

综述

原蛋白转变酶的生物化学结构与功能

吴文锋^{1#} 张娟辉^{2#} 唐松山^{1*}

(1广东药学院基础学院生物化学与分子生物学教研室, 广州 510006; 2广东省武警医院妇产科优生优育中心, 广州 510507)

摘要 肽或者蛋白质以前体形式合成后, 需要原蛋白转变酶, 和/或羧基肽酶, 酰胺化酶等加工酶的协同作用才能获得完全的生物活性。原蛋白转变酶是这个过程中最重要的功能酶, 它们由9种Ca²⁺依赖性的蛋白内切酶组成, 许多重要的生理过程需要它们的直接参与, 如肽与蛋白质激素、膜受体和病毒外壳蛋白的成熟等。它们的功能与许多疾病相关, 如癌症、脑卒中、糖尿病、脂代谢紊乱等疾病, 该文对原蛋白转变酶的生化结构和功能作一简述。

关键词 神经内分泌肽加工; 原蛋白转变酶; 结构与功能

Structure and Function of Proprotein Convertases

Wu Wenfeng^{1#}, Zhang Juanhui^{2#}, Tang Songshan^{1*}

(¹Biochemistry and Molecular Department, School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; ²Center of Reproduction & Infertility, Department of Obstetrics & Gynecology, Guangdong Provincial Corps Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510507, China)

Abstract Precursors of polypeptide and protein hormones are matured through the processings of proprotein convertases, and/or carboxypeptidase, amidation enzyme. Proprotein convertases play the most important role in the process. Proprotein convertases consist of nine endoproteases with Ca²⁺-dependent endoproteolysis activity, which is closely correlated with many physiologic processes, i.e. the maturations of peptide and protein hormones, membrane receptors, and some viral proteins etc. They also are closely correlated with many diseases, i.e. cancer, cerebral apoplexy, diabetes, and lipid metabolism disorder. The structure and function of proprotein convertase is reviewed in the article.

Key words neuroendocrinopeptide proprotein processing; proprotein convertase; structure and function

1967年, Steiner等^[1]首次提出了生物体肽类激素是由较大分子量的前体形式通过蛋白酶的剪切加工而成熟, 其所在实验室以胰岛素原加工形

成有活性胰岛素进行了验证。这一研究成果开创了蛋白质后加工这一全新的研究领域。同年, Chrétien等^[2]和Crine等^[3]对β-促黑色素、γ-促脂解

收稿日期: 2012-10-31 接受日期: 2012-11-19

教育部留学回国基金(批准号: 44143012)、广东药学院基金(批准号: 52104109、43755005)和广东省卫生厅基金(批准号: A2011456)资助的课题
#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 020-39352192, E-mail: songstang@hotmail.com

Received: October 31, 2012 Accepted: November 19, 2012

This work was supported by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (Grant No.44143012), Guangdong Pharmaceutical University (Grant No.52104109, 43755005), and Guangdong Provincial Health Department Grant (Grant No.A2011456)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-20-39352192, E-mail: songstang@hotmail.com

素和 β -促脂解素的结构相关性研究,推定该组肽是由同一蛋白质前体——阿片促黑素细胞皮质素原(propiomelanocortin, POMC)加工成熟而来。

哺乳动物的这些蛋白酶称为原蛋白转变酶(proprotein convertases, PCs),属丝氨酸蛋白酶家族,它们在内质网合成,转运到反式高尔基体网络被加工成熟,在分泌囊泡加工前体蛋白质。其他物种的转变酶有杆菌属的Subtilisin和酵母Kexin,所以许多文献又称为Subtilisin/Kexin家族。

八十年代中期,人们发现这样的加工规律广泛地存在于肽和蛋白质的成熟过程,这类蛋白水解酶的底物不仅仅包括肽类激素和神经递质,还包括生长因子、细胞表面受体蛋白、细胞间的粘连蛋白、血浆蛋白、基质金属蛋白酶、病毒外壳糖蛋白及细菌外毒素等^[4]。

研究者们尝试从组织中分离这类酶,然而,由于其在细胞内极低的表达量和缺乏可靠的检测手段等原因,未成功。直到1984年,美国Julius等^[5]发现,酵母Kex2突变株不能产生酵母成熟因子和杀伤毒素,他们利用缺陷型互补的方法,克隆到了该转变酶的基因。Kex2基因的发现及其功能的阐明,大大加速了原蛋白转变酶的研究。根据Kexin与哺乳动物PC在功能上的相似性,通过蛋白质一级序列同源性的比较,借助分子生物学方法,各种物种的PC基因被相继发现^[6-7]。

