

Konwertazy probiałkowe – rodzina proteaz serynowych o szerokim spektrum funkcji fizjologicznych

Izabela Małuch^{1,✉}

Aleksandra Walewska²

Emilia Sikorska¹

Adam Prahl²

¹Pracownia Badań Strukturalnych Biopolimerów, Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

²Pracownia Chemii Peptydów, Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

✉Pracownia Badań Strukturalnych Biopolimerów, Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk; tel.: (58) 523 50 81, e-mail: izabela.maluch@ug.edu.pl

Artykuł otrzymano 6 września 2016 r.
Artykuł zaakceptowano 13 października 2016 r.

Słowa kluczowe: proteazy serynowe, konwertazy probiałkowe, furyna

Podziękowania: Badania naukowe prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej zostały częściowo sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji nr DEC-2012/05/N/ST5/01080.

STRESZCZENIE

Duża grupa białek wydzielniczych, których działanie odgrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu żywych organizmów, jest syntezowana w postaci nieaktywnych cząsteczek prekursorowych. Ich biologicznie czynne formy powstają w wyniku licznych modyfikacji potranslacyjnych. Niektóre spośród tych procesów zachodzą nieodwracalnie, trwale zmieniając budowę danego związku. Przykładem takiej modyfikacji jest m.in. katalityczna obróbka białek przebiegająca z udziałem enzymów proteolitycznych. Spośród pięciu wyodrębnionych klas tych enzymów, najliczniejszą grupę stanowią proteazy serynowe (EC 3.4.21). Przykładem endoproteaz serynowych są produkowane w organizmach ssaków konwertazy probiałkowe (PCs), do których należą: furyna, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6, PC7, PCSK9 i SKI-1. PCs odgrywają kluczową rolę w aktywacji wielu białek prekursorowych, prowadząc do powstania biologicznie czynnych form enzymów, hormonów, cząsteczek sygnałowych, czynników transkrypcyjnych oraz czynników wzrostu. W niniejszym artykule podsumowano aktualny stan wiedzy na temat biosyntezy, struktury oraz specyficzności substratowej konwertaz probiałkowych. Wskazano również związek pomiędzy ekspresją tkankową, lokalizacją wewnątrzkomórkową i aktywnością tych enzymów, a rolą jaką pełnią w organizmach ssaków.

WPROWADZENIE

Konwertazy probiałkowe (PCs, ang. *proprotein convertases*) stanowią rodzinę dziewięciu enzymów, których aktywność zależna jest od stężenia jonów wapniowych. Do PCs zaliczane są: furyna, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6, PC7, PCSK9 oraz SKI-1 [1] (wymienione skróty nazw konwertaz probiałkowych są powszechnie stosowane w literaturze naukowej; pełne anglo- oraz polskojęzyczne nazwy wszystkich enzymów zestawiono w tabeli 1).

Porównując te enzymy pod względem strukturalnym i biochemicznym, pierwsza siódemka jest bardzo podobna do siebie, wykazując ponadto wysoki stopień podobieństwa do bakteryjnej subtylizyny oraz drożdżowej keksyny. Natomiast pozostałe dwie konwertazy probiałkowe, PCSK9 i SKI-1, zaliczane są do innych rodzin i wykazują odmienną strukturę domen oraz specyficzność substratową.

Historia odkrycia konwertaz probiałkowych jest stosunkowo krótka, dlatego stanowią one źródło stale rosnącego zainteresowania naukowców. Pierwszym odkrytym przedstawicielem omawianej rodziny enzymów jest furyna, którą zidentyfikowano w 1989 roku [2]. W latach 1989-2003 zostały zidentyfikowane i scharakteryzowane pozostałe enzymy zaliczane do PCs. Do dnia dzisiejszego prowadzone są badania mające na celu ocenę wpływu poszczególnych enzymów na embriogenezę i rozwój osobniczy oraz zdefiniowanie roli konwertaz probiałkowych w rozwoju licznych stanów patofizjologicznych.

STRUKTURA ENZYMÓW Z RODZINY PCs

Jedynym enzymem z rodziny PCs o w pełni poznanej strukturze przestrzennej jest furyna [3] (Ryc. 1). Kieszenie substratowe siedmiu konwertaz hydrolizujących wiązanie peptydowe po zasadowym aminokwasie (wszystkich z wyjątkiem PCSK9 i SKI-1) są podobnie zbudowane i wysoce zachowane ewolucyjnie, dlatego możliwe jest przewidywanie ich prawdopodobnej struktury na podstawie posiadanych informacji dotyczących furyny [4]. Analizując jej strukturę krystalograficzną dowiedziono, że w obrębie domeny katalitycznej zlokalizowana jest grupa ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych [3,5], która najprawdopodobniej określa specyfikę enzymu względem substratu zawierającego reszty zasadowe [3,6]. Opisujące uprzednio siedem PCs wykazuje wysoką homologię sekwencyjną w obrębie domen katalitycznych oraz domen P (Ryc. 2). Dwie ostatnie, SKI-1 i PCSK9, również posiadają domeny katalityczne o budowie zbliżonej do pozostałych enzymów tej rodziny, jednak zasadniczo różnią się w C-końcowym fragmencie łańcucha białkowego.

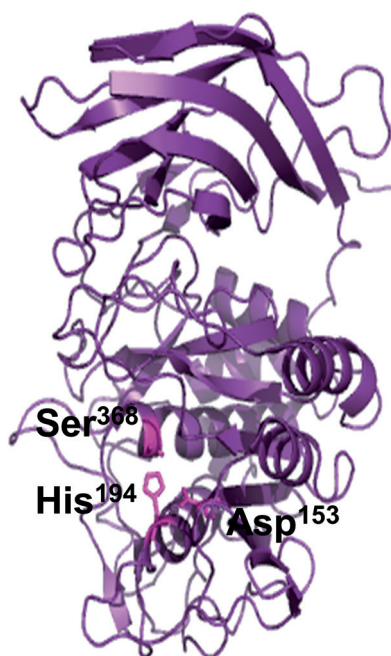
Tabela 1. Nomenklatura enzymów z rodziny konwertaz probiałkowych.

Powszechnie stosowany/ a skrót nazwy/nazwa enzymu	Synonim	Pełna nazwa enzymu w języku angielskim	Pełna nazwa enzymu w języku polskim*
PC1/3	PCSK1	proprotein convertase 1/3 proprotein convertase subtilisin/kexin type 1	konwertaza probiałkowa 1/3 konwertaza probiałkowa typu 1 o aktywności subtylizyny/keksyny
PC2	PCSK2	proprotein convertase 2 proprotein convertase subtilisin/kexin type 2	konwertaza probiałkowa 2 konwertaza probiałkowa typu 2 o aktywności subtylizyny/keksyny
furyna	PACE PCSK3	paired basic amino acid cleaving enzyme proprotein convertase subtilisin/kexin type 3	enzym hydrolizujący wiązanie zlokalizowane po sparowanych zasadowych resztach aminokwasowych konwertaza probiałkowa typu 3 o aktywności subtylizyny/keksyny
PC4	PCSK4	proprotein convertase 4 proprotein convertase subtilisin/kexin type 4	konwertaza probiałkowa 4 konwertaza probiałkowa typu 4 o aktywności subtylizyny/keksyny
PC5/6	PCSK5	proprotein convertase 5/6 proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	konwertaza probiałkowa 5/6 konwertaza probiałkowa typu 5 o aktywności subtylizyny/keksyny
PACE4	PCSK6	paired basic amino acid cleaving enzyme 4 proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	enzym hydrolizujący wiązanie zlokalizowane po sparowanych zasadowych resztach aminokwasowych 4 konwertaza probiałkowa typu 6 o aktywności subtylizyny/keksyny
PC7	PCSK7	proprotein convertase 7 proprotein convertase subtilisin/kexin type 7	konwertaza probiałkowa 7 konwertaza probiałkowa typu 7 o aktywności subtylizyny/keksyny
SKI-1		subtilisin/kexin-isozyme 1	izoenzym subtylizyny/keksyny 1
PCSK9		proprotein convertase subtilisin/kexin type 9	konwertaza probiałkowa typu 9 o aktywności subtylizyny/keksyny

