

Diss. ETH No 9630

Isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by

FELIX ERNST KESSLER

dipl. sc. nat.
born September 21, 1962
citizen of Zurich

accepted on the recommendation of
Prof. E. Carafoli, examiner
Prof. K. H. Winterhalter, examiner

Zürich 1991

Summary

Part II

The C-terminal regions of the four human plasma membrane pump isoform subtypes 1a, 1b, 1c and 1d result from alternatively spliced RNA. They have been expressed in *E. coli* and the recombinant proteins were purified. The C-termini of isoforms 1a, 1c and 1d contain an insert encoded by the alternatively spliced exon which is homologous to the calmodulin binding domain present in isoform 1b. In isoforms 1c and 1d (29 and 38 amino acid residue insertions, respectively) subdomain A of the original high-affinity calmodulin binding site of isoform 1b is followed by the new domain, which in turn is followed by subdomain B of the original calmodulin binding site. Positive charges of histidine residues at positions 27, 28 and 38 of the alternatively spliced sequence are likely to be responsible for the observed pH-dependent calmodulin binding to the novel binding site. The overall structure of the calmodulin-binding region in the alternatively spliced isoforms resembles that in the gamma subunit of phosphorylase kinase where two noncontiguous calmodulin binding sites are contained within a stretch of 70 amino acids. The affinity of calmodulin for the C-terminal domain of isoforms 1a, 1c and 1d is much higher at pH 5.9 than at pH 7.2. A synthetic peptide containing 31 amino acids of the alternatively spliced sequence (from residue 9 to 40) also binds calmodulin with strong pH-dependency. This peptide inhibits the calpain-truncated Ca^{2+} pump in the same way as the canonical calmodulin binding domain of isoform 1b which is autoinhibitory. However, the inhibition is seen only at acidic but not at neutral pH.

The intact Ca^{2+} -ATPase is affected by peptide I31 in both absence and presence of calmodulin. A role for alternative splicing in creating differentially regulated Ca^{2+} pump isoforms that show pH-dependent properties is suggested.

Part III

A Ca^{2+} pumping ATPase from rat hepatocyte plasma membranes has high Ca^{2+} affinity and properties typical of a P-type ion pump. At variance with the Ca^{2+} pumps of other eukaryotic plasma membranes it is not stimulated by calmodulin. The steady state concentration of the phosphoenzyme formed in the presence of ATP is increased by La^{3+} . The enzyme cross-reacts with a monoclonal antibody (Mab-5F10) raised against the human erythrocyte Ca^{2+} pump and has been purified using a Mab-5F10 antibody affinity column. CNBr digestion of the isolated protein yielded two peptides, the sequenced of one of them matches perfectly a sequence contained in the erythrocyte Ca^{2+} pump. The other is highly homologous to another domain in the erythrocyte pump. Despite of the lack of calmodulin stimulation, ^{125}I -calmodulin overlay experiments on the purified liver ATPase under denaturating conditions have revealed that the enzyme binds calmodulin even more strongly than the erythrocyte pump. Immunocytochemical experiments on liver slices using the Mab-5F10 antibody demonstrate the enzyme predominantly in the blood sinusoidal domain of the hepatocyte plasma membrane.

Zusammenfassung

Teil II

Die C-terminalen Regionen von vier menschlichen Plasmamembran Ca^{2+} -Pumpen, die Isoformen 1a, 1b, 1c und 1d, die von alternativ gespleisster RNA stammen, wurden in *E.coli* exprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden gereinigt. Die C-termini der Isoformen 1a, 1c und 1d enthalten Sequenzen, die von einem alternativ gespleistten Exon kodiert werden. Dieses enthält Homologie zur Calmodulinbindungsstelle der Isoform 1b. In den Isoformen 1c und 1d (Insertionen mit 29 resp. 38 Aminosäuren) folgt auf die Subdomäne A der ursprünglichen Calmodulinbindungsstelle der Isoform 1b eine neue Domäne, auf die die Subdomäne B der ursprünglichen Calmodulinbindungsstelle folgt. Die positiven Ladungen der Histidinreste an den Stellen 27, 28 und 38 der alternativ gespleistten Sequenz dürften für die beobachtete, pH-abhängige Bindung von Calmodulin an die neue Bindungsstelle verantwortlich sein.

Die Gesamtstruktur der Calmodulinbindungsregion gleicht jener der γ -Untereinheit der Phosphorylase Kinase. Diese besteht aus zwei nichtzusammenhängenden calmodulinbindenden Sequenzen innerhalb von 70 Aminosäuren.

Die Calmodulinaffinität der Isoformen 1a, 1c und 1d ist bei pH 5.9 höher als bei pH 7.2. Ein synthetisches Peptid (I31), aus der alternativ gespleistten Sequenz (Reste 9-40), bindet ebenfalls in pH-abhängiger Weise an Calmodulin. Das Peptid hemmt die calpainaktivierte Ca^{2+} -Pumpe in gleicher Weise wie die

calmodulinbindende, autoinhibitorische Sequenz der erythrozytären Ca^{2+} -Pumpe. Das Peptid wirkt nur bei saurem pH (pH 5.9). Die intakte Ca^{2+} -ATPase wird sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Calmodulin vom Peptid I31 beeinflusst. Der alternative Spleissvorgang führt möglicherweise zur Bildung von differentiell, in Abhängigkeit des Säuregrads der Zelle regulierten Isoformen der Ca^{2+} -ATPase.

Teil III

Eine Ca^{2+} -pumpende ATPase aus Plasmamembranen von Rattenhepatocyten hat eine hohe Ca^{2+} -Affinität und Eigenschaften, die für P-Typ Ionenpumpen typisch sind. Im Unterschied zu Plasmamembran Ca^{2+} -Pumpen anderer Gewebe wird sie nicht durch Calmodulin stimuliert. Die Gleichgewichtskonzentration des Phosphoenzyms wird durch La^{3+} erhöht. Das Enzym zeigt eine Kreuzreaktion mit einem monoklonalen Antikörper (MAb-5F10) gegen die erythrozytäre Ca^{2+} -Pumpe des Menschen. Das Enzym wurde auf einer MAb-5F10 Antikörperaffinitätssäule gereinigt. CNBr-Spaltung des isolierten Proteins ergab zwei Peptide, die sequenziert worden sind. Eines ist mit einer Sequenz der erythrozytären Ca^{2+} -ATPase identisch, das andere stark homolog zu einer zweiten Sequenz derselben. Trotz Abwesenheit von Calmodulinstimulation ergaben ^{125}I -Calmodulinbindungsstudien unter denaturierenden Bedingungen eine noch stärkere Bindung an das gereinigte

Zusammenfassung

Leberenzym als an das erythrozytäre. Immunocytochemische Untersuchungen auf Leberschnitten mit dem Antikörper MAb-5F10 zeigen das Enzym hauptsächlich in der sinusoidalen Domäne der Rattenhepatocytenplasmamembran.