

DISS. ETH. No. 15180

METHYLGLYOXAL, CREATINE AND MITOCHONDRIAL MICRO-COMPARTMENTS

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

For the degree of
Doctor of natural sciences

Presented by

Oliver Speer

Dipl.-Biologe, Universität Konstanz, Germany

** 08.01.1973, Villingen-Schwenningen, Germany*

German citizen

Prof. Dr. Theo Wallimann, examiner
Prof. Dr Sabine Werner, co-examiner
Ove Eriksson, MD, PhD, co-examiner

Zürich, June 2003

SUMMARY

In recent years mitochondria have been recognized as centers of cell death regulation. The release of several pro-apoptotic proteins from the mitochondrial inter-membrane space leads to programmed cell death. For the release of apoptogenic proteins, such as cytochrome c, the mitochondrial permeability transition (mPT) is essential.

(I) In the first part of the presented thesis, the effects of methylglyoxal (MG), a new permeability transition inhibitor, are described. MG was able to reversibly inhibit Ca^{2+} - and ceramide GD3-induced swelling of mitochondria, as well as the release of cytochrome c. However, MG did not interfere with substrate transport, respiration or oxidative phosphorylation. MG is a physiological carbonyl compound formed as an intermediate by the glycolytic enzyme triose phosphate isomerase. Thus, in addition the effect of 29 other physiological carbonyl compounds were also tested on mPT. Except for glyoxal and MG none of these related compounds showed neither mPT-inducing nor mPT-inhibiting characteristics. The effect of MG is probably due to a reversible covalent modification of arginine residues in proteins that are crucial for mPT regulation.

(II) In the second part of the thesis the role of ubiquitous mitochondrial creatine kinase (mt_uCK) in mitochondria was studied. Mitochondrial CK, among other things, is a regulator of mPT. However, the role and interaction partners of mt_uCK during mPT regulation have not yet been characterised completely. Transgenic liver expressing mt_uCK , which is not present in wild type liver, is used as a model to study the function of mt_uCK . The effects of creatine and its analogues, cyclo-creatine and β -guanidinopropionic acid (β -GPA) were investigated. It was shown by standard mitochondrial swelling measurements that mt_uCK in concert with creatine and cyclocreatine is able to protect mitochondria from swelling and going into mPT pore opening. However β -GPA, which is not phosphorylated by mt_uCK was ineffective in this respect. The creatine and cyclo-creatine effected mPT inhibition was Mg^{2+} dependent. The mt_uCK inhibitory effects were observed without externally added nucleotides. By thin layer chromatography, the incorporation of ^{32}P into phosphocreatine, after the addition of creatine without additional nucleotides was observed.

These data indicate that an internal mitochondrial nucleotide pool must exist and a nucleotide cycling facilitated by functional coupling of adenine nucleotide translocator (ANT) and mt_uCK . An mt_uCK / ANT micro-compartment is therefore suggested. To test this hypothesis, BBCK, a cytosolic creatine kinase isoform, as well as mt_uCK , were both added to isolated wild type mitochondria not containing mt_uCK . As expected, unlike BBCK, mt_uCK did bind to the mitochondrial surface. However, in both cases neither creatine nor cyclocreatine were able to inhibit mPT. Thus, a stringent closely coupled micro-compartment between mt_uCK and ANT seems to be prerequisite for the protective function of CK in concert with the latter protein complex.

(III) To visualize the above reported effects of mt_uCK , the morphology of transgenic liver was studied by electron microscopy. Over-expressed mt_uCK in liver formed inclusions inside the mitochondrial cristae. mt_uCK increased significantly the number of contact sites, thus harbouring additional potential mPT regulators. Also, the resistance of mitochondria to the detergent digitonin increased, as seen by light scattering. It was possible to isolate detergent-resistant membrane domains by ultra-centrifugation. These contained besides mt_uCK also the adenine nucleotide translocator (ANT), the outer membrane voltage-dependent anion channel (VDAC), as well as certain components of the respiratory chain.

In conclusion I hypothesize that mt_uCK besides being concentrated in contact sites is also buried within cristae inside mitochondria. In order to supply mt_uCK with its substrate creatine, a mitochondrial transport mechanism for creatine might be proposed.

