



Doctoral Thesis

Lactase-phlorizin hydrolase primary structure determination via cDNA cloning of the rabbit enzyme and developmental regulation in rabbit and human

Author(s):

Villa, Marco

Publication Date:

1990

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000578072> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 9181

**Lactase-phlorizin hydrolase:
primary structure determination via cDNA cloning of the rabbit
enzyme and developmental regulation in rabbit and human**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
doctor in natural sciences

presented by

MARCO VILLA

Dipl. sc. nat. ETH
born on the 20th of August 1962
citizen of Iseo (TI)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Giorgio Semenza, examiner
Prof. Dr. Ernesto Carafoli, co-examiner
Dr. Ned Mantei, co-examiner

Zürich 1990

Part of this thesis was published in:

EMBO J. (1988) 7: 2705-2713
Am. J. Hum. Genet. (1989) 45: 489-497

SUMMARY

The complete primary structure of the (adult) rabbit brush border membrane β -glycosidase complex (pre-pro-lactase-phlorizin hydrolase, or pre-pro-LPH, EC 3.2.1.23-62) was determined via cDNA cloning. The deduced primary translation product comprises 1926 amino acids. Based on computer sequence analysis, as well as from peptide sequences and further biochemical data, it was concluded that the proteins comprises five domains: (i) a cleaved signal sequence of 19 amino acids, (ii) a large "pro" portion of 846 amino acids, none of which appears in mature, membrane-bound LPH, (iii) the mature LPH, which contains both the lactase and phlorizin hydrolase activities in a single polypeptide chain, (iv) a membrane-spanning hydrophobic segment near the carboxy terminus, which serves as membrane anchor, and (v) a short hydrophilic segment at the carboxy terminus, which must be cytosolic (*i.e.*, the protein has an $N_{out}-C_{in}$ orientation). The pre-pro-lactase exhibits a four-fold internal homology, suggesting that the corresponding gene evolved by two cycles of partial gene duplication. This repetition also implies that parts of the "pro" portion are very similar to parts of the mature LPH, and hence that the "pro" portion may be a water soluble β -glycosidase, with a different cellular location than the mature enzyme.

In most mammals, including rabbits and adult type hypolactasic humans, high levels of lactase (and cognate mRNA) are present at time of birth, but short thereafter the enzymatic activity begins to drop towards the low adult values. This decrease is only in part paralleled by the variations in the mRNA levels, which were shown to be of the same order of magnitude for both milk tolerant and hypolactasic individuals. In a first attempt to investigate the regulation of this process in molecular terms, a number of suckling and adult rabbit lactase cDNAs were characterized and partially sequenced. An unexpected high amount of sequence polymorphism (about 3% at the protein level) was discovered between the three clones analyzed.

As discussed in the text, however, it is extremely unlikely that these variations reflect a developmental controlled alternative splicing of the mRNA precursors. Furthermore, preliminary studies of the rabbit lactase locus suggests that at least part of the gene is present in two copies per haploid genome, a fact that could account for the high degree of polymorphism observed among the rabbit lactase cDNAs. In a second step towards the understanding of the mechanism involved in the lactase gene expression, lactase activities and cognate mRNA levels of human cultured fetal intestinal explants (14-20 weeks of gestation) were examined. It was found that hydrocortisone and, at least in some cases, EGF can elicit the premature appearance of the lactase activity in cultured explants. While in the case of EGF the variations of the LPH levels were correlated to the amount of the cognate mRNA present, the hydrocortisone-induced rise in lactase activity correlated only poorly to the concomitant increase in the cognate mRNA levels observed, suggesting therefore that posttranscriptional mechanisms could be active in the developmental regulation of lactase expression.

RIASSUNTO

Nel presente lavoro la struttura primaria completa del complesso β -glicosidico (pre-pro-lattasi florizina-idrolasi, pre-pro-LFI, EC 3.2.1.23-62) degli orletti a spazzola intestinali del coniglio adulto è stata determinata tramite clonazione del rispettivo cDNA. Il prodotto primario della traduzione viene predetto essere di 1926 amminoacidi. Sulla base dell'analisi computerizzata dei dati e grazie alla determinazione di ulteriori sequenze peptidiche ed ad altri saggi biochimici, si può concludere che la proteina comprenda cinque domini: (i) una sequenza-segnale (scissa) di 19 amminoacidi; (ii) un grande "pro"-frammento di 846 amminoacidi, nessuno dei quali appare nella forma matura della LFI, che è legata alla membrana (iii) la LFI vera e propria (matura), che contiene in un'unica catena polipeptidica i siti catalitici sia della lattasi che della florizina-idrolasi (iv) un segmento idrofobico, localizzato presso il terminale carbossilico, che traversa la membrana e garantisce l'ancoraggio della proteina alla stessa (v) un piccolo segmento idrofilico che costituisce l'estremità carbossilica della proteina, e che pertanto deve avere una localizzazione citosolica (la proteina ha dunque un'orientazione del tipo N_{interno}-C_{esterno}). La pre-pro-LFI possiede una quadruplica omologia interna, il qual fatto suggerisce che il gene corrispondente si sia evoluto tramite due cicli di parziale duplicazione genetica. Questa omologia implica altresì che parti del "pro"-frammento siano molto simili a regioni dell'enzima maturo, e dunque che lo stesso sia una glicosidasi idrosolubile con una collocazione subcellulare diversa dall'enzima maturo.

Nella quasi totalità dei mammiferi, compresi il coniglio e gli esseri umani affetti da ipolattasia dell'adulto, livelli elevati di lattasi (e del corrispondente mRNA) sono presenti al momento della nascita, ma cominciano a declinare nel periodo immediatamente successivo per poi arrivare alle basse attività caratteristiche dell'adulto. Questo calo è accompagnato solo in parte dalla diminuzione del rispettivo

livello di mRNA, il quale è stato dimostrato essere del medesimo ordine di grandezza sia negli individui lattosio-tolleranti che intolleranti. In un primo tentativo di chiarire il processo in termini molecolari si è proceduto alla caratterizzazione di cloni di cDNA lattasici derivati da conigli adulti e lattanti. Lo studio ha rivelato un insospettato tasso di polimorfismo di sequenza (circa il 3% a livello di proteina) nei tre cloni analizzati. Come discusso in dettaglio nel testo, è tuttavia estremamente improbabile che lo stesso derivi da un differente processo dei mRNA precursori. Oltre a ciò, studi preliminari sul loco genetico della lattasi nel coniglio suggeriscono che questo sia (almeno parzialmente) presente in due copie per genoma aploide, fatto che di per se stesso potrebbe almeno in parte spiegare l'elevato grado di polimorfismo riscontrato nei cloni di coniglio.

In un ulteriore appoggio verso il chiarimento dei meccanismi regolatori dell'espressione della lattasi, l'attività enzimatica della stessa e il livello del rispettivo mRNA sono stati analizzati in esplantati fetali umani (14.-20. settimana) mantenuti in cultura cellulare. Idrocortisone, e, in certi casi, anche EGF sono stati in grado di indurre uno specifico aumento dell'attività lattasica negli esplantati. Mentre nel caso dell' EGF le variazioni del livello lattasico sono da addebitare esclusivamente a variazioni nel rispettivo livello di mRNA, nel caso dell'idrocortisone gli aumenti di attività lattasica possono venir correlati solo marginalmente con il concomitante aumento di mRNA: quest'ultimo fatto induce a postulare l'esistenza di meccanismi di controllo post-traduzionali per l'espressione del gene della lattasi.