoprecipitation buffer (IPB; 50mM HEPES pH7; 50mM NaCl; 1% NP-40; 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 10mM iodoacetamide; 1 mM PMSF and 1mg/mL of each aprotinine, pepstatine, leupeptine), and mechanically broken with glass beads, in 10 cycles of 30 secondes vortex and 30 secondes pause, on ice. For each immunoprecipitation, the equivalent of  $10^8$  cells in 500  $\mu\text{L}$  was used. Serum incubations were performed with a 1:200 dilution of polyclonal, guinea-pig anti-NEP (Lemay & *al.*, 1989), or polyclonal rabbit anti-Cnx1p (Jannatipour *et al.*, manuscript in preparation), or polyclonal anti-BiP (Pidoux & Armstrong, 1993), for 1h, at 4 °C. To each tube, one tenth of volume of a 10% solution of protein A-Sepharose in IPB was added and incubation was continued for one additional hour, at 4 °C. Subsequently, immune complexes were washed 5 times with IPB. After this other set of 5 washing, 25  $\mu\text{L}$  of Laemmli 3X sample buffer was added and samples were boiled for 4 min. Samples were fractionated on 12.5% SDS-PAGE gels and immunoprecipitated proteins detected by western blotting. Controls were performed under the same conditions on NEP and sNEP-expressing cells with pre-immune sera.

### **Immunofluorescence**

From an overnight exponential pre-culture, a 25mL culture at 0.2 of  $\text{OD}_{595}$  was started and incubated for 4h (until reaching  $\text{OD}_{595}$  of about 0.5). Fresh 17.5% formaldehyde solution and 10X PBS stock solution were added to the culture to a final concentration of 4% formaldehyde and 1X PBS. Cells were shaken 2 times for 30 min/each (100 RPM) with one buffer change. Cells were then pelleted and resuspended in 500  $\mu\text{L}$  of 10 mM  $\text{NaN}_3$ /1X PBS, and 20  $\mu\text{L}$  of this suspension was placed in wells of poly-L-lysine-coated toxoplasmosis slides (Bellco). Excess fluid was removed and slides were allowed to air dry for 15 min. Polyclonal guinea pig anti-NEP antibodies at a 1:100 dilution in 1% BSA-1% milk-10 mM  $\text{NaN}_3$ /PBS were

added dropwise into each well, and incubation proceeded overnight, at 4°C. After 8 washings with 1% BSA-10mM NaN<sub>3</sub>/PBS, the same incubation conditions were performed for 5 additional hours, in the dark with the secondary FITC-coupled antibodies (Chemicon Int.). After another 8 washing with 1% BSA-10mM NaN<sub>3</sub>/PBS, slides were allowed to air dry slightly (5 min), and mounting solution (1mg/mL para-phenylenediamine, 0.1X PBS-glycerol) was added between wells. Finally, slides were sealed with nail polish. Microscopy was done with a *Leica* optical microscope, at a 1000X magnification. Controls were performed on untransformed cells under the same incubation conditions. Photographs were taken on 400ASA TMAX 35mm film from Kodak.

## RESULTS

### Heterologous production of NEP and sNEP in *S. pombe*.

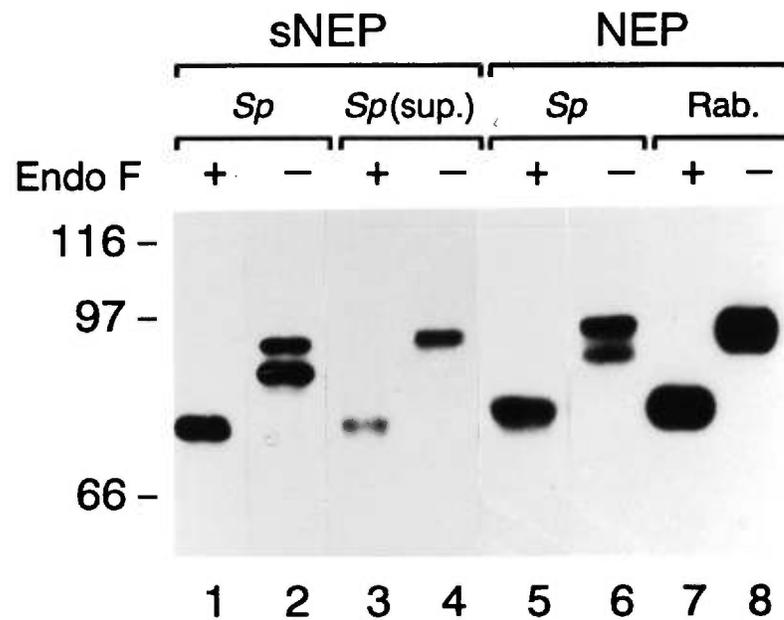
In order to produce NEP and sNEP in *S. pombe*, their respective coding sequences were inserted in the pREP2 shuttle vector (see Materials and Methods). Expression of inserted genes in this vector is driven by the regulatable promoter *nmt1*, which is repressed by the addition of thiamin to the culture medium (Maundrell, 1990). *S. pombe* strains bearing this plasmid construct were cultured exponentially. To assess the production of NEP and sNEP, cell extracts, and supernatants in the case of sNEP clones, were analyzed by western blotting (figure a1). After 16 hours of cell culture, about 5 mg of NEP and sNEP per liter of culture at OD<sub>595</sub> of 1, were produced with the pREP2-based plasmids. Enzymatic activity was detected in crude extracts from NEP and sNEP producing cells, however, no significant activity was detected in sNEP-containing supernatants. Because of the sensitivity of sNEP to low pH and the lack of apparent proteolytical degradation (data not shown), we inferred that the lack of enzymatic activity was due to culture conditions. Consequently, we assessed the effect of different buffers in various culture media and the highest enzymatic activity was observed in minimal medium containing 50 mM HEPES, pH 7.0.

### Targeting of heterologous NEP

The above described experiments determined that the *S. pombe* produced, intracellular NEP and sNEP are functional, and that sNEP is secreted into the culture medium in an active conformation.

Figure a1

Analysis of the glycosylation of the *S. pombe*-produced NEP and sNEP



Endoglucosydase restrictions (peptide-N-glycosidase F, Endo F) were performed, as described in Materials & Methods, on extracts of cells expressing wild type NEP (lanes 5-6), extracts of cells expressing the secreted form (sNEP, lanes 1-2); or supernatant of cells expressing sNEP (lanes 3-4). As control, PNGase F restriction was carried out on purified rabbit NEP (lanes 7-8). Sp: *S. pombe*; Rab.: rabbit.

24

25

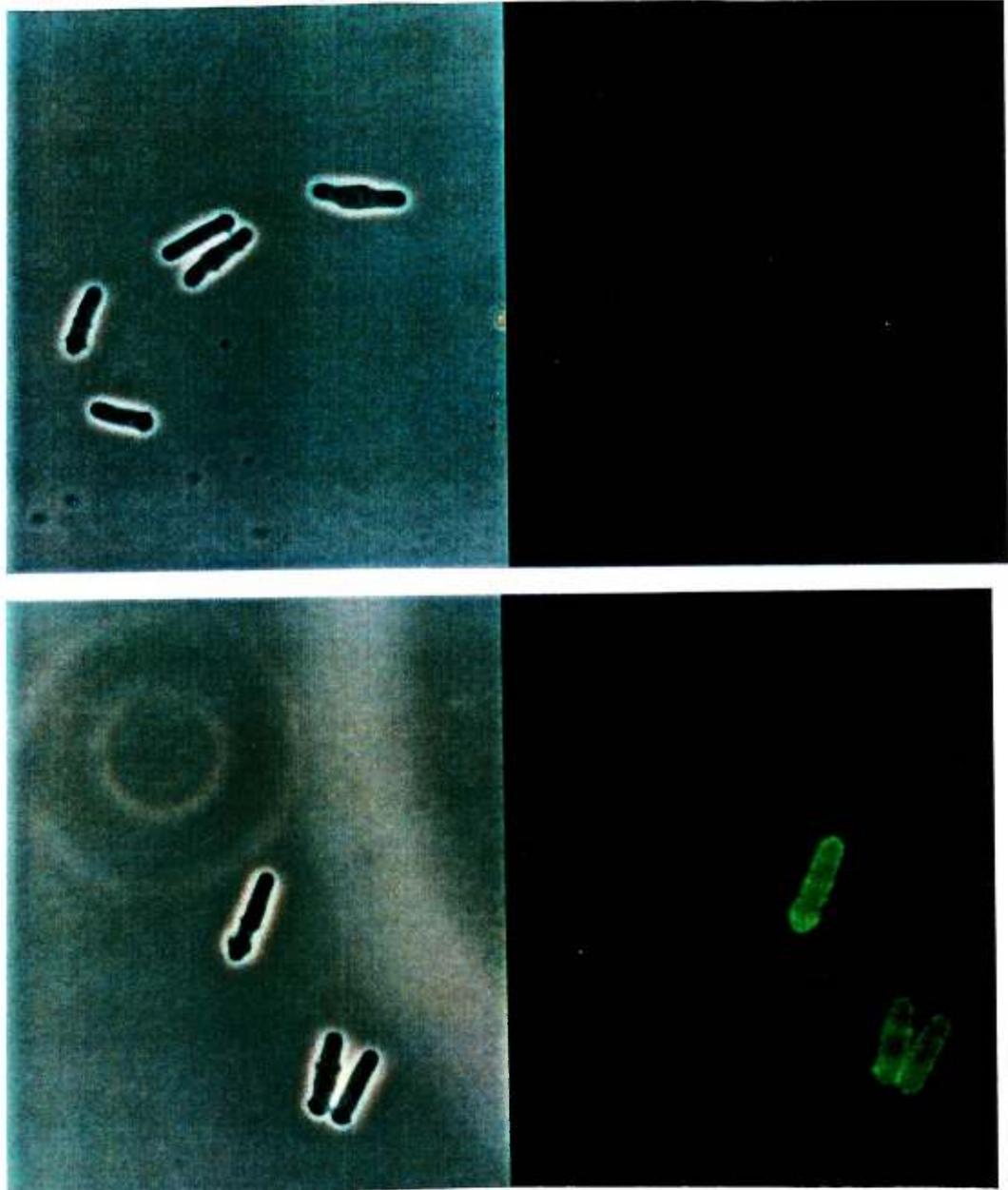
26

Indirect immunofluorescence microscopy was carried out on non-permeabilized cells to examine whether NEP was correctly targeted to the *S. pombe* cell membrane. In those conditions, only surface antigens could be detected. As it possible to see in Figure a2, NEP accumulated at the surface of *S. pombe* cells carrying the NEP expression plasmid (lower panel); in contrast, no detectable immunofluorescence was observed on control cells (higher panel). Furthermore, repeatedly washed, intact cells expressing NEP displayed significant specific enzymatic activity, whereas no activity was detected in control cells. Therefore, confirming both the targeting of NEP to the cell surface and the correct orientation and folding of the protein produced in *S. pombe*.