(IV) Indeed a mitochondrial creatine uptake mechanism could be identified and characterised in the fourth part of this thesis. Antibodies against synthetic peptides derived

from the sequence of the creatine transporter (CrT) gene recognize two distinct polypeptides at ~55 and ~70 kDa (3, 5). Here the mitochondrial localisation of these proteins was investigated. By electron microscopy and sub-mitochondrial fractionation it was shown that those localised to the inner mitochondrial membrane. After assuming that the α -CrT reactive proteins represent creatine transporter; isolated mitochondria were incubated with radioactively labelled creatine. In fact, a mitochondrial creatine uptake with a high K_m of approximately 15 mM was observed. Unlike plasma membrane creatine transport (4, 5), mitochondrial creatine uptake was not inhibited by the creatine analogue β -GPA. However, the creatine precursor arginine was a significant competitive inhibitor for mitochondrial creatine uptake. Finally α -CrT antibodies inhibited mitochondrial creatine uptake.

The mitochondrial creatine uptake was significant. However, as the mitochondrial Cr uptake properties vary substantially from the reported plasma membrane Cr uptake (4, 5) the molecular identity of the mitochondrial creatine uptake system needed to be clarified.

(V) In the fifth part of the thesis, the α -CrT antibody reactive protein species were characterised in more detail. Proteins of enriched inner mitochondrial membrane were separated by 2D gel electrophoresis. After excision from the 2D gel and tryptic digestion, they were identified by LC-ESI-MS/MS. Four α -CrT immuno reactive protein species could be identified as subunits of mitochondrial dehydrogenase complexes. High pH carbonate washing of inner mitochondrial membrane fractions revealed that these α -CrT reactive proteins were not genuine membrane proteins. However, another α -CrT reactive polypeptide at higher molecular weight revealed typical membrane protein behaviour. Consequently, by MALDI-TOF a potential membrane protein was determined as carboamoyl phosphate synthase, a membrane bound mitochondrial enzyme of the urea cycle. As there was no mitochondrial creatine transporter protein found, the creatine uptake was studied again. After mitochondrial volume measurements, mitochondria appeared not to enrich creatine: the creatine concentration in mitochondria increased significantly, yet remained at ~30 % of the external creatine concentration. Pulse chase experiments showed that creatine was migrating freely into and out of mitochondria. This indicates that there is no active creatine uptake system within mitochondria.

(VI) I propose that creatine diffuses freely into the inter-membrane spaces and into the mitochondrial cristae where mtCK is located. For this creatine uptake no specific Cr transporter is needed. I suggest that a classical low K_m , high affinity creatine transporter is only present in the plasma membrane.

The complete micro-compartments inside cristae on the one hand or between MOM and MIM on the other hand, containing mt_oCK, ANT, creatine and Mg²⁺ protects against mPT. In accordance to Eric Fontaine et al. (2) and Paul S. Brookes et al. (1) components of the respiratory chain were found in context with the mPT.

ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren wurden Mitochondrien als Zentren der Zelltodregulation erkannt. Die Freisetzung einiger Proteine aus dem mitochondrialen Zwischenmembranraum führt zum programmierten Zelltod. Für die Freisetzung mitochondrialer apoptogener Proteine, wie zum Beispiel Cytochrome c, ist die mitochondriale Permeabilitäts-Transition (mPT) entscheidend.

(I) Im ersten Teil der vorgestellten Arbeit werden die Effekte von Methyl-Glyoxal (MG), eines neuen Hemmstoffes der mPT beschrieben. MG inhibierte reversibel, durch Ca^{2+} und Ceramide GD3 verursachtes Schwellen von Mitochondrien. MG störte jedoch weder den Substrattransport, die Atmung, noch die oxidative Phosphorylierung. MG ist eine physiologische Verbindung, welche als Zwischenprodukt durch das glycolytische Enzym Triosephosphat Isomerase gebildet wird. Folglich wurde die Wirkung von 29 weiteren physiologisch relevante Carbonyl Verbindung auf die mPT untersucht. Außer Glyoxal zeigte keine der untersuchten Substanzen einen mPT-fördernden oder einen mPT-hemmenden Einfluss. Der Effekt von MG wird der reversiblen kovalenten Bindung an Arginine Reste in Proteinen, die entscheidend für die mPT Regulation sind, zugeschrieben.

