

Rola konwertaz probiałkowych w chorobach nowotworowych ze szczególnym uwzględnieniem enzymu PACE4

STRESZCZENIE

Choroby nowotworowe są jedną z najczęstszych przyczyn zgonów w dzisiejszych czasach. Gruntowne poznanie mechanizmów nowotworzenia oraz inwazyjności komórek nowotworowych są kluczowe dla opracowania terapii celowanych molekularnie, w których upatruje się przyszłości leczenia tego typu schorzeń. Jednym z czynników zaangażowanych w rozwój komórek nowotworowych są enzymy proteolityczne, będące często markerami progresji nowotworów. W niniejszej pracy opisana została rola enzymów z rodziny konwertaz probiałkowych (PCs) w patogenezie oraz rozwoju chorób nowotworowych. Ponadto, wskazano możliwe kierunki rozwoju strategii terapeutycznych zaprojektowanych w oparciu o inhibitory PCs.

WPROWADZENIE

Poznano bardzo dużą grupę białek wydzielniczych, których działanie jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania żywych organizmów. Należą do niej m.in.: enzymy, hormony, neuropeptydy, receptory oraz czynniki wzrostu. Są one syntezowane zazwyczaj jako cząsteczki prekursorowe i podczas modyfikacji potranslacyjnych poddawane katalitycznej obróbce przez endoproteazy, w wyniku czego powstają ich formy biologicznie aktywne. Ponad jedna trzecia enzymów zaangażowanych w ten proces należy do rodziny proteaz serynowych. Nazwa rodziny pochodzi od reszty seryny zlokalizowanej w miejscu aktywnym i pełniącej kluczową rolę w procesach katalitycznych [1]. Do tej obszernej grupy enzymów należą między innymi konwertazy probiałkowe (PCs, ang. *proprotein convertases*). Tworzą one rodzinę dziewięciu enzymów, do których zaliczane są: furyna, PC1/3, PC2, PACE4, PC4, PC5/6, PC7, PCSK9 i SKI-1 (Tab. 1). Pierwsze siedem hydrolizuje wiązanie peptydowe zlokalizowane w substracie po karboksylowej stronie zasadowego aminokwasu występujące po charakterystycznym motywie: Lys/Arg-Xaa_n-Lys/Arg-Arg↓ (Xaa - dowolna reszta kodowanego aminokwasu białkowego z wyjątkiem reszty Cys; n = 0, 2, 4, 6) [3].

Konwertazy probiałkowe odgrywają istotną rolę w embriogenezie oraz rozwoju organizmów żywych [2,4]. Do grupy substratów aktywowanych przez PCs należą m.in. proteazy, hormony, czynniki wzrostu i ich receptory, czynniki transkrypcyjne, cząsteczki sygnałowe oraz adhezyjne [5]. Aktywność konwertaz probiałkowych jest również związana z rozwojem różnych stanów patofizjologicznych, takich jak osteoporoza [6], hiperglikemia, miażdżyca i schorzenia sercowo-naczyniowe [7], choroby neurodegeneracyjne (w tym choroba Alzheimera [8]), infekcje bakteryjne i wirusowe (wywoływane przez takie wirusy jak: A/H5N1, Hong Kong, Ebola [9]) oraz choroby nowotworowe.

CHOROBY NOWOTWOROWE ZWIĄZANE Z AKTYWNOŚCIĄ PCs

Konwertazy probiałkowe odgrywają kluczową rolę w patogenezie przemian, proliferacji, inwazyjności oraz metastazie komórek nowotworowych (Ryc. 1). PCs aktywują szereg odrębnych prekursorów czynników wzrostu i ich receptorów, cząsteczek adhezyjnych i metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej (Tab. 2), które poprzez złożoną sieć relacji zaangażowane są w rozwój wyszczególnionych powyżej procesów.

Dla każdego spośród substratów aktywowanych przez konwertazy probiałkowe udowodniono znaczącą rolę w szlakach powiązanych ze wzrostem i rozwojem guzów. Ponadto w dużej grupie nowotworów ludzkich oraz hodowlanych linii komórek nowotworowych udowodniono wysoki poziom ekspresji PCs (Tab. 3), co związane jest ze wzrostem i inwazyjnością zmienionych chorobowo komórek [12,13].

Wzrost zawartości mRNA regulujących syntezę enzymów PC1/3 i PC2 zaobserwowano w komórkach nowotworowych pochodzenia neuroendokrynnego,

Izabela Małuch^{1,✉}

Marta Makowska¹

Marta Tomczykowska¹

Aleksandra Walewska²

Emilia Sikorska¹

Adam Prah²

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 14 czerwca 2017 r.
Artykuł zaakceptowano 24 lipca 2017 r.

Słowa kluczowe: konwertazy probiałkowe, PACE4, furyna, inhibitor

Wykaz skrótów: PCs – konwertazy probiałkowe

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.

