

Diss. ETH No 6687

STUDIES ON Ca^{2+} -EFFLUX IN RAT LIVER MITOCHONDRIA

A DISSERTATION
submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE
OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Science

presented by
ISABELLE ROOS
dipl. Chem.
born the 13th of March 1954
French citizen

accepted on the recommendation of
Prof. E. Carafoli, referee
Prof. G. Semenza, co-referee

1950

VII SUMMARY

The efflux of Ca^{2+} from rat liver mitochondria was studied under different conditions, by means of a Ca^{2+} -selective electrode, or by a spectrophotometric method with the Ca^{2+} -indicator arsenazo III.

Ca^{2+} release can be induced by millimolar amounts of phosphoenolpyruvate.

PEP is transported through the mitochondrial membrane on the tricarboxylate carrier and on the adenine nucleotide translocase. However, only inhibitors of the latter system, and ATP, prevent the effect of PEP on Ca^{2+} -retention.

Therefore, to exert its effect, PEP must be transported in exchange for endogenous adenine nucleotides.

During the efflux of Ca^{2+} induced by PEP, the mitochondria become progressively uncoupled, and the electrical potential across the inner mitochondrial membrane collapses. Energy dissipation requires intramitochondrial Ca^{2+} in addition to PEP, since both the uncoupling and the decrease of $\Delta\psi$ are prevented by the addition of EGTA to the medium.

Whether the efflux occurs via a system distinct from the uptake pathway was investigated by determining the rate of PEP-induced efflux when the uptake route is blocked by RR. PEP does augment the release of Ca^{2+} also after the addition of RR. However, the rate of "extra" Ca^{2+} release induced by PEP, permitting Ca^{2+} recycling, accounts only for a fraction of the observed respiring increment. These data indicate that the efflux of Ca^{2+} induced by PEP occurs essentially via reversal of the uptake process. The

uncoupling of respiration is presumably responsible for the decrease in $\Delta\Psi$, and the PEP-induced Ca^{2+} efflux has probably no physiological meaning.

Inorganic phosphate on the other hand induces Ca^{2+} efflux from liver mitochondria via a RR-insensitive efflux pathway. This effect is not due to functional or structural damage of the mitochondria: the transmembrane potential is not significantly altered by P_i , and similar potentials in the presence or absence of P_i correspond to different amounts of accumulated Ca^{2+} . Antimycin A, which collapses the membrane potential, increases the rate of RR-insensitive Ca^{2+} efflux, and this effect is maintained in the presence of P_i . This result indicates that the P_i -activated pathway operates electroneutrally.

Oxidation of the pyridine nucleotides was reported to induce Ca^{2+} release. This is not the case in the P_i -induced Ca^{2+} efflux. In fact, the intramitochondrial NAD(P)H increases with time, whether P_i is present or not.

Finally, the effect of P_i requires its export from mitochondria, since inhibitors of P_i -transport prevent Ca^{2+} efflux. Moreover, Ca^{2+} and P_i effluxes do not occur on a common carrier, and P_i -loss precedes Ca^{2+} release.

RESUME

L'efflux de Ca^{2+} de mitochondries de foie de rat a été étudié sous différents aspects, avec une électrode de Ca^{2+} ou spectrophotométriquement avec le complexeur de Ca^{2+} arsenazo III.

Phosphoénolpyruvate en concentrations millimolaires peut provoquer une décharge de Ca^{2+} des mitochondries.

PEP est transporté à travers la membrane mitochondriale par l'adenine nucléotide translocase et par le carrier des tricarboxylates. Cependant, seuls les inhibiteurs du premier système et ATP abolissent l'effet de PEP sur la rétention de Ca^{2+} . Il semble donc que le transport de PEP en échange d'adenines nucléotides internes soit nécessaire.

Pendant l'efflux de Ca^{2+} induit par PEP, les mitochondries se découplent progressivement, et la composante électrique de la force protomotrice s'affaïsse. Ces effets dramatiques peuvent être évités lorsqu' EDTA est ajouté au milieu. La présence de Ca^{2+} dans l'espace mitochondrial est donc tout aussi indispensable que PEP pour provoquer la dissipation d'énergie observée.

Les effets de PEP sur les mitochondries sont annulés en présence de ruthénium rouge (RR), un agent bloquant la voie d'entrée de Ca^{2+} . C'est donc par cette voie même que l'efflux de Ca^{2+} induit par PEP est promu. Le découplément de la respiration est vraisemblablement responsable de la chute de potentiel, et en raison des dégats considérables de la membrane qui s'ensuivent, il ne s'agit probablement pas

d'un phénomène physiologique.

L'efflux de Ca^{2+} peut aussi être stimulé par le phosphate inorganique. La persistance de cet effet en présence de RR indique qu'une voie de sortie indépendante est probablement concernée.

Cette fois-ci, l'effet ne peut être expliqué par quelque dommage de la membrane, puisque le même potentiel électrique en présence ou non de phosphate correspond à différentes quantités de Ca^{2+} accumulées. Il n'est pas possible non plus de corréler cet effet avec une oxidation éventuelle des pyridines nucléotides, ceux-ci se réduisant dans les 2 cas au cours de l'incubation.

Enfin, l'action du phosphate est étroitement liée à son transport hors des mitochondries. En effet, les mitochondries conservent leur Ca^{2+} lorsque les 2 transporteurs essentiels de phosphate sont inhibés. De plus, le Ca^{2+} et le P_i ne sont pas transportés hors des mitochondries sur un porteur commun, et il semblerait que l'efflux de P_i précède celui de Ca^{2+} .