

DIZERTAČNÍ PRÁCE

**ŘÍZENÍ ENZYMATICKÉ AKTIVITY MOLEKULY
KREATINKINÁZY ZMĚNAMI JEJÍ KONFORMACE**



Daniela Horníková

vedoucí dizertační práce: prof. RNDr. Jiří Mejsnar DrSc.

Praha 2008

OBSAH

Seznam použitých zkratk	4
Úvod	6
1. Literární přehled	7
1.1. Řízení aktivity enzymu	7
1.1.1. Fyzikální vlastnosti CK	7
1.1.2. Kinetické analýzy	9
1.1.3. Kompartmentalizace substrátů PCr/CK systému	10
1.2. Fosfagenové systémy	10
1.3. Kreatinkinázový/fosfokreatinový (CK/PCr) systém	11
1.3.1. CK/PCr systém a jeho fyziologický význam	11
1.3.2. Uspořádání CK/PCr systému v kosterním svalu	14
1.4. Lokalizace izoform CK v buňce	16
1.4.1. Izoformy CK	16
1.4.2. Lokalizace cytosolické MM-CK	18
1.4.3. Lokalizace a funkce mitochondriální CK	19
1.5. Působení proteinů a CK v M-linii	20
1.5.1. Interakce strukturálních proteinů v M-linii	20
1.5.2. CK/PCr systém v M-linii sarkomery	21
1.5.3. Význam M-linie sarkomery	22
1.5.4. Interakce CK v M-linii sarkomery	24
1.6. Struktura a funkce CK molekuly	26
1.6.1. Struktura M kreatinkinázového monomeru	26
1.6.2. Dynamika kreatinkinázové molekuly	28
2. Metodiky práce	32
2.1. Biochemické metody	33
2.1.1. Izolace svalové tkáně	33
2.1.2. Příprava myofibrilární frakce	33
2.1.3. Eluce CK z myofibril mediem s nízkým obsahem iontů	34
2.1.4. Mnohonásobná ultrafiltrace eluátu	34
2.1.5. Kapalinová chromatografie	35
2.1.6. SDS elektroforéza	35

2.1.7.	Měření aktivity CK	36
2.1.8.	Stanovení proteinů Lowryho metodou	37
2.1.9.	Dvourozměrná elektroforéza	38
2.1.10.	Hmotnostní spektrometrie	39
2.1.11.	Izolace myofibril pro vytěšňovací experimenty	41
2.1.12.	Vazebný experiment	41
2.1.13.	Měření FLIP a hodnocení dat	42
2.2.	Fyzikální metody	44
2.2.1.	Fluorescenční metody	44
2.2.1.1.	Měření konformačních změn pomocí FRET	45
2.2.1.2.	Steady-state fluorescenční spektroskopie	46
2.2.1.3.	Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie	46
2.2.1.3.1.	Anizotropie	46
2.2.2.	Fluorescenční značení MM-CK molekuly pro měření jejich konformačních změn	48
2.2.2.1.	Neznačená CK	48
2.2.2.2.	Značení CK Dansylchloridem	48
2.2.2.3.	Značení CK pomocí IAF	49
2.2.2.4.	Značení CK pomocí FITC	50
2.2.2.5.	Dvojí značení CK pomocí IAF a ErITC	50
2.2.2.6.	Dvojí značení CK pomocí FITC a ErITC	51
3.	Výsledky	52
3.1.	Purifikace myofibrilární CK	52
3.2.	Charakterizace myofibril	54
3.3.	Vazba CK-IAF v M-linii izolovaných myofibril	55
3.4.	Měření FLIP	56
3.5.	pH závislost CK-IAF na interakci v M-linii	57
3.6.	Měření konformačních změn CK	58
3.6.1.	Neznačená CK	58
3.6.1.1.	Střední doby života	58
3.6.1.2.	Časově rozlišná fluorescenční anizotropie (steady state)	59
3.6.1.3.	Zhášení fluorescence akrylamidem	60
3.6.2.	CK značená pomocí FITC	61
3.6.3.	CK značená dansylchloridem	63

3.6.4.	CK značená pomocí IAF	65
3.6.5.	CK dvojitě značená pomocí FITC a ErITC	66
3.6.6.	CK dvojitě značená pomocí IAF a ErITC	67
4.	Diskuze	68
5.	Závěr	74
6.	Přehled použité literatury	75
7.	Přílohy	91
7.1.	Literární úvod	91
7.1.1.	Přehled genové exprese izoform CK a porovnání primárních struktur	91
7.1.2.	Sekvence kreatinkinázy (EC 2.7.3.2); M – izoforma; králík	101
7.2.	Metodika práce	102
7.2.1.	Složení použitých médií pro přípravu myofibrilární frakce a eluci CK z myofibril	103
7.2.2.	Eluční protokoly	105
7.2.3.	SDS-elektroforéza, zásobní roztoky	107
7.2.4.	Složení roztoků na stanovení aktivity CK v kyvetě ($v_{\Sigma} = 100$ ml)	109
7.2.5.	Složení roztoků pro měření proteinů	111
7.2.6.	TCA precipitace	112
7.2.7.	Barvení stříbrem	114
7.2.8.	Protokol pro značení CK dansylchloridem	116
7.2.9.	Protokol pro značení CK pomocí IAF	117
7.2.10.	Protokol pro značení CK pomocí FITC	118
7.2.11.	Protokol pro dvojí značení CK pomocí IAF + ErITC	119
7.2.12.	Protokol pro dvojí značení CK pomocí FITC + ErITC	121
7.3.	Výsledky	122
7.3.1.	Three isoelectric points of the creatine kinase M-subunit, purified from myofibrils.	122
7.3.2.	Fluorescence resonance energy transfer (FRET) in dansylated creatine kinase molecule.	124
7.3.3.	Creatine kinase binds more firmly to the M-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates.	126
7.3.4.	Creatine kinase structural changes induced by substrates.	134

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosin-5'-difosfát
AMP	adenosin-5'-monofosfát
AMPK	AMP aktivovaná proteinkináza
ANT	mitochondriální ATP/ADP translokáza
Ap₅A	P ¹ , P ⁵ -di (adenosin-5') pentafosfát
ATP	adenosin-5'-trifosfát
ATPáza	adenosintrifosfatáza
BBR	Bismark Brown R
B-CK; BB-CK	mozková izoforma kreatinkinázy (monomer, dimer)
BSA	bovine serum albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CK	kreatinkináza
CK/PCr systém	kreatinkinázový/fosfokreatinový systém
Cr	kreatin
Cys	cystein
DNCl	dansylchlorid
DTT	dithiothreitol (threo -1,4-dimerkapto-2,3-butandiol)
EDTA	ethylendiamin-tetraoctová kyselina
EGTA	ethylengykol-bis(β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraoctová kyselina
EtOH	ethanol
ErITC	erytrosin-5-isothiocyante
FITC	fluorescein-5-isothiocyante
FLIP	Fluorescence Lost in Photobleaching-metoda pro sledování pohybu fluorescenčně značených molekul
FRET	Fluorescence resonance energy transfer, fluorescenční rezonanční přenos energie
G	Gibbsova volná energie
G6P-DH	glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
His	histidin
HK	hexokináza
HM	homogenizační medium

IAA	iodacetamid
5-IAF	5-iodacetamid fluorescein
IEF	izoelektrická fokusace
IMP	inodizol-5'-monofosfát
K_m	Michaelisova konstanta
MB-CK	hybridní kreatinkináza (dimer)
M-CK, MM-CK	svalová izoforma kreatinkinázy (monomer, dimer)
MgADP	hořčnatý komplex adenosin-5'-difosfátu
MgATP	hořčnatý komplex adenosin-5'-trifosfátu
Mi_a-CK	všudypřítomná izoforma mitochondriální kreatinkinázy
Mi_b-CK	sarkomerická izoforma mitochondriální kreatinkinázy
Mi-CK	mitochondriální kreatinkináza
MOPS	3-morpholinopropansulfonová kyselina
MW	molekulová hmotnost
Na⁺/K⁺ pumpa	sodno-draselná ATPáza, sodíková pumpa
NAC	N-acetyl-L-cystein
NAD(H)	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADP(H)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
PCr	kreatinfosfát
Pi	anorganický fosfát
pI	izoelektrický bod
PMSF	fenylmethylsulfonfluorid
SDS	sodium dodecyl sulfát
TCA	kyselina trichloroctová
Temed	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
Thiourea	thiomočovina
Tris-HCl	2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Trp	tryptofan
TSAC	transition-state analog complex
TTNa	tetrathionát sodný
Urea	močovina

ÚVOD

Důležitou oblastí bioenergetiky je porozumění přenosu energie ve svalových buňkách a řízení těchto procesů. Tato oblast zahrnuje základní koncept buněčné organizace a multienzymatických komplexů v souvislosti s kompartmentalizací buněčných funkcí. To má přímý význam pro pochopení adaptačních strategií a patofyziologických mechanismů u různých poruch srdce a kosterní svaloviny.

Diferenciace a zrání vedly v průběhu času k vysoce komplexní a specializované organizaci dospělých svalových buněk u savců, každý typ svalu má svůj specifický program. Ten vede k nejvhodnějšímu morfologickému a biochemickému uspořádání podporujícímu konkrétní buněčnou aktivitu. Tyto programy se přizpůsobují vnějším podmínkám okolí i vnitřním potřebám organismu (hypokineze, cvičení, tlaková zátěž, hormonální změny). Zdá se, že kompartmentalizace enzymů je charakteristická pro zralé, vysoce organizované buňky obratlovců a zvláště savců, jako důsledek specializace míst produkce energie, její spotřeby a následně přenosu energie mezi těmito dvěma místy.

Práce je součástí výzkumného projektu, který řeší otázku buněčného řízení enzymatické aktivity kreatinkinázy (CK) vázané v myofibrile kosterního svalu. CK navázaná v M-linii sarkomery (myofibrilární CK) byla vybrána jako experimentální model umožňující sledování konformačních změn její molekuly za různých fyziologických stavů, které model funkčních myofibril umožňuje (kontrakce, relaxace). K měření strukturních změn molekuly enzymu jsem využila biochemické a současné špičkové fyzikální metody.

Cíl:

1. Získat experimentální data pro 3 konformační stavy molekuly CK.
2. Charakterizovat vazbu CK v M-linii sarkomery, v kontextu fyziologických změn v průběhu kontrakce:
 - a) vliv změny pH ve fyziologickém rozsahu
 - b) vliv vazby jednotlivých substrátů

1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1. Řízení aktivity enzymu

Základních životních procesů v živých buňkách se účastní velké množství na sebe navazujících enzymatických reakcí. Řízení těchto enzymatických kaskád je zajištěno několika různými způsoby např. změnou koncentrace substrátů, změnou koncentrace enzymů, jejich distribucí nebo expresí, specifickými regulačními proteiny, posttranslačními modifikacemi enzymů nebo změnou jejich konformace. Vhodnou reakcí ke studiu procesů řízení je kreatinkinázová reakce. CK je důležitým enzymem buněčného energetického metabolismu. Její izoenzymy jsou v místech, kde přeměna energie v buňce probíhá se značně proměnlivou intenzitou. Experimentální nálezy minulých let ukazují, že ve svalu je CK lokalizována v místech, kde je generována síla myozinovými molekulami, v místech přenosů iontů a energetických substrátů přes membrány (membránové iontové pumpy) a v sarkoplasmě. Kreatinkinázový/fosfokreatinový (CK/PCr) systém má komplexní a multifunkční úlohu v udržení rovnováhy buněčného energetického metabolismu (Wallimann et al., 1992), udržováním stálé koncentrace ATP, při velice rozdílných rychlostech jeho obratu.

