



Doctoral Thesis

The human calmodulin gene family and characterization of the calmodulin-like protein

Author(s):

Rhyner, Johannes A.

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001362041> →

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 Nr. 10508

**THE HUMAN CALMODULIN GENE FAMILY
AND CHARACTERIZATION OF THE
CALMODULIN-LIKE PROTEIN**

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

presented by

JOHANNES A. RHYNER

Dipl. Natw. ETH
born 27th September 1964
citizen of Elm, GL

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ernesto Carafoli, examiner
PD Dr. Martin W. Berchtold, co-examiner

Zurich 1994

SUMMARY

The evolutionary conserved calcium binding protein calmodulin (CaM) plays a major role in transmitting intracellular calcium signals to a wide variety of effector systems. At the beginning of this study three different cDNAs were known to encode the same protein in humans. On the gene level only the CALM3 gene, three CALM2 related pseudogenes and an intronless calmodulin-like gene (CALML) were known. Two clones spanning the whole CALM1 gene were isolated from genomic libraries using a polymerase chain reaction (PCR) generated screening probe. The gene consists of six exons spread over a total of about 10 kb of DNA. Its exon-intron organisation is identical to that of CALM3. A cluster of transcriptional start sites was identified 200 bp upstream of the ATG translation start codon, and several putative regulatory elements were found in the 5' flanking region as well as in intron 1. In all tested human tissues, a 1.7 kb mRNA was present at similar levels, whereas a 4.2 kb mRNA species was particularly abundant in brain and skeletal muscle.

In addition, clones for two different CALM1-related pseudogenes CALM1P1 and CALM1P2 were also isolated and characterized. Both pseudogenes are intronless and nonfunctional as judged from the presence of mutations abolishing the open reading frame. Genomic Southern analysis indicates that the human CALM1 gene/pseudogene subfamily comprises at least three but probably no more than four members. The entire CALM family consists of three bona-fide CALM genes, at least one expressed CALML gene as well as at least five pseudogenes.

Using a combined approach of polymerase chain reaction-based amplification of gene specific human DNA in human-hamster hybrid cells, 'in situ' hybridization using CALM gene specific probes and, - for the CALML gene - a Southern blot analysis of human-rodent cell hybrids, the chromosomal assignment and sublocalisation of all four functional human CALM genes has been determined. The three bona fide genes CALM1, CALM2, CALM3 and the intronless CALML, coding for calmodulin and the calmodulin-like protein, have been localized to human chromosomes 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, 19q13.2-q13.3 and 10p13-15, respectively. These data establish the nonlinkage of this human gene family and provide four new markers for chromosomal mapping studies.

The CALML gene encodes a calmodulin-like protein (CLP), which shows 85% identity to bona fide CaM. Its open reading frame was inserted into the bacterial expression vector pGemex-2 and expressed in *E. coli*. The gene product was purified and analysed by biophysical methods. The Ca^{2+} - and Mg^{2+} binding properties and Ca^{2+} - Mg^{2+} antagonism were characterized under physiological conditions. The Ca^{2+} and Mg^{2+} dependent changes in the environment of the unique Tyr138 were monitored by UV difference spectrophotometry and fluorimetry. The presence of a unique Cys26 was used to analyse changes of the thiol reactivity as a function of the Ca^{2+} and Mg^{2+} induced conformation. The data support a model suggesting that binding of Ca^{2+} to the C-terminal domain is directly responsible for Tyr related conformational changes in this domain, for a modification of long range interacting forces between the C- and N-terminal domains and, finally, for the enhancement of the reactivity of the thiol in the N-terminal domain. Subsequent binding of 1 to 2 Ca^{2+} to the N-terminal domain leads to a rearrangement of the Cys environment, thereby strongly reducing its reactivity. The distinct differences of CLP when compared to bona fide CaM indicate that this CaM 'isoform' performs a specialized function distinct from that of bona fide CaM.

To obtain more information on the function of CLP, antibodies against CLP were raised and the tissue distribution was tested by Western blotting. CLP was shown to be present in lung, skeletal muscle, normal and cancerogenic mammary gland and cultured mammary epithelial cells, whereas in cervix and transformed mammary epithelial cells no protein was detected by the antibody. Using biotinylated CLP and a Phe99→Tyr99CLP mutant (which could be iodinated) in an overlay assay, a major 210 kDa Ca^{2+} dependent interacting protein was identified in all tissues tested. Interaction of labeled CLP with this protein could be competed out by CLP, but not by CaM. The 210 kDa polypeptide was resistant to reducing agents and could be extracted by alkaline treatment. Preliminary attempts to purify this 210 kDa protein by a CLP affinity column failed so far, presumably because the native binding- and the target solubility conditions could not be found to date. CLP bound to rabbit muscle myosin and chicken brush border myosin I in a Ca^{2+} -dependent manner, whereas no binding to chicken brain myosin V was detected. These findings indicate that CLP may act as a 'light chain' of a specific myosin-like protein in the human tissues where it is expressed.

