



## Doctoral Thesis

# Studies on the interaction of mitochondrial creatine kinase with membranes and structural studies on the adenine nucleotide translocator

**Author(s):**

Ortiz de Lanzagorta, Manuel Rojo

**Publication Date:**

1993

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000692552> →

**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. 10042

Studies on the Interaction of Mitochondrial Creatine Kinase with Membranes  
and Structural Studies on the Adenine Nucleotide Translocator

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

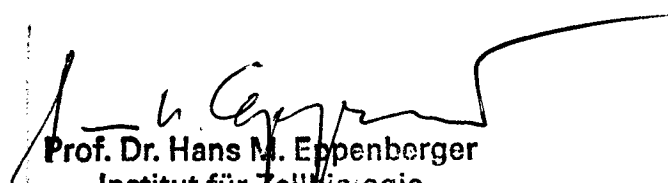
presented by

Manuel Rojo Ortiz de Lanzagorta  
Dipl. Biol., Univ. Konstanz

born October 12, 1964  
citizen of Getxo/Spain

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. H. M. Eppenberger, examiner  
PD Dr. T. Wallimann, co-examiner  
Prof. Dr. J. Seelig, co-examiner

Zürich, 1993

  
Prof. Dr. Hans M. Eppenberger  
Institut für Zellbiologie  
HPM F 39  
ETHZ Hönggerberg  
CH-8093 ZÜRICH



# Summary

The scope of this thesis was to gain structural and biochemical information on mitochondrial creatine kinase (Mi-CK) and adenine nucleotide translocator (ANT) in order to elucidate the role of these enzymes in the exchange of energy metabolites between mitochondrial and cytosolic compartments. Because Mi-CK is a peripheral membrane protein which is proposed to interact with integral membrane proteins (transport proteins), it was decided to study the interaction of Mi-CK with membranes. Since, in contrary to Mi-CK, the structure of ANT is largely unknown, it was intended to generate crystals of this membrane protein suitable for structural analysis.

First, the interaction of Mi-CK with phospholipid monolayers and spread mitochondrial membranes at the air/water interface was studied. It was shown that several CK isoforms induced an increase in surface pressure when injected below a phospholipid monolayer, a property shared by many lipid binding proteins. The cytosolic CK isoforms interacted with phospholipid monolayers with lower affinity than Mi-CK, and octameric Mi-CK showed a higher affinity and critical surface pressure than dimeric Mi-CK. The results suggest that domains of the octameric Mi-CK molecule penetrate in between the phospholipid molecules of the monolayer, but only at surface pressures below the equivalent surface pressure of lipid bilayers. The interaction of Mi-CK with monolayers of pure phosphatidylcholine resulted in a lower surface pressure increase than with monolayers of lipid extracts from inner and outer mitochondrial membranes. The increase in surface pressure was augmented with increasing content of anionic phospholipid in the phosphatidylcholine monolayer, the effect being most prominent for cardiolipin. It is concluded that cardiolipin and other anionic phospholipids can function as membrane receptors of Mi-CK and that Mi-CK is able to interact equally well with both inner and outer mitochondrial membranes.

Second, it was shown that Mi-CK interacts simultaneously with inner and outer mitochondrial membranes, thereby creating an intermembrane contact. Intermembrane contact formation was demonstrated by measuring the binding of inner membrane vesicles to outer membranes spread at the air-water interface. Mi-CK also mediated intermembrane adhesion when membranes formed with total lipid extracts of both membranes were used, pointing to the role of lipids as potential membrane anchors of Mi-CK in the mitochondrial intermembrane space. Other enzymes of the intermembrane space that (like Mi-CK) are also cationic, as well as the cytosolic isoenzymes of CK failed to induce contact formation. Thus, of the proteins tested, membrane contact formation was specific for Mi-CK. The two oligomeric forms of Mi-CK, octamer and dimer, differed substantially in their ability to mediate intermembrane adhesion, the octamer being more potent. Highly basic peptides, i.e.

poly-L-lysines, were shown to mediate membrane contacts by a different mechanism: they induced both intermembrane binding and fusion. Interestingly, the extent of contact formation mediated by poly-L-lysines was lower than that of octameric Mi-CK.

