

Université de Montréal

Étude de la sécrétion de la prosomatostatine humaine dans les cellules  
AtT20

par

Caroline Meilleur

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.)  
en biochimie

Mai 2004  
©, Caroline Meilleur, 2004



W

4

U58

2004

v. 099

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

## PAGE D'IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de la sécrétion de la prosomatostatine humaine dans les cellules  
AtT20

Présenté par :

Caroline Meilleur

a été évalué par un jury composé par les personnes suivantes :

Président du jury : Dr. Léa Brakier-Gingras

Membre du jury : Dr. Nabil Seidah

Directeur de recherche : Dr. Guy Boileau

Codirecteur de recherche : Dr. Denis LeBel

Mémoire accepté le :

## SOMMAIRE

Les cellules eucaryotes possèdent toutes la voie de sécrétion constitutive. Cependant, seules les cellules spécialisées comme les cellules endocrines, exocrines et neuronales sont capables d'emmagasiner des protéines de sécrétion et de les relâcher suite à un stimulus extérieur. En effet, ces cellules possèdent un mécanisme de triage très spécialisé au niveau du réseau *trans*-Golgien qui cible les protéines soit vers les vésicules de sécrétion de la voie constitutive ou vers les grains associés à la voie régulée. Ce ciblage implique la présence d'un ou de plusieurs signaux portés par les protéines afin que celles-ci atteignent leur destination finale dans la cellule. Jusqu'à maintenant, le mécanisme par lequel s'effectue cette reconnaissance du signal demeure encore mal connu. Afin de mieux caractériser le mécanisme de ciblage de la prosomatostatine humaine vers les grains de sécrétion des cellules neuroendocrines AtT20, trois approches furent utilisées. Dans un premier temps, des anticorps dirigés spécifiquement contre la région pro de la prosomatostatine furent produits afin de suivre la protéine entière dans la cellule. Pour la deuxième approche, une protéine de fusion consistant en la prosomatostatine fusionnée au peptide HA du virus influenza fut exprimée dans les cellules AtT20. Des anticorps commerciaux furent utilisés afin de suivre la protéine de fusion dans la cellule. Aucune de ces deux approches n'a permis de suivre la protéine entière dans la voie de sécrétion régulée de la cellule AtT20. La troisième approche consistait en la fusion de l'amylase pancréatique du rat avec le N-terminal de la prosomatostatine humaine. Cette stratégie nous a permis de démontrer que l'amylase, une protéine dirigée vers la voie constitutive dans les cellules AtT20, pouvait être déviée vers la voie régulée lorsqu'elle est jumelée avec une protéine empruntant cette voie.

**Mots clés :** ciblage, voie de sécrétion régulée, prosomatostatine

## SUMMARY

Protein secretion from eukaryotic cells can be either constitutive or regulated. While the constitutive pathway is ubiquitous, the regulated pathway is a hallmark of the endocrine, exocrine and nervous system. In this regulated pathway, newly synthesized proteins are stored within the cell and released only upon stimulation. It is in the *trans*-Golgi network that proteins belonging to the regulated pathway will be actively sorted from those to be secreted by the constitutive pathway. This targeting involves one or several recognition signals carried by the protein itself, within its structure. So far, this mechanism remains elusive. In order to characterize the sorting of the human prosomatostatin to the regulated pathway in neuroendocrine AtT20 cells, three different strategies have been used. First, we produced antibodies against the pro domain of the prosomatostatin to follow the entire protein in the cells. Secondly, a fusion protein has been produced between the prosomatostatin and the peptide HA from Influenza virus. Commercial antibodies have been used to follow our hybrid in the cells. None of these strategies helped us to follow the prosomatostatin in the cells. Finally, another hybrid protein has been expressed in AtT20 cells. Rat pancreatic amylase has been fused to the N-terminal of human prosomatostatin. We showed by this approach that amylase, a constitutive secreted protein in AtT20 cells, may be targeted and secreted by the regulated pathway, when fused to a protein following that way.

**Key words:** targeting, regulated secretion, prosomatostatin

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>III</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>X</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>XII</b>
<b>CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Le Système vacuolaire central.....	1
1.1.1 Translocation co-traductionnelle.....	4
1.1.2 Transit dans le RER.....	6
1.1.2.1 Repliement des protéines dans le RER.....	6
1.1.2.2 Rétention des protéines dans le dans le RER.....	8
1.1.3 Transport vésiculaire.....	10
1.1.3.1 Biogenèse des vésicules enrobées de COP I.....	11
1.1.3.2 Biogenèse des vésicules enrobées de COPII.....	12
1.1.3.3 Biogenèse des vésicules enrobées de clathrine.....	13
1.1.3.4 Fusion.....	14
1.1.4 Transit dans l'appareil de Golgi et le TGN.....	17
1.1.4.1 La rétention dans l'appareil de Golgi.....	20
1.1.4.2 La rétention dans le TGN.....	21
1.1.5 Modification post-traductionnelles.....	22
1.1.5.1 La <i>N</i> -glycosylation.....	22
1.1.5.2 La <i>O</i> -glycosylation.....	25
1.1.5.3 La sulfatation et la phosphorylation.....	26
1.1.5.4 L'acétylation et l'amidation.....	27
1.1.5.5 Maturation des précurseurs.....	28
1.1.6 Ciblage à partir du TGN.....	32
1.1.6.1 Ciblage des enzymes lysosomiales.....	33
1.1.6.2 Ciblage vers la voie de sécrétion régulée.....	34
1.2 La prosomatostatine.....	46
1.3 But du travail.....	50
<b>CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>52</b>
2.1 Matériel.....	52

2.2 Tampons.....	52
2.3 Méthodes.....	54
2.3.1 Construction des différents plasmides.....	54
2.3.1.1 Construction du plasmide pGEX-2T-région Pro.....	54
2.3.1.2 Construction du plasmide pRc/CMV – prosomatostatine-HA et. pRc/CMV-amylase- prosomatostatine .....	59
2.3.2 Expression de la protéine de fusion GST-région pro et immunisation.....	62
2.3.3 Culture cellulaire .....	63
2.3.3.1 Conditions de culture.....	63
2.3.3.2 Passage des cellules.....	63
2.3.3.3 Congélation des cellules.....	64
2.3.3.4 Décongélation des cellules.....	64
2.3.3.5 Transfection .....	65
2.3.4 Extractions des protéines cellulaires et analyse.....	66
2.3.5 Immunofluorescence.....	67
2.3.6 Stimulation de la sécrétion.....	68
2.3.7 Marquage métabolique et chasse.....	69
2.3.8 Immunoprécipitation.....	70
<b>CHAPITRE 3 : RÉSULTATS.....</b>	<b>71</b>
3.1 Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la région pro de la prosomatostatine humaine chez la lapin.....	71
3.1.1 Production de la protéine de fusion GST-région pro de la prosomatostatine dans un système bactérien.....	74
3.1.2 Vérification de la réactivité des anticorps polyclonaux anti région pro de la prosomatostatine humaine sur des cellules LLCPK1 exprimant la protéine de façon stable.....	74
3.1.3 Vérification de la réactivité des anticorps polyclonaux anti région pro de la prosomatostatine humaine sur des cellules AtT20 exprimant la promatostatine de façon stable.....	77
3.2 Expression de la protéine de fusion prosomatostatine-HA dans les cellules AtT20.....	80
3.3 Expression et caractérisation de la protéine de fusion Amylase- Prosomatostatine dans les cellules AtT20.....	84
3.3.1 Expression de la chimère Amylase-Prosomatostatine et de l'Amylase dans les cellules AtT20.....	84
3.3.2 Maturation et sécrétion de la chimère Amylase- Prosomatostatine par les cellules AtT20.....	91
3.3.3 Localisation intracellulaire de la chimère Amylase- Prosomatostatine par immunofluorescence dans les cellules AtT20.....	92



3.3.4 Essai de la stimulation de la sécrétion de la chimère Amylase-Prosomatostatine par les cellules AtT20.....	99
3.3.5 Marquage métabolique et chasse de la chimère Amylase-Prosomatostatine en présence de bréfeldine A dans les cellules AtT20.....	102
<b>CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....</b>	<b>106</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES.....</b>	<b>116</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>117</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Schéma représentant le système vacuolaire central et ses voies de sécrétion.....	2
Figure 1.2 : Modèles de transport intra-Golgien.....	18
Figure 1.3 : La <i>N</i> -glycosylation.....	23
Figure 1.4 : Modèle de sécrétion : « Sorting-for -entry ».....	40
Figure 1.5 : Modèle de sécrétion : « Sorting-by-retention».....	44
Figure 1.6 : Schéma représentant la prosomatostatine et ses produits de maturation.....	48
Figure 2.1 : Séquence de l'ADNc de la préprosomatostatine humaine.....	55
Figure 2.2 : Construction du vecteur pGEX-2T-région Pro de la prosomatostatine.....	57
Figure 2.3 : Construction du vecteur pRc/CMV-prosomatostatine-HA.....	60
Figure 3.1 : Expression de la protéine GST-région pro de la prosomatostatine chez <i>E. coli</i> .....	72
Figure 3.2 : Réactivité des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre la région pro de la prosomatostatine.....	75
Figure 3.3 : Réactivité des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre la région pro de la prosomatostatine envers la chimère amylase- prosomatostatine.....	78
Figure 3.4 : Expression de la protéine de fusion prosomatostatine-HA dans les cellules AtT20.....	82
Figure 3.5 : Expression de la chimère amylase-prosomatostatine dans les cellules AtT20.....	85
Figure 3.6 : Schéma représentant la chimère amylase-prosomatostatine et les portions reconnues par les différents anticorps.....	87
Figure 3.7 : Sécrétion et maturation de la chimère Amylase-prosomatostatine par les cellules AtT20 transfectées de façon stable.....	89
Figure 3.8 : Localisation de la chimère amylase-prosomatostatine dans les cellules AtT20 par immunofluorescence indirecte.....	93

Figure 3.9 : Localisation de l'amylase dans les cellules AtT20 par immunofluorescence indirecte.....	95
Figure 3.10 : Localisation immunohistochimique de la chimère amylase-prosomatostatine dans les grains de sécrétion des cellules AtT20.....	97
Figure 3.11 : Essai de stimulation de sécrétion de la chimère amylase-prosomatostatine dans les cellules AtT20. ....	100
Figure 3.12 : Sécrétion et maturation de la chimère amylase-prosomatostatine par les cellules AtT20 en présence de Bréfeldine A.....	103

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	hormone adrénocorticotropique
AP	adaptor protein
BFA	brefeldine A
BiP	immunoglobulin heavy chain binding protein
C	cellules
cDNA	acide désoxyribonucléique complémentaire
CGN	<i>cis</i> Glogi Network
COPI	coat protein type I
COPII	coat protein type II
DMEM	Dubelco's modified medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
ERGIC	compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi
GS4B	glutathione sépharose 4B
GST	glutathione s-transferase
GTP	guanosine triphosphate
HA	épitope de l'hémaglutinine du virus influenza
HBS	Hepes buffered saline
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside
kD	kilodalton
M	milieux
PBS	phosphate buffered saline
PC	protéine convertase
POMC	pro-opiomélanocortine
PM	poids moléculaire
RE	réticulum endoplasmique

RER	réticulum endoplasmique rugueux
RIPA	radioimmune precipitation buffer
SNAP	soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein
SNARE	SNAP receptor
SRP	signal recognition peptide
TGN	<i>trans</i> Golgi Network
TTBS	Tris and Tween buffered saline

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier mon directeur, Dr Guy Boileau, de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens aussi à le remercier pour son appui, son grand sens critique et pour sa patience au cours de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais aussi remercier mon codirecteur, Dr Denis LeBel, d'avoir fortement contribué à ce projet. Je garde un très bon souvenir de son positivisme et de sa créativité.

Je remercie également toutes les techniciennes et agentes de recherche du laboratoire qui m'ont si gentiment aidée. Merci à Claire Vézina, Line Lespérance et Louise Cournoyer. Votre aide m'a été précieuse.

Finalement, je remercie du fond du coeur ma mère et mon frère qui m'ont supporté et aidé énormément pour la rédaction de ce mémoire. Aussi un gros merci à Jean-Sébastien Rivard pour m'avoir épaulée et encouragée dans les dernières années.

## CHAPITRE 1 – REVUE DE LA LITTÉRATURE

### 1.1 Le système vacuolaire central

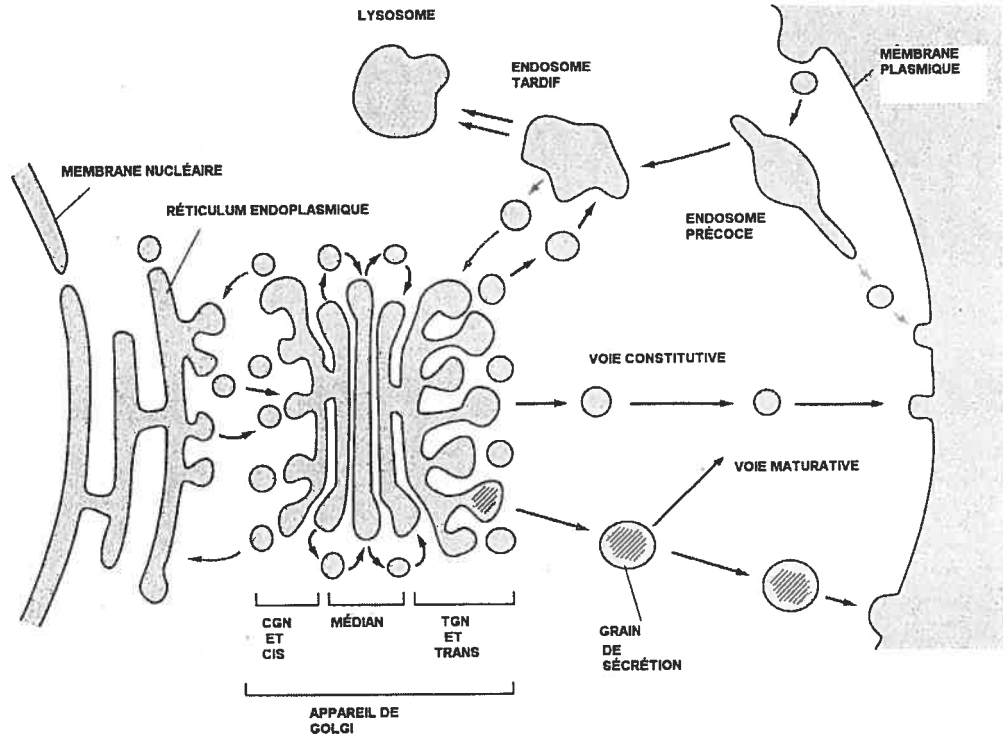
La grande majorité des protéines synthétisées par les cellules eucaryotes partagent une origine de biosynthèse commune dans le cytosol, d'où elles doivent ensuite migrer pour atteindre leur destination finale. Ces protéines possèdent donc l'information nécessaire afin d'être localisées dans le bon compartiment cellulaire.

Plusieurs organelles de la cellule eucaryote sont regroupées en un réseau de vacuoles communément appelé système vacuolaire central. Les protéines destinées à être sécrétées devront emprunter plusieurs de ces organelles. Le système vacuolaire central est illustré de façon schématique à la figure 1.1. Les organelles formant ce réseau sont le réticulum endoplasmique (RE), le compartiment de récupération ou CGN (*cis*-Golgi network), les saccules de l'appareil de Golgi, le TGN (*trans*-Golgi network), les lysosomes, les grains de sécrétion, les endosomes ainsi que toutes les vésicules qui assurent le transport entre ces différents compartiments. La voie de sécrétion (voie d'exocytose) peut être elle même divisée en voies de sécrétion régulée et constitutive.

La voie de sécrétion constitutive est une voie présente dans toutes les cellules eucaryotes. Cette voie est dite constitutive car l'exocytose des protéines s'y fait dans un processus continu, limité seulement par la disponibilité du produit. Conséquemment, les protéines qui utilisent cette voie, suite à leur synthèse, seront immédiatement acheminées vers la membrane plasmique par des vésicules de transport à partir du TGN. Les protéines qui empruntent cette voie comprennent, par

**Figure 1.1 : Schéma représentant le système vacuolaire central et ses voies de sécrétion.** Ce schéma est une adaptation d'une figure du traité *Molecular biology of the cell*, Albert et coll., 1994. RE : réticulum endoplasmique; CGN : «*cis*-Golgi network »; TGN : «*trans*-Golgi network ».





exemple, les protéines qui composent la membrane plasmique et les protéines de la matrice extra-cellulaire. La voie de sécrétion dite régulée se trouve seulement dans les cellules spécialisées pour la sécrétion, soit les cellules endocrines, exocrines et neuroendocrines. Cette voie est dite régulée car les protéines sont emmagasinées dans des grains de sécrétion qui se fusionnent à la membrane plasmique suite à une stimulation exercée par un sécrétagogue externe. Les protéines qui sont dirigées vers cette voie comprennent les précurseurs d'enzymes digestives, les neuropeptides et les prohormones.

Dans ce travail, nous nous intéresserons principalement à la voie d'exocytose dite régulée. Nous suivrons donc chacune des étapes du mécanisme de transport et de triage des protéines empruntant cette voie et ce, de leur synthèse à leur destination finale dans les grains de sécrétion.

### **1.1.1 Translocation co-translationnelle dans la lumière du RER**

La translocation ou l'insertion dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) est la première étape impliquée dans l'adressage intracellulaire de plusieurs protéines dans les cellules eucaryotes. Ces protéines incluent toutes les protéines sécrétées en plus des protéines résidentes du RER, de l'appareil de Golgi, des lysosomes, des endosomes et de la membrane plasmique. Cette translocation s'effectue tout au long de la synthèse des protéines. C'est pourquoi on fait référence au terme co-translationnel.

Cette première étape de ségrégation est réalisée par un « récepteur » spécifique qui reconnaît un signal de translocation porté par la protéine naissante. L'hypothèse du signal fut proposée par Blobel et Doberstein en 1975. Ils démontrèrent alors que l'insertion des protéines dans le RER impliquait la reconnaissance d'un signal peptidique présent dans la séquence située à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale des protéines. Ce signal est en général composé d'une séquence de 15 à 31 résidus d'acide aminé (Carne et Scheele, 1983) et est appelé peptide signal ou pré-séquence. Ces pré-séquences possèdent une partie hydrophobe qui est impliquée dans la liaison au complexe ribonucléoprotéique SRP (signal recognition particle) (Walter *et al.*, 1981; Walter et Blobel, 1981) et qui aurait également une implication au niveau de l'insertion du peptide signal dans la couche bilipidique de la membrane du RER. Un site de coupure protéolytique suit la partie hydrophobe du peptide signal. Ce site de coupure est reconnu par une endoprotéase associée à la membrane du RER qui libère la protéine en synthèse du peptide signal, c'est la «signal peptidase»

Les différentes étapes du processus de translocation sont aujourd'hui bien connues. La synthèse des protéines débute dans le cytosol. Lorsque le peptide signal des protéines en synthèse émerge du ribosome, la particule de reconnaissance du signal (SRP) s'y lie, causant ainsi un arrêt de la traduction (Walter et Blobel, 1981). Cet arrêt aurait pour but d'empêcher la traduction complète de la protéine dans le cytosol. Le complexe ribosome-ARN<sub>m</sub>-chaîne naissante-SRP s'arrime alors à la membrane du RE par la liaison du SRP à son récepteur (Gilmore et coll., 1982 a, b). Le SRP est ensuite relâché moyennant l'hydrolyse de GTP (Rapoport, 1992; Gilmore, 1993, Kalies et coll., 1998). La synthèse de la protéine peut alors continuer ainsi que sa translocation au travers de la membrane du RER via un pore aqueux nommé translocon (Rapoport et coll., 1996). Ce pore est composé de plusieurs complexes protéiques dont les plus importants sont le complexe Sec 61 (Görlich et coll., 1992 b),

et la protéine TRAM («translocating chain-associating membrane») (Görlich et coll. 1992 a). Ces deux éléments, ainsi que le récepteur SRP, sont suffisants pour la translocation des protéines sécrétées dans des protéoliposomes reconstitués (Voight et coll., 1996).

### **1.1.2 Transit des protéines dans le RER**

Une fois passées la barrière du translocon, les protéines nouvellement synthétisées se retrouvent dans la lumière du RER sous forme non-repliée. Celles-ci subiront plusieurs modifications structurales, de façon co- et post-traductionnelle, telles que la glycosylation sur certains résidus asparagine, la formation de ponts disulfures, l'adoption d'une structure secondaire et tertiaire et, quelquefois, l'assemblage en complexes oligomériques. Les protéines doivent donc rencontrer certaines normes structurales avant d'être transportées vers leur destination finale. Certaines d'entre elles resteront dans le RER comme protéines résidentes, alors que d'autres seront transportées aux saccules du Golgi pour être ensuite dirigées soit vers la surface cellulaire, les lysosomes, ou pour certains types cellulaires dans des grains de sécrétion.

#### **1.1.2.1 Repliement des protéines dans le RER**

Un bon repliement des protéines est essentiel à leur bon adressage et à leur activité propre. L'efficacité et la rapidité de ce phénomène sont attribuables à des protéines chaperons agissant au niveau du RER. Une des classes de chaperons est celle des protéines grp (glucose-regulated proteins) qui sont des protéines induites

lors d'un manque de glucose chez des fibroblastes en culture (Shui et coll., 1977). Les deux plus importantes sont la grp78, aussi appelée BIP pour «immunoglobulin heavy-chain binding protein» (Hendershot et coll., 1988; Munro et Pelham, 1986), ainsi que la grp94 (Sorger et Pelham, 1987). La protéine BIP (grp78) est une protéine soluble qui aide au repliement des protéines nouvellement synthétisées en se liant aux surfaces hydrophobes, évitant ainsi leur agrégation. Elle permet donc aux protéines d'adopter leur conformation finale (Pelham, 1986). Pour sa part, la grp94 s'associe avec les protéines complètement oxydées (Melnick et coll., 1994).

La calnexine et la calréticuline sont aussi deux autres importantes molécules chaperons du RER. La calnexine a été découverte par sa phosphorylation par le GTP et par sa capacité à lier le calcium, d'où son nom (Wada et coll., 1991). Il a été proposé que ce chaperon se lierait aux glycoprotéines n'ayant qu'un résidu glucose sur la chaîne oligosaccharidique originale (Ou et coll., 1993; Hammond et coll., 1994). La calréticuline fut d'abord identifiée comme étant une protéine majeure localisée dans le RER et liant le calcium (Fliegel et coll., 1989; Smith et Koch, 1989). Il a été récemment démontré que la calréticuline joue un rôle dans le repliement de la myéloperoxydase. Cette interaction entre les deux molécules se fait dans la mesure où la myéloperoxydase est immature et sous forme glycosylée (Nauseef et coll., 1995). La calréticuline est aussi reconnue pour lier plusieurs autres protéines comme l'hémagglutinine du virus de l'influenza. L'association des deux protéines dépend de la présence d'un seul glucose sur la chaîne oligosaccharidique originale de la protéine virale (Peterson et coll., 1995). La calnexine et la calréticuline contiennent des domaines lectine qui sont cruciaux pour leur fonction de protéines chaperons (Schrag et coll., 2003)

L'enzyme disulfure isomérase est une autre protéine résidente du RER qui interagit avec les protéines non-repliées. Cette enzyme catalyse l'oxydation des résidus thiols, favorisant ainsi l'échange disulfure (Freedman, 1984).

Les protéines chaperons qui s'associent de façon transitoire avec les protéines partiellement repliées et de façon plus permanente avec les protéines mal repliées ont amené Hammond et Helenius à proposer l'existence d'un contrôle de qualité qui préviendrait le ciblage d'une protéine mal repliée vers la surface cellulaire (Hammond et Helenius, 1994, Helenius et coll., 1997, Ritters et Helenius, 2000). Ce serait par l'association des chaperons avec les protéines insuffisamment ou mal repliées que ces dernières resteraient emprisonnées dans le RER (Hurley et Helenius, 1989). En effet, il a été démontré qu'un mutant de repliement de la protéine G du virus VSV sensible à la température ne peut être envoyé au-delà du cis-Golgi (Hammond et Helenius, 1994). Les protéines mal repliées retournent ensuite dans le cytoplasme via le translocon pour être dégradées par le protéasome (Kostova et Wolf, 2003).

### **1.1.2.2 Rétention des protéines dans le RER**

La théorie du transport protéique intracellulaire par défaut prévoit l'existence de mécanismes de rétention pour les protéines résidentes des compartiments du système vacuolaire central. Munro et Pelham (1987) ont comparé la séquence protéique de trois protéines solubles résidentes du RER et ont trouvé à leur extrémité C-terminale un térapeptide commun aux trois protéines. Cette séquence, composée des acides aminés Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL), est responsable de leur rétention dans le réticulum (Pelham, 1990). En réalité, cette séquence n'empêche pas ces protéines de se retrouver dans un autre compartiment post-RE mais assure un mécanisme de

récupération via la reconnaissance de la séquence KDEL. Chez la levure *S.cerevisiae*, un mutant incapable de retenir les protéines résidentes du RER fut isolé par le groupe de Pelham. Le gène mutant est ERD2, qui code pour une protéine de 25 kDa à sept passages transmembranaires. Cette protéine serait responsable de la rétention des protéines dans le RER (Semenza et coll., 1990). De plus, Lewis et Pelham (1990) ont caractérisé une protéine présente dans les cellules humaines (hERD2) qui démontre une homologie de 50 % avec ERD2, et qui se localise dans l'appareil de Golgi et dans les vésicules qui se trouvent entre le RER et le Golgi. Ceci confirme la présence d'un compartiment de récupération responsable de rediriger les protéines vers le RER.

Le système de rétention KDEL est utilisé principalement par les protéines solubles. Chez plusieurs protéines membranaires de type I, on a identifié un motif consensus différent comme signal de rétention. Ce motif de rétention est exposé au niveau de la queue cytoplasmique, donc du côté C-terminal, et est représenté par la séquence KKXX ou KXKXX (Jackson et coll., 1990). Les deux résidus lysines constituent les résidus les plus importants (Gayacol et coll., 1994). Ce motif de rétention semble interagir avec un complexe polypeptidique impliqué dans le transport vésiculaire et appelé coatomère (Cosson et Letourneur, 1994). Pour les protéines membranaires de type II, c'est-à-dire ayant l'extrémité N-terminale du côté cytoplasmique, un motif impliquant deux arginines serait responsable de leur rétention (Schutze et coll., 1994). Cependant, trop peu de protéines membranaires de type II et résidentes du RER sont connues pour en dériver une théorie sur leur mécanisme de rétention.

### 1.1.3 Transport vésiculaire

Les protéines nouvellement synthétisées et bien repliées qui sont destinées à être sécrétées doivent quitter le réticulum endoplasmique et continuer leur transit à travers les différentes organelles du système vacuolaire central. Le transport des protéines entre ces différentes organelles ainsi que vers la membrane plasmique s'effectue via les vésicules de transport qui bourgeonnent de la membrane du compartiment donneur et fusionnent à la membrane du compartiment accepteur. Le transport vésiculaire est assuré par trois types de vésicules: les vésicules enrobées de COPI, de COPII ou de clathrine. Les deux premières assurent le transport entre le RER et le Golgi, entre chacune des saccules de ce dernier et entre le TGN et la membrane plasmique pour les protéines empruntant la voie constitutive. Les vésicules enrobées de COPII sembleraient impliquées exclusivement dans le transport antérograde, entre le RER et le cis-Golgi via le compartiment intermédiaire appelé ERGIC (Kuehn et Schekman, 1997, Glick, 2001). Pour leur part, les vésicules enrobées de COPI joueraient un rôle plus complexe (voir section 1.1.4) dans le transport antérograde et rétrograde entre le RER et le cis-Golgi et entre les différents saccules du Golgi (Schekman et Orci, 1997, Gaynor et coll., 1998, Mironov et coll., 2001). Les vésicules enrobées de clathrine sont impliquées dans le transport à partir du TGN vers les lysosomes via le compartiment de tri endosomal ainsi que vers les grains de sécrétion pour les protéines empruntant la voie régulée.



### 1.1.3.1 Biogenèse des vésicules enrobées de COPI

La formation de chacun des types de vésicules dépend du recrutement de protéines cytosoliques qui agiraient comme dispositif mécanique afin de donner à la membrane du compartiment donneur, une forme sphérique vésiculaire. L'enrobage des vésicules COPI est composé d'une petite protéine liant le GTP, l'ARF (ADP-ribosylation factor; Serafini et coll., 1991) ainsi que de sept sous-unités ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta^1$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - et  $\zeta$ -COP; Stenbeck et coll., 1993; Waters et coll., 1991) d'un complexe protéique cytosolique stable qui est le coatomère. L'ARF a son extrémité N-terminale modifiée par la présence d'une queue formée d'un acide myristique (Kahn et coll., 1993) et lie le GDP lorsqu'elle est soluble dans le cytosol. Lorsqu'il y a échange de GDP pour du GTP, la queue d'acide myristique s'ancre à la membrane. Cet échange est catalysé par un facteur d'échange nucléotidique appelé p619 (Rosa et coll., 1996), et est inhibé par le métabolite fongique brefeldine A (BFA; Donaldson et coll., 1990). La forme ARF-GTP ancrée à la membrane recrute alors les sept unités du coatomère (les COPs pour «coat proteins») qui s'associent de façon équimolaire (Walters et coll., 1991). Une fois l'ARF-GTP lié à la membrane et le recrutement des COPs terminé, le bourgeonnement peut avoir lieu sans aucune autre exigence (Orci et coll., 1993; Ostermann et coll., 1993). En présence d'un acide gras à longue chaîne comme le palmitoyl-CoA, la fusion périplasmique ainsi entraînée conduit à la fission de la vésicule enrobée de COPI nouvellement formée (Ostermann et coll., 1993; Pfanner et coll., 1989). Les composantes protéiques qui médient cette dernière étape ne sont pas encore connues.