*nie ma wytycznych dotyczących nazewnictwa konwertaz probiałkowych stosowanych w polskojęzycznej literaturze naukowej; zestawione w tabeli nazwy, stworzone z zachowaniem reguł językowych, najtrafniej oddają sens nazw enzymów w języku angielskim

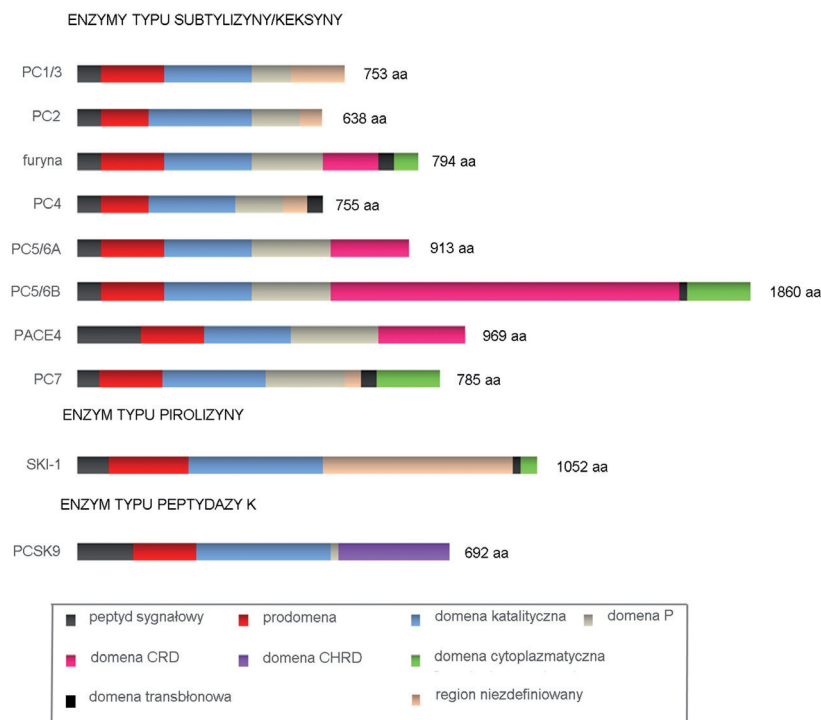
Wszystkie enzymy zaliczane do konwertaz probiałkowych różnią się znacznie długością łańcuchów białkowych oraz składem aminokwasowym jego poszczególnych frag-

mentów, jednak posiadają zbliżony schemat budowy strukturalnej (Ryc. 2), w której wyróżnić można pięć analogicznych segmentów [7,8]:



Rycina 1. Struktura krystalograficzna ludzkiej furyny (pdb 1p8j). Wyszczególnione trzy reszty aminokwasowe tworzą triadę katalityczną proteaz serynowych (Ser³⁶⁸/His¹⁹⁴/Asp¹⁵³).

- peptyd sygnałowy (sekwencja „pre”) – odpowiedzialny jest za wkroczenie enzymu na szlak wydzielniczy, kierując translokacją prekursora enzymu do siateczki śródplazmatycznej;
- prodomena – odpowiada za właściwy szlak zwinięcia łańcucha białkowego enzymu. Ponadto może również pełnić funkcję wewnątrzcząsteczkowego inhibitora utrzymującego enzym w jego nieaktywnej formie do czasu, aż znajdzie się w środowisku o odpowiednim pH oraz wymaganym stężeniu jonów wapniowych, co zainicjuje proces autoobróbki polegającej na usunięciu prodomeny;
- domena katalityczna – zawiera zachowane ewolucyjnie reszty aminokwasowe tworzące triadę katalityczną (Asp, His, Ser) oraz resztę asparaginy tworzącą dziurę oksyanionową i zaangażowaną w jej stabilizację. Fragment ten jest odpowiedzialny za oddziaływanie z substratem oraz hydrolizę odpowiedniego wiązania peptydowego. Domeny katalityczne enzymów PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 i PC7 wykazują ok. 50-70% podobieństwo sekwencyjne do furyny;
- domena P – niezbędna do zachowania aktywności katalitycznej enzymu. Odgrywa kluczową rolę w stabilizacji



Rycina 2. Schemat budowy strukturalnej ludzkich konwertaz probiałkowych (sporządzono na podstawie [10]).

PCs oraz zależności ich aktywności od pH/[Ca(II)]. Niekiedy pojedyncze mutacje w obrębie tej domeny mogą doprowadzić do całkowitej dezaktywacji konwertaz probiałkowych, prawdopodobnie przez zmianę sposobu zwinienia łańcucha polipeptydowego i zaburzenie prawidłowej konformacji kieszeni enzymatycznej. Dodatkowo w obrębie domeny P sześciu konwertaz probiałkowych (z wyjątkiem PC7, SKI-1 oraz PCSK9) zlokalizowany jest tzw. motyw RGD, w którego skład wchodzi reszty argininy, glicyny i kwasu asparaginowego [9]. Budowa domeny P enzymów wyszczególnionych w poprzednim podpunkcie wykazuje ok. 35-55% podobieństwo sekwencyjne do furyny;

- domena C-końcowa – jej budowa jest zróżnicowana i charakterystyczna dla poszczególnych enzymów należących do PCs. W jej skład mogą wchodzić różne kombinacje elementów strukturalnych określanych jako: domena bogata w reszty cysteiny (CRD, jak w przypadku furyny, PACE4 i PC5/6), domena bogata w reszty cysteiny i histydyny (CHRD, charakterystyczna tylko dla PCSK9), domena transbłonowa (obecna w strukturach furyny, PC4, PC5/6B, PC7 i SKI-1), domena cytoplazmatyczna (furyna, PC5/6B, PC7, SKI-1) i region niezdefiniowany (PC1/3, PC2, PC4, PC7 i SKI-1). Budowa domeny C-końcowej warunkuje unikatową lokalizację komórkową każdego z enzymów.

SPECYFICZNOŚĆ SUBSTRATOWA KONWERTAZ PROBIAŁKOWYCH

Konwertazy probiałkowe odpowiadają za potranslacyjne przekształcanie szeregu białek prekursorowych do form aktywnych biologicznie. Wszystkie enzymy należące do rodziny PCs wymagają obecności jonów wapniowych do

przeprowadzenia hydrolizy ich preferowanych substratów. Oprócz PC1/3 i PC2, które wykazują największą aktywność w niskim pH, wszystkie konstytutywnie wydzielane konwertazy wymagają środowiska o odczynie lekko kwaśnym lub obojętnym [10]. Konwertazy probiałkowe posiadające domeny katalityczne najbardziej zbliżone do siebie pod kątem budowy, czyli wspomniane już wcześniej furyna, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 i PC7, hydrolizują wiązanie peptydowe zlokalizowane w substracie po karboksylowej stronie zasadowego aminokwasu występujące w łańcuchu polipeptydowym po ściśle zdefiniowanym motywie: Lys/Arg-Xaaⁿ-Lys/Arg↓ (gdzie Xaa oznacza dowolną resztę kodowanego aminokwasu białkowego poza cysteiną, a współczynnik *n* może przyjmować wartości 0, 2, 4 lub 6) [6,11]. Enzymy te zaangażowane są w procesy przekształcania prekursorów białek, które zachodzą głównie w aparacie Golgiego, endosomach, niedojrzałych pęcherzykach wydzielniczych, na powierzchni komórek lub w macierzy pozakomórkowej [11,12]. Do grupy substratów aktywowanych przez wymienione siedem enzymów należą m.in. proteazy, hormony polipeptydowe, czynniki wzrostu i ich receptory, cząsteczki sygnałowe i adhezyjne, jak również patogenne białka bakteryjne, wirusowe i pasożytnicze [11,13].

SKI-1 wykazuje zupełnie odmienną specyficzność substratową niż uprzednio opisane konwertazy probiałkowe. Enzym ten hydrolizuje wiązanie peptydowe zlokalizowane w łańcuchu substratu po fragmencie: Lys/Arg-Xaa-(reszta aminokwasu o charakterze hydrofobowym)-Xaa↓ [14]. SKI-1 zaangażowany jest w regulację metabolizmu tłuszczów i homeostazy cholesterolu w organizmie [15]. Najbardziej nietypowym enzymem, jeśli chodzi o specyficzność substratową, należącym do konwertaz probiałkowych jest PCSK9, który autokatalitycznie aktywuje swój własny prekursor hydrolizując wiązanie peptydowe w miejscu zlokaliz-

zowanym po sekwencji Val-Phe-Ala-Gln¹⁵²↓[11,16]. Enzym ten jest głównym regulatorem stężenia lipoproteiny niskiej gęstości (LDL, ang. *low density lipoprotein*) we krwi.