1 原蛋白转变酶的分类和加工识别位点

原蛋白转变酶分为9类,分别是PC1/3、PC2、PC4、PC5/6、PC7/8、Furin、PACE4、SKI-1/S1P和PCSK9。原蛋白转变酶识别蛋白质前体底物的加工位点附近的一般序列为:(K/R)-(X)_n-(K/R)↓或(K/R)-(X)_n-(K/R)-R↓结构, $n=0, 2, 4$ 或 6 ,X是除Cys外的任意氨基酸残基^[8]。

目前发现,不同的PC对其底物的酶切位点附近的序列有不同的要求,常常差异性加工它们的底物。Majumdar等^[9]发现,SKI-1/S1P水解底物的C-端位点R/K- θ - φ -L/S/T↓, θ 为除Cys以外的任意氨基酸残基, φ 为疏水氨基酸残基。Bergeron等^[10]对整合素 $\alpha 4$ 亚基的加工研究,发现其水解位点为HVISKR↓ST。Dey等^[11]发现,Furin对生长激素释放激素原(proGHRH)在N-端处水解位点RXXR↓/RXRR↓和随后的PC1/3在C-端水解位点

RXRXXR↓。Siegfried等^[12]发现血小板样生长因子PDGF-B首次水解位点为RGRR₈₁↓和随后水解位点ARPVT₁₉₀↓。Scamuffa等^[13]发现,prohepcidin的水解位点为RRRRR₅₉↓DT。

2 原蛋白转变酶的结构

哺乳动物原蛋白转变酶家族成员在结构上非常保守,包含信号肽、前域、催化结构域、P结构域和可变肽段(图1)。可变肽段包含多个半胱氨酸,常称半胱氨酸结构域。还有一些PC显示了一个跨膜结构域和C端胞浆结构域。PC1/3、PC2和PC4是可溶性蛋白酶,缺少跨膜结构域和胞浆结构域,其末端带有长的Ser/Thr丰富的尾。

2005年,Henrich等^[14]首次发表了Furin和Kex2的蛋白晶体解析结果(图2)。

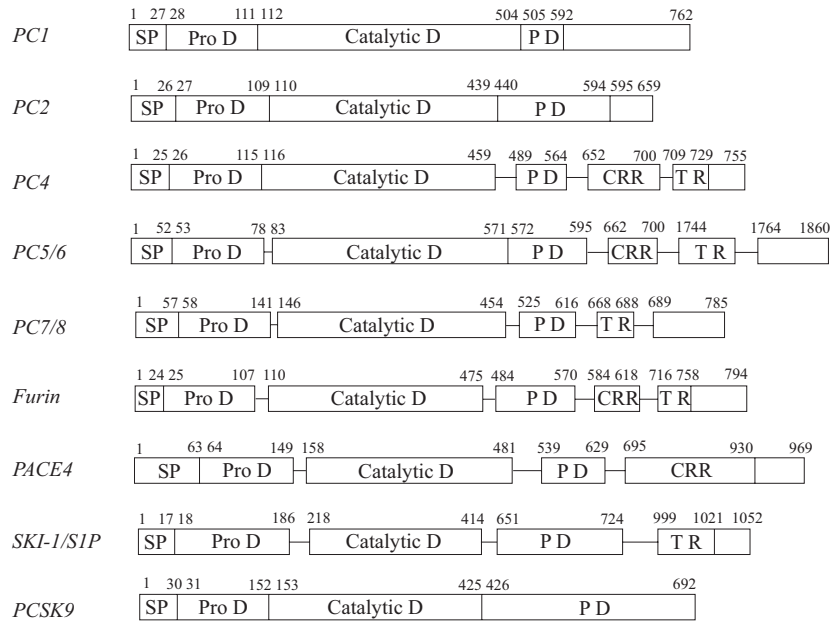
2.1 信号肽

信号肽(signal peptide)是指细胞合成分泌蛋白质时,它们的N-端往往有一延伸的肽段,在穿过内质网时被专一的信号肽酶裂解,这段肽又称为pre结构。PC前原蛋白的信号肽长度为17-24个氨基酸残基,N-端含有碱性残基,C-端是极性残基,中间是疏水区,与一般信号肽结构类似。

2.2 前域

在信号肽序列之后,PC含有一段100个氨基酸残基左右的前体肽,这段肽又称为pro结构,又称前域(pro-Domain)。近年来发现,前域在酶分子翻译后成熟过程中扮演分子伴侣角色,起着协助酶正确折叠作用^[15]。

