

Diss. ETH Nr. 7168

LOKALISIERUNG DES AMINOENDES EINES INTEGRALEN MEMBRANPROTEINS  
DURCH CHEMISCHE MODIFIKATION  
ANWENDUNG AUF DEN SACCHARASE-ISOMALTASE KOMPLEX DES DUENNDARMS

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

R O L F   B U E R G I

dipl. Natw. ETH

geboren am 27. Januar 1953

von Bremgarten (Kt. Aargau)

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. G. Semenza, Referent

Prof. Dr. K. H. Winterhalter, Korreferent

1983

## VII ZUSAMMENFASSUNG

---

Es wurde eine Methode entwickelt, um die Orientierung der N-Termini des Saccharase-Isomaltase-(SI)-Komplexes in der intestinalen Bürstensaummembran von Kaninchen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde ein aminogruppenspezifisches, wenig permeantes Reagenz synthetisiert: 3-Dimethyl-2-(acetimidoxyaethyl)ammonio propansulfonsäure (= DAP).

Dieses Reagenz amidiniert Aminogruppen unter milden Bedingungen. Sein Penetrationsverhalten wurde an der Bürstensaummembran intakter Därme und an Bürstensaummembranvesikeln untersucht. Dazu wurden die Membranen gleichzeitig mit  $^3\text{H}$ -DAP und  $^{14}\text{C}$ -Aethylacetimidat (EAI), einem permeanten Imidat modifiziert. An intakten Därmen wurden extrazelluläre Aminogruppen etwa 12 mal stärker modifiziert als intrazelluläre; an Vesikeln wurden extravesikuläre Aminogruppen jedoch nur 4-5 mal stärker modifiziert als intravesikuläre. Dieser Unterschied wurde darauf zurückgeführt, dass ein Teil der Vesikelpopulation gegenüber DAP durchlässiger ist als die ungestörte Membran und (oder) ein Teil der Membranen als Fragmente vorliegen.

Die Reaktion von DAP mit der Bürstensaummembran führte nur zu einer unvollständigen Amidinierung der Aminotermini des SI-Komplexes. Das Ausmass dieser Reaktion wurde wie folgt bestimmt: Amidinierter SI-Komplex wurde durch Triton X-100 solubilisiert, mittels Immunoprecipitation isoliert und in SDS denaturiert. Freie (nicht amidinierte) Aminogruppen der Polypeptidketten wurden quantitativ mit  $^3\text{H}$ -Dansylchlorid umgesetzt. Saure Hydrolyse ergab  $^3\text{H}$ -Dansylderivate der aminoterminalen Aminosäuren, die mit einem "double labeling"-Verfahren quantifiziert wurden. Es wurde berechnet, dass die N-Termini von Saccharase und von Isomaltase in Vesikeln zu 58% ( $\pm 8\%$  SD; n = 4) beziehungsweise 33% ( $\pm 4\%$  SD; n = 4) amidiniert wurden. Statistisch nicht verschiedene Umsätze wurden erhalten, wenn völlig durchlässige Membranen unter äquivalenten

Bedingungen amidiniert wurden. Vergleichbare Ergebnisse lieferten Experimente an intakten Membranen ganzer Därme und an Proteoliposomen. Basierend auf diesen Resultaten wurde geschlossen, dass beide Aminoenden des SI-Komplexes auf der äusseren, luminalen Seite der Membran lokalisiert sind. Folgerungen für die Biosynthese des Komplexes wurden gezogen.

Mit einem weiteren, neu entwickelten Imidat (GOLEM), das stark negativ geladen und grösser als DAP ist, konnten die N-Termini nur schwach modifiziert werden, was auf sterische und (oder) elektrostatische Einflüsse zurückzuführen ist. In einem Anhang wird gezeigt, dass nahezu alle reaktiven Aminogruppen in Lipiden an der inneren Oberfläche der Bürstensaummembran lokalisiert sind.

## SUMMARY

A method was developed to determine the sidedness of the  $\text{NH}_2$ -termini of sucrase-isomaltase complex in small-intestinal brush border membrane from rabbit. 3-dimethyl-2-(acetimidoxyethyl) ammonio-propanesulfonic acid (DAP), a slightly permeant reagent, was synthesized and evaluated for this purpose.

This reagent readily reacts with amino groups under mild conditions to form amidines. The penetration behavior was investigated on the brush border membrane of intact intestines as well as on brush border membrane vesicles by labeling the membranes simultaneously with  $^3\text{H}$ -DAP and a permeant imidoester,  $^{14}\text{C}$ -ethyl-acetimidate. In intact intestines the external amino groups were labeled 12 times more heavily than internal ones whereas in vesicles the external amino groups were labeled just 2-2.6 times more heavily than internal ones. This difference most probably shows that a part of the vesicle population is leakier for DAP than the undisturbed membrane and/or some of the membranes failed to vesiculate.

The reaction of DAP with the membranes led to a partial amidination of the  $\text{NH}_2$ -termini of the sucrase-isomaltase complex. The extent of these reactions was determined as follows: after solubilization in Triton X-100 the amidinated sucrase-isomaltase complex was isolated by immunoprecipitation and denatured by boiling in SDS. Free (non-amidinated) amino groups of the polypeptide chains were then reacted quantitatively with  $^3\text{H}$ -dansyl-chloride. Acid hydrolysis produced  $^3\text{H}$ -dansyl derivatives of the  $\text{NH}_2$ -terminal amino acids which were quantified by the double labeling approach described. It was calculated that in vesicles the  $\text{NH}_2$ -termini of sucrase and isomaltase were amidinated to the extent of 58% ( $\pm 8\%$  SD;  $n=4$ ) and 33% ( $\pm 4\%$  SD;  $n=4$ ), respectively. Essentially identical figures were obtained when leaky membranes were amidinated under comparable conditions. Similar results

were obtained from experiments with brush border membranes of intact intestines and with proteoliposomes. On the basis of these results it was concluded that both  $\text{NH}_2$ -termini of the sucrase-isomaltase complex are positioned on the outer (luminal) side of the membrane. Possible implications for the biosynthesis of the complex are discussed.

Another newly developed imidate (GOLEM), a reagent more highly charged and of higher molecular weight than DAP, failed to label the  $\text{NH}_2$ -termini of the sucrase-isomaltase complex. Sterical and electrostatical reasons are discussed.

Data on the lipid asymmetry of the brush border membrane are shown in an appendix. Essentially all the reactive lipid amino groups are located on the inner surface of the membrane.