Tandis que la machinerie cytosolique générale pour la formation du bourgeon a été caractérisée en détail, un rôle pour des facteurs additionnels a été proposé ces

dernières années. En effet, un rôle possible a été mis en évidence pour la phospholipase D (PLD) dans le bourgeonnement ARF-dépendant des vésicules enrobées de COPI, ainsi que pour une nouvelle famille de protéines transmembranaires. En effet, il apparaît possible que l'ARF, en plus de diriger un recrutement GTP-dépendant des protéines COPs, joue un rôle en activant la PLD dans le but de réorganiser l'environnement lipidique afin d'améliorer les conditions pour le bourgeonnement (Nickel et Wieland, 1998). Une nouvelle famille, appelée la famille des protéines membranaires retrouvées dans les vésicules enrobées de COPI, a été caractérisée ces dernières années. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines membranaires de type I avec un seul passage transmembranaire, un large domaine luminal et une courte queue cytoplasmique. Ces protéines lient efficacement le coatomère via leur queue cytoplasmique (Fielder et coll., 1996; Lowe et Kreis, 1995; Stamnes et coll., 1995) et seraient donc impliquées dans la formation du bourgeon.

Une fois le bourgeonnement terminé, la fusion à la membrane cible n'est possible que si la vésicule se débarrasse de son enrobage. L'enlèvement de ce dernier est effectué lorsque le complexe ARF-GTP s'hydrolyse en ARF-GDP. Puisque l'ARF n'a pas d'activité GTPase en soi, il a été suggéré que l'hydrolyse est attribuable à une protéine nommée GAP pour «GTPase activating protein». Cette GAP a été purifiée et caractérisée (Makler et coll., 1995).

### **1.1.3.2 Biogenèse des vésicules enrobées de COPII**

En 1994, une deuxième classe de vésicules non-enrobées de clathrine fut découverte, tant dans la levure que dans les cellules mammifères. Ces vésicules furent

nommées les vésicules enrobées de COPII. Même si ces vésicules sont similaires aux vésicules enrobées de COPI par leur morphologie, les sous-unités de l'enrobage de COPII ne sont pas structurellement reliées à celles présentes dans l'enrobage COPI. La présence de cinq protéines et des molécules d'ATP et de GTP serait suffisante pour amener un bourgeonnement du RER dans un système acellulaire (Barlowe et coll., 1994). La protéine Sar1p serait la protéine impliquée dans la liaison au GTP. Suite à la liaison du GTP par Sar1p, le recrutement de deux complexes protéiques formés par Sec13p et Sec31p ainsi que de Sec23p et Sec24p aurait lieu (Barlowe et coll., 1994). La protéine assurant l'hydrolyse du GTP pour le désenrobage serait Sec23p et le catalyseur d'échange de GDP pour le GTP de Sar1p serait une protéine liée à la membrane, la protéine Sec12p (Barlowe et coll., 1994).

### **1.1.3.3 Biogenèse des vésicules enrobées de clathrine**

Les vésicules enrobées de clathrine sont impliquées dans le transport des protéines à partir du TGN vers les lysosomes ainsi que vers la membrane plasmique pour les protéines de la voie de sécrétion régulée. Dans ce dernier cas, on parle plutôt de grains de sécrétion que de vésicules de transport. De plus, il a été démontré qu'il pouvait y avoir bourgeonnement à partir des grains immatures et que ce phénomène impliquait des vésicules enrobées de clathrine. Cette dernière voie de bourgeonnement fut appelée voie «constitutive-like» par Arvan en 1992. Le bourgeonnement à partir de la membrane plasmique lors du processus d'endocytose implique aussi des vésicules enrobées de clathrine.

La protéine majeure constituant l'enrobage de clathrine est la clathrine elle-même. Celle-ci est formée d'un complexe de trois grands polypeptides et de trois

petits formant un triskèle. Assemblés entre eux, plusieurs triskèles forment un panier qui enrobe la vésicule. La deuxième composante majeure de ces vésicules est l'adaptateur. Ce dernier est requis pour lier la clathrine à la membrane et pour mobiliser certaines protéines transmembranaires dans la vésicule. Il existe deux types d'adaptateur présents dans le TGN: les adaptateurs AP-1 et AP-2. Le premier est associé à la membrane des vésicules provenant du TGN et est formé d'une adaptine  $\gamma$ , d'une adaptine  $\beta'$ , d'un polypeptide de 47 kDa (AP47 ou  $\mu_1$ ) et d'un polypeptide d'environ 20 kDa (AP19 ou  $\sigma_1$ ). L'adaptateur AP-2 est présent à la surface des vésicules bourgeonnant de la membrane plasmique et comprend une adaptine  $\alpha$ , une adaptine  $\beta$ , un polypeptide d'environ 50 kDa (AP50 ou  $\mu_2$ ) et un autre polypeptide d'environ 20 kDa (AP17 ou  $\sigma_2$ ) (Robinson, 1987; Ahle et coll., 1988). Les sous-unités adaptines,  $\gamma/\beta$  et  $\alpha/\beta$ , lient la clathrine directement tandis que les polypeptides  $\mu_1$  et  $\mu_2$  interagissent avec le motif YXX $\Phi$  (où Y est un résidu tyrosine et  $\Phi$ , un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe) qui est présent sur plusieurs protéines transmembranaires (Ohno et coll., 1995; Davis et coll., 1989). L'adaptateur AP-1, dans les vésicules dirigées vers le lysosome, interagit aussi avec un motif présent dans la queue cytoplasmique du récepteur de mannose 6-phosphate (Pearse et Robinson, 1990). Cependant, ce motif n'a pas encore été établi avec certitude.

#### 1.1.3.4 Fusion

Une fois le bourgeonnement terminé et le transport assuré, les vésicules de transport doivent être sélectives envers la membrane cible à laquelle elles fusionneront. Ceci suggère donc que chacun des types de vésicules doit avoir un marqueur de surface qui assure l'identification de leur origine et qui est reconnu par un récepteur complémentaire à la membrane réceptrice. En 1993, le groupe de

Rothman décida de concentrer sa recherche sur cette théorie de récepteur, et réussit à en démontrer l'existence. Il appela ces récepteurs les SNARE pour «SNAP receptor». Le groupe isola trois différentes SNARE: la syntaxine, la synaptobrevine et la SNAP-25. Ces trois protéines étaient déjà connues comme des composantes des membranes synaptiques. C'est en réalité suite à la découverte du complexe NSF-SNAP que le groupe partit à la recherche du récepteur. En effet, c'est en observant que le transport était bloqué suite à un traitement au NEM (N-éthyl-maleimide) et qu'une accumulation de vésicules non enrobées en résultait près de la membrane cible, que la protéine sensible au NEM et appelée NSF pour «NEM sensitive factor» fut découverte (Malhotra et coll., 1988). Des études plus poussées sur cette protéine démontrèrent qu'elle était sous forme d'homotétramère de sous-unités de 76 kDa ayant chacune un site de liaison pour l'ATP (Block et coll., 1988). La protéine NSF aurait de l'affinité pour des protéines nommées SNAPs (pour «soluble NSF attachment protein»), et ce complexe se lierait aux vésicules. Les SNAPs sont présentés sous trois formes, soit les formes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les deux premières sont présentes dans tous les types cellulaires alors que la dernière est retrouvée seulement dans le cerveau (Whiteheart et coll., 1993).

Le groupe de Rothman sépara les SNARE en deux groupes: les v-SNARE (v pour «vesicle») comprenant la synaptobrevine, et les t-SNARE (t pour «target») qui comprennent la syntaxine et la SNAP-25. On avança donc l'hypothèse SNARE qui stipule que les vésicules du compartiment donneur contiennent les protéines v-SNARE qui reconnaîtraient les protéines t-SNARE situées sur la membrane cible (Söllner et coll., 1993a). Ceci assurerait donc la spécificité de la fusion, puisqu'à chaque v-SNARE serait associé un t-SNARE (Rothman et Warren, 1994). De plus, il a été démontré que le v-SNARE et le t-SNARE pouvaient former un complexe stable en l'absence du complexe NSF-SNAP (Söllner et coll., 1993b) et que dans un

système acellulaire composé de SNARE purifiés et incorporés dans des vésicules de phospholipides, la fusion avait lieu avec la seule présence d'un v-SNARE et d'un t-SNARE associés sur deux vésicules différentes (Weber et coll., 1998). Le complexe très stable formé par le t-SNARE et le v-SNARE serait sous forme d'une structure de superhélice et est appelé SNAREpin. Il fut proposé que ce complexe serait une source d'énergie permettant la fusion (Weber et coll., 1998), et que le complexe NSF-SNAP assurerait la dissociation de celui-ci afin de le soumettre à un second tour de fusion (Söllner et coll., 1993b; Weber et coll., 1998).

Puisqu'on retrouve plusieurs organites formés de membranes dans la cellule, le processus de fusion doit être fortement sélectif. Des protéines appartenant à la famille des GTPases monomériques appelées les protéines Rab (pour «Ras related small GTP-binding proteins») furent mises en cause dans cette sélectivité (Rothman, 1994; Fischer von Mollard et coll., 1994). Jusqu'à maintenant, une trentaine de ces protéines ont été découvertes. Il a été proposé que les protéines Rab régulent la formation du complexe v-SNARE/t-SNARE (Bennett, 1995, Nielsen et coll., 1999, Goud, 2002) et qu'elles favorisent la direction du transport antérograde versus rétrograde (Rothmans et Warren, 1994).

Une autre protéine accomplirait un rôle dans la fusion; cette protéine est appelée synaptotagmine. Cette dernière est présente sous huit isoformes et est une glycoprotéine transmembranaire ayant la capacité de lier le calcium et quelques phospholipides. On retrouve la synaptotagmine et ses isoformes dans les vésicules synaptiques et les grains de sécrétion des tissus exocrines et neuro-endocrines. Le rôle principal de la synaptotagmine 1, qui est la forme la plus étudiée, est la fonction de détecteur de calcium dans le système d'exocytose dépendant du calcium (Hudson et Birdaun, 1995; Kelly, 1995). Elle pourrait également jouer un rôle dans l'inhibition

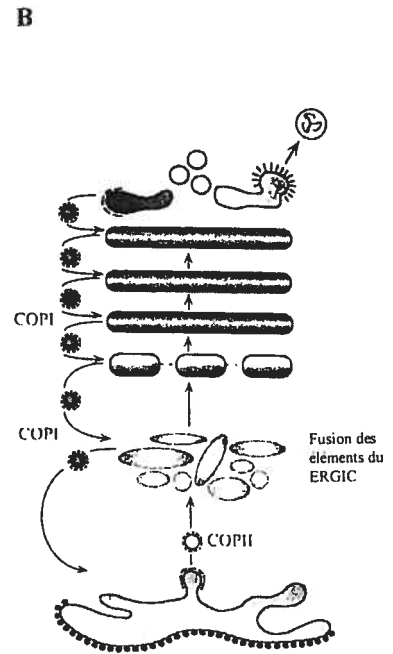
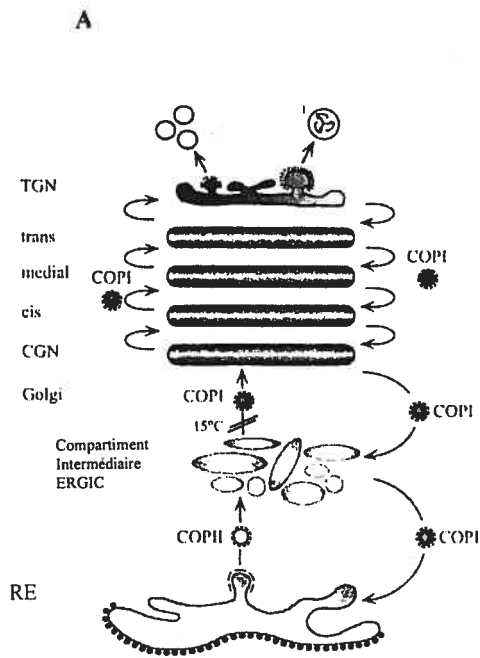
de l'exocytose en se liant avec un t-SNARE de la membrane plasmique, empêchant ainsi la fusion (Popov et Poo, 1993; Buckley, 1994).

### 1.1.4 Transit dans l'appareil de Golgi et le *trans* Golgi Network

Après avoir quitté le réticulum endoplasmique à bord de vésicules de transport, les protéines sécrétées empruntent l'appareil de Golgi après être passées par le compartiment intermédiaire ERGIC. Morphologiquement, l'appareil de Golgi est constitué d'une suite de saccules de forme allongée qui sont fonctionnellement divisées en trois régions distinctes: la région cis, la région médiane et la région trans (voir la figure 1.1). Ces régions se différencient selon la composition en enzymes qui assurent la glycosylation. Il semble bien établi que les vésicules provenant du RER ne fusionnent qu'avec la région cis du Golgi et que le contenu de ces dernières quitte l'appareil de Golgi par le côté opposé formé par la région trans. C'est à l'aide d'expériences biochimiques et morphologiques en système acellulaire que l'on a élucidé les mécanismes de transport entre les saccules du Golgi. Les premières études *in vitro* effectuées par Rothman et coll. en 1984 ont démontré le caractère vectoriel de ce transport qui s'effectue successivement de la région cis à la région médiane, et par la suite, de cette dernière à la région trans. Cependant, deux modèles sont proposés afin d'expliquer la progression des protéines dans l'appareil de Golgi via les vésicules COPI (voir la figure 1.2). Le premier modèle, qui a longtemps prévalu, propose que le transport antérograde, autant que rétrograde, soit effectué par des vésicules COPI (Orci et coll., 2000). Le second modèle propose plutôt que seul le transport rétrograde soit assuré par les vésicules COPI et que le transport antérograde soit effectué par une maturation des saccules (Mironov et coll., 2001). Dans ce

**Figure 1.2 : Modèles de transport intra-Golgien.** Le modèle représenté en A postule que le transport des protéines serait assuré seulement par des vésicules COPI. Le modèle B postule plutôt que le mouvement serait assuré par la maturation progressive des saccules, dans le sens *cis-trans* par leur glissement vers la région distale de l'appareil de Golgi (feuillet *trans*). Le transport rétrograde serait le seul existant et serait assuré par les vésicules COPI. D'après Nickel et Wieland, (1998).





dernier modèle, la progression des protéines se faisant sans que celles-ci ne quittent la lumière du saccule.

Les protéines sécrétées voyagent donc de façon unidirectionnelle d'un compartiment à l'autre dans l'appareil de Golgi et aboutissent dans une structure complexe formée de tubules et de vésicules que l'on appelle réseau trans-golgien (TGN pour «*trans*-Golgi network»). Tout au long de ce voyage, ces protéines entreront en contact avec les protéines résidentes de ces compartiments afin d'acquérir leur forme mature.

#### **1.1.4.1 La rétention dans l'appareil de Golgi**

Les études récentes effectuées sur les protéines résidentes du Golgi ont démontré que ces protéines possèdent un signal de rétention dans leur domaine transmembranaire. Cependant, ce signal n'a pas été défini avec exactitude car dans certains cas, ce sont les régions situées de part et d'autre du domaine transmembranaire ou bien le domaine cytoplasmique qui augmentent l'efficacité de la rétention (Swift et Machamer, 1991; Nilsson et coll., 1991; Munro, 1991; Teasdale et coll., 1992; Wong et coll., 1993; Aoki et coll., 1992; Russo et coll., 1992; Tang et coll., 1992; Burke et coll., 1992).

Un modèle de reconnaissance du signal de rétention fut proposé par Nilsson et Warren en 1994. Ce modèle est basé sur le phénomène d'oligomérisation. En effet, chaque enzyme serait un homodimère où les queues cytoplasmiques seraient liées entre elles et où les domaines transmembranaires des protéines du saccule

interagiraient entre eux. Ces complexes oligomériques seraient exclus des vésicules de transport bourgeonnant, dû à leur trop grosse taille.

Suite à l'observation montrant que la région hydrophobe des domaines transmembranaires des protéines résidentes de l'appareil de Golgi était plus courte que celle des protéines de la membrane plasmique et sachant qu'il existe un gradient de cholestérol dans l'appareil de Golgi (Orci et coll., 1981) Bretscher et Munro (1993) proposèrent un second modèle. Ce modèle suggère le rôle possible de l'épaisseur des membranes du Golgi dans le mécanisme de rétention. Le gradient de cholestérol amènerait un épaissement de la membrane de saccule en saccule, ce qui empêcherait les enzymes d'un compartiment de se retrouver dans le suivant.

#### **1.1.4.2 La rétention dans le TGN**

Les protéines résidentes du TGN ont souvent un mécanisme particulier de rétention, comme c'est le cas pour la furine, où l'on parle plutôt de récupération. En effet, tout comme la TGN38, une autre protéine résidente du TGN, la furine voyage du TGN vers la membrane plasmique, puis retourne au TGN par la voie d'endocytose (Chapman et Munro, 1994). Deux signaux sont localisés dans son domaine cytoplasmique: le premier est une séquence d'acides aminés acides qui seraient le signal de rétention dans le TGN, et le second est un tetrapeptide contenant une tyrosine et qui serait le signal de retour vers le TGN (Vorhees et coll., 1995). La séquence d'acides aminés acides médierait l'internalisation de la furine vers le TGN étant donné que cette séquence additionnée d'une sérine adjacente forme un site de phosphorylation par la caséine kinase II. L'état de phosphorylation de la furine modulerait donc son internalisation (Jones et coll., 1995).

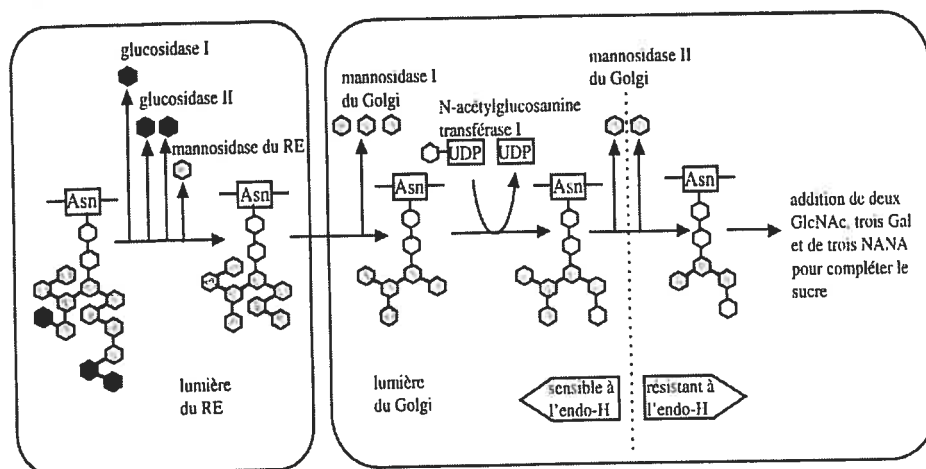
## 1.1.5 Modifications post traductionnelles

Après leur traduction, les protéines ne sont pas tout à fait sous leur forme active car il s'avère souvent que leur activité biologique dépende de certaines modifications co- et post-traductionnelles. Ces modifications sont de plusieurs types et s'effectuent dans divers compartiments cellulaires.

### 1.1.5.1 La *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation s'effectue de façon co-traductionnelle lors de la translocation des protéines naissantes dans le RER. Cette modification consiste en l'addition de chaînes oligosaccharidiques sur la fonction amide des résidus asparagines qui se trouvent dans un environnement Asn-X-Thr/Ser où X ne peut être une proline (Hart et coll., 1979). Cependant, ces séquences ne sont pas toutes glycosylées suggérant que d'autres composantes sont nécessaires pour que la glycosylation ait lieu. La chaîne oligosaccharidique est préformée sur un résidu lipidique appelé dolichol phosphate, et est séquentiellement formée de deux résidus de *N*-acétylglucosamine (GlcNac), de neuf résidus de mannose (Man) et de trois résidus de glucose. Cet oligosaccharide ainsi formé sera transféré en bloc sur le résidu asparagine de la protéine et subira plusieurs modifications par une panoplie d'enzymes. Le schéma résumant les principales étapes de la maturation est montré à la figure 1.3. Après le transfert en bloc, on observe l'élimination rapide de trois résidus glucose par les glucosidases I et II du RER. Il y a ensuite l'enlèvement de un à quatre résidus de mannose par l'action combinée de la  $\alpha$ 1,2-mannosidase du RER et

**Figure 1.3 : La *N*-glycosylation.** Modification du bloc de sucre contenu sur le résidu asparagine (Asn) dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Tiré de « Molecular Biology of the cell », troisième édition, Albert et coll, 1994. UDP : uridine 5'-diphosphate.



de la mannosidase I du cis-Golgi (Farquhar, 1985). La structure de l'oligosaccharide se trouve alors sous forme de haut contenu en mannose. La majorité des glycoprotéines verront leur maturation se poursuivre vers une structure plus complexe. Lorsque ceci se produit, un résidu de GlcNac est ajouté par une transférase, puis vient la coupure de deux résidus mannose (voir figure 1.3). Par la suite, il peut y avoir addition d'autres résidus de GlcNac, de fructose, de galactose et d'acide sialique (Kornfeld et Kornfeld, 1985, Roth, 2002).

Les chaînes oligosaccharidiques semblent jouer plusieurs rôles une fois liées à la protéine. En effet, ces chaînes jouent un rôle dans le repliement final des protéines du RER car une protéine glycosylée mal repliée peut alors entrer en contact avec la calnexine et la calréticuline afin d'obtenir son bon repliement (voir section 1.1.2.1). De plus, pour certaines protéines de sécrétion ou de la membrane plasmique, le transport intracellulaire est perturbé lorsque l'on inhibe la glycosylation. En effet, il a été démontré que lorsque l'on mute l'hormone de croissance, une protéine non-glycosylée, de façon à obtenir un site de glycosylation, on voit sa sécrétion sur le côté apical seulement dans des cellules polarisées. Il appert donc que dans certains cas, la glycosylation soit un signal de ciblage (Scheiffele et coll., 1995).

### **1.1.5.2 La *O*-glycosylation**

La *O*-glycosylation s'effectue de façon post-traductionnelle au niveau de l'appareil de Golgi et consiste en l'addition de sucres sur la fonction hydroxyle des acides aminés sérine ou thréonine (Farquhar, 1985). L'ajout de sucre se fait de façon successive et chaque transfert de glucide est assuré par une glycosyl-transférase spécifique (Han et Martinage, 1992). Les chaînes ainsi formées peuvent comprendre de deux à vingt résidus. La *O*-glycosylation la plus connue est celle impliquant la

liaison d'un résidu de *N*-acétylgalactosamine à la protéine. Les autres sucres utilisés le plus fréquemment sont les résidus galactose et les résidus d'acide sialique. La fonction exacte de la *O*-glycosylation est encore méconnue. Cependant, il a été observé que cette modification post-traductionnelle entraînait une plus grande résistance aux protéases et influençait grandement la dimension et la structure tridimensionnelle de certaines protéines (Jintoft, 1990).

### 1.1.5.3 La sulfatation et la phosphorylation

La sulfatation s'effectue au niveau du *trans*-Golgi et du TGN sur la fonction hydroxyle de la tyrosine (Baeuerle et Huttner, 1987). Cette sulfatation des résidus tyrosine a pour but de moduler l'activité biologique des protéines cibles. Par exemple, l'activité de la gastrine est fortement augmentée par l'addition d'un groupement sulfate (Jensen et coll., 1980; Johnson, 1976). À l'opposé, l'activité de la leu-enképhaline et de la dermorphine est totalement inhibée si celles-ci sont sulfatées (Unsworth et coll., 1982). La sulfatation s'effectue aussi au niveau des chaînes d'oligosaccharides. En effet, la thyroglobuline est sulfatée sur ses tyrosines ainsi que sur ses sucres (Cauvi et coll., 2003). Les glycosaminoglycans (GAGs) sont aussi sulfatés durant leur passage dans le TGN (Hansen et coll., 1999).

La phosphorylation au niveau du Golgi peut s'effectuer sur une chaîne glucidique ou sur un acide aminé. Seules les enzymes lysosomales subiront une phosphorylation sur un résidu mannose de leurs chaînes d'oligosaccharides. Le rôle de cette modification consiste à cibler les enzymes vers les lysosomes (voir section 1.1.6.1). La phosphorylation des résidus sérine, thréonine et tyrosine est un phénomène très connu. La caséine et le neuropeptide ACTH sont phosphorylés lors de leur passage au niveau de l'appareil de Golgi. Cependant, le rôle de cette



modification post-traductionnelle pour les protéines de sécrétion n'a pas encore été déterminé.

#### **1.1.5.4 L'acétylation et l'amidation**

L'acétylation est un processus qui s'effectue rarement sur les protéines sécrétées (Tsunasawa et Sakiyama, 1984). Quelques protéines de sécrétion comme l'hormone de croissance sont acétylées co-traductionnellement à leur extrémité N-terminale dans le RER. Par contre, cette modification s'effectue de façon post-traductionnelle, au niveau des grains de sécrétion, pour la  $\beta$ -endorphine et l'hormone mélanotrope ( $\alpha$ -MSH) (Dores et coll., 1993). L'acétylation a pour rôle de moduler l'activité biologique de l' $\alpha$ -MSH et de la  $\beta$ -endorphine, en activant et inactivant respectivement ces deux neuropeptides.

L'amidation est aussi une modification post-traductionnelle qui s'effectue dans les grains de sécrétion. Cependant, seuls les tissus neuronaux et endocriniens possèdent l'outillage nécessaire à cette modification. À titre d'exemple, la substance P, l'oxytocine, l' $\alpha$ -MSH et le facteur de relâche de l'hormone de croissance sont des protéines amidées. Le processus d'amidation est catalysé par la «peptidyl-glycine alpha amidating monooxygenase» ou PAM qui clive le groupement glyoxylate d'un résidu glycine situé à l'extrémité C-terminale. Ceci résulte en une protéine amidée à son extrémité C-terminale par le groupement amine de la glycine (Eipper et Mains, 1988). Cette modification est importante pour l'activité biologique et la stabilité d'un grand nombre d'hormones peptidiques (Bradbury et Smith, 1991).

### 1.1.5.5 Maturation des précurseurs

Beaucoup de protéines incluant des hormones et des neuropeptides sont d'abord synthétisées sous la forme de précurseurs. Plusieurs de ces précurseurs contiennent dans leur séquence plus d'un peptide biologiquement actif. Les séquences de ces hormones ou neuropeptides sont délimitées par une arginine ou un doublet d'acides aminés basiques (Lys-Arg, Arg-Arg ou Arg-Lys). La maturation des précurseurs, via des coupures protéolytiques spécifiques, est donc essentielle pour libérer l'hormone du précurseur. Cette maturation protéolytique est effectuée par une enzyme de type trypsine. La première enzyme de maturation de précurseur à avoir été caractérisée est la protéine Kex2. Cette enzyme provient de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et libère le facteur  $\alpha$  de son précurseur (Julius et coll., 1984). Kex2 est une protéase membranaire à sérine qui est dépendante du calcium. Elle a un pH optimal neutre et a plusieurs homologues de séquence avec les subtilisines, une classe de protéases bactériennes à sérine (Fuller et coll., 1988). Plusieurs études ont démontré que la protéine Kex2 possède la capacité de maturer quelques protéines de mammifères telles la proalbumine humaine (Bathurst et coll., 1987) et la proopiomélanocortine (Thomas et coll., 1988; Zollinger et coll., 1990; Germain et coll., 1990). Ces études suggèrent donc qu'une protéine homologue à Kex2 existerait dans les cellules de mammifères.

Suite au clonage de la furine humaine en 1986 par Robroek et ses collaborateurs, des études portant sur sa séquence ont montré qu'une partie de la furine possédait plus de 50% d'identité avec le site catalytique de la protéine Kex2, suggérant que la furine pourrait être une convertase à sérine (Fuller et coll., 1989). De plus, plusieurs études vinrent montrer que la furine pouvait cliver plusieurs précurseurs tels le précurseur du facteur von Willebrand (Van de Ven et coll., 1990),

le facteur de croissance de pro- $\beta$ NGF (Bresnahan et coll., 1990), la proalbumine (Misumi et coll., 1990; Brennan et Peach, 1991) et l'hémagglutinine (Stieneke-Grober et coll., 1992).

Depuis quelques années, plusieurs études se sont concentrées sur l'isolement des convertases de mammifères à l'aide de la technologie de l'amplification de l'ADN par PCR («polymerase chain reaction»). Utilisant des oligonucléotides dérivés des séquences conservées entre les protéines Kex2, furine et subtilisine, plusieurs convertases furent clonées. Jusqu'à maintenant, sept convertases spécifiques aux sites mono- et dibasiques ont été caractérisées, soit: la furine aussi appelée PACE, PC1 aussi désigné sous le nom de PC3 (Seidah et coll., 1990; Seidah et coll., 1991; Smeekens et coll., 1991), PC2 (Seidah et coll., 1991; Smeekens et Steiner, 1990), PACE4 (Kiefer et coll., 1991), PC4 (Nakayama et coll., 1992; Seidah et coll., 1992a), PC5 (Lusson et coll., 1993) qui est aussi appelée PC6A (Nakagawa et coll., 1993a), PC6B qui serait une isoforme de PC6A (Nakagawa et coll., 1993b) et PC7 (Seidah et coll., 1996; Constam et coll., 1996). Récemment, deux autres convertases de type subtilisine furent caractérisées : SKI-1 et NARC-1 (Seidah et coll., 1999 ; Seidah et coll., 2003). Cependant, ces convertases ne sont pas spécifiques aux résidus basiques.