Siedem spośród konwertaz probiałkowych hydrolizuje wiązanie peptydowe zlokalizowane w substracie po zdefiniowanym multizasadowym motywie Lys/Arg-Xaa_n-Lys/Arg↓ umiejscowionym w pozycjach P3-P1 (stosowany sposób nazewnictwa określającego specyficzność oddziaływań proteaz z substratami opracowany przez Schechter i Bergera [17]). Z informacji tych można wnioskować, że furyna, PC1/3, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 i PC7 wykazują zbliżone specyficzności substratowe. Niestety, do dnia dzisiejszego nie poznano gruntownie wszystkich różnic w strukturach substratów preferowanych przez poszczególne konwertazy, co dodatkowo pozwoliłoby zdefiniować różnice pomiędzy nimi samymi. Przeprowadzono jednak liczne badania mające na celu poszerzenie wiedzy z tego zakresu. Jako przykład posłużyć mogą te przeprowadzone przez Strongina i jego współpracowników, którzy zsyntetyzowali ponad 100 analogów decapeptydów zawierających w swoich sekwencjach motyw rozpoznawany przez zasadowo specyficzne konwertazy probiałkowe [18]. Peptydy te były zaprojektowane na podstawie sekwencji poznanych wcześniej substratów furyny. Wyniki przeprowadzonych badań dostarczyły wstępnych informacji dotyczących subtelnych różnic w specyficznościach substratowych furyny, PC2, PC4, PACE4, PC5/6 i PC7 (Tab. 2).

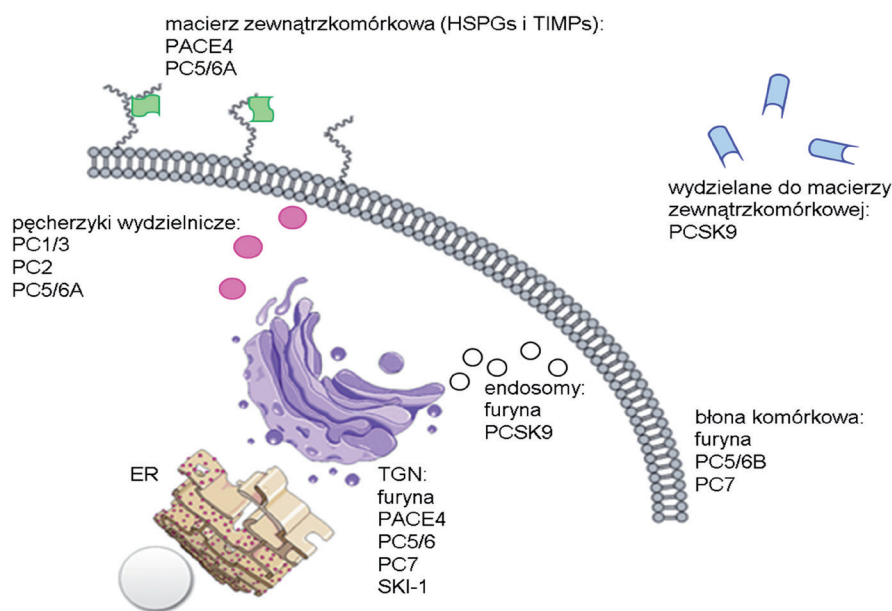
Analizując przedstawione wyniki, można wyróżnić trzy grupy specyficzności substratowych wykazywanych przez zasadowo specyficzne konwertazy probiałkowe. Pierwszą stanowi wyłącznie furyna, drugą – PACE4, PC4, PC5/6 i PC7. Najbardziej odrębnym enzymem jest PC2, który tworzy trzecią grupę. Przeprowadzone badania rzuciły nowe światło na zrozumienie różnic w specyficznościach oraz funkcjach biologicznych pełnionych przez najbliższe spokrewnione ze sobą enzymy z rodziny PCs. Należy jednak mieć na uwadze, że nawet jeżeli dwie lub więcej konwertaz probiałkowych hydrolizują prekursor białkowy w tym samym miejscu łańcucha w idealnych warunkach *in vitro*, możliwe jest, że tylko jeden z tych enzymów jest rzeczywi-

ście w stanie przeprowadzić ten proces *in vivo*, ze względu na określoną lokalizację każdej z PCs wewnątrz żywej komórki.

Pomimo wspomnianych różnic w strukturach substratów furyny i PACE4, to właśnie te dwa enzymy uważane są za zdecydowanie najbardziej podobne do siebie, zarówno pod kątem sekwencji aminokwasowych, jak i struktury przestrzennej [5]. Ponadto, geny kodujące struktury furyny oraz PACE4 zlokalizowane są w obrębie tych samych chromosomów: 7. u myszy i 15. u ludzi [11,19]. Ze względu na liczne analogie tych dwóch enzymów można stwierdzić, że struktury ich substratów również mogą wykazywać pewne podobieństwo. Identyfikacja substratów specyficznych względem każdego z siedmiu enzymów należących do PCs stanowi wciąż duże wyzwanie dla naukowców z uwagi na wspomniany uprzednio wysoki stopień homologii w obrębie ich domen katalitycznych. Dzięki gruntownej charakterystyce furyny, znane są właściwości fizyczne motywu jej miejsca cięcia, który zbudowany jest z dwudziestu reszt aminokwasowych. Na podstawie tych informacji można przewidzieć, jakie reszty aminokwasowe są preferowane w sekwencji substratu. Reszty aminokwasowe zlokalizowane w pozycjach P3, P5, P6, P7 oraz P1'-P4' odgrywają istotną rolę w kształtowaniu aktywności katalitycznej furyny [20]. Z doniesień literaturowych [6,21] wiadomo, że pozycje P5 i P6 substratu furyny tworzą region obdarzony wypadkowym ładunkiem dodatnim. W pozycjach P7 i P8 preferowane są reszty o krótkich i hydrofilowych łańcuchach bocznych. W porównaniu do furyny, kieszeń substratowa S6 enzymu PACE4 posiada mniejszy wypadkowy ładunek ujemny, wykazując powinowactwo względem innych reszt aminokwasowych niż tylko zasadowe, faworyzowane przez furynę [6]. Ta oraz inne subtelne różnice [3,22] powinny pozwolić na zdefiniowanie sekwencji substratów specyficznie oddziaływujących z poszczególnymi enzymami spośród całej rodziny PCs. W chwili obecnej prowadzone są badania nad ustaleniem struktury przestrzennej PACE4, jednak należy podkreślić, że dopóki nie jest ona dokładnie poznana, poszukiwanie substratów oddziaływujących z tą konwertazą w sposób selektywny, w oparciu jedynie o modelowanie molekularne, może okazać się niewystarczające.

Tabela 2. Reszty aminokwasowe preferowane w poszczególnych fragmentach łańcucha peptydowego substratu [5,18].

Pozycja w łańcuchu	Preferowane reszty aa	Enzym, względem którego wykazywana jest specyficzność	Komentarz
P6	Gly, Asp, Asn, Glu, Gln, Leu	wszystkie wymienione PCs	
P5	Val, Ile, Leu, Gln, Asn	wszystkie wymienione PCs	hydrofobowe reszty aminokwasowe podwyższają powinowactwo względem PCs
P4	Arg, Gln, Ile, Arg	PACE4, PC4, PC5/6, PC2 furyna, PC7	Glu, Lys, His, Phe, Tyr, Gly obniżają powinowactwo względem PCs
P3	Lys, Arg, Gln, Ser, Glu	furyna, PC4, PACE4, PC5/6, PC7, PC2	
P2	Arg, Val, Arg, Leu, Lys	PACE4, PC4, PC5/6 furyna, PC7, PC2	Pro obniża powinowactwo względem PCs
P1	Arg, Lys	wszystkie wymienione PCs	Arg podwyższa powinowactwo względem PCs
P1'	Ala, Ser, Asp, Glu, Thr, Arg	furyna, PC4, PACE4, PC5/6, PC7, PC2	Val, Pro, Cys obniżają powinowactwo względem PCs
P2'	Ile	wszystkie wymienione PCs	Gly obniża powinowactwo względem PCs
P3'	Asp, Pro	furyna, PC4, PACE4, PC5/6, PC7	Val obniża powinowactwo względem PCs
P4'	Met	PACE4, PC4, PC5/6, PC7	Pro obniża powinowactwo względem PCs



Rycina 3. Rozmieszczenie poszczególnych enzymów z rodziny PCs wewnątrz komórki.

