

ANTONI WRZOSEK

Zakład Biochemii Mięśni

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Pasteura 3, 02-093 Warszawa

E-mail: antoni@nencki.gov.pl

## CHARAKTERYSTYKA I REGULACJA WYMIENIACZA $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ W KOMÓRKACH MIĘŚNIA SERCOWEGO SSAKÓW

### WSTĘP

W błonie plazmatycznej niemal wszystkich komórek ssaczych, w tym mięśnia sercowego występują dwa systemy usuwające jony wapnia na zewnątrz komórki,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPaza (PMCA) oraz wymienniacz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Zapobiegają one nagromadzeniu się jonów wapnia we wnętrzu komórki, które napływają do sarkoplazmy podczas stymulacji mięśnia sercowego. Istnienie wymienniacza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  w sercu po raz pierwszy wykazano w 1968 roku (REUTER i SEITZ 1968). Zaobserwowano, że transport przez błonę plazmatyczną 3  $\text{Na}^+$  w jednym kierunku, natomiast 1  $\text{Ca}^{2+}$  w kierunku przeciwnym jest elektrogeny (MULLINS 1979). Siłą napędową

tego procesu jest elektrochemiczny gradient stężeń  $\text{Na}^+$  występujący pomiędzy wnętrzem komórki i środowiskiem zewnętrznym.

Zmiany stężenia jonów wapnia w komórkach mięśnia sercowego mogą być przyczyną lub skutkiem zmian chorobowych i patologicznych. Zmiany te obserwuje się w przypadkach niedotlenienia mięśnia sercowego, hipertrofii i niewydolności serca oraz kardiomiopatii. Jednym z czynników wpływających na zaburzenie homeostazy wapnia w komórce mięśniowej są zmiany aktywności wymienniacza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (DHALLA i współaut. 1996).

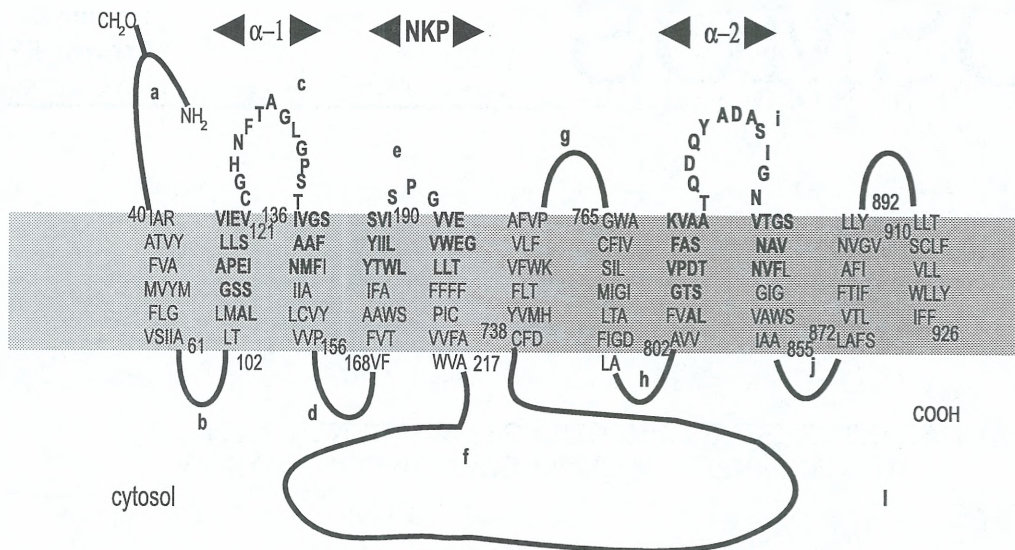
### BUDOWA CZĄSTECZKI WYMIENIACZA $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Obecnie znanych jest szereg izoform wymienniacza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , tworzących wspólną rodzinę homologicznych białek transportujących jony (NICOLL i współaut. 1996a). Określono geny kodujące izoformy wymienniacza występujące u myszy NCX1, NCX2 i NCX3, które znajdują się odpowiednio na chromosomach 17, 7 i 12. Najbardziej rozpowszechnioną izoformą wymienniacza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  w komórkach pobudliwych jest izoforma NCX1; w komórkach mięśnia sercowego jest jedyną, która ulega ekspresji (NICOLL i współaut. 1990).