In summary, the ability of Mi-CK to interact with different lipids and lipid mixtures implies that (i) the binding of Mi-CK to mitochondrial membranes is mediated by lipids, (ii) the differential interaction of Mi-CK oligomers with membrane interfaces points to octameric Mi-CK as the oligomeric form which preferentially interacts with mitochondrial membranes, and (iii) the specificity and extent of Mi-CK induced membrane contact formation suggests that this ability is significant for Mi-CK function *in vivo*.

The third and last chapter of this work describes the characterization of ANT by several means. When the interaction of ANT with various detergents was studied, it appeared that the detergents tested differed substantially in their ability to solubilize and reconstitute ATP exchange: detergents with cyclic hydrophobic moieties were better suited for ANT solubilization than detergents with linear hydrophobic moieties. Searching for a novel purification method, Blue Sepharose affinity matrix was found to strongly and specifically bind ANT. This allowed the development of a purification method that, in contrary to the established method, enables ANT to be purified from several sources. On the basis of these investigations, a systematic search for conditions leading to the two-dimensional crystallization of the ANT was initiated. It could be shown that large aggregates and membranes were formed with different crystallization approaches. Since it was not possible to localize ANT molecules or regular arrays within these structures by electron microscopy, the results have to be considered inconclusive. Therefore, a two-step crystallization strategy is proposed for future studies.

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei Enzyme des Mitochondriums, die mitochondrielle Kreatin-Kinase (Mi-CK) und der Adeninnukleotid-Translokator (ANT), untersucht. Die Mi-CK ist ein lösliches Protein des mitochondriellen Intermembranraums, das peripher an die Innenmembran bindet. Der ANT ist ein integrales Membranprotein und transportiert Adeninnukleotide über die mitochondrielle Innenmembran. Beide Enzyme sind am Austausch von Energiemetaboliten zwischen dem mitochondriellen und cytosolischen Kompartiment beteiligt, weil Adeninnukleotide sowohl Substrate der Mi-CK Reaktion als auch des Transportes sind. Da die Bindung der Mi-CK an mitochondrielle Membranen von grosser Bedeutung für diese Funktion sein kann, wurde die Interaktion der Mi-CK mit Membranen genau charakterisiert. Ausserdem wurde versucht, Proteinkristalle des ANT zu erzeugen, weil, im Gegensatz zur Mi-CK, die Struktur des ANT noch weitgehend unbekannt ist.

Studien zur Interaktion von Mi-CK mit Membranen wurden mit Lipidmonoschichten und mit gereinigten Membranen, die an der Grenzfläche zwischen Luft und Wasser gespreitet worden waren, durchgeführt. Es zeigte sich, dass sämtliche CK-Isoenzyme an Lipidschichten binden und dabei in der Lage sind, den Oberflächendruck monomolekularer Lipidschichten zu erhöhen. Die induzierte Zunahme des Oberflächendrucks war umgekehrt proportional zum Oberflächendruck, der vor der Zugabe des Proteins eingestellt worden war. Im Vergleich zur dimeren Isoform von Mi-CK und zu den anderen CK-Isoenzymen war sowohl die Affinität zur Lipidschicht als auch die induzierte Zunahme des Oberflächendrucks von oktamerer Mi-CK höher. Mi-CK diskriminierte nicht zwischen Lipidmonoschichten, die mit Lipidmischungen verschiedener subzellulärer Membranen geformt worden waren, wohl aber zwischen Monoschichten mit unterschiedlichen anionischen Phospholipiden oder mit unterschiedlichen Anteilen negativer Phospholipide. Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mi-CK, im Besonderen in ihrer oktameren Form, über Lipidmoleküle an die mitochondriellen Membranen bindet.