1.1.1. Fyzikální vlastnosti CK

Průvodní studie fyzikálních vlastností králičí M-CK přinesly údaje o molekulové hmotnosti (MW) 81 kDa pomocí sedimentační rychlosti a chování molekuly jako rehydratovaného elipsoidu (Kuby and Noltmann, 1962). Později bylo ukázáno, že se králičí CK skládá ze dvou podjednotek, které volně disociují a molekulová hmotnost byla upřesněna na 82,6 kDa. Pro ostatní druhy se MW pohybuje v rozmezí od 78,5 – 85,1 kDa. Další sedimentační studie ukázaly, že denaturace guanidinium chloridem způsobí nejdříve disociaci podjednotek a potom jejich rozbalení, kdy nabývají konfigurace „náhodného klubka“. Avšak SDS způsobilo disociaci podjednotek bez zjevné ztráty strukturální organizace podjednotek. Z toho bylo vyvozeno, že enzym se skládá ze dvou podjednotek doutníkového tvaru, které leží vedle sebe.

Cytosolická izoforma byla popsána jako dimer, ale mitochondriální izoforma je aktivní ve formě oktameru. Pokud však je vystavena „přechodnému stavu analogového

komplexu“ (TSAC) směsi obsahující kreatin (Cr), MgADP a planární anionty jako nitrát, nitrit, formiát (Milner-White and Watts, 1971), disociuje mitochondriální oktamer na dimery (Gross and Wallimann, 1993). S těmito nálezy bylo současně konstatováno, že patrně nejmenší katalyticky aktivní jednotka je právě dimer.

Další pokračující debaty byly věnovány roli jednotlivých CK podjednotek v katalýze. Zcela v počátcích se Bickerstaff a Price (1978) zaměřili na chování jedné izolované podjednotky. Autoři stanovili, že každá podjednotka má své aktivní místo a to je dobře lokalizované. Později doložili, že samostatná podjednotka je aktivní. Byly provedeny rozsáhlé studie, které se zaměřily na možné neidentické chování podjednotek v dimeru a přinesly informace o negativní kooperativně obou podjednotek nebo neidentických aktivních místech v dimeru (Price and Hunter, 1976; Bickerstaff and Price, 1978). Nevinsky et al. (1982) například ukázal, že podjednotky králičí M-CK nejsou identické, zatímco Degani a Degani (1979) ukázal, že podjednotky byly organizovány asymetricky, a že dimer je nutný pro aktivitu enzymu. Později se ukázalo, že podjednotky pracují buď nezávisle (Wang et al., 1990), a nebo v přímém směru reakce nezávisle a kooperativně v opačném směru reakce (Hornemann et al., 2000a). Navíc kinetické analýzy poukazují na to, že terciární struktury obou podjednotek mohou být odlišné a mohou se chovat jako oddělené entity (Wang and Pan, 1996).

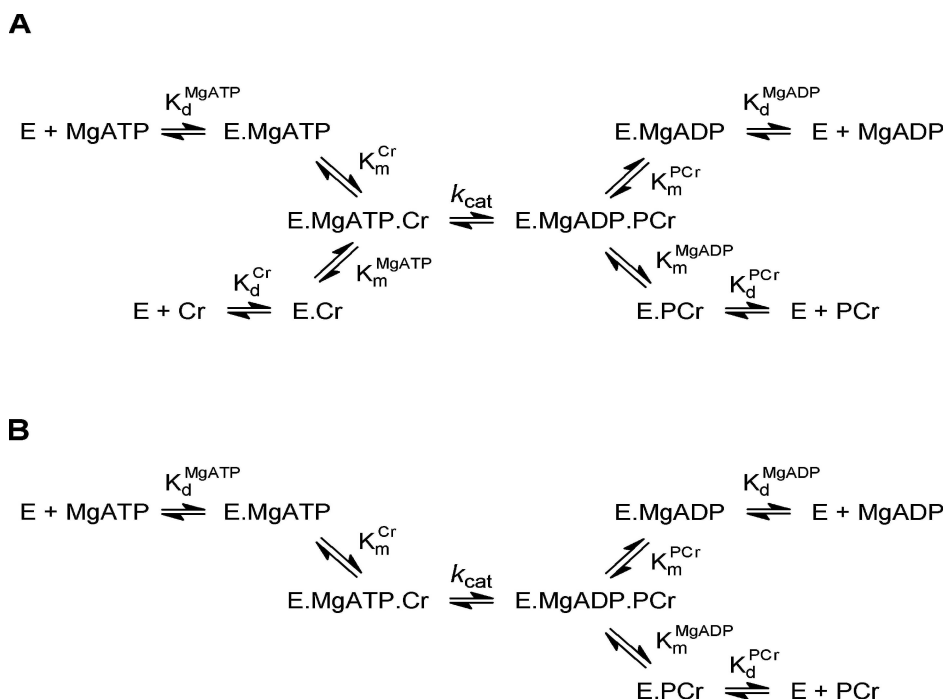
Předpokládalo se, že tyto otázky definitivně zodpoví X-ray analýza krystalické struktury CK s navázaným substrátem. Lahiri et al. (2002) krystalizovali enzym v přítomnosti TSAC směsi, skládající se z MgADP, Cr a nitrátu, a skutečně byl potvrzen obraz asymetrické struktury dimeru, kdy každý monomer vázal jiný substrát. Jeden monomer vázal MgADP a druhý monomer vázal TSAC, což svědčilo o negativní kooperativitě. Následující experiment hmotnostní spektrometrie potvrdil, že každá podjednotka může vázat substrát (Mazon et al., 2003).

Bylo tedy prokázáno, že každá podjednotka CK může katalyzovat transfosforylační reakci. Cox et al. (2003), provedli mnoho bodových mutací, aby odstranili povrchové interakce v oblasti kontaktu obou monomerů a našli dva mutanty, kteří v solubilizované formě vytvářeli monomery. Zajímavé bylo, že oba mutanti byli aktivní ve směru syntézy fosfokreatinu (PCr), ale hodnoty disociační konstanty K_d pro MgATP i Cr byly mnohokrát vyšší než WT enzymu. Navíc pouze jeden mutant vykazoval uspořádaný mechanismus vazby substrátu, kde se Cr vázal jako první (Cox et al., 2003). Tím bylo definitivně potvrzeno, že CK může být aktivní jako monomer, stejně tak jako argininkináza, která katalyzuje analogickou transfosforylační reakci u bezobratlých (Morrison, 1973).

1.1.2. Kinetické analýzy

CK reakce je reverzibilní a charakter reakce je závislý na hodnotě pH. Při pH 8 a výše se i enzym chová dle rychlého rovnovážného náhodného bi-bi mechanismu (obr 1A). Nebyly nalezeny žádné důkazy pro vznik fosforylovaného enzymového intermediátu a přenos fosfátu je rychlost určujícím krokem (Morrison and James, 1965; Morrison and Cleland, 1966; Morrison and White, 1967). Při pH 7 a nižším, je situace více komplexní (Schimerlik and Cleland, 1973). V přímém směru (fosforylace Cr) králičí M-CK pracuje v rovnovážně uspořádaném mechanismu a váže ATP před Cr (obr 1B), zatímco v opačném směru reakce zůstává náhodná (Schimerlik and Cleland, 1973).

Je dostatek údajů o kinetických konstantách rozpustných izoforem enzymu. Specifické aktivity jednotlivých svalových izoforem byly podobné napříč velkým množstvím druhů. Avšak mozkové izofomy se liší (Watts, 1973). Další rozdíl byl nalezen mezi mitochondriální a cytosolickou izoformou. Mitochondriální izoforma obecně má 3 až 4krát nižší specifickou aktivitu oproti cytosolické formě. V obou případech je reverzní reakce vždy rychlejší než v přímém směru, s drobnými výjimkami u jednotlivých druhů (Morrison and James, 1965; Maggio et al., 1977).



Obr 1. Mechanismus kinetiky králičí MM-CK. **A)** pH 8.0 a výše (Morrison&James, 1965). **B)** pH 7.0 a níže (Schimerlik& Cleland, 1973).

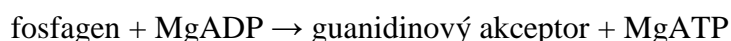
1.1.3. Kompartimentalizace substrátů CK/PCr systému

Kompartmenty obecně řídí lokální koncentraci substrátů a enzymů. Okolí enzymu může být tímto způsobem optimalizováno v oblasti hodnot pH, koncentrace iontů, kofaktorů a substrátů, i lokalizace prekurzorů enzymu. Kompartimentalizace tedy poskytuje lokální variabilitu těchto faktorů, které regulují aktivitu enzymu (Bessman and Carpenter, 1985). Vzhledem k tomu, že existují dobře definované oblasti výskytu v rámci jedné isoformy CK, dá se předpokládat určitá míra kompartimentalizace i jejích substrátů.

O možné kompartimentalizaci nukleotidů na myofibrilách uvažoval již v 60. letech minulého století Perry (1954) a spatřoval v něm velkou výhodu pro přesné nastavení jejich koncentrací nezbytných pro kontrakci. McClellan et al. (1983) popsali dva důležité momenty na permeabilizovaných buňkách. i) adeninové nukleotidy jsou vázané na kontraktilním systému, ii) tyto nukleotidy mohou být refosforylovány v bezprostřední blízkosti kontraktilního aparátu pomocí přenosu fosfátu z PCr. Na druhé straně nepřítomnost nukleotidů maximálně zvyšuje afinitu myosinu k aktinu, bez závislosti na koncentraci Ca^{2+} iontů a způsobuje tak křeč (rigor tension) (Bremel and Weber, 1972).

1.2. Fosfagenové systémy

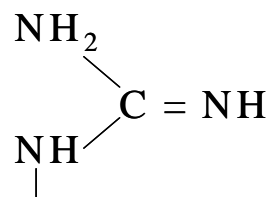
Fosfageny jsou fosforylované guanidinové sloučeniny, spojené s hydrolyzou ATP reverzibilní reakcí řízené odpovídající fosfagenovou kinázou:



Tradiční pohled na funkci fosfagenových systémů spočívá v jejich schopnosti vyrovnávat změny v koncentraci intracelulárního ATP. Tímto způsobem umožňují fosfagenové systémy udržet vysokou koncentraci ATP i za podmínek nerovnováhy mezi jeho spotřebou a produkcí (Kammermeier 1987, 1993). Mezi další hlavní funkce fosfagenových systémů patří regulace glykogenolýzy, pufování buněčného pH a intracelulární transport energie.

V průběhu fylogeneze se vyvinulo celkem osm fosfagenových systémů (Ellington 2001). Všechny doposud popsané fosfageny mají charakteristickou guanidylovou skupinu, ovšem liší se významně v ostatních chemických charakteristikách. Nejjednodušším

fosfagenem je argininfosfát (AP), naopak nejvíce modifikovanou guanidylovou (obr.2) sloučeninu představuje thalaseinfosfát (ThP). Ostatními známými fosfageny jsou kreatinfosfát (PCr), glykocyaminfosfát (GP), taurocyaminfosfát (TP), hypotaurocyaminfosfát (HTP), lombricinfosfát (LP) a ofelinfosfát (OP). Každý z fosfagenů má odpovídající fosfagenkinázu (argininkináza - AK, thalaseinkináza - ThK, kreatinkináza - CK, glykocyaminkináza - GK, taurocyaminkináza - TK, hypotaurocyaminkináza - HTK, lombricinkináza - LK a ofelinkináza - OK), které společně tvoří vysoce konzervativní rodinu enzymů lišících se kromě substrátové specifity rovněž kvarterní strukturou a lokalizací v buňkách (van Thoai, 1968; Robin, 1974).



