



Doctoral Thesis

## **The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger of the heart sarcolemma reconstitution and partial purification**

**Author(s):**

Soldati, Luciano

**Publication Date:**

1985

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000339058> →

**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 7746

THE  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  EXCHANGER OF THE HEART SARCOLEMMMA:  
RECONSTITUTION AND PARTIAL PURIFICATION

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

PRESENTED BY  
LUCIANO SOLDATI  
EIDG. DIPL. APOTHEKER  
BORN 17<sup>TH</sup> JULY 1956  
CITIZEN OF VERNATE, TICINO

ACCEPTED ON THE RECOMMANDATION OF  
PROF. E. CARAFOLI, EXAMINER  
PROF. G. SEMENZA, CO-EXAMINER

1985

## SUMMARY

1. A computer program was developed to calculate the initial rate of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange activity. The uptake traces were recorded by the computer, and fitted with power-series polynomial equation of 3<sup>rd</sup> or 4<sup>th</sup> order by the least square method. The slope of the initial rate of the exchange was derived from the equation of the fitting polynomial function.
2. The possibility that the two processes which activate the initial rate of the exchange (phosphorylation and controlled proteolysis) share the same target region in the carrier molecule, or that they have an additive effect was investigated. The experiments showed that the second hypothesis is correct.
3. The solubilization-reconstitution method developed in this work led to an enrichment of the carrier protein. The sarcolemmal proteins solubilized with Triton X-100 in presence of phospholipids (asolectin) were reconstituted by removal of the detergent with Amberlite XAD-2 (hydrophobic interactions). A 10-fold increase in the specific activity of the reconstituted  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  was obtained.

The effect of phospholipids on the initial rate of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger was investigated by reconstituting the solubilized proteins with different phospholipid mixtures. It was found that acidic phospholipids (phosphatidylserine or phosphatidylinositol) stimulated the initial rate of the exchange. Phosphatidylserine had a larger stimulation effect than phosphatidylinositol. The role of negative

charges and of calcium binding capacity of the membrane in the stimulation of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange activity is discussed.

4. Several different column chromatography procedures were used in order to further purify the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, however, without satisfactory results.
  
5. Rate zonal centrifugation was utilized as technique for identification of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger protein. The active fractions obtained from the sucrose gradient showed always the presence of a protein having an apparent molecular weight of 33kDa. The correlation between the exchange activity and the amount of each protein present in the fractions indicated that the 33kDa protein might represent the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger of heart sarcolemma.

## RIASSUNTO

1. E' stato sviluppato un programma al calcolatore per il calcolo della velocita' iniziale dell'attivita' dello scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Le tracce di accumulo venivano registrate dal calcolatore ed adattate col metodo dei minimi quadrati con equazioni esponenziali polinomiali di terzo o quarto ordine. Dall'equazione polinomiale calcolata si otteneva poi la pendenza della velocita' iniziale dell'attivita' di scambio.
2. La possibilita' che i due processi di attivazione della velocita' iniziale dello scambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (fosforilazione e proteolisi controllata) abbiano il medesimo sito d'azione nella molecola dello scambiatore, o che abbiano un effetto additivo e' stata studiata sperimentalmente. Gli esperimenti hanno dimostrato che la seconda ipotesi e' quella esatta.
3. Il metodo di solubilizzazione-ricostituzione sviluppato in questa tesi ha portato ad un arricchimento della proteina dello scambiatore. Le proteine del sarcolemma solubilizzate con Triton X-100 in presenza di fosfolipidi (asolettina) sono state ricostituite togliendo il detergente con Amberlite XAD-2 (interazioni idrofobiche). L'attivita' specifica dello scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ricostituito e' stata arricchita 10 volte.

L'effetto dei fosfolipidi sulla velocita' iniziale dello scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e' stato studiato mediante ricostituzione delle proteine solubilizzate con differenti miscele di fosfolipidi. E' stato trovato che i fosfolipidi acidi (fosfatidilserina e fosfatidil-

inositolo) stimolavano la velocità iniziale dello scambio. Fosfatidilserina aveva un effetto attivante maggiore di quello del fosfatidilinositolo. Si è discusso sul ruolo delle cariche negative e della capacità della membrana di legare calcio nel processo di attivazione della velocità dello scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .

4. Sono stati utilizzati, comunque senza risultati soddisfacenti, diversi metodi di cromatografia su colonna per tentare di purificare ulteriormente lo scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .
5. La centrifugazione zonale è stata utilizzata come tecnica per l'identificazione della proteina dello scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Le frazioni attive ottenute dal gradiente di saccarosio contenevano sempre una proteina del peso molecolare apparente di 33kDa. La correlazione tra l'attività di scambio e la quantità di proteine presenti nelle frazioni ha indicato che la proteina di peso molecolare 33kDa dovrebbe rappresentare lo scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  del sarcolemma cardiaco.