

## ÜBER EINEN ENERGIEUNABHÄNGIGEN $\text{Me}^{2+}\text{-H}^+$ -AUSTAUSCH IN DER AUßENMEMBRAN VON RATTENLEBERMITOCHONDRIEN UND SEINE BEZIEHUNGEN ZUM ENERGIEUNABHÄNGIGEN $\text{Me}^+\text{-H}^+$ -AUSTAUSCH

G. LUTZE und W. LIESE

*Physiologisch-Chemisches Institut und Zentrallabor der  
Medizinischen Akademie Magdeburg, DDR*

Received 27 February 1974

Intact mitochondria are able to bind monovalent and divalent metal cations and to release protons in an energy-independent exchange process. Directly accessible binding sites exist in the outer membrane. They seem to be identical for monovalent and divalent metal ions. The inner membrane-matrix-fraction possesses exchange sites after ultrasonic disruption only for monovalent cations, but not for divalent cations.

### 1. Einleitung

Über einen energieunabhängigen Austausch von Alkalimetallionen gegen Protonen in der Außenmembran und in der Innenmembran-Matrix-Fraktion von Rattenlebermitochondrien haben wir in mehreren Mitteilungen berichtet [1–4]. Während bei intakten Mitochondrien nur Austauschorte in der Außenmembran nachweisbar sind, werden nach Desintegration weitere Austauschstellen, die in der Innenmembran-Matrix-Fraktion lokalisiert sind, zugänglich.

Mitteilungen über die energieunabhängige Bindung divalenter Kationen durch Mitochondrien [5–15] waren der Anlaß, diesen Vorgang im Hinblick auf einen Protonenaustausch näher zu untersuchen. Es konnte ermittelt werden, daß nur in der Außenmembran von Mitochondrien ein Austausch von divalenten Kationen gegen Protonen erfolgt, wobei die Austauschorte für mono- und divalente Kationen anscheinend identisch sind. In der Innenmembran-Matrix-Fraktion konnten im Gegensatz zu monovalenten Kationen keine Austauschorte für divalente Kationen nachgewiesen werden.

### 2. Methodik

Mitochondrien wurden aus Lebern von Albinoratten des Stammes Wistar-Rehbrücke präpariert [16]. Die Präparation mitochondrialer Membranfraktionen erfolgte mit Digitonin nach Schnaitman et al. [17]. Für die Ultrabeschallung der Mitochondrien und der Digitoninpartikel wurde ein MSE 100 Watt Ultrasonic Disintegrator verwendet. Die Aktivität der Monoaminoxidase (MAO) wurde nach Tabor et al. bestimmt [18].

Die Messung der Protonenfreisetzung und die Proteinbestimmung erfolgten wie früher beschrieben [1, 19–21]. Die maximale Protonenfreisetzung wurde bei Metallionenkonzentrationen, die der 10fachen Halbsättigungskonstanten entsprachen, gemessen. Das Inkubationsmedium bestand aus 250 mM Saccharose + 20 mM Tris-HCl, pH 7,15. Es wurden 5–7 mg Mitochondrienprotein/1,5 ml Inkubationsmedium eingesetzt; die Temperatur im Medium betrug 22°C. Zur Unterbindung energiebedürftiger Ionenakkumulationen wurden die Mitochondrien 1 min mit Rotenon (1,2 µM Endkonzentration) vorinkubiert.

3. Ergebnisse

3.1. Halbsättigungskonstanten des Metallionen-Protonen-Austausches und maximale Protonenfreisetzung

Bei Anwesenheit kleiner  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen im Medium erfolgt durch atemungsgehemmte Mitochondrien eine Protonenfreisetzung (Abb. 1, Tabelle 1). Diese Protonenfreisetzung verläuft im Sinne eines Sättigungsprozesses, der durch Ultraschallung der Mitochondrien nicht beeinflusst wird. Ähnlich verlaufende Sättigungskurven werden auch mit  $Sr^{2+}$  oder  $Mg^{2+}$  im Medium erhalten. Die Halbsättigungskonstanten für divalente Kationen betragen sowohl bei intakten als auch bei ultraschallten Mitochon-

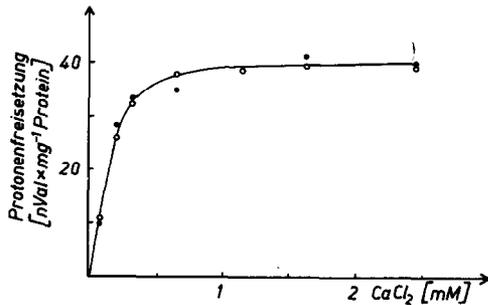


Abb. 1.  $Ca^{2+}$ -bedingte Protonenfreisetzung bei intakten (○—○) und ultraschallten (●—●) Mitochondrien (Exp. 8).

