



## Doctoral Thesis

# Functional and structural characterization of phospholamban, the regulator protein of the cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase

**Author(s):**

Gasser, Jürg

**Publication Date:**

1987

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000413928> →

**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. 8374

**Functional and Structural  
Characterization of Phospholamban,  
the Regulator Protein of the Cardiac  
Sarcoplasmic Reticulum ATPase**

A dissertation submitted to the  
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY, ZÜRICH**  
for the degree of Doctor in Natural Sciences

presented by

**Jürg Thomas Gasser**  
dipl. Natw. ETH

born 10<sup>th</sup> November, 1958  
citizen of Hallau, SH

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. E. Carafoli, examiner  
Prof. Dr. H. Eppenberger, co-examiner

Zürich 1987

## Zusammenfassung

Die Phosphorylierung von Phospholamban aus Herzmuskel sarkoplasmatischem Retikulum durch die cAMP-abhängige sowie die  $\text{Ca}^{2+}$ - und calmodulin-abhängige Proteinkinase wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Unterschiede im scheinbaren Molekulargewicht der Phospholamban Oligomere aufgrund der Inkorporation von Phosphatgruppen wurde auf hochauflösenden SDS Polyacrylamidgelen analysiert. Parallel dazu wurden phosphorylierte Phospholamban Untereinheiten (Monomere) in einem neu entwickelten analytischen isoelektrischem Fokussierverfahren getrennt. Der isoelektrische Punkt der Phospholamban Monomere war 6.2 nach Phosphorylierung durch die calmodulin abhängige Kinase und 6.4 nach Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase. Doppelte Phosphorylierung der selben Phospholamban Untereinheit bewirkte eine Verschiebung des isoelektrischen Punkts zu einem saureren Wert von 5.2. Durch die kombinierte Analyse der Phosphorylierungsprodukte des Phospholamban Oligomers (Komplex) sowie der Phosphorylierungsprodukte der Phospholambanuntereinheiten wurde eine einfachere Interpretation des komplexen Phosphorylierungsverhaltens möglich, was zu den folgenden Schlussfolgerungen führte:

1) der Phospholamban-Komplex ist aus fünf sehr ähnlichen wenn nicht sogar identischen Untereinheiten zusammengesetzt. Jede dieser Untereinheiten besitzt eine spezifische Phosphorylierungsstelle sowohl für die cAMP-abhängige als auch für die calcium/calmodulin abhängige Protein Kinase.

2) die Phospholamban Population, welche mit der calmodulin-abhängigen Kinase in Wechselwirkung steht, kann durch die cAMP-abhängige Proteinkinase nicht phosphoryliert werden, ausser wenn sie vorgängig bereits durch die calmodulin-abhängige Kinase phosphoryliert worden ist.

Phosphoryliertes Phospholamban beschleunigt die Calciumaufnahme durch SR Vesikel, indem es die SR ATPase stimuliert. Wenn Phospholamban durch hohe Konzentrationen an cAMP-abhängiger Proteinkinase maximal phosphoryliert ist, beobachtete man eine bis zu 5-fache Stimulierung der Calciumaufnahme. Dieser Wert ist beträchtlich höher als die bis anhin gefundenen und publizierten Werte in der Literatur.

Die relative Verteilung der cAMP- und der calmodulin-abhängigen Phospholamban Phosphorylierung in den morphologisch verschiedenen Regionen des SR Membransystems der Herzmuskelzelle wurden ebenfalls untersucht. Die maximale cAMP-abhängige Phosphorylierung wurde in Membranvesikeln des longitudinalen Systems gefunden (2100 pMol Phosphat pro mg SR), während die calmodulin-abhängige Phospholamban Phosphorylierung in den terminalen Cisternen vorherrschte (1250 pMol Phosphat pro mg SR). Parallel dazu war die Stimulierung der Calcium

Aufnahme durch cAMP im Vergleich mit der Stimulierung durch Calmodulin in longitudinalem SR grösser als in terminalen Cisternen und umgekehrt. Diese Ergebnisse führen zur Schlussfolgerung, dass die cAMP- und die calcium/calmodulin-abhängige Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im Herzmuskelreticulum ungleich auf die morphologisch verschiedenen Regionen verteilt ist.

Mit einem neuen, heterobifunktionellen,  $^{125}\text{I}$ -markierten und spaltbaren Reagenz wurde versucht, die calmodulin-abhängige Phospholambankinase im Herzmuskelreticulum zu identifizieren. Dabei wurde ein 80 kilodalton Protein markiert, welches membrangebunden ist und ein bis zwei Moleküle Calmodulin binden kann. Es scheint sich bei diesem Protein um ein SR spezifisches, calmodulin-bindendes Membranprotein zu handeln, welches bis anhin in der Literatur nicht beschrieben worden ist.