

1. Juni 1993

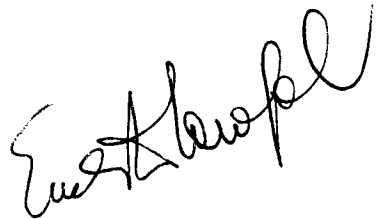
Diss. ETH No. 10054

Ca²⁺ and Calmodulin in the cell nucleus:
A study of the mechanism of nuclear import
of Calmodulin and of a novel Ca²⁺-inhibited
nuclear ATPase

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

presented by

MARTIN N. PRUSCHY
dipl. Natw. ETH
born 21st April 1962



Accepted on the recommendation of
Prof. E. Carafoli, examiner
Prof. H. Eppenberger, co-examiner

SUMMARY

The process of Calmodulin nuclear import is described in the first part of this thesis. Calmodulin is located in both the cytoplasm and nucleoplasm. Whereas the cytosolic functions of Calmodulin have been extensively investigated, its nuclear role is not yet well understood. It has been implicated in DNA-replication, DNA-repair, nuclear envelope breakdown and a nuclear motility system. Its intranuclear concentration increases two to threefold at the G1/S-boundary of the cell cycle.

According to current evidence the nuclear import mechanism of functional pure nuclear proteins plays an important role in the regulation of intranuclear processes. Karyophiles are actively imported into the nucleus based on a signal mediated transport mechanism. Even small nuclear proteins like Histone H1 which would be small enough for passive diffusion through the large nuclear pore complex do not passively diffuse but are transported through a facilitated pathway, similar to the uptake mechanism of larger karyophiles. However, small non-nuclear proteins diffuse passively through the nuclear pore complex.

Based on these findings, it was of interest to investigate the nuclear uptake mechanism of CaM which represents not only an important mediator of the second messenger Ca^{2+} , but is also a member of a class of small proteins, that are distributed both in the cytoplasm and in the nucleoplasm.

Nuclear uptake of Calmodulin following microinjection into PtK1-cells was inhibited by coinjection of wheat germ agglutinin (WGA) and also by prechilling the cells. The lectin WGA is known to inhibit nuclear pore complex mediated translocation of karyophiles by binding to nucleoporins. WGA does not hinder the passive diffusion of small non-nuclear proteins like the trypsin inhibitor. Studies with a permeabilized cell system revealed the involvement of a cytoplasmic proteinaceous factor in the facilitated nuclear uptake mechanism of Calmodulin, which could be presumably saturated by excess calmodulin resulting in passive diffusion of Calmodulin into the nucleus. Surprisingly, the import of Calmodulin was not inhibited by ATP-depletion as is the case for the transport of karyophiles containing a nuclear localisation signal.

Import studies with calmodulin related polypeptides indicated that the import of Calmodulin by a facilitated diffusion process is determined by its global conformation rather than by a short discrete signal motif.

In conclusion, nuclear Calmodulin import was found to be by a facilitated diffusion mechanism although the process does not appear to be an active transport mechanism.

In the second part of this thesis, a novel nuclear ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* has been identified. This ATPase displays all features of a P-type ion transporting ATPase: Its molecular weight of 130 kDa is in the range of known P-type-ATPases, and it forms a phosphoenzyme which is inhibited by micromolar concentrations of vanadate and lanthanum, and is hydrolysed by hydroxylamine. Rapid turnover of the phosphorylated intermediate has been demonstrated by chase experiments. The ATPase-activity was not influenced by common inhibitors of other ATPase-types. However, the nature of the transported compound (if any) has not been elucidated.

The only other P-type ion-transporting ATPase investigated on the protein level in yeast is the plasma membrane H⁺-ATPase, which represents the actual pacemaker of this unicellular eukaryote. Two other genes presumably encoding P-type-ATPases have been cloned: research on ion-transporting P-type-ATPase in yeast which is not yet very developed could provide important comparative results.

Surprisingly, this ATPase, which is an intrinsic membranous protein, is inhibited selectively by submicromolar Ca²⁺-concentrations. Both the phosphoenzyme formation and the phosphate release were half maximally inhibited at [Ca²⁺]_{free} = 0.6-0.7 μM. Ca²⁺ has long been thought not to be an essential nutrient for yeast, though increasing amounts of data reveal its importance during the cell cycle and in the mating pheromone response pathway of *S.cerevisiae*. Thus the Ca²⁺ sensitivity of the novel ATPase may have functional significance.

ZUSAMMENFASSUNG

Der erste Teil dieser Studien befasst sich mit dem Aufnahmeprozess von Calmodulin in den Zellkern. Calmodulin gehört zu einer Gruppe von Proteinen, welche sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma der Zelle vorhanden ist. Die zytoplasmatischen Funktionen von Calmodulin sind auf breiter Ebene untersucht, über die Aufgabe von Calmodulin im Zellkern ist hingegen erst wenig bekannt: Calmodulin scheint bei verschiedenen Prozessen wie DNS-Replikation, DNS-Reparatur, Kernmembranabbau und einem nuklearen Motilitätssystem beteiligt zu sein. Die intranukleare Calmodulin Konzentration erhöht sich um einen Faktor 2-3 spezifisch am Uebergang G1/S während des Zellzyklus.

