ETH zürich

ETH Library

Identification of cardiolipin as the membrane receptor of mitochondrial creatine kinase and determination of the transverse distribution of cardiolipin accross the inner mitochondrial membrane

Doctoral Thesis

Author(s):
Cheneval, Dominique

Publication date:
1987

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-000413938

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 8377

IDENTIFICATION OF CARDIOLIPIN AS THE MEMBRANE RECEPTOR OF MITOCHONDRIAL CREATINE KINASE AND DETERMINATION OF THE TRANSVERSE DISTRIBUTION OF CARDIOLIPIN ACROSS THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE

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

presented by
DOMINIQUE CHENEVAL
dipl.Natw.ETH
born 8th December 1959
citizen of BERN

accepted on the recommendation of
Prof. E.Carafoli, examiner
Prof. K.H.Winterhalter, co-examiner

Zürich 1987

SUMMARY

Adriamycin was used to titrate cardiolipin in the inner membrane of rat liver and heart mitochondria. In both types of mitochondria about 57±5% of the total cardiolipin is located in the cytopolasmic face of the inner membrane. Mitochondria and mitoplasts were used to study the cytoplasmic face, purified submitochondrial vesicles with inverted membrane orientation for the matrix face. The cardiolipin amount titrated in both faces are complementary. The adriamycin association constant for the first saturation level of mitochondria was in good agreement with the value published for cardiolipin in artificial membranes. Two binding plateaus were observed whith increasing amounts of adriamycin. The plateau at higher concentrations is conveniently explained by the penetration of adriamycin into mitochondria and the titration of cardiolipin in the matrix face. Scatchard plot analysis of the binding curves leading to the two plateaus produced almost identical association constants. The total amount of cardiolipin in mitochondria calculated from curves of this type corresponds extraction values, analyzed by thin layer chromatography.

Treatment of rat heart mitochondria with phosphate or mersalyl releases a number of proteins, including the mitochodrial creatine kinase. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of the released proteins showed that phosphate is more selective than mersalyl in releasing the kinase. The rebinding of creatine kinase is selectively inhibited by adriamycin, which complexes membrane bound cardiolipin. Creatine kinase activity and binding experiments show that intact mitochodria are able to bind approximately twice the original amount of creatine kinase. Liver mitochondria bound heart mitochondrial creatine kinase to the same extent as creatine kinase depleted heart mitochondria. The kinase was bound to liposomes only if they contained cardiolipin. The bindig of the kinase to cardiolipin

containing liposomes was inhibited by adriamycin. Phosphatidylcholine liposomes reconstituted with the purified ADP/ATP-translocase failed to bind creatine kinase. Adriamycin did not bind to these liposomes and did not influence the translocase activity.

The creatine kinase was purified to homogenity from rat heart mitochondria, and cleaved with CNBr. The fragments were seperated on an FPLC system using a Mono Q HR 5/5 column. Only one of these fragments binds to cardiolipin containing liposomes, and is thus identified as the cardiolipin binding domain of the enzyme. Its amino acid sequence has been determined. The fragment contains 25 amino acids and corresponds to the N-terminal region of the protein. The binding of the fragment to cardiolipin containing liposomes was inhibited by adriamycin. Another and larger CNBr fragment can be specifically labeled with periodate oxidized (di-aldehyde) ATP and is thus identified as the ATP binding domain. Chemical modification of the basic amino acids Lys and Arg of the enzyme abolished its binding to cardiolipin. Modification of His residues on the other hand had only a minor effect on the binding, and modification of Cys residues no effect at all

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eigenschaft des Adriamycin sich an Cardiolipin zu binden benutzt, um die Bindungstelle in der Membran für die mitochondriale Kreatinkinase zu identifizieren, und um die transversale Verteilung von Cardiolipin in der inneren mitochondrialen Membran von Rattenleber- und Herzmitochondrien zu bestimmen. In beiden Mitochondrientypen wurde ca. 57±5% des totalen Cardiolipins auf der cytoplasmatischen Seite der inneren Membran gefunden. Diese Seite wurde mit Hilfe von Mitochondrien und Mitoplasten untersucht. Der Gehalt der Matrixseite wurde mit Hilfe von submitochondrialen Partikeln bestimmt, welche eine umgekehrte Membranorientierung aufwiesen. Der Cardiolipingehalt auf der Matrixseite war zur cytosolischen Seite komplementär. Die Bindungskonstante von Adriamycin im ersten Sättigunsplateau stimmte mit der Cardiolipinbindung in den künstlichen Membranmonoschichten gut überein. Mit zunehmender Adriamycinkonzentration konnten zwei Sättigunsplateaus beobachtet werden. Das zweite Plateau bei höheren Konzentrationen lässt sich dadurch erklären, dass Adriamycin durch die Membran hindurch sich an das Cardiolipin bindet, welches sich auf der Matrixseite der Membran befindet. Skatchardplot-Analysen der Bindungskurven ergaben für beide Plateaus praktisch gleiche Bindungskonstanten. Der Gesamtgehalt an Cardiolipin in den Mitochondrien, ermittelt durch die Adriamycintitration, stimmte mit dem Gehalt überein, welcher (unabhängig davon) mit Hilfe von Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie bestimmt wurde.

Die Behandlung von Herzmitochondrien mit Phosphat oder Mersalyl solubilisierte eine Anzahl Proteine darunter auch die mitochondriale Kreatinkinase. Wie die Gelelektrophorese zeigte, eignete sich Phosphat besser als Mersalyl die Kreatinkinase zu lösen. Die Rückbindung der Kreatinkinase konnte spezifisch mit Adriamycin,

welches Cardiolipin komplexiert, gehemmt werden. Es zeigte sich, dass die unbehandelten Herzmitochondrien ungefähr zweimal ihren ursprünglichen Gehalt an Kreatinkinase binden konnten. An Lebermitochondrien konnte der gleiche Anteil an Kinase wie an kinasefreie Herzmitochondrien gebunden werden. Liposomen, welche Cardiolipin enthielten, banden ebenfalls Kreatinkinase. Auch diese Bindung wurde mit Adriamycin gehemmt. Liposomen, rekonstituiert mit dem ADT/ATP-translocator hingegen, konnten keine Kreatinkinase binden. Weder wurde die Aktivität dieser Vesikel durch Adriamycin beeinflusst noch konnte Adriamycin gebunden werden.

Die Kreatin Kinase wurde gereinigt und mit CNBr gespalten. Die Fragmente konnten auf einer FPLC Mono Q HR 5/5 Säule aufgetrennt werden. Eines dieser Fragmente konnte an cardiolipinhaltige Liposomen gebunden werden und konnte so als die cardiolipinbindende Region der Kinase identifiziert werden. Sequenzanalysen ergaben, dass es sich um ein 25 Aminosäuren langes Fragment handelte, welches mit dem N-Terminus des Proteins übereinstimmte. Ein anderes, etwas grösseres Fragment konnte mit periodat oxidiertem (di-aldehyd) ATP markiert werden und wurde als ATP-bindende Domäne identifiziert. Chemische Modifikationen der basischen Aminosäuren Lys und Arg verhinderten eine Bindung zu Cardiolipin. Die Modifikation von His hingegen hatte nur einen geringen und die Modifizierung von Cys gar keinen Effekt. Damit wurden die möglichen Aminosäuren, welche an einer Cardiolipinbindung beteiligt sein könnten, auf Lys und Arg beschränkt.