W cząsteczce wymienniacza NCX1 można wyróżnić pewne charakterystyczne obszary określane jako  $\alpha$ - i  $\beta$ -powtórzenia (rys. 1). Konserwatywne rejony  $\alpha$ , o podobnej strukturze pierwszorzędowej, oznaczone  $\alpha$ -1 i  $\alpha$ -2 obejmują odpowiednio transbłonowe domeny 2-3 i 8-9 i są bezpośrednio zaangażowane w procesie wiązania i przemieszczania jonów (NICOLL 1996a). Motywy  $\beta$ -1 i  $\beta$ -2 znajdują się w obsza-

rze dużej pętli cytosolowej f, gdzie występuje również miejsce wiązania jonów wapnia, spełniających funkcje regulatorowe. Miejsce to różni się od miejsca, w którym są wiązane transportowane jony wapnia. Miejsce regulatorowego wiązania jonów wapnia obejmuje rejon  $\beta$ -1 oraz obszar pomiędzy rejonami  $\beta$ -1 i  $\beta$ -2 (MATSUOKA i współaut. 1995).

Funkcja N-końcowej 32-aminokwasowej sekwencji sygnałowej, występującej w cząsteczce wymienniacza, nie jest jasna (DURKIN i współaut. 1991). Przypuszcza się, że jest ona potrzebna do prawidłowego wbudowania białka do błony, ponieważ w pełni funkcjonalnym białku N-koniec jest silnie naładowany, co stanowiłoby przeszkodę we wbudowywaniu wymienniacza (REEVES i współaut. 1994, SAHINTOTH i współaut. 1995). Innym charakterystycznym rejonem cząsteczki wymienniacza NCX1 jest segment określany jako NKP, obejmujący transbłonowe domeny 4 i 5 (NICOLL i



Rys. 1. Model wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX1) (wg NICOLLA i współaut. 1996b, zmodyfikowany).

Sekwencja aminokwasowa proponowanych fragmentów transbłonowych. Sekwencje aminokwasowe znajdujące się poza błoną zaznaczono literami a–i. Aminokwasy należące do powtórzeń  $\alpha$  i mające wysoką homologię z  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazą zostały pogrubione. Pojedyncze miejsca glikolizacji Asn-9 zaznaczono jako  $\text{CH}_2\text{O}$ . Rejony cząsteczki o szczególnym znaczeniu: N-koniec, sekwencja sygnałowa; fragment homologiczny z  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazą 194-VVEVWEGLLT wykazujący 61% identyczności z  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -, SERCA-, PCMA- i  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -ATPazami; rejon XIP 219-RRLLFYKYVYKRYRAGKQRG; fragment homologiczny z białkiem pasma 3, anionowego transportera 263- SHVDSFLDGALVLEVDE, 60% identyczności z białkiem pasma 3a szczura; domeny wiążące jony wapnia, 446-DDDIFEDE i 498-DDDHAGIFTEFE; rejon podlegający różnicowemu składaniu (570-645); rejon bogaty w reszty kwaśnych aminokwasów 723-EDDDDEECGEE.

współaut. 1990). W rejonie tym sekwencja aminokwasów 194-VVEVWEGLL jest w 61% identyczna z odpowiadającymi jej rejonami w cząsteczkach  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy z błon siateczki sarkoplazmatycznej oraz  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -, PMCA- i  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -ATPaz. Ponadto reszta glutaminy (E), występująca w pozycji 199, jest zachowana we wszystkich wymienionych typach ATPaz i jak wykazano, jest resztą aminokwasową niezbędną do wiązania jonów wapnia w cząsteczce  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPazy z błon SR. Aminokwas ten jest również ważny dla funkcji wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , a jego mutacja prowadzi do utraty aktywności transportowej (REEVES i współaut. 1994). Na początku dużej domeny cytosolowej f znajduje się 20-aminokwasowy rejon cząsteczki, zawierający przede wszystkim reszty zasadowe i hydrofobowe, przypominający domenę wiążącą kalmulinę. Zsyntetyzowano peptyd XIP, (ang. exchanger inhibitory peptide) o sekwencji aminokwasów odpowiadającej sekwencji występującej w cząsteczce wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  i stwierdzono, że hamuje on aktywność wymiennicza. Domena XIP pełni zatem rolę domeny

