

19. Dez. 1986

Diss. ETH

Diss. ETH Nr. 8137

CDNA CLONING OF PRO-SUCRASE ISOMALTASE:
PRIMARY STRUCTURE, MEMBRANE TOPOLOGY,
BIOSYNTHESIS AND EVOLUTION
OF AN INTRINSIC BRUSH BORDER ENZYME

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

WALTER HUNZIKER

dipl. Natw. ETH
born the second of June 1958
citizen of Hittnau (ZH)
Staffelbach (AG) and
Mexico

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. G. Semenza, examiner
Prof. Dr. H. F. Lodish, co-examiner

Gj. Semenza

Zürich 1986

Part of the thesis was published in
Cell (1986) 46, 227-234



62

SUMMARY

The complete amino acid sequence of pro-sucrase-isomaltase (1827 residues) was derived from its mRNA.

A rabbit small intestinal mucosa cDNA library was constructed in the expression vector λ gt11. Initial screening of the library was carried out with polyclonal antibodies to the mature sucrase-isomaltase complex. Full length clones were isolated by *in situ* plaque hybridization using as probe a 5'-fragment of an immunoreactive clone. Hybridization experiments with mixed oligonucleotides derived from the partial amino acid sequence around the active site of sucrase were consistent with the isolated clones encoding pro-sucrase-isomaltase. On Northern blots the cDNA hybridized to a mucosa specific mRNA of approx. 6 kb. The sequence of the complete coding and 3'non-coding region as well as part of the 5'non-coding region of the mRNA was established. The identity of the cDNA was confirmed by the essential agreement of the deduced sequence with published partial amino acid sequences of the aminotermini and the active sites of the sucrase and isomaltase subunits.

Pro-sucrase-isomaltase lacks a transient signal sequence, the only N-terminal processing is the cleavage of the initiation methionine.

A single membrane spanning domain at the aminotermminus implies a cytoplasmic location of the 11 N-terminal

residues of isomaltase with the C-terminus of the molecule carrying the active sites protruding into the intestinal lumen.

A domain rich in serine and threonine residues adjacent to the membrane anchor is modified by O-linked carbohydrates and forms a "stalk" connecting the anchor and the globular enzymatic domains.

Extensive homology between the isomaltase and the sucrase subunit (42% identical amino acids) indicate that pro-sucrase-isomaltase evolved by gene duplication. The duplication was partial since the cytoplasmic domain, the membrane anchor and the stalk domain were not affected.

The expression of pro-sucrase-isomaltase in rabbit is developmentally regulated at a level before translation, as shown by Northern blot analysis of intestinal mRNA of baby and adult animals.

Similarities and differences in the structure, the biosynthesis, the evolution and the developmental regulation of sucrase-isomaltase to other brush border hydrolases are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vollständige Aminosäure-Sequenz der Pro-Saccharase-Isomaltase (1827 Reste) wurde von der mRNA abgeleitet.

Eine cDNA Bank des Kaninchen Dünndarms wurde im Expressions-Vektor λ gt11 hergestellt. Erste Klone wurden mit affinitäts-gereinigten polyklonalen Antikörpern gegen den Saccharase-Isomaltase-Komplex identifiziert. Klone die die gesamte Sequenz kodierten wurden durch Hybridisierung mit einem 5'-Endfragment eines mit Antikörpern isolierten Klons gefunden. Hybridisierungs-Experimente mit Oligonukleotiden die von der bekannten Aminosäure-Sequenz um die aktive Stelle der Saccharase-Untereinheit abgeleitet wurden, zeigten, dass diese Sequenz in den gereinigten Klonen vorhanden war. Bei Northern-Untersuchungen hybridisierte die cDNA mit einer mucosa spezifischen mRNA von ungefähr 6 kb. Die gesamte kodierende- und 3'-nicht kodierende- sowie ein Teil der 5'-nicht kodierenden Region der mRNA wurde sequenziert. Die Identität der cDNA wurde durch die Übereinstimmung der abgeleiteten Sequenz mit partiellen, publizierten Sequenzen der aminoterminalen Regionen und der aktiven Stellen der beiden Untereinheiten bestätigt.

Pro-Saccharase-Isomaltase besitzt keine spaltbare Signalsequenz, einzig das Initiations-Methionin wird im Laufe der Biosynthese entfernt. Eine einzige transmembranäre Domäne befindet sich am Aminoterminus der

Isomaltase-Einheit und impliziert, dass die 11 aminoterminalen Reste ins Cytoplasma ragen.

Angrenzend an den Membran-Anker befindet sich auf der extracytoplasmatischen Seite der Zellmembran ein Segment, welches reich an Serin- und Threonin Resten ist. Diese Serine und Threonine sind zumindest teilweise glykosyliert und bilden ein Verbindungsstück ("Stalk") zwischen dem Anker und den katalytischen Untereinheiten.

Die ausgeprägte Homologie zwischen der Isomaltase- und der Saccharase Untereinheit (42% identische Aminosäuren) zeigt, dass pro-SI durch eine partielle Genduplikation entstand, von der jedoch die in der Membran verankerte Domäne und die "Stalk"-Region nicht betroffen waren.

Die Northern-Blot Analyse von mRNA aus neugeborenen (10 Tage alten) und adulten Kaninchen deutet darauf hin, dass die Regulation der SI Expression während der Entwicklung dieses Säugers vor der translationellen Stufe stattfindet.

Gemeinsamkeiten und Unterschiede von SI zu anderen Hydrolasen der Bürstensaum-Membran in Bezug auf Struktur, Biosynthese, Evolution und Regulation der Expression werden diskutiert.