### **Glycosylation of heterologous NEP and sNEP**

To characterize the *S. pombe* produced proteins in terms of their carbohydrate moieties, NEP as well as intracellular and secreted sNEP were treated with endo F (peptide-*N*-glycosidase F) and the digestion products analyzed by western blotting (Figure a1, lanes 1-6). For comparison, NEP from rabbit kidney was subjected to the same treatment and analysis (Figure a1, lanes 7 and 8). Rabbit NEP migrated with an apparent molecular weight of 95 kDa, whereas heterologous NEP and sNEP migrated as 97 and 93 kDa polypeptides, respectively. Both NEP and sNEP intracellular preparations contained an additional band with slightly higher electrophoretical mobility, most likely corresponding to the ER core-glycosylated forms of these proteins.

Figure a2

Targeting of heterologous NEP in *S. pombe*

Immunofluorescence microscopy was performed on intact cells as described in Materials & Methods, with polyclonal guinea pig anti-NEP antibodies (Boileau *et al.*, 1989). Higher panel cells not expressing NEP; lower panel, or transformed with a plasmid expressing wild type NEP (b). Secondary incubations were done with an anti-guinea pig antibody coupled to the FITC fluorescent marker.

Upon deglycosylation with endo F, both recombinant NEP and the *bona fide* protein purified from rabbit kidney migrated as single bands with apparent MW of 82 kDa. Likewise, deglycosylated sNEP migrated with an apparent mobility of 79 kDa, as previously observed for the recombinant protein produced in other expression systems (Introduction). These results confirm that glycosylation of proteins in *S. pombe* is very similar to that occurring in cells of higher eukaryotes (Kukuruzinska & *al.*, 1987).

### **Catalytic properties of heterologous NEP**

To further characterize the NEP and sNEP produced in *S. pombe*, we assessed their kinetic parameters. The results of the Michaelis-Menten kinetic analysis and IC<sub>50</sub> inhibition curves are summarized in Table a1. Although the *S. pombe*-produced enzymes were not highly purified, they displayed catalytic ( $k_{cat}$ ) and Michaelis ( $K_m$ , affinity) constants comparable to previously published values for the enzymes isolated from *bona fide* sources or produced in animal-cell expression systems. NEP produced in *S. pombe* has a catalytic constant of 460 min<sup>-1</sup> and the  $k_{cat}$  of that purified from rabbit kidney is 573 min<sup>-1</sup>. The  $k_{cat}$  of *S. pombe*-produced sNEP is 240 min<sup>-1</sup>, which is very similar to that of the enzyme purified from the baculovirus expression system (508 min<sup>-1</sup>; Fossiez *et al.*, 1992). Similarly, the  $K_m$  values of 50 μM and 47 μM for *S. pombe* NEP and sNEP were also in agreement with those published by Fossiez (Fossiez & *al.*, 1992) who determined constants of 87 μM and 22 μM for NEP and sNEP, respectively. Finally, the thiorphan specific inhibition curve further established that the catalytic properties of the *S. pombe* heterologous products are comparable to the enzymes from native sources or produced in other expression systems (Table a1).

Table a1

Kinetic parameters of heterologous NEP and sNEP.

ProteinSource	$K_m$	$K_{cat}$ ( $\mu.M$ )	$IC_{50}$ ( $min^{-1}$ )	(nM)
NEP	<i>S.pombe</i>	50	460	29
sNEP	<i>S.pombe</i>	47	240	34
sNEP*	<i>Sf9</i>	22	508	4.7
NEP*	<i>Rabbit</i>	87	573	2.1

\* : Fossiez, F. et al., Biochem. J., 284 (53-9) 1992

$K_m$  and  $k_{cat}$  were determined with the D-Ala<sup>2</sup>-Enkephalin natural substrate on unpurified proteins from total cell extracts (for the wild type NEP) or concentrated supernatant (for sNEP). The  $IC_{50}$  values were determined for the specific NEP inhibitor thiorphan. Catalytic reactions were performed at 37°C in MES buffer.

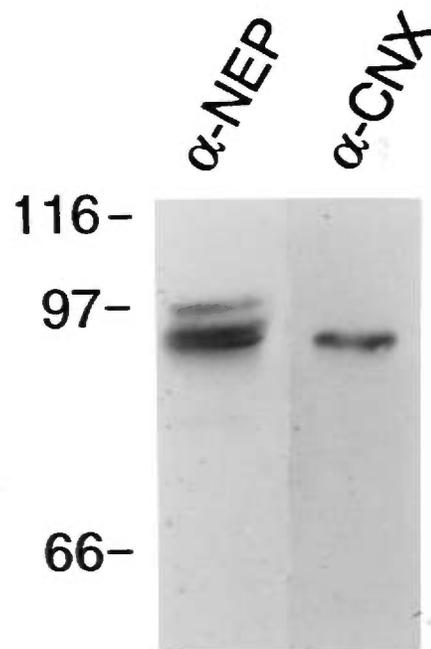
Litterature values come from purified proteins (Fossiez & al., 1992).

### **Interaction of heterologous NEP and sNEP with the ER molecular chaperones BiP and calnexin**

Taken together, the results described above demonstrate that NEP and sNEP produced in *S. pombe* are fully active, strongly suggesting that these heterologous proteins are properly folded. As a first step in the elucidation of the mechanisms of NEP and sNEP folding in the ER, we investigated a possible interaction of these proteins with the chaperone calnexin. To this end, extracts from NEP-producing *S. pombe* cells were immunoprecipitated with polyclonal guinea pig anti-NEP or rabbit anti-calnexin (Cnx1p) antibodies. Following which, immunoprecipitated NEP was detected by western blot analysis with anti-NEP antibodies. As it is possible to see from Figure a3, anti-NEP antibodies immunoprecipitated two groups of NEP species; a faster moving group corresponding to the ER partially/non-glycosylated forms and a larger one representing the mature, post ER fully-glycosylated form of NEP. Anti-Cnx1p precipitation revealed that calnexin does interact with NEP, however, only with the ER form of the latter. As the extract was prepared from entire *S. pombe* cells, these results also prove that the interaction observed with Cnx1p is specific, as it occurs only with the ER form and not with the mature species. Treatments that induce misfolding of nascent polypeptides in the ER, such as exposure to heat shock or to the reducing agent DTT, have been shown to increase the expression and synthesis of chaperones (Kohno & *al.*, 1993; Partaledis & *al.*, 1993). We wanted to see if these different conditions will result in increased interactions between calnexin or BiP and its ligands.

Figure a3

Only the ER form of NEP co-immunoprecipitates with Cnx1p.

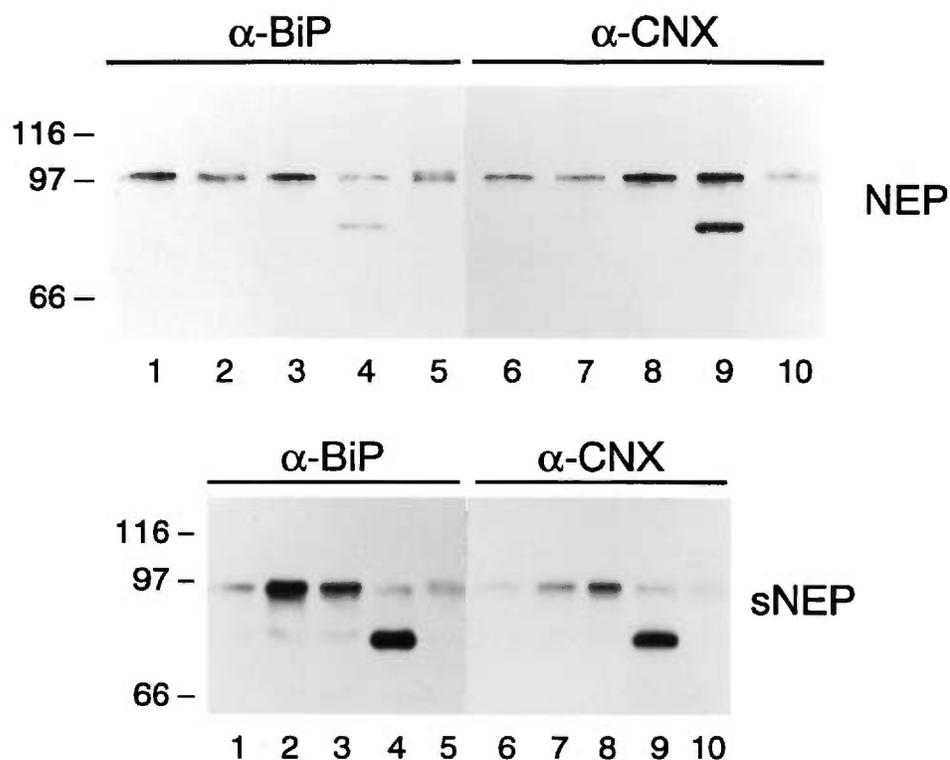


Immunoprecipitations under mild conditions (see Materials & Methods) were carried on extracts of cells producing NEP or sNEP with anti-NEP antibodies ( $\alpha$ -NEP) or anti-Cnx1p antibodies ( $\alpha$ -CNX). Immunoprecipitated material was fractionated on a 10% SDS-PAGE and precipitated NEP or sNEP were detected by western blotting with anti-NEP antibodies. Note that only the fastest moving NEP band, corresponding to its ER form, coprecipitates with Cnx1p.

