

SŁAWOMIR PIKUŁA

Zakład Biochemii Komórki

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, Warszawa

E-mail: slawek@nencki.gov.pl

PODWÓJNE OBLICZE Ca^{2+} -ATPazy

UDZIAŁ Ca^{2+} -ATPaz W HOMEOSTAZIE WAPNIA W KOMÓRCIE

Jony wapnia pełnią w komórce funkcję pierwotnych i wtórnych przekaźników informacji w takich procesach, jak skurcz komórki mięśniowej i wydzielanie przekaźników nerwowych w synapsach (GROVER i KHAN 1992, BERRIDGE 1995, BARAŃSKA 1997). Zjawisko przekazywania informacji osiąga najwyższy stopień komplikacji w komórkach nerwowych, w których jony wapnia biorą także udział w kontroli pobudliwości komórkowej i w transporcie aksonalnym (BENNETT 1997, GODA i SÜDHOF 1997). Dlatego zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i ich precyzyjna kontrola, szczególnie w komórkach nerwowych, są bardzo ważne dla podtrzymania procesów życiowych organizmu. W homeostazie wapnia biorą udział cztery grupy białek: kanały wapniowe, białka wiążące Ca^{2+} , wymiennicze jonowe oraz Ca^{2+} -ATPazy, enzymy nazywane również pompami jonowymi (MØLLER i współaut. 1996), transportujące Ca^{2+} kosztem energii powstającej w wyniku reakcji hydrolizy ATP (rys. 1, tab. 1). Wymienione grupy białek charakteryzują się określoną, specyficzną lokalizacją w komórce, dzięki czemu białka te mogą wpływać na lokalne zmiany stężenia Ca^{2+} (NICHOLLS i współaut. 1992, ANGER i współaut. 1994, FOLLETTI i współaut. 1995, WU i współaut. 1995,

CARAFOLI i współaut. 1996, STAUFFER i współaut. 1997).

Jony wapnia, napływające do cytoplazmy przez kanały wapniowe, zlokalizowane w błonie plazmatycznej, są usuwane na zewnątrz dzięki aktywności zależnej od kalmoduliny Ca^{2+} -ATPazy i wymiennicza $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ lub są kumulowane w wyspecjalizowanych przedziałach błon retikulum endo(sarko)plazmatycznego (ER/SR) w wyniku działania Ca^{2+} -ATPazy, niezależnej od kalmoduliny. Enzym ten transportuje jony wapnia, działa wbrew gradientowi stężeń Ca^{2+} i powoduje kumulację kationu w błonach ER, tak że stężenie Ca^{2+} we wnętrzu tych błon może wzrosnąć 10 000-krotnie (CARAFOLI 1994, MARTONOSI 1995, 1996, STOKES 1997). Inne organelle komórkowe: jądro, endosomy, lizosomy, mitochondria i błony aparatu Golgiego są również zdolne do magazynowania Ca^{2+} , ale ich udział w regulacji homeostazy wapnia w komórce jest niewielki. Jony wapnia są uwalniane z wewnątrzkomórkowych magazynów, takich jak błony ER(SR), przez inny rodzaj kanałów wapniowych niż te, zlokalizowane w błonie plazmatycznej. Dzięki kanałom błon ER(SR) dochodzi do powstawania gwałtownych wyrzutów Ca^{2+} do cytoplazmy, oscylacji i fal wapniowych (MA-

Tabela 1. Typy białek błonowych biorących udział w transporcie jonów

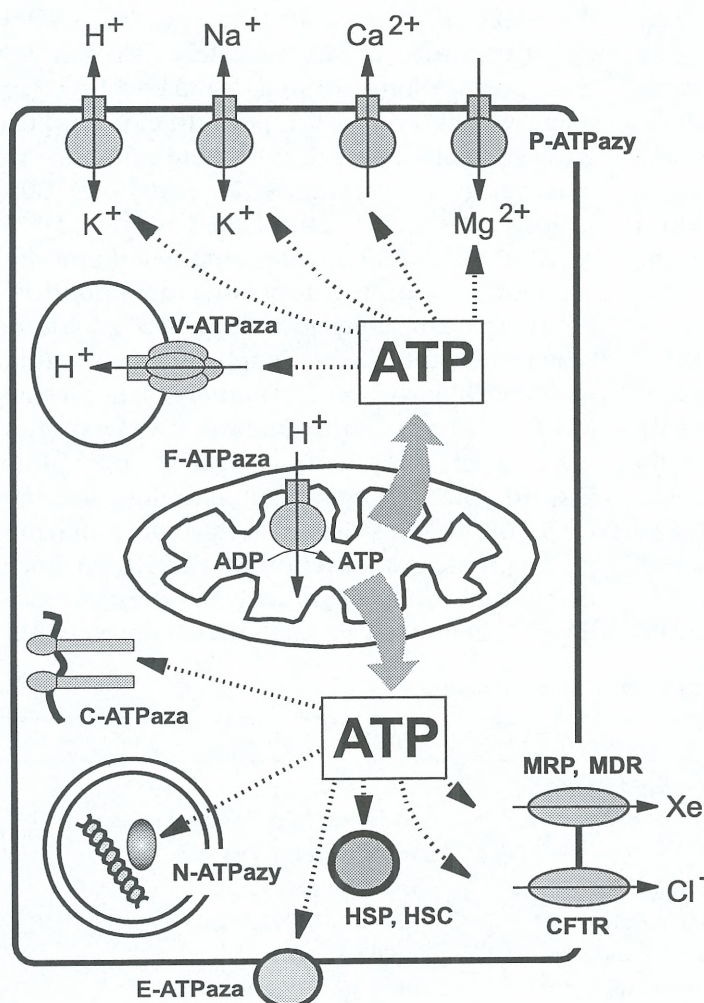
Typ	Funkcje	Reakcje chemiczne
I — kanały	transport jonów (egzoergiczny)	nie występują
II — enzymy (faza wodna)	transport jonów (endoergiczny)	hydroliza ATP, dekarboksylacja, transhydrogenacja
III — kompleksy transportu elektronów	transport ładunków, powiązanie procesów oksydoredukcyjnych	redukcja QH_2 -c, fotoredukcja H_2O -Q i c-Q
IV — systemy foto/redoks	transport jonów, powiązanie procesów oksydoredukcyjnych	redukcja NADH-Q, oksydacja cytochromu c

