

Rôle de la Calcium-ATPase de la Membrane Plasmique dans l'Homéostasie Calcique dans les îlots Pancréatiques de Rat

[The Role of Plasma Membrane Calcium-ATPase on Calcium Homeostasis in Pancreatic Islets of Rat]

Adama KAMAGATE

Laboratoire de Physiologie animale, de Pharmacologie et de Phytothérapie, UFR SN, Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the *Creative Commons Attribution License*, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The regulation of the intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) plays an important role in many biological processes. The PMCA allows the expulsion of Ca^{2+} out of the cell with high affinity but low capacity. To better understand its role in the secretion of insulin we studied them in pancreatic β cell.

PMCA has four (4) isoforms whose PMCA1-4 which each comprise three (3) alternative splice sites A, B and C that will generate different splice variants. In purified β cells, in the RINm5F cells and in rat pancreatic islet cells, we identified the rPMCA1xb, rPMCA2yb, rPMCA2wb, rPMCA3za, rPMCA3zc and rPMCA4xb. Two additional isoforms have been found in the islet cells, so in non β cells of the islets of Langerhans, it is the rPMCA1xkb and rPMCA4za.

Whereas isoforms 1 and 4 are expressed in most tissues, isoforms 2 and 3 are expressed within specialized tissues. The presence of these specialized isoforms in islets indicates that the regulation of calcium homeostasis in these cells is specific and requires specialized ATPases. The β cell is equipped with a variety of PMCA regulated differently, which gives the PMCA different possibility of regulation of calcium homeostasis.

KEYWORDS: Diabetes, Insulin, PMCA, Calcium, β cell.

RESUME: La Régulation de la concentration de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques. La PMCA permet l'expulsion du Ca^{2+} hors de la cellule avec une grande affinité mais une faible capacité. Pour mieux comprendre son rôle dans la sécrétion d'insuline nous l'avons étudié dans la cellule β des îlots de Langerhans.

La PMCA a quatre (4) isoformes dont les PMCA1-4 qui comportent chacune trois (3) sites d'épissage alternatif A, B et C qui vont générer différents variants d'épissage. Dans les cellules β purifiées, dans les cellules RINm5F et dans les îlots Pancréatiques de rat, nous avons identifié la rPMCA1xb, rPMCA2yb, rPMCA2wb, rPMCA3za, rPMCA3zc et la rPMCA4xb. Deux isoformes supplémentaires ont été trouvées dans les cellules d'îlots, donc dans les cellules non β des îlots de Langerhans, il s'agit de la rPMCA1xkb et de la rPMCA4za.

Alors que les isoformes 1 et 4 sont exprimées dans la plupart des tissus, les isoformes 2 et 3 sont exprimées dans des tissus spécialisés. La présence de ces isoformes spécialisées dans les îlots indique que la régulation de l'homéostasie calcique dans ces cellules est particulière et requiert des ATPases spécialisées. La cellule β est donc équipée d'une variété de PMCA régulées différemment, ce qui donne à la PMCA différentes possibilités de régulation de l'homéostasie calcique.

MOTS-CLEFS: Diabète; Insuline; PMCA; Calcium; cellules β .

1 INTRODUCTION

L'ion calcium (Ca^{2+}) agit comme un second messenger intracellulaire ubiquiste dans le fonctionnement de la cellule eucaryote. Les changements de la concentration de calcium intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sont sous contrôle spatio-temporel très rigoureux. L'homéostasie calcique vise à maintenir la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à l'état basal, qui se situe aux alentours de 100 nM dans la plupart des cellules. Le Ca^{2+} extracellulaire entrant lors d'une dépolarisation membranaire entraîne une augmentation de la quantité totale de Ca^{2+} dans la cellule. Si cette quantité totale n'était pas contrôlée, l'entrée de Ca^{2+} entraînerait à la longue une surcharge de l'ion divalent dans la cellule. Par ailleurs, le maintien d'une concentration calcique élevée dans le cytoplasme pendant un temps prolongé est cytotoxique et est à la base de la mort cellulaire induite par de nombreux agents tant chimiques que physiques [1]. Donc, le maintien de l'homéostasie calcique nécessite la présence de systèmes d'expulsion du Ca^{2+} pour compenser l'influx de Ca^{2+} extracellulaire. Deux systèmes localisés dans la membrane plasmique sont responsables de l'expulsion du Ca^{2+} hors de la cellule: la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique (PMCA) et l'échange Na/Ca [2-4]. Alors que la Ca^{2+} -ATPase est un système à haute affinité mais à faible capacité pour le Ca^{2+} , l'échange Na/Ca est un système de faible affinité mais à grande capacité pour l'ion divalent [5].