Intranukleare Prozesse können durch die kontrollierte Aufnahme von Proteinen durch die Porenkomplexe der Kernhülle reguliert werden. Dies lässt sich besonders schön am Beispiel der Histon-Proteine veranschaulichen, die rein aufgrund ihrer Grösse durch die Kernporen frei ins Innere des Kernes hineindiffundieren könnten, deren Transport jedoch über einen aktiven Rezeptor-gekoppelten Aufnahmeprozesses analog zu grösseren nuklearen Proteinen verläuft. Kleine nicht-nukleare Proteine können jedoch passiv ins Kerninnere hineindiffundieren.

Die Untersuchung des Aufnahmeprozesses von Calmodulin ist insofern von Interesse, da es verschiedene Eigenschaften in sich vereint hat: Es ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleoplasma funktionell vorhanden und könnte rein aufgrund seiner Grösse durch die Kernpore hineindiffundieren.

Mikroinjektion von Calmodulin in PtK1-Kulturzellen stellte die Methode der Wahl zur Untersuchung dieses Prozesses dar. Es konnte gezeigt werden, dass das Lektin Weizenkeim-Agglutinin, welches spezifisch an Proteine der Kernporen bindet und dadurch die Aufnahme von nuklearen Proteinen hemmt, ebenfalls den Transport von Calmodulin ins Kerninnere inhibiert, jedoch nicht die passive Diffusion kleiner nicht-nuklearer Proteine beeinflusst. Das gleiche Muster konnte festgestellt werden, nachdem die in den Zellen vorhandenen Enzym-Aktivitäten durch Vor-Inkubation bei 4°C erniedrigt wurden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass cytoplasmatische Faktoren ebenfalls im Aufnahmeprozesse von Calmodulin involviert sind. Umsomehr erstaunlich ist jedoch, dass keine Energie in Form von ATP für den Transport von Calmodulin ins

Kerninnere von Nöten ist, dies jedoch für den Transport von Proteinen, welche eine Kern-Signalsequenz aufweisen, unablässlich ist.

Vergleichende Studien mit Calmodulin-verwandten Polypeptiden, weisen darauf hin, dass nicht eine spezifische Signal-Sequenz sondern die globale Struktur von Calmodulin für dessen gerichtete Aufnahme verantwortlich ist.

Die Aufnahme von Calmodulin in den Kern unterliegt daher nicht einem aktiven Transport Mechanismus, basiert jedoch auf einem Rezeptor gekoppelten erleichterten Diffusionsmechanismus.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit einer neu identifizierten ATPase aus dem Kern der Hefe *Saccaromyces cerevisiae*. Diese ATPase lässt sich aufgrund der untersuchten Eigenschaften zur Gruppe der P-Typ-Ionentransportierender ATPasen einteilen: Sie besitzt ein Molekulargewicht von 130kD., die Bildung des Phosphoenzymes wird durch mikromolare Konzentrationen von Vanadat und Lanthan gehemmt, das Phosphoenzym ist äusserst Hydroxylamin-sensitive und wird sehr schnell umgesetzt. Das zu transportierende Substrat konnte jedoch nicht identifiziert werden.

Nur eine weitere P-Typ-ATPase wurde bis anhin auf Proteinebene in Hefe untersucht, die H⁺-ATPase, welche den eigentlichen Schrittmacher dieses Einzellers darstellt. Zwei weitere Hefe-Gene, welche hohe Homologien zu anderen P-Type-ATPasen aufzeigen, wurden kürzlich kloniert. Dies zeigt auf, dass das Studium von P-Typ-ATPasen in Hefe noch nicht weit entwickelt ist, jedoch äusserst interessant für die vergleichende Forschung sein könnte.

Die untersuchte kernmembranäre ATPase, zeigt eine interessante Eigenschaft auf: Sowohl die Bildung des Phosphoenzymes als auch die eigentliche ATP-spaltendene Aktivität wird durch submikromolare Kalziumkonzentrationen (IC₅₀=0.6-0.7µM) gehemmt. Nachdem für lange Zeit angenommen wurde, dass der Hefe-Metabolismus nicht auf Kalzium angewiesen ist, zeigt sich je länger umso mehr, dass Kalzium auch in Hefe von essentieller Bedeutung ist, insbesondere für die Zellzykluskontrolle. Diese Tatsache impliziert eine mögliche, funktionale Bedeutung dieser Kalzium-Spezifität der neu-entdeckten nuklearen ATPase.