



Doctoral Thesis

Proteine mit Glykosylphosphatidyl-Inositol Ankern cDNA-Klonierung und Charakterisierung von Trehalase aus Kaninchendünndarm, sowie Studien zum Verankerungsmechanismus

Author(s):

Ruf, Jürg

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000684117> →

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. 9951

Proteine mit Glykosylphosphatidyl-Inositol Ankern:

**cDNA-Klonierung und Charakterisierung von
Trehalase aus Kaninchendünndarm, sowie
Studien zum Verankerungsmechanismus**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Jürg Ruf

Dipl. Chem. ETH
geboren am 17. Dezember 1963
von Trub (BE)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. G. Semenza, Referent
Prof. Dr. Th. Koller, Korreferent
Dr. Ned Mantel, Korreferent

Zürich 1992

Zusammenfassung

Die vollständige Primärstruktur der Disaccharidase α,α -Trehalase (EC 3.2.1.28) aus der Bürstensaummembran von Kaninchen-Dünndarm wurde durch cDNA-Klonierung ermittelt. Die Hybridisierungssonde für die Isolierung eines entsprechenden cDNA-Klones wurde mit Hilfe einer Polymerase Kettenreaktion (PCR), basierend auf einer partiellen Aminosäuresequenz hergestellt. Das von der cDNA abgeleitete Protein besteht aus 578 Aminosäuren, hat vier interne N-Glykosylierungsstellen, eine typische, N-terminale Signalsequenz und eine mässig hydrophobe, C-terminale Sequenz, die typisch für Proteine ist, die via Glykosylphosphatidyl-Inositol (GPI) in der Membran verankert sind. Trehalase zeigt keine Sequenzhomologie mit anderen Bürstensaum-Glykosidasen, ist aber zu 35 % identisch mit der periplasmatischen Trehalase aus *E. coli*. In einer Northern Analyse wurden mRNAs des Enzyms in Niere, Dünndarm und in kleinerem Ausmass in Leber gefunden und eine S1-Analyse ergab, dass im Dünndarm vermutlich nur eine Trehalase-mRNA-Spezies vorliegt. Der isolierte Trehalase-cDNA-Klon konnte durch Injektion von *in vitro* synthetisierter mRNA in Oozyten von *Xenopus laevis* exprimiert werden und die in der Oberflächenmembran der Oozyten verankerte Trehalase wurde durch PI-PLC, eine für GPI-Anker spezifische Phospholipase von *B. thuringiensis*, solubilisiert. Dies weist stark darauf hin, dass Trehalase tatsächlich via GPI in der Membran verankert ist.

Mit Trehalase als Substrat wurde versucht, ein *in vitro*-Testsystem für die 'Transamidase', das Enzym, welches den hydrophoben C-Terminus von GPI-Proteinen im ER durch einen GPI-Anker austauscht, zu entwickeln. Dazu wurden die cDNAs von Trehalase und RDP (renal dipeptidase), einem weiteren GPI-Protein, in Weizenkeim-Extrakt- und Retikulozyten-Lysat-Systemen in Gegenwart von Hundepankreas-Mikrosomen *in vitro* translatiert und durch den Einbau von [³⁵S]Methionin radioaktiv markiert. Unvollständige N-Glykosylierung und die Grösse der Translationsprodukte führten jedoch zu prinzipiellen Problemen bei der Interpretation der Resultate. Um diese Probleme zu umgehen, wurde je eine Deletionsmutante von Trehalase und RDP ohne N-Glykosylierungsstellen und mit Molekulargewichten der Proteine von nur noch 23, bzw. 26 kDa konstruiert. Um auf Grund einer Bandenverschiebung auf einem SDS-

Polyacrylamidgel entscheiden zu können, ob die Translationsprodukte dieser Mutanten tatsächlich am C-Terminus prozessiert werden, wurden zusätzlich Referenzmutanten hergestellt, die keine N- und/oder C-terminale Signalsequenzen mehr enthielten oder bei denen das C-terminale Signal durch eine gezielte Mutation deaktiviert war. Die Deletionsmutanten von Trehalase und RDP wurden dann verwendet, um Mikrosomen aus Hundepankreas, Kaninchen-Niere und -Leber, *X. laevis* Oozyten, Raji-Zellen und CHO-Zellen auf Transamidase-Aktivität zu prüfen. Nur Mikrosomen aus CHO-Zellen führten jedoch zu einer zusätzlichen schwachen Bande, die vermutlich dem GPI-verankerten Translationsprodukt entspricht. Die Referenzmutante mit dem deaktivierten Signal am C-Terminus zeigte diese zusätzliche Bande nicht.