BIOSYNTETA I LOKALIZACJA WEWNĄTRZKOMÓRKOWA KONWERTAZ PROBIĄŁKOWYCH

Rozmieszczenie tkankowe, lokalizacja wewnątrzkomórkowa oraz szlaki wydzielania każdego z enzymów należących do konwertaz probiałkowych są odmienne i definiują selektywność tych enzymów względem specyficznych substratów [23]. Szczegółowe badania dotyczące natury PCs i katalizowanych przez nie reakcji dowodzą, że każdy z enzymów pełni specyficzne, ściśle określone funkcje biologiczne, dodatkowo, w przypadku niektórych z nich, wzajemnie się uzupełniając. Sposób i poziom syntezy konwertaz probiałkowych nie jest stały i zależy od wielu czynników, takich jak czas i miejsce wewnątrz komórki, dlatego też poszczególne enzymy produkowane są w różnych ilościach oraz kombinacjach.

Konwertazy probiałkowe syntezowane są w siateczce śródplazmatycznej (ER) w postaci nieaktywnych prekursorów, zymogenów. Ich aktywacja zachodzi w wyniku autokatalitycznych reakcji wewnątrz ER (dla wszystkich kon-

wertaz z wyjątkiem PC2) lub w niedojrzałych pęcherzykach wydzielniczych (w przypadku PC2). Po zainicjowaniu szlaku sekrecyjnego konwertaz probiałkowych, czyli po usunięciu domeny stanowiącej peptyd sygnałowy, tworzy się heterodimer zbudowany z prodomeny pełniącej funkcję kompetycyjnego inhibitora niekowalencyjnie związanego z resztą cząsteczki białka (prodomena-PC) [10,24]. W kolejnym etapie heterodimer opuszcza ER i wędruje do konkretnego miejsca komórki, w którym uzyskuje pełną aktywność katalityczną, głównie w wyniku drugiego autokatalitycznego odszczepienia prodomeny. Ten szczegółowo zorganizowany mechanizm aktywacji zymogenów PCs zapewnia pełną aktywność biologiczną omawianych enzymów jedynie w tym miejscu komórki, w którym warunki pH i stężenia jonów wapniowych są optymalne dla przeprowadzenia procesów hydrolizy specyficznych dla nich substratów. Jedynym enzymem należącym do konwertaz probiałkowych,

który podczas aktywacji nie ulega drugiej autokatalitycznej reakcji jest PCSK9. Prodomena silnie hamuje aktywność tego białka, w wyniku trwałego związania z jego miejscem aktywnym [25].

Dojrzała forma każdego enzymu uwalniana jest w warunkach optymalnych dla jego aktywności biologicznej, definiowanych przez pełnione przez niego funkcje (Ryc. 3). Furyna i PC7 są aktywowane w sieci *trans* aparatu Golgiego (TGN, ang. *trans-Golgi network*) i mogą migrować do endosomów, na powierzchnię komórek i z powrotem do TGN [22]. PC1/3 i PC2 wykazują największą aktywność w pęcherzykach wydzielniczych [26]. Enzym SKI-1 jest aktywowany w sieci *cis* aparatu Golgiego oraz w jego środkowej części [27], natomiast PC5/6 i PACE4 w TGN lub na powierzchni komórek, gdzie związane są poprzez domenę CRD z proteoglikanami heparanosiarczanowymi (HSPGs, ang. *heparan sulfate proteoglycans*) lub tkankowymi inhibitorami metaloproteaz macierzy (TIMPs, ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*) i przekształcają specyficzne dla siebie substraty w tej lokalizacji lub w macierzy zewnątrzkomórkowej [28].

Tabela 3. Wewnątrzkomórkowa oraz tkankowa lokalizacja konwertaz probiałkowych [10].

Enzym	Gen kodujący	Dystrybucja tkankowa	Lokalizacja wewnątrzkomórkowa
PC1/3	<i>Pcsk1</i>	układ neuroendokrynnny	pęcherzyki wydzielnicze regulowane kwasowo
PC2	<i>Pcsk2</i>	układ neuroendokrynnny	pęcherzyki wydzielnicze regulowane kwasowo
furyna	<i>Furin</i>	enzym wszechobecny	sieć <i>trans</i> aparatu Golgiego, endosomy, powierzchnia komórek
PC4	<i>Pcsk4</i>	gruczoły płciowe	prawdopodobnie powierzchnia komórek
PC5/6	<i>Pcsk5</i>	szeroko rozpowszechniony: jelita, nerki, kora nadnerczy, jajniki	powierzchnia komórek, macierz pozakomórkowa
PACE4	<i>Pcsk6</i>	szeroko rozpowszechniony: mięśnie, serce, przysadka, mózdzek, jelita, nerki	powierzchnia komórek, macierz pozakomórkowa
PC7	<i>Pcsk7</i>	wszechobecny	sieć <i>trans</i> aparatu Golgiego, endosomy, powierzchnia komórek
SKI-1	<i>Mbtps1</i>	wszechobecny	biegun <i>cis</i> aparatu Golgiego oraz jego środkowa część, pęcherzyki endosomalne
PCSK9	<i>Pcsk9</i>	wątroba, jelita, nerki, płuca, śledziona	sieć <i>trans</i> aparatu Golgiego, macierz pozakomórkowa

Na podstawie wieloletnich badań nad rozmieszczeniem konwertaz probiałkowych wewnątrz organizmu dowiedziano, że geny kodujące te enzymy ulegają ekspresji prawie we wszystkich tkankach. Jedynie obecność PC1/3, PC2, PC4 i PCSK9 przypisana jest ściśle określonym narządom [1,11,23]. Rozmieszczenie poszczególnych konwertaz probiałkowych w organizmie oraz nazwy kodujących je ludzkich genów zestawiono w tabeli 3.

FIZJOLOGICZNE FUNKCJE KONWERTAZ PROBIAŁKOWYCH

Wyniki wieloletnich badań *in vivo* pozwoliły zrozumieć fizjologiczne funkcje poszczególnych konwertaz probiałkowych pełnione w organizmach żywych oraz rolę jaką enzymy te pełnią w rozwoju zarodkowym. Prace badawcze prowadzone z wykorzystaniem gryzoni modyfikowanych genetycznie w wyniku trwałej dezaktywacji określonego genu na poziomie DNA (organizmy knock-out, KO) oraz zmutowanych ludzkich genów *Pcsk*, dostarczyły obszernych informacji na temat specyficznych substratów poszczególnych enzymów z rodziny PCs i wpływu ich aktywności na zdrowie organizmów i rozwój stanów patofizjologicznych [12,29-31].

Konwertazy PC1/3 i PC2 mają podobne struktury łańcuchów białkowych i wykazują bardzo zbliżone, choć odrębne, specyficzności substratowe ściśle zdefiniowane dla każdej z nich. Oba enzymy są głównymi aktywatorami prohormonów i proneuropeptydów w ramach regulowanych szlaków sekrecyjnych komórek nerwowych oraz endokrynnych. Enzymy te zaangażowane są w przekształcanie do form biologicznie aktywnych wielu hormonów, m.in. proopiomelanokortyny (POMC, ang. *pro-opiomelanocortin*), proinsuliny, prosomatostatyny, proglukagonu, proenkefaliny, prodynorfiny, jak również prekursorów hormonu adrenokortykotropowego (pro-ACTH, ang. *precursor of adrenocorticotrophic hormone*) oraz neurotensyny (pro-NT) [32,33]. W organizmach żywych PC1/3 i PC2 często katalizują podobne procesy. Bardzo dobrym przykładem tego typu reakcji jest aktywowanie proinsuliny. Oba enzymy produkowane są w komórkach beta trzustkowych wysp Langerhansa i posiadają zdolność przekształcania proinsuliny w aktywną biologicznie insulinę. PC2 i PC1/3 wykazują różny poziom syntezy w poszczególnych miejscach tkanek neuroendokrynnych. Opisywane konwertazy mogą przekształcać prekursor tego samego białka uwalniając w efekcie różne produkty o odmiennych, a niekiedy nawet przeciwnych funkcjach. Znakomitym przykładem tego typu procesów jest aktywacja proglukagonu. PC2 przekształca go w komórkach alfa wysp trzustkowych uwalniając głównie glukagon, natomiast w jelitowych komórkach L proglukagon jest przekształcany przez PC1/3 uwalniając glukagonopodobne peptydy 1 i 2 (GLP-1 i GLP-2, ang. *glucagon-like peptide 1/2*) [34].