KOWSKA i DUSZYŃSKI 1996). Pompy wapniowe, zlokalizowane w błonach przedziałów wewnątrzkomórkowych oraz w błonie plazmatycznej, przywracają następnie niski spoczynkowy poziom Ca^{2+} w cytoplazmie komórek. W stanie normy enzymy te są niezawodne, o czym świadczy fakt, że wzrost stężenia Ca^{2+} w cytosolu jest sygnałem programowanej śmierci komórek, uruchamiającym mechanizmy apoptozy (STAUFFER i współaut. 1997).

Ca^{2+} -ATPazy zlokalizowane w błonie plazmatycznej, są kodowane przez cztery geny: *PMCA1*, *PMCA2*, *PMCA3* i *PMCA4*, a w błonach wewnątrzkomórkowych przez trzy: *SERCA1*, *SERCA2* i *SERCA3* (GROVER i KHAN 1992, WU i współaut. 1995). Proces różnicowego składania (ang. alternative splicing) RNA prowadzi dodatkowo do zwiększenia liczby izoform enzymu (GROVER i KHAN 1992, CARAFOLI 1994, CARAFOLI i STAUFFER 1994). W przypadku ATPazy PMCA zjawisko różnicowego składania pierwotnego transkryptu zachodzi w trzech różnych miejscach (CARAFOLI 1994).

Wszystkie Ca^{2+} -ATPazy oscylują między dwoma podstawowymi stanami konformacyj-

nymi, różniącymi się powinowactwem do jonów wapnia, a także zdolnością do autofosforylacji, dzięki czemu w cyklu katalitycznym enzymu powstaje tak zwany ufosforylowany pośrednik czyli ufosforylowana forma białka. Zmiany konformacyjne są niezbędne w procesie transportu Ca^{2+} przez błonę plazmatyczną i błony organelli wewnątrzkomórkowych (PIKUŁA 1997). ATPazy są enzymami specyficznie wiążącymi określone formy jonowe ATP. W warunkach fizjologicznych w komórce występują różne jonowe formy nukleotydu, związane z jonami magnezu lub nie. Większość enzymów przetwarzających energię wykorzystuje kompleks Mg-ATP (PEDERSEN 1995) (rys. 1). W systemie zamkniętym entropia układu wzrasta, na przykład w przypadku, kiedy stężenie substancji ulega wyrównaniu pomiędzy dwoma przedziałami komórkowymi oddzielonymi od siebie błoną. By odtworzyć gradient stężeń tej substancji i obniżyć entropię systemu, musi być dostarczona energia. ATPazy transportujące jony działają właśnie na tej zasadzie. W czasie aktywnego transportu wykorzystują energię pochodzącą z hydrolizy ATP, by wytwor-



Rys. 1. Enzymy wykorzystujące ATP jako źródło energii.

Kluczową rolę w komórce spełnia F-ATPaza czyli mitochondrialna ATPaza typu F_0F_1 , która syntetyzuje adenosynotrójfosforan. ATP jest wykorzystywany przez P-ATPazy, takie jak Na^+, K^+ -ATPaza, H^+, K^+ -ATPaza, Ca^{2+} -ATPaza i Mg^{2+} -ATPaza, które utrzymują homeostazę jonów w cytoplazmie, V-ATPazy czyli ATPazy wakuolarnie, MDR, MRP i CFTR czyli aktywne transportery organicznych anionów, leków i ksenobiotyków (Xe), C-ATPazy, czyli enzymy takie jak miozyna i dyneina, zaangażowane w cyklu skurczowo-rozkurczowym mięśni, N-ATPazy, np. rec A, zlokalizowane w jądrze komórkowym, HSP czyli białka szoku cieplnego oraz E-ATPaza czyli ektoATPaza regulująca stężenie ATP na zewnątrz komórki.

