

ÜBER EINEN ENERGIEUNABHÄNGIGEN AUSTAUSCH DER ALKALI-IONEN Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ UND Cs^+ GEGEN H^+ IN DER MEMBRAN INTAKTER UND DESINTEGRIERTER RATTENLEBERMITOCHONDRIEN

G. LUTZE, W. LIESE und W. KUNZ

Physiol.-chem. Institut der Medizinischen Akademie Magdeburg, 301 Magdeburg, DDR

Eingegangen am 19. Mai 1972

1. The energy-independent exchange of alkali metal cations against protons was investigated in intact and disintegrated mitochondria. The exchange is not specific for different alkali metal ions.
2. In intact mitochondria the apparent K_m for the energy-independent exchange range from 5 to 25 mM (Cs^+ , Rb^+ , K^+ 5–10 mM; Na^+ 15 mM; Li^+ 20 mM). At all ions studied the maximum release of protons was 15–20 nval/mg protein.
3. In disintegrated mitochondria there are no differences between the alkali metal ions (apparent K_m 30 mM; maximum H^+ -release 50 nval/mg protein).
4. Directly accessible binding sites seem to exist in the outer membrane. Binding sites in the inner membrane are accessible only after disintegration, but not after addition of valinomycin + rotenone.

1. Einleitung

Gear und Lehninger berichteten über eine energieunabhängige Bindung monovalenter Kationen an Mitochondrien, die im Austausch gegen eine äquivalente Menge Protonen erfolgt [1, 2]. Wir konnten kürzlich wahrscheinlich machen, dass bei intakten Mitochondrien der energieunabhängige K^+ - H^+ -Austausch durch die mitochondriale Aussenmembran bedingt wird [3], dass aber nach Desintegration von Mitochondrien oder Innenmembranpartikeln ein zusätzlicher K^+ - H^+ -Austausch auftritt [4].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Austauschorte hinsichtlich ihrer Spezifität, Affinität und Kapazität gegenüber Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ und Cs^+ näher zu charakterisieren. Die mögliche Bedeutung des Austauschprozesses für die Ionentranslokation wird diskutiert.

2. Methodik

Mitochondrien wurden aus Lebern von Albino-ratten des Stammes Wistar-Kyoto präpariert

[3, 5]. Die Präparation der Aussenmembranen erfolgte nach Schnaitman et al. [6] unter Einsatz von 2 mg Digitonin/10 mg Mitochondrienprotein. Zur Ultraschallung von Mitochondrien oder Aussenmembranen wurde ein MSE 100 Watt Ultrasonic Disintegrator (10 × 30 sec bei einer Amplitude von 6 μ peak zu peak) benutzt. Das Inkubationsmedium bestand aus 250 mM Saccharose + 20 mM Tris/HCl, pH 7,1; zugesetzt wurden die Alkalichloride in Konzentrationen bis 480 mM. Die Messung der Protonenabgabe, die Berechnung der alkaliionenbedingten Protonenfreisetzung und die Proteinbestimmung erfolgten wie früher beschrieben [3, 7–9].

3. Ergebnisse

3.1. Intakte Mitochondrien

In Abb. 1 ist die Protonenfreisetzung nach Mitochondrienzusatz zu einem Medium in Abhängigkeit von der Konzentration der Alkaliionen Li^+ und Rb^+ dargestellt. Während bei höheren Konzentrationen (ca. 80 mM) die Protonenfreisetzung grössenmässig gleich ist, differiert sie bei niedrigen Alkaliionenkon-

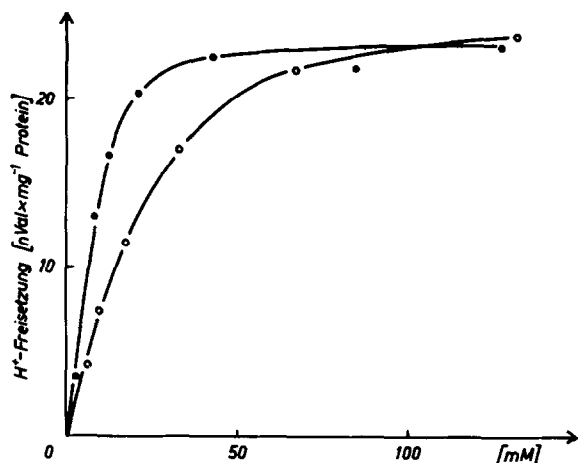


Abb. 1. Alkaliionenbedingte Protonenfreisetzung durch intakte Mitochondrien, Exp. 050471.