autoinhibitorowej (HE i współaut. 1997). Inny rejon cząsteczki wymiennicza wykazuje 60% identyczności z anionowym wymienniczem z błony erytrocytów szczura. Przypuszcza się, że ten rejon cząsteczki wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pełni rolę w oddziaływaniu z cytoszkieletem, między innymi z ankiryną (LI i współaut. 1993).

Rolę poszczególnych aminokwasów wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , występujących w charakterystycznych rejonach cząsteczki białka, określono metodą mutacji punktowych. Niektóre ze zmutowanych form białka wykazywały zmiany w zależności od prądu jonowego, płynącego przez wymienniczą od potencjału błonowego ( $I_{\text{NaCa-V}}$ ). Okazało się, że obszarami szczególnie czułymi na mutację są  $\alpha$ -rejon cząsteczki wymiennicza. Mutacje E199D lub E199Q oraz T203V w rejonie NKP powodowały powstanie nieaktywnej formy wymiennicza. Mutacje w rejonach zasadowych i kwaśnych aminokwasów nie wywoływały istotnych zmian, z wyjątkiem mutacji D785E i D785N, która w rezultacie powodowała utratę aktywności NCX1 (NICOLL i współaut. 1996a).

#### REGULACJA AKTYWNOŚCI TRANSPORTOWEJ WYMIENIACZA $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Ze względu na swoją elektrogenność wymienniczą  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  może zmienić kierunek

transportu jonów w zależności od ich stężenia, jak również od potencjału błonowego. Termo-

dynamiczną siłę napędzającą dla wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  wyraża równanie na potencjał zwrotny (ang. reversal potential), to jest taki potencjał, w którym system wymiany znajduje się w równowadze:

$$E_{\text{Na}/\text{Ca}} = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}} = \\ = -RTF^{-1} \ln\left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]_o/[\text{Ca}^{2+}]_i}{([\text{Na}^+]_i/[\text{Na}^+]_o)^3}\right),$$

gdzie  $E_{\text{Na}/\text{Ca}}$  jest potencjałem zwrotnym,  $E_{\text{Na}}$  i  $E_{\text{Ca}}$  są potencjałami równowagowymi dla  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ , określonymi przez potencjał Nernsta,  $R$  stała gazowa,  $T$  temperatura absolutna i  $F$  stała Faradaya. Jeśli potencjał błonowy będzie bardziej ujemny niż  $E_{\text{Na}/\text{Ca}}$ , prąd będzie płynął w kierunku wnętrza komórki i NCX1 będzie usuwał  $\text{Ca}^{2+}$  na zewnątrz komórki. W odwrotnym przypadku jony wapnia będą napływały do cytosolu. Zgodnie z tym równaniem niewielkie zmiany stężenia jonów sodu powodują znaczne zmiany w transporcie jonów wapnia. Sytuacja ta ma miejsce w przypadku mięśnia sercowego szczura, w którym poziom jonów sodu jest wyższy niż w komórkach sercowych innych gatunków (BERS 1991). Przypuszcza się, że w cyklu pobudzeniowo-skurczowym mięśnia  $\text{Ca}^{2+}$  może napływać do komórki przez wymiennicz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , wpływając na proces wypływu  $\text{Ca}^{2+}$  z błon SR stymulowany przez te jony (CICR, ang. calcium induced calcium release) (LEBLANC i HUME 1990). Ułatwieniem tego procesu jest powstawanie w pobliżu błony lokalnych gradientów stężeń jonów sodu i wapnia (ang. fuzzy space) (LEDERER i współaut. 1990, LIPP i NIGGLI 1994). O możliwości udziału wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  w procesie CICR może świadczyć jego lokalizacja w błonie plazmatycznej komórki mięśniowej serca w rejonie bogatym w kanaliki systemu T, biorące udział w przekazywaniu sygnału docierającego do komórki mięśniowej i przekazywaniu go do błon SR. Przypuszcza się także, że proces różnicowego składania może prowadzić do powstania izoform wymiennicza o różnej lokalizacji w błonie plazmatycznej (FRANK i współaut. 1992, KIEVAL i współaut. 1992). Ostatnio wykazano istnienie specyficznego sprzężenia funkcjonalnego pomiędzy wpływem  $\text{Ca}^{2+}$  z błon SR, a wymienniczem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (JANIAK i współaut. 1996, LEWARTOWSKI i współaut. 1996). Wykazano, że  $\text{Ca}^{2+}$  wypływający z siateczki sarkoplazmatycznej jest transportowany przez wymiennicz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  na zewnątrz komórki również w fazie spoczynkowej serca (WOLSKA i LEWARTOWSKI 1993).

