

**ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN EINEM ENERGIEUNABHÄNGIGEN
K⁺-H⁺-AUSTAUSCH UND DER STRUKTURELLEN INTEGRITÄT
VON MITOCHONDRIEN UND MEMBRANPARTIKELN**

G.LUTZE, W.LIESE und W.KUNZ

Physiol.-chem. Institut der Medizinischen Akademie Magdeburg, DDR

Received 3 August 1970

Desintegration oder Alterung führt bei intakten Lebermitochondrien und bei der Innenmembran + Matrix-Fraktion (Digitonin) zu einer Zunahme der K⁺-bedingten Protonenfreisetzung, nicht jedoch bei Aussenmembranen. Es wird geschlossen, dass auch die Innenmembran + Matrix-Fraktion Austauschstellen für K⁺ enthält, die jedoch bei struktureller Integrität nicht frei zugänglich sind. Die dem intermembrane space zugewandte Seite der Innenmembran stellt möglicherweise eine Barriere für das K⁺-Ion dar.

Disintegration or altering of intact mitochondria or digitonin inner membrane + matrix particles causes an increase in K⁺-linked release of protons. This effect is not obtainable in the case of outer membranes. It is assumed, that also the inner membrane + matrix possesses exchange sites for K⁺, which are freely accessible for the potassium ion if the structural integrity is damaged. The outer layer of inner membrane seems to be a barrier for the K⁺-movement.

1. Einleitung

Aufgrund der Korrelation der K⁺-bedingten energieunabhängigen Protonenfreisetzung mit der Aktivität der Monoaminoxidase bei intakten Mitochondrien und Digitoninpartikeln konnten wir kürzlich [1] wahrscheinlich machen, dass die von Gear und Lehninger [2, 3] beschriebene, alkaliionenabhängige H⁺-Abgabe nach K⁺-Zusatz durch die mitochondriale Aussenmembran bedingt wird. Weitere Untersuchungen ergaben, dass nach Desintegration der Innenmembran + Matrix-Fraktion durch Ultraschall oder Detergentien auch diese zu einem über den Aussenmembrananteil hinausgehenden K⁺-H⁺-Austausch befähigt wird. Dieser K⁺-H⁺-Austausch ist nur nach erheblicher Strukturveränderung der Innenmembran messbar. Es ist daher anzunehmen, dass die intakte Innenmembran die Permeation des K⁺ zu weiteren Bindungsstellen verhindert.

2. Methodik

Die Präparation der Mitochondrien erfolgte aus Leber von Albinoratten des Stammes Wistar-Rehbrücke [1, 4]. Mitochondriale Aussen- und Innenmembranen wurden nach Schnaitman et al. präpariert [5], wobei 1 bzw. 2 mg Digitonin/10 mg Mitochondrienprotein eingesetzt wurden. Die Ultrabeschallung der Mitochondrien und Digitoninpartikel erfolgte mit dem MSE 100 Watt Ultrasonic Disintegrator 10 X 30 sec bei einer Amplitude von 6 μ (peak zu peak). Triton X-100 (Serva, Heidelberg) wurde den Suspensionen in einer Endkonzentration von 1% zugesetzt. Die Messung der Protonenabgabe an das K⁺-freie (250 mM Saccharose, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4) und das K⁺-haltige (250 mM Saccharose, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4; 80 mM KCl) Medium, die Berechnung der K⁺-bedingten Protonenfreisetzung und die Proteinbestimmung erfolgten wie früher beschrieben [1, 6-8].

3. Ergebnisse

Tab. 1 zeigt die K^+ -bedingte Protonenfreisetzung in Abhängigkeit vom Alter und von der Aufbewahrungs-temperatur der Mitochondriensuspension. Nach 4 h bei 0° ist die H^+ -Freisetzung geringfügig, nach 24 h erheblich gegenüber dem Ausgangswert angestiegen. Höhere Temperaturen fördern die H^+ -Freisetzung. Nach Lysis der Mitochondrien mit Triton X-100 betrug das Maximum der Protonenfreisetzung bei den einzelnen Präparationen das 2–4 fache gegenüber intakten Mitochondrien.

Tab. 2 lässt die bereits beschriebene unterschied-

Tab. 1.
Abhängigkeit der K^+ -bedingten Protonenfreisetzung von Alter und Aufbewahrungstemperatur der Mitochondrienpräparation.
Exp. 6470.