前域有较小的分子组成。在前域结构中有两个碱性氨基酸集中区,这就是PC自身识别剪切部位—初级激活切割节段(primary activation cleavage segment, KRRTKR₁₀₇↓D₁₀₈V)和二级激活切割节段(secondary activation cleavage segment, VTKR₇₅YS₇₇↓)。第一次快速剪切 $t_{1/2}<10$ min,是靠近酶蛋白催化区域与初级激活切割节段位点,在pH值中性的内质网腔内完成该过程后,被切下的前域仍与酶催化结构域结合在一起,一起运输到微酸性的反式高尔基网(TGN)中,在那里进行了第二次缓慢剪切 $t_{1/2}<2$ h。第二次剪切是以二级激活切割节段位点处被切除。第二次切除明显导致了前域的去稳定,最终导致活性PC分子的释放。这种通过两次自身剪切使酶蛋白加工成熟的过程,是PC自身调节的一种精准方式^[16]。

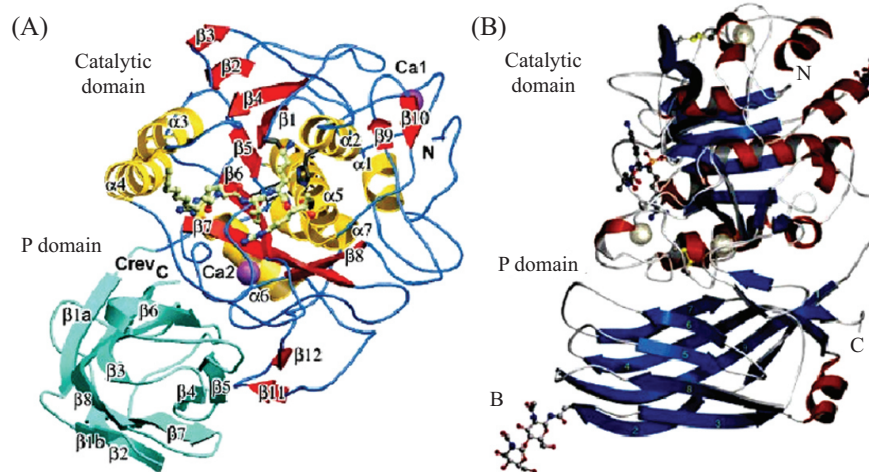


SP:信号肽; Pro D: Pro结构域; Catalytic D: 催化结构域; P D: P结构域; CRR:半胱氨酸丰富区; T R: 跨膜区; □: 其他区。

SP: signal peptide; Pro D: Pro domain; Catalytic D: catalytic domain; P D: P Domain; CRR: cysteine-rich region; T R: trans-membrane region; □: other region.

图1 原蛋白转变酶的结构

Fig.1 Structure graph of proprotein convertases



A: Furin; B: Kexin 2。两个蛋白显示了相似的晶体构象, 晶体结构域呈球形和中心凹陷, P结构域成桶状。

A: Furin; B: Kexin 2. The two proteins show similar crystal configuration. Their catalytic domains are spherical and center-pitting and their P domains show like barrel.

图2 Furin和Kexin 2蛋白的晶体结构(根据参考文献[14]修改)

Fig.2 Crystal configurations of Furin and Kexin 2 proteins(modified from reference [14])

切下的前体肽是作为抑制剂形式存在的, 以屏蔽PC的活力^[17], 如Furin前体肽对成熟Furin的抑制常数为14 nmol/L, PC7的前体肽是成熟PC7的抑制IC₅₀为0.4 nmol/L, 特异性很高。

目前唯一获得的独立前域分离自PC1/3, 这个前域有两个反平行 α 螺旋和四个 β 折叠构成的开

放三明治结构(open sandwich anti-parallel- α / anti-parallel- β)^[18]。哺乳动物PC的前域结构同源性很低。

2.3 催化结构域

前域之后的催化结构域(catalytic domain)由300个左右氨基酸残基组成。该区在一级结构上表现出与枯草杆菌蛋白酶BPN有一定的同源性

(25%~30%)。在哺乳动物PC之间, 同源性达到50.1%~68.5%, 其最保守的是催化三联体DHS氨基酸残基及其附近的序列。

PC催化结构域的核心有高度扭曲的7个平行和一个反平行的 β 片层构成, 这个片层又被7个外围螺旋和两个短 β 发卡环包围着, 较长的N-端构成kexin样螺旋状。在哺乳动物PC和kexin分子中, 催化结构域的肽链通过二硫键交联(C₂₁₁-C₃₆₀和C₃₀₃-C₃₃₃, PC5和PACE4还有C₁₂₇-C₁₂₈)。值得注意的是, 内部不对的C残基, 如Furin的C₁₉₈和C₃₀₅残基, 在所有PC中非常保守。

