

ÜBER DIE LOKALISATION EINES ENERGIEUNABHÄNGIGEN K⁺-H⁺-AUSTAUSCHES IN DER AUSSENMEMBRAN VON RATTENLEBERMITOCHONDRIEN

G.LUTZE, W.LIESE und W.KUNZ

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

Received 20 April 1970

Es wurde die energieunabhängige Protonenfreisetzung durch intakte Mitochondrien und submitochondriale Partikel in Abhängigkeit vom K⁺-Gehalt des Inkubationsmediums gemessen. Die Protonenfreisetzung war korreliert mit der spezifischen Aktivität der Monoaminoxidase. Es wird geschlossen, dass der energieunabhängige K⁺-H⁺-Austausch in der Aussenmembran der Mitochondrien lokalisiert ist.

The energy-independent K⁺-H⁺-exchange was measured in intact mitochondria and submitochondrial particles at different K⁺-concentration of the incubation medium. Correlation was found between H⁺-displacement and specific activity of monoamine oxidase. It is concluded, that the energy-independent K⁺-H⁺-exchange is localized in the outer membrane of mitochondria.

1. Einleitung

Über eine energieunabhängige Bindung monovalenter Kationen durch Mitochondrien berichteten Gear und Lehninger [1, 2]. Untersuchungen von Jacobus und Brierley wiesen darauf hin, dass eine Bindung an Phospholipide der Membran erfolgt [3]. Die Bindung ist von der Freisetzung einer äquivalenten Menge Protonen begleitet, so dass pH-Änderungen des Mediums nach Mitochondrienzusatz Rückschlüsse auf das Ausmass der Bindung erlauben.

Unsere Messungen einer K⁺-bedingten Protonenfreisetzung an intakten Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln wurden mit dem Ziel einer genaueren Lokalisierung des K⁺-H⁺-Austausches an der Mitochondrienmembran durchgeführt. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass die Aussenmembran der Mitochondrien der Ort des K⁺-H⁺-Austausches ist.

Abkürzungen:

EDTA: Äthyldiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
Tris : Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
MAO : Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4)
SDH : Succinatdehydrogenase (EC 1.3.99.1)

2. Methodik

2.1. Präparation und Charakterisierung von Mitochondrien und submitochondrialen Partikeln

Die Präparation der Mitochondrien erfolgte durch Differentialzentrifugation eines ca. 16% igen Homogenates aus Lebern von Albinoratten des Stammes Wistar-Rehbrücke, die 18 Stunden gehungert hatten [4]. Als Homogenisierungsmedium wurde 250 mM Saccharose + 1 mM EDTA in 10 mM tris/HCl, pH 7,4 verwendet. Zu Waschen der Sedimente wurde das Homogenisierungsmedium ohne EDTA benutzt. Die Präparation mitochondrialer Aussen- und Innenmembranen erfolgte nach der Digitoninmethode von Schnaitman et al. [5]. Zur Isolierung der Membranfraktionen 1 wurde 1 mg Digitonin/10 mg Mitochondrienprotein, für die Membranfraktionen 2 entsprechend 2 mg Digitonin/10 mg Mitochondrienprotein eingesetzt. Die Aktivitätsbestimmung der MAO mit Benzylamin als Substrat erfolgte nach Tabor et al. [6], die der SDH nach Arrigoni und Singer [7]. Protein wurde nach Gornall et al. [8] mit Zusatz von Emulgator E 30 (Endkonzentration 3%, VEB Leunawerke W.Ulbricht) bestimmt.