Pozbawienie organizmów aktywności PC1/3 i PC2 wywołuje bardzo poważne nieprawidłowości w funkcjonowaniu organizmu. Zarodki tego typu myszy nie rozwijają się prawidłowo i umierają przed końcem rozwoju zarodkowego [10]. Ponadto zakłócenie genu *Pcsk1* wpływa na opóźnienie wzrostu organizmów i powoduje karłowatość [35],

co prawdopodobnie spowodowane jest deficytem hormonu uwalniającego hormon wzrostu (GHRH, ang. *growth hormone-releasing hormone*). Istnieją również dowody, że utrata przez gen kodujący PC1/3 swoich funkcji jest związana z zainicjowaniem otyłości wieku wczesnego dzieciństwa. Z kolei zablokowanie syntezy enzymu PC2 u myszy nie powoduje zaburzeń w ich rozwoju ani płodności, jednak wywołuje szereg nieprawidłowości w przekształceniach neuroendokrynnych zachodzących w mózgu i wyspach trzustkowych tych zwierząt [36].

Najszerzej rozpowszechnioną w organizmach konwertazą probiałkową jest furyna, która pełni szereg istotnych funkcji w procesie embriogenezy. Wyłączenie u myszy genu kodującego ten enzym powoduje śmierć zarodków w jedenastym dniu rozwoju na skutek niewydolności hemodynamicznej i nieprawidłowości w procesie zamykania serca po stronie brzusznej [37], które na tym etapie embriogenezy ma postać pojedynczej rurki. Ten skomplikowany mechanizm wymaga proliferacji i migracji komórek, a oba te procesy regulowane są przez furynę. Dodatkowo, zarodki myszy KO nie ulegają obrotowi osiowemu [37], który poprzedza przebiegające w prawidłowy sposób prawostronne zapętlenie rurki serca.

Wśród substratów aktywowanych przez furynę znajdują się m.in. prekursor białek zaliczanych do transformujących czynników wzrostu β (TGF β , ang. *transforming growth factor- β*) [38], w tym białka morfogenetyczne kości 10 (BMP10, ang. *bone morphogenetic protein 10*) [39]. Dezaktywacja furyny w komórkach T powoduje utratę przez nie funkcji regulatorowych i efektorowych z uwagi na zmniejszoną produkcję czynników TGF β 1. Brak aktywacji tego typu czynników wzrostu oraz prekursorów innych białek zaangażowanych we wczesny rozwój mięśnia sercowego powoduje zaburzenia rozwoju zarodkowego. Kolejnymi białkami aktywowanymi przez furynę są prekursor cząsteczek adhezyjnych komórek naczyniowych (VACM-1, ang. *vascular cell adhesion molecule*), integryny $\alpha 5$ [40] oraz epilizyny (MMP-28), enzymu należącego do rodziny metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej [41]. W centralnym układzie nerwowym furyna odpowiedzialna jest za przekształcanie szeregu prekursorów czynników wzrostu, włącznie z czynnikiem wzrostu nerwów (NGF, ang. *nerve growth factor*) [42] oraz neuronalnych cząsteczek adhezyjnych i białek sygnałowych (kolejno L1CAM [43] i semaforyn [44]).

Kolejna konwertaza probiałkowa PC4 pełni istotne funkcje w procesie reprodukcji, między innymi wspomagając wczesne etapy rozwoju zarodkowego. Ponadto płodność samców, u których zablokowano ekspresję tego enzymu, zostaje obniżona [45]. Anomalie zaobserwowano również w przypadku zapłodnienia *in vitro* z użyciem spermy pozbawionej PC4. W jądrach i jajnikach gryzoni konwertaza ta przekształca prekursor peptydu aktywującego cyklazę adenylową przysadki (PACAP, ang. *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*) [46], natomiast w ludzkim łożysku prekursor insulinopodobnego czynnika wzrostu 2 (IGF-2, ang. *insulin-like growth factor 2*) [47]. Na liście substratów aktywowanych przez PC4 znajdują się również prekursor niektórych transbłonowych białek ADAM (adamalizyny, białka zawierające domenę dezintegryny i metaloproteazy,

(ang. *a disintegrin and metalloproteinase-like*): ADAM-1, -2, -3 oraz -5 [48].

W przypadku konwertazy probiałkowej PC5/6 obserwuje się tzw. polimorfizm białkowy. Występuje ona w postaci dwóch izoform enzymów różniących się od siebie budową, lokalizacją wewnątrzkomórkową, specyficznością substratową oraz pełnionymi funkcjami. Rozpuszczalna izoforma PC5/6A jest obecna w konstytutywnych oraz regulowanych szlakach egzocytozy, natomiast PC5/6B jest uwalniana wyłącznie w wyniku wydzielania ciągłego [28], głównie w przedziałach komórkowych obejmujących TGN i endosomy. Ponadto ta forma enzymu posiada wydłużoną (w stosunku do PC5/6A prawie czterokrotnie) domenę CRD zlokalizowaną w C-końcowym fragmencie łańcucha białkowego [28]. Transkrypty PC5/6B dominują w jelitach oraz nerkach, z kolei PC5/6A jest główną izoformą występującą w większości tkanek. Natomiast w wątrobie obydwie produkowane są w równych ilościach [49].

Enzym PC5/6 pełni szereg istotnych funkcji w embriogenezie, a utrata jego aktywności skutkuje śmiercią zarodków [49]. Zasadnicza rola tej konwertazy w warunkach *in vivo* sprowadza się do ustalania wzorca przód-tył zarodka poprzez regulację przekształcania jej specyficznego substratu, którym jest prekursor czynnika różnicowania wzrostu 11 (GDF11, ang. *growth differentiation factor 11*). Izoforma enzymu PC5/6A zaangażowana jest w przekształcanie wielu cząsteczek prekursorowych, w tym m.in. cholecystokininy [50], neurotensyny [51], metaloproteaz ADAMTS-4 [52] oraz należących do TGFβ białek Lefty zaangażowanych w różnicowanie endometrium i implantację zarodka [53,54].

Fizjologiczna rola jaką u kręgowców pełni kolejna konwertaza probiałkowa, PC7, wciąż nie jest gruntownie poznana. Dowiedziono jednak, że PC7 i furyna posiadają zbliżone specyficzności substratowe i często przekształcają prekursorzy tych samych cząsteczek m.in. NGF, białka morfogenetycznego kości 4 (BMP4, ang. *bone morphogenetic protein 4*), płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF, ang. *platelet-derived growth factor*) i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) [55-57]. Na podstawie przeprowadzonych prac badawczych zidentyfikowano kilka specyficznych substratów PC7. Enzym ten zaangażowany jest m. in. w proteolityczne przekształcanie prekursorów naskórkowego czynnika wzrostu (EGF, ang. *epidermal growth factor*) oraz TGFβ1a [58].