PC的催化活力表现出对Ca²⁺离子的依赖性。各种转变酶对Ca²⁺的依赖性在量上并不完全相同, 如要达到50%酶活力, Furin、PC1和PC2分别需要0.2 mmol/L、3 mmol/L和1.0 mmol/L的Ca²⁺。在生理条件下, 组织之间和细胞内各种结构之间的Ca²⁺浓度差异很大, 因而不同的Ca²⁺浓度也成为调节转变酶活力的重要因素。在PC分子中, 深埋的残基E与保守的H₃₆₄残基构成内部盐键。PC潜在的N-糖苷化位点有N₄₄₀和N₃₈₇(Furin和PC1)、N₁₃₃和N₁₄₁(PC7)、N₁₅₉(PC1)、N₁₆₆(PC7)、N₂₀₇(PC5, PC7和PACE4)、N₃₅₉(PC2)和N₃₆₃(PC5)等, 它们位于催化结构域的顶端, 糖链不干扰酶与底物的结合^[19]。

2.4 P结构域

P结构域(P domain)对于PC的重要性表现在两个方面, 一是帮助酶分子正确折叠, 二是增强酶分子的稳定性。该结构与催化结构域通过很强的疏水作用相互连接。P结构域有34.6%~54.9%的同源性。通过点突变和构建嵌合体, 证明PC1的P结构域对于调节该酶的稳定性、Ca²⁺依赖性和最适pH方面非常重要。在P结构域的中间位置, 有保守的五肽序列RRGDL, 其中的RGD作为细胞表面蛋白凝集素的识别信号, 在细胞黏连中起重要的作用。近年实验显示, 该结构被突变后, PC1在内质网中的成熟率大大下降, 同时它的分泌途径也有很大变化。人们猜测它可能参与酶分子的折叠, 以及酶分子在细胞各亚结构之间的运输等^[20]。在PC分子中, 除了D₃₉₂外, 保守的W₄₄₁连接P结构域到催化结构域的L/V/I₃₉₆残基。

P结构域是一个独立桶形结构, 这个结构由两个相反的四股 β 片层构成, 它们之间插入一个疏水核心。除了PC7和kexin外, 其它PC有一个共同的二硫键C₄₅₀-C₄₇₇, PC7还有一个新二硫键C₅₀₇-C₅₃₈。在P

结构域中, 残基494和504显示了潜在性N糖基化位点, PC4和PC7在残基470有糖基化位点。P结构域终止于T/E/S₅₇₃残基, 该残基似乎是PC1/3酶活性所必需。

2.5 结构域之间的连接

结构域之间的连接在所有PC中是一致的。实验发现, 嵌合型PC(chimeric PC)结构显示了酶活性。P结构域最大限度地通过它的两个边螺旋与催化结构域联系。疏水性残基多数保守性地存在于PC分子中, 它们介导与P结构域之间的连接。在PC分子中, 保守的R₅₁₉-D₃₀₁和D₅₂₂-R₄₉₈分子之间分别形成盐键, 保守的E₄₈₅和Q₄₄₇的侧链与R₃₉₁和H₃₉₅的侧链分别形成带电氢键。PC4有R₄₁₈-D₅₄₀盐键。除了PC7外, 其它PC由R₄₉₈GD₅₀₀形成RGD结构。

2.6 可变节段

Furin、PACE4和PC5的可变节段(variable segment)包含多个半胱氨酸, 常称半胱氨酸结构域(Cys-rich region), 但在PC4和PC7中可变节段不明显。Furin和PC5含有一个与受体蛋白酪氨酸激酶前体相类似的半胱氨酸丰富区, 该区是由一个保守的半胱氨酸结构方式C-X₂-C-X₃-C-X₅₋₇-C-X₂-C-X₈₋₁₅-C-X₃-C-X₉₋₁₆经过多次重复而形成^[21], 如PC5含5次重复序列, Furin含2次重复, PC5B含有22次重复, 这种半胱氨酸重复序列的功能尚不清楚。

2.7 跨膜结构域

Furin、Kexin以及PC5B都含有一个疏水性的跨膜结构域(trans-membrane domain), 以帮助它们锚定在细胞内的膜状结构上。PC1/3、PC2和PC4是可溶性蛋白酶, 其结构中不含跨膜结构域, 但它们的C末端序列组成一种两性 α 螺旋结构, 与肽类加工中的可溶性羧肽酶Y/E的结构非常相似。该结构具有一种pH依赖性的膜结合功能, 可能在神经内分泌细胞对各种激素及神经肽的精细调节中起到一定的作用^[22]。