Obr.2 Guanidylová skupina

Původní představy o výskytu jednotlivých fosfagenových systémů u živočišných druhů odpovídaly rozdělení - jeden systém na jeden organizmus (Ennor and Morrison, 1958). Pozdější nálezy odhalily poměrně frekventovanou existenci minimálně dvou systémů v jednom organismu. Nejčastěji se jedná o AP/AK a CK/PCr systémy, které jsou však lokalizovány v různých tkáních (Needham et al., 1932). Přesto byly popsány příklady identické tkáňové specifity (Robin 1964, 1974). Tento "plurifosfagenový fenomén" byl pozorován například u svalů ježovek, kde se AP/AK a CK/PCr systém vyskytuje patrně ve stejném typu svalových vláken (Ellington, 2001).

1.3. Kreatinkinázový/fosfokreatinový (CK/PCr) systém

1.3.1. CK/PCr systém a jeho fyziologický význam

Nejvýznamnějším fosfagenovým systémem je systém CK/PCr. Tento systém je široce rozšířen v buňkách charakteristických kolísavými energetickými nároky (neurony, svalové buňky, kardiomyocyty, spermie), a jako takový je rovněž jedním z nejlépe prostudovaných systémů zabezpečujících distribuci energie v buňce.

Jeho podstatou je kreatinkinázová reakce:



Poprvé byla popsána v roce 1934 Karlem Lohmannem (Lohmann, 1934), který tak vysvětlil již pozorované minimální výkyvy v hladinách ATP během aktivace vzrušivých tkání (např. v kosterním svalu, v srdečním svalu, v mozku, ve spermiích a v mitotickém vřetenku (Cande, 1983; Mommaerts and Wallner, 1967; Seraydarian and Abbott, 1976).

Lohmannova reakce probíhá i při kontrakci blízko rovnováže, s ohledem na vliv cytoplazmatického pH; $\alpha \approx 0,8$. Pro enzymatickou aktivitu kreatinkinázy je nutná přítomnost dvojmocných kovových kationtů: Mg^{2+} , Mn^{2+} a Ca^{2+} (Kuby et al., 1954a, 1954b; Noda et al., 1954a, 1954b). Enzym je inhibován anionty Cl^- , SO_4^{2-} , přítomností sulfhydrylových reagentů a dalšími anorganickými anionty (Cain and Davies, 1962).

Význam CK/PCr systému můžeme obecně chápat také tak, že i když je ATP univerzální energetická molekula pro většinu energeticky náročných procesů v biologických systémech (Lehninger, 1982), jeho jednoduché navýšení by nebylo vhodnou volbou pro vyrovnání energetických nároků těchto buněk a tkání. To proto, že lokální koncentrace ATP, ADP a AMP, právě tak jako poměr ATP/ADP, jsou klíčovými regulátory ovlivňující mnoho podstatných metabolických procesů (Gyulai et al., 1985; Chance et al., 1986; From et al., 1990). Ve skutečnosti vzrušivé buňky obvykle obsahují pouze 2-5 mM ATP, které tudíž stačí pro svalovou kontrakci jen na několik vteřin (Infante and Davies, 1965).

A právě v těchto tkáních je nahromaděna značná část metabolicky inertních (zásobních) fosfagenů (Meyer, 1988), které mohou být okamžitě využity k regeneraci ATP bez nároku na přísun kyslíku. U obratlovců a některých bezobratlých jde o jedinný fosfagen - fosfokreatin (PCr). Jeho prekurzor kreatin (Cr), syntetizovaný většinou v játrech a v ledvinách, ale ne ve svalu, je transportován krví a přijímán do tkání s vysokými energetickými nároky prostřednictvím aktivního transportního systému (Fitch et al., 1968). V kosterním svalu koncentrace PCr může dosáhnout 20-35 mM, nebo více v závislosti na živočišném druhu typu svalových vláken (Burt et al., 1976; Ackerman et al., 1980), zatímco v jiných vzrušivých tkáních jako mozek, elektrické orgány, hladký sval, ledvina, atd. je koncentrace PCr v rozsahu 5-10 mM (Iyengar, 1984).

Jak již bylo řečeno množství ATP v buňce je poměrně malé a nebyla detekována žádná významná změna v celkové hladině ATP během aktivace vzrušivých tkání (Mommaerts and Wallner, 1967), protože ATP je souvisle a účinně opět doplňováno z velkého poolu PCr reakcí katalyzovanou CK.

Ve většině svalů je kapacita regeneračního systému ATP velmi vysoká a značně převyšuje jeho využití. ATP je doplňováno poolem PCr, oxidativní fosforylací a glykolýzou (McGilvery and Murray, 1974). Např. maximální rychlost syntézy ATP CK reakcí v krysím srdečním svalu (30 $\mu\text{mol/s per g}$) je mnohem vyšší než maximální rychlost syntézy oxidativní fosforylací (2,5 $\mu\text{mol/s per g}$), nebo cestou *de novo* (0,39 $\mu\text{mol/s per g}$) (Bittl and Ingwall, 1985; Ingwall et al., 1990).

Kromě funkce regenerace hydrolyzovaného ATP, je CK systém velmi citlivým detektorem a je schopen detekovat i malé změny v koncentraci ADP (K_m MM-CK pro ADP je 10-35 μM) (Matthews et al., 1982; Levin et al., 1990). A to je rozhodující role v prevenci proti nárůstu hladiny ADP, zejména během přechodné doby, ve které využití energie z ATP převyšuje jeho zásoby. V klidovém svalu byly změřeny následující koncentrace metabolitů: [PCr] = 12 mM; [Cr] = 7,8 mM; [ATP] = 4,8 mM; [P_i] = 16,4 mM; [volný Mg²⁺] = 3-4 mM; pH = 7,0-7,2 (Stefl et al., 1994; Ackerman et al., 1980; Chance et al., 1986). Většina ADP v klidovém svalu je vázána na F-aktinová vlákna a je metabolicky nedostupná pro okamžitou refosforylací CK reakcí (West et al., 1967). Cytoplazmatická koncentrace volného ADP v klidovém svalu bývá určena výpočty z rovnovážných koncentrací substrátů jako 37 μM (Veech et al., 1979). Byla počítána z pokusů s ³¹P-NMR v rozsahu pouze 1-20 μM (Bittl and Ingwall, 1985; Meyer et al., 1985; Ackerman et al., 1980). Oproti tomu chemické analýzy odhalily hladiny v rozsahu od 100-500 μM , tyto hodnoty jsou příliš vysoké díky štěpení ATP, nebo díky uvolnění ADP z dříve vázaných podbuněčných struktur, např. F-aktin (Chance et al., 1986). Náhlá svalová aktivita *in vivo* je obvykle spojena s využitím PCr a hromaděním volného Cr a anorganického fosfátu (P_i), ale tato množství nejsou v souladu s množstvím volného ADP (Mommaerts, 1969; Balaban et al., 1986; From et al., 1990). Ve stimulovaném svalu hladiny ADP obvykle dosahují pouze kolem 100-400 μM nebo méně (Bittl and Ingwall, 1985; Meyer et al., 1985; Chance et al., 1986).

ADP, spolu s P_i, Ca²⁺, mitochondriálně generovaném NADH a nabídkou kyslíku, reguluje celkovou rovnováhu mezi spotřebou a oxidativní tvorbou ATP v neporušených buňkách (Gyulai et al., 1985; Chance et al., 1986). Například mitochondriální dýchání je aktivováno koncentrací ADP v rozsahu μM (někdy 20-30 μM ADP je potřebná pro polovinu maximální aktivace mitochondriální syntézy ATP) (Chance and Williams, 1955; Chance et al., 1986). Proto ve svalu hrají hladiny ADP a P_i významnou roli v regulaci dýchání (Chance et al., 1985). Závěrem řečeno, regulace toku energie mezi místy spotřeby

ATP a jeho produkce je mnohaúrovňový proces zahrnující distribuci redukčních ekvivalentů (NADH), kyslíku a produktů hydrolýzy ATP (ADP, Pi) (Balaban, 1990). V této souvislosti je CK reakce přímo spojena s rolí ADP a Pi v regulaci oxidativní fosforylace a jiných metabolických procesů (Jacobus et al., 1983; Wallimann et al., 1989).

Vysoká aktivita CK může také regulovat adenylát-kinázovou reakci, a takto ve skutečnosti uchovat adenin nukleotidový pool v buňce (Iyengar, 1984). Jestliže dojde k hromadění ADP v buňce, např. vlivem ischemie nebo anoxie (McGilvery and Murray, 1974; Connett, 1988), je pak prostřednictvím adenylát-kinázy transfosforylováno na ATP a AMP (Hamada and Kuby, 1978). AMP, který je inhibitorem adenylát-kinázy a metabolických cest jako glukoneogeneze (Uyeda and Racker, 1965; Yamada and Sugi, 1989), je deaminován na IMP AMP deaminázou ve svaly, vázanou na myofibrilách (Ashby et al., 1979) na obou koncích A-proužku (Cooper and Trinick, 1984) za vzniku amoniaku (Kushmerick and Davies, 1969; Hamada and Kuby, 1978; Lowenstein, 1972). IMP stejně jako AMP jsou defosforylovány enzymem 5'-nukleotidázou lokalizovanou na sarkolemě (Bowditch et al., 1985) za vzniku inozinu a adenosinu. Vzhledem k tomu, že sarkolema je propustná pro zmíněné dvě sloučeniny, akumulace ADP po delší době vede ke ztrátě adeninových nukleotidů (Jennings et al., 1981).

Závěrem lze shrnout 3 metabolicky důležité důsledky udržování nízkých buněčných hladin ADP CK systémem:

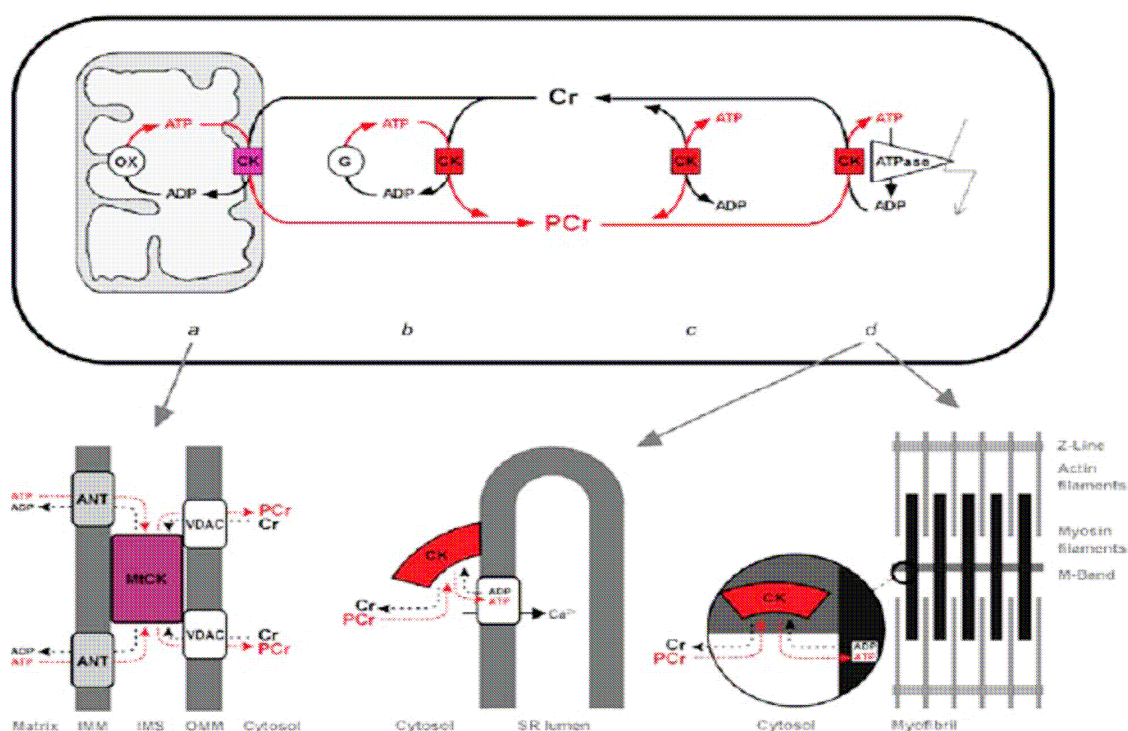
1. CK udržuje nitrobuněčné koncentrace volného ADP v rozsahu, ve kterém se může účastnit regulace mitochondriálního dýchání
2. CK zamezuje inaktivaci ATPáz, ke které by došlo zvýšením koncentrace ADP a H⁺ iontů
3. CK zamezuje čistou ztrátu buněčných adenin nukleotidů.

