



Doctoral Thesis

Analysis of the proteolytic processing of lactase-phlorizin hydrolase

Author(s):

Zecca, Laura

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001891781> →

Rights / License:

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

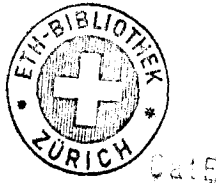
This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH ex. B

Diss. ETH No. 12314

**ANALYSIS OF THE PROTEOLYTIC PROCESSING OF
LACTASE-PHLORIZIN HYDROLASE**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH (ETHZ)
for the degree of
Doctor in Natural Sciences



Presented by

LAURA ZECCA

Diplom in Biology, Milan, Italy
born April 15th, 1968
citizen of Cosio Valtellino, Italy

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. H. Hauser, examiner
Prof. Dr. G. Semenza, co-examiner
Dr. S.M. Gloor, co-examiner

Zurich 1997

Summary

Lactase-phlorizin hydrolase (LPH) is a glycoprotein localized in the brush border membranes of enterocytes. This enzyme digests lactose, the sugar of milk, into its two monosaccharide components, galactose and glucose, which are subsequently absorbed by the intestine. Lactase activity is high at the time of the birth in all mammals, but it declines rapidly after weaning. The factors which lead to decrease in lactase activity have been studied in different species. It is clear that more than one factor is involved in this decline. A decrease of LPH mRNA levels and lower rate of biosynthesis are the most significant, but post-translational factors also play a role.

Lactase is synthesized as a precursor (pre-proLPH is a polypeptide of more than 1900 amino acids) with a large pro region (of about 800 amino acids) which is proteolytically removed to generate the mature LPH. The removal of the pro region is a multi-steps event and it is species specific. The aim of this work has been to analyze the proteolytic processing of proLPH in human and more in particular in rabbit. The characterization of the intermediate forms and the protease(s) involved would provide new information for better understanding the posttranslational processing of LPH. LPH biosynthesis and processing has been well described by analysis in organ culture and CaCo2 cells, a cellular line derived from intestinal tumour metastasis. These studies allowed to describe the intermediate forms, but nothing is known about their role and the proteases which produce them. With this work I tried to answer to the following questions:

- (1) Which proteases are involved in LPH processing?
- (2) Is proLPH processing an intra- or extra-cellular event?
- (3) Which is the importance of the intermediate forms *in vivo* ?

(1) To answer to the first question I followed an indirect approach. I tried to reproduce in a cell culture system the proteolytic processing of proLPH. I used COS7 cells, a cell line which normally do not produce lactase, and I transfected them with the cDNA coding for pre-proLPH. COS7 cells do not process proLPH and represent a good system in which to test exogenous proteolytic activity. By cotransfection in COS7 cells with pre-proLPH cDNA and the cDNAs coding for several proprotein convertases, I found that expression of only few of these cDNAs resulted in the processing of LPH. Among these furin can produce an apparent "mature-like" form in case of human LPH, and an intermediate form similar to that one described *in vivo* in case of rabbit LPH. It appears most probable that furin processes proLPH also *in vivo* and to give support to this hypothesis I analyzed the expression of this enzyme in the intestine. By Northern Blot analysis and *in situ* hybridization I found furin-specific mRNA in rabbit intestine and in particular in the enterocytes, the cells where LPH is synthesized and processed.

(2) Subsequently I tried to localize (intra- and/or extra-cellularly) where the intermediates and the mature form are produced. The N-terminal sequence of mature LPH purified from rats whose intestine was isolated from pancreatic proteases, and the *in vitro* analysis, allowed me to make the following conclusion: the intermediate forms are produced intra-cellularly and the last proteolytic step(s) to mature form is an extra-cellular event.

(3) Finally, using Ltk- cell line, I could produce *in vitro* a processing of rabbit proLPH similar to that one *in vivo* : proLPH → 180-kDa intermediate form → mature form. By single amino acid mutation I inhibited the processing to this intermediate form, but this did not have any effect on the further processing to mature LPH. My results suggest that the intermediate form in rabbit is a dispensable event.

The conclusion I could draw from all my results is that processing of proLPH involves several proteolytic steps in rabbit and most likely in all species analyzed. Although the site within the pro domain varies, intracellular cleavage by furin, or a furin-like protease, occurs. Thereafter, this form is further processed intra-cellularly and/or in the plasma membrane probably involving a combination of other endoproteases, amino peptidases and pancreatic proteases.

Riassunto

La lattasi (lactase-phlorizin hydrolase: LPH) è una glicoproteina presente nell' orletto a spazzola degli enterociti. Questo enzima è responsabile della digestione del lattosio, lo zucchero del latte, nei suoi due componenti monosaccaridici (galattosio e glucosio) che sono quindi assorbiti dall' intestino. La lattasi è presente al momento della nascita nell' intestino di tutti i mammiferi, ma il suo livello diminuisce considerevolmente dopo lo svezzamento. I meccanismi che portano a questa diminuzione di attività sono stati ampiamente analizzati in diverse specie. Ciò che è emerso da un' analisi comparata è che non uno, ma più fattori simultaneamente determinano il declino di questo enzima. Una diminuzione in RNA messaggero e una più lenta biosintesi sono tra i fattori più importanti, ma hanno una certa rilevanza anche fattori post-trancrptionali.