Etant donnée leur grande affinité pour le calcium ($K_{1/2}(\text{Ca}^{2+}) \sim 0.2-0.5 \mu\text{M}$), les PMCA jouent un rôle important dans le maintien de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ autour de la concentration basale dans la cellule au repos [6]. Une implication de la PMCA dans la régulation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est suggérée par la multitude de ses isoformes et variants d'épissage, permettant différentes possibilités de transport et de régulation.

2 CARACTERISTIQUES MOLECULAIRES DE LA PROTEINE

2.1 CLONAGE ET LOCALISATION CHROMOSOMIQUE DE LA PROTEINE

Les études menées sur des cellules de mammifères ont permis d'identifier quatre isoformes différentes de la PMCA, appelées PMCA 1, 2, 3 et 4. Les ADNc entiers codant pour ces différentes isoformes ont été identifiés chez le rat [7-9] et chez l'homme [10-13]. Les 4 gènes sont localisés dans les loci chromosomiques 12q21-q23 pour la PMCA1, 3p25-p26 pour la PMCA2, Xq28 pour la PMCA3 et 1q25-q32 pour la PMCA4 [11; 14-16].

2.2 L'OPTION D'ÉPISSAGE ALTERNATIF

Une diversité additionnelle au sein des 4 PMCA est générée par un épissage alternatif des transcrits primaires. L'existence de l'épissage alternatif dans les transcrits de la PMCA a été suggérée pour la première fois par [7] et démontrée pour la première fois dans la PMCA1 humaine (hPMCA1) par [17]. L'épissage alternatif implique 3 sites appelés A, B et C [13; 18] et plus de 30 variants d'épissage se sont avérées possibles. La Figure 1 présente un résumé des variants d'épissage alternatif identifiés aux sites A, B et C.

2.2.1 L'ÉPISSAGE ALTERNATIF AU SITE A

Le site d'épissage alternatif A est situé en amont du domaine de fixation de phospholipides acides [19]. Ceci pourrait suggérer que l'épissage alternatif au site A joue un rôle dans la régulation par les phospholipides acides. Les options d'épissage alternatif au site A (Figure 5) ont été caractérisées dans les 4 isoformes de la PMCA aussi bien chez l'homme que chez le rat [9; 20-22]. L'épissage implique un exon de 36-42 nucléotides (nt) présent dans tous les gènes de la PMCA et codant pour une petite séquence localisée sur la deuxième boucle intracellulaire de la protéine. Cet exon peut être inséré ou excisé de l'ARNm des gènes PMCA, à l'exception de la PMCA1. Dans le cas de la PMCA1, il existe un exon de 39 nt qui n'est pas épissé et qui est donc présent dans tous les transcrits, générant le variant d'épissage 'x'. Dans le cas de la PMCA2, il existe 3 exons de 33, 60 et 42 nt qui peuvent être épissés pour donner les variants d'épissage 'w' (les 3 exons sont inclus), 'z' (les 3 exons sont exclus), 'x' (seul l'exon de 42 nt est inclus) et 'y' (les exons de 33 et 60 nt sont inclus). Chez l'homme, seules les variants d'épissage 'w', 'x' et 'z' sont présents, alors que chez le rat, un variant d'épissage 'y' additionnel est détecté [23]. Dans le cas des PMCA 3 et 4, un seul exon de 42 et 36 nt, respectivement, peut être inclus pour donner le variant d'épissage 'x', ou exclu pour donner le variant d'épissage 'z'.

2.2.2 L'ÉPISSAGE ALTERNATIF AU SITE B

L'isolement de l'ADNc de la PMCA4 humaine présentant la délétion d'un exon de 108 nt dans la région codant pour l'extrémité COOH-terminale a permis à Strehler *et al.* [18; 24] de suggérer qu'un épissage alternatif puisse se produire

également au site B. Cette hypothèse a été confirmée par la découverte chez l'homme de l'épissage alternatif de l'exon de 108 nt de la PMCA1 [25]. Différents ADNc et produits PCR correspondant à l'épissage alternatif des transcrits PMCA1 et PMCA4 humains (hPMCA1 et 4) au site B ont été isolés. Cependant, ils représentent une infime partie de l'ARNm total et ont été trouvés uniquement dans l'intestin et le foie [26; 27]. Les différents échecs liés à l'identification positive de variants d'épissage, suivis des faibles quantités trouvées dans le cas où ils ont été détectés, suggèrent que les ARNm présentant une délétion de l'exon de 108 nt résultent d'une erreur dans la machinerie d'épissage [28-30].