Podobnie jak furyna, PACE4 jest istotnym enzymem dla prawidłowego przebiegu embriogenezy, zwłaszcza przy określaniu osi lewo-prawej oraz rozwoju przedniej części centralnego układu nerwowego [29]. W przypadku braku PACE4 zarodki wykazują szereg nieprawidłowości (izomeryzm lewostronny płuc, dekstrokardia, cyklopia) oraz złożone wady morfogenetyczne kości i deformacje twarzoczaszki. Fenotypy myszy KO pozbawionych aktywności PACE4 znacznie różnią się od tych, w których unieczynniono gen *Furin* [59]. Sugeruje to, że chociaż PACE4 i furyna są zdolne do przekształcania podobnych substratów, mogą one również aktywować jeden lub więcej innych prekursorów podczas rozwoju zarodkowego. Pozytywnie organów wewnętrznych w organizmach kręgowców wykazują szereg symetrii bocznych. Udowodniono, że specyfikacja obu

typu osi (lewo-prawej i przednio-tylnej) w głównej mierze zależy od TGFβ-podobnych cząsteczek sygnałowych, takich jak Lefty i Nodal oraz białka BMP [60]. Niektóre z tych cząsteczek są aktywowane przez konwertazy probiałkowe specyficzne względem zasadowych aminokwasów [61]. Utrzymanie informacji o braku symetrii w budowie zarodka zachodzi w wyniku asymetrycznej ekspresji genów. Przykładem tego typu genów jest Nodal, kodujący białko należące do rodziny TGFβ, produkowane przez komórki węzła zarodkowego. Szlak, w którym uczestniczy Nodal jest regulowany przez cząsteczki Lefty-1 i Lefty-2 ograniczające nasiloną i asymetryczną translokację komórek węzła zarodkowego. Główną funkcją białka Nodal jest szerzenie informacji odnośnie asymetrii wzdłuż osi lewo-prawej do bocznej płytki mezodermy, a następnie do zawiązków różnych narządów. Aktywność PACE4 zdaje się być konieczna do utrzymania równowagi między czynnikami wzrostu i ich receptorami a antagonistycznymi w stosunku do nich białek w celu zapewnienia specyfikacji osi lewo-prawej.

Pozostałe dwie konwertazy probiałkowe odpowiedzialne są za gospodarkę lipidową organizmu. Jedną z głównych funkcji SKI-1 jest kontrola syntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych poprzez aktywację prekursorów czynników transkrypcyjnych białek SREBP1 i SREBP2 wiążących sekwencję odpowiedzi na sterole (ang. *sterol regulatory element-binding protein*) związanych z błoną siateczki śródplazmatycznej [62]. Dodatkowo wśród substratów przekształcanych przez ten enzym znajdują się również prekursorzy mózgowopochodnego czynnika wzrostu nerwów (BDNF, ang. *brain derived neurotrophic factor*), czynnika transkrypcyjnego 6 (ATF-6, ang. *activating transcription factor 6*), somatostatyny i kilku wirusowych glikoprotein [63,64]. W organizmach żywych konwertaza SKI-1 uczestniczy także w regulacji szeregu funkcji homeostatycznych, takich jak mineralizacja kości oraz odpowiedź na stres komórkowy.

Podobnie do SKI-1, konwertaza probiałkowa PCSK9 jest produkowana głównie w wątrobie i w jelicie cienkim [10], dwóch organach zaangażowanych w utrzymanie homeostazy cholesterolu w organizmie. Po samoaktywacji, PCSK9 traci zdolności proteolityczne i działa jedynie jako białko wiążące się ze specyficznymi receptorami lipoproteiny niskiej gęstości (LDLR, ang. *low-density lipoprotein receptor*) zlokalizowanymi na powierzchni komórek wątrobowych, uniemożliwiając tym samym przyłączanie się do nich wolnego cholesterolu zawartego w lipoproteinie niskiej gęstości (LDL-c). Ponadto enzym ten jest odpowiedzialny za degradację LDLR przez indukowanie endocytozy tych receptorów [30,65], czego skutkiem jest brak możliwości związania się cząsteczek cholesterolu z odpowiednimi receptorami i wzrost stężenia wolnego LDL-c we krwi [16,66]. Wybrane specyficzności substratowe poszczególnych konwertaz probiałkowych oraz efekty braku tych enzymów w organizmie zestawiono w tabeli 4.

PODSUMOWANIE

Konwertazy probiałkowe tworzą rodzinę dziewięciu proteaz serynowych, do których zaliczane są furyna, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6, PC7, PCSK9 oraz SKI-1. Enzymy te odgrywają kluczową rolę w przekształcaniach potranslacyjnych oraz aktywacji szeregu białek prekursorowych. Do

Tabela 4. Substraty konwertaz probiałkowych [7,10,29].

Konwertaza probiałkowa (R/K) X_n (R/K) ↓	Aktywowane substraty	Skutki wywołane deficytem enzymu
PC1/3	GHRH, ACTH, GLP1, GLP2	u ludzi: otyłość wieku dziecięcego, hipogonadyzm wtórny, niedoczynność kory nadnerczy, hiperinsulemia u myszy KO: zwiększona śmiertelność w okresie pre- i perinatalnym, karłowatość
PC2	β -endorfina, glukagon, α -MSH	u ludzi: (brak danych) u myszy KO: hipoglikemia, opóźnienie wzrostu, nieprawidłowości w przekształcaniu peptydów endokrynych
furyna	czynniki wzrostu (TGF β) receptory (np. insuliny) cząsteczki adhezyjne (integryna $\alpha 5$) metaloproteazy (MMP-14) toksyny bakteryjne (m.in. podjednostka pa83 toksyny węgliką) glikoproteiny wirusów (HIV gp160)	u ludzi: (brak danych) u myszy KO: śmierć zarodków, nieprawidłowości w rotacji osiowej i zamknięciu brzuszyn
PC4	IGF-2, PACAP	u ludzi: (brak danych) u myszy KO: obniżona płodność
PC5/6	czynniki wzrostu (GDF11) receptory (PTPRM) cząsteczki adhezyjne (integryna $\alpha 4$, neuronalne L1 CAM)	u ludzi: możliwe powiązanie z wadami rozwojowymi kregów, serca, tchawicy, płuc, nerek oraz kończyn u myszy KO: śmierć zarodków, niedorozwój płuc, agenezja nerek i podniebienia
PACE4	czynniki wzrostu (białka Nodal i Lefty) metaloproteazy (ADAMTS-4) glikoproteiny wirusów (białko Vpr wirusa HIV)	u ludzi: (brak danych) u myszy KO: wady płodu związane z defektami twarzoczaszki i centralnego układu nerwowego, jednoocze, śmierć zarodków
PC7	receptory (receptor transferyny 1)	u ludzi: (brak danych) u myszy KO: nie poznano nietypowych fenotypów
RX(L/I/V)X ↓		
SKI-1	czynniki transkrypcyjne (SREBPs, ATF6, CREBs) transferaza GlcNAc-1 glikoproteiny wirusów (Lassa virus i CCHF Gn)	u ludzi: (brak danych) u myszy KO: problemy z implantacją zarodka, zmniejszona synteza cholesterolu i kwasów tłuszczowych, śmierć zarodków
VFAQ ↓		
PCSK9	wyłącznie PCSK9	u ludzi: hipocholesterolemia u myszy KO: wzmożony wychwyt cholesterolu w wątrobie

α -MSH (ang. *α -melanocyte-stimulating hormone*) – hormon melanotropowy α ; ACTH (ang. *adrenocorticotrophic hormone*) – hormon adrenokortykotropowy; ADAMTS-4 (ang. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 4*) – białka zawierające domenę dezintegriny i metaloproteazy z motywem 4 trombosporyny; ATF6 (ang. *activating transcription factor 6*) – czynnik transkrypcyjny 6; CCHF Gn (ang. *Crimian–Congo haemorrhagic fever virus glycoprotein Gn*) – glikoproteina Gn wirusa gorączki krwotocznej krymsko-kongijskiej; CREBs (ang. *cyclic AMP-responsive element binding proteins*) – białka aktywowane w odpowiedzi na cykliczny AMP; GDF11 (ang. *growth differentiation factor 11*) – czynnik różnicowania wzrostu 11; GHRH (ang. *growth hormone-releasing hormone*) – hormon uwalniający hormon wzrostu; GLP-1/2 (ang. *glucagon-like peptide 1/2*) – glukagonopodobny peptyd 1/2; IGF-2 (ang. *insulin-like growth factor 2*) – insulinopodobny czynnik wzrostu 2; L1 CAM (ang. *L1 cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezyjna L1; MMP-14 (ang. *matrix metalloproteinase 14*) – metaloproteaza macierzy zewnątrzkomórkowej 14; PACAP (ang. *pituitary adenylyl cyclase-activating peptide*) – peptyd aktywujący cyklazę adenylową przysadki; PTPRM (ang. *protein tyrosine phosphatase receptor type M*) – receptor białkowej fosfatazy tyrozynowej typu M; SREBPs (ang. *sterol regulatory element-binding proteins*) – białka wiążące sekwencje odpowiedzi na sterole; TGF β (ang. *transforming growth factor- β*) – transformujący czynnik wzrostu β

grupy substratów aktywowanych przez PCs należą m.in. proteazy, hormony, czynniki wzrostu i ich receptory, czynniki transkrypcyjne, jak również cząsteczki sygnałowe oraz adhezyjne [7,8,10,11,13,67]. Tym samym, konwertazy probiałkowe regulują szereg procesów fizjologicznych, w tym embriogenezę, pracę centralnego układu nerwowego oraz gospodarkę lipidową organizmu.