We therefore explored the interactions of NEP and sNEP with the ER chaperones Cnx1p and BiP under different stress conditions. To this end, *S. pombe* cells expressing NEP or sNEP were exposed to heat shock, or cultured in the presence of either DTT to inhibit disulfide-bond formation, the core-glycosylation inhibitor tunicamycin, or the glucosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin. Total cell lysates were prepared and immunoprecipitations were carried out with anti-Cnx1p or with anti-BiP antibodies, following which immunocomplexes were fractionated on SDS-PAGE and immunoprecipitated NEP and sNEP were visualized by immunoblotting with anti-NEP antibodies. As we have previously observed for *S. pombe* acid phosphatase (Jannatipour *et al.*, submitted), heat shock (Figure a4, lanes 2 and 7), and exposure to DTT (Figure a4, lanes 3 and 8) increased the amount of sNEP associated with Cnx1p and with BiP as compared to the control conditions (Figure a4, lanes 1 and 6). Also as with acid phosphatase, the presence of tunicamycin in the culture medium (Figure a4, lanes 4 and 9), considerably increased the association of Cnx1p and BiP with sNEP. Notice that the inhibition of the glucosidases I and II (with deoxynojirimycin, lanes 5 and 10) has no significant effect of the interaction between sNEP and the molecular chaperones BiP and calnexin. The association between NEP and these molecular chaperones showed no significant increase under the different growth conditions (Figure a4). Thus, it appears that the membrane-bound and the soluble proteins are subjected to different folding mechanisms.

Figure a4

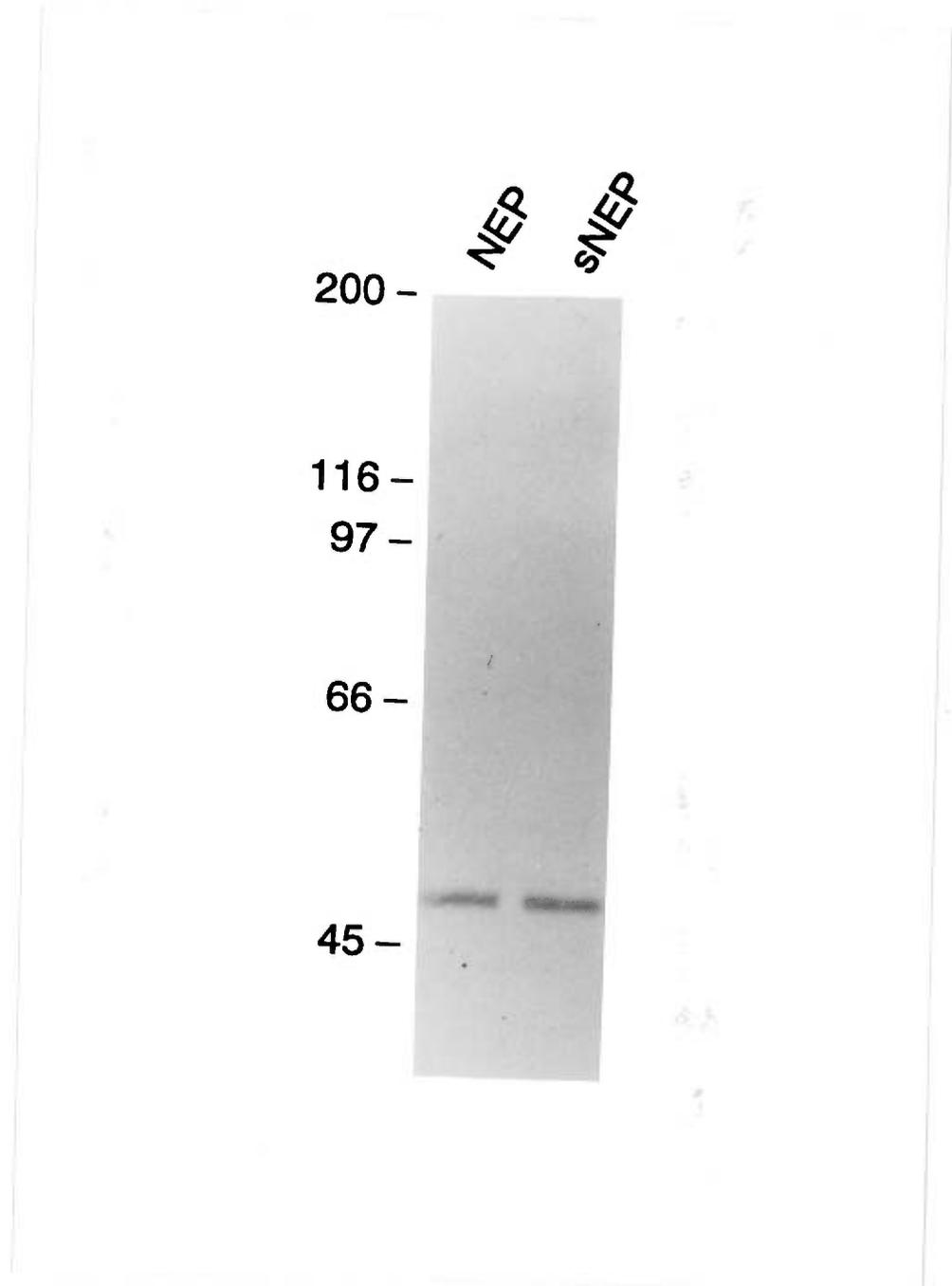
Co-immunoprecipitation of NEP and sNEP with the molecular chaperones BiP and Cnx1p under different stress conditions.



Co-immunoprecipitations were performed on extracts of cells expressing the wild type NEP (upper panel) or the secreted form (sNEP, lower panel) expressed in *S. pombe*. NEP or sNEP were co-immunoprecipitated with rabbit polyclonal anti-BiP antibodies (lanes 1-5) or rabbit anti-Cnx1p (lanes 6-10) antibodies. Cells were subjected to different stress conditions: lanes 1 and 6, control (30°C); lanes 2 and 7, heat shock (39°C); lanes 3 and 8, 10 mM DTT; lanes 4 and 9, 10 mg/mL tunicamycin; lanes 5 and 10, 1 mM deoxynojirimycin. Immunoprecipitated material was fractionated on a 10% SDS-PAGE and precipitated NEP and sNEP were detected by western blotting with anti-NEP antibodies.

Figure a5

Co-immunoprecipitation of NEP and sNEP - control conditions



Co-immunoprecipitations were performed on extracts of cells expressing the wild type NEP (left panel) or the secreted form (sNEP, right panel) expressed in *S. pombe*. Co-immunoprecipitations were performed with rabbit pre-immune serum.

## DISCUSSION

The first objective of this work was to assess whether *S. pombe* could serve as a host for the overproduction of active membrane-bound and secreted enkephalinase (NEP and sNEP, respectively). The characterization of the heterologous proteins demonstrated that indeed the NEP and sNEP synthesized by the fission yeast were correctly targeted and fully active. As judged by the mobility on SDS-PAGE of the mature and endo F-digested NEP and sNEP, the glycosylation pattern of the *S. pombe*-produced proteins was very similar to the pattern of these proteins extracted from animal sources (see Figure a1). These results bring further support to the notion that protein glycosylation in *S. pombe* closely resembles that occurring in higher eukaryotes cells (Armstrong & al., 1993; Chappell & Warren, 1989; Moreno & al., 1985). In contrast, *S. cerevisiae* presents the drawback that secreted proteins are generally hyperglycosylated and their glycans are heterogeneous in size, which in turn may negatively affect the enzymatic activity or the antigenic properties of the overproduced foreign proteins (reviewed in Heslot, H. and Gaillardin, C., 1992). In this respect, it is important to stress that the kinetic parameters  $k_m$ ,  $k_{cat}$  and  $IC_{50}$  observed for the *S. pombe* NEP and sNEP were remarkably comparable to those of the heterologous proteins produced in animal expression systems (see Table a1). Moreover, the *S. pombe*-synthesized proteins were immunologically indistinguishable from NEP and sNEP from animal cells. Thus overall, the

fission yeast appears better suited than *S. cerevisiae* for the heterologous production of higher eukaryotic proteins.

Using shake flasks, *S. pombe* cells secreted 5 mg of sNEP per liter of culture without compromising their viability. Therefore, it can be expected that the production of sNEP in fermentors should reach significantly higher levels. It has been previously observed that both NEP and sNEP from animal cells are inactivated at low pH (data not shown). *S. pombe* cultures in shake flasks reach pH 4 during an overnight incubation period. This resulted in the production of inactive sNEP when the cells were grown in minimal medium. To produce fully active sNEP, HEPES was added to the medium in order to increase its buffering capacity and thereby prevent the acidification of the culture in shake flasks. Certainly, for the large-scale production, fermentors provide the possibility of expressing active heterologous sNEP in a constantly controlled pH medium, at reduced cost. Interestingly, *S. pombe* cells produced functional NEP when cultured in minimum medium without the addition of HEPES, or other buffers. Hence, the membrane attachment of NEP and/or the surrounding environment (e.g. other membrane proteins) may stabilize the activity of this enzyme. Since NEP is active on the surface of *S. pombe* cells, it is conceivable to study mutants and design inhibitor screens using intact cells, without cell lysis or further purification of the enzyme. In addition, the fact that the membrane bound proteins remain accessible to large molecules as antibodies makes it possible the simple and

rapid screening of cells expressing a foreign DNA, by using cytofluorometric procedures (or FACS).

The second objective of this work was to assess whether NEP and sNEP could serve as model proteins to study, in *S. pombe*, the mechanisms involved in protein folding and secretion. The fact that both proteins were correctly targeted and active, strongly indicated that the fission yeast mimics the natural folding, maturation and secretion processes in animal cells, validating therefore the use of *S. pombe* as a surrogate organism. Co-immunoprecipitation studies have revealed that Cnx1p or BiP associate only with the ER forms of NEP and sNEP, confirming thereby that our assay conditions for chaperone-ligand interaction are indeed specific to events taking place in the ER, and not the result of artifacts occurring during or after cell lysis (see Jannatipour *et al.*, unpublished data). The amount of sNEP coprecipitating with Cnx1p and BiP substantially increased when the cells were subjected to stresses such as heat shock and inhibition of disulfide formation (presence of DTT). Mammalian calnexin has been shown to interact with glycoproteins with monoglucosylated oligosaccharide moieties (Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; Hammond & *al.*, 1994; Helenius, 1994). Nevertheless, some reports have described the interaction of calnexin with ligands devoid of *N*-linked glycans, thus occurring through peptide contacts (Kim & Arvan, 1995; Rajagopalam & *al.*, 1994; Wada & *al.*, 1994; Jannatipour & *al.*,

unpublished data). In this respect, Cannon *et al.* (1996), have shown that calnexin binds folding intermediates of unglycosylated proteins in large aggregates. As we have observed previously for acid phosphatase (Pho4p; Jannatipour *et al.*, unpublished data), prevention of glucose trimming with deoxynojirimycin (which inhibits glucosidases I and II), did not significantly reduce the amount of sNEP coprecipitating with Cnx1p. Furthermore, unglycosylated sNEP, resulting from the action of tunicamycin, did coprecipitate with Cnx1p, most likely as part of large protein aggregates formed in the ER when protein glycosylation is inhibited (Cannon *et al.*, 1996; Jannatipour *et al.*, unpublished data). Thus these results bring further support to our proposal that, at least in *S. pombe*, untrimmed or unglycosylated proteins coprecipitate with Cnx1p due to the association of this chaperone with BiP in a functional complex (Jannatipour *et al.*, unpublished data), where this type of ligands probably interact directly with BiP. Interestingly, although NEP coprecipitated with BiP and Cnx1p, the interactions of the membrane-bound protein with the two chaperones were considerably less susceptible, than sNEP, to the stresses to which cells were subjected in this work. Therefore, in spite of the fact that both proteins are practically identical, their distinct "topology" appears to prescribe a more modest role for BiP and Cnx1p, and the involvement of other chaperones, yet to be determined. Consequently, it is tempting to speculate that proteins follow different folding mechanisms, using distinct chaperones, not only due to their particular primary structure but also because of differences in their

topology. The availability of the NEP/sNEP opens the way to explore in detail this possibility.