La lattasi è sintetizzata come precursore (pre-proLPH è un polipeptide di più di 1900 aminoacidi) con una larga pro-regione (circa 800 aminoacidi) che viene proteoliticamente rimossa per generare la lattasi matura presente nella membrana degli enterociti. La rimozione della pro-regione avviene in diversi passaggi e sembra essere specie-specifica. Lo scopo del mio lavoro è stato quello di analizzare la maturazione proteolitica della pro-lattasi umana, ma soprattutto di coniglio. Individuare gli stadi intermedi di questa maturazione e le varie proteasi coinvolte contribuirebbe a definire meglio l' intero processo di modificazioni posttranslazionali a cui la pro-lattasi è sottoposta.

La biosintesi e la maturazione della pro-lattasi è stata ampiamente descritta in culture d'organo e in cellule CaCo2, una linea cellulare che deriva da una metastasi di tumore intestinale. Questi studi hanno permesso di individuare i passaggi intermedi, ma poco o niente si sa sul ruolo delle forme intermedie e soprattutto sulle proteasi coinvolte nella maturazione. Col mio lavoro io ho cercato di rispondere alle seguenti domande:

- (1) Quali sono le proteasi coinvolte nella maturazione della pro-lattasi?
- (2) La maturazione della pro-lattasi è un evento intra- o extra-cellulare?
- (3) Quale ruolo hanno le forme intermedie descritte nelle analisi *in vivo* ?

(1) Per rispondere alla prima domanda ho adottato un approccio indiretto. Tramite cultura cellulare ho cercato di riprodurre *in vitro* la maturazione della pro-lattasi. Per fare questo ho utilizzato cellule COS7, una linea cellulare generata da cellule renali di scimmia, che non producono lattasi, e nelle quali ho introdotto tramite trasformazione il cDNA codificante la proteina. COS7 non producono lattasi matura per cui sono un buon modello per testare l' attività di proteasi esogene. Tramite cotrasfezione in COS7 cells di pro-lattasi con proteasi intracellulari sono stata in grado di individuare alcune attività proteolitiche che maturano la pro-lattasi. In particolare modo una di esse, la furina, produce una forma matura, nel caso di lattasi

umana, e una forma intermedia, nel caso di lattasi di coniglio, del tutto simili a quelle descritte *in vivo*. È probabile che la furina sia responsabile della maturazione di pro-lattasi anche *in vivo* e per supportare questa ipotesi ho analizzato l'espressione di questo enzima nell'intestino. Tramite *northern-blot* e *ibridizzazione in situ* ho potuto individuare la presenza di RNA messaggero specifico per la furina nell'intestino e in particolare modo negli enterociti, le cellule dove la pro-lattasi è sintetizzata e maturata.

(2) Successivamente ho cercato di mappare i siti intra- e/o extra-cellulari dove le forme intermedie e la lattasi matura vengono prodotte. La sequenza N-terminale di lattasi matura purificata da ratti il cui intestino era stato isolato da proteasi pancreatiche e le analisi realizzate *in vitro*, mi hanno permesso di verificare che la maturazione di pro-lattasi a forma intermedia è un evento intracellulare mentre l'ultimo (o gli ultimi) passaggi a una forma matura è (sono) extracellulari, sia nell'uomo che nel coniglio e nel ratto.

(3) Come ultimo, utilizzando cellule Ltk⁻, ho potuto riprodurre *in vitro* una maturazione della pro-lattasi di coniglio simile a quella osservata *in vivo*: pro-lattasi → forma intermedia (180 kDa) → forma matura. Tramite mutazione puntiforme ho inibito il passaggio da pro-forma a forma intermedia. Questo blocco sembra non avere nessuna influenza sul trasporto della lattasi all'interno della cellula alla membrana plasmatica e neppure rallenta il successivo taglio proteolitico a forma matura. Questi risultati suggeriscono che in coniglio la forma intermedia è un passaggio dispensabile.

Intermedi di maturazione sono stati descritti sia in coniglio che uomo e ratto, ma se essi abbiano un ruolo nell'acquisizione dell'attività enzimatica e nel traffico intracellulare della proteina è ancora da provare. I dati da me raccolti e discussi hanno portato a formulare la seguente ipotesi: se la pro-regione è necessaria per il corretto "folding" della proteina e il suo trasporto alla membrana plasmatica, la sua rimozione non è determinante. Per questo le modalità con cui la pro-regione viene rimossa non sono stringenti e ogni specie ha adottato la sua propria strategia. Gli intermedi possono aver avuto un'origine "casuale" perché generati semplicemente dalla presenza di determinate proteasi compartimentalizzate con la lattasi durante il suo trasporto alla membrana plasmatica.