

The calcium path across the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase a study by single amino acid mutations

Doctoral Thesis

Author(s):

Mazza, Alessia Zecca

Publication date:

1999

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-003822194>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 13235

The calcium path across the plasma membrane Ca²⁺-ATPase: a study by single amino acid mutations

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

presented by

ALESSIA ZECCA MAZZA

M.Sc. Università Statale di Milano (Italy)

born April 28, 1970

citizen of Chiesa in Valmalenco (Sondrio), Italy

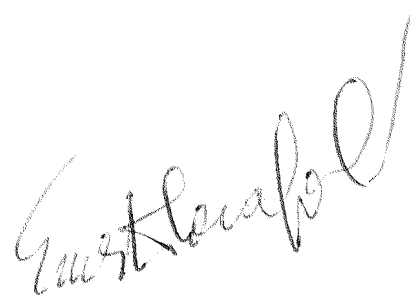
Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Ernesto Carafoli, examiner

PD Dr. Danilo Guerini, co-examiner

Prof. Dr. Ari Helenius, co-examiner

Zurich, 1999



Summary

Calcium is an important second messenger in eukaryotic cells regulating many intracellular processes. This requires mechanisms which enable cells to continuously modify the concentration of calcium in the cytosol, but also in organelles like the endoplasmic reticulum and mitochondria. For this purpose the cells contain a variety of calcium transporters, such as ATP driven pumps, antiporters and calcium-channels. Despite recent advances, still fragmentary information is available on the mechanisms by which these proteins are able to transport calcium ions through biological membranes. The present work has tried to address this topic on an ATP driven pump, the plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA).

The PMCA belongs to the P-type ion transporting ATPases. Another member of this group, which had been extensively investigated in the past, is the endoplasmic (sarcoplasmic) reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA). The comparison of the sequence of the SERCA pump with that of other P-type pumps has revealed the presence of a few highly conserved amino acids in transmembrane domains (TM) 4, 5, 6 and 8. These residues have been shown to be crucial for the Ca^{2+} translocation across the endoplasmic reticulum membrane by the SERCA pump. It was, therefore, surprising that one of these amino acids, the E771, which is located in TM 5 and is highly conserved in P-type pumps, was absent in the PMCA (it is replaced by alanine A854). In addition, the PMCA contains a glutamic acid (E975) in TM 8, which was not found in other P-type pumps. This might be related to the fact that the PMCA pump transports only one calcium ion for each ATP hydrolysed in contrast to the two calcium ions transported by the SERCA pump. In an attempt to explain the differences in the Ca^{2+} transport efficiency between the PMCA and the SERCA pumps, the present work has focused on the amino acids A854 (TM5) and E975 (TM8). Site directed mutagenesis experiments were performed and the properties of the mutated proteins were studied after their expression in COS, HeLa and Sf9 cells. The ability of the PMCA pump to form a phosphoenzyme intermediate was used to screen for active mutants. Kinetic experiments on the phosphoenzyme intermediate stability were performed with the most interesting mutated proteins. The same mutants were purified by affinity chromatography on calmodulin sepharose to study their Ca^{2+} -stimulated ATP hydrolysis. The cellular localization of the mutated pumps was verified by immunocytochemistry on permeabilised COS cells.

When the glutamic acid in TM8 (E975) was replaced by a glutamine or an alanine, the corresponding mutated protein was indistinguishable from the wild type PMCA

pump. In contrast, the substitution of E975 with an aspartic acid led to the retention of the mutant in the endoplasmic reticulum and to the inactivation of the pump. These results indicate that E975 may play an important role in the spatial arrangement of the transmembrane helices, but it is not directly involved in calcium transport.

The replacement of A854 (TM5) with a glutamic acid or by glutamine residue resulted in the retention of the mutants in the endoplasmic reticulum. Surprisingly, these proteins were still active despite their mistargeting. The phosphoenzyme intermediate of the A854-mutated enzymes had a low sensitivity to lanthanum typical of the SERCA pump. The mutant proteins carrying a glutamine instead of A854 had higher Ca^{2+} -cooperativity (Hill's coefficient approximately 2 compared to about 1 for the wild type protein). Finally, the A854E and A854Q mutants showed a reduced dephosphorylation rate of the phosphoenzyme formed from ATP with respect to the wild type pump. This effect was due to an impairment of the catalytic cycle, in particular to a decrease of the interconversion rate between the phosphoenzyme intermediates E_1P and E_2P . The substitution of A854 with an aspartic acid also caused retention of the PMCA in the endoplasmic reticulum but, in this case, the protein was inactive.