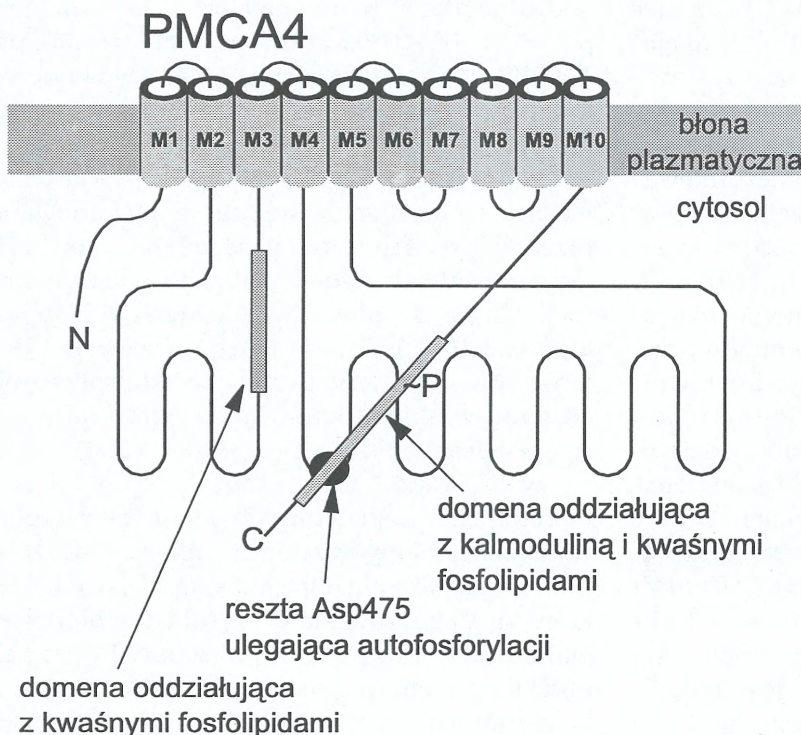
rzyć gradient stężeń jonów w poprzek błony. W procesie odwrotnym wzrost entropii, związany ze spadkiem gradientu stężeń jonu jest wykorzystywany do syntezy ATP. Ca^{2+} -ATPazy mogą syntetyzować ATP nie tylko kiedy gra-

dient stężeń Ca^{2+} w poprzek błony, ale także gradient stężeń H^+ , lub maleje różnica temperatur pomiędzy środowiskami po obu stronach błony (DE MEIS 1993, DE MEIS i współaut. 1997).

Ca^{2+} -ATPazy Z BŁONY PLAZMATYCZNEJ (PMCA)

Ca^{2+} -ATPazy z błony plazmatycznej są integralnymi białkami błony o masie cząsteczkowej 140 kDa (CARAFOLI 1994, CARAFOLI i STAUFFER 1994, CARAFOLI i współaut. 1996). Aktywność enzymów podlega subtelnej regulacji przez białko wiążące Ca^{2+} , kalmodulinę, a także występujące w błonie plazmatycznej fosfolipidy anionowe. Ważną rolę w regulacji aktywności ATPaz odgrywa także fosforylacja enzymu przez kinazy białkowe oraz zjawisko oligomeryzacji cząsteczek białka (CARAFOLI 1994). C-końcowy rejon cząsteczki ATPaz, w którym znajduje się domena wiążąca zarówno kalmodulinę, jak i fosfolipidy anionowe, oddziałując z domemą położoną w pobliżu centrum aktywnego enzymu, obniża aktywność ATPaz (rys. 2) (CARAFOLI i STAUFFER 1994, JAMES i współaut. 1995). Pierwszym odkrytym przedstawicielem Ca^{2+} -ATPaz był enzym z błony plazmatycznej erytrocytów (SCHATZMAN 1966), a następnie Ca^{2+} -ATPazy zidentyfikowano we wszystkich zbadanych dotąd typach komórek. Izoformy Ca^{2+} -ATPazy PMCA różnią się między sobą powinowactwem do Ca^{2+} i do kalmoduliny oraz podatnością na fo-

sforylację przez kinazę białkową zależną od cyklicznych nukleotydów. Badania rozmieszczenia tkankowego produktów czterech genów kodujących Ca^{2+} -ATPazy z błony plazmatycznej, z zastosowaniem technik biologii molekularnej i odpowiednich przeciwciał wykazały, że izoformy PMCA1 i PMCA4 występują praktycznie we wszystkich komórkach, podczas gdy izoformy PMCA2 i PMCA3 przede wszystkim w tkance nerwowej; na przykład izoforma PMCA2 znajduje się tylko w błonie plazmatycznej komórek Purkiniego (STAUFFER i współaut. 1997). Zróżnicowana ekspresja izoform Ca^{2+} -ATPazy PMCA jest regulowana między innymi przez białkową kinazę C, cAMP i Ca^{2+} (KUO i współaut. 1997). Z zastosowaniem metod mutacji punktowej i ekspresji zmutowanych izoform enzymu w komórkach COS-7 wykazano, że zamiana reszty Glu423 w domenie transbłonowej M4, reszt Asp883 i Asn879 w domenie transbłonowej M6 oraz reszty Glu971 w domenie M8 na inne reszty aminokwasowe (ryc. 2), prowadzi do utraty przez Ca^{2+} -ATPazy PMCA zdolności do transportu jonów wapnia i tworzenia ufosforylowanego po-



Rys. 2. Budowa i organizacja domen funkcjonalnych w cząsteczce Ca^{2+} -ATPazy z błony plazmatycznej erytrocytów (PMCA4), której aktywność jest stymulowana przez kalmodulinę.