Auf Grund dieser Resultate wurde versucht, die GPI-Verankerung auch in Detergenz-solubilisierten CHO-Mikrosomen zu zeigen und somit ein Testsystem für die Transamidaseaktivität zur Verfügung zu haben. Dazu wurden Trehalase-Mutanten mit und ohne N-terminale Signalsequenz im Weizenkeim- oder im Retikulozyten-System *in vitro* translatiert und als Substrate für die Transamidase unter verschiedensten Bedingungen eingesetzt. Eine C-terminale Prozessierung oder die GPI-Verankerung konnten jedoch nicht gezeigt werden. Mögliche Gründe dafür werden diskutiert.

Summary

The complete primary structure of the brush-border membrane disaccharidase α,α -trehalase (EC 3.2.1.28) from rabbit small intestine was determined by cDNA-cloning. The hybridization probe for the isolation of a corresponding cDNA-clone was generated through a polymerase chain reaction (PCR) based on a partial amino acid sequence. The protein deduced from the cDNA comprises 578 amino acids, contains four internal N-glycosylation sites, a typical N-terminal signal sequence, and a rather hydrophobic C-terminal sequence which is typical for proteins anchored to the membrane via glycosylphosphatidylinositol (GPI). Trehalase has no sequence homologies with other sequenced brush-border glycosidases but it is 35 % identical with periplasmic *E. coli*-trehalase. Northern blot analysis revealed trehalase mRNA in small intestine, kidney and smaller amounts in liver and S1-analysis indicated only one mRNA species in small intestine. Injection of *in vitro* synthesized mRNA derived from the isolated cDNA-clone into *Xenopus laevis* oocytes resulted in the expression of trehalase activity. The activity was membrane-bound and could be solubilized upon digestion with phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus thuringiensis*. This strongly suggests that trehalase is in fact anchored to the membrane via GPI.

With trehalase as a substrate attempts were made to develop an *in vitro*-assay for the 'transamidase', the enzyme which replaces the hydrophobic C-terminus of GPI-proteins through a GPI-anchor in the ER. The cDNAs of trehalase and RDP (renal dipeptidase), another GPI-protein, were *in vitro* translated and radioactively labeled in a wheat germ extract and in a reticulocyte lysate translation system in the presence of dog pancreas microsomes. C-terminal processing was thought to be detected by a band shift of the translation products on a SDS PAGE gel, but incomplete N-glycosylation and the large size of the translation products rendered the interpretation of the results impossible. In order to avoid these problems deletion mutants of trehalase and RDP were generated which lacked any N-glycosylation sites and whose proteins were only 23 and 26 kDa in size respectively. To judge whether a band shift on a SDS-polyacrylamide gel is due to specific C-terminal processing, reference mutants were made which either lacked the N-terminal and/or the C-terminal hydrophobic signals or in which the signal had been inactivated by a specific mutation. The deletion mutants were then used to test microsomal preparations from dog

pancreas, rabbit kidney and liver, *X. laevis* oocytes, raji cells and CHO-cells for transamidase activity. Only microsomes from CHO cells gave an additional weak band which probably corresponds to a GPI-anchored translation product. This band was not seen with the mutant whose signal had been inactivated.

Based on these results attempts were made to show GPI-anchoring activity also in CHO-microsomes solubilized with non-ionic detergents and by that to have an assay system available for the transamidase. Trehalase mutants with and without the N-terminal signal sequence were *in vitro* translated in a wheat germ extract or a reticulocyte lysate system and then used as substrates for the transamidase in detergent solubilized microsomes under a wide range of varied conditions. However, C-terminal processing or GPI-anchoring could not be shown. Possible reasons for this are discussed.