Ces données appliquées au modèle à 10 domaines transmembranaires de la PMCA amènent à la conclusion que l'épissage alternatif au site B altère la topologie de la PMCA avec comme conséquence la bascule de la région COOH-terminale de l'espace intracellulaire à l'espace extracellulaire. La surexpression de la hPMCA4 présentant une délétion de l'exon au site B dans les cellules Sf9 d'insectes a montré que la protéine n'était pas active. Lors de sa surexpression dans les cellules COS, elle était retenue dans le réticulum endoplasmique tout en exposant sa région COOH-terminale dans le cytoplasme, ce qui suggère qu'un certain nombre de régions transmembranaires avaient été éliminées [31]. Considérant ces différentes données, un doute demeure quant à la signification physiologique de l'épissage alternatif au site B.

2.2.3 L'ÉPISSAGE ALTERNATIF AU SITE C

Le site d'épissage alternatif C est situé sur la boucle cytoplasmique COOH-terminale et dans le domaine de régulation de la CaM. L'épissage alternatif au site C (Figure 6) affecte l'affinité de la pompe pour la calmoduline ainsi que l'activité d'autoinhibition exercée par le domaine de fixation de la CaM [32]. L'épissage se produit dans les quatre isoformes de la PMCA, avec différents degrés de complexité. Au site C, les ARNm provenant du gène de la PMCA1 présentent 5 variants d'épissage connus (a, b, c, d, e). Cet épissage conduit à l'insertion ou à l'exclusion d'un exon de 154 nt contenant 3 sites internes donneurs d'épissage à partir desquels les inserts correspondant à 87, 114 ou 152 nt sont obtenus [17; 29; 30]. L'épissage alternatif au site C de la PMCA2 est caractérisé par 2 exons (172 et 55 nt). L'exon de 172 nt ou les 2 exons peuvent être inclus pour donner les variants d'épissage '2c' ou '2a', respectivement [29; 30]. La PMCA3 contient 2 exons, un exon de 68 nt (exon 22 dans le gène du rat) suivi d'un autre exon de 154 nt (exon 23 dans le gène du rat) qui peuvent être inclus ou excisés. L'exon de 154 nt contient des sites multiples internes donneurs d'épissage et est analogue à l'exon de 154 nt de la PMCA1. Le variant d'épissage présentant l'exon de 154 nt est appelé '3a'. Pour les variants d'épissage utilisant les sites donneurs d'épissage en position 87 et 114 à l'intérieur de l'exon de 154 nt, on obtient les isoformes '3c' et '3d', respectivement. Le variant '3e' est généré par addition de 88 nt contenant un poly(A) à l'exon de 154 nt, ce qui conduit à une protéine dont la région COOH-terminale est plus courte que celle de la '3a' [20]. L'inclusion de l'exon de 68 nt en amont de l'exon de 154 nt donne le variant '3f'. Dans le cas de la PMCA4, l'épissage alternatif conduit à l'inclusion ou l'exclusion d'un exon de 178 nt chez l'homme (175 nt chez le rat) et génère les isoformes '4a' ou '4b', respectivement [29; 33]. Pour les 4 isoformes de la PMCA, le variant 'b' correspond au cas où il n'y aurait pas d'inclusion d'exons.

2.3 DISTRIBUTION TISSULAIRE DES PMCAS ET DE SES VARIANTS D'ÉPISSAGE

Des études ont montré que l'expression des différentes isoformes de la PMCA était tissu spécifique [8; 21; 29; 33]. Alors que les isoformes 1 et 4 sont exprimées dans la plupart des tissus, les isoformes 2 et 3 sont exprimées de façon plus restreinte chez l'adulte, et ne sont détectées en abondance que dans le cerveau et les muscles striés (cerveau pour la PMCA2 et muscle squelettique pour la PMCA3) (Tableaux 2 et 3). La PMCA2 est également présente dans l'utérus, le foie et les reins. L'expression de la PMCA3 est encore beaucoup plus restreinte, et chez le rat n'est trouvée en abondance que dans le muscle squelettique, alors que chez l'homme, elle n'est présente que durant le développement de l'embryon [8].

3 DISTRIBUTION DES PMCAS DANS LES ÎLOTS DE LANGERHANS

Nous avons utilisé la RT-PCR pour identifier les variants d'épissage de la rPMCA1, rPMCA2, rPMCA3 et rPMCA4 aux sites A, B et C, dans les cellules insulaires en utilisant des amorces spécifiques autour des sites d'épissage. Au site A, les données obtenues indiquent que la PMCA 1x, 2y, 2w, 3z et 4x et 4z sont exprimées dans les cellules d'îlots de Langerhans. Pour les deux sites B et C, les données obtenues indiquent que les PMCA1b, 2b, 3a, 3c et 4b sont exprimées dans les cellules d'îlots de Langerhans, et ne présentent pas d'épissage au site B. Par contre, il existe une PMCA1b avec épissage au site B et une PMCA4a sans épissage au site B exprimées dans les cellules d'îlots de Langerhans.