Aktywność konwertaz probiałkowych jest również związana z rozwojem różnych stanów patofizjologicznych, takich jak infekcje wirusowe i bakteryjne, osteoporoza, hiperglukemia, miażdżyca i schorzenia sercowo-naczyniowe, choroby neurodegeneracyjne (w tym choroba Alzheimera) oraz choroby nowotworowe [7,10,67,68]. Tak duża liczba substratów aktywowanych przez konwertazy probiałkowe, sugeruje szeroki zakres potencjalnych zastosowań klinicz-

nych. Regulacja stężenia poszczególnych konwertaz probiałkowych poprzez wykorzystanie ich selektywnych inhibitorów, może w przyszłości zaowocować opracowaniem innowacyjnych środków terapeutycznych.

PIŚMIENNICTWO

- Seidah NG, Sadr MS, Chrétien M, Mbikay M (2013) The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *J Biol Chem* 288: 21473-21481
- Van de Ven WJ, Voorberg J, Fontijn R, Pannekoek H, van den Ouweland AM, van Duijnhoven HL, Roebroek AJ, Siezen RJ (1990) Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep* 14: 265-275
- Henrich S, Cameron A, Bourenkov GP, Kiefersauer R, Huber R, Lindberg I, Bode W, Than ME (2003) The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* 10: 520-526

4. Duckert P, Brunak S, Blom N (2004) Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel* 17: 107-112
5. Henrich S, Lindberg I, Bode W, Than ME (2005) Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: explanation of their specificity. *J Mol Biol* 345: 211-227
6. Tian S, Jianhua W (2010) Comparative study of the binding pockets of mammalian proprotein convertases and its implications for the design of specific small molecule inhibitors. *Int J Biol Sci* 6: 89-95
7. Artenstein AW, Opal SM (2011) Proprotein convertases in health and disease. *N Engl J Med* 365: 2507-2518
8. Couture F, D'Anjou F, Day R (2011) On the cutting edge of proprotein convertase pharmacology: from molecular concepts to clinical applications. *Biomol Concepts* 2: 421-438
9. Rovère C, Luis J, Lissitzky JC, Basak A, Marvaldi J, Chrétien M, Seidah NG (1999) The RGD motif and the C-terminal segment of proprotein convertase 1 are critical for its cellular trafficking but not for its intracellular binding to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *J Biol Chem* 274: 12461-12467
10. Seidah NG, Prat A (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov* 11: 367-383
11. Seidah NG, Mayer G, Zaid A, Rousselet E, Nassoury N, Poirier S, Essalmani R, Prat A (2008) The activation and physiological functions of the proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1111-1125
12. Creemers JW, Khatib AM (2008) Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Front Biosci* 13: 4960-4971
13. Seidah NG (2011) What lies ahead for the proprotein convertases? *Ann N Y Acad Sci* 1220: 149-161
14. Pasquato A, Pullikotil P, Asselin MC, Vacatello M, Paolillo L, Ghezzi F, Basso F, Di Bello C, Dettin M, Seidah NG (2006) The proprotein convertase SKI-1/S1P. *In vitro* analysis of *Lassa virus* glycoprotein-derived substrates and *ex vivo* validation of irreversible peptide inhibitors. *J Biol Chem* 281: 23471-23481
15. Seidah NG, Prat A (2007) The proprotein convertases are potential targets in the treatment of dyslipidemia. *J Mol Med* 85: 685-969
16. Horton JD, Cohen JC, Hobs HH (2007) Molecular biology of PCSK9: Its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* 32: 71-77
17. Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27: 157-162
18. Remacle AG, Shiryayev SS, Oh ES, Cieplak P, Srinivasan A, Wei G, Lidington RC, Ratnikov BI, Parent A, Desjardins R, Day R, Smith JW, Lebl M, Strongin AY (2008) Substrate cleavage analysis of furin and related proprotein convertases. A comparative study. *J Biol Chem* 283: 20897-20906
19. Bassi DE, Mahloogi H, Klein-Szanto AJ (2000) The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog* 28: 63-69
20. Shiryayev SA, Chernov AV, Golugkov VS, Thomsen ER, Chudin E, Chee MS, Kozlov IA, Strongin AY, Cieplak P (2013) High-resolution analysis and functional mapping of cleavage sites and substrate proteins of furin in the human proteome. *PLoS One* 8: e54290
21. Tian S, Huang Q, Fang Y, Wu J (2011) Furin DB: A database of 20-residue furin cleavage site motifs, substrates and their associated drugs. *Int J Mol Sci* 12: 1060-1065
22. Mesnard D, Donnison M, Fuerer C, Pfeffer PL, Constam DB (2011) The microenvironment patterns the pluripotent mouse epiblast through paracrine Furin and Pace4 proteolytic activities. *Genes Dev* 25: 1871-1880
23. Thomas G (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 735-766
24. Seidah NG, Day R, Marcinkiewicz M, Chrétien M (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci* 839: 9-24
25. Cunningham D, Danley DE, Geoghegan KF, Griffor MC, Hawkins JL, Subashi TA, Varghese AH, Ammirati MJ, Culp JS, Hoth LR, Mansour MN, McGrath KM, Seddon AP, Shenolikar S, Stutzman-Engwall KJ, Warren LC, Xia D, Qiu X (2007) Structural and biophysical studies of PCSK9 and its mutants linked to familial hypercholesterolemia. *Nat Struct Mol Biol* 1: 413-419
26. Benjannet S, Rondeau N, Paquet L, Boudreault A, Lazure C, Chrétien M, Seidah NG (1993) Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Biochem J* 294: 735-743
27. Pullikotil P, Benjannet S, Mayne J, Seidah NG (2007) The proprotein convertase SKI-1/S1P: alternate translation and subcellular localization. *J Biol Chem* 282: 27402-27413
28. Nour N, Mayer G, Mort JS, Salvas A, Mbikay M, Morrison CJ, Overall CM, Seidah NG (2005) The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PC5A and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 16: 5215-5226
29. Scamuffa N, Calvo F, Chrétien M, Seidah NG, Khatib AM (2006) Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J* 20: 1954-63
30. Seidah NG, Khatib AM, Prat A (2006) The proprotein convertases and their implication in sterol and/or lipid metabolism. *Biol Chem* 387: 871-877
31. Turpeinen H, Ortutay Z, Pesu M (2013) Genetics of the first seven proprotein convertase enzymes in health and disease. *Curr Genomics* 14: 453-467
32. Villeneuve P, Feliciangeli S, Croissandeau G, Seidah NG, Mbikay M, Kitabgi P, Beaudet A (2002) Altered processing of the neurotensin/neuromedin N precursor in PC2 knock down mice: a biochemical and immunohistochemical study. *J Neurochem* 82: 783-793
33. Laurent V, Kimble A, Peng B, Zhu P, Pintar JE, Steiner DF, Lindberg I (2002) Mortality in 7B2 null mice can be rescued by adrenalectomy: involvement of dopamine in ACTH hypersecretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3087-3092
34. Rouillé Y, Martin S, Steiner DF (1995) Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem* 270: 26488-26496
35. Zhu X, Orci L, Carroll R, Norrbom C, Ravazzola M, Steiner DE (2002) Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lacking prohormone convertase 1/3. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10299-10304
36. Furuta M, Yano H, Zhou A, Rouillé Y, Holst JJ, Carroll R, Ravazzola M, Orci L, Furuta H, Steiner DF (1997) Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6646-6651
37. Roebroek AJ, Umans L, Pauli IG, Robertson EJ, van Leuven F, Van de Ven WJ, Constam DB (1998) Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development* 125: 4863-4876
38. Kim W, Essalmani R, Szumska D, Creemers JW, Roebroek AJ, D'Orleans-Juste P, Bhattacharya S, Seidah NG, Prat A (2012) Loss of endothelial furin leads to cardiac malformation and early postnatal death. *Mol Cell Biol* 32: 3382-3391
39. Resiga-Susan D, Essalmani R, Hamelin J, Asselin MC, Benjannet S, Chamberland A, Day R, Szumska D, Constam D, Bhattacharya S, Prat A, Seidah NG (2011) Furin is the major processing enzyme of the cardiac-specific growth factor bone morphogenetic protein 10. *J Biol Chem* 286: 22785-22794
40. Lissitzky JC, Luis J, Munzer JS, Benjannet S, Parat F, Chrétien M, Marvaldi J, Seidah NG (2000) Endoproteolytic processing of integrin α subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J* 346: 133-138
41. Illman SA, Keski-Oja J, Parks WC, Lohi J (2003) The mouse matrix metalloproteinase, epilysin (MMP-28), is alternatively spliced and processed by a furin-like proprotein convertase. *Biochem J* 375: 191-197
42. Urban D, Lorenz J, Meyborg H, Ghosh S, Kintscher U, Kaufmann J, Fleck E, Kappert K, Stawowy P (2013) Proprotein convertase furin