1.3.2. Uspořádání CK/PCr systému v kosterním svaly

Savčí kosterní svalová tkáň představuje složitou a komplexní strukturu (Millman, 1998), v rámci které dochází v průběhu vývoje a diferenciaci k vysoké míře specializace a organizace jednotlivých buněk. Základní buněčné funkce jsou lokalizovány v různých hierarchicky uspořádaných strukturních a funkčních kompartmentech, jejichž vzájemnou interakci zajišťují systémy, které představují nejvyšší stupeň efektivity buněčné regulace, dosažený během evoluce.

Biochemické dráhy ve svalecth jsou charakterizovány vysokým stupněm kompartmentace příslušných enzymů i substrátů. Rovněž produkce a spotřeba energie je vázána na jednotlivé kompartmenty a svalová tkáň je tak díky svému uspořádání ideálním modelem pro studium bioenergetických aspektů buněčného metabolismu (Kushmerick, 1995). Vysoká organizovanost energetického metabolismu svalu a jeho vysoké a proměnlivé energetické nároky předpokládají existenci drah optimalizujících transformaci energie, její transport a spotřebu bez značných výkyvů v koncentraci substrátů a produktů (Saks and Ventura-Clapier, 1992; Wallimann et al., 1998). CK/PCr systém je nejlépe prostudovaným systémem zabezpečujícím tyto funkce.

Základní funkce CK/PCr systému tkví ve vytváření PCr poolu v oblastech produkce ATP (obr.3) (tj. oxidativní fosforylaci v mitochondriích a substrátovou fosforylaci



Obr.3 CK/PCr systém. Na horní polovině obrázku jsou izoenzymy CK v rozdílných kompartmentech a) mitochondrie, b-d) cytosol. Vysoká hladina PCr v cytosolu dosahuje až 30 mM a je vytvářena CK reakcí, která využívá cytosolický kreatin (Cr) a ATP preferenčně z oxidativní fosforylace (OX), (a) nebo z glykolýzy (G), (b). PCr je následně využit k udržování globálního (c) a lokálního (d) poměru ATP/ADP. V excitabilních buňkách nebo v buňkách, které mají velmi vysokou spotřebu ATP, tyto isoformy CK společně se zásobním depem PCr, udržují energetický člunek mezi ATP produkujícími nebo ATP spotřebovávajícími procesy (a, d) (Wallimann *et al.* 1992).

glykolýzy) a následné využití této energetické zásobárny v oblastech spotřeby ATP (tj. v blízkosti ATPáz). Tato myšlenka, která je podstatou fosfokreatinového člunku („shuttle“), byla navržena Bessmanem a Geigerem (Bessman and Geiger, 1981). Myšlenka měla vývoj přes tři desetiletí a mnoho autorů významně přispělo k popisu tohoto metabolického

komplexu. Ke vzniku tohoto konceptu fosfokreatinového „shuttle“ přispěly důkazy o molekulární interakci a funkčním spojením mezi mitochondriální CK a ATP/ADP translokázou (ANT) (Barbour et al., 1984; Brdiczka et al., 1998), sarkomerickou CK a glykolytickými enzymy (fosfofruktokináza, aldoláza; Kraft et al., 2000), stejně jako důkazy o existenci funkčního spojení mezi CK a myozinovou ATPázou (Mani and Kay, 1976; Arrio-Dupont et al., 1992), nebo ATPázami vázanými na buněčné membrány (Levitsky et al., 1978; Korge et al., 1993; Sistermans et al., 1995).

V této roli bude PCr sloužit jako „nosič energie“ spojující místa energetické produkce s místy energetického využití pomocí nitrobuněčné kompartmentalizace izoenzymů CK, jmenovitě výskytem v mezimembránovém prostoru mitochondrií a v cytoplasmě. Na základě konečné frakcionace a kinetického modelování bylo navrženo toto „člunkové“ vyrovnávání koncentrace ATP pomocí PCr.

1.4. Lokalizace izoform CK v buňce

1.4.1 Izoformy CK

V tkáních obratlovců byly identifikovány 4 izoformy CK, skládající se z monomerů o molekulové hmotnosti přibližně 40 kDa. Tyto izoformy jsou exprimovány tkáňově specifickým způsobem: 2 cytosolické formy, M-CK a B-CK (M ve svalu, B v mozku) a 2 mitochondriální Mi-CK izoformy (Mi_a, Mi_b).

In vivo, M-CK a B-CK podjednotky dávají kombinací 3 cytosolické dimery MM-, MB-, BB-CK izoenzymů s přibližnou molekulovou hmotností 80-86 kDa (Eppenberger et al., 1967). Zatímco MM-CK je poněkud specifická pro diferencovaný kosterní sval, BB-CK se nalézá v mozku a mnoha dalších tkáních (Wallimann and Hemmer, 1994). Během diferenciac svalové buňky *in vitro* a *in vivo* je pozorována vývojová záměna z původní BB-CK přes přechodný hybrid MB-CK za homodimer MM-CK (Perriard et al., 1978; Caravatti et al., 1979; Trask et al., 1988).

V kuřeti byly identifikovány 2 rozdílné B-CK podjednotkové podtřídy, B_a-CK a B_b-CK s rozdílnými izoelektrickými body (Quest et al., 1989). Tyto podtřídy B-CK vznikají rozdílným sestřihem mRNA jedinečného genu B-CK (Wirz et al., 1990) a dimerizují tkáňově specifickým způsobem (Quest et al., 1990).

Mi-CK je lokalizována v mitochondriích (Jacobs et al., 1964; Jacobus and Lehninger, 1973; Scholte et al., 1973) ve dvou izoformách. Specifická pro kosterní sval „sarkomerická“ Mi_b-CK (Schlegel et al., 1988a; Hossle et al., 1988; Haas and Strauss, 1990), a tak zvaná „všudypřítomná“ Mi_a-CK (Schlegel et al., 1988b; Hossle et al., 1988; Haas et al., 1989; Wyss et al., 1990), jsou kódovány dvěma geny CKMT1 a CKMT2, které se liší izoelektrickým bodem a v literatuře jsou označovány jako Mt_a- a Mt_b- CK [(index „a“ označuje kyselejší formu (pI 8,4-9,0) proti „b“ zásaditější izoformy (pI 9,3-9,5)] (Quemeneur et al., 1989, Wyss et al., 1990). Mi_a-CK a Mi_b-CK se neliší pouze v aminokyselinové sekvenci, i když tu je vysoký stupeň homologie, ale také v množství biochemických a biofyzikálních parametrů (Schlegel et al., 1988b; Wyss et al., 1990). Geny kódující jednotlivé izoformy CK jsou uvedeny v Tab.1 a detailní informace o

CKB	14q32.32	kreatinkináza, mozek
CKM	19q13.2-q13.3	kreatinkináza, sval
CKMT1A	15q15	kreatinkináza, mitochondriální 1A
CKMT1B	15q15	kreatinkináza, mitochondriální 1B
CKMT2	5q13.3	kreatinkináza, mitochondriální 2 (sarkomerická)

Tab.1 Tabulka izoform CK. Obsahuje označení kódujícího genu (1.sloupec), lokalizaci genu na chromozomu (2.sloupec) a název izoformy (3.sloupec). (www.genecards.org).

jednotlivých izoformách jsou uvedeny v příloze 7.1.1. Na rozdíl od izoenzymů cytosolické CK, které jsou vždy dimerické, Mi_a-CK a Mi_b-CK se nalézají *in vivo* a *in vitro* přechodně ve formě oktamerů s molekulovou hmotností přibližně 34 kDa (Schlegel et al., 1988a; Quemeneur et al., 1988; Belousova et al., 1991; Wyss et al., 1990). Tyto oktamery jsou složeny ze 4 dimerů s molekulovou hmotností 86 kDa jako stálé stavební kameny (Schnyder et al., 1988; Wyss et al., 1990). Díky svým funkčně identickým stranám mohou interagovat s protilehlými membránami. Touto interakcí vznikají místa, ve kterých jsou spojeny vnitřní a vnější mitochondriální membrány (Rojo et al., 1991b; Rojo and Wallimann, 1994). Ostatní molekuly Mi-CK jsou lokalizovány podél membrány mitochondriálních krist a nejsou v žádném kontaktu s vnější mitochondriální membránou.

Dosud bylo identifikováno více než 20 různých CK izoform (Hossle et al., 1988; Mühlebach et al., 1994). Uvedené klasifikaci M-/B-/Mi_a-/Mi_b odpovídají u nižších obratlovců pouze některé CK enzymy žab (Fischer and Whitt, 1978), zatímco u ostatních

druhů byly zavedeny klasifikace jiné (Mühlebach et al., 1994). Přesto všechny enzymy CK rodiny vykazují rozsáhlou sekvenční homologii i strukturní uspořádání.

Heterogenitu u B-CK i M-CK odhalily pokusy s 2D elektroforézou a chromatofokusací (George et al., 1984). Příčinou existence jednotlivých enzymových podtypů jsou alternativní místa iniciace při translaci (Soldati et al., 1990) a posttranslační fosforylace, prokázaná u kuřecí, myši a krysí B-CK (Hemmer et al., 1993). Tři různé podtypy M-CK, lišící se izoelektrickým bodem (pI), byly detekovány u potkana pomocí 2D SDS-PAGE v oblasti mírně alkalického pH (7.17, 7.28, 7.48) (Malacova et al. 2004; viz příloha 7.3.1.), zatímco u opice pI přechází z kyselého do alkalického pH (6.8-7.1) (Grossman and Mollo, 1979).

1.4.2 Lokalizace cytosolické MM-CK

Histochemické studie a subcelulární frakcionace umožnily v druhé polovině minulého století buněčnou lokalizaci izoform kreatinkinázy.

Ve svalu byla M-CK identifikována v myofibrilách jako strukturní protein v M-linii, která je funkčně spojená s myozinovou ATPázou. Myofibrilární CK může refosforylovat veškeré ADP vzniklé reakcí ATPázy a může poskytnout dostatek energie pro maximální sílu kontrakce a normální kontrakční kinetiku i v případě absence MgATP (Wallimann and Eppenberger, 1985). Přenos substrátů mezi CK v M-linii a myozinovou ATPázou je realizován mechanismem, který je znám pod pojmen „substrate channelling“. Část ATP (42%), produkovaná CK reakcí je bezprostředně štěpena myozinovou ATPázou tj. téměř polovina (Gregor et al., 2003a). Na intaktním svalu byla identifikována další oblast slabé asociace M-CK v I-pruhu sarkomery, která byla při permeabilizaci vláken vždy solubilizována. Zároveň zde byla potvrzena interakce CK s adenylátkinázou a aldolázou, což vede k představě funkčního spojení CK/PCr systému s glykolýzou právě v této oblasti (Wegmann et al., 1992; Savabi, 1994; Foucault et al., 2000; Kraft et al., 2000).