-P, reszta treoniny w cząsteczce enzymu, która jest fosforylowana przez białkową kinazę C, M1-M10, domeny transbłonowe.

średnika w reakcji z ATP (GUERINI i współaut. 1996).

Z cząsteczką Ca^{2+} -ATPazy z błony erytrocytów są związane niekowalencyjnie dwa biopolimery zbudowany z reszt fosforanowych polifosforan (polyP) i poly3-hydroksymasłan z reszt kwasu R-3-hydroksymasłowego. Oba biopolimery są w stanie tworzyć kanały jonowe w błonach sztucznych i naturalnych. W dodatku polyP jest wymienniczym jonowym i bogatym źródłem reszt fosforanowych dla różnorodnych

reakcji fosforylacji. Na tej podstawie wysunięto przypuszczenie, że Ca^{2+} -ATPaza PMCA może funkcjonować w komórce jako kinaza katalizująca reakcję fosforylacji ADP do ATP, w podobny sposób w jaki działa kinaza polifosforanowa w komórkach bakterii. Odkrycie to rzuca nowe światło na mechanizm transportu Ca^{2+} przez błony, gdyż cząsteczki polifosforanów mogą stanowić dodatkowe miejsca specyficznego wiązania kationu (REUSCH i współaut. 1997).

Ca^{2+} -ATPazy Z BŁON RETIKULUM ENDO(SARKO)PLAZMATYCZNEGO (SERCA)

Ca^{2+} -ATPazy z błon ER(SR) są enzymami o małej cząsteczkowej masy 110 kDa. W ich cząsteczkach istnieje, jak we wszystkich Ca^{2+} -ATPazach, związek funkcjonalny pomiędzy domeną katalityczną enzymu (miejsce autofosforylacji), a miejscami wiązania Ca^{2+} . Związek ten stanowi mechaniczną podstawę procesu translokacji Ca^{2+} przez błonę (MARTONOSI 1996). Specyficznym inhibitorem Ca^{2+} -ATPazy typu SERCA, w odróżnieniu od ATPazy typu PMCA, jest tapsigargina (MARTONOSI 1996).

Ca^{2+} -ATPaza Z BŁON RETIKULUM SARKOPLAZMATYCZNEGO KOMÓREK MIĘŚNI SZKIELETOWYCH (SERCA1)

Ca^{2+} -ATPaza z błon SR jest przykładem białka, które wykorzystuje przemianę różnych form energii, w tym cieplnej, do aktywnego transportu Ca^{2+} wbrew gradientowi stężeń tego kationu (DE MEIS i współaut. 1997). Monomer ATPazy jest jednocześnie jednostką funkcjonalną białka, choć enzym jest zdolny do tworzenia w pełni funkcjonalnych dimerów (NAKAMURA i TAJIMA 1997). Hydroliza ATP katalizowana przez enzym jest związana z ukierunkowanym transportem kationów i tworzeniem się, w wyniku autofosforylacji reszty Asp351, ufosforylowanego pośrednika (INESI 1994). Pośrednik ten występuje w dwóch stanach konformacyjnych E_1P i E_2P , które ulegają wzajemnym przemianom, co stanowi istotę wykorzystania przez enzym energii zgromadzonej w ATP (HARTUNG i współaut. 1997). Izofорма z mięśni szkieletowych SERCA1 została sklonowana i poddana funkcjonalnej ekspresji w komórkach COS-1 (ANDERSEN i SØRENSEN 1996, MØLLER i współaut. 1996) i w komórkach drożdży (CENTENO i współaut. 1997). Synteza Ca^{2+} -ATPazy, w trakcie rozwoju osobniczego i w odpowiedzi na zróżnicowaną aktywność mięśni, jest regulowana przez jony wapnia i cAMP oraz zależy od

stanu metabolicznego komórek i od fazy cyklu komórkowego (MARTONOSI 1996, CHENG i współaut. 1997, GREEN i współaut. 1997).