L'analyse de l'épissage alternatif aux sites A, B, et C permet de conclure que huit variants d'épissage alternatif sont exprimés (rPMCA1xb, 1xkb, 2yb, 2wb, 3za, 3zc, 4xb, 4za) dans les cellules d'îlots pancréatiques de rat. Le variant rPMCA1xkb correspond à un nouveau variant d'épissage de la rPMCA1 manquant l'exon codant pour le 10^{ème} segment transmembranaire, au site d'épissage alternatif B.

Notre étude a montré que cinq sous isoformes de la PMCA sont fortement transcrites, ce sont les rPMCA1xb (15%), rPMCA2wb (22%), rPMCA3za (18%), rPMCA3zc (13%) et rPMCA4xb (23%); et deux sous isoformes sont faiblement transcrites ce sont les rPMCA2yb (4%) et rPMCA4za (5%). Cinq variants d'épissage (rPMCA1xb, 2wb, 3za, 3zc, 4xb) prédominent sur le plan des taux ARNm et protéique, alors qu'un autre variant d'épissage (rPMCA4za) ne prédomine que sur le plan du taux protéique. Notre travail est le premier à démontrer l'expression de quantités substantielles de PMCA2 et PMCA3 au niveau protéique dans un tissu non neuronal.

La cellule β est donc équipée d'un ensemble d'isoformes de la PMCA, avec comme avantage, différentes possibilités de régulations de celles-ci par la $[Ca^{2+}]_i$.

4 ROLE PHYSIOLOGIQUE DE LA PROTEINE

Pour de nombreuses raisons, déterminer le rôle physiologique de chaque isoforme de la PMCA et des ses variants d'épissage dans les cellules intactes reste une chose extrêmement difficile. Une des raisons est le fait qu'il n'y ait pas d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des PMCA, ce qui freine notre compréhension de la fonction de ces pompes dans les cellules vivantes ou tissus. Par ailleurs, il a été montré que les PMCA ont une capacité faible de transport des ions Ca^{2+} qui est de l'ordre de 10-50 transloqués/s [34]. Ce taux est considéré comme en dessous de ce qui est nécessaire pour mesurer avec succès l'activité de la pompe par des méthodes standard comme le patch clamp qui a fait ses preuves dans le domaine des canaux ioniques (dans le cas où la PMCA serait électrogène). Compte tenu de la multitude d'isoformes de la PMCA et de ses variants d'épissage, leur étude dans des systèmes *in vivo* reste difficile. Au vu de ces limites technologiques, nos connaissances sur le rôle physiologique spécifique de chaque isoforme de la PMCA et de ses variants d'épissage, dans un type de cellule spécifique et en réponse à un mouvement calcique dynamique reste peu connu. Il est néanmoins possible d'étudier la PMCA en utilisant des inhibiteurs des autres transporteurs calciques, exemple des inhibiteurs de la SERCA ("sarco/endoplasmique reticulum Ca^{2+} -ATPase") dans le RE, du transport de calcium dans la mitochondrie et de l'échange Na/Ca [35-38] ainsi qu'en utilisant des manipulations génétiques de suppression ("knock out") ou de surexpression d'une isoforme spécifique de la PMCA. Grâce à ces méthodes, la contribution des différentes isoformes de la PMCA dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire et le maintien de l'homéostasie calcique commence à être connue [39; 40]. La capture ("uptake") de $^{45}Ca^{2+}$ dans des microvésicules a permis de mesurer l'activité de la protéine et de déterminer la fonction de différentes isoformes de la PMCA et leurs variants d'épissage [41-45]. Cette méthode est donc valide pour déterminer les caractéristiques des différentes isoformes isolément ainsi que leur régulation *in vitro* par la CaM, la phosphorylation et les phospholipides acides. Cependant, ceci ne donne qu'un nombre limité d'informations sur les vraies propriétés physiologiques des différentes isoformes de la PMCA et des ses variants d'épissage dans les systèmes *in vivo*, dans lesquels différents facteurs de régulation endogène interviennent.

La PMCA est une pompe calcique de haute affinité et faible capacité pour le Ca^{2+} . Elle permet l'extrusion du Ca^{2+}_i , avec en contre courant le transport d'ions H^+ dans le cytoplasme [46]. Les ions H^+ peuvent augmenter la séquestration du Ca^{2+} dans le RE en stimulant la SERCA et en diminuant par compétition la fixation du Ca^{2+} aux protéines cytoplasmiques.

Les PMCA1 et PMCA4 sont considérées comme les "housekeepers" parce qu'elles sont présentes dans tous les tissus.

La PMCA2 est exprimée dans des tissus bien spécifiques contrairement aux PMCA1 et 4, suggérant qu'elle puisse servir à une fonction physiologique bien spécialisée. Les souris transgéniques pour la PMCA2 ont permis de montrer que la souris n'ayant pas le gène de la PMCA2 à une croissance plus lente que son hétérozygote et la souris de type sauvage. De plus, ces souris ont une démarche instable et ont des difficultés à maintenir leur équilibre. Le mutant homozygote est sourd et l'hétérozygote a de sérieux problèmes d'audition [13]. Ces données confirment le fait que la PMCA2 s'avère importante pour l'équilibre et l'audition.