ZUSAMMENFASSUNG

Das evolutionär konservierte Kalzium bindende Protein Calmodulin (CaM) ist ein wichtiger Signalübermittler in der Zelle. Zu Beginn dieser Arbeit waren drei menschliche cDNAs bekannt, die für das gleiche Protein kodieren. Auf genomischer Ebene war das CALM3 Gen, drei CALM2-ähnliche Pseudogene und ein intronloses CaM-ähnliches Gen (CALML) sequenziert worden. Mit der Polymerasen Kettenreaktion konnte eine CALM1 Gen-spezifische Probe hergestellt werden. Aus genomischen Bibliotheken wurden zwei Klone isoliert, die das ganze CALM1 Gen enthielten. Das Gen enthielt sechs Exone, die über 10 kb verteilt waren. Die Exon-Intron Organisation war identisch mit derjenigen des CALM3 Gens. Der Transkriptionsstart konnte 200 bp vor dem Startkodon ATG lokalisiert werden und weiter 5'-wärts und im Intron 1 konnten verschiedene mögliche regulatorische Elemente gefunden werden. In allen menschlichen Geweben wurde eine ähnlich grosse Menge von 1.7 kb mRNA und eine speziell in Hirn und Skelettmuskel häufige 4.2 kb mRNA nachgewiesen.

Zusätzlich wurden zwei weitere CALM1-ähnliche Pseudogene gefunden und charakterisiert. Beide Gene sind intronlos und weisen Mutationen auf, die eine Expression eines funktionellen Proteins verunmöglichen. Mit genomischen Southern Blots wurde gezeigt, dass die CALM1 Genfamilie aus drei, aber nicht mehr als vier Genen besteht.

Mit einer Kombination der Polymerase Kettenreaktion an Mensch-Hamster Hybrid DNA, 'in situ' Hybridisierung (und im Falle des CALML Gens mittels eines Southernblots von Mensch-Nager Hybrid DNA) konnte die chromosomale Lokalisation dieser vier Gene bestimmt werden. Die drei bona fide Gene und das CALML Gen konnten den chromosomalen Regionen 14q24-q31, 2p21.1-p21.3, 19q13.2-q13.3 und 10p13-15 zugewiesen werden. Diese Resultate belegen, dass die vier Gene nicht gekoppelt sind und als neue Marker für spätere chromosomale Zuordnungsstudien dienen können.

Das CALML Gen kodiert das Calmodulin-ähnliche Protein (CLP), welches 85% Identität zu 'bona fide' CaM aufweist. Das offene Leseraster wurde in den Expressionsvektor pGemex-2 kloniert und das Protein in *E. coli* exprimiert. CLP wurde gereinigt und biophysikalisch analysiert. Die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Bindungseigenschaften und der Antagonismus zwischen diesen beiden Ionen wurden unter physiologischen Bedingungen untersucht. Mit

UV Differenzspectrophotometrie und Fluoreszenzmessungen wurden die Veränderungen in der Microumgebung des einzigen Tyr138 in Abhängigkeit von Ca^{2+} und Mg^{2+} verfolgt. Die Reaktivitätsveränderungen der Schwefelgruppe am einzigen Cys26 wurden ebenfalls auf ihre Abhängigkeit von Ca^{2+} und Mg^{2+} hin untersucht. Diese Resultate unterstützen das Model, in welchem zuerst ein Ca^{2+} an die C-terminale Domäne des Proteins bindet und dort sowohl direkt die konformationelle Veränderung am Tyr138 auslöst, als auch die weitreichenden Interaktionen verändert, welche zwischen den beiden C- und N-terminalen Domänen bestehen. Die anfängliche Ca^{2+} Bindung in der C-terminalen Domäne scheint auch für die erhöhte Reaktivität der Schwefelgruppe verantwortlich zu sein. Die Bindung weiterer Ca^{2+} Ionen an die N-terminale Domäne führt zu einer Umgestaltung der Schwefelumgebung, welche die Reaktivität stark reduziert. Diese markanten Unterschiede von CLP zu CaM sind ein Hinweis, dass CLP eine CaM 'isoform' darstellt und Funktionen, die verschieden sind von CaM, ausüben könnte.

Um mehr Information über die Funktion von CLP zu erhalten, wurde ein Antikörper gegen CLP hergestellt. In Westernblot Experimenten konnte gezeigt werden, dass CLP in Lunge, Skelettmuskel, normaler und verkrebster Brustdrüse und kultivierten Brustdrüsenzellen vorkommt. In veränderten Brustdrüsenzellen und in Muttermund konnte mit dem Antikörper kein Protein gefunden werden. Mit biotinyliertem CLP und einer CLP Mutante, die iodiniert werden konnte, wurde in Overlay Experimenten eine prominente Proteinbande von 210 kDa Masse gefunden, die Ca^{2+} abhängig mit CLP interagiert. Dieses Protein konnte in allen getesteten Geweben gefunden werden. Die Interaktion des markierten CLP mit dem 210 kDa Protein konnte mit CLP, aber nicht mit CaM, verdrängt werden. Das 210 kDa Polypeptid wird durch Reduktionsmittel nicht aufgetrennt und kann mit alkalischer Extraktion von der Membran gelöst werden. Erste Experimente zur Reinigung dieses Proteins über eine CLP Affinitätssäule brachten keine schlüssigen Resultate, da die Bedingungen für die CLP-Protein Interaktion im nativen Zustand und die Bedingungen, um das 210 kDa Protein in Lösung zu halten, bis jetzt noch nicht gefunden werden konnten. CLP bindet an Hasen Skelettmuskel Myosin II und Hühnerdarmepithel Myosin I, aber nicht an Hühnerhirn Myosin V. Diese Resultate sind Hinweise, dass CLP als leichte Kette eines spezifischen Myosinähnlichen Proteins funktionieren könnte.