Ces convertases font partie de la famille des protéases à sérine du type subtilisine et contiennent toutes un domaine catalytique formé des acides aminés sérine, histidine et acide aspartique. De plus, un résidu asparagine situé près de la triade catalytique joue un rôle important dans le mécanisme catalytique. Chez PC2, cette asparagine est remplacée par un acide aspartique. Cette substitution amène le pH optimum dans un environnement plus acide, ce qui rendrait PC2 plus efficace au niveau des grains de sécrétion. Les convertases ont toutes un peptide signal clivable, une région pro qui serait impliquée dans le repliement final de l'enzyme, un domaine

structurel ainsi qu'un domaine C-terminal unique à chaque convertase. La furine, PC6B, SKI-1 et PC7 se différencient par le fait qu'elles comportent chacune un domaine transmembranaire. Les convertases sont elles-mêmes synthétisées sous forme de précurseur et leur maturation a lieu à l'intérieur de la voie de sécrétion. En effet, pro PC1 est maturé en PC1 à un pH optimal situé entre 7,0 et 8,0 de façon calcium dépendante. Ceci suggère que cette maturation s'effectue au RER. Cependant, une seconde protéolyse du propeptide dans le TGN permet l'activation maximale de l'enzyme. De plus, la mutation de l'acide aspartique de la triade catalytique inhibe cette maturation, démontrant qu'elle se produit de façon autocatalytique. Quant à la maturation de pro PC2, il semblerait qu'elle aurait lieu au niveau du TGN ou des grains de sécrétion étant donné que le pH optimum où a lieu la maturation se trouve entre 5,5 et 6,0 et est dépendante du calcium (Sheenan et coll., 1995). La localisation intracellulaire des convertases montre que la furine est localisée au niveau du TGN ainsi qu'à la surface cellulaire. Il a été démontré que la furine voyageait entre la surface cellulaire et le TGN et qu'elle se colocalisait avec TGN38, une protéine résidente du TGN (Molloy et coll., 1994). Il fut aussi démontré que PC1 se localisait au TGN et qu'elle était transportée dans l'extrémité des extensions des cellules AtT20, plus précisément dans les grains de sécrétion (Hornby et coll., 1993).

Suite à l'analyse de la distribution des ARNm des différentes convertases, on a montré que chacune d'elles possédaient une distribution tissulaire unique (Seidah et coll., 1994). La furine, PACE4 et PC7 sont largement distribués à travers tous les tissus. Par contre, seulement la furine et PC7 sont vraiment ubiquitaires (Constam et coll., 1996). Les convertases PC1 et PC2 sont principalement exprimées dans les cellules possédant des grains de sécrétion. PC4 se retrouve dans les cellules germinales des testicules. La PC5, quant à elle, se retrouve dans plusieurs lignées cellulaires avec ou sans grains de sécrétion, mais est moins exprimée que la furine et

PACE4 (Seidah et coll., 1994). Finalement, les convertases PC1 et PC2 sont les deux principales enzymes impliquées dans la maturation des prohormones.

La spécificité de clivage de PC1 et de PC2 a été étudiée à l'aide de virus recombinants de la vaccine exprimant ces deux enzymes ainsi que différents précurseurs et ce, dans diverses lignées cellulaires. C'est ainsi qu'on a démontré que PC1 clive la proopiomélanocortine pour donner l'ACTH, la  $\beta$ -lipotropine (BLPH), le joining peptide et le fragment N-terminal 1-80. PC2 clive la proopiomélanocortine en  $\beta$ -endorphine,  $\alpha$ -MSH et en un fragment N-terminal 1-107 (Benjannet et coll., 1991; Seidah et coll., 1992b). La prorénine humaine est clivée par PC1 et non par PC2 dans les cellules GH4 qui contiennent la voie de sécrétion régulée (Seidah et coll., 1993). Lorsque l'on co-transfecte la prosomatostatine dans les cellules AtT20 avec différentes convertases, celle-ci est clivée par PC2 pour donner la somatostatine S-14 alors qu'elle est clivée par PACE 4 pour donner les formes S-28 et S-14 dans les cellules LoVo qui ne possèdent pas de voie de sécrétion régulée (Brakch et coll., 1995). Cependant, la prosomatostatine est clivée par SKI-1 pour générer l'antrine (PSST 1-10) lorsque l'on co-transfecte ces deux protéines dans les cellules COS-1 (Mouchantaf et coll., 2004). Cette coupure ne requiert donc pas le site Lys comme proposé (Pradaysol et coll., 1980; Rabbani et Patel, 1990).

Après le clivage protéolytique du côté C-terminal des paires d'acides aminés basiques, une seconde étape implique l'enlèvement de ces résidus. Cette réaction est effectuée par l'enzyme carboxypeptidase E. Cette enzyme est une glycoprotéine d'environ 50 kDa, ayant un pH optimal entre 5 et 6, et est stimulée par le cobalt, ce qui la différencie des carboxypeptidases lysosomales (Fricker et Snyder, 1983). L'activité de cette enzyme est largement distribuée dans le système nerveux central et

sa séquence révèle une forte homologie avec les carboxypeptidases A et B (Fricker et coll., 1986). Elle existe tant sous une forme soluble que liée à la membrane.

### **1.1.6 Ciblage à partir du TGN**

Une fois que les protéines ont traversé l'appareil de Golgi, elles aboutissent dans un réseau complexe constitué de vésicules et de tubules appelé TGN pour «*trans-Golgi Network*». C'est au niveau de cette structure que s'effectue le mécanisme de triage des protéines en transit dans le système vacuolaire central. C'est donc dans ce compartiment que se départageront les protéines destinées aux lysosomes, à la membrane plasmique ou à l'espace extracellulaire. Certaines cellules spécialisées telles les cellules exocrines, endocrines et neuronales ont développé des mécanismes de tri très spécifique au niveau du TGN qui permettent de diriger les protéines de sécrétion soit vers les vésicules de transport, qui les dirigeront très rapidement vers l'espace extracellulaire, soit vers les grains de sécrétion, où elles seront emmagasinées jusqu'à la stimulation de leur relargage. La façon par laquelle s'effectue ce triage pour les protéines de sécrétion est encore mal connue. On peut par contre imaginer que chaque molécule devant être triée au niveau du TGN possède un déterminant moléculaire précisant une destination finale et que ce déterminant puisse être reconnu par un récepteur spécialisé. Dans les prochaines sections, nous résumerons les connaissances actuelles à propos des mécanismes moléculaires régissant le triage des protéines solubles au niveau du TGN.

### 1.1.6.1 Ciblage des enzymes lysosomales

Les enzymes lysosomiales partagent la même voie de biosynthèse que les protéines de sécrétion et membranaires. Ces enzymes doivent donc être triées et acheminées vers les lysosomes. Reitman et Kornfeld (1981) ont identifié le déterminant moléculaire responsable de la ségrégation de ces enzymes. En effet, ils ont démontré que l'acquisition d'un phosphate sur un oligosaccharide en haut contenu en mannose formait le déterminant responsable de la ségrégation. Cette structure est ajoutée par une phosphotransférase qui transfère un résidu *N*-acétylglucosamine 1-phosphate au carbone six d'un groupement mannose (Waheed et coll., 1981). Cette phosphotransférase assure la sélectivité de la modification aux enzymes lysosomales en reconnaissant une structure tridimensionnelle présente seulement sur ces enzymes (Reitman et Kornfeld, 1981). En effet, le groupe de Kornfeld a étudié cette structure avec comme modèle, des chimères de la cathepsine D et du pepsinogène. Ils ont démontré que certains résidus dispersés dans la séquence primaire se regroupaient tridimensionnellement et formaient ainsi un domaine potentiel de reconnaissance par la phosphotransférase (Baranski et coll., 1991).

Dans une deuxième étape, une phosphodiester  $\alpha$ -*N*-acétylglucosaminosidase localisée dans l'appareil de Golgi enlève le résidu *N*-acétylglucosamine, ce qui permet d'exposer le signal de ciblage formé par le mannose 6-PO<sub>4</sub> (Waheed et coll., 1981; Deutscher et coll., 1983). Ce résidu sera reconnu par des récepteurs spécifiques situés au niveau du TGN (Kornfeld, 1986). Deux récepteurs ont été isolés et caractérisés. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, qui possèdent respectivement une masse moléculaire de 275 kDa (Sahagian et coll., 1981) et de 46 kDa (Hoflack et Kornfeld, 1985). Le récepteur de 46 kDa lie son ligand de façon plus efficace en présence de cations bivalents. Le complexe ligand-récepteur sera emballé dans des

vésicules enrobées de clathrine et ciblé vers les endosomes pré-lysosomaux. La baisse de pH dans ces organites assure la dissociation du ligand. Le récepteur sera ensuite recyclé vers le TGN via des vésicules et le reste de l'endosome fusionnera avec le lysosome (Brown et coll., 1986).

### **1.1.6.2 Ciblage vers la voie de sécrétion régulée**

Suite à la comparaison de séquences de différentes protéines de la voie régulée, aucune séquence primaire homologue pouvant servir de signal de ciblage ne fût trouvée. Il est donc improbable que le signal responsable du ciblage vers la voie régulée soit de même nature que la plupart des signaux de ciblage ou de rétention trouvés jusqu'à maintenant. Il serait par contre possible que certains résidus adjacents tridimensionnellement et régissant le ciblage soient séparés dans la séquence primaire. Ceci rendrait l'identification du signal très difficile. Jusqu'à maintenant, plusieurs études ont porté sur l'identification d'un tel signal de ciblage vers la voie de sécrétion régulée. Il fut démontré que ce signal n'était pas localisé au niveau du peptide signal dans le cas du préprotrypsinogène (Burgess et coll., 1987), de la préprosomatostatine (Sevarino et coll., 1989) et de la préprorenine (Chu et coll., 1990). Il ne semble pas non plus que ce signal puisse être inclus dans la région pro de quelques protéines telles la protrypsinogène (Burgess et coll., 1987), la proinsuline (Powell et coll., 1988), la prorénine (Chu et coll., 1990; Chidgey et Harrison, 1990), la proenképhaline (Albert et Liston, 1993). Cependant, l'équipe de Sevarino a pourtant proposé la région pro de la prosomatostatine comme responsable de son ciblage vers la voie de sécrétion régulée lorsque l'on fusionnait cette région pro avec une protéine de la voie constitutive (Sevarino et coll., 1989). Par la suite, ce même groupe a montré que plusieurs délétions effectuées dans la région pro n'influençaient pas le ciblage vers les grains de sécrétion et a suggéré la présence de signaux



redondants situés à la fois dans les régions pro et hormonales de la prosomatostatine (Sevarino et Stork, 1991). Plus récemment, il fut démontré qu'une hélice  $\alpha$  présente dans la région N-terminale de la prosomatostatine était responsable de son ciblage vers la voie de sécrétion régulée. En effet, la délétion du segment contenant l'hélice résulte en la sécrétion constitutive du précurseur (Mouchantaf et coll., 2002). Il a aussi été démontré récemment que le site de clivage de la prorénine en rénine était responsable de son ciblage vers la voie régulée. En effet, la mutation de ce site, ou sa délétion, résulte en la sécrétion constitutive de ce peptide (Brechler et coll., 1996).

Une stratégie générale utilisée afin de localiser le signal de ciblage est l'expression hétérologue de différentes protéines de la voie de sécrétion régulée dans diverses lignées cellulaires endocriniennes ou neuronales. Les lignées généralement utilisées sont les cellules GH3 dérivées d'une tumeur de l'hypophyse de rat ; les cellules GH4 dérivées des cellules GH3 par propagation sériée (ces deux types cellulaires sécrètent la prolactine, mais ont différents niveaux d'expression de l'hormone de croissance (Dannies et Tashjian, 1973)) ; les cellules PC12 dérivées d'un phéochromocytome de rat et qui sécrètent la neurotensine ; les cellules Rin 5F dérivées d'un insulinome de rat et qui produisent de l'insuline ; les cellules Neuro 2A qui proviennent d'un neuroblastome de souris et, finalement, les cellules AtT20 dérivées d'une tumeur du lobe antérieur de l'hypophyse de souris et qui sécrètent l'ACTH. Suite à l'application de cette stratégie, la conclusion tirée fut que le mécanisme de ciblage semblait universel car peu importe l'origine de la protéine (exocrine, endocrine ou neuroendocrine), celle-ci était correctement ciblée vers la voie de sécrétion régulée de cellules d'origine endocrine, exocrine ou neuroendocrine. Cependant, cette théorie universelle fut mise en doute par le groupe de Rindler qui démontra que la protéine GP-2, une protéine majeure de la membrane des grains du pancréas exocrine, était ciblée vers la voie constitutive dans les cellules AtT20. Cette

même protéine se retrouve dans les grains de sécrétion lorsqu'elle est transfectée dans les cellules AR42J (une lignée dérivée du pancréas exocrine). Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'amylase, une protéine de la voie régulée des acinis pancréatiques (Colomer et coll., 1994). Ces résultats suggèrent l'existence de deux mécanismes différents pour l'entrée des protéines dans la voie de sécrétion régulée dans les cellules exocrines et neuroendocrines. Cependant, il est à noter que le trypsinogène exocrine exprimé dans les cellules AtT20 d'origine endocrine se retrouve dans la voie de sécrétion régulée (Burgess et coll., 1985).

Une autre stratégie souvent utilisée pour étudier le signal de ciblage des protéines de la voie régulée est la fusion entre une protéine de cette voie et une protéine de la voie constitutive. Cette stratégie peut mettre en évidence un signal positif car si une des protéines porte un signal et l'autre pas, la chimère se retrouvera dans la voie nécessitant un signal positif. De plus, si chacune des protéines comporte un signal et que l'un domine l'autre, la chimère se retrouvera dans la voie du signal dominant. La chimère créée par la fusion entre la protéine G tronquée du virus de la stomatite vésiculeuse, une protéine se trouvant dans la voie constitutive, et l'hormone de croissance est acheminée vers les grains de sécrétion (Moore et Kelly, 1986). De la même façon, la chimère formée du prépropeptide de la somatostatine I de la lotte et de l' $\alpha$ -globine de chimpanzé (protéine cytoplasmique) est dirigée vers la voie de sécrétion régulée dans les cellules GH3. De plus, la fusion entre les 241 premiers acides aminés de la préproenképhaline de rat et l'extrémité C-terminale de la prodermophine de grenouille (protéine de la voie constitutive) est dirigée vers la voie régulée dans les cellules AtT20 (Seethaler et coll., 1991). Finalement, une étude démontra que l'expression d'un anticorps dirigé contre la protéine régulée sécrétogranine I dans les cellules PC12 résulte en la présence de cet anticorps dans les grains de sécrétion. L'expression d'un anticorps contre une protéine non-exprimée

dans les cellules PC12 amène sa localisation dans la voie constitutive (Rosa et coll., 1989). Tous ces résultats sont en faveur de la présence d'un signal positif ou dominant pour les protéines de la voie de sécrétion régulée.

L'environnement particulier présent dans le TGN et les grains de sécrétion a aussi été la cible d'études sur le ciblage des protéines vers la voie régulée. Le pH très acide de ces organites, 5,9 pour le TGN et de 5,2 à 5,5 pour les grains (Demaurex et coll., 1998; Johnson, 1987), a été mis en cause par quelques groupes. Il semblerait que l'addition de neutralisateur de pH, comme la chloroquine ou le chlorure d'ammonium, inhibe l'accumulation des protéines dans les grains de sécrétion (Moore et coll., 1983a; Stoller et Shields, 1989; Gerdes et coll., 1989). Un environnement acide semble donc être une composante importante du ciblage des protéines vers la voie régulée de sécrétion. La concentration en calcium du TGN est aussi une caractéristique du TGN. En effet, la concentration en calcium augmente en gradient le long du système vacuolaire central, passant de 3 mM dans le RER à environ 10 mM au niveau du TGN et de 20 à 50 mM dans les grains de sécrétion (Sambrook, 1990; Bulenda et Gratzl, 1985).

Suite à l'observation en microscopie électronique de la formation de noyaux denses au niveau du TGN composés de protéines de la voie régulée, on a postulé que l'agrégation sélective des protéines était une étape essentielle dans le processus de ciblage (Kelly, 1985; Burgess et Kelly, 1987; Pfeffer et Rothman, 1987; Huttner et coll., 1988; Gerdes et coll., 1989; Huttner et Tooze, 1989; Tooze et coll., 1989b). Cet agrégation serait le résultat de la concentration en calcium élevée et du pH acide du TGN (Farquhar et Palade, 1981; Orci et coll., 1987; Tooze et coll., 1987b). Ainsi, les protéines de la voie régulée, dû à leurs propriétés physiques, s'agrègeraient dans cet environnement. L'agrégat exclurait les protéines destinées à la voie constitutive qui

resteraient en solution. Plusieurs études ont suggéré que certaines protéines jouaient un rôle dans l'agrégation des protéines de la voie régulée. En effet, il fut proposé que les granines, qui sont des protéines présentes dans les grains des cellules neuroendocriniennes, favorisent l'agrégation d'autres protéines (Krömer et coll., 1998). La chromogranine A, l'hormone lutéinisante et l'hormone de croissance sont incapables de s'agréger lors d'essais d'agrégation *in vitro*. Par contre, suite à l'ajout d'extrait de grains de sécrétion pituitaires, ces protéines peuvent alors co-agréger. De plus, la prolactine qui a la capacité de s'autoagréger, agirait comme partenaire d'agrégation dans les grains de sécrétion (Colomer et coll., 1996).

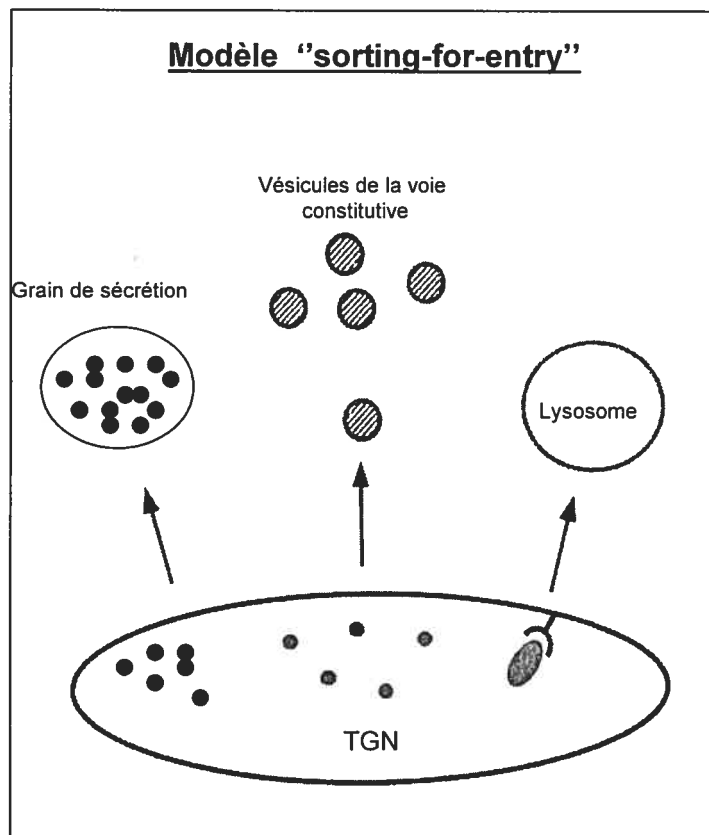
Comme suite à toutes les études portant sur l'identification du signal de ciblage ou à l'environnement physique du TGN, deux hypothèses différentes ont vu le jour pour expliquer la sélection du contenu protéique des grains de sécrétion. Il est à noter que ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs. Le premier modèle repose sur la proposition que le TGN agit comme premier opérateur pour le ciblage des protéines vers la voie régulée. Ce modèle appelé «Sorting-for-entry» postule l'existence d'un ou plusieurs récepteurs associés au TGN, qui seraient responsables du triage et du ciblage au niveau du TGN (Moore et coll., 1989; Kelly, 1987, Tooze, 1998). Puisqu'aucun récepteur n'est assez abondant pour lier stoechiométriquement dans un rapport un pour un les protéines régulées, ce modèle propose plutôt que les récepteurs lieraient les agrégats formés par ces protéines, en excluant les protéines solubles de la voie constitutive (voir figure 1.4) (Thiele et coll., 1997). Évidemment, l'identification d'un tel récepteur faisant office d'expéditeur à partir du TGN, et la découverte d'un domaine structural présent sur les protéines régulées qui interagirait avec ce récepteur viendraient appuyer ce modèle. Une étude récente a proposé la carboxypeptidase E (CPE) comme récepteur. La CPE pourrait diriger les protéines vers les grains d'une façon entièrement indépendante de son activité enzymatique

(Cool et coll., 1997; Shen et Loh, 1997). Ce rôle potentiel de la CPE est basé en grande partie sur des études des tissus neuroendocriniens des souris  $Cpe^{fat}/Cpe^{fat}$  qui n'expriment pas de CPE. Ces cellules montrent une diminution de la maturation de plusieurs polypeptides hormonaux et une déficience dans l'accumulation des protéines dans les grains de sécrétion (Shen et Loh, 1997). De plus, Loh et son équipe démontrèrent des caractéristiques de la CPE attribuables aux récepteurs. En effet, la CPE lie la queue N-terminale de la proopimélanocortine (POMC), ce lien étant rompu par compétition avec d'autres protéines de la voie régulée mais pas avec des protéines constitutives. Donc, le défaut de maturation dans les souris  $Cpe^{fat}/Cpe^{fat}$  fut postulé comme reflétant seulement le mauvais ciblage des prohormones vers les grains de sécrétion.

Cependant, ces résultats ont été mis en doute par d'autres groupes qui ont répété les expériences sur les souris  $Cpe^{fat}/Cpe^{fat}$  et sur des cellules d'îlots de Langherans de ces souris. Leurs résultats démontrent que l'insuline est correctement ciblée vers les grains chez ce mutant (Varlamov et coll., 1997; Irminger et coll., 1997). Parallèlement aux études sur la CPE, il fut mis en évidence que les extrémités N-terminales de la POMC et de la chromogranine B (CgB) contiennent un motif conformationnel en forme de courte boucle formé par un pont disulfure qui serait responsable du ciblage de ces protéines dans les grains via une liaison à la membrane du TGN (Chanat et coll., 1993). Cependant, de nouvelles recherches ayant démontré que le pont disulfure n'est apparemment pas impliqué dans la liaison de la CgB à la membrane, viennent affaiblir cette hypothèse (Yoo, S.H et Kang, Y.K, 1997). De plus, cette boucle n'est pas présente sur chacune des protéines régulées et pourrait l'être sur quelques protéines constitutives. Il semblerait donc prématuré d'affirmer l'existence d'un seul système ligand-récepteur responsable du ciblage vers la voie régulée.

**Figure 1.4 : Modèle de sécrétion : « Sorting-for-entry ».**

Dans ce modèle, le ciblage vers les différentes voies de sécrétion s'effectue à partir du TGN. Ce ciblage se fait de façon spécifique par des récepteurs.



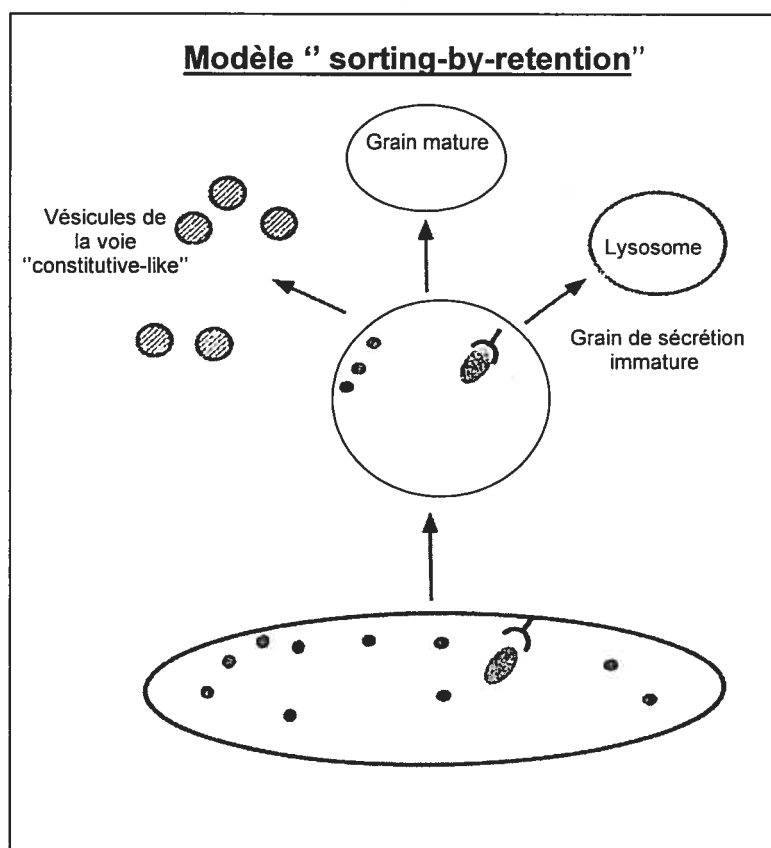
Le second modèle proposé pour expliquer la sélection vers la voie régulée repose sur la considération que les grains immatures seraient une extension fonctionnelle du TGN où s'effectuerait le triage. Ces grains seraient pourvus de mécanismes de triage, tout comme le TGN, et pourraient déterminer quelles protéines seraient aptes à poursuivre leur chemin vers les grains matures (Arvan et Castle, 1992, Tooze, 1998). Ce modèle appelé «Sorting-by-retention» propose que l'entrée des protéines dans la voie régulée ne soit pas dépendante d'un triage actif au niveau du TGN. En effet, les protéines non-associées directement ou indirectement à la membrane limitante pourraient entrer dans la phase fluide de chacune des vésicules dérivées du TGN, donc directement en fonction du volume disponible dans les vésicules en partance. Le ciblage des protéines régulées, selon ce modèle, serait exécuté de façon passive et simultanée avec l'exclusion des vésicules immatures d'une catégorie de protéines. Cette exclusion s'effectuerait via un récepteur ou seulement par exclusion (par bourgeonnement) de la phase fluide contenant les protéines non agrégées (voir Figure 1.5). Donc, les associations intermoléculaires formées par les protéines régulées seraient responsables de leur rétention efficace au niveau des grains matures. Ce modèle a été élaboré suite à l'étude des cellules  $\beta$  du pancréas où la proinsuline est la protéine majeure des grains immatures (Huang et Castle, 1995). Les hexamères formés par la proinsuline ne forment pas de complexes (Steiner, 1973), cependant l'insuline mature s'agrège et augmente ainsi son efficacité d'emmagasinage dans les grains (Arvan et coll., 1991). Par opposition, le peptide-C nouvellement formé demeure soluble et montre une prédisposition à sortir des grains via une voie de sécrétion appelée «constitutive-like». De plus, les hydrolases acides du lysosome semblent être co-transportées à l'extérieur des grains immatures vers le lysosome (Kuliawat et Arvan, 1994). En appui à cette observation, une étude morphologique a démontré l'existence de vésicules enrobées de clathrine qui



bourgeonnaient des grains immatures (Kuliawat et coll., 1997; Tooze et Tooze, 1986; Orci et coll., 1985; Orci et coll., 1987). De plus, des agents bloqueurs de la perte de clathrine des grains dans les cellules inhibent la sécrétion de protéines marquées vers la voie «constitutive-like» (Kuliawat et Arvan, 1992). Ces résultats appuient l'hypothèse voulant que le bourgeonnement vésiculaire des grains immatures joue un rôle important dans le ciblage à la voie régulée et apportent des éléments nouveaux sur l'existence d'une nouvelle voie de sécrétion.

**Figure 1.5 : Modèle de sécrétion : « Sorting-by-retention ».**

Ce modèle propose plutôt les grains immatures comme compartiment de sélection. Le triage s'y effectuerait de façon passive par maturation des grains lors de l'exclusion des protéines non agrégées, soit par liaison à un récepteur ou par bourgeonnement de la phase fluide.



## 1.2 La prosomatostatine

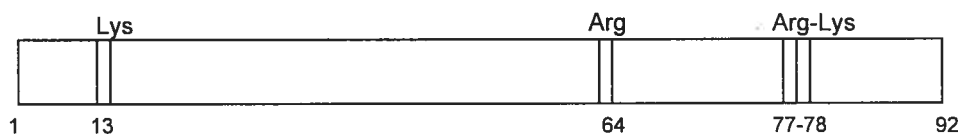
Les connaissances détaillées de la structure primaire de la prosomatostatine et de ses fragments maturés font de cette protéine un bon modèle d'étude pour la maturation de précurseurs. La prosomatostatine humaine est encodée dans un seul gène qui est exprimé dans les cellules du système nerveux central, des îlots pancréatiques et du tube gastrointestinal (Spiess et Vale, 1980; Bravo et coll., 1980; Goodman et coll., 1983; Morel et coll., 1989). Ce gène code pour un polypeptide de 92 acides aminés, précédé d'un peptide signal de 24 acides aminés (Montminy et coll., 1984). La prosomatostatine possède trois sites de clivage reconnus par les convertases. La maturation s'effectue principalement dans la portion C-terminale de la protéine et génère deux formes bioactives: la somatostatine-14 (S-14) et la somatostatine-28 (S-28) (Patel et O'Neil, 1988) qui sont le résultat de coupures au niveau du doublet Arg-Lys en position -2 et -1, respectivement, et au niveau du résidu Arg en position -15 par rapport à l'extrémité N-terminale du peptide S-14 (voir Figure 1.6). De plus, un second site monobasique Lys en position -66, donc en N-terminal du précurseur, est aussi proposé comme site de coupure. Cette coupure générerait un peptide de 10 acides aminés suite à l'enlèvement de deux résidus par la CPE (Pradaysol et coll., 1980; Rabbani et Patel, 1990). Cependant, il a été démontré récemment que ce peptide, nommé antrine, était plutôt clivé par SKI-1 en amont du site Lys -66 (Mouchantaf et coll., 2004).

