



Doctoral Thesis

Charakterisierung der Rutheniumrot-Bindung an Rattenlebermitochondrien und teilweise Reinigung des Rutheniumrot bindenden Proteins

Author(s):

Schwerzmann, N.

Publication Date:

1978

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000149944> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss ETH 6247

CHARAKTERISIERUNG DER RUTHENIUMROT-BINDUNG AN RATTEN-
LEBERMITOCHONDRIEN UND TEILWEISE REINIGUNG DES RUTHE-
NIUMROT BINDENDEN PROTEINS

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften

vorgelegt von

Nikolaus Schwerzmann

Dipl. Natw. ETH

geboren am 17. Juni 1947

Bürger von Risch und Zug / ZG

angenommen auf Antrag von

Prof. E. Carafoli, Referent

Prof. G. Semenza, Korreferent

1978

ZUSAMMENFASSUNG

Rutheniumrot ist ein spezifischer und potenter Hemmstoff der energieabhängigen Calciumaufnahme in Mitochondrien. Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem ^{106}Ru -Rutheniumrot zeigten zwei Klassen von Bindungsstellen. Die eine zeigt eine relativ niedrige Affinität ($K_d > 10 \mu\text{M}$). Ihre Kapazität für den Hemmstoff ist abhängig von der Ionenstärke des Mediums. Sie ist hemmbar durch tiefe Konzentrationen von Lanthaniden oder Calcium. Die andere Klasse von Bindungsstellen scheint sehr spezifisch zu sein für Rutheniumrot und zeigt eine hohe Affinität ($K_d = 0.1 \mu\text{M}$) für den Hemmstoff. Ihre Anzahl beträgt etwa $0.06 - 0.08 \text{ nmol/mg}$ Protein. Der mitochondriale Calciumtransport wird schon durch Bindung von Rutheniumrot an diese Bindungsstelle vollständig gehemmt. Es wird angenommen, dass sie am Carrier selbst liegt.

Diese Bindungsstelle ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, da sie in allen untersuchten submitochondrialen Präparationen vorhanden ist. Sie kann weder durch Ultraschallbehandlung noch durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln noch durch nichtionische Detergentien (Lubrol, Triton X-100) solubilisiert werden. Dies zeigt, dass es sich bei der Rutheniumrot bindenden Stelle um ein hydrophobes Protein der inneren Membran handelt.

Durch Solubilisierung von ^{106}Ru -Rutheniumrot markierten Mitochondrien oder submitochondrialen Partikeln mit Triton X-100 konnte eine hydrophobe, unlösliche Fraktion erhalten werden, die 30 - 40fach angereichert ist an gebundenem Rutheniumrot. Diese Fraktion enthält wenig Phospholipide ($0.15 - 0.3 \text{ nmol/mg}$ Protein), aber keine Cytochrome und keinen signifikanten Anteil an Glykoproteinen.

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigt die Anwesenheit von mehreren Proteinen, wovon vor allem zwei deutlich angereichert sind. (ca. 30 - 50% des Gesamtproteins der hydrophoben Fraktion). Die beiden Hauptproteine haben ein Molekulargewicht, nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, von 30'000 und 60'000.

Die hydrophobe Fraktion bindet Rutheniumrot mit ähnlicher Affinität wie Mitochondrien ($K_D = 0.4 - 0.6 \mu\text{M}$) und Calcium (K_D ca. $4 \mu\text{M}$). Sie kann die Hemmung des Calciumtransports durch Rutheniumrot in Mitoplasten fast vollständig aufheben, (ca. $70 \mu\text{g}$ Protein hydrophobe Fraktion/mg Protein Mitoplasten). Dies und die Ergebnisse der Bindungsstudien lassen vermuten, dass ein Teil der Rutheniumrot-Bindungsstellen inaktiviert oder für Rutheniumrot nicht mehr zugänglich sind.

Das Rutheniumrot bindende Protein konnte nicht eindeutig identifiziert werden. Aber auf Grund von Vergleichen kommt man zum Schluss, dass es vermutlich mit einem der beiden Hauptproteine (MG 30'000, bzw. 60'000) identisch sein muss.

ABSTRACT

The energy dependent Ca^{2+} uptake in mitochondria is strongly inhibited by low concentrations of ruthenium red. Binding studies revealed two classes of binding sites at the inner mitochondrial membrane, one of which is specific for this inhibitor (binding constant $0.2 \mu\text{M}$, binding capacity less than 0.1 nmoles/mg of protein). This binding is not inhibited by Ca^{2+} or La^{3+} , but is abolished by the highly negatively charged polysaccharide polygalacturonic acid. Inhibition studies show that the binding of ruthenium red to the high affinity binding site is sufficient to inhibit the Ca^{2+} uptake completely without affecting other mitochondrial functions.

The high affinity sites appear to be contained in a highly hydrophobic protein fraction, which could be partially purified with the aid of radioactively labelled ruthenium red. ^{106}Ru -ruthenium red labelled mitochondria (0.05 nmoles/mg of protein) were extracted with 4% Triton X-100 (8 mg/mg of protein). The resulting pellet represented about 1% of the starting protein material, but was 20-30 fold enriched in bound ^{106}Ru -ruthenium red ($1.5\text{-}2.0 \text{ nmoles/mg}$ of protein). Analytical polyacrylamide SDS gelelectrophoresis showed the presence of two major protein bands ($\approx 50\%$ of the total stain) with a molecular weight of about 30'000, or 60'000 respectively, and a few more faintly visible bands.

The protein fraction contains only low amounts of phospholipids ($\leq 0.15 \text{ mg/mg}$ of protein) and is practically free of cytochromes. Tests using the Schiffs staining method have failed to reveal the presence of carbohydrates. This protein fraction binds ruthenium red ($K_d 0.3 \mu\text{M}$) and Ca^{2+} ($K_d 4 \mu\text{M}$). It is insoluble in a variety of organic solvents and detergents, but soluble in SDS.

It is premature to draw any conclusion from these studies on the participation of this fraction in the transport of Ca^{2+} , but its properties certainly seem promising.