

# A quantitative approach to membrane-binding and peroxynitrite-induced inactivation of mitochondrial creatine kinase

**Doctoral Thesis**

**Author(s):**

Stachowiak, Olaf

**Publication date:**

1997

**Permanent link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001852349>

**Rights / license:**

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

Diss. ETH No. 12340

# A Quantitative Approach to Membrane-Binding and Peroxynitrite-Induced Inactivation of Mitochondrial Creatine Kinase

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by

**Olaf Stachowiak**

Dipl.-Biochem., University of Hannover, Germany

born November 11, 1968, in Hamm, Germany

German citizen

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. T. Wallimann, examiner

Prof. Dr. C. Richter, co-examiner

Prof. Dr. D. Brdiczka, co-examiner

Zürich, 1997

## Summary

Sarcomeric mitochondrial creatine kinase (Mi<sub>b</sub>-CK; EC 2.7.3.2) is a positively charged enzyme located between the mitochondrial inner and outer membrane as well as along the cristae membranes. The octameric form of Mi-CK<sup>1</sup> is supposed to cross-link mitochondrial membranes to form contact sites. The process of Mi-CK membrane-binding and Mi-CK-induced cross-linking of model membrane-vesicles containing different amounts of cardiolipin (CL) was investigated *in vitro*.

First, the direct binding of octameric Mi-CK to immobilised lipid vesicles containing cardiolipin was monitored by surface plasmon resonance (BiaCore). For this purpose, a new setup for the repeated immobilisation of lipid vesicles, based on the biotin/avidin system, was developed. The analysis of the pseudo first-order on- and off-rate constants indicates that there are two binding-sites for Mi-CK on the membrane with different affinity. The association equilibrium constants obtained at 25 °C were 813.7 (for 100% CL) and 343.6 (for 16%CL), respectively, for the high-affinity binding mode.

Second, the Mi-CK-induced vesicle cross-linking kinetics were analysed by fixed-angle light scattering. Only octameric Mi-CK induced bridged vesicle/protein complexes, whereas dimeric Mi-CK failed to induce vesicle cross-linking. For vesicles containing 100% cardiolipin the pseudo-first order association rate constant was  $2.55 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , for membranes containing 16% cardiolipin and 84% PC a constant of  $6.25 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  was found. The examined kinetic properties of the system suggest a two-step model for Mi-CK-induced vesicle-cross-linking which consists of a fast binding step of the enzyme to the membrane followed by a remarkably slower cross-linking reaction between Mi-CK-covered vesicles. The data obtained by *in vitro* biophysical methods complement earlier qualitative experiments done with mitoplasts and isolated mitochondrial membranes and explain the *in vivo* accumulation of Mi-CK at contact sites between the inner and outer mitochondrial membrane and the formation of Mi-CK-rich intramitochondrial inclusions observed in creatine-depleted animals as well as in patients with mitochondrial cytopathies.

The binding of dimeric Mi-CK to the model membrane systems described above and the effects of divalent cations were examined with fluorescence spectroscopy and fluorescence energy transfer. A more pronounced dependence of dimeric Mi-CK on the CL content of the membrane was detected, as dimers did not bind to membranes containing only 16% CL. Using pure CL vesicles, a quite fast adsorption of dimeric Mi-CK to the membrane was monitored, yielding a pseudo first-order association rate constant of  $1.55 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . The addition of Mg<sup>2+</sup> or Ca<sup>2+</sup> ions after membrane association of the dimer led to

an energy transfer signal to a dansylated lipid probe, indicating a repositioning of the dimer on the membrane plane.