La séquence de ces sites de clivage a été totalement conservée au cours de l'évolution chez les vertébrés (Benoit et coll., 1990; Argos et coll., 1983; Conlon, 1990). Les deux peptides S-14 et S-28 montrent des activités biologiques comme l'inhibition de la sécrétion d'insuline, de glucagon et de l'hormone de croissance

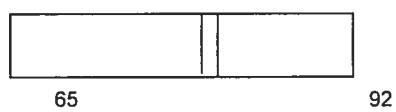
(Reichlin, 1983). Cependant, leur distribution n'est pas homogène; le peptide S-14 est prédominant dans le cortex alors que l'hypothalamus présente des proportions équivalentes de S-14 et de S-28. La S-28 est aussi retrouvée au niveau du petit intestin (Patel et coll., 1998; Gomez et coll., 1983). Cette maturation spécifique peut être expliquée par la présence de différentes enzymes de maturation dans les cellules ou par le ciblage spécifique du précurseur vers différentes voies de sécrétions.

**Figure 1.6: Schéma représentant la prosomatostatine et ses produits de maturation.**

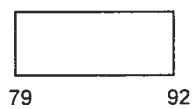
PSS: prosomatostatine, S-28: somatostatine-28, S-14: somatostatine-14, PSS-1-10: prosomatostatine-1-10



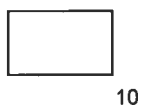
PSS



S-28



S-14

PSS-1-10  
Antrine

### **1.3 But du travail**

Le ciblage des protéines au niveau du TGN implique la présence d'un ou de plusieurs signaux afin que ces dernières atteignent leur destination finale dans la cellule. Dans le cas de la ségrégation des protéines vers la voie de sécrétion régulée, ces signaux sont encore méconnus. Une des hypothèses avancées jusqu'à maintenant repose sur l'existence d'une composante responsable de la reconnaissance d'un signal porté par les protéines destinées à cette voie de sécrétion régulée. Ce signal pourrait être formé d'acides aminés contigus ou d'une structure tridimensionnelle particulière.

Le but de ce travail est de développer un modèle d'étude afin de mieux caractériser la nature du signal de ciblage vers la voie de sécrétion régulée. Pour ce faire, la prosomatostatine humaine fut exprimée par transfection stable de son ADNc dans la lignée cellulaire AtT20. Nous avons d'abord produit des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre la région pro de la prosomatostatine afin de suivre la protéine entière dans la cellule. Puis, à l'aide du génie génétique, nous avons construit deux protéines de fusion. La première protéine de fusion consiste en la prosomatostatine fusionnée à son extrémité C-terminale à un peptide provenant de la protéine hémagglutinine A (HA) du virus influenza. Étant donné l'existence d'anticorps commerciaux dirigés contre ce peptide, cette stratégie nous donne aussi la possibilité de suivre notre modèle d'étude dans la cellule. La deuxième protéine de fusion consiste en l'amylase pancréatique du rat fusionnée au N-terminal de la prosomatostatine humaine. Cette stratégie permettra de démontrer si l'amylase, une protéine dirigée vers la voie constitutive dans les cellules AtT20, pourra être déviée vers la voie régulée lorsqu'elle est jumelée avec une protéine empruntant cette voie. Ces



résultats permettront de préciser si le signal porté par la prosomatostatine est dominant lors du ciblage de cette chimère à partir du TGN.

## **CHAPITRE 2- MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1 Matériel**

Le vecteur pGEX-2T a été acheté chez Pharmacia alors que les vecteurs pRc/CMV proviennent de chez INVITROGEN. Toutes les enzymes de restriction et de modification proviennent de chez Pharmacia sauf la DNA polymérase thermostable Deep Vent et le tampon pour la réaction de PCR qui proviennent de chez NEB. Les produits radioactifs proviennent de chez ICN. Les billes Glutathione Sepharose 4B ont été achetées chez Pharmacia et la thrombine chez Sigma. La protéine A-Sépharose CL-4B provient de chez Pharmacia. Les anticorps anti-Amylase, anti-Somatostatine S28 et S14 sont un don du Dr. Denis LeBel. Les anticorps anti-HA (Hemagglutinine A) sont produits dans notre laboratoire. Tous les produits de culture cellulaire ainsi que les godets montés sur lame de microscope ont été obtenus chez Gibco-BRL. Les pétris de 100 mm de diamètre utilisés pour la culture des cellules sont de Corning. La lignée cellulaire AtT20 provient de chez American Type Cell Culture. Les tubes de polypropylène utilisés pour les transfections proviennent de chez Sarstedt. La bréfeldine A et le 8-Br-cAMP proviennent de chez Sigma. Les anticorps couplés proviennent de chez Vector Laboratories.

### **2.2 Tampons**

PBS: « Phosphate buffered saline »

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6.5 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM.

HBS 2X: «HEPES buffered saline»

HEPES 50 mM, NaCl 280 mM

TE 1X: Tris 1mM pH 8.0, EDTA 0.1 mM pH 8.0

Tampon Sorensen 4X:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  321.2 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  78.9 mM

TTBS: «Tris and Tween buffered saline »

0.2% de Tween –20 et 150 mM de NaCl dans un tampon TRIS-HCl 100 mM  
pH 7.5

Tampon d'immunoprécipitation RIPA: « Radioimmune Precipitation Buffer »

20 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl

1% Sodium Déoxycholate, 1% Triton X100, 0.1% SDS, 1 mM PMSF,

1mg/ml d'inhibiteur de trypsin et 0.5 mM EDTA.

Tampon lavage 1 : Tampon RIPA mais avec 500 mM NaCl.

Tampon lavage 2 : Tampon RIPA mais avec 250 mM NaCl

Tampon d'Élution Glutathione :

10 mM glutathione réduite dans 50 mM Tris HCl (pH 8.0)

Solution de Laemmli 5X :

2% de SDS, 10% de glycérol, 2% de mercaptoéthanol et 0.01% de bleu de  
bromophénol dans du tampon Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 (Laemmli, 1970).

## 2.3 Méthodes

### 2.3.1 Construction des différents plasmides

Les différentes constructions ont été effectuées à l'aide de techniques courantes utilisées en biologie moléculaire (Sambrook et coll., éd. 1987). Nous ne nous attarderons pas à une description détaillée des étapes suivies pour la construction de chaque plasmide. Seul un bref résumé sera donné. La figure 2.1 montre la séquence de la préprosomatostatine ainsi que les régions non codantes qui ont été utilisées pour faire les amplifications par PCR pour les constructions.

#### 2.3.1.1. Construction du plasmide pGEX-2T-région Pro

Le vecteur pGEX est un vecteur d'expression bactérienne utilisé pour créer une protéine de fusion à la GST (Glutathione-S-transférase). Ce vecteur contient le gène de résistance à l'ampicilline servant à la sélection des bactéries ayant reçu le vecteur, et un promoteur *tac* sous le contrôle duquel notre protéine sera exprimée. La pro région de la prosomatostatine a été amplifiée par PCR à partir du vecteur pRc/CMV contenant la prosomatostatine humaine en entier (don du Dr Nouredine Brakch) et cloné dans le vecteur PCR 2.1 afin d'en vérifier la séquence. Les sites de restriction *Bam*H1 et *Eco*RI ont été ajoutés par les amorces de PCR. Suite à la digestion du vecteur PCR 2.1 par ces enzymes, la région pro fut clonée dans pGEX-2T, (préalablement digéré avec les mêmes enzymes) en aval de la séquence de la GST (Voir figure 2.2).

**Figure 2.1. Séquence de l'ADNc de la préprosomatostatine humaine.** La séquence en acides aminés est indiquée et numérotée selon le premier résidu faisant partie de la somatostatine-14. Le peptide signal s'étend du résidu Met en position -102 au résidu Gly en -79. Le propeptide s'étend du résidu Ala en -78 jusqu'au résidu Arg en -15 et la portion somatostatine-28, du résidu Ser en -14 jusqu'au résidu Cys en 14. Le peptide somatostatine-14 s'étend des résidus 1 à 14.

```

                                -102
                                met leu ser cys arg leu gln cys ala
CGGCTTTTCGCGGCGCCGAG ATG CTG TCC TGC CGC CTC CAG TGC GCG
-90
ala leu ala ala ser ile val leu ala leu gly cys val thr
CTG CGT GCG CTG TCC ATC GTC CTG GCC CTG GGC TGT GTC ACC
-80
gly ↓ ala pro ser asp pro arg leu arg gln phe leu gln lys
GGC GCT CCC TCG GAC CCC AGA CTC CGT CAG TTT CTG CAG AAG
-60
ser leu ala ala ala ala gly lys gln glu leu ala lys tyr
TCC CTG GCT GCT GCC GCG GGG AAG CAG GAA CTG GCC AAG TAC
-50
phe leu ala glu leu leu ser glu pro asn gln thr glu asn
TTC TTG GCA GAG CTG CTG TCT GAA CCC AAC CAG ACG GAG AAT
-30
asp ala leu glu pro glu asp leu ser gln ala ala glu gln
GAT GCC CTG GAA CCT GAA GAT CTG TCC CAG GCT GCT GAG CAG
-20
asp glu met arg leu glu leu gln arg ser ala asn ser asn
GAT GAA ATG AGG CTT GAG CTG CAG AGA TCT GCT AAC TCA AAC
-15
pro ala met ala pro arg glu arg lys ala gly cys lys asn
CCG GCT ATG GCA CCC CGA GAA CGC AAA GCT GGC TGC AAG AAT
-10
phe phe trp lys thr phe thr ser cys AM
TTC TTC TGG AAG ACT TTC ACA TCC TGT TAG CTTTCTTAAGTAGTA

```

TTGTCCATA...

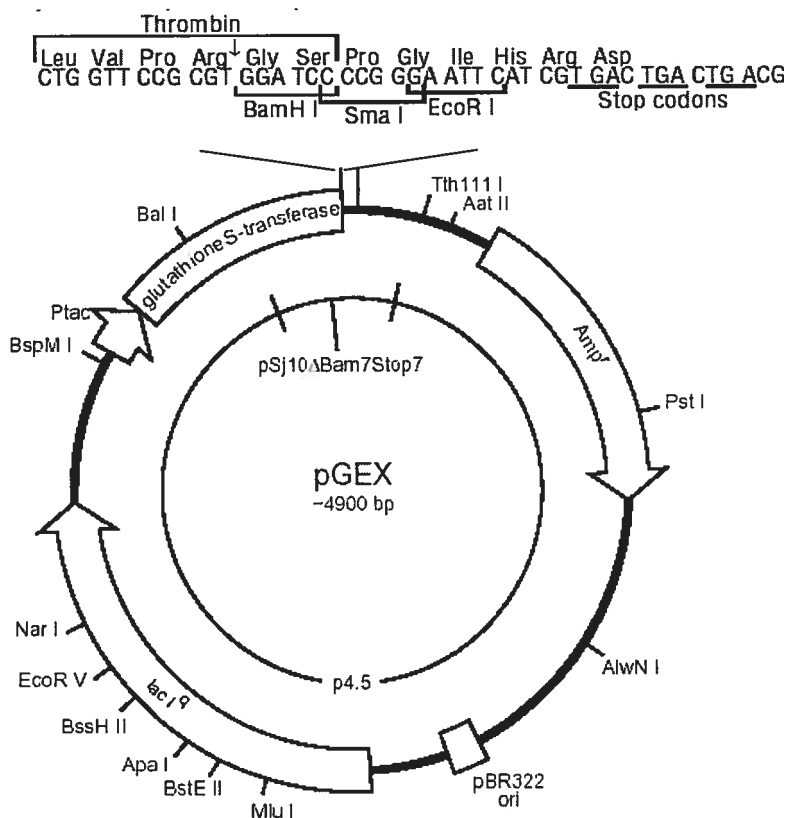
**Figure 2.2. Construction du vecteur pGEX-2T-région Pro de la prosomatostatine.** Les sites de restriction requis pour le clonage de notre séquence dans le vecteur pGEX-2T furent ajoutés par PCR avec des oligonucléotides (en italique) complémentaires aux extrémités de notre séquence contenue dans le vecteur pRc/CMV. Un fois cloné dans le vecteur intermédiaire PCR 2.1, le fragment fut digéré avec les enzymes *Bam*HI et *Eco*RI et inséré dans le vecteur pGEX-2T, en aval de la séquence de la GST.

```

Site BamHI ala pro ser asp pro arg leu arg gln phe leu gln lys ser
GGA TCC GCT CCC TCG GAC CCC AGA CTC CGT CAG TTT CTG CAG AAG TCC
leu ala ala ala ala gly lys gln glu leu ala lys tyr phe
CTG GCT GCT GCC GCG GGG AAG CAG GAA CTG GCC AAG TAC TTC

leu ala glu leu leu ser glu pro asn gln thr glu asn asp
TTG GCA GAG CTG CTG TCT GAA CCC AAC CAG ACG GAG AAT GAT
-30
ala leu glu pro glu asp leu ser gln ala ala glu gln asp
GCC CTG GAA CCT GAA GAT CTG TCC CAG GCT GCT GAG CAG GAT
-20
glu met arg leu glu leu gln
GAA ATG AGG CTT GAG CTG CAG
CTC GAC GTC CCT TAAG
Site EcoRI
    
```

↓ PCR  
 Clonage dans PCR 2.1 pour séquençage  
 Digestion par *Bam*HI et *Eco*RI du PCR 2.1  
 et de pGEX-2T .  
 Isolement du fragment et du vecteur pGEX-2T.  
 ↓ Ligation





### 2.3.1.2. Construction des plasmides pRc/CMV prosomatostatine-HA et pRc/CMV amylase-prosomatostatine

Le vecteur pRc/CMV contenant la prosomatostatine humaine fut amplifié par PCR afin d'obtenir la protéine de fusion prosomatostatine-HA. Une des amorces utilisées représentées à la figure 2.3 possède un site de restriction *Bst*XI précédé de la séquence de la protéine Hemaglutimine A du virus de l'Influenza contenant le codon de terminaison. Le fragment obtenu par PCR, où l'enzyme Vent fut utilisé, fut cloné dans le vecteur PCR 2.1 afin d'en vérifier la séquence. Le vecteur PRC 2.1 contenant le produit de PCR et le vecteur pRc/CMV-prosomatostatine furent digérés par l'enzyme *Bst*XI et les bandes correspondant au produit de PCR et au vecteur pRc/CMV furent purifiées sur gel et joints entre eux grâce à la ligase.

Le vecteur pRc/CMV est un vecteur d'expression utilisé dans les cellules mammifères. Ce vecteur contient un gène de résistance à l'ampicilline servant à la propagation et à la sélection des bactéries, un gène de résistance à la néomycine et un promoteur du cytomégalovirus sous le contrôle duquel notre protéine sera exprimée. Le signal de polyadénylation est celui de l'hormone de croissance.

Le vecteur pRc/CMV exprimant la protéine de fusion amylase-prosomatostatine est un don généreux du Dr. Denis LeBel. La fusion comprend l'amylase pancréatique complète du rat suivit de la séquence complète de la prosomatostatine humaine en C-terminal. Cependant, la prosomatostatine est mutée en son premier site de maturation protéolytique libérant le peptide S-28. En effet, le singulet Arg<sup>-15</sup> a été remplacé par une asparagine, rendant ainsi impossible la maturation au niveau du TGN afin de suivre la protéine entière dans la cellule (voir figure 3.6).

**Figure 2.3. Construction du vecteur pRc/CMV-prosomatostatine-HA.** La séquence de la préprosomatostatine contenue dans le vecteur pRc/CMV-préprosomatostatine fut amplifiée par PCR entre les deux amorces exposées en italique. Un des deux oligonucléotides apporte un site de restriction *Bst*XI précédé de la séquence de la protéine Hemaglutimine A du virus de l'Influenza contenant le codon de terminaison. Un autre site de restriction *Bst*XI est déjà présent dans la séquence de la préprosomatostatine (↓). Un fois cloné dans le vecteur intermédiaire PCR 2.1, le fragment généré par amplification fut digéré avec l'enzyme de restriction *Bst*XI et inséré dans le vecteur pRc/CMV-préprosomatostatine original prédigéré avec la même enzyme.

-102 →

met leu ser cys arg leu gln cys ala

CGGCTTTCGGCGCGCCGAG ATG CTG TCC TGC CGC CTC CAG TGC GCG

-90

ala leu ala ala ser ile val leu ala leu gly cys val thr

CTG CGT GCG CTG TCC ATC GTC CTG GCC CTG GGC TGT GTC ACC

-70

gly ↓ ala pro ser asp pro arg leu arg gln phe leu gln lys

GGC GCT CCC TCG GAC CCC AGA CTC CGT CAG TTT CTG CAG AAG

-60

ser leu ala ala ala ala gly lys gln glu leu ala lys tyr

TCC CTG GCT GCT GCC GCG GGG AAG CAG GAA CTG GCC AAG TAC

-50

phe leu ala glu leu leu ser glu pro asn gln thr glu asn

TTC TTG GCA GAG CTG CTG TCT GAA CCC AAC CAG ACG GAG AAT

-30

asp ala leu glu pro glu asp leu ser gln ala ala glu gln

GAT GCC CTG GAA CCT GAA GAT CTG TCC CAG GCT GCT GAG CAG

-20

asp glu met arg leu glu leu gln arg ser ala asn ser asn

GAT GAA ATG AGG CTT GAG CTG CAG AGA TCT GCT AAC TCA AAC

-2 -1 1

pro ala met ala pro arg glu arg lys ala gly cys lys asn

CCG GCT ATG GCA CCC CGA GAA CGC AAA GCT GGC TGC AAG AAT

10 14 3'-C TTA

phe phe trp lys thr phe thr ser cys

TTC TTC TGG AAG ACT TTC ACA TCC TGT TAG

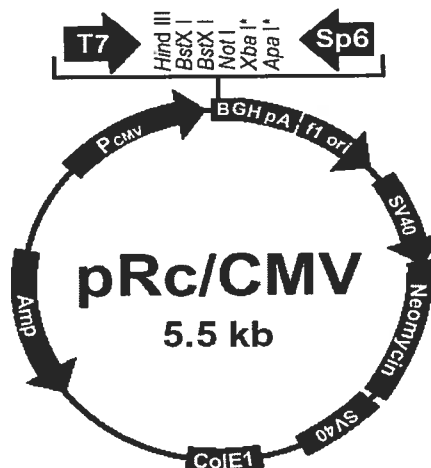
AAG AAG ACC TTC TGA AAG TGT AGG ACA ACA CCA AGA CCA ATA

GGG ATG CTG CAG GGT CTA ATA CGG ACT GGT AGT GTG ACC-5'

stop ←

### PCR

Clonage dans PCR2.1 pour séquençage  
 Digestion des vecteurs PCR 2.1 et de  
 pRc-CMV-préprosomatostatine par *Bst*XI  
 Isolement du fragment et du vecteur pRc-CMV  
 et ligation



### 2.3.2 Expression de la protéine de fusion GST –région pro et immunisation

Des bactéries *E. coli* de souche BL21 contenant notre vecteur pGEX-2T-région pro (voir section 2.2.1.1) sontensemencées dans 500 ml de milieu de culture (2 x YT avec 2% de glucose et contenant 100 µg/ml d'ampicilline) avec 7.5 ml de préculture. La croissance bactérienne est amenée à une densité optique  $A_{600}$  de 0.6-0.8 à 37°C. L'induction de la production de notre protéine de fusion est effectuée suite à l'ajout d'IPTG 100 mM (0.1 mM final) suivi d'une incubation de 2 heures. Le milieu de culture est ensuite centrifugé 10 minutes à 5 000 rpm et le culot resuspendu dans 25 ml de tampon STE contenant des inhibiteurs de protéases, 5 mM de DTT et 1% de sarkosyl. Une sonification de 10 fois 10 secondes est ensuite effectuée. Un volume de 250 µl de Triton X100 est ajouté suivi d'une agitation de 30 minutes. On centrifuge ensuite 20 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Au surnageant, on ajoute 500 µl de billes GS4B 50% et on agite sur roue 12 heures à 4°C. Les billes sont ensuite décantées, resuspendues et lavées 3 fois au PBS. Les billes sont éluées 3 fois dans 500 µl de tampon d'éluion glutathione contenant 0.25% de sarkosyl. La dernière éluion s'effectue 12 heures à 4° C sur roue. La thrombine est ensuite ajoutée à l'éluat à raison de 1 unité pour 100 µg de protéines de fusion. L'éluat clivé à la thrombine est ensuite chargé sur gel SDS-PAGE. La protéine de fusion maintenant clivée est ensuite visualisée sur le gel. La bande correspondante à la protéine détachée de la GST est découpée du gel et homogénéisée dans 1 ml de PBS contenant 1% de saponine avec un polytron. Cet homogénat est ensuite injecté chez le lapin. Environ 300 µg de protéine furent injectés trois fois à chacun des deux lapins avec un mois d'intervalle entre chacune des injections. Les lapins sont ensuite sacrifiés et le sérum est testé pour la présence d'anticorps.

### **2.3.3 Culture cellulaire**

Les solutions utilisées sont décrites dans la section 2.1.1

#### **2.3.3.1 Conditions de culture**

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées dans un incubateur humidifié à 37° C sous une atmosphère contenant 5% de CO<sub>2</sub>. La lignée cellulaire AtT20 est cultivée dans du DMEM contenant 10% de sérum foetal bovin (FBS), 5% de sérum de cheval (Horse), 5% de sérum Nu, 1% d'une solution de pénicilline/streptomycine (10 000 U/ml et 20 000 U/ml respectivement) et 0.1% de fongizone (250 µg/ml d'amphotéricine B). Les cellules LLCPK1 sont cultivées dans du milieu 199 contenant 5% de FBS et 0.5% d'une solution de pénicilline-streptomycine (10 000 u/ml et 20 000 µg/ml respectivement). Les cellules sont cultivées dans des pétris de 100 mm de diamètre.

#### **2.3.3.2 Passage des cellules**

Après avoir décanté le milieu dans lequel baignent les cellules, ces dernières sont rincées avec 2 ml de PBS. Ensuite, 2.5 ml de trypsine-EDTA sont ajoutés sur les cellules. Cette solution permet la dissociation des cellules et détruit leur adhérence au pétri. Les cellules sont ensuite déposées dans l'incubateur à 37<sup>0</sup>C. La durée de l'incubation varie selon le type de cellules (1 à 2 minutes pour les AtT20, jusqu'à 10 minutes pour les LLCPK). La trypsine est inactivée par l'ajout de 1.5 ml de milieu de

culture. Les cellules sont resuspendues à l'aide d'une pipette de 5 ml et quelques gouttes de cette suspension sont distribuées dans un nouveau pétri dans lequel du milieu a été préalablement déposé.

### **2.3.3.3 Congélation des cellules**

Pour la congélation des cellules, les mêmes étapes que celles effectuées pour le passage des cellules sont exécutées. Après avoir inactivé la trypsine et resuspendu les cellules, ces dernières sont récupérées par centrifugation (10 minutes à 500 g) dans un tube de 15 ml. Le surnageant est décanté et écarté. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du DMEM contenant 20% de FBS, 10% de Horse, 10% de Nu et 10% de DMSO. Cette suspension est transférée dans un cryotube qui sera placé dans un portoir en styromousse placé à  $-70^{\circ}\text{C}$ , ce qui permet de garder les membranes cellulaires en bon état. Les cellules seront ensuite transférées dans l'azote liquide.

### **2.3.3.4 Décongélation des cellules**

Les cellules sont rapidement dégelées à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le cryotube est rincé à l'éthanol 95% pour en stériliser les parois externes. Le contenu du cryotube est transvidé dans un pétri. Dix ml de milieu contenant le double de sérum est ajouté goutte à goutte. Le premier ml doit être ajouté très lentement afin de ne pas créer de choc aux cellules. Le pétri est ensuite placé dans l'incubateur. Une fois les cellules attachées, le milieu est changé pour du milieu de culture.

### 2.3.3.5 Transfection

Les cellules ont été transfectées avec les différents vecteurs par la méthode de coprécipitation au calcium-phosphate (Wigler et coll., 1977). Dix  $\mu\text{g}$  d'ADN sont requis par pétri de 100 mm. L'ADN de départ doit être dans un volume final de 400  $\mu\text{l}$  contenant 0.01 M d'acétate de magnésium et 0.3 M d'acétate de sodium pH 5.0 auquel on ajoute 1 ml d'éthanol 95%. L'ADN est précipité par une incubation de 20 minutes à  $-70^{\circ}\text{C}$  suivi d'une centrifugation de 15 minutes à 16 000 g. Le microtube est ensuite considéré comme stérile, donc toutes les manipulations subséquentes seront effectuées sous la hotte à flux laminaire avec des solutions stériles. Après l'enlèvement du surnageant, le culot est séché puis resuspendu dans 100  $\mu\text{l}$  de TE 0.1 X. La préparation du précipité s'effectue comme suit: deux tubes de polypropylène sont utilisés et identifiés A et B respectivement. On dépose dans le tube A, 500  $\mu\text{l}$  d'HBS 2X et 10  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.07 M. Dans le tube B, on dépose 337.5  $\mu\text{l}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  et 12.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2 M. L'ADN, en solution dans le TE 0.1X, est ajouté goutte à goutte au tube B ainsi que 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{CaCl}_2$  2 M. On ajoute par la suite le contenu du tube B, goutte à goutte à l'aide d'une pipette pasteur, au tube A en faisant barboter de l'air à l'aide d'une seconde pipette pasteur à raison de 1 à 2 bulles d'air par goutte. Une solution turbide sera obtenue après 20 minutes d'attente. Le co-précipité calcium-phosphate est donc formé. Cette suspension sera distribuée sur les cellules dont le milieu a été remplacé par 10 ml de milieu frais. Le précipité est ajouté goutte à goutte et le pétri est agité par des mouvements perpendiculaires. Les cellules sont ensuite replacées dans l'incubateur ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) pour environ 4 heures. Un choc au glycérol sera effectué par la suite, ce qui augmentera l'efficacité de la transfection. Le milieu des cellules est remplacé par 1 ml de glycérol 15% dilué dans du milieu de culture. Le pétri est agité pendant une minute sous la hotte. Suivent ensuite trois

lavages avec 2 ml de milieu. On ajoute 10 ml de milieu frais et on incube 48 heures. Pour terminer, le marqueur de sélection est ajouté: 400 µg/ml de G418.

### **2.3.4 Extraction des protéines cellulaires et analyse**

Les cellules et le milieu de culture à analyser sont récoltés lorsque les cellules ont atteint une confluence de 70 à 80%. Le jour précédent la récolte, les cellules sont rincées trois fois au PBS et 4 ml de milieu sans sérum est ajouté (DMEM ou 199 selon le type de cellule, contenant 1 µg/ml de BSA, 2.5 µg/ml d'insuline, 17.5 µg/ml de transférine, 10 µg/ml d'aprotinine, 100 µg/ml de SBTI et 20 µM d'éthanolamine). Avant d'être récoltées, les cellules demeurent 16 heures dans le milieu sans sérum. Suite à la récolte, le milieu est centrifugé à 100 g pendant 10 minute et le surnageant est recueilli. Le surnageant est ensuite concentré sur Centriprep 3. Quant aux cellules, elles sont rincées 3 fois au PBS puis 1.5 à 2 ml de tampon RIPA est ajouté. Les cellules sont grattées à l'aide d'un policeman. Les cellules prennent alors une consistance visqueuse suite à la relâche de leur ADN. Après une incubation de 15 minutes sur glace, les débris ainsi que les membranes cellulaires sont sédimentées par centrifugation à 13 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est conservé à -20<sup>0</sup> C jusqu'à analyse. Un dosage de protéines totales Bradford est effectué sur chaque échantillon.

Pour analyse sur SDS-PAGE, du tampon Laemmli 5X est ajouté aux échantillons d'extraits cellulaires et de milieux concentrés. Les échantillons sont bouillis, déposés sur le gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. La migration est effectuée à 200 volts pendant environ 1 heure. Après l'électrophorèse, les protéines sont ensuite électrotransférées sur membrane de nitrocellulose. Ce transfert s'effectue sur un support à transfert pendant une heure à 250 mA. Le transfert terminé, la présence de



la protéine est révélée par immunodétection. La membrane sera saturée par une incubation d'une heure dans du tampon TTBS contenant 5% de BSA. La membrane est ensuite incubée en présence d'anticorps spécifiques à la protéine recherchée et produits chez la souris ou le lapin. Cet anticorps est dilué dans le tampon TTBS. Après incubation, la membrane est lavée trois fois pendant 5 minutes avec du tampon TTBS. La membrane est ensuite incubée en présence d'un deuxième anticorps anti IgG de souris ou de lapin couplé à la peroxydase. Le substrat fluorescent (Luminol) de l'enzyme est ensuite ajouté après trois lavages au TTBS et la membrane est exposée sur film Kodak après assèchement sur papier.