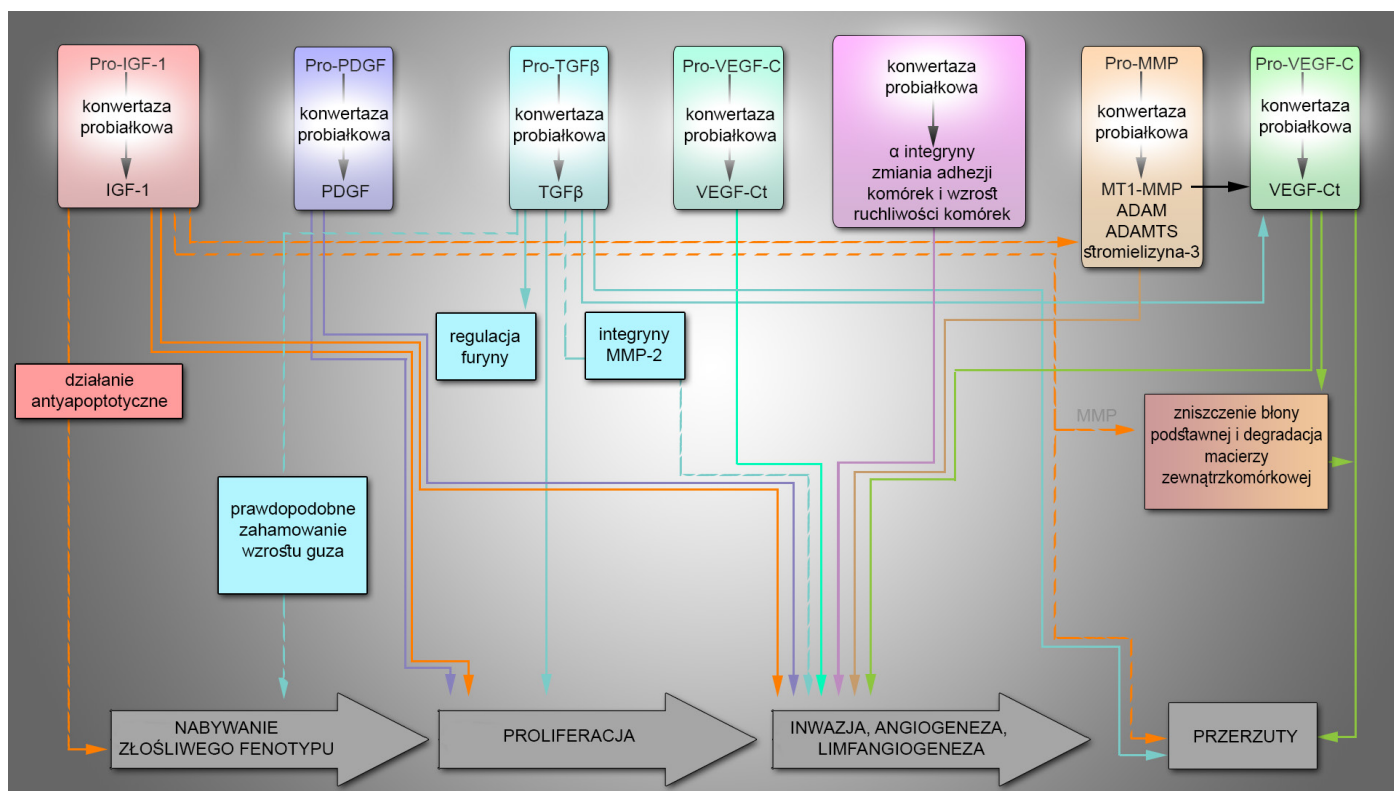
Tabela 1. Nomenklatura enzymów zaliczanych do konwertaz probiałkowych [2]

Powszechnie stosowany/a skrót nazwy/nazwa enzymu	Synonim	Nazwa enzymu w języku angielskim
PC1/3	PCSK1	proprotein convertase 1/3 proprotein convertase subtilisin/kexin type 1
PC2	PCSK2	proprotein convertase 2 proprotein convertase subtilisin/kexin type 2
furyna	PACE PCSK3	paired basic amino acid cleaving enzyme proprotein convertase subtilisin/kexin type 3
PC4	PCSK4	proprotein convertase 4 proprotein convertase subtilisin/kexin type 4
PC5/6	PCSK5	proprotein convertase 5/6 proprotein convertase subtilisin/kexin type 5
PACE4	PCSK6	paired basic amino acid cleaving enzyme 4 proprotein convertase subtilisin/kexin type 6
PC7	PCSK7	proprotein convertase 7 proprotein convertase subtilisin/kexin type 7
SKI-1		subtilisin/kexin-izozyme 1
PCSK9		proprotein convertase subtilisin/kexin type 9