Li⁺ (○—○—○): Halbsättigungskonstante 25 mM;
Rb⁺ (●—●—●): Halbsättigungskonstante 9 mM.

zentrationen, so dass unterschiedliche Halbsättigungskonstanten resultieren.

In Tab. 1 sind die Halbsättigungskonstanten für die untersuchten Alkalimetallionen zusammengefasst. Sie wurden mittels doppelt-reziproker Auftragung nach Lineweaver—Burk ermittelt. Während K⁺, Rb⁺ und Cs⁺ annähernd gleiche Halbsättigungskonstanten aufweisen (< 10 mM), sind diejenigen von Na⁺ und Li⁺ grösser. Die maximale Protonenfreisetzung im Sättigungsbereich (Konzentration der 10fachen Halbsättigungskonstanten) ist dagegen bei allen Alkaliionen annähernd gleich (Tab. 2).

Bei Erhöhung der Alkaliionenkonzentration im Sättigungsbereich erhöht sich die Protonenfreisetzung nur geringfügig (Abb. 2); erst bei Konzentration über 300 mM ist eine etwas grössere Zunahme der Protonenfreisetzung zu beobachten. Ein Zusatz von Valinomycin zu einem KCl-Medium erhöht die Protonenfreisetzung bei intakten Mitochondrien über den alkaliionenbedingten Betrag, jedoch nicht, wenn gleichzeitig Rotenon oder Rotenon + Oligomycin anwesend sind (Abb. 3).

3.2. Desintegrierte Mitochondrien

Nach Desintegration der Mitochondrien durch Ultraschall werden die Halbsättigungskonstanten für die Protonenfreisetzung deutlich grösser (ca. 30 mM).

Tabelle 1

Halbsättigungskonstanten für die Protonenfreisetzung durch intakte und desintegrierte Mitochondrien bei Zusatz von Alkaliionen zum Inkubationsmedium (angegeben sind die gemessenen Extremwerte), Exp. 080371—050471.

Me ⁺	Intakte Mitochondrien (mM Me ⁺)	Desintegrierte Mitochondrien (mM Me ⁺)
Li ⁺	15 – 25	25 – 40
Na ⁺	12 – 17	28 – 38
K ⁺	5 – 9	25 – 38
Rb ⁺	7 – 10	25 – 35
Cs ⁺	5 – 8	25 – 35

Unterschiede innerhalb der Alkaliionen werden nicht beobachtet (Tab. 1). Die maximale Protonenfreisetzung steigt gegenüber intakten Mitochondrien an (Tab. 2, Abb. 2 und [4]). Der Maximalwert wird aber erst bei wesentlich höheren Alkaliionenkonzentrationen erreicht (> 300 mM) und beträgt dann in Abhängigkeit von der Mitochondrienpräparation das 2–5fache im Vergleich zu intakten Mitochondrien. Die Maximalwerte sind wie bei intakten Mitochondrien unabhängig von der Art des Alkaliions.

Nach Ultraschallung von Aussenmembranen ändert sich dagegen weder die Halbsättigungskonstante noch die Maximalkapazität [4].

Valinomycinzusatz hat bei desintegrierten Mitochondrien keine zusätzliche Erhöhung der Protonenfreisetzung zur Folge.

4. Diskussion

Aufgrund der in dieser und in vorangegangenen Mitteilungen [3, 4] erhaltenen Ergebnisse halten wir zwei Alkaliionenbindungsorte in der Mitochondrienmembran für wahrscheinlich. An beiden spielt sich ein energieunabhängiger Alkaliionen-Protonen-Austausch ab; sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Lokalisation, ihrer Zugänglichkeit für die Ionen und in ihrer Affinität. Es werden postuliert:

1) Äussere Bindungsorte, die unmittelbar für Alkaliionen zugänglich sind mit kleiner Halbsättigungs-

Tabelle 2

Alkaliionenbedingte Protonenfreisetzung durch intakte und desintegrierte Mitochondrien im Sättigungsbereich, Exp. 080471.