## FOOTNOTES

\*\* To whom correspondence should be addressed at:  
Département de biochimie  
Université de Montréal  
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville  
Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada  
Phone: (514) 343-6324  
Fax: (514) 343-6069  
e-mail: rokeach@bch.umontreal.ca

This work was supported by research grants from the Medical Research Council of Canada to L.A.R. and P.C. and Faculté de Médecine, Université de Montréal to L.A.R.

**Abbreviations used are:** ANP, atrial natriuretic peptide; DTT, dithiothreitol; ER, endoplasmic reticulum; NEP, neutral endopeptidase; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis, POMC, pro-opiomelanocortin; PMSF, phenylmethylsulfonyl; sNEP, secreted neutral endopeptidase; TBS, Tris-buffered saline.

**Acknowledgments:** We want to thank Mehrdad Jannatipour and Jean-Claude Labbé for their continuous help; Dr. Pierre Belhumeur for his assistance in immunofluorescence; and the Département de médecine dentaire, Université de Montréal, for allowing the use of the optical microscope.

## REFERENCES

- Armstrong, J., Craighead, M.W., Watson, R., Ponnambalam, S. and Bowden, S. (1993) *Schizosaccharomyces pombe* ypt5: a homologue of the rab5 endosome fusion regulator *Mol. Biol. Cell* 4, 583-592
- Barnes, K., Turner, A. J. and Kenny, A. J. (1992) Membrane localization of endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase A (angiotensine converting enzyme) in the pig brain: a study using subcellular fractionation and electron microscopic immunocytochemistry *J. Neurochem.* 58, 2088-2096
- Basi, G., Schimid, E. and Maundrell, K. (1993) TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility *Gene* 123, 131-136
- Benchetrit, T., Bissery, V., Mormon, J. P., Devault, A., Crine, P. and Roques, B. P. (1988) Primary structure homologies between two zinc metallopeptidases, the neutral endopeptidase 24.11 («enkephalinase») and thermolysin, through clustering analysis *Biochem.* 27, 592-596
- Boileau, G., Crine, P. and Devault A. (1989) Determination of the molecular structure of neutral endopeptidase 24.11 *Cell.Prot.Cont.Mechan.* pp.159-168
- Bowes, M. A. and Kenney, A. J. (1986) Endopeptidase-24.11 in pig lymph nodes: purification and immunocytochemical localization in reticular cells *Biochem. J.* 236, 801-810
- Cannon, K.S., Hebert, D.N. and Helenius, A. (1996) Glycan-dependent and -independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin *J. Biol. Chem.* 271, 14280-14284

- Chappell, T.G. and Warren, G. (1989) A galactosyltransferase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *J. Cell Biol.* 109, 2693-2702
- Chen, W., Helenius, J., Braakman, I. and Helenius, A. (1995) Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (14) 6229-6233
- Chou, P.Y. and Fasman, G.D., (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence *Annu. Rev. Biochem.* 47, 251-276
- Connelly, J. C., Skidgel, R. A., Schulz, W. W., Johnson, A. R. and Erdos, E. G. (1985) Neutral endopeptidase in human neutrophil: cleavage of chemotactic peptide *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 8737-8741
- Corbeil, D., Boileau, G., Lemay, G. and Crine, P. (1992) Expression and polarized apical secretion in MDCK cells of a recombinant soluble form of neutral endopeptidase lacking the cytosolic and transmembrane domains *J. Biol. Chem.* 264, 2798-2801
- Crine, P., LeGrimellec, C., Lemieux, E., Labonté, L., Fortin, S., Blachier, A. and Aubry, M. (1985) The production and characterization of a monoclonal antibody specific of the 94,000 dalton enkephaline-degrading peptidase from rabbit kidney brush border *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131, 255-261
- Danielsen, E. M., Vyas, J. P. and Kenny, A.J. (1980) A neutral endopeptidase in the microvillar membrane of pig intestine - Partial purification and properties *Biochem. J.* 191, 645-648
- Devault, A., Lazure, C., Nault, C., LeMoual, H., Seidah, N., Chrétien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A., Roques, B. P., Crine, P. and Boileau, G. (1987) Amino acid

sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA *EMBO J.* 6, 1317-1322

Fossiez, F., Lemay, G., Labonté, N., Parmentier-Lesage, F., Boileau, G. and Crine, P. (1992) Secretion of a functional soluble form of neutral endopeptidase 24.11 from a baculovirus-infected insect cell line *Biochem. J.* 284, 53-59

Gee, N. S., Bowes, M. A., Buck, P. and Kenny, A. J. (1985) An immunoradiometric assay for endopeptidase 24-11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues *Biochem. J.* 228, 119-126

Hammond, C., Braakman, I. and Helenius, D. (1994) Role of *N*-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 913-917

Helenius, A. (1994) How *N*-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum *Mol. Biol. Cell* 5, 253-265

Heslot, H. and Gaillardin, C. (1992) *Molecular Biology and Genetic Engineering of Yeasts* CRC Press Inc.

Howell, S., Lanctôt, C., Boileau, G. and Crine, P. (1994) Expression of an enzymatically active glycosyl-phosphatidylinositol-anchored form of neutral endopeptidase (E.C. 3.4.24.11) in *cos-1* cells *Biochem. J.* 299, 171-176

Johnson, A. R., Ashton, J., Schulz, W. and Erdos, E. G., (1985) Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells *Am. Rev. Respir. Dis.* 132, 564-568

- Kerr, M. A. and Kenny, A. J. (1974) The molecular weight and properties of a neutral metallo-  
endopeptidase from rabbit kidney brush border *Biochem. J.* 137, 477-488
- Kerr, M. A. and Kenny, A. J. (1974) The purification and specificity of a neutral endopeptidase  
from rabbit kidney brush border *Biochem. J.* 137, 489-495
- Kim, P.S. and Arvan, P. (1995) Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones  
during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum *J. Cell Biol.* 128, 29-38
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M.J. and Mori, K. (1993) The promoter  
region of the yeast *KAR2* (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the  
presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum *Mol. Cell Biol.* 13, 877-890
- Kukurukinska, M.A., Bergh, L.C. and Jackson, B.J. (1987) Protein glycosylation in yeast *Ann.*  
*Rev. Biochem.* 56, 915-944
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the  
bacteriophage T4 *Nature* 227, 680-685
- Lafrance, M.-H., Vézina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P. and Lemay, G. (1994) Role of  
glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-24.11 *Biochem. J.*  
302, 451-454
- Lanctôt, C., Fournier, H., Howell, S., Boileau, G. and Crine, P. (1995) Direct targeting of  
neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) to the apical cell surface of transfected LLC-PK1  
cells and unpolarized secretion of its soluble form *Biochem. J.* 305, 165-171
- Lemay, G., Waksman, G., Roques, B. P., Crine, P. and Boileau, G. (1989) Fusion of a  
cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11)

results in the secretion of an active enzyme in COS-1 cells *J. Biol. Chem.* 264, 15620-15623

LeMoual, H., Devault, A., Roques, B.P., Crine, P. and Boileau, G. (1991) Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in the endopeptidase-24.11 *J. Biol. Chem.* 266, 15670-15674

Malfroy, B., Swertz, A., Guyon, A., Roques, B. P. and Schwartz, J. C. (1978) High-affinity enkephalin-degrading peptidase in mouse brain and its enhanced activity following morphine *Nature* 276, 523-524

Marcil, J. and Anand-Srivastava, M. B., (1995) Defective ANF-R2/ANP-C receptor-mediated signalling in hypertension *Mol. Cell. Biochem.* 149-150, 223-231

Matsas, R., Fulcher, I. S., Kenny, A. J. and Turner, A. J. (1983) Substance P and Leu-enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3111-3115

Maudrell, K. (1990) *nmt1* of Fission Yeast *Journ. Biol. Chem.* 265, 10857-10864

Maudrell, K. (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast *Gene* 123, 127-130

Moreno, S., Ruiz, T., Sanchez, Y., Villanueva, J.R. and Rodriguez, L. (1985) Subcellular localization and glycoprotein nature of the invertase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *Arch. Microbiol.* 14, 370-374

Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *Meth. Enzymol.* 194, 795-823

Partaledis, J.A. and Berlin, V. (1993) The *FKB2* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding the immunosuppressant-binding protein FKBP-13, is regulated in response to accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5450-5454

Pidoux, A.L. and Armstrong, J. (1993) The BiP protein and the endoplasmic reticulum of *schizosaccharomyces pombe*: fate of the nuclear envelope during cell division *J. Cell Sci.* 105, 1115-1120

Rajagopalan, S., Xu, Y. and Brenner, M.B. (1994) Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin *Science* 263, 387-390

Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review *Yeast* 8, 423-488

Roques, B. P., Fournié-Zaluski, M. C., Soroca, E., Lecompte, J. M., Malfroy, B., Llorens, C. and Schwartz, J. C. (1980) The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice *Nature* 288, 286-289

Roques, B. P., Noble, F., Crine, P. and Fournié-Zaluski, M.-C. (1995) Inhibitors of Neprilysin: design, pharmacological and clinical applications *Meth. Enzym.* 248, 263-283

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

- Seymour, A. A., Abboa-Offei, B. E., Smith, P. L., Mathers, P. D., Asaad, M. M. and Rogers, W. L. (1995) Potentiation of natriuretic peptides by neutral endopeptidase inhibitors *Clin. Exp. Pharm. Phys.* 22, 63-69
- Wada, I., Ou, W.J., Liu, M.C. and Scheele, G. (1994) Chaperone function of calnexin for the folding intermediate of gp80, the major secretory protein in MDCK cells *J. Biol. Chem.* 269, 7464-7472
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. and Roques, B. P. (1986) Neuronal localization of the neutral endopeptidase « enkephalinase » in rat brain revealed by lesions and autoradiographie *EMBO J.* 5, 3163-3166
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. and Roques, B. P. (1987) Neutral endopeptidase 24.11 mu and delta opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study *Brain Res.* 436, 205-216

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Le projet de recherche *Expression de l'Endopeptidase Neutre dans la levure Schizosaccharomyces pombe et étude de son interaction avec les chaperones du réticulum endoplasmique* présente deux intérêts majeurs. D'abord, l'expression de l'Endopeptidase Neutre (NEP E.C.3.4.24.11) et de sa forme soluble (sNEP) dans la levure *S. pombe* fournit un système de production protéique efficace et non toxique pour les cellules transformées. Nous avons montré que les cellules produisent plus de 5 mg/litre de protéines. De plus, l'enzyme de *S. pombe* a la même activité et sensibilité aux inhibiteurs que l'enzyme produite dans des systèmes animaux. Enfin, l'expression de la NEP et la sNEP dans *S. pombe* a démontré que ce système d'expression hétérologue devient un excellent modèle pour l'étude des interactions entre les chaperones moléculaires du réticulum endoplasmique et des protéines en repliement.