La PMCA3 est exprimée dans des tissus bien spécifiques. Le gène de la PMCA3 contient dans sa région 5' non transcrite des séquences extensives de trinuécléotides répétées qui sont impliquées dans plusieurs maladies telles que le Syndrome du X Fragile, la Dystrophie Myotonique, et la Maladie de Huntington. Par ailleurs, la PMCA3 est potentiellement impliquée dans des désordres neuromusculaires héréditaires.

5 DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons identifié les isoformes et variants d'épissage de la PMCA aux trois sites A, B et C dans les cellules β purifiées, dans les cellules RINm5F et dans les cellules d'îlots de Langerhans de rat. Les données obtenues suggèrent l'expression de la rPMCA1xb, rPMCA2yb, rPMCA2wb, rPMCA3za, rPMCA3zc et la rPMCA4xb dans les cellules β purifiées, dans les cellules RINm5F et dans les cellules d'îlots pancréatique de rat. Deux isoformes supplémentaires ont été

trouvées dans les cellules d'îlots, donc dans les cellules non β des îlots de Langerhans, il s'agit de la rPMCA1xkb et de la rPMCA4za.

Le site A de la PMCA est situé près du domaine de fixation des phospholipides [19]. Les études menées sur le site A de la PMCA2 ont montré qu'il n'y avait pas de différence fonctionnelle entre les variants d'épissage [41].

Le site C d'épissage alternatif des PMCA se trouve au milieu de la région codant pour le domaine de fixation de la calmoduline [8]. Le domaine de fixation de la calmoduline est composé de 28 acides aminés riches en résidus hydrophobes [47]. En se fixant à cette région, la calmoduline stimule la pompe en augmentant sa vitesse maximale et son affinité pour le Ca^{2+} . Le domaine de fixation de la calmoduline est une région d'autoinhibition de la pompe [47]. Il en résulte que l'insertion d'un exon au site C altère l'affinité de la pompe pour la calmoduline [8]. Ces isoformes pourraient avoir une activité basale élevée servant au transport du Ca^{2+} à $[\text{Ca}^{2+}]_i$; basale faible ou lorsqu'il n'y a plus suffisamment de calmoduline disponible pour activer la pompe [34].

L'expression de ces différentes isoformes est tissu spécifique. Alors que les isoformes 1 et 4 sont exprimées dans la plupart des tissus, les isoformes 2 et 3 sont exprimées dans des tissus spécialisés [17; 20; 29; 33]. Dans la cellule β , les isoformes 1 et 4 sont de type 'b' au niveau du site C, et de type 'x' au niveau du site A. Par contre pour les isoformes 2 et 3, on a les types 'a', 'b', 'c' au niveau du site C, et 'w', 'y', 'z' au niveau du site A.

Au niveau protéique, la PMCA2wb est bien exprimée, ainsi que les deux autres isoformes de la PMCA3. La présence de ces isoformes spécialisées dans les îlots indique que la régulation de l'homéostasie calcique dans ces cellules est particulière et requiert des ATPases spécialisées. La cellule β est donc équipée d'une variété de PMCA régulées différemment dont certaines sont tissus spécifiques. Ceci donne à la PMCA la possibilité de jouer un rôle important dans l'homéostasie calcique et la sécrétion d'insuline.

Tableau 1 : Identification de la taille des différents isozymes de la PMCA

PMCA	Molecular Mass (kDa)
rPMCA1xb	134.20
rPMCA1xkb	130.24
rPMCA2yb	135.19
rPMCA2wb	136.73
rPMCA3za	127.49
rPMCA3zc	135.96
rPMCA4za	127.27
rPMCA4xb	133.65