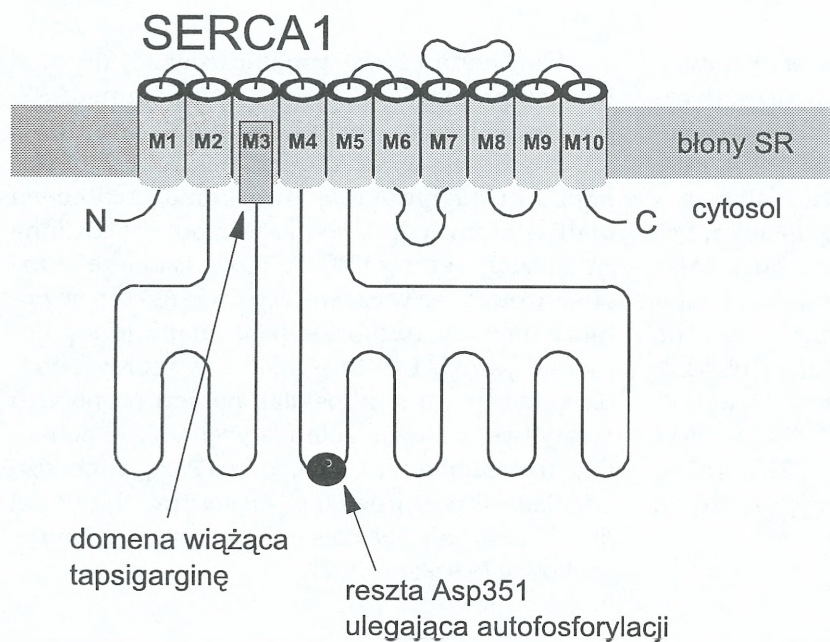
Analiza struktury białka z zastosowaniem techniki mutacji punktowej i chemicznego znakowania Ca^{2+} -ATPazy pomogła określić, że rejon wiązania Ca^{2+} znajduje się w części transbłonowej enzymu, zaś centrum katalityczne i miejsce wiązania ATP, są zlokalizowane w domenie cytoplazmatycznej białka, w odległości 4–5 nm od miejsc wiązania Ca^{2+} (MARTONOSI i współaut. 1991, TOYOSHIMA i współaut. 1993, STOKES i współaut. 1994, ANDERSEN i SØRENSEN 1996, MARTONOSI 1996). Musi zatem istnieć rodzaj komunikacji pomiędzy częścią cytoplazmatyczną i błonową białka, prawdopodobnie dzięki wewnątrzcząsteczkowym zmianom konformacyjnym, co przypomina związek pomiędzy podjednostką F_1 (aktywność ATPazowa) a podjednostką F_0 (kanał jonowy) w ATPazach typu F_0F_1 (F -ATPazy) (NICHOLLS i współaut. 1992). Ca^{2+} -ATPazy można zatem porównać do kanałów wyposażonych w mechanizm otwierający (DE MEIS 1993, INESI 1994, ANDERSEN i SØRENSEN 1996). Właściwości kinetyczne Ca^{2+} -ATPazy są w dużym stopniu determinowane przez fizykochemiczne właściwości błon SR. Przywrócenie aktywności enzymu po rekonstrukcji białka do błon zbudowanych z różnych klas fosfolipidów, kwasów tłuszczowych i detergentów, świadczy o tym, że oddziaływania enzymu ze składnikami lipidowymi błony nie są specyficzne (PIKUŁA i współaut. 1994).

W cząsteczce Ca^{2+} -ATPazy z błon SR komórek mięśni szkieletowych od strony cytoplazmatycznej błony występują miejsca wiążące Ca^{2+} z wysokim powinowactwem ($K_D = 10^{-7}$ M), które są zlokalizowane w części transbłonowej białka (MARTONOSI 1996). Wiązanie dwóch kationów w tych miejscach jest sekwencyjne i kooperatywne. Autofosforylacja enzymu w re-

akcji z ATP powoduje, że oba kationy nie mogą się wymieniać z pulą Ca^{2+} w cytoplazmie. Zaobserwowano, że nie ma różnic pomiędzy poziomem autofosforylacji enzymu w pęcherzykach SR wypełnionych Ca^{2+} i pustych. Na tej podstawie wyciągnięto wniosek, że w cząsteczce Ca^{2+} -ATPazy istnieją niezależne miejsca wiązania Ca^{2+} , położone w części białka eksponowanej po stronie ekstracytoplazmatycznej błon SR (JENCKS 1995). Dwa jony wapnia wiążą się zatem po stronie cytoplazmatycznej błony do miejsc w cząsteczce Ca^{2+} -ATPazy o wysokim powinowactwie do tego kationu. Po autofosforylacji enzymu kationy są przenoszone na stronę wewnętrzną w kanale wewnętrznym w cząsteczce białka, a następnie wiążą się do miejsc o niskim powinowactwie do Ca^{2+} , skąd są uwalniane do światła kanałka SR (JENCKS 1995, MARTONOSI 1996). Jaka jest struktura kanału w cząsteczce białka? Przewiduje się, że to domeny transbłonowe M4, M5, M6, M8 tworzą kanał hydrofilowy w cząsteczce ATPazy, domena M1 jest częścią miejsca wiążącego kationy z wysokim powinowactwem, a w domenie M3 jest zlokalizowane miejsce wiążące tapsigarginę (ryc. 3). W oparciu o strukturę krystal-

folamban, który bierze tym samym udział w skurczu mięśnia sercowego, określa odpowiedź mięśnia na wysilek i reguluje funkcję mięśni w stanach patologicznych (VERBOOMEN i współaut. 1995, MACLENNAN i współaut. 1997). Fosfolamban nie oddziałuje z Ca^{2+} -ATPazami PMCA. W badaniach *in vitro* i *in vivo* z zastosowaniem zwierząt transgenicznych stwierdzono, że fosfolamban może regulować również aktywność ATPazy SERCA1 (SLACK i współaut. 1997).

Fosfolamban jest niewielkim integralnym białkiem błonowym zbudowanym z 52 reszt aminokwasowych. W stanie spoczynku, fosfolamban hamuje transport Ca^{2+} , prawdopodobnie oddziałując bezpośrednio z domeną wiążącą to białko w cząsteczce Ca^{2+} -ATPazy (rys. 4). W wyniku stymulacji receptorów β -adrenergicznych w błonie plazmatycznej komórek mięśnia sercowego następuje aktywacja zależnej od cAMP kinazy białkowej (kinaza białkowa A), która fosforyluje fosfolamban, dzięki czemu oddziaływanie tego białka z ATPazą ulega zaburzeniu. Aktywność Ca^{2+} -ATPazy nie jest już dłużej hamowana przez fosfolamban i Ca^{2+} może gromadzić się we wnętrzu błon SR,



Rys. 3. Ca^{2+} -ATPaza z błon retikulum sarkoplazmatycznego komórek mięśni szkieletowych (SERCA1).