- enhances survival and migration of vascular smooth muscle cells via processing of pro-nerve growth factor. *J Biochem* 153: 197-207
43. Xu YZ, Ji Y, Zipser B, Jellies J, Johansen KM, Johansen J (2003) Proteolytic cleavage of the ectodomain of the L1 CAM family member Tractin. *J Biol Chem* 278: 4322-4330
 44. Adams RH, Lohrum M, Klostermann A, Betz H, Püschel AW (1997) The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J* 16: 6077-6086
 45. Tadros H, Chrétien M, Mbikay M (2001) The testicular germ-cell protease PC4 is also expressed in macrophage-like cells of the ovary. *J Reprod Immunol* 49: 133-152
 46. Li M, Mbikay M, Nakayama K, Miyata A, Arimura A (2000) Prohormone convertase PC4 processes the precursor of PACAP in the testis. *Ann N Y Acad Sci* 921: 333-339
 47. Qiu Q, Basak A, Mbikay M, Tsang BK, Gruslin A (2005) Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11047-11052
 48. Basak S, Chrétien M, Mbikay M, Basak A (2004) In vitro elucidation of substrate specificity and bioassay of proprotein convertase 4 using intramolecularly quenched fluorogenic peptides. *Biochem J* 380: 505-514
 49. Essalmani R, Hamelin J, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Mbikay M, Chrétien M, Seidah NG, Prat A (2006) Deletion of the gene encoding proprotein convertase 5/6 causes early embryonic lethality in the mouse. *Mol Cell Biol* 26: 354-361
 50. Cain BM, Vishnuvardhan D, Beinfeld MC (2001) Neuronal cell lines expressing PC5, but not PC1 or PC2, process Pro-CCK into glycine-extended CCK 12 and 22. *Peptides* 22: 1272-1277
 51. Barbero P, Rovère C, De Bie I, Seidah NG, Beaudet A, Kitabgi P (1998) PC5-A-mediated processing of pro-neurotensin in early compartments of the regulated secretory pathway of PC5-transfected PC12 cells. *J Biol Chem* 273: 25339-25346
 52. Tortorella MD, Arner EC, Hills R, Gormley J, Fok K, Pegg L, Munie G, Malfrait AM (2005) ADAMTS-4 (aggrecanase-1): N-terminal activation mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 444: 34-44
 53. Tang M, Mikhailik A, Pauli I, Giudice LC, Fazelabas AT, Tulac S, Carson DD, Kaufman DG, Barbier C, Creemers JW, Tabibzadeh S (2005) Decidual differentiation of stromal cells promotes Proprotein Convertase 5/6 expression and lefty processing. *Endocrinology* 146: 5313-5320
 54. Nicholls PK, Sun Z, Heng S, Li Y, Wang J, Nie G (2011) Embryo implantation is closely associated with dynamic expression of proprotein convertase 5/6 in the rabbit uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 9: 43
 55. Nelsen SM, Christian JL (2009) Site-specific cleavage of BMP4 by furin, PC6 and PC7. *J Biol Chem* 284: 27157-27166
 56. Siegfried G, Basak A, Prichett-Pejic W, Scamuffa N, Ma L, Benjannet S, Veinot JP, Calvo F, Seidah NG, Khatib AM (2005) Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* 24: 6925-6935
 57. Siegfried G, Basak A, Cromlish JA, Benjannet S, Marcinkiewicz J, Seidah NG, Khatib AM (2003) The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 111: 1723-1732
 58. Turpeinen H, Oksanen A, Kivinen V, Kukkurainen S, Uusimäki A, Rämetsä M, Parikka M, Hytönen VP, Nykter M, Pesu M (2013) Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 7 (PCSK7) Is Essential for the Zebrafish Development and Bioavailability of Transforming Growth Factor β 1a (TGF β 1a). *J Biol Chem* 288: 36610-36623
 59. Constam DB, Robertson EJ (2000) SPC4/PACE4 regulates a TGF β signaling network during axis formation. *Genes Dev* 14: 1146-1155
 60. Meno C, Ito Y, Saijoh Y, Matsuda Y, Tashiro K, Kuhara S, Hamada H (1997) Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos. *Genes Cells* 2: 513-524
 61. Dubois CM, Blanchette F, Laprise MH, Leduc R, Grondin F, Seidah NG (2001) Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* 158: 305-316
 62. Huber MD, Vesely PW, Datta K, Gerace L (2013) Erlins restrict SREBP activation in the ER and regulate cellular cholesterol homeostasis. *J Cell Biol* 203: 427-436
 63. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6: 1355-1364
 64. Burri DJ, da Palma JR, Seidah NG, Zanotti G, Cendron L, Pasquato A, Kunz S (2013) Differential recognition of Old World and New World arenavirus envelope glycoproteins by subtilisin kexin isozyme 1 (SKI-1)/site 1 protease (S1P). *J Virol* 87: 6406-6414
 65. Farnier M (2014) PCSK9: From discovery to therapeutic applications. *Arch Cardiovasc Dis* 107: 58-66
 66. Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH (2009) PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J Lipid Res* 50: S172-S177
 67. Chrétien M, Mbikay M (2016) 60 years of POMC: From the prohormone theory to pro-opiomelanocortin and to proprotein convertases (PCSK1 to PCSK9). *J Mol Endocrinol* 56: T49-62
 68. Bassi DE, Fu J, Lopez de Cicco R, Klein-Szanto AJ (2005) Proprotein convertases: „master switches” in the regulation of tumor growth and progression. *Mol Carcinog* 44: 151-161

Proprotein convertases – family of serine proteases with a broad spectrum of physiological functions

Izabela Małuch^{1,✉}, Aleksandra Walewska², Emilia Sikorska¹, Adam Prahł²

¹Laboratory of Biopolymers Structural Research and ²Laboratory of Peptide Chemistry, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk, 63 Wita Stwosza St., 80-308 Gdańsk, Poland

✉e-mail: izabela.maluch@ug.edu.pl

Key words: serine proteases, proprotein convertases, furin

ABSTRACT

A large group of secretory proteins involved in proper functioning of living organisms, is synthesized as inactive precursor molecules. Their biologically active forms are obtained as a result of numerous post-translational modifications. Some of these processes occur irreversibly, permanently changing the initial compound structure. An example of such modifications is catalytic treatment of proteins performed by proteolytic enzymes. Among five separate classes of these enzymes, the most numerous are serine proteases. Mammalian proprotein convertases (PCs), which include: furin, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6, PC7, PCSK9, SKI-1, represent serine endoproteases family. PCs play a key role in the activation of a number of precursor proteins causing formation of biologically active forms of enzymes, hormones, signaling molecules, transcription and growth factors. This article summarizes current state of knowledge on biosynthesis, structure and substrate specificity of PCs, identifies the relationship between location and intracellular activity of these enzymes, and their physiological functions in mammals.