m.in. w rakowiakach [15] i gruczolakach przysadki [16]. Aktywność tych enzymów jest również istotna w rozwoju drobnokomórkowego raka płuca [17]. Wysoki poziom furyny w porównaniu do PACE4, PC5/6 i PC7 opisano w ludzkich komórkach nowotworu głowy i szyi [18], jajników [19,20] oraz endometrium [21]. Natomiast w ludzkich komórkach nowotworu jelita grubego udowodniono duże stężenie wszystkich czterech z wymienionych enzymów, które zaangażowane są w regulację metastazy zmienionych chorobowo komórek [22]. Furyna, PACE4 i PC5/6 aktywują pro-VEGF-C [23] oraz pro-PDGF-B, w którego dojrzewanie zaangażowana jest również PC7. Aktywne biologicznie formy wymienionych białek odpowiadają za postęp przemian patofizjologicznych w procesie nowotworzenia. Spośród wszystkich konwertaz probiałkowych, najistotniejszą rolę w powstaniu i dalszym rozwoju chorób nowotworowych pełnią furyna i PACE4 [24]. Do głównych substratów aktywowanych przez te enzymy należą prekursorzy metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej, m. in. stromielizyny-3, ADAMTS i MMP typu 1 [25-27], czynników, które inicjują i regulują postęp inwazji komórek nowotworowych w obrębie macierzy zewnątrzkomórkowej lub przez ściany naczyń włosowatych. Dodatkowo, dwie opisywane konwertazy aktywują wiele czynników wzrostu (m.in. TGFβ [28] i IGF-1 [29]) oraz receptorów (IGF-1R [29]), przyczyniając się tym samym do dalszego wzrostu guzów nowotworowych.

ROLA PACE4 W STANACH PATOFIZJOLOGICZNYCH

Oprócz wspomnianego już udziału PACE4 w przemianach nowotworowych w obrębie jelita grubego człowieka, aktywność tego enzymu powiązana jest również z rozwojem



Rycina 1. Rola konwertaz probiałkowych w rozwoju chorób nowotworowych (sporządzono na podstawie [10]).

Tabela 2. Substraty aktywowane przez enzymy z rodziny konwertaz probiałkowych [2,4,10,11]

Konwertaza probiałkowa	Aktywowane substraty
PC1/3	GHRH, ACTH, GLP1, GLP2
PC2	β -endorfina, glukagon, α -MSH
furyna	czynniki wzrostu (TGF β) receptory (np. insuliny) cząsteczki adhezyjne (integryna $\alpha 5$) metaloproteazy (MMP-14) toksyny bakteryjne (m.in. pojednostka pa83 toksyny węgliką) glikoproteiny wirusów (HIV gp160)
PC4	IGF-2, PACAP
PC5/6	czynniki wzrostu (GDF11) receptory (PTPRM) cząsteczki adhezyjne (integryna $\alpha 4$, neuronalne L1 CAM)
PACE4	czynniki wzrostu (białka Nodal i Lefty) metaloproteazy (ADAMTS-4) glikoproteiny wirusów (białko Vpr wirusa HIV)
PC7	receptory (receptor transferyny 1)
SKI-1	czynniki transkrypcyjne (SREBPs, ATF6, CREBs) transferaza GlcNAc-1 glikoproteiny wirusów (Lassa virus i CCHF Gn)
PCSK9	wyłącznie PCSK9

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

licznej grupy innych nowotworów. PACE4 aktywuje prekursor białka angiopoetynopodobnego 4 (ANGPTL4, ang. *angiopoietin-like 4*) odgrywającego kluczową rolę w rozwoju chorób nowotworowych [30]. ANGPTL4 wydzielany przez komórki nowotworowe umożliwia proces powstawania przerzutów poprzez indukowanie przepuszczalności naczyń włosowatych [31]. Ponadto PACE4 zwiększa podatność organizmu na powstanie raka skóry podwyższając stężenie metaloproteaz macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wpływając na rozwój guzów złośliwych. Głównym substratem opisywanego enzymu są MT-MMPs, metaloproteazy odpowiedzialne za aktywację kolagenazy IV (MMP-2), głównego degradującego

Tabela 3. Udział zasadowo specyficznych enzymów z rodziny PCs w poszczególnych rodzajach nowotworów [13,14]