### **2.3.5 Immunofluorescence**

L'immunofluorescence est effectuée sur  $1 \times 10^5$  cellules AtT20 en culture qui ont été préalablement dispersées dans des godets «Lab-Tek» montés sur lame de microscope. Les cellules sont incubées dans du milieu synthétique sans sérum avec 100 ng/ml de NGF (nerve growth factor) pendant 24 heures afin de favoriser l'apparition d'extensions. Les cellules sont ensuite fixées pendant 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$  dans du tampon Sorensen (0.1 M, pH 7.4) contenant 4% de paraformaldéhyde. Elles sont ensuite lavées 3 fois avec du PBS 0.01 M, pH 7.4. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes dans du PBS contenant 50 mM de chlorure d'ammonium afin de neutraliser les aldéhydes du fixateur. Les membranes sont ensuite perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0.005% de saponine pendant 30 minutes. Les liaisons non spécifiques sont diminuées en incubant les cellules dans du PBS contenant 0.005% de saponine et 0.2% de gélatine pendant 30 minutes. Une incubation avec le premier anticorps dilué dans la solution de PBS-saponine-gélatine (dilution 1/750 pour l'anticorps polyclonal produit chez le lapin reconnaissant l'amylase) est ensuite effectuée pendant 1 heure. Ce premier anticorps est dirigé contre la protéine d'intérêt.

Suite à l'incubation, 3 lavages de 10 minutes sont effectués avec la solution de PBS-saponine-gélatine. Les prochaines étapes sont effectuées dans le noir car une exposition prolongée à la lumière diminue fortement le signal d'immunofluorescence. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 heure avec le deuxième anticorps conjugué avec la fluorescéine (dilution 8 µg/ml d'anti IgG de lapin couplé à la fluorescéine). Le deuxième anticorps est un anti IgG de l'espèce utilisée pour faire le premier anticorps. Après l'incubation avec le deuxième anticorps, les cellules sont lavées 3 fois pendant 10 minutes avec la solution de PBS-saponine-gélatine. Les godets sont ensuite retirés de la lame et une lamelle est déposée et scellée avec une colle caoutchouc. Les cellules sont ensuite observées avec un microscope Zeiss à un grossissement de 400X.

### **2.3.6 Stimulation de la sécrétion**

Les tests de stimulation de sécrétion ont été effectués sur  $1 \times 10^6$  cellules AtT20 préalablement dispersées dans des pétris de 60 mm. Après deux jours d'incubation à 37°C (5% CO<sub>2</sub>), le milieu est changé pour 1 ml de milieu synthétique contenant 5 mM de sodium butyrate et les cellules sont incubées 12 heures supplémentaires. Le milieu est récolté et remplacé pour 1 ml de milieu synthétique contenant 5 mM de sodium butyrate et 10 mM de 8-BrcAMP. Le milieu récolté est centrifugé 10 minutes à 400 g et le surnageant est concentré 5 fois sur Centricon 3. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> pendant 2 heures. Après cette dernière incubation, le milieu est récupéré est centrifugé 10 minutes à 400 g. Le surnageant est ensuite conservé et concentré 5 fois sur Centricon 3. Les cellules sont homogénéisées dans 500 µl de RIPA à l'aide d'un policeman. Les échantillons sont

ensuite chargés sur gel de SDS-PAGE et une analyse par transfert western est effectuée.

### 2.3.7 Marquage métabolique et chasse

Le marquage métabolique est effectué sur  $1 \times 10^6$  cellules AtT20 en culture préalablement dispersées dans des pétris de 60 mm. Ces cellules sont incubées deux jours à  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  pour permettre un bon attachement au pétri. Le milieu est ensuite changé pour 2 ml de milieu DMEM (sans sérum) sans méthionine et cystéine pour permettre l'incorporation sélective de méthionine et cystéine marquées radioactivement. Du sodium butyrate 10 mM est aussi ajouté pour induire la production de notre protéine. Cette incubation est effectuée pendant 20 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$ . Puis le milieu est changé pour 1 ml de milieu de marquage contenant du DMEM met<sup>-</sup>/cys<sup>-</sup> et 50  $\mu\text{Ci}/\text{pétri}$  de méthionine [ $^{35}\text{S}$ ] et de cystéine [ $^{35}\text{S}$ ]. Les cellules sont incubées 1 heure à  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Après cette incubation, une seconde incubation de 2 heures que l'on appelle chasse, est effectuée dans 1 ml de milieu DMEM met<sup>-</sup>/cys<sup>-</sup> contenant 0.6 mM de méthionine froide. Ce milieu est ensuite récolté et centrifugé 10 minutes à 400 g. Le surnageant est ensuite conservé à  $4^{\circ}\text{C}$  suite à l'ajout de 500  $\mu\text{l}$  de tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases. Les cellules sont lavées 3 fois au PBS à  $4^{\circ}\text{C}$ . Elles sont ensuite grattées à l'aide d'un policeman dans 1.5 ml de tampon RIPA-Lyse contenant des inhibiteurs de protéases (voir tampons, section 2.1.1) et conservées à  $4^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'immunoprécipitation. Lors des essais avec la bréfeldine A (BFA), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de BFA sont ajoutés au milieu tout au long du marquage et de la chasse.

### 2.3.8 Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation est effectuée sur le milieu de chasse et sur les cellules homogénéisées. L'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt est ajouté. Dans notre cas, l'anticorps anti-amylase est ajouté à une dilution finale de 1/500 dans le tampon RIPA. On incube ensuite le milieu de chasse et les cellules avec les anticorps à 4°C pendant 12 heures sur roue.

La protéine A Sépharose est ensuite ajoutée à raison de 20 µl de 40 mg/ml pour 1.5 ml de matériel. La protéine A de *Staphylococcus aureus* est liée à des billes de sépharose. Ainsi, la protéine A lie l'anticorps primaire et une précipitation a lieu. Les billes sont lavées 3 fois avec chacun des tampons de lavage (voir section 2.2.1). Elles sont ensuite resuspendues dans 40 µl de tampon de chargement Laemmli 5X et bouillies quelques minutes. Après sédimentation des billes, le surnageant est analysé sur gel SDS-PAGE. Suite à l'électrophorèse, le gel est fixé, séché et exposé sur film Kodak X-OMAT à -70°C.

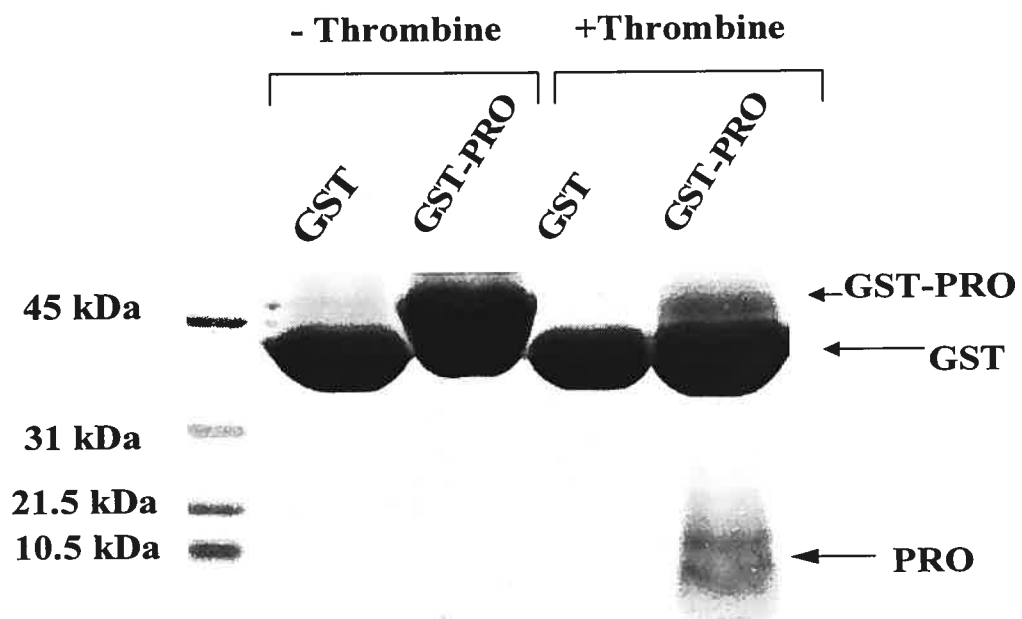
## **CHAPITRE 3- RÉSULTATS**

Dans le but de mieux caractériser la nature du signal impliqué lors du ciblage des protéines vers la voie de sécrétion régulée, nous avons développé un modèle d'étude dans lequel l'ADNc de la prosomatostatine fut transfecté dans les cellules neuroendocrines AtT20. Afin de suivre notre protéine modèle entière dans son transit vers la sécrétion régulée, nous avons produit des anticorps contre la région pro de la protéine. Nous avons aussi créé deux chimères où l'une est formée d'un peptide provenant de la protéine hémagglutinine A (HA) du virus influenza fusionnée à la prosomatostatine à son extrémité C-terminale et la seconde consiste en l'amylase pancréatique de rat aussi fusionnée à la prosomatostatine, mais en son extrémité N-terminale. Cette dernière fusion nous permettra de connaître si la portion prosomatostatine est dominante dans le ciblage vers la voie régulée de sécrétion.

### **3.1 Production d'anticorps polyclonaux dirigés contre la région pro de la prosomatostatine humaine chez le lapin.**

Afin de produire des anticorps polyclonaux dirigés contre la région pro de la prosomatostatine humaine, nous avons utilisé le système d'expression pGEX-2T de Pharmacia. En effet, la séquence codant pour la région pro de la prosomatostatine (voir figure 2.1) fut clonée en aval de celle codant pour la protéine glutathione-S-tansférase (GST) contenue dans ce vecteur, produisant ainsi une protéine de fusion ayant un site de digestion reconnu par la thrombine afin de séparer notre peptide de la GST (voir section 2.2.1 et 2.2.2). Le plasmide pGEX-2T contenant la protéine de fusion fut inséré dans les bactéries *E.coli* de souche BL-21.

**Figure 3.1 : Expression de la protéine GST-région pro de la prosomatostatine chez *E.coli*.** La protéine de fusion fut purifiée et visualisée sur gel SDS-PAGE après incubation en présence de thrombine . Le clivage par la thrombine amène la libération de la région pro (10 kDa).



### **3.1.1 Production de la protéine de fusion GST-région pro de la prosomatostatine dans un système bactérien**

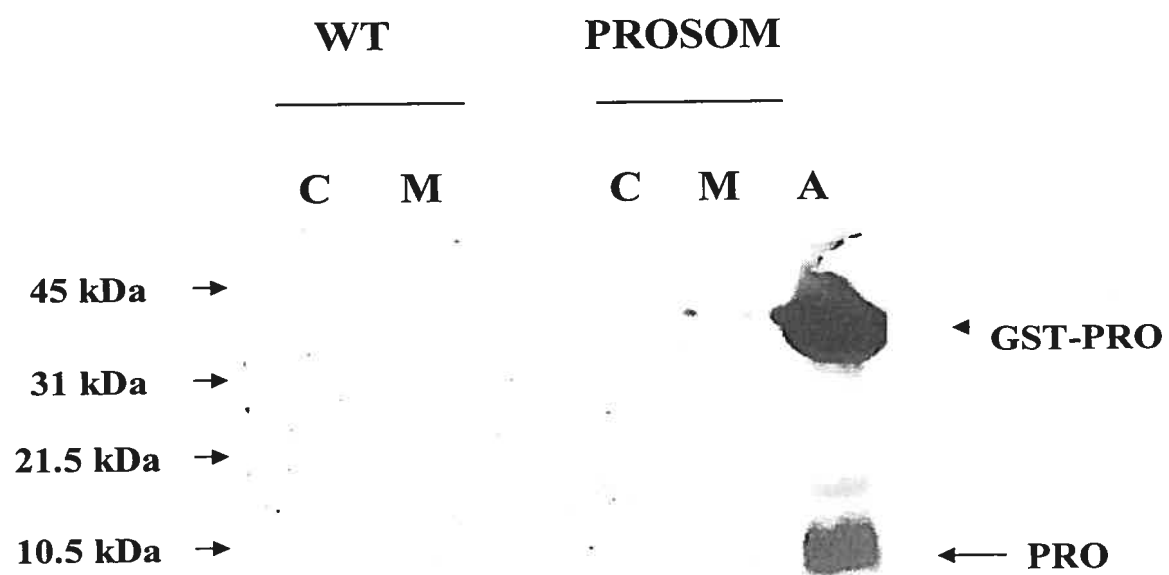
La production de notre protéine de fusion à la GST a été effectuée selon les directives de Pharmacia (voir Section 2.2.2) dans la bactérie *E.coli* de souche BL21 (souche protéase négative). La protéine de fusion fut purifiée par chromatographie d'affinité sur billes de Sépharose jumelée à la glutathione et clivée à la thrombine pour libérer la région pro de la GST. La quantité totale de protéine fut estimée par un dosage protéique Bradford. La production de la protéine de fusion à la GST et le clivage à la thrombine furent visualisés sur gel SDS-PAGE (figure 3.1). Par comparaison avec l'extrait provenant du plasmide ne contenant que la GST, on peut noter la différence de masse entre les deux protéines produites et l'effet de la thrombine sur celles-ci. On peut donc voir l'apparition attendue de la bande de la région pro autour de 10 kDa suite au clivage à la thrombine. Nous avons tenté de purifier ce peptide sur des billes de Glutathione-Sépharose ainsi que par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) , sans toutefois y arriver. Nous avons donc opté pour l'injection directe dans les lapins suite au découpage de la bande correspondante dans l'acrylamide et de son homogénéisation (Section 2.2.2.).

### **3.1.2 Vérification de la réactivité des anticorps polyclonaux anti région pro de la prosomatostatine humaine sur des cellules LLCPK1 exprimant la protéine de façon stable.**

Des cellules LLCPK1 exprimant la prosomatostatine humaine de façon stable (Brakch et coll, 1997) furent mises en culture afin de vérifier si nos anticorps pouvaient reconnaître la protéine dans son intégrité dans le milieu de culture. Ces cellules sécrètent la prosomatostatine de façon constitutive dans le milieu. Les



**Figure 3.2 : Réactivité des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre la région pro de la prosomatostatine.** Des cellules LLCPK1 exprimant de façon stable la prosomatostatine humaine furent solubilisées et leur milieu de culture concentré. Les extraits cellulaires (C) et le milieu concentré (M) furent déposés sur gel SDS-PAGE et transférés sur membrane. La membrane fut incubée en présence du sérum de lapin #2 immunisé contre la région pro. L'antigène (A) fut déposé sur gel comme témoin positif.

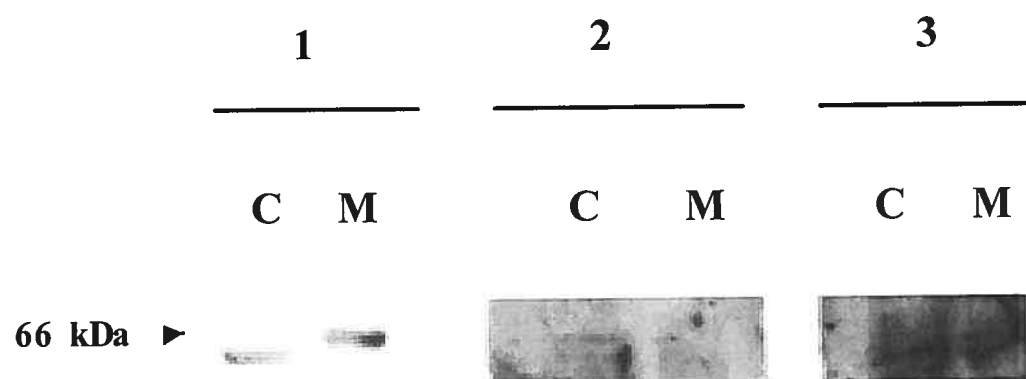


cellules furent solubilisées et le milieu concentré. Le tout fut déposé sur gel SDS-PAGE 15% et transféré sur membrane. La membrane fut incubée avec le sérum du lapin #2 dilué 1:500 avec TTBS et révélée au Vecta Stain. Comme référence, 30 ng de protéine de fusion clivée à la thrombine, ayant servi à l'immunisation, furent déposés sur gel. Comme le démontre la révélation avec le substrat Vecta Stain (figure 3.2), aucune bande significative représentant la prosomatostatine ne fut mise en évidence. Des résultats semblables furent obtenus en utilisant le substrat Luminol pour détecter la prosomatostatine ainsi qu'en déposant un pourcentage supérieur du milieu de culture. Il semblerait donc que notre sérum ne puisse reconnaître la prosomatostatine produite par les cellules LLCPK1. Le sérum du lapin #1 fut testé ultérieurement. Les résultats obtenus furent les mêmes qu'avec le sérum du lapin #2.

### **3.1.3. Vérification de la réactivité des anticorps polyclonaux dirigés contre la région pro de la prosomatostatine humaine dans des cellules AtT20 exprimant la chimère amylase-prosomatostatine de façon stable.**

Étant donné les résultats négatifs obtenus avec les cellules LLCPK1 exprimant la prosomatostatine, des cellules AtT20 exprimant la chimère amylase-prosomatostatine de façon stable (voir section 3.3) furent utilisées afin de tester à nouveau l'affinité de nos anticorps anti-région pro. Le milieu fut recueilli et les cellules lysées dans 1 ml de tampon RIPA-lyse. Un échantillon correspondant à 2.5% du milieu de culture ou des cellules lysées fut déposé sur gel SDS-PAGE 8% et transférés sur membrane de nitrocellulose. La membrane fut incubée avec le sérum de chacun des lapins dilué 1:300 avec TTBS et, comme contrôle positif, une partie de la membrane fut incubée en présence du sérum de lapin immunisé contre l'amylase et diluée 1:500 dans TTBS. La révélation au Luminol montre une bande distincte

**Figure 3.3 : Réactivité des anticorps polyclonaux de lapins dirigés contre la région pro de la prosomatostatine envers la chimère amylase-prosomatostatine.** Des cellules AtT20 exprimant de façon stable la chimère amylase-prosomatostatine furent solubilisées et leur milieu de culture concentré. Les extraits cellulaires (C) et le milieu concentré (M) furent déposés sur gel SDS-PAGE et transférés sur membrane. La membrane fut incubée en présence de sérums de lapins immunisés contre l'amylase (1) ou contre la région pro (2: lapin#1) et (3: lapin#2).



d'environ 65 kDa présente dans les cellules ainsi que dans le milieu, lorsque l'on utilise le sérum dirigé contre l'amylase (figure 3.3). Ce poids correspond en effet au poids théorique de la chimère amylase-prosomatostatine. Il est à noter que le poids apparent de la protéine retrouvée dans le milieu est légèrement plus grand que celui observé dans la cellule et semble être sous forme de doublet. La glycolylation de la protéine sécrétée pourrait expliquer cette légère différence, ainsi que la maturation protéolytique de la portion prosomatostatine. Sur les parties de la membrane incubées avec les sérums des lapins immunisés contre la région pro de la prosomatostatine, aucune bande significative ne fut observée.

### **3.2. Expression de la protéine de fusion prosomatostatine-HA dans les cellules AtT20**

L'immunisation contre la région pro de la prosomatostatine n'ayant pas été concluante, nous nous sommes dirigés vers l'utilisation de la protéine chimérique prosomatostatine-HA afin de suivre notre modèle dans la cellule. En effet, l'utilisation du peptide provenant de la protéine hémagglutinine A (HA) du virus influenza nous permet de suivre notre protéine d'intérêt lorsque ce peptide est fusionné à celle-ci, étant donné l'existence d'anticorps commerciaux dirigés contre ce peptide. Cette chimère fut donc construite (section 2.2.1) et transfectée dans les cellules AtT20 qui possèdent la voie de sécrétion régulée. Le peptide fut ajouté en C-terminal de la prosomatostatine.

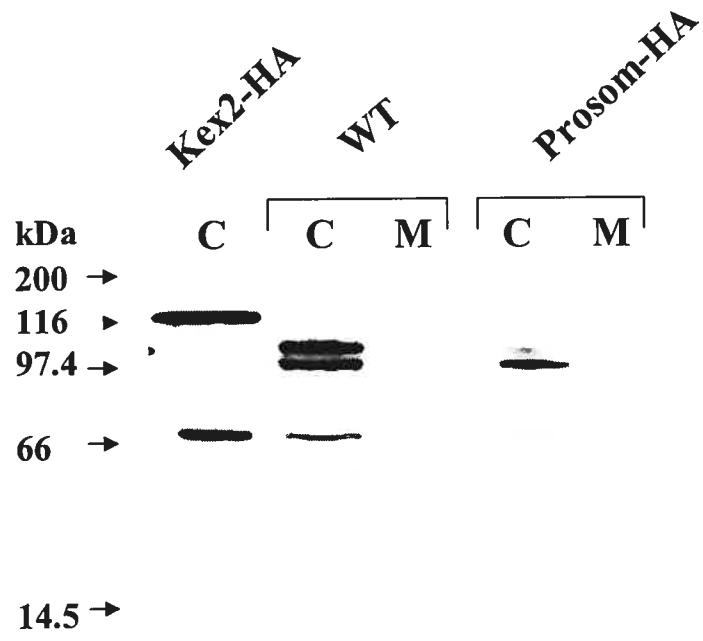
Des cellules transfectées de façon stable avec la chimère prosomatostatine-HA furent mises en culture. Après 24 heures de sécrétion, le milieu fut concentré, les cellules lysées et 25 µg de protéines totales provenant de chaque échantillon furent

déposés sur gel SDS-PAGE 12%. Comme témoin positif, 10  $\mu\text{g}$  de l'enzyme Kex2 fusionnée au peptide HA et provenant d'un extrait cellulaire de levure (Lesage et coll., 2000) furent aussi déposés sur gel. Le témoin négatif consiste en 25  $\mu\text{g}$  de protéines provenant de milieu ou d'extrait de cellules AtT20 non transfectées. Le tout fut analysé par Western blot. La présence de protéines fut détectée par le substrat Luminol après avoir utilisé un anticorps de souris dirigé contre le peptide HA, dilué 1 :1000 dans du TTBS et un second anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase dilué 1 :8000.

On peut observer une réponse positive à la masse moléculaire de 130 kDa pour la protéine Kex2-HA (figure 3.4). Aucune bande n'apparaît par contre autour de la masse moléculaire de 15 kDa attendue pour la prosomatostatine-HA et ce, autant dans l'extrait cellulaire que dans le milieu. Cependant, on peut observer un doublet autour de 97 kDa dans l'extrait cellulaire non transfecté ainsi que dans celui de cellules exprimant la prosomatostatine-HA. Ce doublet représente sans doute une liaison non spécifique des anticorps puisqu'il est retrouvé dans les cellules AtT20 sauvages (non transfectées). Une autre bande non spécifique peut être observée autour de 66 kDa dans chacun des extraits cellulaires. D'après ces résultats, on peut déduire que la chimère ne fut pas correctement exprimée et possiblement rapidement dégradée au niveau du réticulum endoplasmique. Il est aussi probable qu'une maturation complète fut effectuée sur la prosomatostatine, entraînant la perte du peptide HA.

**Figure 3.4 : Expression de la protéine de fusion prosomatostatine-HA dans les cellules AtT20.** Des cellules AtT20 exprimant de façon stable la prosomatostatine-HA furent solubilisées et leur milieu de culture concentré. Les extraits cellulaires (C) et le milieu concentré (M) furent déposés sur gel SDS-PAGE et transférés sur membrane. La membrane fut incubée en présence d'anticorps dirigés contre le peptide HA. Des cellules AtT20 non transfectées (WT) et un extrait cellulaire de levures exprimant la protéine Kex2-HA furent utilisés comme témoins.





### **3.3 Expression et caractérisation de la protéine de fusion amylase-prosomatostatine humaine dans les cellules AtT20**

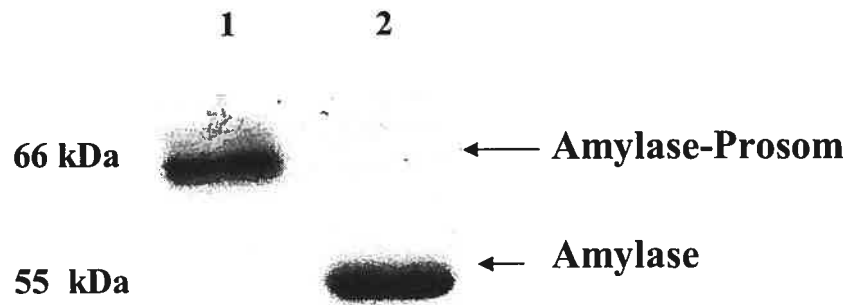
Devant l'impossibilité de suivre dans les cellules AtT20 la prosomatostatine native ou son mutant ayant un épitope HA, nous avons créé une chimère qui consiste en l'amylase pancréatique de rat fusionnée à l'extrémité N-terminale de la prosomatostatine. Cette chimère fut construite dans un vecteur d'expression mammifère et une lignée stable fut établie dans les cellules AtT20 (voir section 2.3.1.3). Une lignée stable exprimant l'amylase seule fut aussi établie comme témoin. Cette chimère pourra nous renseigner sur la dominance du signal de la prosomatostatine sur l'amylase, qui est une protéine sécrétée de façon constitutive dans les cellules AtT20.

#### **3.3.1. Expression de la chimère amylase-prosomatostatine et de l'amylase dans les cellules AtT20.**

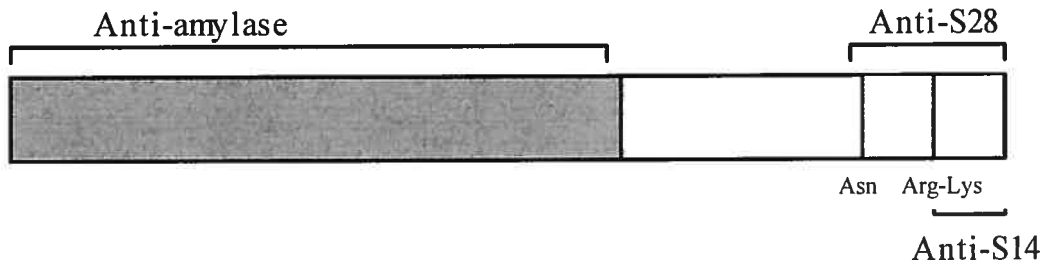
Des cellules AtT20 exprimant l'amylase pancréatique de rat et des cellules exprimant la chimère amylase-prosomatostatine furent mises en culture. Les milieux de culture furent concentrés et 25 µg de protéines totales de chacun des milieux furent déposés sur gel SDS-PAGE 8%. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, cette dernière fut incubée en présence d'anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre l'amylase dilués 1 :750 dans du TTBS. Un deuxième anticorps anti-lapin commercial dilué 1 :8000 fut utilisé.

On peut observer sur la figure 3.5 l'apparition d'une bande à 55 kDa dans le milieu de culture des cellules exprimant l'amylase. Cette bande apparaît bien à la masse attendue. Dans le milieu de culture des cellules exprimant la chimère, la bande

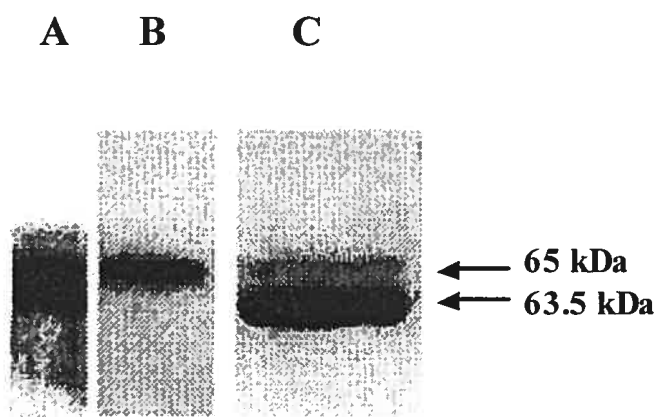
**Figure 3.5 : Expression de la chimère amylase-prosomatostatine dans les cellules AtT20.** Les milieux de culture de cellules AtT20 exprimant de façon stable l'amylase ou la chimère amylase-prosomatostatine furent concentrés, déposés sur gel SDS-PAGE 8% et transférés sur membrane. La membrane fut incubée en présence de sérum de lapin immunisé contre l'amylase. Sur la figure, les flèches montrent un doublet migrant autour de 65 kDa qui représente l'amylase-prosom, tandis que l'amylase migre autour de 55 kDa.



**Figure 3.6 : Schéma représentant la chimère Amylase-prosomatostatine et les portions reconnues par les différents anticorps.** La portion hachurée représente l'amylose. Les anticorps dirigés contre la portion amylose ainsi que ceux dirigés contre la séquence entière (S-28) de la prosomatostatine détectent la chimère maturée ou non. Cette maturation ne peut se faire qu'au site Arg-Lys. Ceux dirigés contre la séquence C-terminale de la prosomatostatine (S-14) ne détectent que la forme non mature.



**Figure 3.7 : Sécrétion et maturation de la chimère Amylase-prosomatostatine par les cellules AtT20 transfectées de façon stable.** Après 12 heures de sécrétion, le milieu des cellules AtT20 exprimant la chimère Amylase-Prosom fut concentré, déposé sur gel SDS-PAGE et analysé par Western-blot. La membrane fut incubée en présence d'anticorps spécifiques pour (A) la séquence entière de la prosomatostatine(S28), (B) la séquence C-terminale de la prosomatostatine (S14) et, (C) la séquence de l'Amylase en N-terminal de la chimère.





apparaît plutôt sous forme d'un doublet migrant autour de 65 kDa. Ce qui correspond aussi à la masse prévue étant donné que la prosomatostatine apporte environ 9.2 kDa supplémentaires. L'expression de la chimère amylase-prosomatostatine est donc bien établie dans les cellules AtT20, et son niveau d'expression semble équivalent à celui de l'amylase lorsque l'on compare l'intensité des bandes obtenues dans le milieu de culture pour chacune des deux lignées cellulaires. Cependant, l'apparition d'un doublet semble démontrer la présence de deux populations caractérisant notre chimère. Une maturation de la prosomatostatine à son site libérant le peptide S-14 pourrait expliquer la présence de ce doublet.