2.8 胞浆结构域

跨膜区之后, 还有一段大小不同的胞浆结构域(C-terminal cytoplasmic domain)。已经证明, 在Furin的胞浆区, 至少存在三个主要的信号区, 即细胞表面聚集信号(cell surface tethering signal)、内吞信号(multiple internalization signal)和酸性氨基酸富集结构域(acidic cluster motif)。这些信号区指导着成熟后的Furin在细胞内各亚结构中转运与定位。胞浆区

与诸多调控因子相互作用, 深刻地影响Furin在细胞各种结构层次上的功能^[23]。

2.9 底物结合区

所有PC的底物结合区(substrate binding regions)模型显示了很深的船形活性位点裂隙, 三氨基酸残基S₃₆₈/H₁₉₄/D₁₅₃构成的活性位点排列在中心, 环中所有的残基都对该裂隙有贡献。裂隙的上边缘是由多个转角和螺旋形成, 裂隙的下缘包围两个环, 排在底物排列序列SW₂₅₄GP之后^[24]。

3 原蛋白转变酶的功能

原蛋白转变酶的主要功能是在翻译后加工和激活前体蛋白质, 通过内切许多原蛋白的PRO结构, 使其转活, 它们的主要功能分述如下:

PC1/3: 研究发现, 小鼠*PC1/3*基因敲除后, 引起先天性免疫缺陷, *PC1/3*通过调节巨噬细胞细胞因子的分泌对先天免疫中起着重要的作用^[25]。当*PC1/3*基因发生突变时, 会导致肥胖^[26]。同时还发现, *PC1/3*可以促进正常和癌变的乳腺细胞生长^[27], *PC1/3*通过加工胰高血糖素样蛋白原(proGlucagon-like protein, GLP)产生GLP-1和GLP-2调节血糖和*PC1/3*有利于提高机体的耐冷性^[28]。

PC2: Gagnon等^[29]在对比研究中发现, *PC2*基因敲除小鼠出现肠道蠕动延迟、投喂反应降低以及降低一些血液中调节肽的水平等。研究表明, *PC2*减轻肥胖, 保护小鼠体重不受食物中脂肪的影响^[30]; *PC2*基因变异会引起心肌梗死^[31]; *PC2*在细胞的分化和癌变中的伴有重要的角色^[32]。

PC5/6: 研究表明, *PC5/6*通过加工子宫内膜的整合素 α 影响胚胎的植入^[33], 抑制*PC5/6*的活性可以达到避孕的作用^[34]。Heng等^[35]报道, *PC5/6*通过加工EBP50蛋白, 调节Ezrin蛋白的绑定以及膜与细胞骨架的相互作用影响着胚胎的着床。*PC5/6*可以预防肠道肿瘤的发生^[36]和*PC5/6*失活的小鼠出生时出现额外的脊椎、缺尾和肾发育不全, 甚至死亡^[37]。

Furin: 研究发现, Furin加工IBV的S蛋白增加了病毒对动物细胞的敏感性^[38], *furin*基因的过表达促进皮肤肿瘤的生长和子宫癌侵袭性^[39], 抑制Furin在细胞表面的重新定位可以降低癌细胞的迁移能力^[40]。血管内皮细胞Furin的缺失会导致心脏畸形和出生后早期死亡, Furin对关节炎有保护作用 and 免疫细胞*furin*基因的过表达促进人类动脉粥样硬

化等^[41-43]。

PACE4: PACE4在骨骼肌分化、唾液腺发育和前列腺癌持续生长方面起重要作用^[44-46]。

PCSK9: PCSK9通过控制低密度脂蛋白受体水平调节胆固醇代谢^[47]和*PCSK9*基因的突变会造成常染色体显性遗传的高胆固醇血症^[48]。

SKI-1/S1P: 研究报道, 抑制SKI-1的活性, 可以抑制主要细胞外基因的复制而调节成骨细胞的矿化^[49]。

4 展望

PC在高尔基体膜和分泌囊泡中单独或互相协同作用, 在时间和空间上加工多种蛋白质前体在特定组织和细胞中的成熟。

神经内分泌肽加工有三种形式: N-端加工, 如氨基肽酶^[50], 是从成熟肽N-端切除两个氨基酸残基, 与肽失活有关^[51-52]; 内切加工, 如PC等, 从未成熟肽的内部切割; C-端加工, 如羧基肽酶E(CPE)和酰胺化酶(PAM)等, 前者是从未成熟肽的C末端逐个切除碱性氨基酸, 后者是在肽链C末端形成 α 酰胺基。内切加工和C端加工与神经内分泌肽前体成熟相关。