2.2. Messung der Protonenfreisetzung

Die Protonenabgabe an das Medium wurde mit einer früher ausführlich beschriebenen Apparatur registriert [9]. Als Glaselektrode benutzten wir den Typ G 2222 B der Firma Radiometer. Die Messungen erfolgten bei 22° in einem thermostatierten Inkubationsgefäß über eine Agar-Tris/HCl-Brücke in einem K⁺-freien (250 mM Saccharose, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4) und einem K⁺-haltigen (250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 20 mM Tris/HCl, pH 7,4) Medium. Für die Bestimmung der Halbsättigungskonstanten betrugen die KCl-Konzentrationen außerdem 5, 10 und 20 mM. Alle Messwerte wurden um den Leerwert korrigiert, da bereits der Zusatz des reinen Suspensionsmediums das Elektrodenpotential beeinflusst und somit eine pH-Änderung vortäuscht. Zur Berechnung der K⁺-bedingten Protonenfreisetzung gingen wir von der Differenz der H⁺-Abgabe im K⁺-haltigen und K⁺-freien Medium aus.

3. Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 stellt die Abhängigkeit der Protonenfreisetzung vom KCl-Gehalt des Mediums in einem repräsentativen Versuch dar. Wird Protein als Bezugsgröße gewählt, so ist die H⁺-Freisetzung durch Aussenmembranen 1 bereits bei niedrigen KCl-Konzentrationen erheblich höher als bei intakten Mitochondrien. Die maximale Protonenfreisetzung der Aussenmembranen 1 überstrifft die der intakten Mitochondrien bis um das 4,5-fache. Wie die doppelt reziproke Darstellung des gleichen Versuchs zeigt (Abb. 2), sind die Halbsättigungskonstanten für Mitochondrien und Aussenmembranen gleich und betragen 8 mM KCl. Das Ergebnis spricht dafür, dass es sich bei dem K⁺-H⁺-Austausch in beiden Fraktionen um die gleiche Reaktionen handelt.

Der K⁺-H⁺-Austausch ist anscheinend nur in der mitochondrialen Aussenmembran lokalisiert, denn nach Tab. 1 korreliert die H⁺-Freisetzung eng mit der spezifischen Aktivität der MAO. Dies wird bei der Desintegration der Mitochondrien mit verschiedenen Digitoninkonzentrationen besonders deutlich. Wie bereits an anderer Stelle festgestellt, gelingt es nicht, mit dieser Methode gleichzeitig reine Innен- und Aussenmembranen zu isolieren [4]. Mit 1 mg Digitonin/10 mg Mitochondrienprotein werden ca.

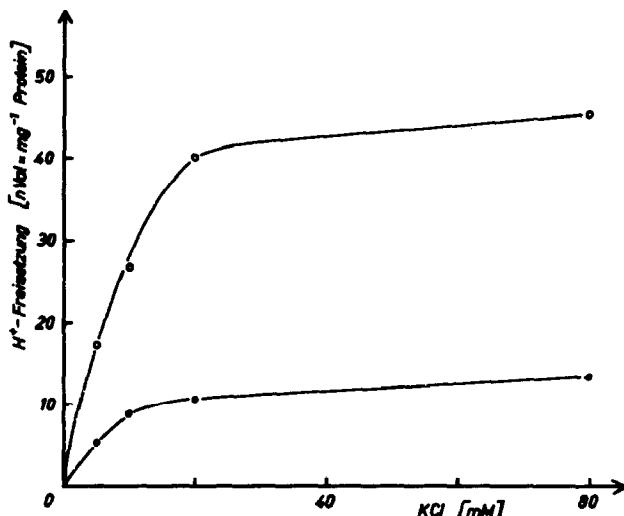


Abb. 1. K⁺-bedingte Protonenfreisetzung bei intakten Mitochondrien (●—●) und Aussenmembranen 1 (○—○) in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration des Inkubationsmediums, Exp. 11370.

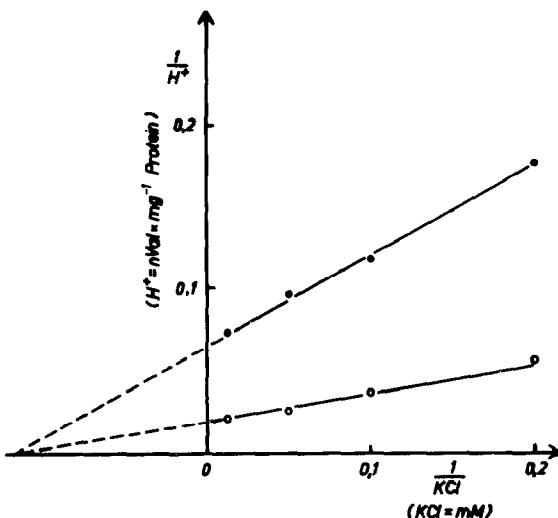


Abb. 2. Doppelt reziproke Darstellung der Protonenfreisetzung der Abb. 1. Halbsättigungskonstante 8 mM KCl.