### **3.3.2 Maturation et sécrétion de la chimère amylase-prosomatostatine dans les cellules AtT20.**

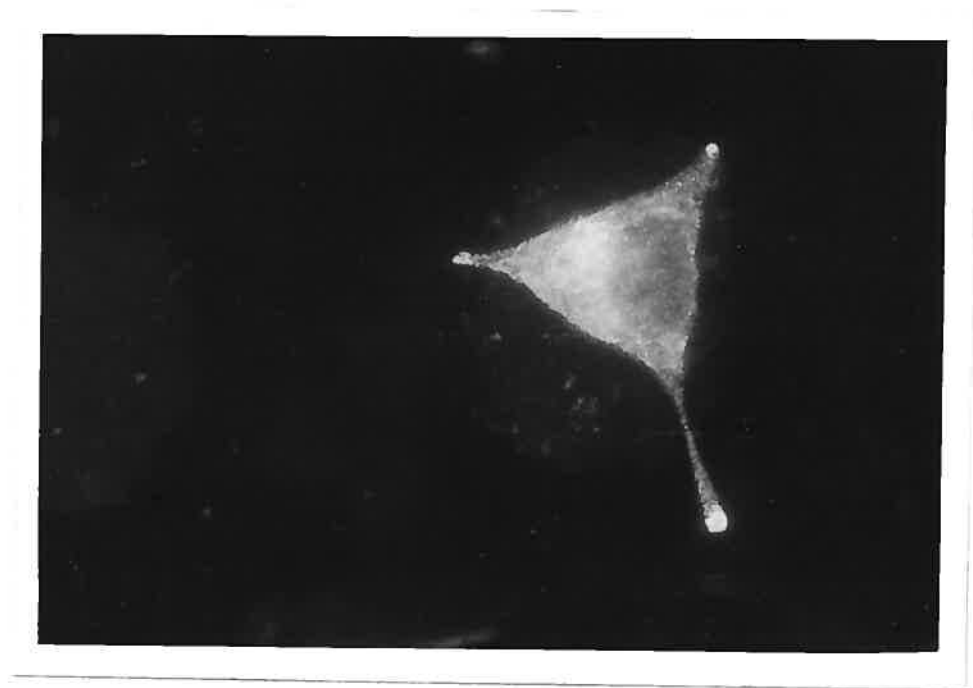
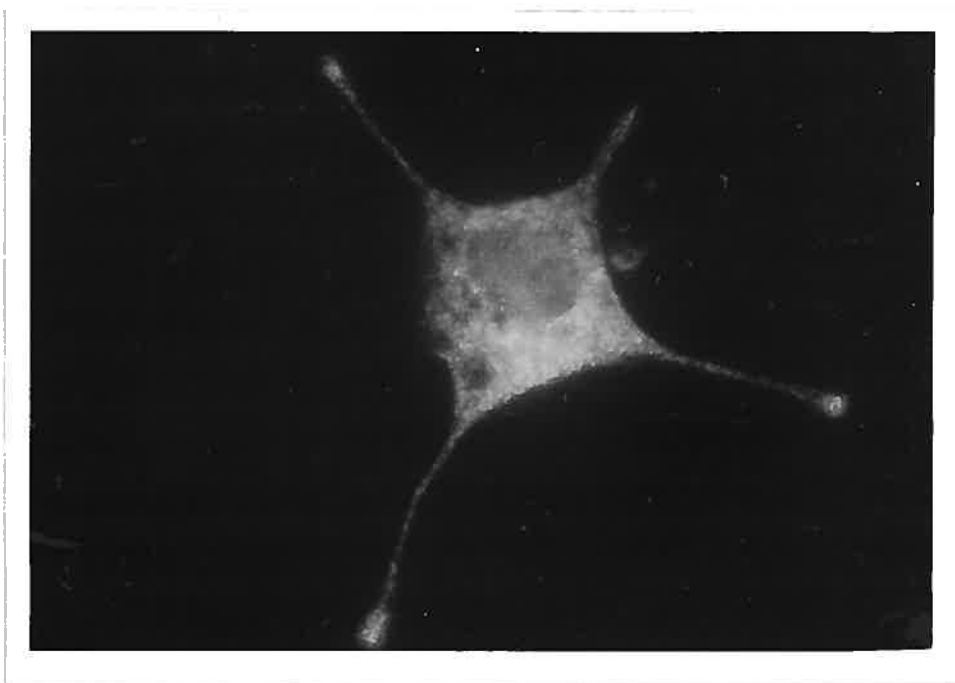
La présence de deux bandes réactives à l'anticorps anti-amylase dans le milieu de culture des cellules AtT20 exprimant la chimère peut s'expliquer par la maturation protéolytique de la portion prosomatostatine. En effet, la plupart des prohormones et des neuropeptides subissent une maturation protéolytique nécessaire à leur activation. Cette maturation s'effectue dans différentes organelles durant le transport intracellulaire vers la voie de sécrétion régulée et se caractérise par un clivage aux paires de résidus basiques. Afin de vérifier si notre chimère amylase-prosomatostatine subissait une telle maturation, des échantillons de milieu de culture des cellules exprimant notre chimère de façon stable furent déposés sur gel SDS-PAGE en conditions réductrices, puis électrotransférés sur membranes de nitrocellulose. Les membranes avec les échantillons de milieu de culture furent incubées soit en présence d'anticorps spécifiques pour la séquence de la somatostatine-28 (S-28), soit en présence d'anticorps spécifiques pour la séquence de la somatostatine-14 (S-14), soit en présence d'anticorps spécifiques pour la séquence N-terminale de l'amylase de la

chimère (voir figure 3.6). On peut observer, lors de l'utilisation de l'anticorps dirigé contre la portion N-terminale de l'amylase, l'apparition des deux bandes dans le milieu (colonne C de la figure 3.7), où la bande du bas est majoritaire. Cependant, l'anticorps anti-S14 (colonne B) ne reconnaît que le précurseur de 65 kDa ce qui nous suggère que la protéine sécrétée est presque entièrement maturée en son extrémité C-terminale par la perte du peptide somatostatine S14. La colonne A nous démontre que la présence de la forme S28 est maintenue après maturation puisque cette forme est détectée par les anticorps qui y sont spécifiques. Le résultats n'est pas surprenant puisque la chimère amylase-prosomatostatine fut mutée au site de coupure arginine R<sup>-15</sup> en amont du peptide S28 pour un résidu asparagine N<sup>-15</sup> rendant la maturation impossible à ce site. Ces résultats nous indiquent donc que la maturation de la chimère amylase-prosomatostatine se caractérise par la perte du peptide S14. La maturation de la prosomatostatine en la forme mature somatostatine (S14) dans les cellules AtT20 reflète une caractéristique du système de sécrétion régulée.

### **3.3.3 Localisation intracellulaire de la chimère amylase-prosomatostatine par immunofluorescence dans les cellules AtT20.**

L'immunofluorescence indirecte a été utilisée afin de localiser la chimère amylase-prosomatostatine à l'intérieur des cellules AtT20 l'exprimant. L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'amylase fut utilisé. Les cellules exprimant l'amylase-prosomatostatine démontrent un marquage intense dans les extrémités des extensions cellulaires ainsi qu'un marquage près du noyau, correspondant à l'appareil de Golgi (figure 3.8). Des cellules AtT20 non transfectées furent utilisées comme témoin négatif afin de s'assurer que les anticorps utilisés ne reconnaissent aucune protéine endogène (figure 3.9, bas). Les cellules exprimant l'amylase furent aussi utilisées comme témoin car lorsque cette protéine est exprimée dans les cellules

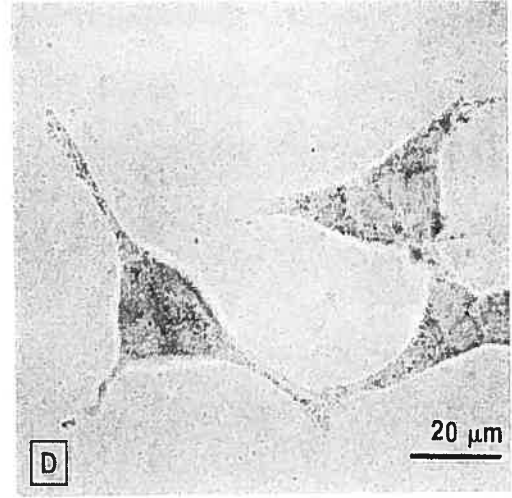
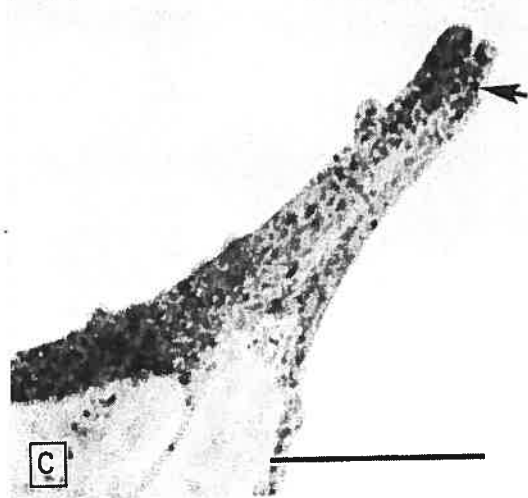
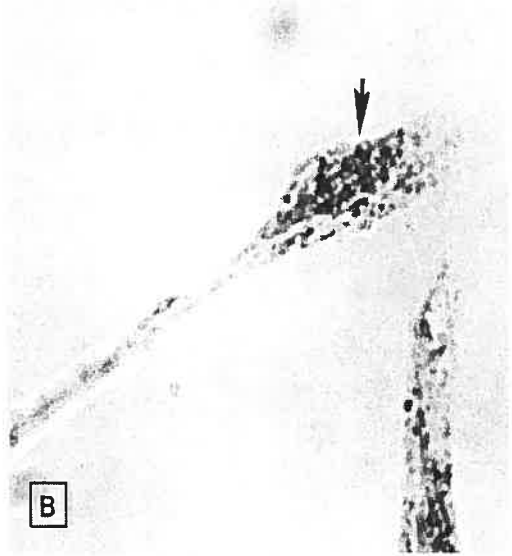
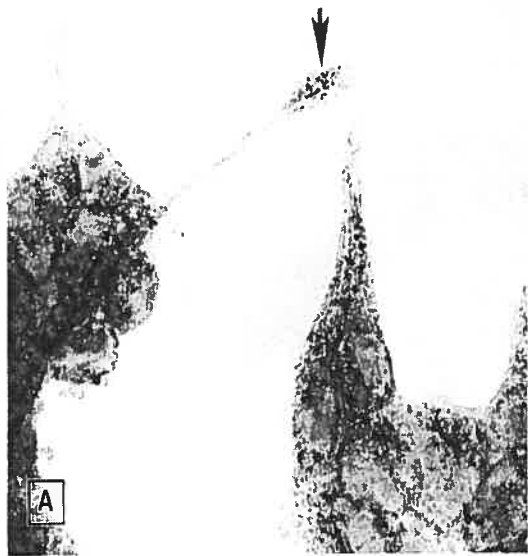
**Figure 3.8 : Localisation de la chimère amylase-prosomatostatine dans les cellules AtT20 par immunofluorescence indirecte.** Des cellules transfectées de façon stable avec le vecteur pRc/CMV codant pour la chimère amylase-prosomatostatine furent fixée dans 4% de paraformaldehyde. Après perméabilisation, les cellules furent incubées avec l'anticorps anti-amylase (haut et bas).



**Figure 3.9 : Localisation de l'amylase dans les cellules AtT20 par immunofluorescence indirecte.** Des cellules transfectées de façon stable avec le vecteur pRc/CMV codant pour l'amylase pancréatique de rat furent fixées dans 4% de paraformaldehyde. Après perméabilisation, les cellules furent incubées avec l'anticorps anti-Amylase (haut). Bas : les cellules non transfectées furent fixées et perméabilisées comme ci-haut et incubées avec l'anticorps anti-Amylase



**Figure 3.10 : Localisation immunohistochimique de la chimère amylase-prosomatostatine dans les grains de sécrétion des cellules AtT20.** Des cellules transfectées de façon stable avec le vecteur pRc/CMV codant pour la chimère Amylase-Prosomatostatine furent fixée dans 4% de paraformaldehyde. Après perméabilisation, les cellules furent incubées avec l'anticorps anti-Amylase (**A**) et (**B**) ou l'anticorps anti-ACTH (**C**). La réaction immunohistochimique fut effectuée avec un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline. Aucun signal n'apparaît avec le sérum pré-immun (**D**). **A, D** x 800, **B, C** x 2000.





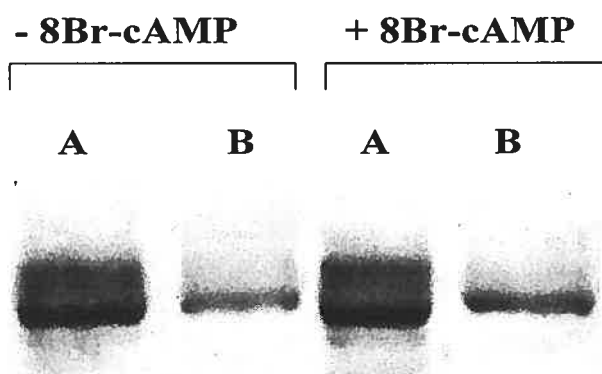
AtT20, elle se retrouve dans la voie de sécrétion constitutive (Colomer et coll., 1994). Ceci est caractérisé par un marquage près du noyau et sur tout le pourtour de la cellule, mais pas aux extrémités des extensions cellulaires où s'accumulent les grains de sécrétion. (Figure 3.9, haut). Nos résultats montrent que la chimère amylase-prosomatostatine, contrairement à l'amylase, se retrouve dans l'extrémité des extensions cellulaires.

La localisation immunohistochimique nous a permis de confirmer que le marquage obtenu en immunofluorescence était effectivement associé à des grains de sécrétion pour l'amylase-prosomatostatine (figure 3.10, A, B). L'ACTH, un marqueur endogène des grains de sécrétion chez les cellules AtT20, fut utilisé comme témoin positif d'une localisation dans les grains (figure 3.10, C).

### **3.3.4 Essai de stimulation de la sécrétion de la chimère amylase-prosomatostatine par les cellules AtT20.**

Les résultats obtenus en immunofluorescence avec la chimère amylase-prosomatostatine nous démontrent que cette protéine, contrairement à l'amylase, semble se diriger vers la voie de sécrétion régulée, étant donné qu'on la retrouve dans l'extrémité des extensions cellulaires. Cependant, une autre caractéristique qui distingue la voie de sécrétion régulée est que les protéines destinées à cette voie, s'accumulent dans les grains de sécrétion pour être sécrétées suite à un stimulus exercé par un secrétagogue. Afin de vérifier si la sécrétion de la chimère était stimuable, les cellules furent incubées 4 heures en présence ou en absence de 8Br-cAMP. La chimère fut détectée dans le milieu de culture par SDS-PAGE en

**Figure 3.11 : Essai de stimulation de sécrétion de la chimère amylase-prosomatostatine dans les cellules AtT20.** Après 12 heures de sécrétion, les milieux des cellules AtT20 exprimant la chimère amylase-prosom furent recueillis (A). Les cellules furent ensuite incubées en présence ou en absence de secrétagogue (8Br-cAMP) pendant 4 heures et les milieux furent recueillis à nouveau (B). Tous les milieux furent concentrés et le tout fut résolu sur gel SDS-PAGE 8% et transféré sur membrane. La membrane fut incubée en présence d'anticorps anti-amylase.



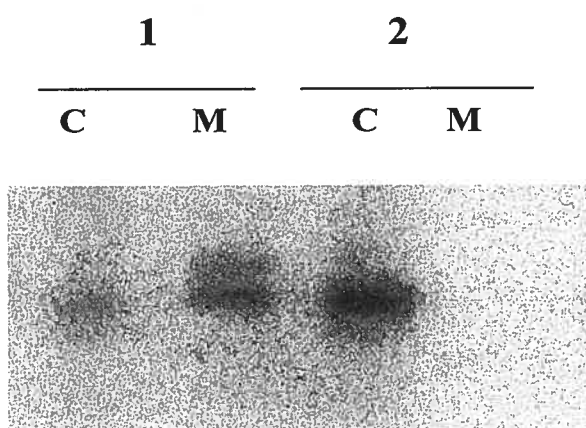
conditions réductrices suivit d'un Western Blot, utilisant l'anticorps spécifique anti-amylase (figure 3.11). Suite à la stimulation, on ne peut observer qu'une légère augmentation de la quantité d'amylase-prosomatostatine détectée dans le milieu comparativement au contrôle sans 8Br-cAMP.

### **3.3.5 Marquage métabolique et chasse de la protéine de fusion amylase-prosomatostatine en présence de bréfeldine A dans les cellules AtT20.**

Afin de mieux caractériser la sécrétion et la maturation de la chimère amylase-prosomatostatine, un marquage métabolique à la méthionine-<sup>35</sup>S suivit d'une chasse furent effectuée sur les cellules AtT20 en présence ou en absence de bréfeldine A (BFA). Ce métabolite fongique inhibe la sécrétion en prévenant la formation de vésicules à partir du réticulum endoplasmique et amène la dissolution et la redistribution de l'appareil de Golgi (Klausner, R.D et coll. 1992). Ce blocage au niveau du réticulum endoplasmique nous permet de voir si la maturation au niveau du peptide S14 est spécifique au TGN et si elle est sensible à la BFA.

La sécrétion normale de la chimère amylase-prosomatostatine c'est-à-dire en absence de BFA se caractérise par l'apparition de la forme majoritairement maturée dans le milieu (figure 3.12, ligne 1). Lors de l'incubation en présence de BFA au moment du marquage et de la chasse, ce qui amène un blocage complet et maintenu, on ne voit apparaître aucune forme de la chimère dans le milieu (figure 3.12, ligne 2). Par contre, on peut apercevoir dans les cellules, la présence majoritaire de la forme mature.

**Figure 3.12 : Sécrétion et maturation de la chimère amylase-prosomatostatine par les cellules AtT20 en présence de Bréfeldine A.** Un marquage métabolique à la [<sup>35</sup>S]Met et à la [<sup>35</sup>S]Cys suivi d'une chasse de 4 heures en présence (2) ou en absence (1) de Bréfeldine A furent effectués sur les cellules AtT20 exprimant la chimère amylase-prosom de façon stable. Les cellules solubilisées (C) et le milieu (M) furent immunoprécipités en présence d'anticorps dirigés contre l'amylase.



Ces résultats suggèrent que la maturation de notre chimère au niveau du peptide S14 ne se fait pas au niveau du TGN, mais lors de son passage dans le réticulum endoplasmique.

## CHAPITRE 4 - DISCUSSION

Le ciblage des protéines vers leur destination finale dans la cellule est un processus qui fut l'objet de nombreuses études depuis quelques décennies. Il fut démontré que les protéines voyageant dans le système de transport intracellulaire possèdent des signaux qui sont susceptibles d'être reconnus par diverses composantes de ce système. Suite à la reconnaissance de ces signaux, les protéines se retrouvent donc au bon endroit dans la cellule. Il est maintenant admis que les protéines destinées au RE, au noyau, aux mitochondries et aux peroxysomes possèdent une série d'acides aminés contigus formant un signal de ciblage vers ces organelles. Cependant, les mécanismes de ciblage des protéines sécrétées à partir du TGN, demeurent encore obscurs. La sécrétion des protéines chez les cellules eucaryotes peut être soit constitutive, soit régulée. La voie de sécrétion constitutive serait ubiquitaire, alors que la voie de sécrétion régulée n'est présente que dans les cellules endocrines, exocrines et neuronales. C'est au niveau du TGN de ces cellules que les protéines destinées à la voie de sécrétion régulée sont départagées de celles relâchées via la voie constitutive. Ainsi, il existe au niveau du TGN un mécanisme de triage qui sélectionne l'une ou l'autre de ces voies selon la protéine impliquée. De plus, un autre type de protéine subit un triage à partir du TGN : les enzymes lysosomales. En effet, ces enzymes sont dirigées vers les lysosomes par un mécanisme qui fut relativement bien compris vu sa simplicité. En effet, un signal composé d'un mannose 6-phosphate est présent sur ces enzymes et est reconnu par un récepteur situé au niveau du TGN. Ce complexe récepteur-enzyme est ensuite ciblé vers les lysosomes (Kornfeld, 1986).

Jusqu'à aujourd'hui aucun mécanisme de ce genre ne fut mis à jour pour le ciblage vers la voie de sécrétion régulée. Cependant, deux modèles sont proposés afin d'expliquer comment et où les protéines sont ciblées vers la sécrétion régulée. Le



premier modèle appelé « Sorting-for-entry » postule l'existence d'un ou plusieurs récepteurs associés au TGN qui seraient responsables du triage et du ciblage des protéines (Moore et coll., 1989 ; Kelly, 1987). Ce modèle propose que ces récepteurs lieraient les agrégats formés par les protéines destinées à la voie régulée, en excluant les protéines solubles qui s'achemineraient vers la voie constitutive (Thiele et coll., 1997). Le second modèle appelé « Sorting-by-retention » postule plutôt l'existence d'un ciblage passif au niveau du TGN, où toutes les protéines seraient acheminées vers les grains immatures, considérés ici comme une extension fonctionnelle du TGN. Le ciblage sélectif se ferait par une condensation des protéines de la voie régulée qui seraient retenues ainsi dans le grain, tandis que les protéines de la voie constitutive formant une phase fluide seraient exclues progressivement par bourgeonnement tout au long de la maturation du grain de sécrétion. L'un ou l'autre des deux modèles implique l'existence d'un signal ou d'une propriété physique portée par la protéine de la voie régulée qui lui permet de se condenser dans les conditions physicochimiques des grains immatures.

Au cours de nos travaux, nous avons tenté par trois approches différentes de mettre en évidence le signal de ciblage porté par la prosomatostatine humaine. Dans un premier temps, nous avons mis au point un système d'expression de la prosomatostatine humaine dans les cellules neuroendocrines AtT20 en y transférant son ADN<sub>c</sub> de façon stable. Les cellules AtT20 qui sont dérivées d'une tumeur du lobe antérieur de l'hypophyse de souris, sécrètent la proopiomelanocortine, non la prosomatostatine. Afin d'être en mesure de détecter notre protéine, nous avons produit des anticorps polyclonaux dirigés spécifiquement contre la région pro de la prosomatostatine humaine.

La deuxième approche fut de produire une protéine de fusion consistant en la prosomatostatine fusionnée en son extrémité C-terminale à un peptide provenant de la protéine hémagglutinine A (HA) du virus de l'influenza. L'existence d'anticorps commerciaux contre ce peptide nous donnait aussi la capacité de suivre notre protéine entière dans la cellule, avant sa maturation protéolytique en S14 ou en S28.

Finalement, notre troisième approche consistait en l'utilisation d'une deuxième protéine de fusion : soit l'amylase pancréatique de rat fusionnée au N-terminal de la prosomatostatine humaine. Cette chimère contient une mutation dans la somatostatine au niveau du site de clivage Arg<sup>-15</sup>, ce qui rend impossible la libération du peptide S-28, mais toujours possible celle du peptide S-14. Cette approche s'intéresse plus particulièrement à la capacité de la prosomatostatine à retenir dans la voie régulée l'amylase qui normalement, y passe mais ne s'accumule pas (Castle et coll., 1997)

Dans notre première série d'expériences, nous devions produire des anticorps polyclonaux anti-région pro de la prosomatostatine humaine chez le lapin. Pour ce faire, le système de protéine de fusion à la glutathione-S-transférase fut utilisé. Une fois la protéine de fusion produite dans la bactérie *E. coli*, celle-ci fut clivée et purifiée sur gel SDS-PAGE afin d'injecter seulement notre région pro aux lapins. L'antigénicité des anticorps produit dans le sérum des lapins fut testée sur des milieux de culture des cellules LLCPK et AtT20 exprimant de façon stable soit la prosomatostatine, soit la chimère amylase-prosomatostatine. Malgré le fait que les sérums reconnaissent le peptide injecté, soit l'antigène, aucun résultat positif ne fut obtenu sur les cellules en culture. Ces résultats rendaient inutilisables ces sérums pour suivre la prosomatostatine entière dans la cellule AtT20. Il est probable que la région pro de la prosomatostatine humaine est peu immunogénique. En effet, aucun

anticorps commercial n'est exclusivement dirigé contre cette portion de la protéine. Cependant, le groupe de Shields a pu produire avec succès un anticorps dirigé contre la région pro de la prosomatostatine humaine (Elgort et Shields, 1994). Par contre, le peptide utilisé afin de produire cet anticorps polyclonal comprenait le peptide signal et la région comprise entre le résidu Arginine et le doublet Arginine-Lysine S-28 de la prosomatostatine humaine. Ce qui pourrait expliquer l'immunogénicité de leur peptide.

Notre deuxième série d'expériences fut donc de créer une chimère prosomatostatine-HA et de l'exprimer dans les cellules AtT20 de façon stable. L'utilisation d'anticorps commerciaux dirigés spécifiquement contre le peptide HA nous permettrait de détecter cette chimère. Malheureusement, après l'établissement de ces cellules, aucune trace de notre chimère ne fut détectée. Il est fort possible que cette chimère soit dégradée au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, l'ajout d'un peptide à l'extrémité C-terminale de la prosomatostatine pourrait résulter en un mauvais repliement de la protéine, amenant ainsi sa dégradation au sein du réticulum endoplasmique. Il fut déjà démontré qu'un ajout, tel que la protéine chloramphénicol acetyltransférase (CAT) en C-terminal de la prosomatostatine résultait en sa dégradation intracellulaire, plus particulièrement dans le réticulum endoplasmique (Danoff et coll., 1993). Notre protéine chimérique a pu subir le même sort même si le peptide HA est beaucoup plus petit que CAT. Il est aussi fort possible que notre chimère puisse avoir subi une maturation protéolytique dans la portion prosomatostatine, perdant ainsi son épitope.

Le dernier volet de notre étude portait sur la capacité de la prosomatostatine humaine à retenir l'amylase dans la voie régulée. La chimère amylase-prosomatostatine fut donc construite en ajoutant la séquence de l'amylase

pancréatique de rat à l'extrémité N-terminale de la prosomatostatine humaine mutée au site de clivage libérant le peptide S-28 pour prévenir au moins la perte du peptide 1-12 de la S28 par maturation protéolytique. Cette chimère fut exprimée avec succès dans les cellules AtT20. Afin de connaître la localisation intracellulaire de notre chimère, l'immunofluorescence indirecte fut utilisée. Une caractéristique de la voie régulée est l'emmagasinage des protéines dans des grains de sécrétion. Cet emmagasinage peut être facilement visualisé grâce à l'immunofluorescence indirecte.

Cette technique fut validée maintes fois par plusieurs études parues dans la littérature. En effet, il a été montré que dans les cellules AtT20, l'ACTH était localisée dans les extrémités des extensions cellulaires (Matsuuchi et Kelly, 1991). Il en était de même pour l'insuline transfectée dans les cellules AtT20 (Quinn et coll., 1991). Plus récemment, il fut démontré que la FLAG-leptine était aussi dirigée dans les extrémités des extensions des cellules AtT20 (Chavez et coll. 1997). Cependant, l'amylase salivaire de souris n'est pas localisée dans les extrémités lorsque transfectée dans les cellules AtT20 (Colomer et coll. 1994). En appliquant cette technique à notre système, soit l'amylase-prosomatostatine exprimée dans les cellules AtT20, nos résultats montrent que notre chimère se retrouve bien dans les extrémités des extensions cellulaires. Ce qui suggère qu'elle emprunte la voie de sécrétion régulée. Les résultats obtenus avec l'amylase dans les mêmes conditions montrent plutôt un marquage autour du noyau et au pourtour de la cellule, ce qui indique un ciblage vers la voie constitutive. La technique d'immunohistochimie nous a permis de confirmer que le marquage obtenu en immunofluorescence pour l'amylase-prosomatostatine était bien associé à des grains de sécrétion et suivait le marquage obtenu pour l'ACTH, un marqueur endogène de la voie régulée dans les cellules AtT20. Ces résultats suggèrent donc que notre chimère se comporte comme une protéine de la voie régulée. Ceci permet de conclure que la prosomatostatine apporte le signal

permettant d'amener l'amylase dans les grains de sécrétion, plutôt que vers la voie constitutive, et ce, malgré sa mutation au site de clivage libérant le peptide S-28.