Obdobně je M-CK silně vázána na membrány sarkoplazmatického retikula, kde je funkčně spojena s Ca^{2+} ATPázou a napomáhá regulaci lokálního poměru ATP/ADP (Rossi et al., 1990). Na sarkolemě vytváří M-CK další mikrokompartment s Na^+/K^+ ATPázou (Sharov et al., 1977).

1.4.3 Lokalizace a funkce mitochondriální izoformy CK

Primární i terciální struktura mitochondriální CK ($_{mt}CK$) je v průběhu fylogeneze vysoce konzervativní (Ellington 2001) a byla nalezena již u prvoústých (Ellington et al., 1998), což svědčí o jejím univerzálním významu. Oktamery $_{mt}CK$ se vyskytují mezi vnitřní a vnější mitochondriální membránou a v prostoru krist (Wallimann et al., 1992; Schlattner and Wallimann, 2000; Schlattner et al., 2004). Katalyzuje přímou transfosforylaci mitochondriemi produkovaného ATP a cytosolického Cr na ADP a PCr. ADP vstupuje do prostoru matrix, aby stimulovalo oxidativní fosforylaci, zatímco PCr opouští mitochondrie a vstupuje do cytosolu jako primární vysokoenergetická fosforylovaná komponenta (Jacobus and Leninger, 1973).

Molekulární základ takto nasměrovaného metabolického toku vytváří spojení mezi velkým mitochondriálním oktamerem (Schlattner et al., 1998; Schlattner and Wallimann, 2000) a dvěma transmembránovými proteiny, adenin nukleotidovým translokátorem (ANT) a napětově závislým kanálem (VDAC - Voltage Gated Anion Channel) (Brdiczka et al., 1994, 1998). Přenos substrátů dovnitř a ven z mitochondrií související s CK je založen na kolokalizaci, přímé interakci a na difuzní bariéře (Vendelin et al., 2004; Saks et al., 2005) následujícím způsobem:

$_{mt}CK$ se pevně váže na kyselý kardiolipin, specifický pro vnitřní mitochondriální membránu, pomocí pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků (lysinu a argininu) na C-terminálním konci své molekuly. Zároveň i ANT je ukotven na kardiolipin, což vede ke kolokalizaci a přednostnímu metabolickému toku mezi oběma proteiny v kristách a v intermembránovém prostoru (Schlattner et al., 2004). Omezená propustnost VDAC-kanálu přispívá k $_{mt}CK$ „channellingu“ a odděluje ATP „pool“ (Andrienko et al., 2003).

$_{mt}CK$ v tomto prostoru dále interaguje s fosfolipidy vnější membrány a VDAC (Schlattner et al., 2001), tímto je virtuálně spojena vnější a vnitřní membrána a přispívá k mitochondriálním kontaktním místům. Stabilita oktameru a vazby $_{mt}CK$ na membránu je významná pro funkci enzymu a je považována za jeden z důležitých regulačních mechanismů (Schlattner and Wallimann, 2000). Oktamery a dimery $_{mt}CK$ jsou v závislosti na experimentálních či fyziologických podmínkách vzájemně konvertibilní (Wyss et al., 1992). V posledních letech se množí důkazy o regulačním významu disociace a reasociace oktamerů pro CK aktivitu *in vivo* (Schlattner and Wallimann, 2000).

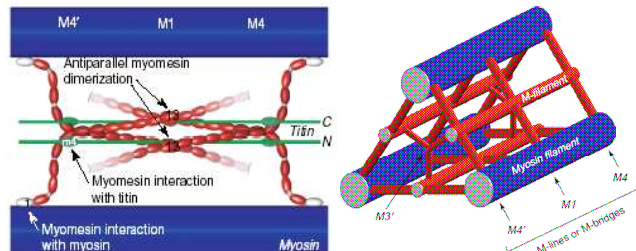
1.5. Působení proteinů a CK v M-linii

1.5.1. Interakce strukturálních proteinů v M-linii

Na rozdíl od I-pruhu, který je poměrně dobře prostudován, je v oblasti A-pruhu a M-linie dosud identifikováno pouze několik základních proteinů a objevují se první signální molekuly, které byly uvedeny v předešlé kapitole v kontextu jejich funkce.

M-protein (165 kD) byl charakterizován poměrně brzy (Masaki and Takaiti, 1974; Trinick and Lowey, 1977) a lokalizován pomocí polyklonálních protilátek (Strehler et al., 1983). Myomezin (185 kD) byl objeven jako kontaminace při purifikaci M-proteinu (Grove et al., 1984) a trvalo dalších 10 let, než byl charakterizován na molekulární úrovni Obermannem et al. (1995). Současně u již známého titinu (dříve connectin) byla prokázána vazebná schopnost s oběma proteiny – myomezinem i M-proteinem (Nave et al., 1989; Vinkemeier et al., 1993) v oblasti M-linie, kdy interakce myomezinu s titinem je závislá na přítomnosti fosfátu (Obermann et al., 1997). Struktura titinu byla souhrnně popsána Labeitem a Kolmererem (1995) a do oblasti M-linie zasahuje jeho část C-terminálního konce (250 kD), která v blízkosti M1-linie obsahuje doménu titinkinázy (Obermann et al., 1997).

V centrální M1-linii je pozorován též myomezin, u kterého dochází k antiparalelní dimerizaci jeho dvou protilehlých molekul procházejících až k oblasti M4 a M4' můstkům (obr.4). V tomto místě dochází k jeho interakci s myozinem (Lange, 2005). Tento model ukazuje,



Obr.4 Vlevo - Dimerizace myomezinu v M-linii v oblasti M1 až M4 (M4') můstků. Myozinová filamenta jsou zobrazena (modře), myomezin (červeně) a titin (zeleně). Vpravo – uspořádání M1-M4 M-liníí doplňuje prostorovou představu obr vlevo. (Lange et al. 2002).

že stejně jako α -aktinin spojuje tenká filamenta v Z-linii (Young et al., 2001) do tvaru sítě, tak myomezinové dimery spojují silná filamenta v M-linii.

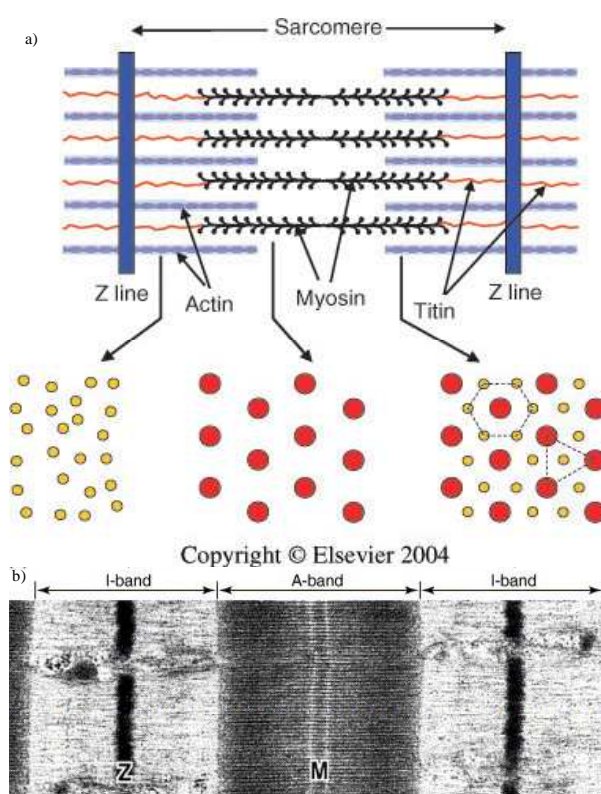
Myozin vázající proteiny (MyBP) vyskytující se v M-linii či její přímé blízkosti, byly pomocí cDNA zařazeny do nové rodiny proteinů (pro přehled Furst and Gautel, 1995), která je charakteristická dvěma doménami imunoglobulinu „Ig-like“ a doménu typu fibronektinu III „(Fn)-like domain“. Patří sem: titin (Labeit and Kolmerer, 1995), myomezin a M-protein (Vinkemeier et al., 1993), myozin vázající C-protein (MyBP-C) a H-protein (Vaughan et al., 1992; Bennet et al., 1986). MyBP-C byl lokalizován v A-pruhu po obou stranách M-linie u psoasu králíka (Craig and Offer, 1976) a je známa jeho

fosforylace prostřednictvím cAMP-dependentní proteinkinázy v kosterním svalu a při β -adrenergní stimulaci v srdci (Lim and Walsch, 1986).

Myofibrilární CK byla popsána jako strukturální součást M4, M4' můstků M-linie sarkomery (Strehler et al., 1983), která je důležitá pro sestavení a stabilitu myozinových filament v sarkomeře (Luther and Squire, 1980; Thornell et al., 1987).

1.5.2. CK/PCr systém v M-linii sarkomery

Symetrická $\frac{1}{2}$ sarkomery, je považována za nejmenší funkční jednotku. Kontrakce a relaxace kosterního svalu je realizována posuvem kontraktálních filament v jednotlivých sarkomerách. Sarkomera ve fyziologické délce (cca 2.2 μm) vykazuje v elektronovém mikroskopu (obr.5) tři základní široké pruhy, jeden A (anizotropní) a dvě poloviny I (izotropního) pruhu. A-pruh je tvořen převážně silnými filamenti myosinu a v jeho střední části bez myosinových hlav v H-pruhu, tvořeného lehkým meromyozinem (LMM), můžeme pozorovat několik



Obr.5 Sarkomera. a) schema základního proteinového složení; b) zobrazení sarkomery pomocí elektronové mikroskopie (TEM). (Edman et al., 1988).

tmavých linií. Počet těchto M-linií se liší podle typu svalu a u některých svalů není patrný (Sjostrom and Squire, 1977; Andrade et al., 2003). I-pruh obsahuje převážně tenká filamenta aktinu (včetně regulačních proteinů) a je rozdělen na dvě poloviny tmavou tenkou Z-linií. Zatímco silná (myozin) a tenká (aktin) filamenta mají za úkol generovat sílu při svalové kontrakci, jiné strukturální proteiny přispívají k jejich nejvhodnějšímu prostorovému uspořádání a tím zajišťují maximální účinnost jejich funkce, a současně se účastní signalizačních procesů.

Tyto strukturální proteiny jsou převážně organizovány v okrajových příčných strukturách sarkomery v Z-liniích, kde upevňují tenká filamenta a vymezují délku

sarkomery; a ve středu sarkomery v M-linii, kde zajišťují organizaci myozinových filament. Významnou úlohu ve vývoji a organizaci myofibril mají tři cytoskeletální proteiny, které jsou příbuzné superrodině imunoglobulinu (Bantle et al., 1996): obscurin (800 kD), nebulin (800 kD) a samotný titin (2-3 MD). Mají podobnou strukturu – tvoří je dvě základní oblasti: adhesivní modul a signální domény (Obermann et al., 1995, 1997; Russell et al., 2002). Na C-terminálním konci obsahují násobný fosforylační motiv pro ERK kinázy.