Wymiennicz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  podlega regulacji przez jony  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$ . Podwyższenie stężenia

jonów sodu w komórce lub obniżenie stężenia jonów wapnia prowadzi do zahamowania aktywności transportowej wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (MATSUOKA i współaut. 1995). Pomimo że działanie wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  nie jest związane z hydrolizą ATP, nukleotyd ten ma wpływ na jego aktywność. Dotychczas zakładano, że proces ten nie jest związany z fosforylacją cząsteczki wymiennicza w sercu, chociaż jak pokazano, niektóre jego izoformy mogą ulegać fosforylacji. Ostatnie badania wykazały, że w komórkach sercowych nowo narodzonych szczurów oraz w komórkach CCL39 wymiennicz NCX1 może ulegać fosforylacji przez kinazę białkową C. Fosforylacja ta wpływa na zwiększenie jego aktywności (IWAMOTO i współaut. 1996a). Zaobserwowano również fosforylację wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  przez kinazę białkową C w komórkach mięśni gładkich aorty pod wpływem aktywacji komórek czynnikami wzrostu (IWAMOTO i współaut. 1996b). Przypuszcza się, że rola ATP może polegać także na zmianie oddziaływania wymiennicza z cytoskieletem komórkowym (REEVES i współaut. 1994). Istnieją również doniesienia świadczące o zaangażowaniu translokazy aminofosfolipidów w procesie regulacji aktywności wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  przez ATP (HILGEMANN i COLLINS 1992). Badania nad wymienniczem  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  w komórkach włókien nerwowych kałamarnicy pozwoliły zidentyfikować w cytosolu rozpuszczalne niskocząsteczkowe białko, SCPr (ang. soluble cytoplasmic protein). Białko to przywraca regulacyjny efekt MgATP na wymiennicz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  zanikający w czasie izolowania błon komórek nerwowych lub w wyniku długotrwałej dializy wewnątrzkomórkowej (DIPOLO i współaut. 1997). Dotychczas nie wykazano istnienia takiego białka w komórkach mięśnia sercowego ssaków.