(II) Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde die Rolle der ubiquitären Kreatin Kinase (mt_uCK) in Mitochondrien untersucht. Unter anderem ist die mt_uCK ein Regulator der mPT. Die Rolle der mt_uCK und deren Interaktionspartner bei der mPT wurden jedoch noch nicht vollständig charakterisiert. Mt_uCK ist normalerweise in Lebergewebe nicht nachweisbar. Deshalb wird transgene Leber, welche mt_uCK expremiert, als Modell zur Funktionsuntersuchung der mt_uCK verwendet. Die Wirkung von Kreatin und dessen Analoge Cyclo-Kreatin und β -Guanidino-Propion Säure (β -GPA) wurde untersucht. Mittels Standard Schwell-Messungen an Mitochondrien wurde gezeigt, dass mt_uCK zusammen mit Kreatin oder Cyclo-Kreatin das Öffnen der mPT Pore verhindern konnte. β -GPA, dass von mt_uCK nicht phosphoryliert werden kann, zeigt hier keinen Effekt. Die Wirkung von Kreatine und Cyclo-Kreatine auf die mPT war Mg^{2+} abhängig, und wurde ohne den Zusatz von Nukleotiden beobachtet. Mittels Dünnschicht-Chromatographie wurde nach der Zugabe von Kreatin ohne zusätzlich Nukleotide der Einbau von ^{32}P in Phospho-Kreatine nachgewiesen.

Diese Daten deuten darauf hin, dass es einen internen mitochondrialen Pool an Nukleotiden geben muss, und dass eine Zyklisierung der Nukleotide durch die funktionelle Kopplung des Adenin-Nukleotid Translokators (ANT) und der mt_uCK ermöglicht wird. Deshalb wird eine ANT / mt_uCK Mikro-Kompartimentierung vorgeschlagen. Um diese Hypothese zu testen wurde zu isolierten Wildtyp-Mitochondrien (ohne mt_uCK), sowohl gereinigt mt_uCK als auch BBCK, ein zytosolisches Isoenzym, zugesetzt. Wie erwartet band mt_uCK im Gegensatz zur BBCK and die Oberfläche der Mitochondrien. In beiden Fällen waren jedoch weder Kreatin noch Cyclo-Kreatin in der Lage mPT zu hemmen. Deshalb scheint eine direkt Nachbarschaft von ANT und mt_uCK in einem Mikro-Kompartiment notwendig um die schützende Wirkung der mt_uCK zu ermöglichen.

(III) Um die oben berichteten Wirkungen der mt_uCK sichtbar zu machen wurde die Morphologie der transgenen Leber im Elektronenmikroskop untersucht. In Leber über-expremierte mt_uCK führte zu Einschlüssen innerhalb der mitochondrialen Cristae. MtuCK erhöhte signifikant die Anzahl der Kontaktstellen, welche vermutlich einige mögliche mPT Regulatoren beherbergen. Ebenso erhöhte sich die Beständigkeit der Mitochondrien gegenüber dem Detergents Digitonin. Dies wurde bei Lichtstreuungs-Messungen festgestellt. Es war außerdem möglich durch Ultra-zentrifugation Detergents resistente Membran-Domänen zu isolieren. Diese enthielten außer mt_uCK auch ANT, spannungsabhängigen Ionenkanäle (VDAC) und Bestandteile der Atmungskette.

mt_uCK ist folglich sowohl in den Kontaktstellen, als auch in den unzugänglichen Cristae lokalisiert ist. Um mt_uCK mit Kreatin zu versorgen schlage ich hier einen mitochondrialen Kreatin-Transport-Mechanismus vor.

(IV) Tatsächlich konnte im vierten Teil dieser Doktorarbeit ein mitochondrialer Kreatin Aufnahme Prozess identifiziert und charakterisiert werden. Antikörper, die gegen synthetische Peptide, abgeleitet von der Gen-Sequenz des Kreatin Transporters (CrT), hergestellt wurden,

erkannten zwei verschiedene Polypeptide mit der molekularen Größe von ca. 55 und 70 kDa (3, 5). Hier wurde die mitochondriale Lokalisierung dieser Proteine untersucht. Mittels Elektronenmikroskopie und Sub-Fraktionierung von mitochondrialen Membranen wurde gezeigt, dass sich diese Proteine in der mitochondrialen Innenmembran befinden. Nach der Annahme, dass diese α -CrT reaktiven Proteine CrT seien, wurden isolierte Mitochondrien mit radioaktiv markiertem Kreatin inkubiert. Tatsächlich wurde ein Kreatin-Aufnahme mit hohem K_m (ca. 15 mM) gemessen. Im Gegensatz zum Kreatin Transport über der Plasmamembran (4, 5), wurde der mitochondrial Kreatine Transport nicht durch β -GPA gehemmt. Arginine war jedoch ein signifikanter Inhibitor der mitochondrialen Kreatin Aufnahme. Schließlich inhibierte der α -CrT Antikörper die mitochondriale Kreatin Aufnahme.