In the final part of this dissertation, the reaction of peroxynitrite (PN) with Mi-CK was examined with biochemical and biophysical techniques. The reaction of PN with Mi-CK resulted in the inactivation of the enzyme which was observed at different stages of complexity i) with purified Mi-CK, ii) with enzyme bound on isolated mitoplasts and iii) within intact respiring mitochondria. Creatine-stimulated respiration was abolished by PN concentrations likely to be physiological, and far before the respiratory chain itself was affected, thus demonstrating that Mi-CK is a prime target for inactivation by PN in intact mitochondria. The inactivation of Mi-CK by PN was reversed by 22% with 2-mercaptoethanol (2-ME) and application of the latter, prior to the addition of PN and preincubation with EDTA, protected the enzyme. No protective effect was noticed with single CK substrates. These data indicate an involvement of the active site Cys-278 residue of Mi-CK in this process. Furthermore, changes in endogenous tryptophane fluorescence intensity and spectral changes after reaction of Mi-CK with PN suggest additional modifications of Trp and Tyr residues. Indeed, Mi-CK contains several Trp residues, some of which were shown to play a crucial role in either the catalytic process, e.g., Trp-223, or in stabilizing the Mi-CK octamer, e.g. Trp-264 located at the dimer/dimer contacts. In contrast to the native enzyme, PN-inactivated Mi-CK persisted in the octameric state after incubation with reagents inducing a transition state analog complex at the active site. Obviously, the octamer-dimer equilibrium of Mi-CK is affected by PN and the enzyme is “locked” in its octameric state. The consequences of the exquisite sensitivity of Mi-CK to PN, as reported here, are discussed with respect to the recent discovery of a highly active NO synthase in mitochondria. In this context, our results bear some importance for ischemia and reperfusion damage, as well as the energetics of cellular calcium homeostasis.

*'In the following text, Mi<sub>v</sub>-CK will be simply addressed to as Mi-CK.*

## Zusammenfassung

Sarkomere mitochondriale Kreatinkinase (Mi<sub>6</sub>-CK; EC 2.7.3.2) ist ein positiv geladenes Enzym, das sowohl zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran, als auch zwischen den Cristaemembranen lokalisiert ist. Die oktamere Form der Mi-CK<sup>1</sup> kann vermutlich die Vernetzung von mitochondrialen Membranen zu sogenannten "contact sites" induzieren. Der Vorgang der Mi-CK Membranbindung und der Mi-CK-induzierten Membranvernetzung wurde *in vitro* anhand eines Modellmembransystems, welches variierenden Cardiolipingehalt (CL) aufwies, untersucht.

Zunächst wurde die direkte Bindung von oktamerer Mi-CK an immobilisierte Lipidvesikel mit der "surface plasmon resonance" (BiaCore) Technik analysiert. Zu diesem Zweck wurde ein neuartiges, auf der wiederholten Immobilisierung von Lipidvesikeln basierendes, System auf Avidin/Biotin Basis entwickelt. Die Analyse der Geschwindigkeitsassoziations- und Dissoziationskonstanten (pseudo erster Ordnung) zeigte, daß zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität für Mi-CK auf der Membran existieren. Die bei 25 °C gemessenen Assoziationsgleichgewichtskonstanten betragen 813.7 (100% CL) bzw. 343.6 (16% CL) für den hochaffinen Bindungsmodus.

Anschließend wurde die Mi-CK-induzierte Vernetzungskinetik (cross-link) mit Lichtstreuversuchen bei konstantem Detektionswinkel gemessen. Lediglich die oktamere Form der Mi-CK war in der Lage, verbrückte Vesikel/Proteinaggregate zu induzieren, während dimere Mi-CK keinerlei Verbrückungseigenschaften zeigte. Für Vesikel, welche zu 100% aus CL bestanden, wurde die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante zu  $2.55 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  bestimmt, für Membranen, die 16% CL und 84% Phosphatidylcholin (PC) enthielten, wurde eine Konstante von  $6.25 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  gefunden. Die so für das System bestimmten kinetischen Konstanten legen ein Bindungsmodell nahe, das aus zwei Schritten besteht, d.h. aus einer schnellen Assoziation von Mi-CK mit der Membran mit anschließender, deutlich langsamerer, Vernetzung der Vesikel. Die durch biophysikalische *in vitro* Methoden ermittelten Daten stellen eine gute Erweiterung zu früheren, qualitativen Experimenten mit Mitoplasten und tragen zur Erklärung der Akkumulation von Mi-CK an "contact sites" zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran und der Ausbildung von intramitochondrialen kristallinen Einschlüssen (inclusions) bei Patienten mit mitochondrialen Cytopathien bei.