由于原蛋白转变酶与多种生理及病理情况密切相关, 它们已经成为治疗多种疾病的重要靶点。许多疾病的发生伴随着原蛋白转变酶或其底物在体内产生变化, 通过调控原蛋白转变酶的活性, 有可能达到治疗这些疾病的目的。许多文献报道, 控制某种神经内分泌肽或其基因的表达, 就可以控制相关肿瘤, 如促性腺激素释放激素和生长激素释放激素的拮抗剂或其分子疫苗可治疗乳腺癌和肺癌等, 而通过控制原蛋白加工能力来控制肿瘤的方法, 比起控制神经内分泌肽本身或调控肿瘤相关基因更容易和安全, 因为原蛋白加工酶仅有9个, 而神经内分泌肽至少有350多种。随着原蛋白转变酶结构和作用机理的阐明, 将为相关疾病的治疗和诊断提供新的研究方向。

参考文献 (References)

- Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor. *Science* 1967; 157(3789): 697-700.
- Chrétien M, Li CH. Isolation purification and characterization of γ -lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem* 1967; 45(7): 1163-74.
- Crine P, Benjannet S, Seidah NG, Lis M, Chrétien M. *In vitro* biosynthesis of β -endorphin in pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci* 1977; 74(4): 1403-6.

- 4 Seidah NG, Chrétien M. Proprotein and prohormone convertases: A family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 1999; 848(1/2): 45-62.
- 5 Julius D, Blair L, Brake A, Sprague G, Thorner J. Yeast factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell* 1983; 32(3): 839-52.
- 6 Holyoak T, Kettner CA, Petsko GA, Fuller RS, Ringe D. Structural basis for differences in substrate selectivity in Kex2 and furin protein convertases. *Biochemistry* 2004; 43(9): 2412-21.
- 7 Turpeinen H, Kukkurainen S, Pulkkinen K, Kauppila T, Ojala K, Hytönen VP, *et al.* Identification of proprotein convertase substrates using genome-wide expression correlation analysis. *BMC Genomics* 2011; 12(618): 1-10.
- 8 Basak A, Lazure C. Synthetic peptides derived from the prosegments of proprotein convertase 1/3 and furin are potent inhibitors of both enzymes. *J Biochem* 2003; 373(1): 231-9.
- 9 Majumdar S, Chen A, Palmer-Smith H, Basak A. 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* 2011; 18(18): 2770-82.
- 10 Bergeron E, Basak A, Decroly E, Seidah NG. Processing of alpha4 integrin by the proprotein convertases: Histidine at position P6 regulates cleavage. *Biochem J* 2003; 373(2): 475-84.
- 11 Dey A, Norrbom C, Zhu X, Stein J, Zhang C, Ueda K, *et al.* Furin and prohormone convertase 1/3 are major convertases in the processing of mouse pro-growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 2004; 145(4): 1961-71.
- 12 Siegfried G, Basak A, Prichett-Pejic W, Scamuffa N, Ma L, Benjannet S, *et al.* Regulation of the stepwise proteolytic cleavage and secretion of PDGF-B by the proprotein convertases. *Oncogene* 2005; 24(46): 6925-35.
- 13 Scamuffa N, Basak A, Lalou C, Wargnier A, Marcinkiewicz J, Siegfried G, *et al.* Regulation of prohepcidin processing and activity by the subtilisin-like proprotein convertases Furin, PCS5, PACE4 and PC7. *Gut* 2008; 57(11): 1573-82.
- 14 Henrich S, Lindberg I, Bode W, Than ME. Proprotein convertase models based on the crystal structures of furin and kexin: Explanation of their specificity. *J Mol Biol* 2005; 345(2): 211-27.
- 15 Anderson ED, Molloy SS, Jean F, Fei H, Shimamura S, Thomas G. The ordered and compartment-specific autoproteolytic removal of the furin intramolecular chaperone is required for enzyme activation. *J Biol Chem* 2002; 277(15): 12879-90.
- 16 Anderson ED, VanSlyke JK, Thulin CD, Jean F, Thomas G. Activation of the furin endoprotease is a multiple-step process—requirements for acidification and internal propeptide cleavage. *EMBO J* 1997; 16(7): 1508-18.
- 17 Fugere M, Limperis PC, Beaulieu-Audy, Gagnon F, Lavigne P, Klarskov K, *et al.* Inhibitory potency and specificity of subtilase-like pro-protein convertase (SPC) prodomains. *J Biol Chem* 2002; 277(10): 7648-56.