Die mitochondriale Kreatin Aufnahme war eindeutig. Ihre Eigenschaften gegenüber der des Plasmamembran Transportes waren jedoch substanziiell verschieden (4, 5). Die molekulare Identität dieser mitochondrialen Kreatin Aufnahme bedurften der Klärung.

(V) Im fünften Teil dieser These wurden die α -CrT reaktiven Protein näher untersucht. Proteine aus hochangereicherter mitochondrialer Innenmembran wurden durch 2D Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Nach dem Ausschneiden aus den Gelen und dem tryptischen Verdau, wurden sie mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert. Vier Proteine konnten als Untereinheiten von mitochondrialen Dehydrogenase Komplexen identifiziert werden. Carbonat-Extraktionen bei hohem pH zeigten, dass es sich tatsächlich nicht um Membranproteine handelte. Eine weiter α -CrT reaktive Proteinbande bei einem Molekulargewicht von >100 kDa zeigte jedoch typische Eigenschaften eines Membranproteins. Mittels MALDI-TOF wurde dieser Kandidat aber als Karboamoyl-Phosphat Synthase, einem hypothetischen Membranprotein des Harnstoff Zyklus identifiziert. Da kein mitochondrialer CrT gefunden werden konnte wurde die mitochondriale Kreatin Aufnahme nochmals untersucht. Nach der Messung des mitochondrialen Volumens ergab es sich bei der Konzentrationsberechnung, dass Mitochondrien Kreatin nicht anreichern. Die Kreatinkonzentration in Mitochondrien stieg zwar eindeutig an, blieb jedoch immer bei 30 % der außen vorgelegten Konzentration. „Pulse chase“ Experimente zeigten weiterhin, dass Kreatin sich frei in Mitochondrien hinein und herausbewegen kann. Summa summarum zeigen diese Ergebnisse, dass es keinen aktiven mitochondrialen Kreatintransport gibt.

(VI) Ich schlage vor, dass Kreatin frei zur mt_t CK in die Cristae hinein diffundieren kann. Für diese Aufnahme in die Mitochondrien ist jedoch kein spezifischer Transport notwendig. Ein klassischer hochaffiner Kreatin Transporter mit niedrigem K_m -Wert kommt vermutlich nur in der Plasma-Membran vor.

Weiterhin stelle ich vor, dass intakte Micro-Kompartimente in den Cristae auf der einen Seite, und zwischen Außen- und Innenmembran auf der anderen Seite, mt_t CK, ANT, Mg^{2+} und Nukleotide enthalten, und als funktionelle Einheit mPT verhindern können. In Übereinstimmung mit Eric Fontaine (2) und Paul S. Brooks (1) konnten im Zusammenhang mit mPT Teile der Atmungskette nachgewiesen werden.

References:

1. **Brookes PS, Pinner A, Ramachandran A, Coward L, Barnes S, Kim H, and Darley-Usmar VM.** High throughput two-dimensional blue-native electrophoresis: a tool for functional proteomics of mitochondria and signaling complexes. *Proteomics* 2: 969-977, 2002.
2. **Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, and Bernardi P.** Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 273: 12662-12668, 1998.
3. **Guerrero-Ontiveros ML WT.** Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 184: 427-437, 1998.
4. **Peral MJ, Garcia-Delgado M, Calonge ML, Duran JM, De La Horra MC, Wallimann T, Speer O, and Ilundain A.** Human, rat and chicken small intestinal Na(+)-Cl(-)-creatine transporter: functional, molecular characterization and localization. *J Physiol* 545: 133-144., 2002.
5. **Walzel B, Speer O, Boehm E, Kristiansen S, Chan S, Clarke K, Magyar JP, Richter EA, and Wallimann T.** New creatine transporter assay and identification of distinct creatine transporter isoforms in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E390-401, 2002.



Brain mitochondrion, Oliver Speer, 12.04.2001