



Doctoral Thesis

## Structure-function relationships in the purified Ca-2+-pumping ATPase of plasma membranes

**Author(s):**

Zurini, Mauro

**Publication Date:**

1983

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000311555> →

**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. 7452

STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN THE PURIFIED  $\text{Ca}^{2+}$ -PUMPING  
ATPase OF PLASMA MEMBRANES

---

A dissertation submitted to the  
Swiss Federal Institute of Technology Zürich

for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

Presented by

MAURO ZURINI  
Dipl. Natw. ETH  
born March 15th, 1955  
citizen of Tegna, Ticino

Accepted on the recommendation of  
Prof. E. Carafoli, examiner  
Prof. H.J. Schatzmann, co-examiner

1983

## Summary

The purified  $\text{Ca}^{2+}$ -pumping ATPase of erythrocyte plasma membrane has been subjected to a controlled proteolytic treatment with trypsin. The treatment has been previously shown to shift the enzyme from low to high  $\text{Ca}^{2+}$ -affinity in the absence of calmodulin. The proteolytic degradation leads to the fragmentation of the ATPase molecule into a number of products, and to the accumulation of major limit polypeptides of 14,000, 28,000, 33,500, 48,000, and 76,000 dalton. At proteolysis times at which full activation is not yet reached, the presence of two active calmodulin binding polypeptides of 90,000 and 85,000 dalton has been demonstrated. The 90,000 dalton fragment has been purified on calmodulin-Sepharose or on phenothiazine affinity columns. The purified fragment is calmodulin stimutable and actively accumulates  $\text{Ca}^{2+}$  upon reconstitution into liposomes. Further proteolysis of the 90,000 dalton fragment produces the 81-76,000 dalton polypeptides, probably via the calmodulin binding 85,000 dalton fragment. The 81-76,000 dalton fragments are responsible for the calmodulin-insensitive activity which appears as they are produced. These fragments form an acyl-phosphate intermediate and do not bind calmodulin. Stabilization and accumulation of fragments of 85,000 or 81,000 dalton are observed upon digesting the purified ATPase in the presence of calmodulin or  $\text{VO}_4^{3-}/\text{Mg}^{2+}$ , respectively. Activity measurements performed in the presence of calmodulin have revealed that the 81,000 dalton polypeptide is more active than the 85,000 dalton polypeptide, indicating that the 85,000 dalton calmodulin binding polypeptide is probably no longer or only negligibly stimutable by the activator. The 90,000 dalton fragment is on the other hand fully calmodulin sensitive. A sequence of at least 9000 dalton is thus apparently necessary for calmodulin-mediated stimulation of the ATPase. The use of a label specific for hydrophobic regions of proteins has revealed an unusual high hydrophobicity of the 33,500 dalton fragment,

which is thus suggested to contain a portion of the ATPase sequence spanning through the lipid bilayer.

Chymotryptic digestion of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase results mainly in the formation of an active 120,000 dalton polypeptide and of a calmodulin binding fragment of 20,000 dalton. It is thus reasonable to assign to the calmodulin binding region a terminal position in the ATPase molecule. Two different models, which account for the production of the major and some minor tryptic and chymotryptic proteolysis products of the ATPase molecule, are presented.

The purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of heart sarcolemma has also been subjected to trypsin proteolysis. The experiment has revealed the existence of striking similarities between the heart and the erythrocyte enzyme.

The reversal of the ATPase reaction has been studied in the purified erythrocyte ATPase in the absence of a  $\text{Ca}^{2+}$ -gradient. Both the formation of acylphosphate, and the synthesis of ATP, could be demonstrated.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die gereinigte  $\text{Ca}^{2+}$ -transportierende ATPase aus der Plasmamembran von Erythrozyten ist einer milden Trypsinbehandlung unterworfen worden, die das Enzym in der Abwesenheit von Calmodulin stimuliert. Dadurch wird die ATPase von einer niederaffinen zu einer hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Form überführt. Die Trypsin-Spaltung bewirkt die Fragmentierung der ATPase in verschiedene Peptide, die in der Akkumulation einiger Hauptfragmente mit Molekulargewichten von 14000, 28000, 33500, 48000 und 76000 Dalton resultiert. Nach Proteolyse-Zeiten, bei denen die maximale Stimulierung noch nicht erreicht wurde, konnte die Anwesenheit von zwei Calmodulin-bindenden Polypeptiden nachgewiesen werden. Diese Peptidfragmente besitzen ein Molekulargewicht von 90000 und 85000 Dalton. Das 90000 Dalton Fragment konnte einerseits mittels Calmodulin Affinitätschromatographie, andererseits auch mit immobilisierten Phenothiazin Derivaten gereinigt werden. Das gereinigte Fragment ist durch Calmodulin stimulierbar und kann, nach Rekonstitution in Liposomen, aktiv  $\text{Ca}^{2+}$  transportieren. Eine weitere Trypsin-Behandlung dieses Fragmentes produziert Polypeptide von 81-76000 Dalton. Die 81-76000 Dalton Produkte zeigen eine Calmodulin unabhängige ATPase Aktivität. Diese Fragmente bilden in der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  und ATP ein Acyl-phosphat-Zwischenprodukt, und binden kein Calmodulin. Die Anreicherung und die Stabilisierung der Fragmente von 85000 und 81000 Dalton konnten nachgewiesen werden, wenn die Trypsin-Verdauung in der Anwesenheit von Calmodulin oder  $\text{VO}_4^{3-}/\text{Mg}^{2+}$  durchgeführt wurde. Die Messung der ATPase Aktivität in der Anwesenheit von Calmodulin zeigte, dass das 81000 Dalton Fragment aktiver als das 85000 Dalton Polypeptid ist. Dieser Befund zeigt, dass das 85000 Dalton Calmodulin bindende Produkt durch den Aktivator nicht oder nur sehr schwach stimuliert wird. Das 90000 Dalton Fragment ist hingegen vollständig durch Calmodulin stimulierbar. Diese Befunde zeigen, dass eine Sequenz von 9000 Dalton essentiell ist für die Calmodulin abhängige Stimulierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -

ATPase. Die Verwendung eines hydrophoben Labels, der spezifisch für hydrophobe Regionen von Proteinen ist, zeigt, dass das 33500 Dalton Fragment einen ungewöhnlich hohen Grad an Hydrophobizität besitzt. Daher ist zu vermuten, dass ein Teil dieses ATPase Fragments die Zellmembran durchspannt.

Die Chymotrypsin Verdauung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bewirkt die Spaltung des Moleküls in zwei Hauptprodukte von 120000 und 20000 Dalton. Das erste ist voll aktiv und das zweite bindet Calmodulin. Es ist deshalb vernünftig anzunehmen, dass der Calmodulin bindenden Region eine terminale Position im ATPase Molekül zuzuweisen ist. Zwei verschiedene Modelle, die sowohl die Haupt- als auch die Nebenprodukte der Trypsin und Chymotrypsin Verdauung zu erklären versuchen, wurden dargestellt.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase von Rinderherzsarkolemma wurde ebenfalls mit Trypsin verdaut. Der Versuch zeigte das Bestehen von überraschenden Ähnlichkeiten zwischen dem Erythrocyten- und dem Enzym aus Plasmamembranen von Herzzellen.

Die Umkehrung der ATPase Reaktion wurde am Beispiel der Erythrocyten-ATPase studiert. Die Bildung eines Acyl-phosphates aus  $\text{PO}_4^{3-}$  und die Synthese von ATP konnten in der Abwesenheit eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten nachgewiesen werden.