

Diss. ETH No.13101

Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms

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

presented by

Lei Li

B.Sc.Biol.Engineering
Shanghai University of Science and Technology
Shanghai, China

born November 14, 1967
from Suzhou, China

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Ernesto Carafoli, examiner
Prof. Dr. Ari Helenius, coexaminer
PD Dr. Danilo Guerini, coexaminer

Zürich 1999

Summary

The plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger plays an important role in the intracellular Ca^{2+} homeostasis, especially in excitable cells, e.g. heart and neurons. Both the cloning of canine cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in 1990 (later on referred to as NCXI), and the development of the "giant patch" technique for measuring exchanger currents have accelerated our understanding of the function and the regulation of the exchanger. NCXI was found to undergo extensive tissue-specific alternative splicing, but little information is available on the functional role of splicing variants, and on how the splicing variants change during the development. The cloning of additional two exchanger genes, namely NCXII, and NCXIII has raised a new question: why are three exchanger genes needed?

Cultured cerebellar granule cells and cerebellar extracts were used in this thesis to address the questions mentioned above. Isoform specific oligonucleotides, DNA probes and NCXI-, NCXII- specific antibodies were generated. Western blot, Northern blot and RT-PCR analysis demonstrated that all the three NCX transcripts were present in cerebellum and in granule cells. Furthermore, the amount of both NCXI and NCXII protein increased during the development of the cerebellum (from 3 to 21 days), and in the granule cells cultured *in vitro* (from 2 to 7 days).

25 mM KCl was used to chronically depolarize the granule cells (which had been previously shown to lead to the sustained increase of cytosolic Ca^{2+} -concentration). The expression of the three NCX genes was sensitive to depolarization of the plasma membrane of the cell: both NCXI and NCXIII were slightly up-regulated, while NCXII was down-regulated. Kinetic analysis showed that the down-regulation of NCXII was an extremely fast process and did not need *de novo* protein synthesis. The content of NCXI splicing variants in granule cells underwent a switch upon depolarization and during development. Isoforms ACDEF, ACDF or ADEF were present only at the early stages of development; in contrast, the amount of isoforms AD and ADF increased with the development.

Increasing intracellular Ca^{2+} concentration by activating L-type Ca^{2+} -channels showed that Ca^{2+} influx from the plasma membrane indeed significantly down-regulated NCXII expression, but did not influence the expression of NCXI. This suggested that the depolarization induced intracellular Ca^{2+} increase directly controlled NCXII expression. To unravel the Ca^{2+} signal mediator(s) granule cells were treated with immunosuppressant drugs FK506, cyclosporin A and rapamycin. The results supported that calcineurin played an important role in Ca^{2+} controlled NCXII expression.

In order to investigate the relative importance of these three NCX exchangers in granule cells, the exchanger activity was measured. It turned out that NCXII contributed to the total $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger activity of the granule cells by 30-40% .

These data indicate that the three NCX genes are subjected to different regulation at their transcriptional levels. The observation that depolarization and development greatly affect the composition of NCX isoforms in neurons, may shed light on an involvement of NCX isoforms in neuronal signalling.

Zusammenfassung

Der Plasmamembran $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchanger spielt eine wichtige Rolle in der intrazellulären Ca^{2+} Homöostase, im besonderen in erregbaren Zellen (Herz, Nervensystem). Die Klonierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchangers aus Herzzellen des Hundes im Jahre 1990 (später bezeichnet als NCXI) und die Entwicklung der "giant patch" Technik zur Bestimmung des Exchangerflusses haben wesentlich zum verbesserten Verständnis der Funktion und Regulation des Exchangers beigetragen. Es wurde festgestellt, dass NCXI extensivem alternativem Splicing unterworfen ist. Ueber die funktionelle Rolle der Splicingformen und über die Aenderung ihrer Expression während der Entwicklung sind jedoch nur beschränkt Informationen vorhanden. Die Klonierung zweier weiterer Exchanger Gene, NCXII und NCXIII, hat eine neue Frage aufgeworfen: Warum sind drei Exchanger Gene notwendig?

Gereinigte Kleinhirn Körnerzellneurone und ganze Kleinhirnextrakte wurden während der Doktorarbeit gebraucht, um diese Frage zu beantworten. Im folgenden wurden isoform-spezifische Oligonukleotide, DNA-Proben und NCXI- bzw. NCXII-spezifische Antikörper hergestellt. Western Blot, Northern Blot und RT-PCR Analysen zeigten, dass alle drei NCX-Transkripte im Kleinhirn und in Körnerzellen vorhanden sind. Desweiteren wurde festgestellt, dass die Menge an NCXI und NCXII Proteinen während der Entwicklung des Kleinhirns (von 3 bis 21 Tage) und in Körnerzellen (von 2 bis 7 Tagen) ansteigt.

Körnerzellen wurden dann in 25 mM KCl depolarisiert, da dies, wie bereits früher gezeigt wurde, eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration bewirkt hatte. Die Expression aller drei NCX Gene veränderte sich aufgrund der Depolarisierung der Zellplasmamembran: Sowohl die Expression von NCXI als auch die von NCXIII wurde leicht hochreguliert, während jene von NCXII herunterreguliert wurde. Die kinetische Analyse zeigte eine aussergewöhnlich schnelle Herunterregulierung der NCXII Expression, die keine *de novo* Proteinsynthese benötigte. Infolge der Depolarisierung und während der Entwicklung fand innerhalb der Expression der Splicingformen ein Wechsel statt. So waren zu Beginn der Entwicklung die Isoformen ACDEF, ACDF oder ADEF vorherrschend, während die Menge der Isoformen AD und ADF im Verlauf

der Entwicklung zunahm. Experimente zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration durch Aktivierung der L-Typ Ca^{2+} Kanäle zeigten, dass das Eindringen von Ca^{2+} über die Plasmamembran in der Tat die NCXII Expression beträchtlich stimulierte, im Gegensatz dazu aber bei NCXI wirkungslos war. Dies lässt vermuten, dass das durch die Depolarisation eingeströmte Ca^{2+} unmittelbar die Expression von NCXII kontrolliert. Es wurden daher Anstrengungen unternommen, die Signalrolle von Ca^{2+} mit Immunsuppressoren wie FK506, Cyclosporin A und Rapamycin weiter zu untersuchen. Alle angefallenen Resulte deuteten daraufhin, dass Calcineurin an der Ca^{2+} kontrollierten Expression von NCXII beteiligt ist.

Zur Abklärung der relativen Wichtigkeit der drei NCX Exchanger in Körnerzellen wurde die Exchangeraktivität in Ca^{2+} Aufnahmeexperimenten gemessen. Es stellte sich heraus, dass die Isoform NCXII in Granulazellen für 30-40% der Exchangeraktivität verantwortlich ist.

Insgesamt deuten die Daten in dieser Arbeit darauf hin, dass die Expression der drei NCX Exchanger unterschiedlich und komplex reguliert ist. Die Entdeckung des Isoformenwechsels von NCXI infolge Depolarisierung und während der Entwicklung könnte dazu beitragen, die Rolle der Exchangerisoformen in Signalprozessen von Neuronen weiter zu verstehen.