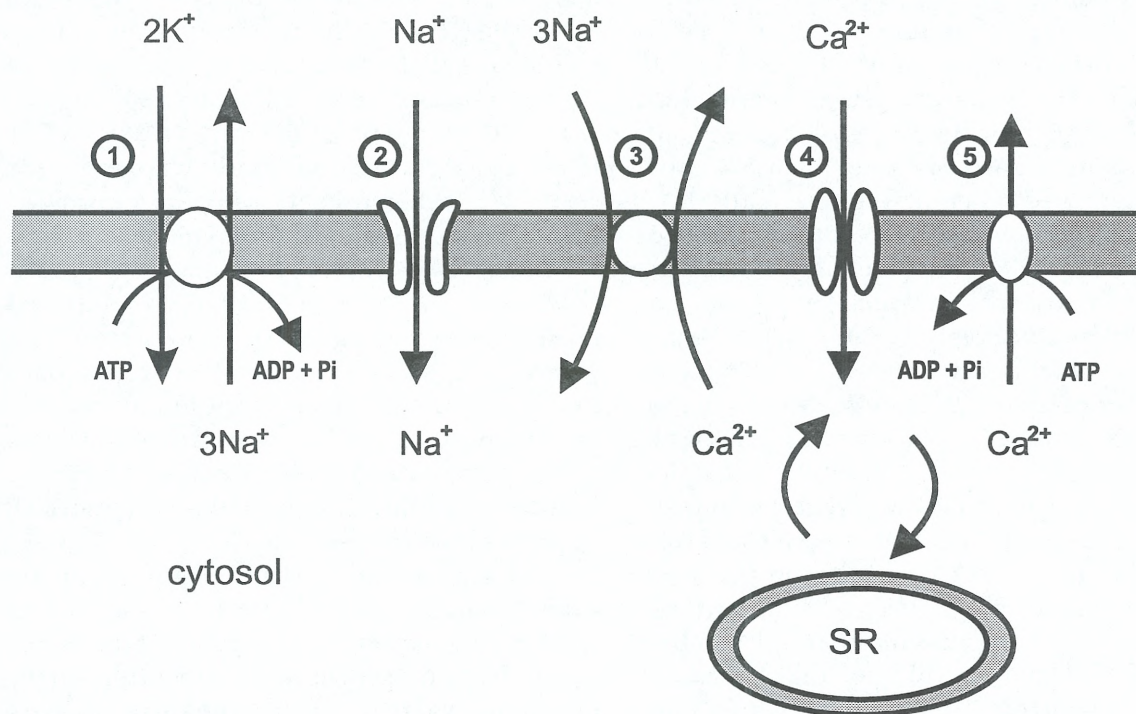
Ostatnio zsyntetyzowano dodatkowo naładowany heksapeptyd FRCRCF hamujący aktywność wymiennicza w stężeniach mikromolowych. Jest on specyficzny w stosunku do wymiennicza  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  i wykazuje dużą szybkość hamowania. Kanał wapniowy typu L błony plazmatycznej nie ulega inaktywacji w obecności tego peptydu. Jednocześnie wykazano, że ograniczona proteoliza nie zmieniała zdolności inhibitorowych tego peptydu (KHANANSHVILI i współaut. 1996).

Wymiennicz  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  podlega również regulacji hormonalnej. Oddziaływanie adrenaliny, angiotensyny II i endoteliny I z odpowiednimi receptorami, znajdującymi się w błonie plazmatycznej komórek serca, prowadzi do

zmian inotropowych i chronotropowych w mięśni. Pod wpływem stymulacji tych receptorów następuje uruchomienie szlaku związanego z powstawaniem inozytolo-1,4,5-trisfosforanu ( $IP_3$ ) i 1,2-diacylglicerolu w wyniku hydrolizy fosfatydyloinozytolo-4,5-bisfosforanu ( $PIP_2$ ) przy udziale fosfolipazy C. Prowadzi to do aktywacji wymiennicza  $Na^+/Ca^{2+}$  przez zmianę otoczenia lipidowego i fosforylację przy udziale kinazy białkowej C (BALLARD i SCHAFFER 1996, FUKUTA i współaut. 1996, IWAMOTO i współaut. 1996a). Czynniki wpływające na zmiany aktywności wymiennicza  $Na^+/Ca^{2+}$  przestają działać (wyjątek stanowi peptyd FRCRCF), jeśli zostanie odtrawiona przez enzym proteolityczny lub usunięta przez manipulację genetyczną duża domena cytosolowa białka (REEVES i współaut. 1994).

Regulacja aktywności wymiennicza  $Na^+/Ca^{2+}$  może również zachodzić na drodze pośredniej, w wyniku zmian aktywności  $Na^+,K^+$ -ATPazy z błony plazmatycznej komórki sercowej. Sytuację tę przedstawia rysunek 2.

$Na^+,K^+$ -ATPaza jest odpowiedzialna za utrzymanie gradientu stężeń jonów sodu i potasu przez błonę plazmatyczną (BOLDYREV 1993). Wpływ zmian aktywności  $Na^+,K^+$ -ATPazy można prześledzić po zastosowaniu specyficznych jej inhibitorów, ouabainy lub glikozydów pochodzących z wyciągu z naparstnicy. Pod wpływem tych czynników następuje podwyższenie wewnątrzkomórkowego stężenia  $Na^+$ . Zwiększony poziom jonów sodu powoduje zmianę aktywności wymiennicza  $Na^+/Ca^{2+}$  i podwyższenie stężenia jonów wapnia w sarkoplazmie w fazie rozkurczu. Interesującym wydaje się fakt jednoczesnej, zwiększonej ekspresji wymiennicza  $Na^+/Ca^{2+}$  i  $Na^+,K^+$ -ATPazy w komórkach hodowanych przez dłuższy czas w obecności ouabainy (PHILIPSON 1992). Wydaje się, że synteza niektórych białek transportujących jony może być dynamicznie kontrolowana. Ostatnio wykryto endogenny czynnik o działaniu podobnym do ouabainy, wpływający na aktywność  $Na^+,K^+$ -ATPazy (DOVIS 1994).