Me ⁺	Intakte Mitochondrien		Desintegrierte Mitochondrien	
	Me ⁺ -Konzentration in Ansatz (mM)	H ⁺ -Freisetzung (nVal × mg ⁻¹ Protein)	Me ⁺ -Konzentration im Ansatz (mM)	H ⁺ -Freisetzung (nVal × mg ⁻¹ Protein)
Li ⁺	200	19	320	55
Na ⁺	160	18	320	52
K ⁺	80	16	320	51
Rb ⁺	80	15	320	51
Cs ⁺	80	18	320	54

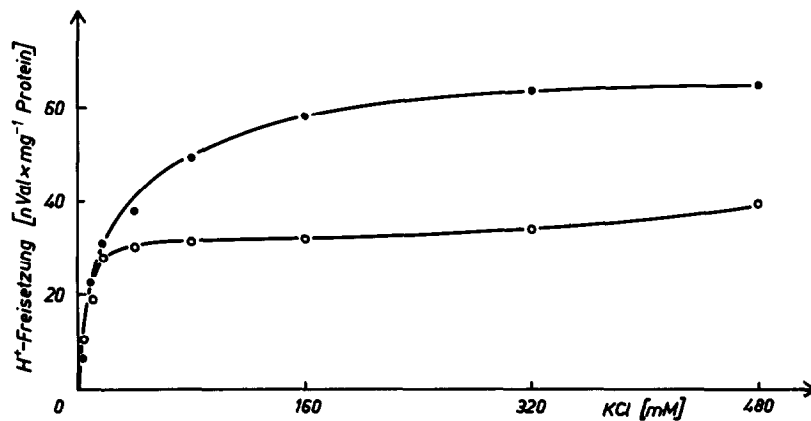
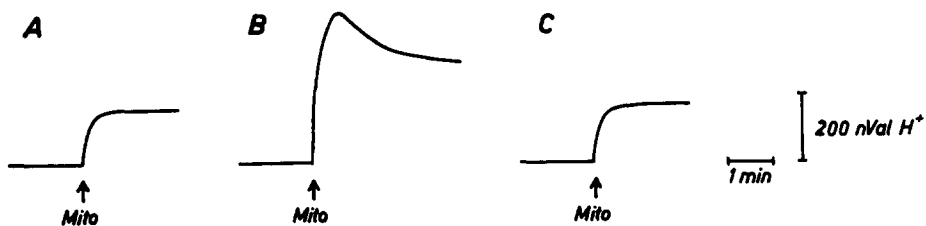
Abb. 2. K⁺-bedingte Protonenfreisetzung durch intakte und desintegrierte Mitochondrien, Exp. 150371. Intakte Mitochondrien (○—○—○): Halbsättigungskonstante 8 mM; Desintegrierte Mitochondrien (●—●—●): Halbsättigungskonstante 38 mM.

Abb. 3. Kontinuierliche Registrierung der Protonenfreisetzung durch intakte Mitochondrien, Exp. 211069. 7,1 mg Mitochondrienprotein. Dem Inkubationsmedium wurden zugesetzt: A) 80 mM KCl; B) 80 mM KCL, 1,5 µg Valinomycin; C) 80 mM KCl, 1,5 µg Valinomycin, 1 µM Rotenon, 7,5 µg Oligomycin.

konstante (< 10 mM für K^+ , Rb^+ und Cs^+). Die grösseren Halbsättigungskonstanten für Na^+ und Li^+ haben möglicherweise ihre Ursache in den unterschiedlichen Ionenvolumina der solvatisierten Ionen. Die äusseren Bindungsorte sind wahrscheinlich in der Aussenmembran lokalisiert, da einerseits die Halbsättigungskonstanten isolierter Aussenmembranen und intakter Mitochondrien übereinstimmen und sich auch nach Desintegration der Aussenmembran nicht ändern, andererseits Korrelation zur Aktivität der Monoaminoxidase als Markerenzym der Aussenmembran besteht [3]. Die äusseren Bindungsorte können aufgrund ihrer Lokalisation keine unmittelbare Beziehungen zu Translokationsvorgängen in der Innenmembran haben.