- 18 Tangrea MA, Bryan PN, Sari N, Orban J. Solution structure of the pro-hormone convertase 1 pro-domain from *Mus musculus*. *J Mol Biol* 2002; 320(4): 801-12.
- 19 Henrich S, Cameron A, Bourenkov GP, Kiefersauer R, Huber R, Lindberg I, *et al.* The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* 2003; 10(7): 520-6
- 20 Zhou A, Martin S, Lipkind G, LaMendola J, Steiner DF. Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem* 1998; 273(18): 11107-14.
- 21 Nour N, Mayer G, Mort JS, Salvas A, Mbikay M, Morrison CJ, *et al.* The cysteine-rich domain of the secreted proprotein convertases PCSA and PACE4 functions as a cell surface anchor and interacts with tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biol Cell* 2005; 16(11): 5215-26.
- 22 Blázquez M, Thiele C, Huttner WB, Docherty K, Shennan KI. Involvement of the membrane lipid bilayer in sorting prohormone convertase 2 into the regulated secretory pathway. *Biochem J* 2000; 349(3): 843-52.
- 23 Schäfer W, Stroth A, Berghofer S, Seiler J, Vey M, Kruse ML, *et al.* Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine trans-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J* 1995; 14(11): 2424-35.
- 24 Creemers JW, Siezen RJ, Roebroek AJ, Ayoubi TA, Huylebroeck D, van de Ven WJ. Modulation of furin-mediated proprotein processing activity by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1993; 268(29): 21826-34.
- 25 Refaie S, Gagnon S, Gagnon H, Desjardins R, D'Anjou F, D'Orléans-Juste P, *et al.* Disruption of proprotein convertase 1/3 (PC1/3) expression in mice causes innate immune defects and uncontrolled cytokine secretion. *J Biol Chem* 2012; 87(18): 14703-17.
- 26 Choquet H, Stijnen P, Creemers JW. Genetic and functional characterization of PCSK1. *Methods Mol Biol* 2011; 768: 247-53.
- 27 Blanchard A, Iwasio B, Yarmill A, Fresnosa A, Silha J, Myal Y, *et al.* Targeted production of proprotein convertase PC1 enhances mammary development and tumorigenesis in transgenic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87(10): 831-8.
- 28 Wideman RD, Gray SL, Covey SD, Webb GC, Kieffer TJ. Transplantation of PC1/3-Expressing alpha-cells improves glucose handling and cold tolerance in leptin-resistant mice. *Mol Ther* 2009; 17(1): 191-8.
- 29 Gagnon J, Mayne J, Chen A, Raymond A, Woulfe J, Mbikay M, *et al.* PCSK2-null mice exhibit delayed intestinal motility, reduced refeeding response and altered plasma levels of several regulatory peptides. *Life Sci* 2011; 88(5/6): 212-7.
- 30 Anini Y, Mayne J, Gagnon J, Sherbafi J, Chen A, Kaefer N, *et al.* Genetic deficiency for proprotein convertase subtilisin/kexin type 2 in mice is associated with decreased adiposity and protection from dietary fat-induced body weight gain. *Int J Obes(Lond)* 2010; 34(11): 1599-607.
- 31 Fujimaki T, Kato K, Yokoi K, Oguri M, Yoshida T, Watanabe S, *et al.* Association of genetic variants in SEMA3F, CLEC16A, LAMA3, and PCSK2 with myocardial infarction in Japanese individuals. *Atherosclerosis* 2010; 210(2): 468-73.
- 32 Tang SS, Zhang JH, Liu HX, Li HZ. PC2/CPE -mediated proprotein processing in tumor cells and its differentiated cells or tissues. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 303(1/2): 43-9.
- 33 Paule S, Aljofan M, Simon C, Rombauts LJ, Nie G. Cleavage of endometrial α -integrins into their functional forms is mediated by proprotein convertase 5/6. *Hum Reprod* 2012; 27(9): 2766-74.
- 34 Aljofan M, Singh H, Ho H, Xie S, Zhu Y, Sun Z, *et al.* Inhibition