10–20%, mit 2 mg Digitonin/10 mg Mitochondrienprotein ca. 70–80% der MAO-Aktivität von den Mitochondrien abgelöst, wobei jedoch nicht die gesamte Aktivität sedimentiert werden kann. Die SDH-Aktivität beträgt, bezogen auf intakte Mito-

Tabelle 1
Spezifische Aktivitäten der Monoaminoxidase und K^+ -bedingte Protonenfreisetzung bei intakten Mitochondrien und Mitochondrialen Membranfraktionen, Exp. 5370.

	Spezifische Aktivitäten der MAO (nMol \times min $^{-1}$ \times mg $^{-1}$ Prot.)	H $^+$ -Freisetzung	
		H $^+$ /Protein (nVal \times mg $^{-1}$ Prot.)	H $^+$ /MAO (nVal \times nMol $^{-1}$ \times min)
Mitochondrien	4,48	15,1	3,38
Aussenmembranen 1	12,30	36,1	2,93
Aussenmembranen 2	5,85	20,7	3,54
Innenmembranen 1	2,65	10,4	3,93
Innenmembranen 2	1,24	3,9	3,14

chondrien, in den Aussenmembranen 1 weniger als 1%, in den Aussenmembranen 2 2–6%. Eine Beziehung der H $^+$ -Freisetzung zur SDH-Aktivität liess sich nicht erkennen (nicht dargestellt). Wird die MAO als Bezugsgrösse gewählt, so ist die H $^+$ -Freisetzung durch intakte Mitochondrien und sämtliche submitochondriale Partikelfraktionen nahezu gleich. Diese Korrelation war reproduzierbar. Unterschiede bestanden bei den einzelnen Präparationen lediglich hinsichtlich der spezifischen Aktivitäten der MAO als Ausdruck einer unterschiedlichen Separierung von Aussen- und Innenmembran. Bei den Aussenmembranen betrug die spezifische MAO-Aktivität das 1,5-bis 4,5-fache der intakten Mitochondrien, wobei sich jeweils die H $^+$ -Freisetzung gleichsinnig verhielt.

Wir schliessen aus unseren Befunden, dass der Ort des K $^+$ -H $^+$ -Austausches der durch die MAO charakterisierte Teil der Mitochondrienmembran, also die Aussenmembran, ist.

Dipl. Chem. R. Levin für wertvolle Mitarbeit bei den Untersuchungen.

Literaturverzeichnis

- [1] A.R.L.Gear und A.L.Lehninger, Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (1967) 840.
- [2] A.R.L.Gear und A.L.Lehninger, J. Biol. Chem. 243 (1968) 3953.
- [3] W.E.Jacobus und G.P.Brierley, J. Biol. Chem. 244 (1969) 4995.
- [4] W.Liese, K.Jung, W.Kunz und H.David, Acta Biol. Med. German., in Druck.
- [5] C.Schnaitman, V.G.Erwin und J.W.Greenawalt, J. Cell. Biol. 32 (1967) 719.
- [6] C.W.Tabor, H.Tabor und S.M.Rosenthal, J. Biol. Chem. 208 (1954) 664.
- [7] O.Arrigoni und T.P.Singer, Nature 193 (1962) 1256.
- [8] A.G.Gornall, C.J.Bardawill und M.M.David, J. Biol. Chem. 177 (1949) 751.
- [9] W.Kunz und P.Klossek, Acta Biol. Med. German. 19 (1967) 767.

Dank

Die Autoren danken Herrn Dr. K.Jung und Herrn