2) Innere Bindungsorte mit grösserer Halbsättigungskonstante, die erst nach Desintegration für Alkaliionen des Mediums zugänglich werden; innerhalb der Alkaliionen existieren hinsichtlich Halbsättigungskonstante und Spezifität keine Unterschiede. Die inneren Bindungsorte sind wahrscheinlich in der Innenmembran-Matrix-Fraktion lokalisiert, da Veränderungen der Halbsättigungskonstanten und der Maximalkapazität nur nach Ultraschallung ganzer Mitochondrien oder von Innenmembranpartikeln, nicht dagegen bei isolierten Aussenmembranen auftreten.

Eine energieunabhängige Bindung von mono- und bivalenten Kationen an Mitochondrien [10–19], wahrscheinlich an Membranphospholipide [11, 12, 16, 18], wurde wiederholt nachgewiesen. Sie wird von Massari und Azzone [13, 14] als Anfangs- und Endschrift in ein Modell der Ionentranslokation einbezogen, das sich auf die Darstellungen von Lenard und Singer [20] sowie von Wallach und Zahler [21] über den Membranaufbau stützt. Nach der Oberflächenbindung soll die eigentliche Translokation des Kations im Antiport gegen H^+ mit Hilfe von Valinomycin durch die Lipidphase und mittels eines anderen Carriers durch die Proteinphase erfolgen [13, 22].

Wir konnten an der Aussenseite der intakten Innenmembran keine frei zugänglichen protonenaustauschenden Bindungsstellen nachweisen, jedoch aufgrund der angewandten Methodik das Vorhandensein von Bindungsstellen ohne Alkaliionen-Protonenaustausch nicht ausschliessen. Nach Desintegration ist die Barrierenfunktion der Innenmembran für Alkaliionen nicht mehr vorhanden, und es kann sich ein energie-

unabhängiger Ionenaustauschvorgang vergleichbar dem an den äusseren Bindungsstellen vollziehen. Die inneren Austauschstellen werden nicht zugänglich, wenn Valinomycin + Rotenon anwesend sind. Daraus ist zu folgern, dass sie nicht am valinomycininduzierten K^+/H^+ -Austausch teilnehmen oder mit Valinomycin erst im energetisierten Zustand für K^+ zugänglich werden.

Literatur

- [1] A.R.L. Gear and A.L. Lehninger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28 (1967) 840.
- [2] A.R.L. Gear and A.L. Lehninger, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 3953.
- [3] G. Lutze, W. Liese und W. Kunz, *FEBS Letters* 8 (1970) 210.
- [4] G. Lutze, W. Liese und W. Kunz, *FEBS Letters* 10 (1970) 133.
- [5] W. Liese, K. Jung, W. Kunz and H. David, *Acta Biol. Med. Germ.* 27 (1971) 477.
- [6] C. Schnaitman, V.C. Erwin und J.W. Greenawalt, *J. Cell. Biol.* 32 (1967) 719.
- [7] W. Kunz and P. Klossek, *Acta Biol. Med. Germ.* 19 (1967) 767.
- [8] G. Lutze, *Acta Biol. Med. Germ.* 26 (1971) 655.
- [9] A.G. Gornall, C.J. Bardawill and M.M. David, *J. Biol. Chem.* 177 (1949) 751.
- [10] J.B. Chappell, M. Cohn and G.D. Greville, in: *Energy-linked Functions of Mitochondria*, ed. B. Chance (Academic Press, New York, 1963) p. 219.
- [11] W.E. Jacobus and G.P. Brierley, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 4995.
- [12] A. Scarpa and A. Azzi, *Biochim. Biophys. Acta* 150 (1968) 473.
- [13] S. Massari and G.F. Azzone, *European J. Biochem.* 12 (1970) 301.
- [14] S. Massari and G.F. Azzone, *European J. Biochem.* 12 (1970) 310.
- [15] A. Scarpa and G.F. Azzone, *European J. Biochem.* 12 (1970) 328.
- [16] B. Reynafarje and A.L. Lehninger, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 584.
- [17] C. Rossi, A. Azzi and G.F. Azzone, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 951.
- [18] A. Scarpa and G.F. Azzone, *Biochim. Biophys. Acta* 173 (1969) 78.
- [19] A. Scarpa and G.F. Azzone, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 5132.
- [20] J. Lenard and S.J. Singer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56 (1966) 1828.
- [21] D.F.H. Wallach and P.H. Zahler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56 (1966) 1557.
- [22] A.L. Lehninger, *Biochem. J.* 119 (1970) 129.