



Doctoral Thesis

Overexpression and functional characterisation of three isoforms of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase

Author(s):

Pan, Bin

Publication Date:

1995

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001548882> →

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. 11310

Overexpression and functional characterisation of three isoforms of 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

Bin Pan

B.Sc., M.Sc. (Shanghai Medical University)
born 3th October 1963
in Fuzhou (China)

Accepted on the recommendation of
Prof. E. Carafoli, examiner
Prof. K. H. Winterhalter, co-examiner
Dr. D. Guerini, co-examiner

Zurich 1995

Summary

The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) plays a critical role in extruding Ca^{2+} from the cytosol and terminating the Ca^{2+} signal inside the cells. It has a high affinity for Ca^{2+} and its activity is thought to complement that of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, which has a high capacity but low affinity, in tissues where both proteins are present. The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase is encoded by at least 4 different genes and alternative splicing is responsible for the generation of more isoforms. The PMCA genes 1 and 4 are thought to be the house-keeping genes because their transcripts are ubiquitous whilst the products of gene 2 and 3 are only found in neuronal tissues.

The isoforms hPMCA1CI, hPMCA2AIICI and hPMCA4CI have been overexpressed in the Sf9 cells by the help of the baculovirus expression system. While preparing the full-length cDNA of hPMCA1CI, two "poisonous" sequences were found that were the cause of the instability and the low yield of constructs containing the full-length hPMCA1CI-cDNA in bacteria. In spite of the lower level of expression, the hPMCA1CI protein, together with hPMCA2AIICI and hPMCA4CI, could be purified from Sf9 cell membranes by calmodulin affinity chromatography. The three isoforms had similar Ca^{2+} -dependent ATPase activity which were all stimulated by calmodulin. The hPMCA2AIICI protein showed a much higher calmodulin affinity than that of the two house-keeping isoforms hPMCA1CI and hPMCA4CI. Despite the fact that the hPMCA1CI and hPMCA4CI did not show any great differences in their calmodulin stimulated activity, in overlay experiments calmodulin bound slightly more strongly to hPMCA1CI than to hPMCA4CI. All three isoforms differed in the affinity towards ATP in experiments where the formation of the phosphorylated intermediate was studied. The hPMCA1CI isoform had the highest affinity with a K_m about 0.1 μM . hPMCA1CI was different in one other aspect from the other pumps, at least in the Sf9 cells: it was much less stable and was degraded much faster than hPMCA4CI.

The three isoforms could be phosphorylated *in vitro* by the cAMP-dependent protein kinase but phosphorylated the hPMCA1CI protein was 10 times more than hPMCA4CI and 3 times more than hPMCA2AIICI. *In vivo* phosphorylation was investigated by using forskolin, an activator for adenylyl cyclase and H-89, an specific inhibitor for cAMP-dependent protein kinase.

The phosphorylation experiments indicated that hPMCA1CI might be a substrate for the cAMP-dependent protein kinase under physiological conditions.

Since hPMCA1CI is less stable than the other two isoforms, their proteolytic susceptibility was studied. The three isoforms differ in susceptibility to calpain, a Ca^{2+} -dependent protease. hPMCA1CI was most sensitive, hPMCA2AIICI and hPMCA4CI were proteolyzed more slowly. In addition, they had different patterns of proteolysis. Calpain proteolysis of hPMCA4CI resulted mainly in the loss of the C-terminal calmodulin-binding site. Proteolysis of hPMCA2AIICI was toward the C-terminal end whereby the calmodulin-binding domain was not removed and cutting also occurred near the catalytic site. hPMCA1CI on the other hand yielded no significant intermediate peptides. hPMCA1CI, hPMCA2AIICI and hPMCA4CI were similar in susceptibility to trypsin, indicating that differences seen with calpain were not just unspecific increase in proteolytic susceptibility. These difference might play an important role in the turnover of the three isoforms.