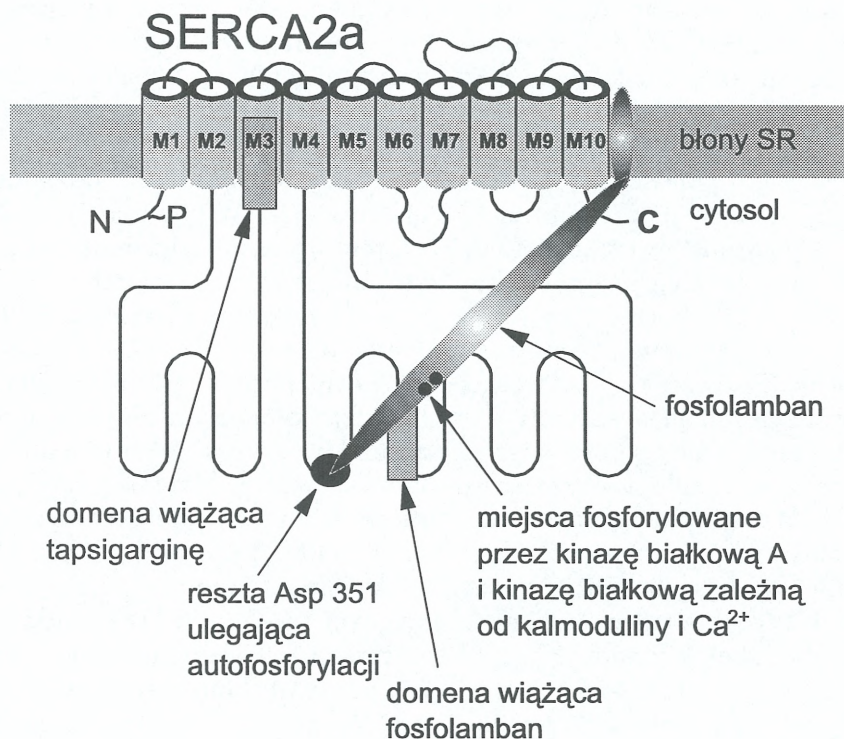
M1-M10, domeny transbłonowe.

liczną enzymu zaproponowano, jako alternatywę, istnienie dwóch kanałów hydrofilowych w cząsteczce enzymu (DE MEIS i współaut. 1996, MARTONOSI 1996, YOUNG i współaut. 1997).

Ca^{2+} -ATPaza Z BŁON SR KOMÓREK MIĘŚNIA
SERCOWEGO (SERCA2)

Białkiem regulującym aktywność ATPazy z błon SR komórek mięśnia sercowego jest fos-

co nie tylko przyspiesza relaksację mięśnia, ale przygotowuje mięsień sercowy do kolejnych skurczów (KISS i współaut. 1997, NARAYANAN i XU 1997). Specyfika oddziaływań pomiędzy fosfolambanem i Ca^{2+} -ATPazą nie jest do końca poznana. Transbłonowa domena fosfolambanu obejmuje reszty aminokwasów od 25/26 do 52 i ma strukturę α -helisy (20-22 reszt aminokwasowych); domena ta jest na-



Rys. 4. Ca^{2+} -ATPaza z błon retikulum sarkoplazmatycznego komórek mięśnia sercowego (SERCA2a). Aktywność enzymu jest hamowana przez fosfolamban. W wyniku fosforylacji fosfolambanu białko oddysocjowuje od miejsca wiążącego w cząsteczce ATPazy, która w ten sposób ulega aktywacji.

~P — reszta seryny w cząsteczce ATPazy ulegająca fosforylacji, M1–M10 — domeny transbłonowe.

chylona pod kątem $18\text{--}27^\circ$ do osi przechodzącej w poprzek błony. Domena cytoplazmatyczna fosfolambanu ma również strukturę α -helisy (13–18 reszt aminowasowych na 26). Fosforylacja reszty Ser16 przez kinazę białkową A wywołuje zmianę konformacyjną fosfolambanu, charakteryzującą się spadkiem zawartości struktury α -helisy w cząsteczce białka. Fosfolamban tworzy stabilne pentamery, co do których istnieje podejrzenie, że mogą tworzyć kanały jonowe w błonach SR (ARKIN i współaut. 1994, CORNEA i współaut. 1997, STOKES 1997, VERBOOMEN i współaut. 1997). Istnieją dane przeczące jednak temu przypuszczeniu (AUTRY i JONES 1995).

MacLennan i jego współpracownicy (KIMURA i współaut. 1997, MACLENNAN i współaut. 1997) po zastosowaniu metody mutacji punktowej stwierdzili, że w stabilizacji pentameru fosfolambanu odgrywa rolę transbłonowa domena białka, która jednocześnie jest odpowiedzialna za oddziaływanie z Ca^{2+} -ATPazą. Badacze ci zaobserwowali, że w cząsteczce Ca^{2+} -ATPazy w pobliżu miejsca autofosforylacji znajduje się domena Lys-Asp-Lys-Pro-Val402, w której zachodzi oddziaływanie z fosfolambanem (w pobliżu reszty Lys3). Można zatem stwierdzić, że pomiędzy fosfolambanem, a Ca^{2+} -ATPazą zachodzą oddziaływania zarówno w części transbłonowej obu białek, jak i w części eksponowanej do cytoplazmy (STOKES 1997).

