

DISS. NR. 7134

DIE VERANKERUNG DES SACCHARASE-ISOMALTASE-KOMPLEXES
IN DER INTESTINALEN BUERSTENSAUMMEMBRAN

mit einem Appendix über die Phospholipidasymmetrie
der Bürstensaummembran

A B H A N D L U N G

zur Erlangung
des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften
der

E I D G E N O E S S I S C H E N T E C H N I S C H E N
H O C H S C H U L E Z U E R I C H

vorgelegt von

M A R T I N S P I E S S

Dipl. Naturwissenschaftler ETH
geboren am 11. Oktober 1955
von Zürich und Hemberg (SG)

angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. G. Semenza, Referent
Prof. Dr. J.H.R. Kägi, Korreferent
PD Dr. H. Hauser, Korreferent

Separatdrucke:

J. Biol. Chem. (1981) 256, 8977-8982
J. Biol. Chem. (1982) 257, 2370-2377

11. ZUSAMMENFASSUNG

Der Saccharase-Isomaltase-(SI)-Komplex aus der intestinalen Bürstensaummembran von Kaninchen ist ein integrales, "gestieltes" Membranprotein, welches mit einem aminoterminalen Segment der Isomaltase-Untereinheit in der Bilayer verankert ist. Das hydrophobe Ankerpeptid lässt sich mit Papain abspalten. Die Molekulargewichte des intakten und des mit Papain solubilisierten SI-Komplexes, bestimmt durch analytische Ultrazentrifugation, betragen 275000 D bzw. 237000 D.

Das hydrophobe Ankerpeptid wurde mit [^{125}I]3-Trifluormethyl-3-(m-jodphenyl)diazirin selektiv in der hydrophoben Matrix der Membran markiert, durch Papain vom Rest des Proteines getrennt durch Gelfiltration in Detergenzlösungen oder organischen Lösungsmitteln isoliert und charakterisiert. Das Molekulargewicht beträgt ca. 6500 D. Die Aminosäurezusammensetzung enthält 76% hydrophobe Aminosäuren. Eine vollständige Hydrolyse konnte nur mit 6 N HCl in 50% Propionsäure erreicht werden. CD-Spektren des solubilisierten oder in Proteoliposomen rekonstituierten Ankerpeptides weisen auf einen Helix-Gehalt von ca. 80%. Die wahrscheinlichste Struktur des Ankerpeptides besteht aus zwei haarnadelförmig angeordneten, transmembranären Helices mit dem N- und C-Terminus auf der luminalen Membranseite. Implikationen für die Biosynthese des SI-Komplexes werden diskutiert. Möglicherweise ist diese Art der Membranverankerung auch in anderen Bürstensaumproteinen in Darm und Niere verwirklicht.

Spaltungsexperimente haben gezeigt, dass das hydrophobe Ankerpeptid gegenüber Proteasen sehr stabil ist, im Gegensatz zum Verbindungspeptid zwischen der Membran und dem globulären Teil der SI. Dieses Segment wird auch im nativen Zustand von nicht-pankreatischen Proteasen quantitativ gespalten. Gegenüber Trypsin und Chymotrypsin ist dieser Abschnitt aber durch die Aminosäuresequenz geschützt, d.h. durch das Fehlen von Lys, Arg, Phe, Tyr und Trp auf einer Länge von rund 100 Aminosäureresten.

Die hydrophobe Sequenz 12-31 des Ankerpeptides wurde mittels "Solid Phase"-Peptidsynthese hergestellt und zeichnete sich durch weitgehende Unlöslichkeit und β -Faltblatt-Konformation aus. Mögliche Ursachen und Konsequenzen werden diskutiert.

In einem Anhang sind Arbeiten über die Phospholipidasymmetrie der Bürstensaummembran gezeigt. Austausch- und Hydrolyse-Experimente sind durchgeführt worden. Ca. 75% des Phosphatidylcholin und Phosphatidylaethanolamin (entsprechend 52% des Gesamtphospholipides) konnten auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert werden. Das Phospholipid weist bei physiologischer Temperatur eine sehr hohe "flip-flop"-Rate auf (Halbwertszeit < 8 min bei 37°C), welche unter 10°C aber stark reduziert ist (Halbwertszeit ca. 6 h bei 4° und 10°C).

SUMMARY

The sucrase-isomaltase (SI) complex of the rabbit small-intestinal brush border membrane is an integral, stalked protein anchored in the membrane by an aminoterminal segment of the isomaltase subunit. The hydrophobic anchor peptide can be split off by papain. The molecular weights of the intact and the papain-solubilized SI complex were determined by analytical ultracentrifugation to be approx. 275000 D and 237000 D, respectively.

The hydrophobic anchor peptide was selectively labelled from within the lipid bilayer by [¹²⁵I]3-trifluoromethyl-3-(m-iodophenyl)diazirine, separated from the rest of the protein by papain-digestion, isolated by gel filtration in detergent solution or organic solvents and characterized. Its molecular weight was found to be approx. 6500 D. The amino acid composition contains 76% apolar residues. Complete hydrolysis was achieved only in 6 N HCl in 50% propionic acid. CD-Spectra of the anchor peptide, solubilized or reconstituted into proteoliposomes, showed approx. 80% helical conformation. The most probable structure consists of two transmembrane helices similar to a hairpin with both N- and C-terminus on the extracytoplasmic side of the membrane. Implications for the biosynthesis of SI are discussed. Possibly other proteins of the intestinal and renal brush border are anchored in the membrane in a similar manner.

The hydrophobic anchor peptide is very stable against proteolytic attack in contrast to the connecting segment between the membrane and the globular part of SI. This segment is readily cleaved by non-pancreatic proteases. It is protected from trypsin and chymotrypsin by its primary structure, i.e. in a length of approx. 100 amino acid residues it lacks Lys, Arg, Phe, Tyr and Trp.

The hydrophobic sequence 12-31 of the anchor peptide was synthesized by solid phase peptide synthesis. It proved to be in-

soluble in most solvents and to have β -sheet conformation. Possible reasons and implications are discussed.

In an appendix some work on the phospholipid asymmetry of the brush border membrane, using phospholipid exchange and phospholipase treatment, is shown. Approx. 75% of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamin (corresponding to 52% of the total phospholipid) were located on the cytoplasmic side of the bilayer. At physiological temperature the phospholipids undergo a rapid transbilayer movement ("flip-flop") (halftime <8 min at 37°C), which is dramatically slowed down below 10°C (halftime approx. 6 h at 4°C and 10°C).