Die Bindung von dimerer Mi-CK an die oben beschriebenen Modellmembransysteme und die Effecte von divalenten Kationen wurden mit Fluoreszenzspektroskopie und Fluoreszenz-Energietransfer untersucht. Es konnte eine erhöhte Sensitivität der dimeren Mi-CK gegenüber der Membranzusammensetzung

festgestellt werden, da diese nicht an Membranen, die lediglich 16% CL enthielten, adsorbiert wurde. Bei Verwendung von reinen CL-Membranen wurde eine relativ schnelle Membranadsorption des Dimers gemessen, die gemessene Assoziationsgeschwindigkeitskonstante pseudo erster Ordnung betrug  $1.55 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Bei Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  -Ionen nach der Membranassoziation des Dimers, wurde ein Energietransfersignal der dansylierten Lipidsonde gemessen, die auf eine Repositionierung des Dimers auf der Membranoberfläche schließen ließ.

Im letzten Teil dieser Dissertation wurde die Reaktion von Peroxynitrit (PN) und Mi-CK mit biochemischen und biophysikalischen Techniken untersucht. Die Reaktion von PN mit Mi-CK führte zur Inaktivierung des Enzyms, was auf unterschiedlichen Komplexitätsebenen nachgewiesen wurde, d.h. i) mit gereinigter Mi-CK, ii) mit an Mitoplasten gebundenem Enzym und iii) mit intakten Mitochondrien. Die kreatinstimulierte Atmung wurde, lange vor der Atmungskette selbst, durch PN-Konzentrationen, die als physiologisch gelten, unterdrückt. Daraus läßt sich folgern, daß in intakten Mitochondrien Mi-CK ein primäres Zielprotein der durch PN verursachten Inaktivierungen ist. Die Inaktivierung von Mi-CK durch PN ließ sich durch 2-Mercaptoethanol (2-ME) zu 22% rückgängig machen, wobei eine Präinkubation mit 2-ME bzw. EDTA - vor PN Zugabe - das Enzym schützte. Die Zugabe von einzelnen CK-Substraten ließ hingegen keinen Schutzeffekt erkennen. Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung des am aktiven Zentrum liegenden Cys-278 am Inaktivierungsvorgang schließen. Eine Veränderung der endogenen Tryptophan-Fluoreszenzintensität und spektrale Veränderungen nach der Reaktion von Mi-CK mit PN lassen auf weitere Veränderungen von Tyr- und Trp-Resten schließen. In der Tat enthält Mi-CK einige Trp-Reste, welche eine Schlüsselrolle im katalytischen Prozess (Trp-223, am aktiven Zentrum) und bei der Stabilisierung des Okatmers (Trp-264, an der Dimer/Dimer Kontaktstelle) spielen. Im Gegensatz zum nativen Enzym verblieb PN-inaktivierte Mi-CK nach Zugabe eines Komplexes, der am aktiven Zentrum den Übergangszustand der Phosphatübertragung induziert (TSAC), im oktameren Zustand. Die Konsequenzen der hier beschriebenen, ausgesprochen hohen, Sensitivität der Mi-CK gegenüber PN werden in Bezug auf die neuentdeckte, hochaktive NO Synthase in Mitochondrien, diskutiert. In diesem Kontext sind die gewonnenen Resultate sowohl für Ischämie und Perfusionsschädigung von Geweben, als auch für die zelluläre Energetik und die Kalziumhomöostase von Bedeutung.

*<sup>1</sup>Im nachfolgenden Text wird  $\text{Mi}_b\text{-CK}$  der Einfachheit halber als Mi-CK bezeichnet.*