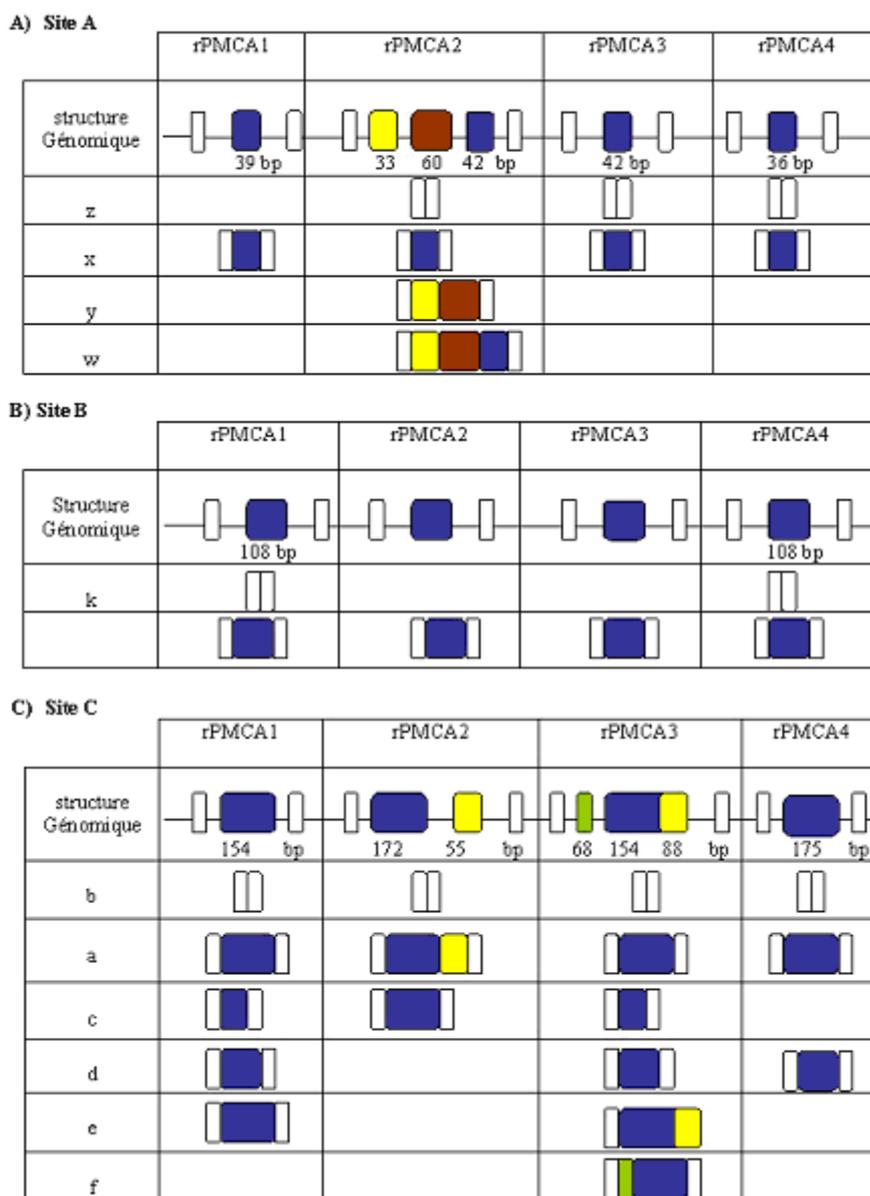


Figure 1 : Résumé de l'épissage alternatif au site A (A), au site B (B) et au site C (C)

L'épissage alternatif aux sites A, B et C est montré pour chacun des 4 gènes de la rPMCA. Les exons qui subissent un épissage alternatif sont présentés en bleu, vert, marron et jaune avec leur taille nucléotidique (nt). Les introns sont représentés par de simples barres. Les variants d'épissage alternatif obtenus sont indiqués par des lettres.

REFERENCES

- [1] B. F. Trump, and I. K. Berezsky, "The role of altered $[Ca^{2+}]_i$ regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis", *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1313, pp. 173-178, 1996.
- [2] E. Carafoli, "Intracellular calcium homeostasis", *Annu. Rev. Biochem.*, Vol. 56, pp. 395-433, 1987.
- [3] R. J. Miller, "The control of neuronal Ca^{2+} homeostasis" *Prog. Neurobiol.*, vol. 37, pp. 255-285, 1991.
- [4] M. P. Blaustein, W. F. Goldman, G. Fontana, B. K. Krueger, E. M. Santiago, T. D. Steele, D. N. Weiss, and P. J. Yarowsky, "Physiological roles of the sodium-calcium exchanger in nerve and muscle", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 639, pp. 254-274, 1991.
- [5] E. Carafoli, "Membrane transport of calcium: an overview", *Methods Enzymol.*, vol. 157, pp. 3-11, 1988.