### **EXPRESSION HÉTÉROLOGUE DE LA NEP**

L'expression de la NEP et la sNEP dans la levure *S. pombe* fut d'abord confirmée par SDS-PAGE et *western blot* sur des extraits cellulaires exprimant l'une ou l'autre des protéines (Figure a1, p.44). Afin de comparer l'état de glycosylation des produits hétérologues, nous avons procédé à des études de déglycosylation (Figure a1, pistes impaires, p.44). Nous avons ainsi confirmé que la glycosylation des NEP et sNEP dans *S. pombe* était tout à fait comparable à celle retrouvée dans le rein de lapin.

TABLEAU II

Migration électrophorétique sur gel dénaturant (*SDS-PAGE*)

Protéine	Poids moléculaire apparent	Poids moléculaire apparent déglycosylé
NEP <i>S. pombe</i>	97 kDa	82 kDa
sNEP <i>S. pombe</i>	93 kDa	79 kDa
NEP <i>lapin</i>	95 kDa	82 kDa

Cette similitude dans la glycosylation entre les systèmes cellulaires de mammifère et chez *S. pombe* fait de *S. pombe* un excellent candidat pour l'expression hétérologue puisque les protéines produites seront suffisamment et correctement glycosylées. D'autres systèmes d'expression hétérologue n'offrent pas cet avantage, notamment celui de cellules Sf9 infectées par baculovirus où la glycosylation y est sensiblement différente. Dans le système de cellules Sf9, le patron de glycosylation en est un riche en mannose, et quantitativement moins important que celui de l'enzyme produite chez le lapin (Fossiez et al., 1992). Il est à noter aussi que la sNEP et la NEP n'ont pas subi d'hyperglycosylation, problème pouvant être rencontré lors d'expression hétérologue chez la levure (voir Introduction).

Cette première observation sur l'état de glycosylation des NEP et sNEP était importante puisque le bon repliement, le ciblage et l'activité enzymatique de la NEP sont influencés par la glycosylation (Lafrance et al., 1994).

## **CIBLAGE CELLULAIRE DE LA NEP**

Sachant que les vecteurs d'expression pour NEP et sNEP sont fonctionnels, la deuxième étape consiste à vérifier si le ciblage cellulaire dans la levure *S. pombe* se fait correctement. Nous avons donc voulu déterminer si la NEP se retrouve à la surface cellulaire et si la sNEP est sécrétée dans le surnageant. Le bon ciblage de la sNEP fut rapidement confirmé par des *western blots* d'extraits de surnageant (Figure a1, piste 4). Pour la NEP, nous avons d'abord confirmé que cette glycoprotéine de type II était bien transmembranaire, et ensuite que son ectodomaine se retrouvait exposé à la surface cellulaire.

Nous avons donc procédé à des tests d'activité catalytique "qualitatifs" réalisés sur des cellules entières et à des expériences d'immunohistochimie.

*i) activité catalytique.* En partant du principe que la NEP est bien localisée dans la membrane cellulaire, son ectodomaine doit alors être disponible à la surface de la cellule pour hydrolyser un substrat situé dans le milieu. Des tests d'activité ont donc été réalisés sur des cellules entières. Ces résultats ont clairement démontré que seules les cellules exprimant la NEP pouvaient hydrolyser un substrat extracellulaire (le [tyrosil-(3,5-<sup>3</sup>H)](D-Ala<sup>2</sup>)-Leu-Enkephaline) et qu'aussi, cette activité catalytique pouvait être inhibée par la présence d'un inhibiteur (le thiorphan) spécifique à la NEP (résultats non montrés dans l'article).

*ii) immunohistochimie.* Des études d'immunofluorescence sur des cellules non-perméabilisées exprimant la NEP ont aussi été réalisées. Les signaux obtenus ont clairement démontré que la NEP était bien ciblée à la

surface de celles-ci, avec leur ectodomaine extra-cellulaire accessible aux anticorps (Figure a2, p.47).

### **CARACTÉRISATION CINÉTIQUE DE LA NEP**

Des études de cinétique ont été réalisées sur des extraits cellulaires et sur des surnageants concentrés et partiellement purifiés afin de s'assurer que les NEP et sNEP produites conservent toute leur activité catalytique. Les valeurs des paramètres  $K_m$ ,  $IC_{50}$  et  $k_{cat}$  ont été comparées à celles du système de surexpression dans des cellules d'insectes *Sf9* infectées par un baculovirus recombinant (Tableau III). Ces comparaisons ont permis de conclure que, même sans être purifiées, la NEP et la sNEP demeurent tout aussi actives dans les deux systèmes d'expression. La purification des NEP et sNEP hétérologues permettrait certainement d'observer des valeurs cinétiques différentes puisque certaines impuretés peuvent venir interagir sur les protéines et en changer l'affinité et l'activité. Toutefois, les paramètres cinétiques observés concordent suffisamment avec la littérature pour conclure que NEP et sNEP conservent chez *S. pombe* toute leur activité. Comme les protéines produites chez *S. pombe* ont des paramètres d'activité très semblables à celles des cellules animales, on peut en déduire qu'elles acquièrent leur bonne conformation tridimensionnelle.

Il est connu qu'en phase exponentielle, le métabolisme cellulaire de *S. pombe* acidifie considérablement son milieu et celui-ci peut atteindre un pH de moins de 4, en moins d'une journée. Cette particularité peut avoir des répercussions sur l'activité catalytique de certaines protéines sécrétées. En effet, nous avons remarqué que bien que l'on retrouve une activité

catalytique spécifique dans les extraits de cellules exprimant la sNEP, aucune activité catalytique n'était présente dans le surnageant. C'est que dans le cas de la sNEP, la baisse du pH conduit à une inactivation irréversible de la protéine. Nous proposons deux solutions à cette difficulté. Premièrement, l'ajout d'un tampon fort et inerte (comme l'HEPES, par exemple) peut venir ralentir et stabiliser cette baisse drastique du pH prévenant ainsi la perte d'activité catalytique. C'est cette première solution que nous avons adoptée dans notre travail expérimental. Deuxièmement - et c'est cette solution que nous proposons pour d'éventuelles applications industrielles du système de levure - l'utilisation d'un chemostat (dans un fermenteur, par exemple) s'avérerait une solution efficace à la baisse de pH du surnageant.

Le tableau III compare les rendements de production de la sNEP dans différents systèmes d'expressions ou différentes conditions de croissance. Selon le moyen utilisé pour tamponner le pH du milieu, le système d'expression *S. pombe* peut obtenir un excellent rendement.

**Tableau III**

Rendement de systèmes d'expression hétérologue

Système	Coût (\$/L)	Quantité (mg/L)	Rendement (\$/mg)
<i>Sf9</i>	70	15	5, <sup>00</sup> *
Chenille	49	84	0, <sup>60</sup> *
<i>S.pombe</i> (tampon HEPES)	7	5	1, <sup>60</sup>
(fermenteur indust.)	-	-	0, <sup>20</sup> **

\* Source: Gonneville, Lucie, 1997

\*\* Évaluation où le coût de l'HEPES est soustrait

Ces premiers résultats nous amènent donc au premier des deux volets du projet de recherche. La surproduction d'une protéine chez *S. pombe* est tout à fait réalisable et avantageuse. Tout comme dans les systèmes cellulaires de mammifères, le produit hétérologue est glycosylé et bien ciblé, correctement replié et actif. De plus, les coûts de production du système de la levure sont minimales. Il est possible d'obtenir dans les conditions normales de croissance (milieu minimal, incubateur-"shaker" à 30°C) près de 5 mg/L. Le système *S. pombe* concilie facilité de manipulation (sous-clonage rapide, promoteur inductible, expression stable, surproduction de protéines, ...) et souplesse des études possibles (immunohistochimie, test d'activité enzymatique de suspension de cellule, ...). Il sera intéressant aussi d'étudier d'autres systèmes d'expression de la levure potentiellement plus performants, tel *P. Pastoris*. Des travaux d'expression hétérologue de la sNEP dans cet organisme sont présentement en cours dans le laboratoire du Dr Crine (Ellefson, 1998).

### **ÉTUDES D'INTERACTIONS AVEC LES CHAPERONES**

Le deuxième volet du projet de recherche consiste en l'étude du repliement de la NEP et de la sNEP via les chaperones moléculaires du réticulum endoplasmique. L'étude des interactions entre protéines et chaperones est limitée aux deux chaperones clonées et caractérisées chez *S. pombe* et pour lesquelles des anticorps sont disponibles, BiP et calnexine.

Les dernières expériences suggèrent très fortement que la NEP et la sNEP adoptent une conformation tridimensionnelle adéquate. En effet, les protéines sont en mesure de satisfaire les exigences du système de contrôle de la qualité du réticulum endoplasmique et peuvent le quitter; elles sont

alors correctement ciblées dans la voie de sécrétion, et conservent toute leur activité enzymatique.

Pour tenter d'explorer davantage le mécanisme de repliement de la NEP et de la sNEP dans le réticulum endoplasmique, nous avons procédé à des études de co-immunoprécipitation. Ces études nous ont permis de vérifier que les chaperones BiP et calnexine participent à la maturation structurale de ces protéines. Nous avons montré que les deux chaperones, BiP et calnexine, interagissent avec des intermédiaires de repliement de la NEP et de la sNEP (Figure a4, p.53).