- of proprotein convertase 5/6 activity: Potential for nonhormonal women-centered contraception. *Contraception* 2012; 85(6): 602-10.
- 35 Heng S, Cervero A, Simon C, Stephens AN, Li Y, Zhang J, *et al.* Proprotein convertase 5/6 is critical for embryo implantation in women: regulating receptivity by cleaving EBP50, modulating ezrin binding, and membrane-cytoskeletal interactions. *Endocrinology* 2011; 152(12): 5041-52.
- 36 Sun X, Essalmani R, Seidah NG, Prat A. The proprotein convertase PC5/6 is protective against intestinal tumorigenesis: *in vivo* mouse model. *Mol Cancer* 2009; 8: 73.
- 37 Essalmani R, Zaid A, Marcinkiewicz J, Chamberland A, Pasquato A, Seidah NG, *et al.* *In vivo* functions of the proprotein convertase PC5/6 during mouse development: Gdf11 is a likely substrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(15): 5750-5.
- 38 Tay FP, Huang M, Wang L, Yamada Y, Xiang Liu D. Characterization of cellular furin content as a potential factor determining the susceptibility of cultured human and animal cells to coronavirus infectious bronchitis virus infection. *Virology* 2012; 433(2): 421-30.
- 39 Fu J, Bassi DE, Zhang J, Li T, Nicolas E, Klein-Szanto AJ. Transgenic overexpression of the proprotein convertase furin enhances skin tumor growth. *Neoplasia* 2012; 14(4): 271-82.
- 40 Arsenaault D, Lucien F, Dubois CM. Hypoxia enhances cancer cell invasion through relocalization of the proprotein convertase furin from the trans-Golgi network to the cell surface. *J Cell Physiol* 2012; 227(2): 789-800.
- 41 Kim W, Essalmani R, Szumska D, Creemers JW, Roebroek AJ, D'Orleans-Juste P, *et al.* Loss of endothelial furin leads to cardiac malformation and early postnatal death. *Mol Cell Biol* 2012; 32(17): 3382-91.
- 42 Lin H, Ah Kioon MD, Lalou C, Larghero J, Launay JM, Khatib AM, *et al.* Protective role of systemic furin in immune response-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64(9): 2878-86.
- 43 Turpeinen H, Raitoharju E, Oksanen A, Oksala N, Levula M, Lyytikäinen LP, *et al.* Proprotein convertases in human atherosclerotic plaques: the overexpression of FURIN and its substrate cytokines BAFF and APRIL. *Atherosclerosis* 2011; 219(2): 799-806.
- 44 Yuasa K, Masuda T, Yoshikawa C, Nagahama M, Matsuda Y, Tsuji A. Subtilisin-like proprotein convertase PACE4 is required for skeletal muscle differentiation. *J Biochem* 2009; 146(3): 407-15.
- 45 Akamatsu T, Azlina A, Javkhan P, Hasegawa T, Yao C, Hosoi K. Salivary gland development: its mediation by a subtilisin-like proprotein convertase, PACE4. *J Med Invest* 2009; 56 Suppl: 241-6.
- 46 D'Anjou F, Routhier S, Perreault JP, Latil A, Bonnel D, Fournier I, *et al.* Molecular validation of PACE4 as a target in prostate cancer. *Transl Oncol* 2011; 4(3): 157-72.
- 47 Xu W, Liu L, Hornby D. c-IAP1 binds and processes PCSK9 protein: Linking the c-IAP1 in a TNF- α pathway to PCSK9-mediated LDLR degradation pathway. *Molecules* 2012; 17(10): 12086-101.
- 48 Abifadel M, Guerin M, Benjannet S, Rabès JP, Le Goff W, Julia Z, *et al.* Identification and characterization of new gain-of-function mutations in the PCSK9 gene responsible for autosomal dominant hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2012; 223(2): 394-400.
- 49 Gorski JP, Huffman NT, Chittur S, Midura RJ, Black C, Oxford J, *et al.* Inhibition of proprotein convertase SKI-1 blocks transcription of key extracellular matrix genes regulating osteoblastic mineralization. *J Biol Chem* 2011; 286(3): 1836-49.
- 50 Tang SS, Wu J, Xie YF, Ming X, Hu ZY, and Liu JJ. Purification, kinetic characterization of lactococcus lactis X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase recombined in *E. coli*. *Chin J Biochem Mol Biol* 2003; 19(2): 144-150.
- 51 Tang SS, Du MH, Zhang JH, Kong X, Liu JJ. Structure and function relationships of three novel hGHRH-GGC analogs. *Regul Pept* 2010; 159(1/2/3): 87-92.
- 52 Tang SS, Du MH, Zhang XW, Zhang JH, Kong X, Wu J, *et al.* Study on the constructions and activities of three novel hGHRH analogs with N-terminal prolyl modulation⁺. *Regul Pept* 2006; 133(1/2/3): 20-6.