Význam a lokalizace těchto proteinů se liší. Obscurin přiléhá těsně v oblasti M- a Z-linie sarkomery, kde plní organizační i signalizační funkci (Kontogianni-Konstantonopolus et al., 2003, 2004). Nebulin reguluje délku aktinových filament (Horowitz, 2006) společně s tropomodulinem, který zakončuje tenká filamenta ve střední části sarkomery (Fischer and Fowler, 2003). Největším proteinem je titin, jehož dlouhá molekula (1 μm) spojuje M- a Z-linii a tím stabilizuje myozinová filamenta ve střední části sarkomery, kde se jeho dvě molekuly spojují překrytím svých C-terminálních konců (Gregorio et al., 1999; Granzier and Labeit, 2002; Tskhoverbova and Trincik, 2003). Titin zajišťuje klidové napětí svalu a signalizační funkce a v tomto ohledu jsou významná fosforylační místa na N- a C- konci obrovské molekuly, která spadají do oblastí Z- a M-linie (Gautel et al., 1993).

Z uvedených prací vyplývá, že právě přes tyto dvě příčné linie M a Z prochází signály k bazální lamině a k ECM (Pardo et al., 1983; Danowski et al., 1992) a jsou tedy významnými regulačními oblastmi sarkomery v období vývoje a ve zralém svalu.

1.5.3. Význam M-linie sarkomery

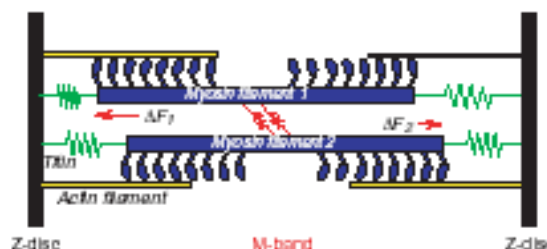
Lokalizace M-linie ve středu A-pruhu určuje její význam v organizaci myozinových filament a zároveň důležitou úlohu při myofibrilogenezi, kdy jsou silná filamenta uspořádávána do typické hexagonální struktury (Knappeis and Carlsen, 1968).

První autoři uvažovali úlohu M-linie v regulaci příčné pozice myofilament a rostoucí tloušťky myofibril v průběhu kontrakce, která ovšem byla později experimentálně vyloučena. Bobtnání svalu při zkrácení tedy nesouvisí se změnou prostorového uspořádání myozinu a aktinu, ale s cytosolem (Millman, 1998).

Druhou možností se nabízela ochrana podélného uspořádání silných filament při kontrakci, kdy dochází k destabilizaci jejich pozice a dislokaci A-bandu (Patel and Lieber, 1998; Agarkova et al., 2003). Horowitz et al. (1989) v tomto případě přisuzovali

nejdůležitější roli titinu, jehož jedna dlouhá molekula (cca 1 μ m) spojuje M-linii se Z-liní sarkomery a zároveň vytváří různé funkční izoformy dle typu svalu (Kenny et al., 1999; Obermann et al., 1997). Tento názor diskutují autoři Agarkova et al. (2003) a jednoznačně přisuzují stabilizační funkci M-linii, která naopak napomáhá obrovskému titinu v aktivované sarkomeře.

Vzniká tak třetí představa o tom, že struktura M-linie vyrovnává možnou nerovnováhu sil působících od střední části sarkomery v opačném směru. Zajišťuje tedy rovnoměrné rozložení sil a symetrické zkrácení sarkomery a tím zároveň brání její možné deformaci (Agarkova et al., 2003) (obr.6).



Obr. 6 Možná deformace sarkomery protisměrným působením sil při kontrakci, v případě nestabilní M-linie. (Agarkova et al., 2003).

Asociace enzymů energetického metabolismu v M-linii a existence přednostního energetického toku směrem k myozinové ATPáze svědčí o jejím významu v energetice kontrakce. Přítomnost vázané kreatinkinázy byla poprvé dokumentována již před více než 30 lety (Turner et al., 1973; Stolz and Wallimann, 1998), ale asociace enolázy, fosfofruktokinázy a adenylátkinázy byla potvrzena relativně nedávno (Keller et al., 2000; Lange et al., 2002).

Signalizační význam M-linie je možné odvodit z recentních prací, které přinášejí nové nálezy proteinů asociovaných v M-linii. Z rodiny LIM proteinů byl identifikován DRAL/FHL-2 i zde kromě I-pruhu. LIM proteiny obsahují LIM doménu, která obsahuje zhruba 30 aminokyselinových zbytků se dvěma Cys a His zbytky vázajícími Zn^{2+} atom ve svém středu, tzv. „zinc finger motif“. LIM proteiny se uplatňují v buněčných strukturách převážně jako „lešení“ (Bach, 2000). Lange et al. (2002) předpokládají spojení DRAL/FHL-2 s CK a s ostatními metabolickými enzymy vyskytujícími se v této oblasti. Na základě prokázané interakce DRAL/FHL-2 proteinu s jadernými faktory (jako promyelocytic leukemia zinc finger protein) a androgenními receptory, je mu přisuzována úloha v jaderné signalizaci (Muller et al., 2000; McLoughlin et al., 2002).

Další identifikované proteiny jsou z rodiny „RING finger“, MURF1 a MURF 2, které mohou zprostředkovávat signalizaci přes dráhu glukokortikoidu (MURF1) a nebo buněčného stresu (MURF2) (McElhinny et al., 2002; Pizon et al., 2002). Současně byl prokázán jejich význam v myogenezi a stabilizaci mikrotubulů společně s MURF3 (Gregorio et al., 2005). Všechny zmíněné formy MURF asociují s titinem v oblasti M-

linie. MURF1 a MURF2 jsou spojovány též s ubikvitinilací proteinů (Witt et al., 2005) a oxidovaná forma MM-CK byla prokázána jako specifický substrát pro MURF1 (Zhao et al., 2007). Autoři zde poukazují na možný mechanismus degradace cytosolické CK, vazbou na MURF1 a následnou ubikvitinilací, zajišťující její obrat v buňce, který je spojený s oblastí M-linie sarkomery.

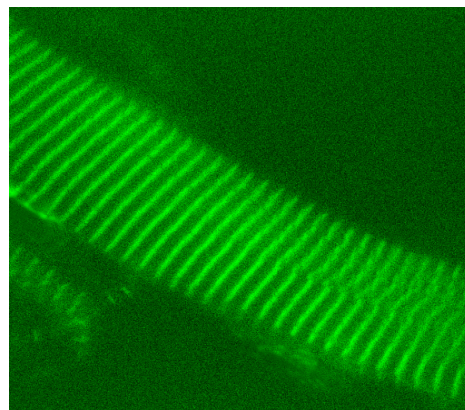
V současnosti stále není jasné, zda je M-linie integrována s laterální membránou srovnatelným způsobem jako Z-linie, avšak existence takového spojení je žádoucí už jen z uvedeného pohledu stability sarkomery. Transverzální spojení M-linie s membránou bylo vizualizováno, ale jeho molekulární složení ještě není zdaleka kompletní (Pierobon-Bormioli, 1981; Wang and Ramirez-Mitchell, 1983). Skelemin jako součást M-linie byl původně považován za spojku hranice M-linie a intermediálních filament (Price and Gomer, 1993). Avšak skelemin je ve skutečnosti varianta sestřihu myomezinu (Steiner et al., 1999), a proto byl přejmenován na EH-myomezin (Agarkova et al., 2000). Poměrně nedávno bylo zjištěno, že spojení s membránou by mohl zastávat spektrin společně s asociovanými proteiny (Williams and Bloch, 1999; Flick and Konieczny, 2000). Tomu napovídá skutečnost, že ankyrin, který interaguje s erytrocytárním spektrinem, byl též nalezen na membráně na úrovni M-linie společně s obscurinem (Bagnato et al., 2003). Současně byla prokázána přímá interakce obscurinu s malým ankirinem 1 (Kontogianni-Konstantopoulos et al., 2003), tento multifunkční adaptorový protein zde zprostředkovává přímou interakci mezi proteiny sarkomery a sarkoplazmatického retikula.

Z uvedených informací vyplývá, že oblast M-linie může být dobrým senzorem mechanické zátěže sarkomery během kontrakce, který je spojen se signalizačními systémem směrem ven přes membránu k ECM i směrem do nitra svalové buňky do jádra či k jiným organelám.

1.5.4. Interakce CK v M-linii sarkomery

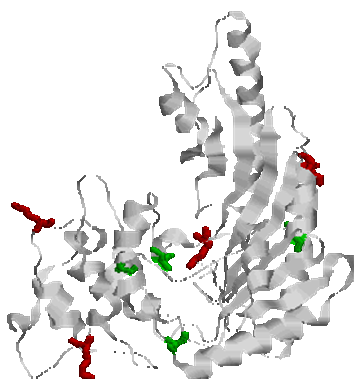
Znalost primární struktury proteinů M-linie a technický rozvoj umožnily výrobu specifických protilátek proti jednotlivým epitopům a zároveň testování specifických interakcí metodami „Surface plasmon resonance“ (SPRC) a „Two-yeast hybridization“. Tento rozvoj umožnil detailní studium interakce CK v M-linii, ale některé funkční otázky zůstávají stále nezodpovězeny, např. zda tato interakce souvisí s aktivitou enzymu a pokud ano, tak jak.

Kreatinkináza, jak bylo řečeno, je strukturální součástí M4, M4' můstků M-linie sarkomery a lze ji vyjmout pomocí specifických monovalentních protilátek (Wallimann et al., 1977) a následně ji znovu navázat v případě neporušené struktury silných filament (Bahler et al., 1985). Je možné ji extrahovat pomocí nízkoiontového (bezvápnickového) media a následně znovu navázat do struktury (Ventura-Clapier et al., 1987), nebo vytěsnit z permeabilizovaných vláken či izolovaných myofibril použitím vyšší koncentrace exogenní CK (Obr.7) (Kraft et al. 1995, **Zurmanova et al. 2007**; viz příloha 7.3.2.).



Obr.7 Izolované myofibrily s vytěsněnou endogenní CK v M-linii pomocí exogenní CK fluorescenčně značené konjugací (IAF) (zeleně; CK-IAF). Obrázek z konfokálního mikroskopu (Field of view:XY 49.82 μ m x 49.82 μ m (512 x 512)), (autor obrázku Žurmanová).

Výsada vazby v M-linii přísluší pouze MM-cytosolické CK izoformě a je realizována N-koncovou částí každého monomeru této molekuly (Stolz and Wallimann



Obr.8 Monomer M-CK s vyznačenými páry Lys zbytků (K104/115) a (K8/K24) (červená) a s fluorescenčně (IAF) značenými 4 Cys zbytky (zelená).

1998). Porovnáním primárních struktur identifikovali Hornemann et al. (2000b) dva páry lyzinových zbytků, které jsou vysoce konzervativní v M-CK izoformě a nejsou přítomny ve struktuře B-CK. Pomocí chimér M-CK a B-CK potvrdily, že oba páry se účastní interakce, přičemž první pár na velké doméně CK (K104/115) vytváří silné vazebné místo a druhý pár (K8/K24) se váže slabě (obr.8). O tři roky později, ve stejné laboratoři, autoři navrhli tři kandidáty na přímé vazebné partnery M-CK v M-linii: M-protein, myomezin a titin a testovali jejich vybrané fragmenty. Byla prokázána interakce M-CK

s myomezinem a M-proteinem a interakce CK s titinem potvrzena nebyla. Zároveň byla zaznamenána pH závislost této protein-proteinové interakce (Hornemann et al., 2003).