Rys. 2. Homeostaza jonów  $Ca^{2+}$  w komórkach mięśnia sercowego (wg REEVESA i współaut. 1994, zmodyfikowany).

(1)  $Na^+,K^+$ -ATPaza utrzymująca transbłonowy gradient  $Na^+$  i  $K^+$ ; (2) kanał sodowy odpowiedzialny za napływ  $Na^+$  do komórki podczas depolaryzacji błony komórkowej; (3) wymienniacz  $Na^+/Ca^{2+}$ ; (4) kanał wapniowy odpowiedzialny za napływ jonów  $Ca^{2+}$  do komórki podczas potencjału czynnościowego; (5)  $Ca^{2+}$ -ATPaza z błony plazmatycznej, enzym usuwający jony  $Ca^{2+}$  z komórki.

## CHARACTERISTICS AND REGULATION OF $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ EXCHANGER IN MAMMALIAN HEART MUSCLE

### Summary

The plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger is the major system responsible for maintaining calcium homeostasis in sarcoplasm of cardiac muscle.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger moves 3  $\text{Na}^+$  across the plasma membrane in exchange for 1  $\text{Ca}^{2+}$  transported in the opposite direction, on expense of

the energy coming from the sodium gradient across the membrane. Primary structure, as well as the role of the exchanger in calcium homeostasis of the cardiac muscle and its regulation are presented.