Afin de vérifier que notre chimère était sécrétée de façon stimulable, des tests de sécrétion en présence du sécrétagogue 8Br-cAMP furent effectués. La fusion des grains de sécrétion à la membrane plasmique suite à un stimulus exogène est une autre caractéristique de la voie de sécrétion régulée. Malheureusement, seulement une très faible augmentation de la quantité d'amylase-prosomatostatine dans le milieu suite au stimulus fut observée. Étant donnée l'observation de la localisation de notre chimère dans les grains de sécrétion, ceci nous suggère que notre chimère se retrouve dans une population de grains non stimulables. Cette hypothèse pourrait être appuyée par le modèle proposé par Arvan (Arvan and Castle, 1992). En effet, d'après le modèle «*sorting by retention*», notre chimère pourrait être dirigée vers la voie régulée et entrer dans les grains immatures, pour en être graduellement exclue dans la phase fluide qui serait sécrétée de façon constitutive. La portion prosomatostatine de notre chimère pourrait être responsable du ciblage vers la voie régulée, mais la partie volumineuse de l'amylase pancréatique de rat pourrait être responsable de l'exclusion de l'agrégation, donc de l'absence de rétention dans les grains. Des études d'agrégation avec notre chimère pourraient confirmer cette hypothèse. De plus, il est aussi probable que le niveau d'expression de notre chimère soit trop bas pour que l'on puisse apercevoir une différence marquée de la sécrétion lors de la stimulation.

Dans le but de poursuivre la caractérisation de notre chimère amylase-prosomatostatine, une étude sur la maturation de notre précurseur fut effectuée. La maturation protéolytique est une autre caractéristique de la voie de sécrétion régulée. En effet, la plupart des prohormones et des neuropeptides subissent une maturation durant leur transport intracellulaire dans la voie régulée. Cette maturation s'effectue

au niveau du TGN et dans les grains de sécrétion et se caractérise principalement par un clivage aux paires de résidus basiques ou plus rarement, à un simple résidu basique. En utilisant différents anticorps dirigés spécifiquement soit contre la séquence entière de la prosomatostatine-28 (S-28), soit contre la séquence C-terminale S-14 de la prosomatostatine ou bien contre la séquence N-terminale de l'amylase, nous avons pu étudier la maturation que subissait notre chimère. Suite à la mutation du site de coupure au résidu basique arginine R-15, seul le site de coupure dibasique libérant le peptide S-14 pouvait être clivé efficacement. Avec l'utilisation d'anticorps spécifiques pour chacune des régions, nous avons pu démontrer que notre chimère était bien maturée au site de clivage libérant le peptide mature S-14. Ces résultats suggèrent que notre chimère entre bien en contact avec les convertases responsables de la maturation des propeptides qui sont situées dans la voie régulée, en l'occurrence ici la PC1 responsable de la maturation du site dibasique de la S14 dans les cellules AtT20 (Galanopoulou et coll., 1993).

Puisque les cellules endocrines possèdent les deux voies de sécrétion constitutive et régulée, un mécanisme doit exister afin que la cellule puisse cibler les différentes classes de protéines vers leurs vésicules de sécrétion appropriées. Des évidences morphologiques provenant de plusieurs groupes impliquent le TGN comme site où s'effectue ce ciblage (Tooze et coll., 1987 ; Sossin et coll., 1990). De même, la maturation protéolytique des prohormones s'effectuait aussi au niveau du TGN. En effet, en 1987, Tooze et ses collaborateurs démontrèrent que le TGN était le site où la POMC était maturée et dirigée vers les grains de sécrétion. De plus, en 1991, le groupe de Lepage-Lezin effectua d'autres études morphologiques qui suggèrent que la prosomatostatine est maturée au TGN dans les cellules neuronales de rat. Finalement, Xu et Shields confirmèrent en 1993 que la prosomatostatine était bien maturée au niveau du TGN, dans les cellules hypophysaires de rat (GH<sub>3</sub>) lors de son expression

hétérologue. Afin d'identifier le site intracellulaire où s'effectue la maturation de notre chimère, une chasse en présence de BFA fut effectuée suite à un marquage métabolique. Cette molécule inhibe la sécrétion en empêchant le transport antérograde du RE vers l'appareil de Golgi, ce qui amène le collapsus du Golgi vers le RE et donc la redistribution des protéines de ce dernier vers le RE (Klausner et coll., 1992). Le marquage fut aussi effectué en présence de BFA. Ceci amène le blocage de toutes les protéines nouvellement synthétisées et marquées au niveau du RE. Évidemment, aucune trace de notre chimère ne fut observée dans le milieu de sécrétion. Cependant, dans les cellules, la forme mature de notre chimère fut retrouvée de façon majoritaire. Ces résultats sont étonnants étant donné que la maturation semble s'initier au niveau du TGN pour se poursuivre dans les grains de sécrétion et que notre chimère ne peut s'y rendre, étant bloquée au RE. En effet, il fut démontré que la BFA avait peu ou pas d'effet sur les dernières étapes de la sécrétion, c'est-à-dire du TGN vers la membrane plasmique, mais inhibait de façon significative la maturation des prohormones avant que ces précurseurs n'atteignent le compartiment du TGN (Xu et Shield, 1993). Ces études furent effectuées sur des cellules GH<sub>3</sub> perméabilisées. En 1997, le groupe de Fernandez obtint des résultats semblables avec les cellules AtT20. En effet, suite à un blocage à la BFA, aucune maturation protéolytique ne fut obtenue pour la proopiomélanocortine. Cependant, le traitement à la BFA de cellules de la médullo-surrénale bovine démontre un effet mineur sur la maturation de la proenképhaline. Ceci suggère que la maturation protéolytique de la proenképhaline commence avant son transport vers le TGN (Rostovtev et coll., 1994). Ces derniers résultats sont plutôt en faveur de ceux que nous observons avec notre chimère. La BFA étant ajoutée dès le marquage et présente tout au long de la chasse, les protéines nouvellement synthétisées ainsi que les protéines du Golgi se retrouvent dans le réticulum endoplasmique. Il est fort possible que parmi ces protéines nouvellement synthétisées se retrouvent des enzymes

responsables de maturations protéolytiques des prohormones. Il fut démontré que les convertases PC1 et PC2 avaient une activité maximale à pH acide ; pH retrouvé dans le TGN et les grains de sécrétion, (Jean et coll., 1993) et que la furine avait plutôt un large spectre d'activité près du pH neutre (Molloy et coll., 1992). La furine pourrait alors être responsable de la maturation de notre chimère au niveau du RE dans ces conditions expérimentales. En effet, en 1994, Vey et ses collaborateurs apportèrent l'évidence que le RE était le compartiment où avait lieu la maturation de la profurine en furine et que son passage dans le Golgi était nécessaire à son activation, fort probablement dû à la maturation de ses sucres. Il est donc probable que la furine soit plus ou moins active dans le RE en présence de BFA, étant donné la redistribution vers le RE des enzymes de maturation associées au Golgi. (Lippincott-Schwartz et coll., 1989, Johnson et coll., 1991, Berger et coll., 1995).

En 1993, le groupe de Benjannet démontra qu'après le traitement à la BFA des cellules GH4C1, exprimant de façon hétérologue PC1, cette enzyme était bien clivée en sa forme mature. Ceci suggère donc que sa maturation se fait au niveau du RE. Vindrola obtint les mêmes résultats avec les cellules AtT20, qui expriment cette convertase de façon endogène. Il démontra néanmoins que la PC1 subissait une autre maturation soit au niveau du TGN ou soit au niveau des grains de sécrétion (Vindrola 1994). De plus, Schmidt et Moore démontrèrent en 1995, que cette deuxième maturation de la PC1 dans les cellules AtT20 semi-intactes était nécessaire à son activation pour la maturation de la POMC. En effet, l'incubation prolongée de la POMC dans le RE ou dans le Golgi ne résulte pas en la maturation du précurseur. Par contre, l'acidification de ces compartiments cellulaires amène une maturation efficace. Ces résultats nous laissent donc la furine comme principal responsable de la maturation de notre chimère amylase-prosomatostatine au niveau du RE, en son site  $R^2K^{-1}$ . La furine, qui est ubiquitaire, clive sélectivement aux paires de résidus



basiques et à pH relativement neutre (Halban et Irminger, 1994). En 1993, Galanopoulou et son équipe étudièrent la maturation de la prosomatostatine par la furine dans les cellules COS-7 et PC12. Ces cellules n'expriment pas PC1 ni PC2, mais expriment la furine comme convertase. Ils démontrèrent que la prosomatostatine était bien clivée au site R<sup>2</sup>K<sup>1</sup>, mais non efficacement. Cependant, ce n'était pas sous contact prolongé suite à l'incubation des cellules en présence de BFA.

Steiner et son équipe démontrèrent que le récepteur muté de la proinsuline était clivé à un site spécifique pour la furine, lors de sa rétention au niveau du RE (Bass et coll., 2000). Cette observation suggère que la maturation des propeptides par la furine peut s'effectuer avant leur transport vers le TGN. Elle suggère aussi que l'action de la furine dans le RE pourrait dépendre de la conformation de son substrat, étant donné que le récepteur sauvage n'est pas clivé. Il est donc aussi probable que la portion amylase de notre chimère amène un certain changement dans le repliement de la prosomatostatine, amenant éventuellement une meilleure reconnaissance du doublet par la convertase au niveau du RE. Des études de maturation *in vitro* de notre chimère en présence de furine pourraient nous éclairer sur le sujet.

## **CHAPITRE 5 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES FUTURES**

À la lumière des résultats obtenus avec la chimère amylase-prosomatostatine, nous pouvons conclure que la portion prosomatostatine est responsable de la localisation intracellulaire de la chimère dans les extensions cellulaires plus précisément dans les grains de sécrétion des cellules AtT20. Cependant, cette chimère, quoique maturée efficacement en son site de clivage libérant le peptide S-14, est relâchée de façon «constitutive-like» dans le milieu. Ces résultats viennent appuyer le modèle «sorting- by- retention» proposé en 1992 par Arvan et Castle.

Néanmoins, des études de mutagenèses portant sur la partie prosomatostatine de la chimère pourraient nous informer sur les caractéristiques intrinsèques de la prohormone qui sont responsables du ciblage de la chimère vers la voie de sécrétion régulée.

**BIBLIOGRAPHIE**

- S. Ahle, A. Mann, U. Eichelsbacher, and E. Ungewickell. Structural relationships between clathrin assembly proteins from the Golgi and the plasma membrane. *EMBO J.* 7 (4):919-929, 1988.
- P. R. Albert and D. Liston. Deletions of the synenkephalin domain which do not alter cell-specific proteolytic processing or secretory targeting of human proenkephalin. *J.Neurochem.* 60 (4):1325-1334, 1993.
- D. Aoki, N. Lee, N. Yamaguchi, C. Dubois, and M. N. Fukuda. Golgi retention of a trans-Golgi membrane protein, galactosyltransferase, requires cysteine and histidine residues within the membrane-anchoring domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (10):4319-4323, 1992.
- P. Argos, W. L. Taylor, C. D. Minth, and J. E. Dixon. Nucleotide and amino acid sequence comparisons of preprosomatostatin. *J.Biol.Chem.* 258 (14):8788-8793, 1983.
- P. Arvan, R. Kuliawat, D. Prabakaran, A. M. Zavacki, D. Elahi, S. Wang, and D. Pilkey. Protein discharge from immature secretory granules displays both regulated and constitutive characteristics. *J.Biol.Chem.* 266 (22):14171-14174, 1991.
- P. Arvan, B. Y.Zhang, L. J. Feng, M. Liu, and R. Kuliawat. Luminal protein multimerization in the distal secretory pathway/secretory granules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 448-453, 2002.
- P. Arvan and D. Castle. Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem.J.* 332 ( Pt 3):593-610, 1998.
- P. A. Baeuerle and W. B. Huttner. Tyrosine sulfation is a trans-Golgi-specific protein modification. *J.Cell Biol.* 105 (6 Pt 1):2655-2664, 1987.
- T. J. Baranski, G. Koelsch, J. A. Hartsuck, and S. Kornfeld. Mapping and molecular modeling of a recognition domain for lysosomal enzyme targeting. *J.Biol.Chem.* 266 (34):23365-23372, 1991.
- C. Barlowe, L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77 (6):895-907, 1994.
- P. J. Barr, O. B. Mason, K. E. Landsberg, P. A. Wong, M. C. Kiefer, and A. J. Brake. cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protease with cleavage specificity for paired basic amino acid residues. *DNA Cell Biol.* 10 (5):319-328, 1991.

- J. Bass, C. Turk, M. Rouard and D.F. Steiner. Furin-mediated processing in the early secretory pathway: sequential cleavage and degradation of misfolded insulin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24; 97(22):11905-9. 2000.
- I. C. Bathurst, S. O. Brennan, R. W. Carrell, L. S. Cousens, A. J. Brake, and P. J. Barr. Yeast KEX2 protease has the properties of a human proalbumin converting enzyme. *Science* 235 (4786):348-350, 1987.
- S. Benjannet, N. Rondeau, R. Day, M. Chretien, and N. G. Seidah. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 (9):3564-3568, 1991.
- S. Benjannet, N. Rondeau, L. Paquet, A. Boudreault, C. Lazure, M. Chretien, and N. G. Seidah. Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem.J.* 294 ( Pt 3):735-743, 1993.
- M. K. Bennett. SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *Curr.Opin.Cell Biol.* 7 (4):581-586, 1995.
- R. Benoit, F. Esch, H. P. Bennett, N. Ling, M. Ravazzola, L. Orci, and E. J. Mufson. Processing of prosomatostatin. *Metabolism* 39 (9 Suppl 2):22-25, 1990.
- E. G. Berger, P. Burger, A. Hille, and T. Bachi. Comparative localization of mannose-6-phosphate receptor with 2,6sialyltransferase in HepG2 cells: an analysis by confocal double immunofluorescence microscopy. *Eur.J.Cell Biol.* 67 (2):106-111, 1995.
- G. Blobel and B. Dobberstein. Transfer to proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J.Cell Biol.* 67 (3):852-862, 1975.
- G. Blobel and B. Dobberstein. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J.Cell Biol.* 67 (3):835-851, 1975.
- M. R. Block, B. S. Glick, C. A. Wilcox, F. T. Wieland, and J. E. Rothman. Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85 (21):7852-7856, 1988.
- A. F. Bradbury and D. G. Smyth. Peptide amidation. *Trends Biochem.Sci.* 16 (3):112-115, 1991.
- N. Brakch, P. Cohen, and G. Boileau. Processing of human prosomatostatin in AtT-20 cells: S-28 and S-14 are generated in different secretory pathways. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 205 (1):221-229, 1994.

- N. Brakch, A. S. Galanopoulou, Y. C. Patel, G. Boileau, and N. G. Seidah. Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett.* 362 (2):143-146, 1995.
- N. Brakch, A. S. Galanopoulou, Y. C. Patel, G. Boileau, and N. G. Seidah. Comparative proteolytic processing of rat prosomatostatin by the convertases PC1, PC2, furin, PACE4 and PC5 in constitutive and regulated secretory pathways. *FEBS Lett.* 362 (2):143-146, 1995.
- V. Brechler, W. N. Chu, J. D. Baxter, G. Thibault, and T. L. Reudelhuber. A protease processing site is essential for prorenin sorting to the regulated secretory pathway. *J.Biol.Chem.* 271 (34):20636-20640, 1996.
- S. O. Brennan and R. J. Peach. The processing of human proinsulin and chicken proalbumin by rat hepatic vesicles suggests a convertase specific for X-Y-Arg-Arg or Arg-X-Y-Arg sequences. *J.Biol.Chem.* 266 (32):21504-21508, 1991.
- P. A. Bresnahan, R. Leduc, L. Thomas, J. Thorner, H. L. Gibson, A. J. Brake, P. J. Barr, and G. Thomas. Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J.Cell Biol.* 111 (6 Pt 2):2851-2859, 1990.
- M. S. Bretscher and S. Munro. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science* 261 (5126):1280-1281, 1993.
- W. J. Brown, J. Goodhouse, and M. G. Farquhar. Mannose-6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi complex and endosomes. *J.Cell Biol.* 103 (4):1235-1247, 1986.
- D. Bulenda and M. Gratzl. Matrix free Ca<sup>2+</sup> in isolated chromaffin vesicles. *Biochemistry* 24 (26):7760-7765, 1985.
- T. L. Burgess, C. S. Craik, and R. B. Kelly. The exocrine protein trypsinogen is targeted into the secretory granules of an endocrine cell line: studies by gene transfer. *J.Cell Biol.* 101 (2):639-645, 1985.
- T. L. Burgess and R. B. Kelly. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu.Rev.Cell Biol.* 3:243-293, 1987.
- J. Burke, J. M. Pettitt, H. Schachter, M. Sarkar, and P. A. Gleeson. The transmembrane and flanking sequences of beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I specify medial-Golgi localization. *J.Biol.Chem.* 267 (34):24433-24440, 1992.
- L. Canaff, V. Brechler, T. L. Reudelhuber, and G. Thibault. Secretory granule targeting of atrial natriuretic peptide correlates with its calcium-mediated aggregation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (18):9483-9487, 1996.

- T. Carne and G. Scheele. Amino acid sequences of transport peptides associated with canine exocrine pancreatic proteins. *J.Biol.Chem.* 257 (8):4133-4140, 1982.
- A. M. Castle, A. Y. Huang, and J. D. Castle. Passive sorting in maturing granules of AtT-20 cells: the entry and exit of salivary amylase and proline-rich protein. *J.Cell Biol.* 138 (1):45-54, 1997.
- A. M. Castle, A. Y. Huang, and J. D. Castle. Immunoglobulin-derived polypeptides enter the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *FEBS Lett.* 439 (3):341-345, 1998.
- J. D. Castle, P. Arvan, and R. Cameron. Protein production and secretion in exocrine cells. *J.Dent.Res.* 66 Spec No:633-637, 1987.
- D. Cauvi, N. Venot, M. C. Nlend and O. Chabaud. Thyrotropin and iodide regulate sulfate concentration in thyroid cells. Relationship to thyroglobulin sulfation. *Can J Physiol Pharmacol.* 81(12):1131-8, 2003.
- E. Chanat, U. Weiss, W. B. Huttner, and S. A. Tooze. Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. *EMBO J.* 12 (5):2159-2168, 1993.
- R. E. Chapman and S. Munro. Retrieval of TGN proteins from the cell surface requires endosomal acidification. *EMBO J.* 13 (10):2305-2312, 1994.
- R. A. Chavez and H. P. Moore. Targeting of leptin to the regulated secretory pathway in pituitary AtT-20 cells. *Curr.Biol.* 7 (5):349-352, 1997.
- K. Chen, G. N. Stephanopoulos, A. J. Sinskey, and H. F. Lodish. Regulated secretion of prolactin by the mouse insulinoma cell line beta TC-3. *Biotechnology (N.Y.)* 13 (11):1191-1197, 1995.
- Y. G. Chen, A. Danoff, and D. Shields. The propeptide of anglerfish preprosomatostatin-I rescues prosomatostatin-II from intracellular degradation. *J.Biol.Chem.* 270 (31):18598-18605, 1995.
- M. A. Chidgey and T. M. Harrison. Renin is sorted to the regulated secretory pathway in transfected PC12 cells by a mechanism which does not require expression of the pro-peptide. *Eur.J.Biochem.* 190 (1):139-144, 1990.
- W. N. Chu, J. D. Baxter, and T. L. Reudelhuber. A targeting sequence for dense secretory granules resides in the active renin protein moiety of human preprorenin. *Mol.Endocrinol.* 4 (12):1905-1913, 1990.
- K. N. Chung, P. Walter, G. W. Aponte, and H. P. Moore. Molecular sorting in the secretory pathway. *Science* 243 (4888):192-197, 1989.

- K. N. Chung, P. Walter, G. W. Aponte, and H. P. Moore. Molecular sorting in the secretory pathway. *Science* 243 (4888):192-197, 1989.
- V. Colomer, K. Lal, T. C. Hoops, and M. J. Rindler. Exocrine granule specific packaging signals are present in the polypeptide moiety of the pancreatic granule membrane protein GP2 and in amylase: implications for protein targeting to secretory granules. *EMBO J.* 13 (16):3711-3719, 1994.
- V. Colomer, G. A. Kicska, and M. J. Rindler. Secretory granule content proteins and the luminal domains of granule membrane proteins aggregate in vitro at mildly acidic pH. *J. Biol. Chem.* 271 (1):48-55, 1996.
- J. M. Conlon. Somatostatin: aspects of molecular evolution. *Prog. Clin. Biol. Res.* 342:10-15, 1990.
- D. B. Constam, M. Calfon, and E. J. Robertson. SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J. Cell Biol.* 134 (1):181-191, 1996.
- D. R. Cool, E. Normant, F. Shen, H. C. Chen, L. Pannell, Y. Zhang, and Y. P. Loh. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* 88 (1):73-83, 1997.
- D. R. Cool, E. Normant, F. Shen, H. C. Chen, L. Pannell, Y. Zhang, and Y. P. Loh. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice. *Cell* 88 (1):73-83, 1997.
- P. Cosson and F. Letourneur. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263 (5153):1629-1631, 1994.
- A. Danoff, X. P. Mai, and D. Shields. Intracellular degradation of prohormone-chloramphenicol-acetyl-transferase chimeras in a pre-lysosomal compartment. *Eur. J. Biochem.* 218 (3):1063-1070, 1993.
- N. Demaurex, W. Furuya, S. D'Souza, J. S. Bonifacino, and S. Grinstein. Mechanism of acidification of the trans-Golgi network (TGN). In situ measurements of pH using retrieval of TGN38 and furin from the cell surface. *J. Biol. Chem.* 273 (4):2044-2051, 1998.
- S. L. Deutscher, K. E. Creek, M. Merion, and C. B. Hirschberg. Subfractionation of rat liver Golgi apparatus: separation of enzyme activities involved in the biosynthesis of the phosphomannosyl recognition marker in lysosomal enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 80 (13):3938-3942, 1983.
- J. G. Donaldson, J. Lippincott-Schwartz, G. S. Bloom, T. E. Kreis, and R. D. Klausner. Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi

apparatus is an early event in brefeldin A action. *J. Cell Biol.* 111 (6 Pt 1):2295-2306, 1990.

R. M. Does and S. Harris. Differential N-acetylation of alpha-MSH and beta-endorphin in the intermediate pituitary of the turtle, *Pseudemys scripta*. *Peptides* 14 (4):849-855, 1993.

B. A. Eipper and R. E. Mains. Peptide alpha-amidation. *Annu. Rev. Physiol* 50:333-344, 1988.

A. Elgort and D. Shields. Prosomatostatin processing in pituitary GH3 cells. Identification and secretion of the intact propeptide. *J. Biol. Chem.* 269 (48):30668-30675, 1994.

N. L. Eskeland, A. Zhou, T. Q. Dinh, H. Wu, R. J. Parmer, R. E. Mains, and D. T. O'Connor. Chromogranin A processing and secretion: specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway. *J. Clin. Invest* 98 (1):148-156, 1996.

M. G. Farquhar and G. E. Palade. The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. *J. Cell Biol.* 91 (3 Pt 2):77s-103s, 1981.

M. G. Farquhar. Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1:447-488, 1985.

C. J. Fernandez, M. Haugwitz, B. Eaton, and H. P. Moore. Distinct molecular events during secretory granule biogenesis revealed by sensitivities to brefeldin A. *Mol. Biol. Cell* 8 (11):2171-2185, 1997.

K. Fiedler, M. Veit, M. A. Starnes, and J. E. Rothman. Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* 273 (5280):1396-1399, 1996.

von Mollard Fischer, B. Stahl, C. Li, T. C. Sudhof, and R. Jahn. Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 19 (4):164-168, 1994.

L. Fliegel, K. Burns, M. Opas, and M. Michalak. The high-affinity calcium binding protein of sarcoplasmic reticulum. Tissue distribution, and homology with calregulin. *Biochim. Biophys. Acta* 982 (1):1-8, 1989.

L. D. Fricker and S. H. Snyder. Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephalin-synthesizing carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 258 (18):10950-10955, 1983.

L. D. Fricker, C. J. Evans, F. S. Esch, and E. Herbert. Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine carboxypeptidase E. *Nature* 323 (6087):461-464, 1986.



- R. S. Fuller, A. Brake, and J. Thorner. Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protease. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 86 (5):1434-1438, 1989.
- A. S. Galanopoulou, G. Kent, S. N. Rabbani, N. G. Seidah, and Y. C. Patel. Heterologous processing of prosomatostatin in constitutive and regulated secretory pathways. Putative role of the endoproteases furin, PC1, and PC2. *J.Biol.Chem.* 268 (8):6041-6049, 1993.
- A. S. Galanopoulou, G. Kent, S. N. Rabbani, N. G. Seidah, and Y. C. Patel. Heterologous processing of prosomatostatin in constitutive and regulated secretory pathways. Putative role of the endoproteases furin, PC1, and PC2. *J.Biol.Chem.* 268 (8):6041-6049, 1993.
- E. C. Gaynor, T. R. Graham, and S. D. Emr. COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way? *Biochim.Biophys.Acta* 1404 (1-2):33-51, 1998.
- M. Geetha-Habib, R. Noiva, H. A. Kaplan, and W. J. Lennarz. Glycosylation site binding protein, a component of oligosaccharyl transferase, is highly similar to three other 57 kd luminal proteins of the ER. *Cell* 54 (7):1053-1060, 1988.
- H. H. Gerdes, P. Rosa, E. Phillips, P. A. Baeuerle, R. Frank, P. Argos, and W. B. Huttner. The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. *J.Biol.Chem.* 264 (20):12009-12015, 1989.
- R. Gilmore, P. Walter, and G. Blobel. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J.Cell Biol.* 95 (2 Pt 1):470-477, 1982.
- R. Gilmore, G. Blobel, and P. Walter. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J.Cell Biol.* 95 (2 Pt 1):463-469, 1982.
- R. Gilmore and K. V. Kellaris. Translocation of proteins across and integration of membrane proteins into the rough endoplasmic reticulum. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 674:27-37, 1992.
- R. Gilmore. Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* 75 (4):589-592, 1993.
- B. S. Glick. ER export: more than one way out. *Curr.Biol.* 11 (9):R361-R363, 2001.
- S. Gomez, A. Morel, P. Nicolas, and P. Cohen. Regional distribution of the Mr 15,000 somatostatin precursor, somatostatin-28 and somatostatin-14 in the rat brain

- suggests a differential intracellular processing of the high molecular weight species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112 (1):297-305, 1983.
- R. H. Goodman, D. C. Aron, and B. A. Roos. Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* 258 (9):5570-5573, 1983.
- D. Gorlich, S. Prehn, E. Hartmann, J. Herz, A. Otto, R. Kraft, M. Wiedmann, S. Knespel, B. Dobberstein, and T. A. Rapoport. The signal sequence receptor has a second subunit and is part of a translocation complex in the endoplasmic reticulum as probed by bifunctional reagents. *J. Cell Biol.* 111 (6 Pt 1):2283-2294, 1990.
- D. Gorlich, T. V. Kurzchalia, M. Wiedmann, and T. A. Rapoport. Probing the molecular environment of translocating polypeptide chains by cross-linking. *Methods Cell Biol.* 34:241-262, 1991.
- D. Gorlich, E. Hartmann, S. Prehn, and T. A. Rapoport. A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* 357 (6373):47-52, 1992.
- D. Gorlich, S. Prehn, E. Hartmann, K. U. Kalies, and T. A. Rapoport. A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71 (3):489-503, 1992.
- D. Gorlich and T. A. Rapoport. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75 (4):615-630, 1993.
- S. U. Gorr, X. F. Huang, D. J. Cowley, R. Kuliawat, and P. Arvan. Disruption of disulfide bonds exhibits differential effects on trafficking of regulated secretory proteins. *Am. J. Physiol* 277 (1 Pt 1):C121-C131, 1999.
- P. A. Halban and J. C. Irminger. Sorting and processing of secretory proteins. *Biochem. J.* 299 ( Pt 1):1-18, 1994.
- C. Hammond, I. Braakman, and A. Helenius. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91 (3):913-917, 1994.
- C. Hammond, I. Braakman, and A. Helenius. Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91 (3):913-917, 1994.
- C. Hammond and A. Helenius. Folding of VSV G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* 266 (5184):456-458, 1994.

- C. Hammond and A. Helenius. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 126 (1):41-52, 1994.
- C. Hammond and A. Helenius. Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7 (4):523-529, 1995.
- K. K. Han and A. Martinage. Post-translational chemical modification(s) of proteins. *Int. J. Biochem.* 24 (1):19-28, 1992.
- C. Hansen, R. Rouhi, G. Forster, G. J. Kahaly. Increased sulfatation of orbital glycosaminoglycans in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(4):1409-13, 1999.
- A. Helenius. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 5 (3):253-265, 1994.
- A. Helenius. Quality control in the secretory assembly line. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 356 (1406):147-150, 2001.
- L. M. Hendershot, J. Ting, and A. S. Lee. Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. *Mol. Cell Biol.* 8 (10):4250-4256, 1988.
- B. Hoflack and S. Kornfeld. Purification and characterization of a cation-dependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J. Biol. Chem.* 260 (22):12008-12014, 1985.
- P. J. Hornby, S. D. Rosenthal, J. P. Mathis, O. Vindrola, and I. Lindberg. Immunocytochemical localization of the neuropeptide-synthesizing enzyme PC1 in AtT-20 cells. *Neuroendocrinology* 58 (5):555-563, 1993.
- A. W. Hudson and M. J. Birnbaum. Identification of a nonneuronal isoform of synaptotagmin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92 (13):5895-5899, 1995.
- S. M. Hurtley and A. Helenius. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:277-307, 1989.
- W. B. Huttner. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu. Rev. Physiol* 50:363-376, 1988.
- W. B. Huttner and S. A. Tooze. Biosynthetic protein transport in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1 (4):648-654, 1989.
- W. B. Huttner and S. Natori. Regulated secretion. Helper proteins for neuroendocrine secretion. *Curr. Biol.* 5 (3):242-245, 1995.