Studium interakce fluorescenčně značené CK s izolovanými myofibrilami potvrdilo pH závislost této vazby na vyšší strukturální úrovni (viz příloha 7.3.2.) ve shodě s výsledky získanými na úrovni protein-proteinových interakcí (Hornemann et al., 2003). Současně byla zjištěna nutná přítomnost substrátů CK pro silné navázání enzymu do struktury myofibril a plnění její známé strukturální funkce. V nepřítomnosti substrátů v oblasti mírně

alkalického pH CK vykazuje dynamický stav asociace a disociace, kdy v průběhu 1 min dojde k výměně veškeré CK vázané v M-linii (**Zurmanova et al., 2007**; viz příloha 7.3.2.). Zesílení vazby v přítomnosti substrátů může být indukováno konformační změnou CK molekuly při jejich navázání (Mejsnar et al., 2002). Současně může docházet k autofosforylaci CK (Stolz et al., 2002) a nebo k fosforylaci jiných vazebných partnerů CK v M-linii. V úvahu připadá i fosforylace titinu, který však nebyl prokázán přímým vazebným partnerem CK, ale mohl by ovlivnit vazbu přes interakci s myomezinem (Obermann et al., 1997).

Jak je uvedeno, vytěsnění exogenní MM-CK vykazuje závislost na pH ve velmi úzkém rozsahu jeho fyziologických hodnot (pH 6.8-7.2) (**Zurmanova et al., 2007**; viz příloha 7.3.2.). Autoři předpokládají možné konformační změny molekuly CK, které by tímto způsobem ovlivňovali vazbu do M-linie sarkomery. Byla prokázána kontinuální mírná relaxace CK molekuly vlivem alkalizace pH z 6.8 na 7.5, která ovšem neodpovídá dramatickým změnám ve vazbě CK do M-linie (**Zurmanova et al., 2007**; viz příloha 7.3.2.).

1.6. Struktura a funkce CK molekuly

1.6.1. Struktura M kreatinkinázového monomeru

Ačkoliv je CK dlouho studovaným enzymem a postupně byla shromážděna řada údajů o jejích klasických biochemických parametrech a enzymologii, podrobný 3D model CK byl popsán teprve v posledním desetiletí. V minulosti se o krystalizaci CK snažilo několik pracovních skupin (Keutel et al., 1968; Mc Pherson, 1973; Gilliland et al., 1983; Schnyder et al., 1990; Belousova et al., 1991; Schnyder et al., 1991), ale až Fritz-Wolf se spolupracovníky (Fritz-Wolf et al., 1996) získal krystaly mitochondriální CK, které umožnily RTG difrakci s potřebným rozlišením. Od té doby se objevily další krystalografické studie, které potvrdily základní strukturní organizaci monomerní podjednotky CK a její obecnou platnost pro jednotlivé CK izoformy (O'Gorman et al., 1997; Rao et al., 1998; Loew and Bax, 1998; Eder et al., 1999; Eder et al., 2000b; Shen et al., 2001).

Monomer CK se skládá ze dvou globulárních domén oddělených štěrbinou. Menší N-koncová doména obsahuje aminokyselinové zbytky¹⁾ 1-100 a větší C-koncová doména je tvořena zbytky 120-381. C-koncové doméně dominuje β -meandr, tvořený osmi antiparalelními β -strukturami, který je obklopený sedmi α -helixy, zatímco N-koncová doména obsahuje výhradně helikální struktury. Jednoduchá β -struktura (aminokyselinové zbytky 121-130) rozděluje velký β -meandr C-koncové domény na dvě poloviny, které dohromady s okolními strukturami mohou být považovány za dvě poddomény tvořené aminokyselinovými zbytky 166-236, respektive 287-316. Ze společné krystalizace substrátu a CK (Fritz-Wolf et al., 1996) je zřejmé, že ATP vazebné místo je situováno v centrální části monomeru a je obklopeno mimo jiné strukturami β_6 , β_1 a helixem α_9 .

Stejně stará jako pokusy o krystalizaci CK je i snaha o identifikaci vazebných míst v primární struktuře enzymu a určení aminokyselinových zbytků nezbytných pro interakci enzymu se substráty. Olcott se spolupracovníky (Olcott et al., 1994) určil dvě peptidové sekvence odpovědné za vazbu adeninové báze ATP. Jedná se o oblasti Val 237-Lys 242 a Val 280-Arg 292. Důkaz o významu těchto sekvencí pro katalýzu byl potvrzen bodovými mutacemi (Lin et al., 1994), které prokázaly, že Cys 283 a Arg 292 jsou nezbytné pro katalýzu. Oblast Val 280-Arg 292 se navíc překrývá se sekvencí Leu 287-Val 295, která tvoří konzervativní P-smyčku charakteristickou pro celou proteinkinázovou rodinu. Jako méně pravděpodobná se jeví lokalizace ATP vazebného místa v oblasti Asp 340-Gln 349, identifikované pomocí nukleotidového analogu (James et al., 1990). Argininové zbytky Arg 130, Arg 132 a Arg 135 se rovněž podílejí na interakci s navázanou molekulou ATP (Wood et al., 1998), respektive spolu s Arg 236, Arg 292, Arg 320 a Arg 341 na fixaci fosfátové skupiny substrátů/produktů (Zhou et al., 1998). Tripeptid Glu 231-Asp 233 pravděpodobně koordinačně váže Mg^{2+} kation, který je nezbytný pro vazbu ATP do aktivního místa CK a vznik přechodného komplexu MgADP-PO₃-kreatin (Fritz-Wolf, 1996; Eder et al., 2000a). Je rovněž možné, že právě interakce mezi Mg^{2+} kationtem a enzymem způsobuje glykosidickou torzi adenosinu (Murali et al., 1994), kterou je podmíněna specifická vazba substrátu. Méně zřejmá je pozice vazebného místa pro kreatin. Možnost jeho identifikace je ztížena skutečností, že na molekulu CK se nejdříve váže MgATP komplex a teprve po následné konformační změně vyvolané interakcí mezi MgATP a CK nasedá molekula Cr. Jako možná vazebná místa pro Cr byly identifikovány sekvence Ile 57-Asn 63 a rovněž Val 280-Arg 292 (Buechter et al., 1992). Jako možný

¹⁾ Číslování aminokyselinových zbytků v následujícím textu je sjednoceno podle primární sekvence králičí M-CK, která je uvedena v příloze 7.1.2.

aminokyselinový zbytek, odpovědný za interakci s molekulou kreatinu byl označen Arg 95 (Rao et al., 1998; Edmiston et al., 2001). Vysoce konzervativní Try 228 je při navázání MgATP blízko adeninové báze a zabraňuje molekulám vody ve vstupu do aktivního místa CK (Hagemann et al., 2000). Důležitou roli v mechanismu katalýzy hraje rovněž histidinový zbytek (Mejsnar et al. 2002). Také sekvence odpovědné za dimerizaci (Gross et al., 1994; Perraut et al., 1998) a vazbu do myofibrilární struktury (Stolz et al., 1998) nebyly dosud s definitivní platností identifikovány.

Poněkud kontroverzní je význam vysoko reaktivního Cys 283 (Kenyon and Reed, 1983), lokalizovaného v blízkosti vazebného místa pro adeninovou bázi ATP (Furter et al., 1993; Lin et al., 1994; Mejsnar et al., 2002). Obecně je tento aminokyselinový zbytek považovaný za nezbytný pro katalytický mechanismus CK. Chemická modifikace Cys 283 vede k různé míře inhibice enzymatické aktivity v závislosti na velikosti modifikující skupiny (Brown and Cunningham, 1970; O'Sullivan, 1971; Henkin, 1977; Sheikh et al., 1993; Liu and Zhou, 1995; Gregor et al., 2003b). Předpokládaným mechanismem této inhibice je sterický konflikt mezi modifikující skupinou a substrátem. Zároveň však byly popsány případy, kdy jeho modifikace s vazbou substrátu neinterferuje (Lin and Zhou, 1995). David a Haley (1999) popsali překvapivý případ kovalentní vazby ATP a Cys 283. Na rozdíl od autorů považujících Cys 283 za přímého účastníka přenosu elektronů během reakce (Mejsnar et al., 2002), uvažuje Furter se spolupracovníky (Furter et al., 1993) jeho roli v reakčním mechanismu za nepřímou. Jeho hypotetickou funkcí je zprostředkování synergizmu mezi vazbou dvou substrátů nebo podíl na konformační změně CK molekuly, která vede ke změně její aktivity.

1.6.2. Dynamika kreatinkinázové molekuly

Enzymatická aktivita CK, jako pravděpodobně každého enzymu v buňce, je řízena konformačními změnami molekuly, kterými se v případě CK mění vzdálenost dvou domén. Dle současných znalostí má buňka několik možností, jak tyto konformační změny řídit. Nejznámějším regulačním mechanismem je změna Gibbsovy energie (ΔG) vyvolaná dostupnou koncentrací reaktantů a produktů. V druhém typu řízení se uplatňuje vliv dalších buněčných enzymatických systémů. Třetím typem může být interakce enzymu s buněčnými organelami, v případě myofibrilární CK vazba na myofibrily.

Buňka dokáže změnit koncentraci v místě přenášených substrátů tak, aby optimalizovala distribuci energie do míst s největšími energetickými nároky, což dokládá

existence fenoménu „substrate channeling“, kde v případě CK systému v kosterním svalu je formou přímého přenosu transportováno kolem 50% ATP mezi MM-CK a myozinovou ATPázou (Gregor et al., 1999). Snížení pH vede k přednostnímu transportu ATP a tento transport nadále energeticky zajišťuje svalovou kontrakci.

Příkladem vlivu dalších enzymatických systémů je role významného regulátoru energetického metabolismu – AMP aktivované proteinkinázy (AMPK). Tento enzym je metabolickým senzorem, který udržuje v rovnováze anabolické a katabolické pochody v buňce (Carling et al., 1997; Chen et al., 2000; Mu et al., 2001; Winder, 2001). V okamžiku zvýšených energetických nároků aktivuje dráhy energie uvolňující a inhibuje dráhy energie spotřebovávající. Jedním z enzymů, které jsou AMPK inhibovány je CK (Ponticos et al., 1998). V CK reakci inhibice dráhy energie spotřebovávající znamená inhibici syntézy PCr. AMPK je regulována poměrem ATP/ADP a snížením tohoto poměru se aktivuje AMPK. Podle posledních nálezů je AMPK schopna poměrně silné vazby na MM-CK kosterního svalu a její fosforylace, čímž inhibuje její aktivitu (Ponticos et al., 1998).

Celá řada studií dokumentuje konformační změny CK molekuly v důsledku vazby substrátu do aktivního místa (Messmer and Kagi, 1985; Rao and Cohn, 1977). V posledních letech byly publikovány 3D modely CK a argininkinázy (Fritz-Wolf et al., 1996; Forstner et al., 1998; Zhou et al., 2000; Mejsnar et al., 2002), s jejichž pomocí bylo možné potvrdit experimentálně získaná data a formulovat předpokládanou roli konformačních změn v reakčním mechanismu enzymu. Důkazy o substrátem indukované konformační změně zahrnují spektroskopické a UV absorbní studie (Roustan et al., 1968; Reed and Cohn, 1972; Messmer and Kagi, 1985; Grossman et al., 1992), rozdíly v přístupnosti citlivých míst pro tryptické štěpení (Lui and Cunningham, 1966), NMR spektroskopii (Rosevear et al., 1981) a RTG difrakci v roztoku (Forstner et al., 1996, 1998).



obr.9 3D konformace CK; červená molekula znázorňuje „open“ konformaci a modrá molekula znázorňuje „closed“ konformaci (Mejsnar et al., 2002).