Konwertaza probiałkowa	Rodzaj nowotworu, dla którego udowodniono aktywność enzymu
PC1/3, PC2	- nowotwory neuroendokrynne (gruczolaki przysadki, rakowiaki) - drobnokomórkowy rak płuc - nowotwór trzustki - nowotwór jelita cienkiego
furyna	- nowotwór głowy, szyi i krtani - nowotwór jajników i endometrium - nowotwór piersi - nowotwór jelita grubego i żołądka - nowotwór płuc - nowotwór trzustki
PC5/6, PC7	- nowotwór jelita grubego - nowotwór piersi
PACE4	- nowotwór jelita grubego - nowotwór piersi - nowotwór przysadki mózgowej - nowotwór głowy i szyi - nowotwór prostaty

enzymu macierzy zewnątrzkomórkowej. Podwyższonemu poziomowi PACE4 towarzyszy wzmożona aktywacja MT1- i MT2-MMP. Wzrost aktywacji MT1-MMP podwyższa aktywność kolagenolityczną niszcząc cząsteczki kolagenu typu IV, jednego z głównych komponentów błony podstawnej [32]. MT1-MMP jest główną proteazą kształtującą inwazyjność komórek, również nowotworowych [33]. Nadekspresja genu kodującego PACE4 w komórkach nowotworu piersi prowadzi do podwyższenia aktywności MMP-9 (ale nie MMP-2) i zmniejszenia wydzielania tkankowego inhibitora metaloproteazy macierzy 1 (TIMP-1, ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase-1*). Powiązane jest to ze znaczącą poprawą ruchliwości komórek oraz migracji i degradacji kolagenu *in vitro*. Dla kontrastu, ekspresja genu furyny obniża aktywność MMP-9 i zmniejsza zakres funkcji biologicznych pełnionych przez to białko, jednakże nie wywiera znaczącego wpływu na wydzielanie TIMP-1. Są to szczególne i przeciwstawne funkcje furyny i PACE4 w regulacji ruchliwości i inwazji komórek zależnej od MMP-9 i TIMP-1 [34].

Wyniki testów *in vitro*, profilowania proteomicznego, badań nad ekspresją genów oraz eksperymentów prowadzonych na zwierzętach dowodzą, że w komórkach nowotworu prostaty występuje nadmierna produkcja PACE4 [35]. Ponadto jest to jedyny enzym spośród wszystkich PCs obecny w znacznych ilościach we wszystkich stadiach zmienionych chorobowo tkanek. Zważywszy na powszechną obecność w komórkach kilku konwertaz probiałkowych jest to istotna informacja znacznie ułatwiająca prowadzenie dalszych studiów nad specyficznymi funkcjami pełnionymi przez PACE4. Znanych jest kilka hodowlanych linii komórek ludzkich stosowanych do badań nad rakiem prostaty, jednak najlepszym modelem okazała się niezależna od androgenów linia DU145 wykazująca umiarkowaną zdolność do metastazy [36]. PACE4 odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowotworu prostaty kierując progresję wzrostu guzów w stronę ich większej agresywności. Zahamowanie aktywności tego enzymu prowadzi do znacznej utraty tumorogenności przez ludzkie komórki nowotworu prostaty

linii DU145 [35]. Specyficzne funkcje pełnione przez każdą z konwertaz probiałkowych obecnych w komórkach nowotworu prostaty (PACE4, furynę i PC7) poznano bliżej dzięki wynikom badań prowadzonych *in vitro* i *in vivo* na liniach komórkowych DU145 oraz LNCaP z wyciszoną ekspresją genów kodujących wymienione enzymy [37]. Aktywność PACE4 w komórkach nowotworu prostaty odpowiada za ich proliferację oraz wzrost i unaczynienie guzów. Funkcji tych nie pełnią natomiast furyna i PC7, których unieczynnienie nie wywołało spektakularnych zmian w rozwoju guzów nowotworowych w porównaniu do komórek referencyjnych wykazujących pełną aktywność tych enzymów.

Więcej informacji dotyczących istotnej roli PACE4 w proliferacji i metastazie komórek różnego typu nowotworów dostarczyły badania nad związkami hamującymi aktywność tej konwertazy, powodującymi jednoczesną blokadę dalszego rozwoju chorób nowotworowych [38,39].