### LITERATURA

- BALLARD CH., SCHAFFER S., 1996. Stimulation of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger by phenylephrine, angiotensin II and endothelin I. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 11–17.
- BERS D. M., 1991. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht
- BOLDYREV A. A., 1993. Functional activity of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -pump in normal and pathological tissues. *Mol. Chem. Neurobiol.* 19, 83–93.
- DHALLA N. S., WANG X., BEAMISH R. E., 1996. Intracellular calcium handling in normal and failing hearts. *Exp. Clin. Cardiol.* 1, 7–20.
- DIPOLO R., BERBERIAN, DELGADO D., ROJAS H., BEAUGE L., 1997. A novel 13 kDa cytoplasmic soluble protein is required for the nucleotide (MgATP) modulation of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in squid nerve fibers. *FEBS Lett.* 401, 6–10.
- DOVIS P. A., 1994. Regulation of  $\text{Na}, \text{K}$ -ATPase by endogenous ouabain-like materials. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205, 202–212.
- DURKIN J. T., AHRENS D. C., PAN Y. C. E., REEVES J. P., 1991. Purification and amino terminal sequence of the bovine cardiac sodium-calcium antiporter: evidence for the presence of a signal sequence. *Arch. Biochem. Biophys.* 290, 369–375.
- FRANK J. S., MOTTINO G., MOLDAI R. S., PHILIPSON K. D., 1992. Distribution of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange protein in mammalian cardiac myocytes: an immunofluorescence gold-labeling study. *J. Cell. Biol.* 117, 337–345.
- FUKUTA Y., YOSHIZUMI M., KITAGAWA T., HORI T., CHIKUGO F., KAWAHITO T., KATOH I., HOUCHE H., OKA M., 1996. Angiotensin II as a stimulator of  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *Neuroscience Lett.* 213, 95–98.
- HE Z., PETESCH N., VOGES K.-P., ROEBEN W., PHILIPSON K. D., 1997. Identification of important amino acid residues of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger inhibitory peptide, XIP. *J. Membrane Biol.* 156, 149–156.
- HILGEMANN D. W., COLLINS A., 1992. Mechanism of cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange current stimulation by MgATP: Possible involvement of aminophospholipid translocase. *J. Physiol.* 454, 59–82.
- IWAMOTO T., PAN Y., WAKABAYASHI S., IMAGAWA T., YAMANA H. I., SHIGEKAWA M., 1996a. Phosphorylation-dependent regulation of cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger via protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 271, 13609–13615.
- IWAMOTO T., WAKABAYASHI S., SHIGEKAWA M., 1996b. Growth factor-induced phosphorylation and activation of aortic smooth muscle  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *J. Biol. Chem.* 270, 8996–9001.
- JANIAK R., LEWARTOWSKI B., LANGER G. A., 1996. Functional coupling between sarcoplasmic reticulum and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in single myocyte of guinea-pig and rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28, 253–264.
- KHANANSHVILI D., BAAZOV D., WEIL-MASLANSKY E., SHAULOV G., MESTER B., 1996. Rapid interaction of FRCRCFA with cytosolic side of the cardiac sarcolemma  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger blocks the ion transport without preventing the binding of either sodium or calcium. *Biochemistry* 35, 15933–15940.
- KIEVAL R. S., BLOCH R. J., LINDENMAYER G. E., AMBESI A., LEDERER W. J., 1992. Immunofluorescence localization of the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in heart cells. *Am. J. Physiol.* 263, C545–550.
- LEBLANC N., HUME J. R., 1990. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 248, 283.
- LEDERER W. J., NIGGLI E., HADLEY R. W., 1990. Sodium-Calcium exchange in excitable cells: fuzzy space. *Science*, 248, 283.
- LEWARTOWSKI B., JANIAK R., LANGER G. A., 1996. Effect of sarcoplasmic reticulum Ca release into diadic region on  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in cardiac myocytes. *J. Physiol. Pharmacol.* 47, 577–590.
- LI A., BURKE E. P., FRANK J. S., BENNET V., PHILIPSON K. D., 1993. The cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiporter binds to the cytoskeletal protein ankyrin. *J. Biol. Chem.* 268, 1489–1491.
- LIPP P., NIGGLI E., 1994. Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 474, 439–446.
- MATSUOKA S., NICOLL D. A., HRYSHKO L. V., LEVITSKY D. O., WEISS J. N., PHILIPSON K. D., 1995. Regulation of the cardiac  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger by  $\text{Ca}^{2+}$ . Mutational analysis of the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain. *J. Gen. Physiol.* 105, 403–420.
- MULLINS L. J., 1979. The generation of electric current in cardiac fibers by  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Am. J. Physiol.* 236, C103–C110.
- NICOLL A. D., LONGONI S., PHILIPSON K. D., 1990. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Science* 250, 562–565.
- NICOLL D. A., HRYSHKO L. V., MATSUOKA S., FRANK J. S., PHILIPSON K. D., 1996a. Mutation of amino acid residues in the putative transmembrane segments of the cardiac sarcolemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *J. Biol. Chem.* 271, 13383–13391.
- NICOLL D. A., QUEDNAU B. D., QUI Z., XIA Y.-R., LUSIS A. J., PHILIPSON K. D., 1996b. Cloning of a third mamma-

- lian  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchanger, NCX3. *J. Biol. Chem.* 271, 24914–24921.
- PHILIPSON K. D., 1992. Cardiac sodium-calcium exchange research. New directions. *Trends Cardiovasc. Med.* 2, 12–14.
- REEVES J. P., CONDRESCU M., CHERNAYA G., GARDNER J. P., 1994.  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  antiport in the mammalian heart. *J. Exp. Biol.* 196, 375–388.
- REUTER H., SEITZ N., 1968. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol. Lond.* 195, 451–470.
- SAHIN-TOTH M., NICOLL D. A., FRANK J. S., PHILIPSON K. D., FRIEDLANDER M., 1995. The cleaved N-terminal signal sequence of the cardiac  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  exchanger is not required for functional membrane integration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 968–974.
- WOLSKA B., LEWARTOWSKI B., 1993. The role of sarcoplasmic reticulum and Na-Ca exchange in the  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion from the resting myocytes of guinea-pig heart: comparison with rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 25, 75–91.