



Doctoral Thesis

## Relationship between structural principles and functional properties of the CA-(2+)-binding protein calmodulin

**Author(s):**

Guerini, Danilo

**Publication Date:**

1986

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000409869> →

**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. 8113

REALTIONSHIP BETWEEN STRUCTURAL PRINCIPLES AND FUNCTIONAL  
PROPERTIES OF THE  $Ca^{2+}$ -BINDING PROTEIN CALMODULIN

A dissertation submitted to the Swiss Federal Institute of Technology  
Zurich  
for the degree of  
Doctor in Natural Sciences

Presented by  
DANILO GUERINI  
Dipl. Natw. ETH  
born August 8th, 1959  
citizen of Muralto, Ticino

accepted on the recommendation of  
Prof. E. Carafoli, examiner  
Prof. K. Winterhalter, co-examiner  
Dr. J. Krebs, co-examiner

1986

## SUMMARY

An important conclusion of this work is that calmodulin interacts differently with different targets. This is indicated by the fact that fragments of calmodulin differ in the ability to stimulate the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of erythrocytes and the ciliary guanylate cyclase of *Paramecium*. It has also been shown that chemical modifications produce different effects on the interaction of calmodulin with the cyclic nucleotide phosphodiesterase and with the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of erythrocytes.

A major part of this work has been devoted to the determination of the calmodulin region which interacts with the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Results obtained with calmodulin fragments underline the importance of the third  $\text{Ca}^{2+}$  binding loop (region 78-106) which probably contains the informations allowing calmodulin to interact with the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and stimulate it. Fragment 78-106 itself is incapable to bind to the ATPase, but, once being part of other fragments (fragments 78-148 and 1-106), it stimulates it. Other fragments were purified (fragment 1-77, 1-90 and 107-148) but none showed interaction with the ATPase, with the partial exception of fragment 1-90, which at high concentrations competes weakly with calmodulin. The reduced efficiency by which fragment 78-148 and fragment 1-106 stimulate the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase as compared to the intact calmodulin, indicates the importance of

cooperativity factors between the two halves of the protein.

The  $\text{Ca}^{2+}$  dependent exposure of hydrophobic sites has been demonstrated by using TID, a photoreactive probe that labels membrane spanning regions of proteins. It has been shown that fragments of calmodulin, containing at least two adjacent  $\text{Ca}^{2+}$ -binding sites, are labeled by TID in a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent way, indicating that two or more of these regions are present in calmodulin. The exact determination of the hydrophobic sites has not been possible, but some data support the idea that they encompass large areas of the protein.

Met residues are important for the function of calmodulin, because modification of three of them strongly influences the ability of calmodulin to stimulate the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. The most important effects are related to the oxidation of Met-residues contained in the region 109-144. Modification of basic amino acids also influences the function of calmodulin, but the studies on this point have not yet carried out to great detail.

## ZUSAMMENFASSUNG

Erster wichtige Befund der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung, dass Calmodulin mit verschiedenen Enzymen auf unterschiedliche Art in Wechselwirkung tritt, wie es durch Experimente angedeutet wird, in denen verschiedene Calmodulinfragmente die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase von Erythrocyten und die Guanylat Cyclase von Paramecium unterschiedlich stimulieren. Auch chemische Modifikationen des Calmodulin haben unterschiedliche Wirkung auf die Faehigkeit von Calmodulin die Cyclische Nucleotid Phosphodiesterase und die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase zu stimulieren.

Der groesste Teil unserer Bemuehungen wurde der Ermittlung der Calmodulinregion gewidmet, die mit der ATPase interagiert. Arbeiten mit Calmodulinfragmenten unterstreichen die essentielle Rolle der dritten  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Region (Region 78-106), die sehr wahrscheinlich viele notwendige Informationen enthaelt, um mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Wechselwirkung zu treten und sie zu stimulieren. Das Fragment 78-106 ist allein unfaeig, an die ATPase zu binden, aber wenn es in anderen Fragmenten eingegliedert ist (Fragmente 78-148 und 1-106), kann es die ATPase stimulieren. Andere Fragmente wurden isoliert (Fragmente 1-77, 1-90 und 107-148), aber keines war faehig, mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Wechselwirkung zu treten, mit der Ausnahme vielleicht von Fragment 1-90, das in hohen Konzentrationen eine geringe Competition mit Calmodulin aufwies.

Die stark reduzierte Faehigkeit der Fragmente 78-148 und 1-

106, die ATPase zu stimulieren, zeigt, im Vergleich zum nativen Protein, die Bedeutung der Kooperativitaet zwischen den zwei Haelften des Calmodulin.

Ca<sup>2+</sup>-abhaengige Exposition hydrophober Oberflaechen wurde mit Hilfe von TID demonstriert, einem photoreactiven Reagenz, das verwendet wird, um hydrophobe Regionen von Membran-Proteinen zu markieren. Es wurde gezeigt, dass alle Fragmente von Calmodulin, die zumindest zwei benachbarte Ca<sup>2+</sup>-bindende Loops enthalten, mit TID markiert werden koennen, was auch bedeutet, dass zwei oder mehr hydrophobe Regionen vorhanden sein muessen. Die genaue Lokalisierung der hydrophoben Oberflaechen war nicht moeglich, aber einige Resultate deuten an, dass diese groessere Regionen im Protein darstellen.

Methionin-Seitenketten sind sehr wichtig fuer die Funktion des Calmodulin, weil die Modifikation von drei solchen Resten einen starken Einfluss auf die Faehigkeit von Calmodulin, die Ca<sup>2+</sup>-ATPase zu stimulieren, hat. Dies ist mit der Oxidation von Methionin-Resten in der Calmodulinregion 109-144 verbunden. Modifikationen basischer Aminosaeuren haben auch einen Einfluss auf die biologischen Aktivitaet von Calmodulin, aber dies wurde nicht im Detail untersucht.