Na liście substratów aktywowanych *in vivo* przez PACE4 znajdują się również prekursorzy enzymu należącego do agrekanaz (ADAMTS), podrodziny adamalizin [40,41]. Agrekanazy stanowią odrębną grupę metaloproteaz o istotnym znaczeniu w patogenezie chorób zwyrodnieniowych [42,43]. Dojrzała agrekanaza 1 (ADAMTS-4) zaangażowana jest w trawienie proteoglikanów utrzymujących mechaniczne właściwości chrząstki. Dezintegracja substancji podstawowej chrząstki powoduje rozwój chorób zwyrodnieniowych stawów oraz powstawanie zmian zapalnych [44,45]. Według doniesień literaturowych, PACE4 jest zaangażowany również w proces chorobotwórczy wywoływany przez wirusa HIV-1 [46]. Synteza tego enzymu oraz PC5/6A w różnych liniach komórkowych wzmaga przekształcanie białka Vpr (ang. *viral protein R*) zlokalizowanego w macierzy pozakomórkowej. Furyna wykazuje marginalny wpływ na regulację tego procesu. Białko Vpr posiada w swojej budowie sekwencję Arg⁸⁵-Gln-Arg-Arg⁸⁸↓(Val/Ala/Gly)-Arg zlokalizowaną w obrębie C-końcowej domeny bogatej w reszty argininy (reszty od 73 do 96 [47]). Fragment ten jest rozpoznawany przez konwertazy probiałkowe, szczególnie PACE4 i PC5/6A. Ponadto w niektórych szczepach wirusów obecność hydrofobowych reszt aminokwasowych (np. waliny) w pozycji P1' tuż za miejscem cięcia łańcucha białkowego wskazuje na specyficzną hydrolizę katalizowaną przez wymienione wyżej konwertazy. Aktywne formy tych enzymów obecne są na powierzchni komórek oraz w macierzy pozakomórkowej [48,49], co potwierdza możliwość posiadania przez nie substratów znajdujących się na zewnątrz komórki, w tym białka Vpr. Funkcje tej biomolekuły sprowadzają się m.in. do zatrzymania proliferujących limfocytów w poprzedzającej rozpoczęcie mitozy fazie G2, w której poziom replikacji wirusa jest najwyższy [50]. Skutkiem tego jest dalsze zwiększenie intensywności jego namnażania. Przypuszczalny mechanizm prowadzący w efekcie do zatrzymania cyklu komórkowego polega na aktywowaniu zmian w błonie komórkowej umożliwiających przerwanie ciągłości jej struktury [51].

STRATEGIE TERAPEUTYCZNE ZAPROJEKTOWANE W OPARCIU O INHIBITORY PCS

Precyzyjne zdefiniowanie udziału proteaz w rozwoju poszczególnych stanów patofizjologicznych prowadzi do

opracowania odpowiedniej strategii terapeutycznej, polegającej zazwyczaj na zidentyfikowaniu specyficznego małej cząsteczkowego inhibitora blokującego aktywność enzymu zaangażowanego w rozwój choroby. W chemii farmaceutycznej dostępna jest ograniczona ilość procedur prowadzących do osiągnięcia tego celu. Najczęściej polega ona na zaprojektowaniu inhibitora oddziałującego z miejscem aktywnym enzymu. Z tego względu popularnym zabiegiem jest projektowanie inhibitorów określonej proteazy posiadających struktury podobne do naturalnych peptydowych substratów tego enzymu. Fizjologiczne inhibitory proteaz wykazują często bardzo szeroką specyficzność substratową oraz mogą hamować aktywności wielu spokrewnionych i podobnych do siebie enzymów proteolitycznych [52]. Istnieje pewne niebezpieczeństwo, że takie inhibitory mogą oddziaływać negatywnie na przekształcanie innych białek niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania komórki, a w konsekwencji zaburzać jej fizjologię.

Jednym z wyzwań w badaniach dotyczących konwertaz probiałkowych jest identyfikacja naturalnych substratów poszczególnych PCs zlokalizowanych w określonych tkankach lub biorących udział w przebiegu konkretnych procesów komórkowych [53]. Preferencje katalityczne ludzkich konwertaz probiałkowych nie zostały dotąd poznane na poziomie koniecznym do zaprojektowania specyficznych inhibitorów poszczególnych enzymów, dlatego poszukiwaniem tego typu związków jest skomplikowanym i wielopłaszczyznowym procesem. PCs stanowią ważną klasę enzymów będącą celem opracowania strategii terapeutycznych ukierunkowanych między innymi na infekcje bakteryjne i wirusowe, choroby endokrynologiczne i neurodegeneracyjne, hipercholesterolemię oraz nowotwory [10,54-56]. W rzeczywistości, w ludzkich guzach nowotworowych oraz w liniach komórek nowotworowych pochodzących z tego samego rodzaju raka występuje niekiedy jednoczesna nadmierna synteza kilku spośród konwertaz probiałkowych. Kompletna charakterystyka ekspresji genów kodujących PCs w komórkach każdego typu nowotworu jest konieczna dla przyszłego projektowania specyficznego inhibitora oddziałującego z wybranym enzymem zaangażowanym w postępowanie choroby chorobotwórczego.

PODSUMOWANIE

Z uwagi na udział konwertaz probiałkowych w rozwoju tak licznej grupy chorób, wielkie nadzieje pokłada się w inhibitorach PCs, nie tylko z powodu ich możliwych zastosowań terapeutycznych [11,57,58]. Znalezienie skutecznego inhibitora oraz analiza mechanizmów jego oddziaływania z konwertazami probiałkowymi są kluczowe dla pogłębienia wiedzy z zakresu biochemii omawianych enzymów oraz ich właściwości. Zdobyte w ten sposób informacje mogą być wykorzystane w przyszłości przy projektowaniu analogów, które hamowałyby aktywności PCs jeszcze silniej niż zsyntezowane dotychczas związki. Do tej pory opracowano kilka typów inhibitorów konwertaz probiałkowych, które można podzielić na pięć podstawowych kategorii: peptydy, peptydomimetyki, małe niepeptydowe cząsteczki, przeciwciała i siRNA [59,60]. Spośród tak obszernej grupy związków hamujących aktywność PCs najsilniejszą pozycję zajmują inhibitory peptydowe [60-68].