Alter (h)	Aufbewahrungs-Temperatur ($^\circ C$)	H^+ -Freisetzung (nVal $\times mg^{-1}$ Protein)
0,25	0	9,3
4	0	11,4
24	-20	20,7
24	0	25,0
24	+20	35,7
0,25 + Triton X-100	0	34,3

Table 2
 K^+ -bedingte Protonenfreisetzung durch Mitochondrien und submitochondriale Partikel.

- a) Intakte Mitochondrien und Digitoninpartikel (1 mg Digitonin/10 mg Protein)
- b) Ultrabeschallte Mitochondrien und Digitoninpartikel
- c) Triton X-100 behandelte Mitochondrien und Digitoninpartikel
Exp. 26570

	H^+ -Freisetzung (nVal $\times mg^{-1}$ Protein)		
	a	b	c
Mitochondrien	13,1	27,1	26,9
Aussenmembranen	26,4	38,4	32,8
Innenmembranen + Matrix	8,0	26,7	27,6

liche H^+ -Freisetzung der Membranfraktionen gegenüber intakten Mitochondrien erkennen [1]. Durch Ultrabeschallung oder Einwirkung von Triton X-100 wird die K^+ -bedingte H^+ -Freisetzung bei Mitochondrien und Innenmembranen deutlich erhöht, bei den Aussenmembranen jedoch nicht verändert. Die in Tab. 2 angegebenen Werte sind bei verschiedenen Präparationen größenmäßig, nich jedoch prinzipiell unterschiedlich.

4. Diskussion

Die Beobachtung, dass gealterte oder anderweitig geschädigte Mitochondrien eine Erhöhung der K^+ -bedingten Protonenfreisetzung aufweisen, lässt vermuten, dass durch strukturelle Schädigungen weitere Austauschstellen zugänglich werden. Bei Aussenmembranen ruft eine weitere Desintegration keine Erhöhung der H^+ -Freisetzung hervor, bei der Innenmembran + Matrix-Fraktion nimmt bei intakten Mitochondrien bei weiterer Desintegration der K^+ - H^+ -Austausch erheblich zu.

Bei der Präparation nach Schnaitman wurden unter unseren Bedingungen durch 1 mg Digitonin/10 mg Mitochondrienprotein etwa 20%, durch 2 mg Digitonin/10 mg Mitochondrienprotein etwa 80% der Monoaminoxidaseaktivität abgelöst und der K^+ - H^+ -Austausch entsprechend verringert [1]. Eine derartige Verringerung liess sich bei der höheren Digitoninkonzentration nur unmittelbar nach der Präparation nachweisen; einige Präparationen zeigten von vornherein, die übrigen nach kurzer Aufbewahrungszeit eine Zunahme des K^+ - H^+ -Austausches.

Aufgrund der mitgeteilten Ergebnisse nehmen wir an, dass die Austauschstellen der Aussenmembran für K^+ (möglicherweise Phospholipide [9, 10] frei zugänglich sind, während die äussere Proteinschicht der Innenmembran (die dem intermembrane space zugewandte Seite der Innenmembran) eine Barriere für K^+ darstellt. Bei Schädigung dieser Proteinschicht durch verschiedenartige Einwirkungen (Ultraschall, Detergentien, Alterung, Einfrieren-Auftauen usw.) können weitere Bindungsstellen (Phospholipide der Innenmembran oder Anteile der Matrix) an einem K^+ - H^+ -Austausch teilnehmen.

Literaturverzeichnis

- [1] G.Lutze, W.Liese und W.Kunz, FEBS Letters 8 (1970) 210.
- [2] A.R.L.Gear und A.L.Lehninger, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (1967) 840.
- [3] A.R.L.Gear und A.L.Lehninger, J. Biol. Chem. 243 (1968) 3953.
- [4] W.Liese, K.Jung, W.Kunz und H.David, Acta Biol. Med. Germ., im Druck.
- [5] C.Schnaitman, V.C.Erwin und J.W.Greenawalt, J. Cell. Biol. 32 (1967) 719.
- [6] W.Kunz und P.Klossek, Acta Biol. Med. Germ. 19 (1967) 767.
- [7] G.Lutze, Acta Biol. Med. Germ., in Vorbereitung.
- [8] A.G.Gornall, C.J.Bardawill und M.M.David, J. Biol. Chem. 177 (1949) 751.
- [9] W.E.Jacobus und G.P.Brierley, J. Biol. Chem. 244 (1969) 4995.
- [10] A.Scarpa und A.Azzi, Biochim. Biophys. Acta 150 (1968) 473.