Un *western blot* d'extraits cellulaires de *S. pombe* révèle deux groupes de bandes qui correspondent à des structures intermédiaires de la NEP ou de la sNEP (Figure a1, pistes 2 et 6). L'une des bandes, de plus grand poids moléculaire apparent, correspond à la protéine complètement repliée et reglycosylée (après le passage dans le Golgi) dans la voie de sécrétion. L'autre bande (ou groupe de bandes), de plus petit poids moléculaires apparents, suggère la présence d'intermédiaires de repliement partiellement glycosylés, gardés captifs dans le réticulum endoplasmique par les chaperones moléculaires. Cette suggestion semble se confirmer lorsqu'on réalise des immunoprécipitations d'extraits cellulaires à l'aide d'anticorps dirigés contre la NEP ou la sNEP ou d'anticorps dirigés contre les chaperones BiP ou calnexine (Figure a3, p.51). En effet, des deux bandes décrites plus haut, une seule peut être détectée suite à des immunoprécipitations avec un sérum anti-calnexine ou anti-BiP, indiquant que les chaperones n'ont d'affinité que pour une seule des deux structures, celle correspondant aux intermédiaires partiellement glycosylés.

Non seulement ces dernières observations permettent de conclure à la grande spécificité des expériences de co-immunoprécipitations, mais aussi, il s'agit du premier indice démontrant l'utilité du système *S. pombe* pour étudier le mécanisme de repliement des protéines. En effet, ce système permet de détecter et de différencier des intermédiaires de repliement, ce qui pourrait faciliter d'éventuelles études d'interactions entre chaperones et protéines en repliement.

Sachant déjà que les NEP et sNEP interagissent avec les chaperones BiP et calnexine, on a voulu étudier ces interactions dans différentes conditions de croissance cellulaire: soit une condition contrôle (Figure a4, pistes 1 et 6); au cours d'un "choc thermique" (pistes 2 et 7); en présence de l'agent réducteur DTT (pistes 3 et 8); en présence de l'inhibiteur de la glycosylation tunicamycine (pistes 4 et 9); et en présence de l'inhibiteur de la déglucosylation déoxynojoymicine (pistes 5 et 10). Ces différentes conditions de croissance devraient permettre de connaître l'influence de l'état de glycosylation sur les interactions chaperone-protéine, ainsi que l'impact de certaines conditions de stress sur celles-ci.

La première observation importante faite au cours de ces expériences est que les interactions de la NEP et de la sNEP avec BiP et calnexine ne répondent pas de la même façon aux différentes conditions de croissance des cellules en culture. Ces observations suggèrent fortement que les mécanismes de repliement d'une protéine membranaire diffèrent de ceux d'une protéine soluble et sécrétée. Pour la NEP, par exemple, la quantité de protéines que l'on retrouve associée aux chaperones BiP ou calnexine demeure sensiblement la même d'une condition de croissance à l'autre (Figure a4, panneau du haut). Par contre, pour ce qui est de la forme

sécritée, la sNEP, ces variations de conditions de croissance ont un effet important sur les interactions entre chaperone et protéine (Figure a4, panneau du bas).

Cette observation suggère qu'à l'intérieur du réticulum endoplasmique, d'autres composantes importantes de la machinerie de repliement viennent aider la NEP et la sNEP dans leur maturation structurale. Toutefois, la réorganisation entre BiP, calnexine et les autres chaperones lors de conditions défavorables au repliement n'est pas la même selon que la protéine est membranaire ou sécrétée. On peut aussi suggérer que le repliement d'une protéine membranaire demeure stable et inchangé, malgré les variations de conditions de croissance, en raison d'un avantage que procurerait une attache avec la membrane.

Une autre observation importante est l'état de glycosylation des protéines qui interagissent avec la chaperone calnexine. En effet, certains groupes de recherche proposent que la calnexine reconnaît exclusivement les glycoprotéines, et plus particulièrement, les protéines monoglucosylées (Williams, 1995, Chen et *al.*, 1995). D'autres expériences, utilisant par exemple l'inhibiteur de la glycosylation tunicamycine, ont toutefois démontré une association entre calnexine et des protéines non-glycosylées.

Une association entre la chaperone calnexine et les NEP ou sNEP en repliement est observée même lorsque les protéines sont non-glycosylées (Figure a4, pistes 4 et 9) ou sont des glycoprotéines avec des glucoses terminaux (Figure a4, pistes 5 et 10). En combinant ces observations avec d'autres résultats de travaux de recherche (notamment, travaux de M. Jannatipour de l'équipe du docteur Rokeach sur les interactions entre

calnexine et phosphatase acide), il devient possible de conclure que la calnexine peut reconnaître son substrat selon deux voies: *i)* d'une façon "oligosaccharide-dépendante", par la reconnaissance d'un patron de glucosylation bien précis; et *ii)* d'une façon plus classique chez les chaperones moléculaires, par la reconnaissance de portions hydrophobes encore non-repliées.

### **PERSPECTIVES DE RECHERCHE**

**SURPRODUCTION DE PROTÉINES.** L'expression d'une protéine hétérologue dans le système de la levure *Schizosaccharomyces pombe* permet d'obtenir simplement et de façon peu coûteuse d'importantes quantités de protéines. L'utilisation de ce système d'expression est donc prometteuse. D'ailleurs, un système commercialisé de production de protéines hétérologues dans *S. pombe* est maintenant disponible (*ESP™system*, de Stratagene). Un autre avantage du système d'expression chez *S. pombe* est apparu lors des expériences d'immunofluorescence. En effet, les ectodomains des glycoprotéines membranaires ciblées à la surface cellulaire demeurent accessibles aux anticorps, et il devient alors envisageable d'utiliser des techniques d'immunohistochimie qui permettent le tri cellulaire selon l'importance de l'expression (comme le *FACS*, par exemple). Les tests d'activité enzymatique effectués directement sur des suspensions de cellules permettent aussi d'envisager d'autres utilisations potentielles de la levure *S. pombe* pour des expériences de criblage, d'inhibition *in situ*, d'activité enzymatique, etc. Les résultats positifs obtenus avec *S. pombe* ouvrent aussi la voie à l'étude et l'utilisation potentielle

d'autres systèmes de levure qui pourraient s'avérer avantageux pour différentes applications. Finalement, rappelons que l'utilisation d'un fermenteur permettra la surproduction protéique de façon industrielle.

*sNEP, ÉTUDES STRUCTURALES ET INHIBITEURS.* La surproduction de la sNEP dans un système économique et productif facilite et élargit le champ des études structurales de l'endopeptidase neutre par les techniques de cristallographie. Pour la formation des cristaux, d'importantes quantités de protéines pures sont nécessaires. Un système cellulaire efficace qui permet une purification rapide est donc très avantageux. Ultimement, les études structurales sur l'endopeptidase neutre permettront le *design* de nouveaux inhibiteurs de la NEP à potentiel thérapeutique.

*ÉTUDE DES CHAPERONES MOLÉCULAIRES.* L'efficacité du système de levure *S. pombe* comme modèle pour l'étude d'interactions entre chaperones et protéines en repliement ouvre la voie à de futures investigations et activités de recherche. Le ciblage cellulaire et l'activité enzymatique des protéines sont maintenus. On peut donc suggérer que le repliement des protéines se déroule adéquatement. Le système de *S. pombe* semble donc tout aussi approprié pour réaliser des études sur les mécanismes cellulaires fondamentaux, comme le repliement des protéines. Les deux glycoprotéines hétérologues étudiées ici (la NEP et la sNEP) sont d'ailleurs d'excellentes candidates pour ces études. En effet, il devient possible, par la simple comparaison des interactions observées entre chaperones-NEP ou chaperones-sNEP, d'élucider les différences des mécanismes sous-jacents au repliement de protéines, qu'elles soient membranaires ou sécrétées. Aussi, les cellules *S. pombe* se prêtent très bien à de nombreuses conditions de cultures cellulaires, offrant ainsi

beaucoup de latitude pour d'éventuels projets de recherche. De plus, l'importante quantité d'études sur la NEP et les nombreux mutants disponibles (glycosylation, ponts S-S, ...) au sein du laboratoire du docteur Crine permettront certainement d'étudier les éléments de la structure primaire importants pour une association avec des chaperones données. Finalement, le développement de mutants (glycosylation, phosphorylation, sécrétée, ...) pour la chaperone calnexine est actuellement en cours dans le laboratoire du docteur Rokeach. De tels mutants permettront d'investiguer les éléments importants de la structure primaire de cette chaperone pour la reconnaissance de son substrat, une protéine en repliement. <

## RÉFÉRENCES

- Almenoff, J. et Orłowski, M. (1983) Membrane-bound kidney neutral metalloendopeptidase: interaction with synthetic substrates, natural peptides, and inhibitors *Biochemistry* 22, 590-599
- Anfinsen, C.B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains *Science* 181(96), 223-230
- Baneyx, F. (1994) Chaperonins and protein folding *Ann. NY Acad. Sci.* 745, 383-394
- Barnes, H.J., Arlotto, M.P. et Waterman, M.R. (1991) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88, 5597-5601
- Bateman, R.C., Jackson, D.Jr., Slaughter, C.A., Unnithan, S., Chai, Y., Moomaw, C. et Herch, L.B. (1989) Identification of the active site origin in rat neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) as Arg 102 and analysis of a glutamine 102 mutant *J.Biol.Chem.* 264, 6151-6157
- Beaumont, A., Barbe, B., LeMoual, H., Boileau, G., Crine, P., Fournié-Zaluski, M.-C. et Roques, B.P. (1992) Charge polarity reversal inverses the specificity of neutral endopeptidase-24.11 *J.Biol.Chem.* 267, 2138-2141
- Beaumont, A., LeMoual, H., Boileau, G., Crine, P. et Roques, B.P. (1991) Evidence that both arginine 102 and arginine 747 are involved in substrate binding to neutral endopeptidase (E.C.3.4.24.11) *J.Biol.Chem.* 266, 214-220
- Benchetrit, T., Bissery, V., Mornon, J. P., Devault, A., Crine, P. et Roques, B. P. (1988) Primary structure homologies between two zinc metallopeptidases, the neutral

endopeptidase 24.11 («enkephalinase») and thermolysin, through clustering analysis  
*Biochem. 27*, 592-596

Benuck, M. et Marcks, N. (1980) Characterization of a distinct membrane bound dipeptidyl carboxypeptidase inactivating enkephalin in brain *Biochem Biophys Res Commun* 95, 822-828