In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass Mi-CK nach Bindung an eine Lipidmonoschicht Membranvesikeln binden kann. Die simultane Interaktion von Mi-CK mit zwei Membranoberflächen führte zur Ausbildung von Kontakten zwischen Lipidmonoschichten und Lipidvesikeln oder andererseits zwischen gespreiteten und vesikelförmigen mitochondriellen Membranen. Versuche, die mit anderen Proteinen durchgeführt wurden, z.B. mit den cytosolischen CK-Isoenzymen und einigen Enzymen des mitochondriellen Intermembranraums, zeigten, dass die Fähigkeit zur Intermembranadhäsion für Mi-CK spezifisch ist. Die dimere Isoform der Mi-CK besass eine viel niedrigere Kapazität zur simultanen Bindung von Membranen als die oktamere Isoform der Mi-CK. Die

Kapazität von Mi-CK zur Intermembranadhäsion wurde darüberhinaus nur von stark basischen, synthetischen Proteinen, wie Polylysinen, erreicht. Diese linearen Polylysinmoleküle induzierten aber nicht nur die Bindung, sondern auch die Fusion von Vesikeln an die Lipidmonoschicht.

Zur Aufklärung der Struktur des ANT wurden Studien mit dem solubilisierten, gereinigten ANT durchgeführt. Preliminäre Arbeiten waren der Wahl des am Besten geeigneten Detergens und der Entwicklung einer neuen Reinigungsmethode gewidmet. Die überprüften Detergentien unterschieden sich sehr stark voneinander: Diejenigen mit zyklischen hydrophoben Domänen solubilisierten und rekonstituierten eine signifikant grössere Menge an aktivem ANT aus Mitochondrien als solche mit linearen hydrophoben Domänen. Der solubilierte Translokator band stark und spezifisch an die Affinitätsmatrix Blue Sepharose. Aufgrund dieser Eigenschaften war es möglich, eine Reinigungsmethode für ANTen aus verschiedenen Organen unterschiedlicher Arten zu entwickeln, während sich die herkömmliche Methode auf bestimmte Gewebe beschränkt. Verschiedene Ansätze zur zweidimensionalen Kristallisation des gereinigten ANT wurden ausprobiert, wobei die zur Zeit erfolgversprechendsten Methoden angewandt wurden. Mit den gewählten Bedingungen konnten bisher keine Kristalle erzeugt werden. Es stellte sich ausserdem heraus, dass die extrem kleine Grösse des ANT ein grosser Nachteil war, um die Ergebnisse der durchgeführten Kristallisationsansätze zu analysieren. Im Hinblick auf die Schwierigkeiten, den ANT mittels Elektronenmikroskopie zu lokalisieren, wird für zukünftige Versuche eine veränderte Kristallisationsstrategie vorgeschlagen.

# Resumen

Las investigaciones realizadas durante la tesis estuvieron dedicadas al estudio de dos proteínas mitocondriales, la creatina quinasa mitocondrial (Mi-CK) y el translocador de ATP/ADP (ANT). La Mi-CK es una proteína soluble y catiónica del espacio mitocondrial intermembranoso que está adherida a la membrana mitocondrial interior y que cataliza la transferencia de fosfatos entre ATP y creatina. El ANT es una proteína integral de membrana que cataliza el transporte de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial interior. Ambas enzimas están implicadas en el metabolismo energético de los compartimentos citosólico y mitocondrial y además tienen un sustrato común (ATP). Primero se estudió la interacción de la Mi-CK con membranas *in vitro*, ya que la unión de la Mi-CK a membranas mitocondriales puede ser determinante para su función *in vivo*, especialmente para el posible intercambio de sustratos y productos con el ANT. Puesto que la estructura del ANT es en gran parte desconocida, igualmente se intentó generar cristales del ANT que fueran aptos para un análisis cristalográfico.