PIŚMIENNICTWO

- Di Cera E (2009) Serine proteases. *IUBMB Life* 61: 510-515
- Małuch I, Walewska A, Sikorska E, Prahł A (2016) Konwertazy probiałkowe – rodzina proteaz serynowych o szerokim spektrum funkcji fizjologicznych. *Postępy Biochem* 62: 472-481
- Remacle AG, Shiryayev SA, Oh ES, Cieplak P, Srinivasan A, Wie 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. *J Biol Chem* 283: 20897-20906
- Scamuffa N, Calvo F, Chrétien M, Seidah NG, Khatib AM (2006) Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J* 20: 1954-1963
- Seidah NG (2011) What lies ahead for the proprotein convertases? *Ann N Y Acad Sci* 1220: 149-161
- Malfait AM, Arner EC, Song RH, Alston JT, Markosyan S, Staten N, Yang Z, Griggs DW, Tortorella MD (2008) Proprotein convertase activation of aggrecanases in cartilage in situ. *Arch Biochem Biophys* 478: 43-51
- Davignon J, Dubuc G, Seidah NG (2010) The influence of PCSK9 polymorphism on serum low-density lipoprotein cholesterol and risk of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 12: 308-315
- Lopez-Perez E, Seidah NG, Checler F (1999) Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive alpha-secretase pathway. *J Neurochem* 73: 2056-2062
- Basak A, Zhong M, Munzer JS, Chrétien M, Seidah NG (2001) Implication of the proprotein convertases furin, PC5 and PC7 in the cleavage of surface glycoproteins of Hong Kong, Ebola and respiratory syncytial viruses: a comparative analysis with the fluorogenic peptides. *Biochem J* 353: 537-545
- Artenstein AW, Opal SM (2011) Proprotein convertases in health and disease. *N Engl J Med* 365: 2507-2518
- Seidah NG, Prat A (2012) The biology and therapeutic targeting of the proprotein convertases. *Nat Rev Drug Discov* 11: 367-383
- Bassi DE, Fu J, Lopez de Cicco R, Klein-Szanto AJ (2005) Proprotein convertases: „master switches“ in the regulation of tumour growth and progression. *Mol Carcinog* 44: 151-161
- Khatib AM, Siegfried G, Chrétien M, Metrakos P, Seidah NG (2002) Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol* 160: 1921-1935
- Jaaks P, Bernasconi M (2017) The proprotein convertase furin in tumor progression. *Int J Cancer* doi: 10.1002/ijc.30714
- Kajiwara H, Itoh Y, Itoh J, Yasuda M, Osamura RY (1999) Immunohistochemical expressions of prohormone convertase (PC)1/3 and PC2 in carcinoids of various organs. *Tokai J Exp Clin Med* 24: 13-20
- Takumi I, Steiner DF, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY (1998) Localization of prohormone convertases 1/3 and 2 in the human pituitary gland and pituitary adenomas: analysis by immunohistochemistry, immunoelectron microscopy, and laser scanning microscopy. *Mod Pathol* 11: 232-238
- Mbikay M, Sirois F, Yao J, Seidah NG, Chrétien M (1997) Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer* 71: 1509-1514
- Bassi DE, Mahloogi H, Al-Saleem S, Lopez De Cicco R, Ridge JA, Klein-Szanto AJ (2001) Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog* 31: 224-232
- Fu Y, Campbell EJ, Shepherd TG, Nachtigal MW (2003) Epigenetic regulation of proprotein convertase PACE4 gene expression in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 1: 569-576
- Klein-Szanto AJ, Litwin S, Nicolas E, Al-Jumaily R, Alexander P, Godwin AK, Ross EA, Schilder RJ, Bassi DE (2007) Increased expression of the pro-protein convertase furin predicts decreased survival in ovarian cancer. *Cell Oncol* 29: 289-299
- Singh H, Heng S, Nicholls PK, Li Y, Tai LT, Jobling T, Salamonsen LA, Nie G (2012) Proprotein convertases in post-menopausal endometrial cancer: distinctive regulation and non-invasive diagnosis. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 809-814