Zusammenfassung

Die Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran (PMCA) spielt eine essentielle Rolle in der Entfernung des Ca^{2+} aus dem Zytosol und in der Beendigung des Ca^{2+} -Signals in den Zellen. Sie besitzt eine grosse Affinität für Ca^{2+} , deshalb ist ihre Aktivität als Ergänzung zum $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zu betrachten. Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher zeigt in Geweben, in denen beide Proteine vorhanden sind, eine hohe Leistung und eine niedrige Ca^{2+} -Affinität. Die Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran ist von mindestens 4 verschiedenen Genen kodiert und alternatives "splicing" führt zur Erzeugung mehrerer Isoformen. Die PMCA-Gene 1 und 4 sind möglicherweise "house-keeping" Gene, da ihre Transkripte überall zu finden sind, während die Produkte der Gene 2 und 3 nur in Nervengewebe nachgewiesen wurden.

hPMCA1CI, hPMCA2AIIICI und hPMCA4CI Ca^{2+} -ATPase wurden mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems in Sf9-Zellen überexprimiert. Bei der Herstellung der vollständigen cDNA's von hPMCA1CI wurden zwei "giftige" Sequenzen gefunden, welche die Ursache für die Instabilität und für die geringe Ausbeute des Konstruktes dieser cDNA's in Bakterien sind. Trotz des geringen Expressionsspiegels konnte das Protein hPMCA1CI, wie auch die Proteine hPMCA2AIIICI und hPMCA4CI, aus Membranen von Sf9-Zellen durch Calmodulin-Chromatographie gereinigt werden. Die drei Isoformen haben ähnliche Ca^{2+} -abhängige Aktivitäten, welche durch Calmodulin stimuliert wurden. Das Protein hPMCA2AIIICI besitzt eine höhere Calmodulin-Affinität als die Proteine der "house-keeping" Isoformen hPMCA1CI und hPMCA4CI. Obwohl PMCA1CI und PMCA4CI geringe Unterschiede in ihren durch Calmodulin stimulierten Aktivitäten zeigen, bindet hPMCA1CI in Overlay-Experimenten Calmodulin stärker als hPMCA4CI. In Experimenten, wo die Bildung phosphorylierter Zwischenprodukte untersucht wird, haben die drei Isoformen unterschiedliche Affinitäten für ATP. Die Isoform hPMCA1CI hat die grösste Affinität (K_m ca. $0.1 \mu\text{M}$). Die hPMCA1CI hat zusätzlich eine geringere Stabilität als andere Pumpen und wird in Sf9-Zellen schneller abgebaut.

Alle drei Isoformen konnten *in vitro* durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert werden. Der Phosphorylierungsspiegel des Proteins hPMCA1CI ist 10x höher als derjenige von hPMCA4CI und 3x

höher als bei hPMCA2AIICI. Die Phosphorylierung *in vivo* wurde unter Verwendung von Forskolin, einem Aktivator der Adenylzyklase, und von H-89, einem spezifischen Hemmstoff der cAMP-abhängige Proteinkinase, untersucht. Die Phosphorylierungsexperimente zeigten, dass hPMCA1CI auch unter physiologischen Bedingungen ein Substrat dieser Kinase ist.

Da hPMCA1CI weniger stabil ist als die beiden anderen Isoformen, wurde ihre proteolytische Empfindlichkeit studiert. Die drei Isoformen wiesen unterschiedliche Empfindlichkeit für Calpain, einer Ca^{2+} -abhängigen Protease, auf. hPMCA1CI wurde durch Calpain schneller verdaut als hPMCA2AIICI und hPMCA4CI. Ausserdem zeigten sie unterschiedliche Proteolysemuster. Die Behandlung der Isoform hPMCA4CI mit Calpain verursacht hauptsächlich den Verlust der C-terminalen Bindungsstelle des Calmodulin, während die Isoform hPMCA2AIICI sowohl in der C-terminalen als auch in der katalytischen Region gespalten wurde wobei die Calmodulin-bindende Region nicht entfernt wurde. hPMCA1CI wurde ohne Bildung signifikanter Zwischenprodukte verdaut. Dabei handelt es sich nicht um eine unspezifische Erhöhung der proteolytischen Aktivität, da die Proteine hPMCA1CI, hPMCA2AIICI und hPMCA4CI ähnliche Empfindlichkeiten gegenüber Trypsin zeigten. Diese Unterschiede könnten eine wichtige Rolle im Turnover der drei Isoformen spielen.