A DOUBLE FACE OF CALCIUM TRANSPORT ATPase

S u m m a r y

Calcium serves as a signal in a great variety of cellular functions, from muscle contraction to synaptic transmission. Therefore, calcium homeostasis seems to be crucial for appropriate sustaining of these functions and even survival of organism. An important role in these processes is played by calcium transport ATPases, called al-

so calcium pumps. These enzymes are ubiquitous and belong to a multigene family of proteins localized in plasma and intracellular membranes. This review highlights recent progress in the research on the structure and mechanism of regulation and expression of diverse isoforms of Ca^{2+} -ATPases.

LITERATURA

- ANDERSEN J. P., SØRENSEN T., 1996. Site-directed mutagenesis studies of energy coupling in the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 118–122.
- ANGER M., SAMUEL J. L., MAROTTE F., WUYTACK F., RAPPAPORT L., LOMPRES A. M., 1994. In situ mRNA distribution of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoforms during ontogeny in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26, 539–550.
- ARKIN I. T., ADAMS P. D., MACKENZIE K.R., LEMMON M. A., BRUNGER A. T., ENGELMAN D. M., 1994. Structural organization of the pentameric transmembrane α -helices of phospholamban, a cardiac ion channel. *EMBO J.* 13, 4757–4764.
- AUTRY J. M., JONES L. R., 1997. Functional co-expression of the canine cardiac Ca^{2+} pump and phospholamban in *Spodoptera frugiperda* (Sf21) cells reveals new insights on ATPase regulation. *J. Biol. Chem.* 272, 15872–15880.
- BARAŃSKA J., 1997. Wapń jako pierwotny i wtórny przekaznik informacji. Udział Ca^{2+} w cyklu komórkowym, sekcji i adhezji. *Kosmos* 46, 33–44.
- BENNETT M. K. 1997. Ca^{2+} and the regulation of neurotransmitter secretion. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 316–322.
- BERRIDGE M. J., 1995. Calcium signalling and cell proliferation? *BioEssays* 17, 491–500.
- CARAFOLI E., 1994. The plasma membrane calcium ATPase: fifteen years of work on the purified enzyme. *FASEB J.* 8, 993–1002.
- CARAFOLI E., STAUFFER T., 1994. The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity and tissue specificity of isoform expression. *J. Neurobiol.* 25, 312–324.
- CARAFOLI E., GARCIA-MARTIN E., GUERINI D., 1996. The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. *Experientia* 52, 1091–1100.
- CENTENO F., DESCHAMPS S., LOMPRES A.-M., ANGER M., MOUTIN M.-J., DUPONT Y., PALMGREN M. G., VILLALBA J. M., MØLLER J. V., FALSON P., LE MAIRE M., 1994. Expression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in yeast. *FEBS Lett.* 354, 117–122.
- CHENG G., LIU B. F., YU Y., DIGLIO C., KUO T. H., 1996. The exit from G(0) into the cell cycle requires and is controlled by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} pump. *Arch. Biochem. Biophys.* 329, 65–72.
- CORNEA R. L., JONES L. R., AUTRY J. M., THOMAS D. D., 1997. Mutation and phosphorylation change the oligomeric structure of phospholamban in lipid bilayers. *Biochemistry* 36, 2960–2967.
- DE MEIS L., 1993. The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases, and entropic energy. *Arch. Biochem. Biophys.* 306, 287–296.
- DE MEIS L., BIANCONI M. L., SUZANO V. A., 1997. Control of energy fluxes by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: ATP hydrolysis ATP synthesis and heat production. *FEBS Lett.* 406, 201–204.
- DE MEIS L., WOLOSKEWICZ H., ENGELENDER S., 1996. Regulation of the channel function of Ca^{2+} -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 105–110.
- FOLETTI D., GUERINI D., CARAFOLI E., 1995. Subcellular targeting of the endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca^{2+} pumps: a study using recombinant chimeras. *FASEB J.* 9, 670–680.
- GODA Y., SÜDHOF T. C., 1997. Calcium regulation of neurotransmitter release: reliably unreliable? *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 513–518.
- GREEN H. J., MCKEE N. H., CARVALHO A. J., PHILLIPS S. M., 1997. Reduction in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity in rat skeletal muscles of different fibre composition with ischemia and reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 78–82.
- GROVER A. K., KHAN I., 1992. Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. *Cell Calcium* 13, 9–17.
- GUERINI D., FOLETTI D., VELLANI F., CARAFOLI E., 1996. Mutation of conserved residues in transmembrane domains 4, 6 and 8 causes loss of Ca^{2+} transport by the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Biochemistry* 35, 3290–3296.
- HARTUNG K., FROELICH J. P., FENDER K., 1997. Time-resolved charge translocation by the Ca -ATPase from sarcoplasmic reticulum after an ATP concentration jump. *Biophys. J.* 72, 2503–2514.
- INESI G., 1994. Teaching active transport at the turn of the twenty-first century: recent discoveries and conceptual changes. *Biophys. J.* 66, 554–560.
- JAMES P., VORHERR T., CARAFOLI E., 1995. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem. Sci.* 20, 38–42.
- JENCKS W. P., 1995. The mechanism of coupling chemical and physical reactions by the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum and other coupled vectorial systems. *Biosci. Rep.* 15, 283–287.
- KIMURA Y., KURZYDŁOWSKI K., TADA M., MACLENNAN D. H., 1997. Phospholamban inhibitory function is activated by depolymerization. *J. Biol. Chem.* 272, 15061–15064.
- KISS E., EDES I., SATO Y., LUO W., LIGGETT S. B., KRANIAS E., 1997. β -Adrenergic regulation of cAMP and protein phosphorylation in phospholamban-knockout mouse hearts. *Am. J. Physiol.* 272, H785–H790.
- KUO T. H., LIU B.-F., YU Y., WUYTACK F., RAEYMAEKERS L., TSANG W., 1997. Co-ordinated regulation of the plasma membrane calcium pump and the sarco(endo)plasmic reticular calcium pump gene expression by Ca^{2+} . *Cell Calcium* 21, 399–408.
- MACLENNAN D. H., TOYOFUKU T., KIMURA T., 1997. Sites of regulatory interaction between calcium ATPases and phospholamban. *Basic Res. Cardiol.* 92, 11–15.
- MAKOWSKA A., DUSZYŃSKI J., 1996. Oscylacje i fale wapniowe w komórce. *Post. Biochem.* 42, 146–153.
- MARTONOSI A., 1995. The structure and interactions of Ca^{2+} -ATPase. *Biosci. Rep.* 15, 263–281.
- MARTONOSI A., 1996. Structure-function relationships in the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum: facts, speculations and questions for the future. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 111–117.
- MARTONOSI A., TAYLOR K. A., PIKULA S., 1991. The crystallization of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. [W:] H. MICHEL (red.), *Crystallization of Membrane Proteins*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, 167–182.
- MØLLER J. V., JUUL B., LE MAIRE M., 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 1–51.
- NAKAMURA J., TAJIMA G., 1997. Independence of two conformations of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mo-