Bergman, J.F., Chaussade, S., Couturier, D., Baumer, P., Schwartz, J.C. et Lecomte, J.M. (1992) Effects of acetorphan, an antidiarrhoeal enkephalinase inhibitor, on or-caecal and colonic transit times in healthy volunteers *Aliment.Pharmacol.Ther.* 6, 305-313

Boileau, G., Crine, Philippe et Devault, Alain (1989) Determination of the molecular Structure of Neutral endopeptidase 24.11 (Enkephalinase) *Cellular Proteases and Control Mechanisms*, Alan R. Liss, Inc., pp. 159-168

Blount, P. et Merlie, J.P. (1991) Characterization of an adult muscle acetylcholine receptor subunit by expression in fibroblasts *J. Cell Biol.* 113, 1125-1132

Bourgoin, S., Le Bars, D., Artaud, F., Clot, A.M., Bouboutou, R., Fournié-Zaluski, M.-C., Roques, B.P., Hamon, M. et Cesselin, F. (1986) *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 238, 360-366

Bowes, M. A. et Kenney, A. J. (1986) Endopeptidase-24.11 in pig lymph nodes: purification and immunocytochemical localization in reticular cells *Biochem. J.* 236, 801-810

Butter, T.D. et Hughes, R.C. (1981) *Biochim.Biophys.Acta* 640, 655-686

Checler, F., Emson, P.C., Vincent, J.P. et Kipabgi, P. (1984) Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes. Cleavage at the Pro10-Tyr11 bond by endopeptidase 24.11

(enkephalinase) and a peptidase different from proline-endopeptidase *J. Neurochem.* 43, 1295-1301

- Chen, W., Helenius, J., Braakman, I. et Helenius, A. (1995) Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (14) 6229-6233
- Chou, P.Y. et Fasman, G.D., (1978) Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence *Annu. Rev. Biochem.* 47, 251-276
- Christianson, D.W. et Lipscomb, W.N. (1985) Binding of a possible transition state analogue to the active site of carboxypeptidase A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6840-6844
- Connelly, J. C., Skidgel, R. A., Schulz, W. W., Johnson, A. R. et Erdos, E. G. (1985) Neutral endopeptidase in human neutrophil: cleavage of chemotactic peptide *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 8737-8741
- Corvol, P., Jeunemaitre, X., Charru, A., Kotelevtsev, Y. et Soubrier, F. (1995) Role of the renin-angiotensin system in blood pressure regulation and in human hypertension: new insights from molecular genetics *Rec. Prog. Horm. Research* 50, 287-308
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S. et Raschke, W.C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11, 905-910
- Crine, P. (1997) Endopeptidase -24.11 *Cell-Surface Peptidases* BIOS Scientific Publishers, Oxford, Chap. 6 (*sous presse*).
- Danielsen, E. M., Vyas, J. P. et Kenny, A.J. (1980) A neutral endopeptidase in the microvillar membrane of pig intestine. Partial purification and properties *Biochem. J.* 191, 645-648

- David, V., Hochstenbach, F., Rajagopalan, S. et Brenner, M.B. (1993) Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein IP90 (calnexin) *J. Biol. Chem.* 268, 9585-9592
- De Virgilio, C., Burckert, N., Neuhaus, J.M., Boller, T. et Wiemken, A. (1993) CNE1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the genes encoding mammalian calnexin and calreticulin *Yeast* 9, 185-188
- Degen, E. et Williams, D.B. (1991) Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules *J. Cell Biol.* 112, 1099-1115
- Devault, A., Lazure, C., Nault, C., LeMoual, H., Seidah, N., Chrétien, M., Kahn, P., Powell, J., Mallet, J., Beaumont, A., Roques, B. P., Crine, P. et Boileau, G. (1987) Amino acid sequence of rabbit kidney neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) deduced from a complementary DNA *EMBO J.* 6, 1317-1322
- Devault, A., Sales, N., Nault, C., Beaumont, A., Roques, B.P., Crine, P. et Boileau, G. (1988) Exploration of the catalytic site of endopeptidase 24-11 by site-directed mutagenesis. Histidine residues 583 and 587 are essential for catalysis *FEBS Lett.* 231, 54-58
- Dion, N., LeMoual, H., Crine, P. et Boileau, G. (1993) Kinetic evidence that His 711 of neutral endopeptidase 24.11 is involved in stabilization of the transition state *FEBS Lett.* 318, 301-304
- Domingo, D.L. et Trowbridge, I.S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 13386-13392
- Dussaule, J.C. (1994) Connaissances actuelles sur le facteur auriculaire natriurétique *Rev. Prat.* 44, 505-513

- Dusser, D.J., Jacoby, D.B., Djokic, T.D., Rubinstein, I., Borson, D.B. et Nadel, J.A. (1989) Virus induces airway hyperresponsiveness to tachykinins: role of neutral endopeptidase  
*J.Appl.Physiol.* 67, 1504-1511
- Erdos, E.G. et Skidgel, R.A. (1989) Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones *FASEB J.* 3, 145-151
- Evans, G.L, Ni, B., Hrycyna, C.A., Chen, D., Ambudkar, S.V., Pastan, I., Germann, U.A. et Gottesman, M.M. (1995) Heterologous expression systems for P-glycoprotein: *E.coli*, Yeast, and Baculovirus *J.Bioenerg.Biomembran.* 27, 43-52
- Fagny, C., Michel, A., Leonard, I., Berkenboom, G., Fontaine, J. et Deschodt-Lanckman, M. (1991) In vitro degradation of endothelin-1 by endopeptidase 24.11 (enkephalinase)  
*Peptides* 12, 773-778
- Fiermonte, G., Walker, J.E. et Palmieri, F. (1993) *Biochem.J.* 294, 293-299
- Fossiez, F., Lemay, G., Labonté, N., Parmentier-Lesage, F., Boileau, G. et Crine, P. (1992) Secretion of a fonctional soluble form of neutral endopeptidase 24.11 from a baculovirus-infected insect cell line *Biochem. J.* 284, 53-59
- Fernandez, F., Jannatipour, M., Hellman, U., Rokeach, L.A. et Parodi, A.J. (1996) A new stress protein: synthesis of *Schizosaccharomyces pombe* UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase mRNA is induced by stress conditions but the enzyme is not essential for cell viability *EMBO J.* 15, 705-713
- Flynn, G.C., Chappell, T.G. et Rothman, J.E. (1989) Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly *Science* 245, 385-390

- Fournié-Zaluski, M.-C., Chaillet, P., Bouboutou, R., Coulaud, A., Chérot, P., Waksman, G., Constantin, J. et Roques, B.P. (1984) Analgesic effects of kelatorphan, a new highly potent inhibitor of multiple enkephaline degrading enzymes *Eur.J.Pharmacol.* 102, 525-528
- Gafford, J.T., Skidel, R.A., Erdos, E.G. et Hersh, L.B. (1982) Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides *Biochemistry* 22, 3265-3271
- Gee, N. S., Bowes, M. A., Buck, P. et Kenny, A. J. (1985) An immunoradiometric assay for endopeptidase 24-11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues *Biochem. J.* 228, 119-126
- Gething, M.J. et Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell *Nature* 355, 33-45
- Gonneville, L. (1997) *Données non-publiées communiquées verbalement.*
- Goeddel, D.V. (1991) Gene expression technology *Academic Press Inc.* 682p.
- Haas, I.G. (1994) BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum *Experientia* 50(11-12), 1012-1020
- Haas, I.G. et Wabl, M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein *Nature* 306, 387-389
- Hammond, C. et Helenius, D. (1993) A chaperone with a sweet tooth *Current Biology* 3, 884-886

- Hammond, C., Braakman, I. et Helenius, D. (1994) Role of *N*-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 913-917
- Hebert, D.N., Foellmer, B. et Helenius, A. (1995) Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum *Cell* 81, 425-433
- Hersh, L.B. (1984) Reaction of opioid peptides with neutral endopeptidase ("enkephalinase") *J. Neurochem.* 43, 487-493
- Hinnen, A., Buxton, F., Chaudhuri, B., Heim, J., Hottiger, T., Meyhack, B. et Pohlig, G. (1992) *Gene expression in recombinant microorganisms*, Chap.3, Marcel Dekker Inc.
- Holmes, M.A. et Matthews, B.W. (1982) Structure of thermolysin refined at 1.6Å resolution *J. Mol. Biol.* 160, 623-639
- Hooper, N.M. et Turner, A.J. (1985) Neurokinin B is hydrolysed by synaptic membranes and by endopeptidase-24.11 (enkephalinase) but not by angiotensin converting enzyme *FEBS Lett.* 190, 133-136
- Hooper, N.M., Kenny, A.J. et Turner, A.J. (1985) The metabolism of neuropeptides. Neurokinin A (substance K) is a substrate for endopeptidase-24.11 but not for peptidyl dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme) *Biochem. J.* 231, 357-361
- Hurtley, S.M. et Helenius, A. (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum *Ann. Rev. Cell Biol.* 5, 277-307

- Jannatipour, M. et Rokeach, L.A. (1995) The Schizosaccharomyces pombe homologue of the chaperone calnexin is essential for viability *J. Biol. Chem.* 270, 4845-4853
- Johnson, A. R., Ashton, J., Schulz, W. et Erdos, E. G., (1985) Neutral metalloendopeptidase in human lung tissue and cultured cells *Am. Rev. Respir. Dis.* 132, 564-568
- Kahn, J.C., Patey, M., Dubois-Rande, J.L., Merlet, P., Castaigne, A., Lim-Alexandre, C., Lecomte, J.M., Duboc, D., Gros, C. et Schwartz, J.C. (1990) Effect of sinorphan on plasma atrial natriuretic factor in congestive heart failure *Lancet* 335, 118-119
- Kearse, K.P., Williams, D.B. et Singer, A. (1994) Persistence of glucose residues on core oligosaccharides prevents association of TCR-alpha and TCR-beta proteins with calnexin and results specifically in accelerated degradation of nascent TCR-alpha proteins within the endoplasmic reticulum *EMBO J.* 13, 3678-3686
- Kenny, A.J., Stephenson, S.L. et Turner, A.J. (1987) Cell surface peptidases. *In* Mammalian ectoenzymes, *ed by* A.J. Kenny and A.J. Turner, pp.169-210, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, The Netherlands
- Kerr, M. A. et Kenny, A. J. (1974) The molecular weight and properties of a neutral metallo-endopeptidase from rabbit kidney brush border *Biochem. J.* 137, 477-488
- Kerr, M. A. et Kenny, A. J. (1974) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border *Biochem. J.* 137, 489-495
- Kim, P.S. et Arvan, P. (1995) Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum *J. Cell Biol.* 128, 29-38