- Scamuffa N, Siegfried G, Bontemps Y, Ma L, Basak A, Chereł G, Calvo F, Seidah NG, Khatib AM (2008) Selective inhibition of proprotein convertases repress the metastatic potential of human colorectal tumor cells. *J Clin Invest* 118: 352-363
- 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
- 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
- Pei D, Weiss SJ (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature* 375: 244-247
- Hubbard FC, Goodrow TL, Liu SC, Brilliant MH, Basset P, Mains RE, Klein-Szanto AJ (1997) Expression of PACE4 in chemically induced carcinoma cis associated with spindle cell tumor conversion and increased invasive ability. *Cancer Res* 57: 5226-5231
- Yana I, Weiss SJ (2000) Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 11: 2387-2401
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE, Leduc R (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270: 10618-10624
- Stawowy P, Kallish H, Kilimnik A, Margeta C, Seidah NG, Chrétien M, Fleck E, Graf K (2004) Proprotein convertases regulate insulin-like growth factor 1-induced membrane-type 1 matrix metalloproteinase in VSMCs via endoproteolytic activation of the insulin-like growth factor-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 531-533
- Grotaert C, Van de Wiele T, Verstraete W, Bracke M, Vanhooeck B (2012) Angiopoietin-like protein 4: health effects, modulating agents and structure-function relationships. *Expert Rev Proteomics* 9: 181-199
- Huang RL, Teo Z, Chong HC, Zhu P, Tan MJ, Tan CK, Lam CR, Sng MK, Leong DT, Tan SM, Kersten S, Ding JL, Li HY, Tan NS (2011) ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intracellular VE-cadherin and claudin-5 clusters. *Blood* 118: 3990-4002
- Bassi DE, Lopez De Cicco R, Cenna J, Litwin S, Cukierman E, Klein-Szanto AJ (2005) PACE4 expression in mouse basal keratinocytes results in basement membrane disruption and acceleration of tumor progression. *Cancer Res* 65: 7310-7319
- Sabeh F, Ota I, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Soloway P, Balbin M, Lopez-Otin C, Shapiro S, Inada M, Krane S, Allen E, Chung D, Weiss SJ (2004) Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. *J Cell Biol* 167: 769-781
- Lapierre M, Siegfried G, Scamuffa N, Bontemps Y, Calvo F, Seidah NG, Khatib AM (2007) Opposing function of the proprotein convertases furin and PACE4 on breast cancer cells' malignant phenotypes: role of tissue inhibitors of metalloproteinase-1. *Cancer Res* 67: 9030-9034
- D'Anjou F, Routhier S, Perreault JP, Latil A, Bonnel D, Fournier I, Salzet M, Day R (2011) Molecular validation of PACE4 as a target in prostate cancer. *Transl Oncol* 4: 157-172
- Alimirah F, Chen J, Basrawala Z, Xin H, Choubey D (2006) DU-145 and PC-3 human prostate cancer cell lines express androgen receptor: implications for the androgen receptor functions and regulation. *FEBS Lett* 580: 2294-2300
- Couture F, D'Anjou F, Desjardins R, Boudreau F, Day R (2012) Role of proprotein convertases in prostate cancer progression. *Neoplasia* 14: 1032-1042
- Bassi DE, Zhang J, Cenna J, Litwin S, Cukierman E, Klein-Szanto AJ (2010) Proprotein convertase inhibition results in decreased skin cell proliferation, tumorigenesis, and metastasis. *Neoplasia* 12: 516-526
- Panet F, Couture F, Kwiatkowska A, Desjardins R, Guérin B, Day R (2017) PACE4 is an important driver of ZR-75-1 estrogen receptor-positive breast cancer proliferation and tumor progression. *Eur J Cell Biol* doi: 10.1016/j.ejcb.2017.03.006