- lecules in hydrolyzing acetyl phosphate — A two-pair model of the ATPase structural unit. *J. Biol. Chem.* 272, 19290–19294.
- NARAYANAN N., XU A., 1997. Phosphorylation and regulation of the Ca^{2+} -pumping ATPase in cardiac sarcoplasmic reticulum by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Basic Res. Cardiol.* 92, 25–35.
- NICHOLLS P., RAND R. P., FULLER N., BUTKO P., 1992. Water, ions and membrane proteins: How would Darwin look at cytochromes and channels? *Biochem. Soc. Trans.* 20, 58–589.
- PIKULA S., 1997. ATPaza z błon sarkoplazmatycznego retikulum, transportująca jony wapnia. *Kosmos* 46, 105–114.
- PIKULA S., EPSTEIN L., MARTONOSI A., 1994. The relationship between phospholipid content and Ca^{2+} ATPase activity in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 1196, 1–13.
- PEDERSEN P. L., 1995. Multidrug resistance — a fascinating, clinically relevant problem in bioenergetics. *J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 3–5.
- REUSCH R., HUANG R., KOSK-KOSICKA D., 1997. Novel components and enzymatic activities of the human erythrocyte plasma membrane calcium pump. *FEBS Lett.* 412, 592–596.
- SCHATZMANN H. J., 1966. ATP-dependent Ca^{2+} extrusion from human red blood cells. *Experientia* 22, 364–368.
- SLACK J. P., GRUPP I. L., FERGUSON D. G., ROSENTHAL N., KRANIAS E., 1997. Ectopic expression of phospholamban in fast-twitch skeletal muscle alters sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport and muscle relaxation. *J. Biol. Chem.* 272, 18862–18868.
- STAUFFER T. P., GUERINI D., CELIO M. R., CARAFOLI E., 1997. Immunolocalization of the plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms in the rat brain. *Brain Res.* 748, 21–29.
- STOKES D. L., 1997. Keeping calcium in its place: Ca^{2+} -ATPase and phospholamban. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 550–556.
- STOKES D. L., TAYLOR W. R., GREEN N. M., 1994. Structure, transmembrane topology and helix packing of P-type ion pumps. *FEBS Lett.* 346, 32–38.
- TOYOSHIMA C., SASABE H., STOKES D. L., 1993. Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature* 362, 469–471.
- VERBOOMEN H., MERTENS L., EGGERMONT J., WUYTACK F., VANDENBOSCH L., 1995. Modulation of SERCA2 activity: regulated splicing and interaction with phospholamban. *Biosci. Rep.* 15, 307–315.
- WU K. D., LEE W. S., WEY J., BUNGARD D., LYTTON J., 1995. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoform transcripts. *Am. J. Physiol.* 269, C775–784.
- YOUNG H. S., RIGAUD J. L., LACAPERE J. J., REDDY L. G., STOKES D. L., 1997. How to make tubular crystals by reconstitution of detergent-solubilized Ca^{2+} -ATPase. *Biophys. J.* 72, 2545–2558.