- J. C. Irminger, C. B. Verchere, K. Meyer, and P. A. Halban. Proinsulin targeting to the regulated pathway is not impaired in carboxypeptidase E-deficient Cpefat/Cpefat mice. *J.Biol.Chem.* 272 (44):27532-27534, 1997.
- M. R. Jackson, T. Nilsson, and P. A. Peterson. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 9 (10):3153-3162, 1990.
- F. Jean, A. Basak, N. Rondeau, S. Benjannet, G. N. Hendy, N. G. Seidah, M. Chretien, and C. Lazure. Enzymic characterization of murine and human prohormone convertase-1 (mPC1 and hPC1) expressed in mammalian GH4C1 cells. *Biochem.J.* 292 ( Pt 3):891-900, 1993.
- S. L. Jensen, J. F. Rehfeld, J. J. Holst, J. Fahrenkrug, O. V. Nielsen, and O. B. Schaffalitzky de Muckadell. Secretory effects of gastrins on isolated perfused porcine pancreas. *Am.J.Physiol* 238 (2):E186-E192, 1980.
- L. M. Johnson, V. A. Bankaitis, and S. D. Emr. Distinct sequence determinants direct intracellular sorting and modification of a yeast vacuolar protease. *Cell* 48 (5):875-885, 1987.
- M. J. Johnson, Y. Miura, D. Rubin, and J. A. Magner. Processing to endoglycosidase H-resistant thyrotropin subunits occurs in the presence of brefeldin-A: evidence favoring the recycling of Golgi membranes to the rough endoplasmic reticulum in mouse thyrotrophs. *Thyroid* 1 (2):185-194, 1991.
- B. G. Jones, L. Thomas, S. S. Molloy, C. D. Thulin, M. D. Fry, K. A. Walsh, and G. Thomas. Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* 14 (23):5869-5883, 1995.
- B. G. Jones, L. Thomas, S. S. Molloy, C. D. Thulin, M. D. Fry, K. A. Walsh, and G. Thomas. Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* 14 (23):5869-5883, 1995.
- D. Julius, A. Brake, L. Blair, R. Kunisawa, and J. Thorner. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell* 37 (3):1075-1089, 1984.
- R. A. Kahn, J. K. Yucel, and V. Malhotra. ARF signaling: a potential role for phospholipase D in membrane traffic. *Cell* 75 (6):1045-1048, 1993.
- K. U. Kalies, T. A. Rapoport, and E. Hartmann. The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J.Cell Biol.* 141 (4):887-894, 1998.
- Y. K. Kang and S. H. Yoo. Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin A. *FEBS Lett.* 404 (1):87-90, 1997.

- R. B. Kelly. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230 (4721):25-32, 1985.
- R. B. Kelly. Protein transport. From organelle to organelle. *Nature* 326 (6108):14-15, 1987.
- R. B. Kelly. Neural transmission. Synaptotagmin is just a calcium sensor. *Curr. Biol.* 5 (3):257-259, 1995.
- P. S. Kim and P. Arvan. Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 128 (1-2):29-38, 1995.
- T. Kirchhausen, K. L. Nathanson, W. Matsui, A. Vaisberg, E. P. Chow, C. Burne, J. H. Keen, and A. E. Davis. Structural and functional division into two domains of the large (100- to 115-kDa) chains of the clathrin-associated protein complex AP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 86 (8):2612-2616, 1989.
- R. D. Klausner, J. G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116 (5):1071-1080, 1992.
- J. A. Koedam, E. M. Cramer, E. Briend, B. Furie, B. C. Furie, and D. D. Wagner. P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J. Cell Biol.* 116 (3):617-625, 1992.
- R. Kornfeld and S. Kornfeld. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54:631-664, 1985.
- S. Kornfeld. Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J. Clin. Invest* 77 (1):1-6, 1986.
- Z. Kostova and D. H. Wolf. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* 22, 2309-2317
- M. J. Kuehn and R. Schekman. COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (4):477-483, 1997.
- M. J. Kuehn and R. Schekman. COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (4):477-483, 1997.
- R. Kuliawat and P. Arvan. Protein targeting via the "constitutive-like" secretory pathway in isolated pancreatic islets: passive sorting in the immature granule compartment. *J. Cell Biol.* 118 (3):521-529, 1992.

- R. Kuliawat and P. Arvan. Protein targeting via the "constitutive-like" secretory pathway in isolated pancreatic islets: passive sorting in the immature granule compartment. *J.Cell Biol.* 118 (3):521-529, 1992.
- R. Kuliawat and P. Arvan. Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J.Cell Biol.* 126 (1):77-86, 1994.
- R. Kuliawat, J. Klumperman, T. Ludwig, and P. Arvan. Differential sorting of lysosomal enzymes out of the regulated secretory pathway in pancreatic beta-cells. *J.Cell Biol.* 137 (3):595-608, 1997.
- G. Lesage, A. Pratt, J. Lacombe, D.Y. Thomas, N.G. Seidah and G. Boileau. The Kex2p proregion is essential for the biosynthesis of an active enzyme and requires a C-terminal basic residue for its function. *Mol Biol Cell.* 11(6):1947-57, 2000.
- M. J. Lewis and H. R. Pelham. A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348 (6297):162-163, 1990.
- J. Lippincott-Schwartz, L. C. Yuan, J. S. Bonifacino, and R. D. Klausner. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* 56 (5):801-813, 1989.
- Y. P. Loh, K. I. Andreasson and N. P. Birch. Intracellular trafficking and processing of pro-opiomelanocortin. *Cell. Biophys.* 19, 73-83, 1991.
- M. Lowe and T. E. Kreis. Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim.Biophys.Acta* 1404 (1-2):53-66, 1998.
- J. Lusson, D. Vieau, J. Hamelin, R. Day, M. Chretien, and N. G. Seidah. cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 (14):6691-6695, 1993.
- V. Makler, E. Cukierman, M. Rotman, A. Admon, and D. Cassel. ADP-ribosylation factor-directed GTPase-activating protein. Purification and partial characterization. *J.Biol.Chem.* 270 (10):5232-5237, 1995.
- V. Malhotra, L. Orci, B. S. Glick, M. R. Block, and J. E. Rothman. Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* 54 (2):221-227, 1988.
- F. Mallard, B. L. Tang, T. Galli, D. Tenza, A. Saint-Pol, X. Yue, C. Antony, W. Hong, B. Goud, and L. Johannes. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J.Cell Biol.* 156 (4):653-664, 2002.

- K. Matsuoka, R. Schekman, L. Orci, and J. E. Heuser. Surface structure of the COPII-coated vesicle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (24):13705-13709, 2001.
- L. Matsuuchi and R. B. Kelly. Constitutive and basal secretion from the endocrine cell line, AtT-20. *J.Cell Biol.* 112 (5):843-852, 1991.
- J. Melnick, J. L. Dul, and Y. Argon. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370 (6488):373-375, 1994.
- A. A. Mironov, G. V. Beznoussenko, P. Nicoziani, O. Martella, A. Trucco, H. S. Kweon, D. Di Giandomenico, R. S. Polishchuk, A. Fusella, P. Lupetti, E. G. Berger, W. J. Geerts, A. J. Koster, K. N. Burger, and A. Luini. Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J.Cell Biol.* 155 (7):1225-1238, 2001.
- Y. Misumi, M. Sohda, and Y. Ikehara. Sequence of the cDNA encoding rat furin, a possible propeptide-processing endoprotease. *Nucleic Acids Res.* 18 (22):6719, 1990.
- S. S. Molloy, L. Thomas, J. K. VanSlyke, P. E. Stenberg, and G. Thomas. Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* 13 (1):18-33, 1994.
- M. R. Montminy, R. H. Goodman, S. J. Horovitch, and J. F. Habener. Primary structure of the gene encoding rat preprosomatostatin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81 (11):3337-3340, 1984.
- H. H. Moore and R. B. Kelly. Re-routing of a secretory protein by fusion with human growth hormone sequences. *Nature* 321 (6068):443-446, 1986.
- H. P. Moore, B. Gumbiner, and R. B. Kelly. Chloroquine diverts ACTH from a regulated to a constitutive secretory pathway in AtT-20 cells. *Nature* 302 (5907):434-436, 1983.
- H. P. Moore, C. Brion, K. N. Chung, L. Lehmicke, R. Rivas, and D. Quinn. Protein secretion by constitutive and regulated pathways. *Soc.Gen.Physiol Ser.* 44:189-201, 1989.
- G. Morel, F. Dihl, and F. Gossard. Ultrastructural distribution of growth hormone (GH) mRNA and GH intron I sequences in rat pituitary gland: effects of GH releasing factor and somatostatin. *Mol.Cell Endocrinol.* 65 (1-2):81-90, 1989.
- S. Munro and H. R. Pelham. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46 (2):291-300, 1986.

- S. Munro and H. R. Pelham. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48 (5):899-907, 1987.
- S. Munro. Sequences within and adjacent to the transmembrane segment of alpha-2,6-sialyltransferase specify Golgi retention. *EMBO J.* 10 (12):3577-3588, 1991.
- T. Nakagawa, K. Murakami, and K. Nakayama. Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. *FEBS Lett.* 327 (2):165-171, 1993.
- T. Nakagawa, M. Hosaka, S. Torii, T. Watanabe, K. Murakami, and K. Nakayama. Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J.Biochem.(Tokyo)* 113 (2):132-135, 1993.
- K. Nakayama, W. S. Kim, S. Torii, M. Hosaka, T. Nakagawa, J. Ikemizu, T. Baba, and K. Murakami. Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. Its testis-specific expression. *J.Biol.Chem.* 267 (9):5897-5900, 1992.
- W. M. Nauseef, S. J. McCormick, and R. A. Clark. Calreticulin functions as a molecular chaperone in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J.Biol.Chem.* 270 (9):4741-4747, 1995.
- W. Nickel and F. T. Wieland. Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem.Cell Biol.* 109 (5-6):477-486, 1998.
- T. Nilsson, J. M. Lucocq, D. Mackay, and G. Warren. The membrane spanning domain of beta-1,4-galactosyltransferase specifies trans Golgi localization. *EMBO J.* 10 (12):3567-3575, 1991.
- T. Nilsson and G. Warren. Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6 (4):517-521, 1994.
- H. Ohno, J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J. S. Bonifacino. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269 (5232):1872-1875, 1995.
- L. Orci, R. Montesano, P. Meda, F. Malaisse-Lagae, D. Brown, A. Perrelet, and P. Vassalli. Heterogeneous distribution of filipin--cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (1):293-297, 1981.
- L. Orci, M. Ravazzola, M. Amherdt, D. Louvard, and A. Perrelet. Clathrin-immunoreactive sites in the Golgi apparatus are concentrated at the trans pole in polypeptide hormone-secreting cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82 (16):5385-5389, 1985.



L. Orci, M. Ravazzola, and R. G. Anderson. The condensing vacuole of exocrine cells is more acidic than the mature secretory vesicle. *Nature* 326 (6108):77-79, 1987.

L. Orci, M. Ravazzola, M. J. Storch, R. G. Anderson, J. D. Vassalli, and A. Perrelet. Proteolytic maturation of insulin is a post-Golgi event which occurs in acidifying clathrin-coated secretory vesicles. *Cell* 49 (6):865-868, 1987.

L. Orci, A. Perrelet, M. Ravazzola, F. T. Wieland, R. Schekman, and J. E. Rothman. "BFA bodies": a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90 (23):11089-11093, 1993.

L. Orci, M. Starnes, M. Ravazzola, M. Amherdt, A. Perrelet, T. H. Sollner, and J. E. Rothman. Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* 90 (2):335-349, 1997.

G. F. Oster, L. Y. Cheng, H. P. Moore, and A. S. Perelson. Vesicle formation in the Golgi apparatus. *J.Theor.Biol.* 141 (4):463-504, 1989.

J. Ostermann, L. Orci, K. Tani, M. Amherdt, M. Ravazzola, Z. Elazar, and J. E. Rothman. Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* 75 (5):1015-1025, 1993.

W. J. Ou, P. H. Cameron, D. Y. Thomas, and J. J. Bergeron. Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* 364 (6440):771-776, 1993.

Y. C. Patel and W. O'Neil. Peptides derived from cleavage of prosomatostatin at carboxyl- and amino-terminal segments. Characterization of tissue and secreted forms in the rat. *J.Biol.Chem.* 263 (2):745-751, 1988.

Y. C. Patel and W. O'Neil. Peptides derived from cleavage of prosomatostatin at carboxyl- and amino-terminal segments. Characterization of tissue and secreted forms in the rat. *J.Biol.Chem.* 263 (2):745-751, 1988.

Y. C. Patel, A. S. Galanopoulou, S. N. Rabbani, J. L. Liu, M. Ravazzola, and M. Amherdt. Somatostatin-14, somatostatin-28, and prosomatostatin[1-10] are independently and efficiently processed from prosomatostatin in the constitutive secretory pathway in islet somatostatin tumor cells (1027B2). *Mol.Cell Endocrinol.* 131 (2):183-194, 1997.

B. M. Pearse and M. S. Robinson. Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu.Rev.Cell Biol.* 6:151-171, 1990.

H. R. Pelham. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* 46 (7):959-961, 1986.

- H. R. Pelham. The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem.Sci.* 15 (12):483-486, 1990.
- J. R. Peterson, A. Ora, P. N. Van, and A. Helenius. Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol.Biol.Cell* 6 (9):1173-1184, 1995.
- N. Pfanner, L. Orci, B. S. Glick, M. Amherdt, S. R. Arden, V. Malhotra, and J. E. Rothman. Fatty acyl-coenzyme A is required for budding of transport vesicles from Golgi cisternae. *Cell* 59 (1):95-102, 1989.
- S. R. Pfeffer and J. E. Rothman. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu.Rev.Biochem.* 56:829-852, 1987.
- S. V. Popov and M. M. Poo. Synaptotagmin: a calcium-sensitive inhibitor of exocytosis? *Cell* 73 (7):1247-1249, 1993.
- S. K. Powell, L. Orci, C. S. Craik, and H. P. Moore. Efficient targeting to storage granules of human proinsulins with altered propeptide domain. *J.Cell Biol.* 106 (6):1843-1851, 1988.
- D. Quinn, L. Orci, M. Ravazzola, and H. P. Moore. Intracellular transport and sorting of mutant human proinsulins that fail to form hexamers. *J.Cell Biol.* 113 (5):987-996, 1991.
- S. N. Rabbani and Y. C. Patel. Peptides derived by processing of rat prosomatostatin near the amino-terminus: characterization, tissue distribution, and release. *Endocrinology* 126 (4):2054-2061, 1990.
- T. A. Rapoport. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258 (5084):931-936, 1992.
- T. A. Rapoport, D. Gorlich, A. Musch, E. Hartmann, S. Prehn, M. Wiedmann, A. Otto, S. Kostka, and R. Kraft. Components and mechanism of protein translocation across the ER membrane. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61 (2):119-122, 1992.
- T. A. Rapoport, M. M. Rolls, and B. Jungnickel. Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr.Opin.Cell Biol.* 8 (4):499-504, 1996.
- S. Reichlin. Somatostatin. *N.Engl.J.Med.* 309 (24):1495-1501, 1983.
- M. L. Reitman and S. Kornfeld. Lysosomal enzyme targeting. N-Acetylglucosaminylphosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. *J.Biol.Chem.* 256 (23):11977-11980, 1981.

- C. Ritter and A. Helenius. Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nat.Struct.Biol.* 7 (4):278-280, 2000.
- R. J. Rivas and H. P. Moore. Spatial segregation of the regulated and constitutive secretory pathways. *J.Cell Biol.* 109 (1):51-60, 1989.
- M. S. Robinson. 100-kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies. *J.Cell Biol.* 104 (4):887-895, 1987.
- J. L. Rosa, R. P. Casaroli-Marano, A. J. Buckler, S. Vilaro, and M. Barbacid. p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator RCC1, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins. *EMBO J.* 15 (16):4262-4273, 1996.
- P. Rosa, U. Weiss, R. Pepperkok, W. Ansorge, C. Niehrs, E. H. Stelzer, and W. B. Huttner. An antibody against secretogranin I (chromogranin B) is packaged into secretory granules. *J.Cell Biol.* 109 (1):17-34, 1989.
- J. Roth. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem.Rev.* 102 (2):285-303, 2002.
- J. E. Rothman, R. L. Miller, and L. J. Urbani. Intercompartmental transport in the Golgi complex is a dissociative process: facile transfer of membrane protein between two Golgi populations. *J.Cell Biol.* 99 (1 Pt 1):260-271, 1984.
- J. E. Rothman. Intracellular membrane fusion. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 29:81-96, 1994.
- J. E. Rothman and G. Warren. Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr.Biol.* 4 (3):220-233, 1994.
- P. Roy, D. Chevrier, H. Fournier, C. Racine, M. Zollinger, P. Crine, and G. Boileau. Investigation of a possible role of the amino-terminal pro-region of proopiomelanocortin in its processing and targeting to secretory granules. *Mol.Cell Endocrinol.* 82 (2-3):237-250, 1991.
- R. N. Russo, N. L. Shaper, D. J. Taatjes, and J. H. Shaper. Beta 1,4-galactosyltransferase: a short NH<sub>2</sub>-terminal fragment that includes the cytoplasmic and transmembrane domain is sufficient for Golgi retention. *J.Biol.Chem.* 267 (13):9241-9247, 1992.
- G. G. Sahagian, J. Distler, and G. W. Jourdian. Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular beta-galactosidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 78 (7):4289-4293, 1981.

- J. F. Sambrook. The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell* 61 (2):197-199, 1990.
- P. Scheiffele, J. Peranen, and K. Simons. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* 378 (6552):96-98, 1995.
- W. K. Schmidt and H. P. Moore. Ionic milieu controls the compartment-specific activation of pro-opiomelanocortin processing in AtT-20 cells. *Mol. Biol. Cell* 6 (10):1271-1285, 1995.
- J. D. Schrag, D. O. Procopio, M. Cygler, D. Y. Thomas, and J. J. Bergeron. Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem. Sci.* 28 (1):49-57, 2003.
- M. P. Schutze, P. A. Peterson, and M. R. Jackson. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 13 (7):1696-1705, 1994.
- G. Seethaler, M. Chaminade, R. Vlasak, M. Ericsson, G. Griffiths, O. Toffoletto, J. Rossier, H. G. Stunnenberg, and G. Kreil. Targeting of frog prodermorphin to the regulated secretory pathway by fusion to proenkephalin. *J. Cell Biol.* 114 (6):1125-1133, 1991.
- N. G. Seidah, L. Gaspar, P. Mion, M. Marcinkiewicz, M. Mbikay, and M. Chretien. cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell Biol.* 9 (10):789, 1990.
- N. G. Seidah, M. G. Mattei, L. Gaspar, S. Benjannet, M. Mbikay, and M. Chretien. Chromosomal assignments of the genes for neuroendocrine convertase PC1 (NEC1) to human 5q15-21, neuroendocrine convertase PC2 (NEC2) to human 20p11.1-11.2, and furin (mouse 7[D1-E2] region). *Genomics* 11 (1):103-107, 1991.
- N. G. Seidah, R. Day, J. Hamelin, A. Gaspar, M. W. Collard, and M. Chretien. Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like proprotein convertase. *Mol. Endocrinol.* 6 (10):1559-1570, 1992.
- N. G. Seidah, H. Fournier, G. Boileau, S. Benjannet, N. Rondeau, and M. Chretien. The cDNA structure of the porcine pro-hormone convertase PC2 and the comparative processing by PC1 and PC2 of the N-terminal glycopeptide segment of porcine POMC. *FEBS Lett.* 310 (3):235-239, 1992.
- N. G. Seidah, R. Day, S. Benjannet, N. Rondeau, A. Boudreault, T. Reudelhuber, M. K. Schafer, S. J. Watson, and M. Chretien. The prohormone and proprotein processing enzymes PC1 and PC2: structure, selective cleavage of mouse POMC and

human renin at pairs of basic residues, cellular expression, tissue distribution, and mRNA regulation. *NIDA Res. Monogr* 126:132-150, 1992.

N. G. Seidah, R. Day, and M. Chretien. The family of pro-hormone and pro-protein convertases. *Biochem. Soc. Trans.* 21 ( Pt 3) (3):685-691, 1993.

N. G. Seidah, M. Chretien, and R. Day. The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie* 76 (3-4):197-209, 1994.

N. G. Seidah, J. Hamelin, M. Mamarbachi, W. Dong, H. Tardos, M. Mbikay, M. Chretien, and R. Day. cDNA structure, tissue distribution, and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93 (8):3388-3393, 1996.

J. C. Semenza, K. G. Hardwick, N. Dean, and H. R. Pelham. ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* 61 (7):1349-1357, 1990.

T. Serafini, L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R. A. Kahn, and J. E. Rothman. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell* 67 (2):239-253, 1991.

K. A. Sevarino, R. Felix, C. M. Banks, M. J. Low, M. R. Montminy, G. Mandel, and R. H. Goodman. Cell-specific processing of preprosomatostatin in cultured neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* 262 (11):4987-4993, 1987.

K. A. Sevarino, P. Stork, R. Ventimiglia, G. Mandel, and R. H. Goodman. Amino-terminal sequences of prosomatostatin direct intracellular targeting but not processing specificity. *Cell* 57 (1):11-19, 1989.

K. A. Sevarino, R. Ventimiglia, and P. Stork. Processing and intracellular sorting of anglerfish and rat preprosomatostatins in mammalian endocrine cells. *Metabolism* 39 (9 Suppl 2):26-29, 1990.

K. A. Sevarino and P. Stork. Multiple preprosomatostatin sorting signals mediate secretion via discrete cAMP- and tetradecanoylphorbolacetate-responsive pathways. *J. Biol. Chem.* 266 (28):18507-18513, 1991.

D. Shields, T. G. Warren, and R. F. Green. Expression of anglerfish preprosomatostatin genes in mammalian cells: studies on the synthesis and post-translational processing of somatostatin precursors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 188:3-18, 1985.

S. P. Smeeckens and D. F. Steiner. Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J. Biol. Chem.* 265 (6):2997-3000, 1990.

- S. P. Smeeckens, A. S. Avruch, J. LaMendola, S. J. Chan, and D. F. Steiner. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88 (2):340-344, 1991.
- M. J. Smith and G. L. Koch. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. *EMBO J.* 8 (12):3581-3586, 1989.
- T. Sollner, M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller, and J. E. Rothman. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75 (3):409-418, 1993.
- T. Sollner, S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, and J. E. Rothman. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362 (6418):318-324, 1993.
- P. K. Sorger and H. R. Pelham. The glucose-regulated protein grp94 is related to heat shock protein hsp90. *J.Mol.Biol.* 194 (2):341-344, 1987.
- W. S. Sossin, J. M. Fisher, and R. H. Scheller. Sorting within the regulated secretory pathway occurs in the trans-Golgi network. *J.Cell Biol.* 110 (1):1-12, 1990.
- J. Spiess and W. Vale. Multiple forms of somatostatin-like activity in rat hypothalamus. *Biochemistry* 19 (13):2861-2866, 1980.
- L. E. Stahl, R. L. Wright, J. D. Castle, and A. M. Castle. The unique proline-rich domain of parotid proline-rich proteins functions in secretory sorting. *J.Cell Sci.* 109 (Pt 6):1637-1645, 1996.
- M. A. Stamnes and J. E. Rothman. The binding of AP-1 clathrin adaptor particles to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein. *Cell* 73 (5):999-1005, 1993.
- G. Stenbeck, C. Harter, A. Brecht, D. Herrmann, F. Lottspeich, L. Orci, and F. T. Wieland. beta'-COP, a novel subunit of coatomer. *EMBO J.* 12 (7):2841-2845, 1993.
- A. Stieneke-Grober, M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H. D. Klenk, and W. Garten. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* 11 (7):2407-2414, 1992.
- T. J. Stoller and D. Shields. The propeptide of preprosomatostatin mediates intracellular transport and secretion of alpha-globin from mammalian cells. *J.Cell Biol.* 108 (5):1647-1655, 1989.

- T. J. Stoller and D. Shields. The role of paired basic amino acids in mediating proteolytic cleavage of prosomatostatin. Analysis using site-directed mutagenesis. *J.Biol.Chem.* 264 (12):6922-6928, 1989.
- A. M. Swift and C. E. Machamer. A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J.Cell Biol.* 115 (1):19-30, 1991.
- B. L. Tang, S. H. Wong, S. H. Low, and W. Hong. The transmembrane domain of N-glucosaminyltransferase I contains a Golgi retention signal. *J.Biol.Chem.* 267 (14):10122-10126, 1992.
- R. D. Teasdale, G. D'Agostaro, and P. A. Gleeson. The signal for Golgi retention of bovine beta 1,4-galactosyltransferase is in the transmembrane domain. *J.Biol.Chem.* 267 (18):13113, 1992.
- C. Thiele, H. H. Gerdes, and W. B. Huttner. Protein secretion: puzzling receptors. *Curr.Biol.* 7 (8):R496-R500, 1997.
- C. Thiele and W. B. Huttner. Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to secretory granules-recent developments. *Semin.Cell Dev.Biol.* 9 (5):511-516, 1998.
- C. Thiele and W. B. Huttner. The disulfide-bonded loop of chromogranins, which is essential for sorting to secretory granules, mediates homodimerization. *J.Biol.Chem.* 273 (2):1223-1231, 1998.
- G. Thomas, B. A. Thorne, L. Thomas, R. G. Allen, D. E. Hruby, R. Fuller, and J. Thorner. Yeast KEX2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* 241 (4862):226-230, 1988.
- J. Tooze and S. A. Tooze. Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells. *J.Cell Biol.* 103 (3):839-850, 1986.
- J. Tooze, S. A. Tooze, and S. D. Fuller. Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. *J.Cell Biol.* 105 (3):1215-1226, 1987.
- S. A. Tooze. Biogenesis of secretory granules. Implications arising from the immature secretory granule in the regulated pathway of secretion. *FEBS Lett.* 285 (2):220-224, 1991.
- S. A. Tooze, G. J. Martens, and W. B. Huttner. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* 11 (3):116-122, 2001.
- S. Tsunasawa and F. Sakiyama. Amino-terminal acetylation of proteins: an overview. *Methods Enzymol.* 106:165-170, 1984.

C. D. Unsworth, J. Hughes, and J. S. Morely. O-sulphated Leu-enkephalin in brain. *Nature* 295 (5849):519-522, 1982.

W. J. van de Ven, J. Voorberg, R. Fontijn, H. Pannekoek, A. M. van den Ouweland, H. L. van Duijnhoven, A. J. Roebroek, and R. J. Siezen. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* 14 (4):265-275, 1990.

O. Varlamov, L. D. Fricker, H. Furukawa, D. F. Steiner, S. H. Langley, and E. H. Leiter. Beta-cell lines derived from transgenic Cpe(fat)/Cpe(fat) mice are defective in carboxypeptidase E and proinsulin processing. *Endocrinology* 138 (11):4883-4892, 1997.

O. Vindrola. Rapid cleavage of the endogenous PC3 prosegment and slow conversion to 74 kDa and 66 kDa proteins in AtT-20 cells. *Neuropeptides* 27 (2):109-120, 1994.

S. Voigt, B. Jungnickel, E. Hartmann, and T. A. Rapoport. Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* 134 (1):25-35, 1996.

I. Wada, D. Rindress, P. H. Cameron, W. J. Ou, J. J. Doherty, D. Louvard, A. W. Bell, D. Dignard, D. Y. Thomas, and J. J. Bergeron. SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 266 (29):19599-19610, 1991.

A. Waheed, A. Hasilik, and K. von Figura. Processing of the phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes. Characterization and partial purification of a microsomal alpha-N-acetylglucosaminyl phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 256 (11):5717-5721, 1981.

P. Walter, I. Ibrahimi, and G. Blobel. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* 91 (2 Pt 1):545-550, 1981.

P. Walter and G. Blobel. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J. Cell Biol.* 91 (2 Pt 1):551-556, 1981.

T. G. Warren and D. Shields. Expression of preprosomatostatin in heterologous cells: biosynthesis, posttranslational processing, and secretion of mature somatostatin. *Cell* 39 (3 Pt 2):547-555, 1984.

M. G. Waters, T. Serafini, and J. E. Rothman. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* 349 (6306):248-251, 1991.



T. Weber, B. V. Zemelman, J. A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T. H. Sollner, and J. E. Rothman. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92 (6):759-772, 1998.

S. W. Whiteheart, I. C. Griff, M. Brunner, D. O. Clary, T. Mayer, S. A. Buhrow, and J. E. Rothman. SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. *Nature* 362 (6418):353-355, 1993.

S. H. Wong and W. Hong. The SXYQRL sequence in the cytoplasmic domain of TGN38 plays a major role in trans-Golgi network localization. *J. Biol. Chem.* 268 (30):22853-22862, 1993.

H. Xu and D. Shields. Prohormone processing in the trans-Golgi network: endoproteolytic cleavage of prosomatostatin and formation of nascent secretory vesicles in permeabilized cells. *J. Cell Biol.* 122 (6):1169-1184, 1993.

H. Xu and D. Shields. Prosomatostatin processing in permeabilized cells. Endoproteolytic cleavage is mediated by a vacuolar ATPase that generates an acidic pH in the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 269 (36):22875-22881, 1994.

H. Xu and D. Shields. Prohormone processing in permeabilized cells: endoproteolytic cleavage of prosomatostatin in the trans-Golgi network. *Biochimie* 76 (3-4):257-264, 1994.

L. Zollinger, C. Racine, P. Crine, G. Boileau, D. Germain, D. Y. Thomas, and F. Gossard. Intracellular proteolytic processing of proopiomelanocortin in heterologous COS-1 cells by the yeast KEX2 endoprotease. *Biochem. Cell Biol.* 68 (3):635-640, 1990.