drien etwa 0,15 mM. Die maximale Protonenfreisetzung ist ebenfalls unabhängig von der Art des divalenten Kations und der strukturellen Integrität. Dagegen sind für monovalente Kationen die Halbsättigungskonstanten wesentlich höher (Tab. 1 und [3]), wobei ein deutlicher Unterschied zwischen intakten und ultraschallten Mitochondrien besteht. Die maximale Protonenfreisetzung durch Alkaliionen ist bei intakten Mitochondrien zwar von gleicher Größe wie die durch divalente Metallionen, jedoch führt Ultraschallung nur im alkaliionenhaltigen Medium zu einer Erhöhung der Protonenfreisetzung. Vorinkubation mit divalenten Metallionen verhindert eine alkaliionenbedingte Protonenfreisetzung.

3.2. Lokalisation des Metallionen-Protonen-Austausches

3.2.1. Lokalisation in der Außenmembran

In Abb. 2 sind die  $Ca^{2+}$ -bedingte Protonenfreisetzung und die spezifische Aktivität der Monoaminoxidase als Leitenzym der Außenmembran dargestellt. Zwischen beiden besteht bei intakten Mitochondrien und bei Digitoninpartikeln eine enge Korrelation, so daß bei den einzelnen Fraktionen annähernd identische  $H^+$ /MAO-Quotienten resultieren. Eine Beziehung zwischen Protonenfreisetzung und der Aktivität der Succinatdehydrogenase als Leitenzym der Innenmembran ließ sich nicht nachweisen. Die gleichen Beziehungen zwischen Protonenfreisetzung und Aktivität der Monoaminoxidase wurden auch mit monovalenten Kationen beobachtet [1].

Tabelle 1  
Halbsättigungskonstanten (Exp. 7-17) und maximale Protonenfreisetzung (Exp. 21) durch intakte und ultraschallte Mitochondrien bei Anwesenheit mono- und divalenter Kationen

Kation	Halbsättigungskonstanten [mM]		Maximale Protonenfreisetzung [nVal x mg <sup>-1</sup> Protein]	
	intakte Mito	ultraschallte Mito	intakte Mito	ultraschallte Mito
$Ca^{++}$	0,15	0,15	30	31
$Sr^{++}$	0,15	0,15	30	33
$Mg^{++}$	0,15	n.b.	31	32
$Na^+$	15	35	32	54
$K^+$	8	35	32	59

(n.b. = nicht bestimmt)

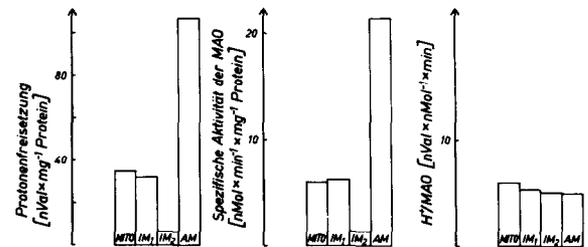


Abb. 2.  $Ca^{2+}$ -bedingte Protonenfreisetzung und spezifische Aktivität der Monoaminoxidase bei intakten Mitochondrien und Digitoninpartikeln (Exp. 23). MITO: intakte Mitochondrien; IM<sub>1</sub>: Innenmembran-Matrix-Fraktion (1 mg Digitonin/10 mg Protein); IM<sub>2</sub>: Innenmembran-Matrix-Fraktion (2 mg Digitonin/10 mg Protein); AM: Außenmembranfraktion (Überstände von IM<sub>1</sub> und IM<sub>2</sub>).

### 3.2.2. Lokalisation in der Innenmembran-Matrix-Fraktion

Abb. 3 zeigt die Protonenfreisetzung nach Ultraschallung von intakten Mitochondrien und von Digitoninpartikeln. Bei einer Inkubation mit  $\text{Ca}^{2+}$  resultierte keine Veränderung der Protonenfreisetzung, wohl aber bei einer Inkubation mit  $\text{K}^+$ . In den Fraktionen, die Innenmembran-Matrix-Anteile enthalten (MITO,  $\text{IM}_1$  und  $\text{IM}_2$ ), steigt nach Ultraschallung die  $\text{K}^+$ -bedingte Protonenfreisetzung an, nicht aber in der Außenmembranfraktion.