La interacción de Mi-CK con membranas se estudió utilizando monocapas de fosfolípidos y membranas extendidas sobre la superficie de un compartimento acuoso. La inyección de Mi-CK bajo monocapas de fosfolípidos indujo un incremento de la presión superficial de las monocapas. Esta propiedad es común a muchas proteínas solubles capaces de unirse periféricamente a membranas biológicas. Los isoenzimas citosólicos de la CK interactuaron con las monocapas con una afinidad inferior a la de la Mi-CK. También se observaron diferencias entre las dos isoformas oligoméricas de la Mi-CK, octámero y dímero: el octámero interactuó con una mayor afinidad e indujo un mayor incremento de la presión superficial que el dímero. El incremento de la presión superficial inducido por Mi-CK fue mayor cuanto mayor fue la proporción de lípidos aniónicos, especialmente cardiolipina, en la monocapa de fosfolípidos. Sin embargo, no se observaron diferencias cuando la interacción de Mi-CK con monocapas formadas por lípidos extraídos de diferentes membranas (membranas mitocondriales interior y exterior, membranas microsomales) fue estudiada. Los resultados sugieren que a presiones superficiales equivalentes a las de las bicapas de las membranas biológicas la Mi-CK no penetra entre las moléculas de fosfolípidos y que la interacción con los grupos polares de los lípidos, preferentemente aniónicos, es responsable de la unión de la Mi-CK a las membranas mitocondriales *in vivo*.

Se demostró que las moléculas de Mi-CK son capaces de interactuar simultáneamente con dos membranas. La formación de contactos entre membranas fue demostrada midiendo la unión de vesículas de membrana mitocondrial interior a membranas mitocondriales externas que habían sido extendidas en la superficie de un compartimento acuoso. Mi-CK también facilitó la adhesión entre membranas (liposomas y monocapas)

formadas exclusivamente con lípidos extraídos de las membranas interior y exterior de las mitocondrias. La capacidad de los octámeros de Mi-CK para inducir la adhesión entre membranas fue mucho mayor que la de los dímeros. Puesto que los isoenzimas citosólicos de la CK y otros enzimas catiónicos del espacio intermembranoso mitocondrial no fueron capaces de interactuar simultáneamente con dos membranas, esta propiedad es aparentemente específica para la Mi-CK. Solamente polilisinas de gran masa molecular (13-289 kDa), demostraron tener una capacidad similar a la de la Mi-CK para mediar la formación de contactos entre membranas. Sin embargo, estos péptidos polycatiónicos indujeron no sólo la adhesión sino también la fusión de liposomas a la monocapa de fosfolípidos.

La última parte del trabajo estuvo dedicada a la caracterización del ANT. Los primeros experimentos tuvieron como objetivo la elección de los detergentes idóneos para el estudio del ANT. Los datos obtenidos revelaron que los detergentes con grupos hidrofóbicos cíclicos tienen una capacidad significativamente mayor para solubilizar y reconstituir el transporte de ATP que los detergentes con grupos hidrofóbicos lineares. Tras el descubrimiento de la adhesión fuerte y específica del ANT a una matriz de afinidad (Blue Sepharose) se desarrolló un nuevo método para la purificación del ANT. Este método, al contrario del utilizado previamente, permite la purificación de los ANTEs de diferentes tejidos y especies. Con objeto de conseguir la cristalización bidimensional del ANT purificado, se utilizaron las técnicas actualmente en uso. Sin embargo, sólo fue posible generar agregados de proteínas y lípidos faltos de todo tipo de estructura (semi)cristalina. Estos experimentos también revelaron que la resolución que permiten las técnicas empleadas para microscopía electrónica no es suficiente para identificar moléculas del ANT, lo que dificultó seriamente el análisis. A la vista de las dificultades encontradas, al final del trabajo se propone una nueva estrategia experimental para la cristalización del ANT.