- [6] E. Carafoli, "Calcium pump of the plasma membrane", *Physiol. Rev.*, vol. 71, pp. 129-153, 1991.
- [7] G. E. Shull, and J. Greeb, "Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na^+ , K^+ - and other cation transport ATPases", *J. Biol. Chem.*, vol. 263, pp. 8646-8657, 1988.
- [8] J. Greeb, and G. E. Shull, "Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle", *J. Biol. Chem.*, vol. 264 pp.18569-18576, 1989.
- [9] T. P. Keeton, and G. E. Shull, "Primary structure of rat plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice site A", *Biochem. J.*, vol. 306, pp. 779-785, 1995.
- [10] R. Kumar, J. D. Haugen, and J. T. Penniston, "Molecular cloning of a plasma membrane calcium pump from human osteoblasts", *J. Bone Miner. Res.* Vol. 8, pp. 505-513, 1993.
- [11] P. Brandt, E. Ibrahim, G. A. Bruns, and R. L. Neve, "Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca^{2+} -pumping ATPase isoform PMCA2", *Genomics*, vol. 14, pp. 484-487, 1992.
- [12] B. J. Brown, H. Hilfiker, S. J. DeMarco, D. A. Zacharias, T. M. Greenwood, D. Guerini, and E. E. Strehler, "Primary structure of human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3", *Biochim. Biophys. Acta*, vol.1283, pp. 10-13, 1996.
- [13] E. E. Strehler, P. James, R. Fischer, R. Heim, T. Vorherr, A.G. Filoteo, J.T. Penniston, and E. Carafoli, "Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in the human erythrocyte membrane", *J. Biol. Chem.* Vol. 265, pp. 2835-2842, 1990.
- [14] F. Latif, F. M. Duh, J. Gnarra, K. Tory, I. Kuzmin, M. Yao, T. Stackhouse, W. Modi, L. Geil, and L. Schmidt, "von Hippel-Lindau syndrome: cloning and identification of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase isoform 2 gene that resides in the von Hippel-Lindau gene region", *Cancer Res.*, Vol. 53, pp. 861-867, 1993.
- [15] S. Olson, M. G. Wang, E. Carafoli, E. E. Strehler, and O. W. McBride, "Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPases to human chromosomes 1q25-32 and 12q21-23", *Genomics*, vol. 9, pp. 629-641, 1991.
- [16] M. G. Wang, H. Yi, H. Hilfiker, E. Carafoli, E. E. Strehler, and O. W. McBride, "Localization of two genes encoding plasma membrane Ca^{2+} ATPases isoforms 2 (ATP2B2) and 3 (ATP2B3) to human chromosomes 3p26-->p25 and Xq28, respectively", *Cytogenet. Cell Genet.*, vol. 67, pp. 41-45, 1994.
- [17] E. E. Strehler, M. A. Strehler-Page, G. Vogel, and E. Carafoli, "mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, pp. 6908-6912, 1989.
- [18] E. E. Strehler, "Plasma membrane Ca^{2+} pumps and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers", *Semin. Cell. Biol.*, vol. 1, pp. 283-295, 1990.
- [19] E. Zvaritch, P. James, T. Vorherr, R. Falchetto, N. Modyanov, and E. Carafoli, "Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca^{2+} pump using trypsin proteolysis", *Biochemistry*, vol. 29, pp. 8070-8076, 1990.
- [20] S. E. Burk, and G.E. Shull, "Structure of the rat plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products. Skeletal muscle-specific splicing results in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase with a novel calmodulin-binding domain", *J. Biol. Chem.*, vol. 267, pp. 19683-19690, 1992.
- [21] T. P. Stauffer, H. Hilfiker, E. Carafoli, and E. E. Strehler, "Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes", *J. Biol. Chem.*, Vol. 268, pp. 25993-26003, 1993.
- [22] D. A. Zacharias, S. J. Dalrymple, and E. E. Strehler, "Transcript distribution of plasma membrane Ca^{2+} pump isoforms and splice variants in the human brain", *Brain Res. Mol. Brain Res.*, pp. 28, pp. 263-272, 1995.
- [23] H. P. Adamo, and J. T. Penniston, "New Ca^{2+} pump isoforms generated by alternative splicing of rPMCA2 mRNA", *Biochem. J.* 283: 355-359, 1992.
- [24] E. E. Strehler, R. Heim, R. Fischer, P. James, T. Vorherr, G. Vogel, M. A. Strehler-Page, and E. Carafoli, "The plasma membrane Ca^{2+} pump : structural, functional and genetic aspects of isoform diversity. In : J. Nunez and J.E. Dumont (Eds), *Hormones and Cell Regulation*, London: Libby Eurotext, pp. 105-110, 1989.
- [25] H. Hilfiker, M. A. Strehler-Page, T.P. Stauffer, E. Carafoli, and E.E. Strehler, "Structure of the gene encoding the human plasma membrane calcium pump isoform 1", *J. Biol. Chem.* 268: 19717-19725, 1993.
- [26] A. Howard, N. F. Barley, S. Legon, and J. R. Walters, "Plasma-membrane calcium-pump isoforms in human and rat liver" *Biochem. J.*, vol. 303, pp. 275-279, 1994.
- [27] A. Howard, S. Legon, and J. R. Walters, "Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms" *Am. J. Physiol.*, vol. 265, pp. G917-G925, 1993.
- [28] A. Kamagate, A. Herchuelz, A. Bollen, and F. Van Eylen, "Expression of multiple plasma membrane Ca^{2+} -ATPases in rat pancreatic islet cells", *Cell Calcium*, vol. 27, pp. 231-246, 2000.
- [29] T. P. Keeton, S. E. Burk, and G. E. Shull, "Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4", *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp. 2740-2748, 1993.