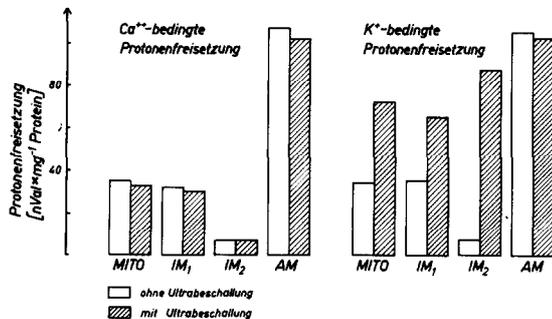


Abb. 3: Einfluß der Ultraschallung von intakten Mitochondrien und Digitoninpartikeln auf die  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{K}^+$ -bedingte Protonenfreisetzung (Exp. 23). (Abkürzungen s. Legende zu Abb. 2).

## 4. Diskussion

Die dargestellten Experimente lassen in Verbindung mit vorhergehenden Arbeiten folgende Schlußfolgerungen hinsichtlich der energieunabhängigen Metallionenbindung an die Mitochondrienmembran zu:

(i) Die protonenaustauschenden Stellen intakter Mitochondrien sind auf Grund der Korrelation zur MAO-Aktivität wahrscheinlich in der Außenmembran lokalisiert, wobei ein Protonenaustausch sowohl gegen mono- als auch divalente Kationen erfolgt.

(ii) Die Bindungsorte für beide Ionengruppen sind anscheinend identisch, da maximale Protonenfreisetzen von gleicher Größe und Kompetitionen zwischen mono- und divalenten Ionen auftreten [11]. Es bestehen jedoch erhebliche Affinitätsunterschiede.

(iii) Die Lokalisation des Austausches in der Außenmembran und die prinzipiell gleichartige Bindung aktiv akkumulierbarer und nicht akkumulier-

barer Metallionen sprechen gegen eine Bedeutung dieses Austauschvorgangs für mitochondriale Transportvorgänge. Möglicherweise sind die protonenaustauschenden Stellen ein Teil der 'low-affinity binding' [10].

(iv) In der Innenmembran-Matrix-Fraktion sind frei zugängliche protonenaustauschende Orte weder für mono- noch für divalente Ionen nachweisbar. Erst nach Zerstörung der Struktur erfolgt eine Protonenfreisetzung durch Austausch gegen monovalente, nicht aber gegen divalente Kationen.

## Literatur

- [1] Lutze, G., Liese, W. und Kunz, W. (1970) FEBS Letters 8, 210.
- [2] Lutze, G., Liese, W. und Kunz, W. (1970) FEBS Letters 10, 133.
- [3] Lutze, G., Liese, W. und Kunz, W. (1972) FEBS Letters 24, 189.
- [4] Lutze, G., Liese, W., Häcker, M. R. und Kunz, W. (1973) Acta Biol. Med. Germ. 31, 667.
- [5] Chappell, J. B., Cohn, M. und Greville, G. D. (1963) in: Energy-linked Functions of Mitochondria (Chance, B., ed.), p. 232, Academic Press, New York.
- [6] Rossi, C., Azzi, A. und Azzone, G. F. (1967) J. Biol. Chem. 242, 951.
- [7] Scarpa, A. und Azzone, G. F. (1968) J. Biol. Chem. 243, 5132.
- [8] Scarpa, A. und Azzi, A. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 150, 473.
- [9] Scarpa, A. und Azzone, G. F. (1969) Biochim. Biophys. Acta 173, 78.
- [10] Reynafarje, B. und Lehninger, A. L. (1969) J. Biol. Chem. 244, 584.
- [11] Jacobus, W. E. und Brierley, G. P. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4995.
- [12] Lehninger, A. L. (1970) Biochem. J. 119, 129.
- [13] Lehninger, A. L. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 312.
- [14] Carafoli, E. und Gazzotti, P. (1973) Experientia 29, 408.
- [15] Toury, R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 307, 607.
- [16] Steinbrecht, I. und Kunz, W. (1970) Acta Biol. Med. Germ. 25, 731.
- [17] Schnaitman, C., Erwin, V. C. und Greenawalt, J. W. (1967) J. Cell Biol. 32, 719.
- [18] Tabor, C. W., Tabor, H. und Rosenthal, S. M. (1954) J. Biol. Chem. 208, 664.
- [19] Kunz, W. und Klossek, P. (1967) Acta Biol. Med. Germ. 19, 767.
- [20] Lutze, G. (1973) Biol. Rundschau 11, 40.
- [21] Gornall, A. G., Bardawill, C. J. und David, M. M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751.