



Doctoral Thesis

## **Studies on the kinetics and charge stoichiometry of Ca-(2+)-transporting systems using ion-selective electrodes**

**Author(s):**

Affolter, Hubert

**Publication Date:**

1980

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000380533> →

**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 No 6695

STUDIES ON THE KINETICS AND CHARGE  
STOICHIOMETRY OF  $Ca^{2+}$ -TRANSPORTING SYSTEMS  
USING ION-SELECTIVE ELECTRODES

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
HUBERT AFFOLTER  
dipl. Natw. ETH  
born September 10th, 1950  
citizen of Halten, Solothurn

accepted on the recommendation of  
Prof. E. Carafoli, referee  
Prof. W. Simon, co-referee  
1980

## 10. Summary

The application of electrodes selective to  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , or  $\text{TPP}^+$  to studies in ion transport across biological membranes is discussed. An incubation vessel is described that allows optimal use of specially adapted ion-selective mini-electrodes. This system is compared with methods using metallochromic indicators such as murexide or arsenazo III. In addition, a continuous-flow apparatus, combined with specific electrodes, is described, suitable for fast kinetic measurements (ms-range) of changes in  $\text{Ca}^{2+}$ -activity. With the systems described, studies were carried out on:

- The charge stoichiometry of the  $\text{Ca}^{2+}$ -carrier in rat liver mitochondria. Evidence is given that the carrier is a  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter, showing a charge translocation of 2 charges per 1  $\text{Ca}^{2+}$ -ion, without obligatory counter- or co-transport of charge-compensating ions.
- The charge stoichiometry of the  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Na}^+$ -antiporter in rat heart mitochondria. The membrane potential of mitochondria during the  $\text{Na}^+$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$ -release has continuously been monitored with a  $\text{TPP}^+$ -sensitive electrode. The data obtained indicated that the exchange process does not generate an electrical current, and provide direct support for the assumption of a 2  $\text{Na}^+$  per 1  $\text{Ca}^{2+}$  exchange.
- The kinetics of the  $\text{Ca}^{2+}$ -uniporter in rat liver mitochondria. Evidence is given that  $\text{Ca}^{2+}$ -transport supported by the oxidation of succinate is limited by the activity of the respiratory chain. If a  $\text{K}^+$ -diffusion potential is used as the driving force for the uptake, the  $\text{Ca}^{2+}$ -carrier is the limiting factor, showing a hyperbolic dependence of uptake rate on  $\text{Ca}^{2+}$ -activity in the extra-mitochondrial medium.

- The initial  $\text{Ca}^{2+}$ -uptake rate of sarcoplasmic reticulum vesicles from lobster muscle. The uptake rate decreases from 53 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein/s during the first 140 ms to about 20 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg protein/s during the first 10 s.

## 11. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Anwendung ionenselektiver Electroden besprochen, die spezifisch sind für Kalzium, Kalium oder Tetraphenylphosphonium, wenn ionentransportierende Systeme biologischer Membranen untersucht werde. Ein Inkubationsgefäß wird vorgestellt, das einen optimalen Einsatz spezieller Mini-Elektroden ermöglicht. Dieses System zur direkten Aktivitätsbestimmung von Ionen wird mit anderen Methoden verglichen, z.B. mit der Anwendung von Metallindikatoren, wie Murexid oder Arsenazo III.

Dann wird eine Messapparatur beschrieben, die kinetische Messungen der Kalziumaktivität mit ionenspezifischen Elektroden im Millisekundenbereich ermöglicht.

Mit diesen Messsystemen wurde untersucht:

- 1) Das Ladungsverhältnis des Kalziumtransportes in Lebermitochondrien. Es konnte gezeigt werden, dass 2 Ladungen je Kalziumion transportiert werden und dass kein anderer Ionentransport fest damit gekoppelt ist.
- 2) Das Ladungsverhältnis des Natrium-Kalzium-Gegentransportes der Herzmitochondrien. Das Membranpotential der Mitochondrien wurde fortlaufend mit einer tetraphenylphosphonium-selectiven Elektrode überwacht, während der Austausch aktiviert war. Da netto keine Ladungsverschiebung gemessen werden konnte, wird angenommen, dass das Verhältnis Natrium zu transportiertem Kalzium gleich 2:1 ist.
- 3) Die kinetischen Eigenschaften des Kalziumtransportes in Lebermitochondrien. Es konnte gezeigt werden, dass die Umsatzgeschwindigkeit der Atmungskette limitierend ist, wenn diese durch die Oxidation von Bernsteinsäure den Kalziumtransport antreibt. Wird aber das Kaliumdiffusionspotential als treibende Kraft ausgenützt, so wird der Kalziumtransport selber limitierend. Damit zeigt auch

dieser Transport eine hyperbolische Beziehung zwischen Aufnahmegeschwindigkeit und Kalziumaktivität, analog zu denjenigen in Mitochondrien aus anderen Geweben.

- 4) Die Anfangsgeschwindigkeit der Kalziumaufnahme des isolierten sarkoplasmatischen Retikulums aus Hummermuskel. Die gemessene Aufnahmerate geht von 53 nmol Kalzium pro mg Protein und Sekunde während der ersten 140 ms auf 20 nmol Kalzium pro mg Protein und Sekunde während der ersten 20 Sekunden zurück.