- [30] T. P. Stauffer, H. Hilfiker, E. Carafoli, and E. E. Strehler, "Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes" *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp. 25993-26003, 1993.
- [31] B. S. Preiano, D. Guerini, and E. Carafoli, "Expression and functional characterization of isoforms 4 of the plasma membrane calcium pump", *Biochemistry*, vol. 35, pp. 7946-7953, 1996.
- [32] A. Enyedi, A. G. Filoteo, G. Gardos, and J. T. Penniston, "Calmodulin-binding domains from isozymes of the plasma membrane Ca^{2+} pump have different regulatory properties", *J. Biol. Chem.*, vol. 266, pp. 8952-8956, 1991.
- [33] P. Brandt, R. L. Neve, A. Kammesheidt, R. E. Rhoads, and T. C. Vanaman, "Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels", *J. Biol. Chem.*, vol. 267, pp. 4376-4385, 1992.
- [34] B. Sarkadi, "Active calcium transport in human red cells", *Biochim. Biophys. Acta* 604: 159-190, 1980.
- [35] D. F. Babcock, and B. Hille, "Mitochondrial oversight of cellular Ca^{2+} signaling", *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 8, pp. 398-404, 1998.
- [36] J. Herrington, Y. B. Park, D. F. Babcock, and B. Hille, "Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca^{2+} loads from rat adrenal chromaffin cells", *Neuron*, vol. 16, pp. 219-228, 1996.
- [37] J. L. Werth, and S. A. Thayer, "Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons", *J. Neurosci.*, vol. 14, pp. 348-356, 1994.
- [38] J. L. Werth, Y. M. Usachev, and S. A. Thayer, "Modulation of calcium efflux from cultured rat dorsal root ganglion neurons", *J. Neurosci.*, vol. 16, pp. 1008-1015, 1996.
- [39] P. C. Brandt, J. E. Sisken, R. L. Neve, and T. C. Vanaman, "Blockade of plasma membrane calcium pumping ATPase isoform 1 impairs nerve growth factor-induced neurite extension in pheochromocytoma cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, pp. 13843-13848, 1996.
- [40] B. F. Liu, X. Xu, R. Fridman, S. Muallem, and T. H. Kuo, "Consequences of functional expression of the plasma membrane Ca^{2+} pump isoform 1a", *J. Biol. Chem.*, vol. 271, pp. 5536-5544, 1996.
- [41] H. Hilfiker, D. Guerini, and E. Carafoli, "Cloning and expression of isoform 2 of the human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. Functional properties of the enzyme and its splicing products", *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pp. 26178-26183, 1994.
- [42] H. P. Adamo, A. K. Verma, M. A. Sanders, R. Heim, J. L. Salisbury, E.D. Wieben, and J. T. Penniston, "Overexpression of the erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} pump in COS-1 cells", *Biochem. J.*, vol. 285, pp. 791-797, 1992.
- [43] A. J. Caride, N. L. Elwess, A. K. Verma, A. G. Filoteo, A. Enyedi, Z. Bajzer, and J. T. Penniston, "The rate of activation by calmodulin of isoform 4 of the plasma membrane Ca^{2+} pump is slow and is changed by alternative splicing" *J. Biol. Chem.*, vol. 274, pp. 35227-35232, 1999.
- [44] A. Enyedi, A. K. Verma, R. Heim, H. P. Adamo, A. G. Filoteo, E. E. Strehler, and J. T. Penniston, "The Ca^{2+} affinity of the plasma membrane Ca^{2+} pump is controlled by alternative splicing" *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pp. 41-43, 1994.
- [45] R. Heim, T. Iwata, E. Zvaritch, H. P. Adamo, B. Rutishauser, E. E. Strehler, D. Guerini, and E. Carafoli, "Expression, purification, and properties of the plasma membrane Ca^{2+} pump and of its N-terminally truncated 105-kDa fragment", *J. Biol. Chem.*, vol. 267, pp. 24476-24484, 1992.
- [46] L. Hao, J. L. Rigaud, and G. Inesi, " $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ countertransport and electrogenicity in proteoliposomes containing erythrocyte plasma membrane Ca-ATPase and exogenous lipids", *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pp. 14268-14275, 1994.
- [47] J. T. Penniston, and A. Enyedi, "Plasma Membrane Ca^{2+} Pump: Recent Developments", *Cell Physiol. Biochem.*, vol. 4, pp. 148-159, 1994.
- [48] A., Varadi, E. Molnar, and S. J. Ashcroft, "A unique combination of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoforms is expressed in islets of Langerhans and pancreatic beta-cell lines", *Biochem. J.*, vol. 314, pp. 663-669, 1996.