40. Malfait AM, Seymour AB, Gao F, Tortorella MD, Le Graverand-Gastineau MP, Wood LS, Doherty M, Doherty S, Zhang W, Arden NK, Vaughn FL, Leaverton PE, Spector TD, Hart DJ, Maciewicz RA, Miur KR, Das R, Sorge RE, Sotocinal SG, Schorsch-Petcu A, Valdes AM, Mogil JS (2012) A role for PACE4 in osteoarthritis pain: evidence from human genetic association and null mutant phenotype. *Ann Rheum Dis* 71: 1042-1048
41. Żebrowska A, Wysoczyńska K, Waszczykowska E (2005) Adamalizin – metaloproteinazy biorące udział w patofizjologii chorób skóry. *Alerg Astma Immun* 10: 187-192
42. Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, Little CB (2000) Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol* 19: 333-344
43. Verma P, Dalal K (2011) ADAMTS-4 and ADAMTS-5: key enzymes in osteoarthritis. *J Cell Biochem* 112: 3507-3514
44. Lin EA, Liu CJ (2010) The role of ADAMTSs in arthritis. *Protein Cell* 1: 33-47
45. Flannery CR (2010) Novel therapies in OA. *Curr Drug Targets* 11: 614-619
46. Xiao Y, Chen G, Richard J, Rougeau N, Li H, Seidah NG, Cohen EA (2008) Cell-surface processing of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Vpr by proprotein convertases. *Virology* 372: 384-397
47. Le Rouzic E, Benichou S (2005) The Vpr protein from HIV-1: distinct roles along the viral life cycle. *Retrovirology* 2: 11
48. 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
49. Tsuji A, Sakurai K, Kiyokage E, Yamazaki T, Koide S, Toida K, Ishimura K, Matsuda Y (2003) Secretory proprotein convertases PACE4 and PC6A are heparin-binding proteins which are localized in the extracellular matrix. Potential role of PACE4 in the activation of proproteins in the extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* 1645: 95-104
50. Malim MH, Emerman M (2008) HIV-1 accessory proteins-ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* 3: 388-398
51. De Noronha CM, Sherman MP, Lin HW, Cavrois MV, Moir RD, Goldman RD, Greene WC (2001) Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 294: 1105-1108
52. Drag M, Salvesen GS (2010) Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 9: 690-701
53. Nie G, Stephens AN (2011) A proteomic protocol to identify physiological substrates of pro-protein convertases. *Methods Mol Biol* 768: 325-341
54. Lah TT, Durán Alonso MB, Van Noorden CJ (2006) Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert Opin Biol Ther* 6: 257-279
55. Vihinen P, Ala-aho R, Kähäri VM (2005) Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 5: 203-220
56. Scamuffa N, Sfaxi F, Ma J, Lalou C, Seidah NG, Calvo F, Khatib AM (2013) Prodomain of the proprotein convertase subtilisin/kexin Furin (ppFurin) protects from tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 35: 528-536
57. Taylor NA, Van De Ven WJ, Creemers JW (2003) Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *FASEB J* 17: 1215-1227
58. Fugère M, Day R (2005) Cutting back on pro-protein convertases: the latest approaches to pharmacological inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 26: 294-301
59. 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
60. Basak A. (2005) Inhibitors of proprotein convertases. *J Mol Med* 83: 844-855
61. Basak A, Lazure C (2003) Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. *Biochem J* 373: 231-239
62. Becker GL, Sielaff F, Than ME, Lindberg I, Routhier S, Day R, Lu Y, Garten W, Steinmetzer T (2010) Potent inhibitors of furin and furin-like proprotein convertases containing decarboxylated P1 arginine mimetics. *J Med Chem* 53: 1067-1075
63. Fugère M, Appel J, Houghton RA, Lindberg I, Day R (2007) Short polybasic peptide sequences are potent inhibitors of PC5/6 and PC7: use of positional scanning-synthetic peptide combinatorial libraries as a tool for the optimization of inhibitory sequences. *Mol Pharmacol* 71: 323-332
64. Majumdar S, Chen A, Palmer-Smith H, Basak A (2011) Novel circular, cyclic and acyclic $\Psi(\text{CH}(2)\text{O})$ containing peptide inhibitors of SKI-1/S1P: synthesis, kinetic and biochemical evaluations. *Curr Med Chem* 18: 2770-2782
65. Sielaff F, Than ME, Bevec D, Lindberg I, Steinmetzer T (2011) New furin inhibitors based on weakly basic amidinohydrazones. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 836-840
66. Zhang Y, Eigenbrot C, Zhou L, Shia S, Li W, Quan C, Tom J, Moran P, Di Lello P, Skelton NJ, Kong-Beltran M, Peterson A, Kirchofer D (2014) Identification of a small peptide that inhibits PCSK9 protein binding to the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 289: 942-955
67. Couture F, Kwiatkowska A, Dory YL, Day R (2015) Therapeutic uses of furin and its inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 25: 379-396
68. Małuch I, Levesque C, Kwiatkowska A, Couture F, Ly K, Desjardins R, Neugebauer WA, Prahla A, Day R (2017) Positional scanning identifies the molecular determinants of a high affinity multi-Leucine inhibitor for furin and PACE4. *J Med Chem* 60: 2732-2744

The role of proprotein convertases in cancer diseases with particular focus on PACE4

Izabela Małuch^{1,✉}, Marta Makowska¹, Marta Tomczykowska¹, Aleksandra Walewska², Emilia Sikorska¹, Adam Prahla²

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 Gdansk, Poland

✉e-mail: izabela.maluch@ug.edu.pl

Key words: proprotein convertases, PACE4, furin, inhibitor

ABSTRACT

Cancer is one of the most common cause of death nowadays. Thorough knowledge of the mechanisms of tumorigenesis and invasiveness of tumor cells is crucial for the development of molecular targeted therapies, which are believed to be future treatment of this type of diseases. Proteolytic enzymes are one of the factors involved in the development of cancer cells, very often used as markers of tumor progression. In this paper we describe the role of enzymes termed proprotein convertases (PCs) in pathogenesis and progress of cancer diseases. Furthermore, we indicate potential directions for the development of therapeutic strategies designed based on PCs inhibitors.