- Knittler, M.R. et Haas, I.G. (1992) Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release *EMBO J.* 11, 1573-1581
- Kukurukinska, M.A., Bergh, L.C. et Jackson, B.J. (1987) Protein glycosylation in yeast *Ann. Rev. Biochem.* 56, 915-944
- Lafrance, M.-H., Vézina, C., Wang, Q., Boileau, G., Crine, P. et Lemay, G. (1994) Role of glycosylation in transport and enzymic activity of neutral endopeptidase-24.11 *Biochem. J.* 302, 451-454
- Le, M.G. et Nurse, P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* 327, 31-35
- Lemay, G., Waksman, G., Roques, B. P., Crine, P. et Boileau, G. (1989) Fusion of a cleavable signal peptide to the ectodomain of neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) results in the secretion of an active enzyme in COS-1 cells *J. Biol. Chem.* 264, 15620-15623
- LeMoual, H., Devault, A., Roques, B.P., Crine, P. et Boileau, G. (1991) Identification of glutamic acid 646 as a zinc-coordinating residue in the endopeptidase-24.11 *J. Biol. Chem.* 266, 15670-15674
- Livi, G.P., Ferrara, A., Roskin, R., Simon, P.L. et Young, P.R. (1990) Secretion of N-glycosylated human recombinant interleukin-1 $\alpha$  in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 88, 297-301
- Malfroy, B. et Schwartz, J.C. (1984) Enkephalinase from rat kidney. Purification, characterization, and study of substrate specificity *J. Biol. Chem.* 259, 14365-14370

- Malfroy, B., Swertz, A., Guyon, A., Roques, B. P. et Schwartz, J. C. (1978) High-affinity enkephalin-degrading peptidase in mouse brain and its enhanced activity following morphine *Nature* 276, 523-524
- Matsas, R., Fulcher, I. S., Kenny, A. J. et Turner, A. J. (1983) Substance P and Leu-enkephalin are hydrolyzed by an enzyme in pig caudate synaptic membranes that is identical with the endopeptidase of kidney microvilli *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 3111-3115
- Matsas, R., Kenny, A.J. et Turner A.J. (1984) The metabolism of neuropeptides: the hydrolysis of peptides including enkephalins, tachykinins and their analogues, by endopeptidase 24.11 *Biochem. J.* 223, 433-440
- McDonnell, J.M., Jones, G.E., White, T.K. et Tanzer M.L. (1996) Calreticulin binding affinity for glycosylated laminin *J. Biol. Chem.* 271, 7891-7894
- Nadel, J.A. (1990) Neutral endopeptidase modulation of neurogenic inflammation in airways *Eur.Resp.J.* 3, 645s-651s
- Nadel, J.A. et Borson, D.B. (1988) Modulation of tachykinins and bradykinins by enkephalinase. *In Mechanism in asthma: Pharmacology Physiology and Managements*, pp.123-130, Alan R. Liss, Inc., New York
- Nauseef, W.M., McCormick, S.J. et Clark, R.A. (1995) Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase *J. Biol. Chem.* 270, 4741-4747
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y, Gething, M.M. et Sambrook, J. (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP *Cell* 57, 1223-1236

- Northridge, D.B., Alabaster, C.T., Connell, J.M.C., Dilly, S.G., Lever, A.F., Jardine, A.G., Barclay, P.L., Dargie, H.J., Findlay, I.N. et Samuels, G.M.R. (1989) Effects of UK 69578: a novel atriopeptidase inhibitor *Lancet* 2, 591-593
- Ora, A. et Helenius, A. (1995) Calnexin fails to associate with substrate proteins in glucosidase-deficient cell lines *J. Biol. Chem.* 270, 26060-26062
- Otteken, A. et Moss, B. (1996) Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin *J. Biol. Chem.* 271, 97-103
- Ou, W.J., Bergeron, J.J.M. et Thomas, D.Y. (1994) Characterization of a soluble derivative of calnexin secreted from baculovirus infected insect Sf9 cells *Mol. Cell Biol.* 5S, 202a
- Ou, W.J., Bergeron, J.J.M., Li, Y., Kang, C.Y. et Thomas, D.Y. (1995) Conformational changes induced in the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin by Mg-ATP and Ca<sup>2+</sup> *J. Biol. Chem.* 270, 18051-18059
- Ou, W.J., Cameron, P.H., Thomas, D. et Bergeron, J.J.M. (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation *Nature* 364, 771-776
- Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J.J.M. et Thomas, D. (1995) The calnexin homologue *cnx1+* in *Schizosaccharomyces pombe* is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain *EMBO J.* 14, 3064-3072
- Pelham, H.R.B. (1986) Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins *Cell* 46, 959-961

- Pelham, H.R.B. (1988) Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment *EMBO J.* 7, 913-918
- Pelham, H.R.B. (1990) The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum *TIBS* 15, 483-486
- Peterson, J., Ora, A., Van, P.N. et Helenius, A. (1995) Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins *Mol. Biol. Cell* 6, 1173-1184
- Pidoux, A.L. et Armstrong, J. (1992) Analysis of the BiP and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe* *EMBO J.* 11, 1583-1591
- Pierart, M.E., Najidovski, T., Appleboom, T.E. et Deschodt-Lanckman (1988) Effects of human endopeptidase 24.11 ("enkephalinase") on IL-1-induced thymocyte proliferation activity *J. Immunol.* 140, 3808-3811
- Rajagopalan, S., Xu, Y. et Brenner, M.B. (1994) Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin *Science* 263, 387-390
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. et Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review *Yeast* 8, 423-488
- Roques, B. P., Fournié-Zaluski, M. C., Soroca, E., Lecompte, J. M., Malfroy, B., Llorens, C. et Schwartz, J. C. (1980) The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice *Nature* 288, 286-289
- Roques, B. P., Noble, F., Crine, P. et Fournié-Zaluski, M.-C. (1995) Inhibitors of Nephilysin: design, pharmacological and clinical applications *Meth. Enzym.* 248, 263-283

- Roques, B.P. et Beaumont, A. (1990) Neutral endopeptidase-24.11 inhibitors: from analgesics to antihypertensives? *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 245-249
- Roques, B.P. et Fournié-Zaluski, M.-C. (1985) A new way to antinociceptive compounds through rational design of enkephalin degrading enzymes inhibitors *Proceedings of the International Symposium on Medicinal Chemistry*, Ed.R. Dalhomb and J.L.G. Nilsson, pp. 134-146, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden
- Roques, B.P., Noble, F., Daugé, V., Fournié-Zaluski, M.-C. et Beaumont, A. (1993) Neutral endopeptidase 24.11: Structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology *Pharm.Rev.* 45, 87-146
- Rose, M.D., Misra, L.M. et Vogel, J.P. (1989) *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene *Cell* 57, 1211-1221
- Rye, H.S., Burston, S.G., Fenton, W.A., Beechem, J.M., Xu, Z., Sigler, P.B. et Horwich, A.L. (1997) Distinct actions of *cis* and *trans* ATP within the double ring of the chaperonin GroEL *Nature* 388, 792-798
- Sales, N., Dutriez, I., Maziere, B., Ottaviani, M. et Roques, B.P. (1991) Neutral endopeptidase 24.11 in rat peripheral tissues: comparative localization by *ex-vivo* and *in vitro* autoradiography *Reg.Pept.* 33, 209-222
- Schultz, L.D., Tanner, J., Hofmann, K.J., Emini, E.A., Condra, J.H., Jones, R.E., Kieff, E. et Ellis, R.W. (1987) Expression and secretion in yeast of a 400-kDa envelope glycoprotein derived from Epstein-Barr virus *Gene* 54, 113-123
- Scott, J.E. et Dawson, J.R. (1995) MHC class I expression and transport in a calnexin-deficient cell line *J. Immun.* 155, 143-148

- Seymour, A. A., Abboa-Offei, B. E., Smith, P. L., Mathers, P. D., Asaad, M. M. et Rogers, W. L. (1995) Potentiation of natriuretic peptides by neutral endopeptidase inhibitors *Clin. Exp. Pharm. Phys.* 22, 63-69
- Shang, J.C., Hemond, M., Hebert, M. et Pilote, M. (1986) How does morphine work on colonic motility? An electromyographic study in the human left and sigmoid colon *Life sci.* 38, 671-676
- Sousa, M. et Parodi, A.J. (1995) The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase *EMBO J.* 14, 4196-4203
- Stader, J. (1995) Gene expression in recombinant *E.coli*, Marcel Dekker Inc., Chap.1.
- Stephensen, S.L. et Kenny, A.J. (1987) The hydrolysis of a human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase 24.11 *Biochem. J.* 243, 183-187
- Summers, M.D. et Smith, G.E. (1987) A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures *Texas A&M Univ.* 57p.
- Thompson, J.S. et Morice, A.H. (1996) Neutral endopeptidase and the pulmonary circulation *Gen.Pharmac.* 27(4), 581-585
- Trombetta, S.E. et Parodi, A.J. (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase *J. Biol. Chem.* 267, 9236-9240
- Vallee, B.L. et Auld, D.S. (1990) Zinc coordination function and structure of zinc enzymes and others proteins *Biochemistry* 29, 5647-5659

- Wada, I., Ou, W.J., Liu, M.C. et Scheele, G. (1994) Chaperone function of calnexin for the folding intermediate of gp80, the major secretory protein in MDCK cells *J. Biol. Chem.* 269, 7464-7472
- Waksman, G., Bouboutou, R., Devin, J., Bourgoïn, S., Cesselin, F., Hamon, M., Fournié-Zaluski, M.-C. et Roques, B.P. (1985) *In vitro* and *in vivo* effects of kelatorphan on enkephalin metabolism in rodent brain *Eur.J.Pharmacol.* 117, 233-243
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. et Roques, B. P. (1986) Neuronal localization of the neutral endopeptidase « enkephalinase » in rat brain revealed by lesions and autoradiographie *EMBO J.* 5, 3163-3166
- Waksman, G., Hamel, E., Delay-Goyet, P. et Roques, B. P. (1987) Neutral endopeptidase 24.11 mu and delta opioid receptors after selective brain lesions: an autoradiographic study *Brain Res.* 436, 205-216
- Ware, F.E., Vassilakos, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Lehrman, M.A. et Williams, D.B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins *J. Biol. Chem.* 270, 4697-4704
- Williams, D.B. (1995) Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate *Biochem. Cell. Biol.* 73, 123-132