The results suggest that insertion of the proper amino acid at position 854 may confer to the PMCA properties typical of the SERCA pump (lanthanum effect, and retention in the ER) and even higher calcium binding capacity. The efficiency of the catalytic reaction of the mutants could probably be increased by inserting some additional mutations in the transmembrane domain of the PMCA.

Riassunto

Il calcio è un importante messaggero secondario nelle cellule eucariotiche e regola molti dei processi intracellulari. Per questo è necessaria la presenza nelle cellule di meccanismi che permettono di modificare continuamente la sua concentrazione non solo nel citoplasma, ma anche negli organelli intracellulari come il reticolo endoplasmatico e il mitocondrio. Per questo scopo le cellule hanno sviluppato un elaborato sistema di proteine in grado di trasportare il calcio, come le pompe Ca^{2+} ATPasi, gli antiporti e i canali del calcio. Nonostante recenti sviluppi, le conoscenze sui meccanismi di trasporto del calcio attraverso le membrane biologiche sono solo frammentarie. Questa tesi rappresenta un approfondimento di questa tematica per il caso di una particolare Ca^{2+} ATPase: la Ca^{2+} ATPase della plasma membrana (PMCA).

La PMCA fa parte del gruppo delle "P-type" ATPase per il trasporto di ioni. La Ca^{2+} ATPase del reticolo endo-sarcoplasmatico (SERCA) è un'altra ATPase del gruppo "P-type", ed è stata studiata nel passato in modo alquanto approfondito. Un confronto delle sequenze della SERCA con quelle di altre pompe "P-type" mostra come alcuni aminoacidi dei domini delle transmembrane (TM) 4, 5, 6 e 8 siano marcatamente conservati. Questi residui sembrano essere fondamentali per il meccanismo di trasporto. Per questo risulta sorprendente l'assenza di uno di questi (E771, TM5) nella PMCA (l'alanina A854 è presente al suo posto). Inoltre l'acido glutamico E975 presente nella TM8 della PMCA non è presente nelle altre pompe "P-type". Il lavoro presentato in questa tesi si è focalizzato su questi due aminoacidi (A854, E975) e sulla possibilità che essi contribuiscano alle differenze nei meccanismi di trasporto del calcio tra la SERCA e la PMCA. Proteine con singole mutazioni di aminoacidi sono state espresse in cellule COS, HeLa e Sf9 e le loro caratteristiche sono state studiate. L'attività delle proteine è stata verificata tramite dei test sulla formazione del fosfoenzima. Le proteine con le mutazioni più interessanti sono state analizzate con esperimenti di cinetica e, dopo essere state purificate, la loro capacità di idrolizzare l'ATP in dipendenza dalla concentrazione di calcio è stata misurata. Esperimenti di immunocitochimica su cellule COS permeabilizzate sono stati fatti per determinare la localizzazione delle proteine mutate nella cellula.

La mutazione dell'acido glutamico E975 del TM8 in una glutamina o alanina non ha portato a sostanziali modifiche rispetto alle proprietà della PMCA non mutata. Al contrario, la sostituzione dell'E975 con un acido aspartico è risultata nella ritenzione

della proteina nel reticolo endoplasmatico (ER) e nella sua inattivazione. Questi risultati suggeriscono che l'E975 possa rivestire un ruolo importante nell'arrangiamento spaziale delle eliche di transmembrana, ma non è direttamente coinvolto nel trasporto del calcio.

La sostituzione dell'alanina A851 (TM5) con un acido glutamico o una glutamina porta alla ritenzione delle proteine nell'ER, ma ciò nonostante esse sono ancora attive. Il fosfoenzima formato da queste proteine mostra una scarsa sensibilità al lantanio, tipica della SERCA. Inoltre le proteine nelle quali l'aminoacido A851 è stato sostituito con una glutamina mostrano una maggiore cooperatività con il calcio (il coefficiente di Hill è circa di 2 rispetto a 1 della PMCA non mutata). Infine, le mutanti A854E e A854Q posseggono una ridotta velocità di defosforilazione del fosfoenzima formato da ATP rispetto alla proteina non mutata. Questo è probabilmente dovuto ad una diminuzione della velocità di conversione tra le due forme di fosfoenzima E_1P e E_2P . La sostituzione dell'aminoacido A854 con un acido aspartico causa la ritenzione della proteina nel ER, ma in questo caso la proteina è inattiva.

In conclusione, i risultati suggeriscono che l'inserimento di un appropriato aminoacido nella posizione A854 possa conferire alla PMCA proprietà tipiche della pompa SERCA (effetto del lantanio e ritenzione nell'ER) e persino una più alta capacità di legare calcio. L'efficienza della reazione catalitica delle proteine mutate potrebbe probabilmente essere aumentata inserendo aminoacidi addizionali nel dominio TM della PMCA.