



## Doctoral Thesis

# Further characterization and partial purification of the calcium, magnesium-stimulated adenosine triphosphatase of human erythrocyte membranes

**Author(s):**

Ronner, Peter

**Publication Date:**

1978

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000132818> →

**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 No 6191

FURTHER CHARACTERIZATION AND PARTIAL  
PURIFICATION OF THE CALCIUM, MAGNESIUM-  
STIMULATED ADENOSINE TRIPHOSPHATASE  
OF HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANES.

A DISSERTATION SUBMITTED TO THE  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

PRESENTED BY  
PETER RONNER  
DIPL.NATW.ETH  
BORN 17th DECEMBER, 1951  
CITIZEN OF SCHUEBELBACH / SZ

ACCEPTED ON THE RECOMMENDATION OF  
PROF. E. CARAFOLI, REFEREE  
PROF. H.J. SCHATZMANN, CO-REFEREE

1978

## 6. ABSTRACT

---

The Ca,Mg-ATPase of human erythrocyte membranes was found to have a specific lipid requirement for phosphatidylserine.

The Ca,Mg-ATPase was selectively solubilized by Triton X-100, and its stability could be considerably increased by addition of phospholipids, and of glycerol.

Chromatography of the solubilized Ca,Mg-ATPase on Sepharose 6B yielded a preparation contaminated mainly with the erythrocytes anion carrier.

Preparative isoelectric focusing on a sucrose gradient, of this Sepharose-purified Ca,Mg-ATPase did not allow separation of the ATPase from the anion carrier.

Pronase- or chymotrypsin-treatment of intact erythrocytes degraded the anion carrier to a 65,000 MW fragment. However, this fragment could not be separated from the Ca,Mg-ATPase by chromatography on Sepharose 6B, or by preparative isoelectric focusing, either.

The effect of some analogues of ATP on the Ca,Mg-ATPase was tested in intact membranes. It is concluded, that ATP substituted at its C(8) position and linked to Sepharose 4B, is a promising tool in further purifying the Ca,Mg-ATPase by affinity chromatography.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Lipid-Abhängigkeit der Ca,Mg-ATPase der menschlichen Erythrozyten-Membran wurde untersucht. Der Abbau der Glycerophospholipide mittels Phospholipase A<sub>2</sub> führte zur Inaktivierung des Enzyms. Die beste Reaktivierung wurde durch Zugabe von Phosphatidylserin erzielt, während Phosphatidylcholin und Phosphatidyläthanolamin einen viel kleineren Effekt zeigten.

Ein reproduzierbares Verfahren zur Solubilisierung der Ca,Mg-ATPase und zur Chromatografie in gemischten Detergens / Phospholipid - Mizellen auf Sepharose 6B wurde aus demjenigen von Dieckvoss et al. (Poster No. P 316, FEBS Symposium on the Biochemistry of Membrane Transport, Zurich, 1976) entwickelt.

Die solubilisierete Ca,Mg-ATPase konnte durch Zugabe von Phospholipiden und Glycerin stabilisiert werden.

Der Erythrozyten-Anionencarrier stellte die hauptsächliche Proteinverunreinigung der selektiv solubilisierten und auf Sepharose chromatografierten Ca,Mg-ATPase dar. Der Abbau dieses Proteins zu einem 65 000 MG Fragment durch Pronase- oder Chymotrypsin-Behandlung intakter Erythrozyten erlaubte ebenfalls keine Trennung von der Ca,Mg-ATPase (MG ca. 125 000).

Präparative isoelektrische Fokussierung in Triton X-100 auf einem Saccharose-Gradienten führte weder zur Trennung der Ca,Mg-ATPase vom Anionencarrier, noch von dessen 65 000 MG Fragment.

Analoge des ATP mit einem geöffneten Ribose-Ring, mit  $\beta,\gamma$ -Phosphatgruppen, die durch eine Amino- oder Methylen-

Gruppe (statt eines Sauerstoff-Atoms) verbunden sind, oder mit inverser Orientierung des Adenin-Rings zur Ribose wurden getestet. Daraus kann geschlossen werden, dass von den gegenwärtig erhältlichen Typen von Sepharose - gebundenem ATP, derjenige des am C(8) substituierten ATP für eine Affinitäts-Chromatografie am aussichtsreichsten erscheint.