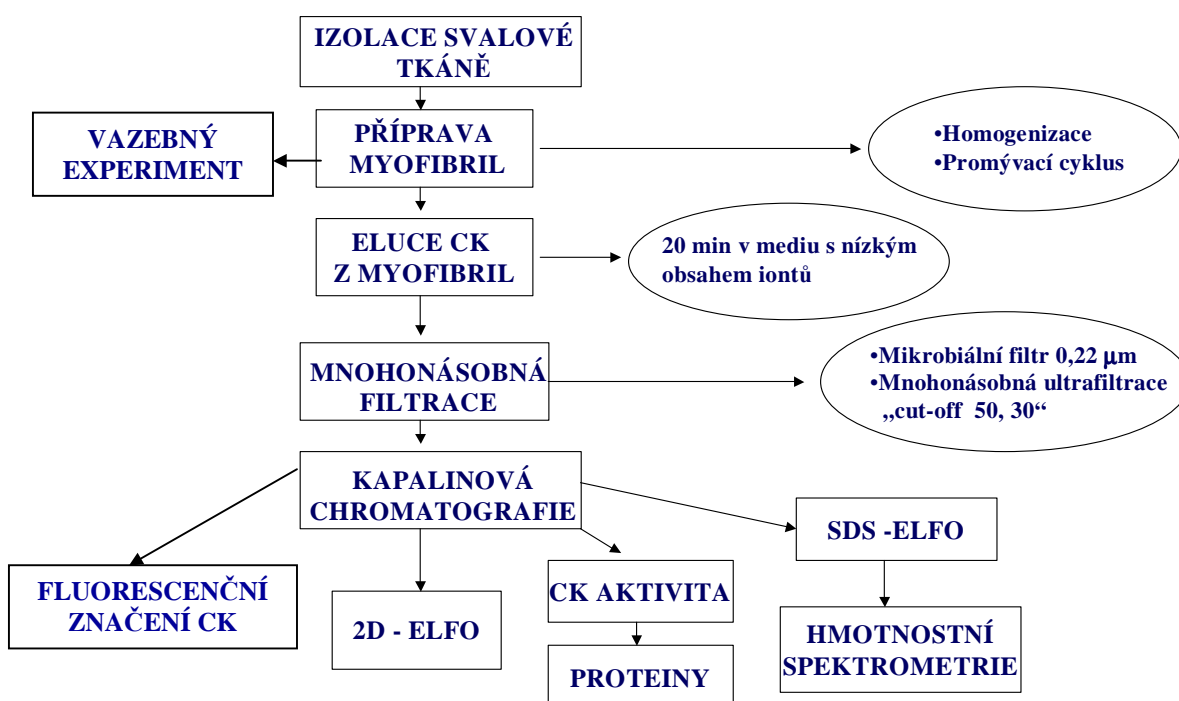
Konformační změny jsou indukovány vazbou MgATP nebo přechodného komplexu MgADP-PO₃-Cr. Řada pokusů prokázala, že přítomnost Mg²⁺ kationtu je nezbytná pro vazbu substrátu do specifického místa (Forstner et al., 1998) a vyvolání konformační změny enzymu (Raimbault et al., 1996; Forstner et al., 1998). Na 3D modelu (obr.9) byly publikovány 3 různé konformační stavy CK definovány vzdáleností mezi His 97 a Cys 283 (Mejsnar et al., 2002). V nepřítomnosti substrátů zaujímá enzymová molekula inaktivní „open“ konformaci (červená molekula, vzdálenost mezi His 97 a Cys 283 je 0,766 nm; Mejsnar et al., 2002). Po vazbě ATP dochází k rozsáhlé rotaci domén a jejich přiblížení, které má za následek aktivní „closed“ uspořádání (modrá molekula, vzdálenost mezi His 97 a Cys 283 je 0,277 nm; Mejsnar et al., 2002). Během tohoto pohybu dochází k rekonfiguraci klíčových aminokyselinových zbytků v aktivním místě a uzavření vazebného místa pro okolní roztok (Forstner et al., 1998; Zhou et al., 2000; Mejsnar et al., 2002). Podle 3D modelu dojde tímto pohybem k uzavření aktivního místa a hydrofóbní část velké domény vytlačí všechny molekuly vody okolního roztoku kromě jedné, která je nezbytná pro hydrolytické štěpení makroergní vazby fosfátu. Sekundární struktura enzymu se při vazbě nukleotidu mění pouze minimálně (Granjon et al., 2001). V důsledku vazby MgATP dochází k přiblížení aminokyselinových zbytků (His 97 a Cys 283) a jejich vzájemná pozice se liší o 0.5 nm (Mejsnar et al., 2002). Pokud budeme brát v úvahu ještě větší přiblížení C-koncové a N-koncové domény, nedosáhneme úrovně experimentálně zjištěných konformačních změn (Forstner et al., 1998). Za tyto změny bude patrně odpovědný jiný typ pohybu domén, popsáný u velké konformační změny oktameru mitochondriální CK. Může se jednat o vzájemnou změnu polohy jednotlivých dimerů v oktameru, která vede ke změně tvaru celé molekuly po vazbě substrátu. Po navázání druhého vhodného substrátu (Cr) zaujímá molekula konformaci „intermediary“ (nereaktivní). Tato konformace je vzdáleností mezi His 97 a Cys 283 blíže k open

konformaci (0,620 nm; Mejsnar et al., 2002). V této konformaci jsou navázány oba substráty, ale molekula CK potřebuje ještě podnět k dosažení „open“ konformace a ke spuštění reakce.

Z výše uvedeného vyplývá vysoká pravděpodobnost dalších regulačních mechanismů, které umožňují přesně naplňovat potřeby buňky. Z našeho pohledu je významná interakce CK se subcelulárními strukturami, která je pro tento enzym významná a mohla by vést k uzavření CK molekuly do aktivní konformace. Předpokládáme tedy, že vazba CK molekuly na myofibrilu způsobí posun obou domén z „intermediary“ do „closed“ konformace a tato práce významně přispívá k finálnímu ověření této hypotézy.

2. METODIKY PRÁCE

Příprava funkčních myofibril pro vazebný experiment a purifikace myofibrilární CK obsahovaly velký počet metodických kroků, který je pro přehled uveden ve vývojovém diagramu. Dále je tato kapitola členěna na dvě podkapitoly: metody biochemické a fyzikální.



2.1. Biochemické metody

2.1.1. Izolace svalové tkáně

Svalová tkáň byla izolována z potkanů, samců, kmene Wistar o průměrné hmotnosti 350g. Potkan byl intraperitoneálně anestetizován dávkou pentobarbitalu (50 mg/kg) a po odebrání m. psoas major usmrčen prostřížením bránice. Králík byl usmrčen cervikální dislokací a m. psoas major byl okamžitě odebrán.

2.1.2. Příprava myofibrilární frakce

Myofibrilární frakce byla připravena podle Wallimanna (Wallimann and Eppenberger, 1985), s mírnou modifikací (Gregor, 1999). Vypreparovaná svalová tkáň byla zbavena šlach a tuků, rozstříhána na drobné kousky a inkubována v homogenizačním mediu (viz příloha 7.2.1., ad 1) s 50% obsahem glycerolu po dobu 60 minut na ledu. Během této doby došlo k penetraci tkáně glycerolem, která usnadní rozvolnění myofibril.

Po 60-ti minutové inkubaci byla rozstříhaná svalová tkáň zfiltrována a resuspendována v homogenizačním mediu v poměru 5 ml HM : 1 g tkáně. Následně byla 3-krát provedena homogenizace rotačním homogenizátorem LHM-20 rychlostí 7000 otáček za minutu po dobu 7 sekund a homogenát byl doplněn homogenizačním mediem na poměr 9 ml HM : 1 g tkáně. Naředěný homogenát byl centrifugován při 800 g po dobu 7 minut. Supernatant byl slit a sediment byl opět resuspendován v homogenizačním mediu v poměru 5 ml HM : 1 g tkáně. Dále dvakrát rehomogenizován rotačním homogenizátorem LHM-20 rychlostí 7000 otáček za minutu po dobu 7 sekund. Poté byl homogenát zbaven hrubých nečistot filtrací přes nylonovou gázu. Homogenát byl doplněn homogenizačním mediem na poměr 9 ml HM : 1 g tkáně, 20 minut inkubován na ledu a centrifugován při 800 g po dobu 7 minut.

Následovalo promývání o 12 cyklech, kdy byl supernatant vždy slit a sediment byl resuspendován v homogenizačním mediu v poměru 7,5 ml HM : 1 g tkáně. Homogenát byl zcentrifugován při 1500 g po dobu 7 minut. V pátém kroku tohoto cyklu byla provedena inkubace homogenátu 5 minut s 1% Tritonem X-100 na ledu (Solaro et al., 1971), z důvodu narušení buněčných struktur.

Během celé přípravy myofibrilární frakce bylo nutné uchovávat homogenát i svalovou tkáň na ledu. Medium i nádoby pro práci s biologickým materiálem byly vychlazeny na teplotu 4°C.

2.1.3. Eluce CK z myofibril mediem s nízkým obsahem iontů

Po posledním kroku promývacího cyklu byl sediment resuspendován v mediu s nízkým obsahem iontů (Ario-Dupont and De Nay, 1986; viz příloha 7.2.1., ad 2) v poměru 10 ml media : 1 g tkáně a inkubován 20 minut na ledu. Při této inkubaci došlo k dostatečnému uvolnění CK lokalizované v M-linii sarkomery včetně dalších balastních proteinů. Standardně jsem zpracovávala 30 g tkáně a získala 300 ml eluátu.

2.1.4. Mnohonásobná ultrafiltrace eluátu

Získaný eluát byl předfiltrován přes mikrobiální filtr s velikostí pórů 0,22 µm (Millipore) a tím byl eluát zbaven nečistot.

Druhým krokem byla filtrace přes membránu s velikostí pórů „cut-off 50“ (Stairred Ultrafiltration Cells, Amicon, obr.1), kde byl vzorek filtrován pod tlakem 500 kPa dusíku. Eluát v tomto zařízení byl zahuštěn na cca 1-2 ml.

Dalším krokem filtrace byla centrifugační ultrafiltrace na centrikonech velikostí pórů membrány „cut-off 30“ (Amicon) a následné převedení vzorku, který zůstal nad filtrem, do ekvilibračního pufru, který se skládal z 5 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, pH 8.7 nebo 9.0.

Konečné množství vzorku bylo cca 500-1000 µl.

Z takto připraveného vzorku pro kapalinovou chromatografii bylo standardně odebráno 10 µl na měření specifické enzymatické aktivity CK, 40 µl na stanovení celkového obsahu proteinů a 10 µl na SDS-elektroforézu pro jejich identifikaci.



Obr.1 Stairred Ultrafiltration Cells

2.1.5. Kapalinová chromatografie

Výběr vhodného ionexu pro chromatografii proteinů závisí na stabilitě proteinu a především na jeho izoelektrickém bodě (pI). Izoelektrický bod proteinu je hodnota pH, při které je protein jako celek elektroneutrální a na ionexu se nebude prakticky vázat. Optimální sorpce nastává při pH, které se liší od pI sledovaného proteinu alespoň o jednu pH jednotku. Při nižším pH roztoku má protein kladný náboj a váže se na katex, při vyšším pH roztoku má protein záporný náboj a váže se na anex.

Purifikace eluátu z myofibril na Duoflow System (Bio-Rad)

Směs eluovaných a následně filtrovaných proteinů jsme dále purifikovali pomocí středně tlaké kapalinové chromatografie na koloně UNO-Q (velmi silný anex, matrice polymer kvarterního aminu). Purifikace byla zahájena nanesením vzorku na kolonu v ekvilibračním pufru. Eluce byla prováděna lineárním gradientem 0-100% elučního pufru, který se skládal z 5 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 5 mM DTT, pH 8.7 a 9.0, v uspořádání uvedeném v příloze (viz příloha 7.2.2.), za konstantního průtoku 1 ml/min a v rozmezí tlaku 250-700 psi.

Z vybraných 1 ml frakcí bylo standardně odebráno 15 μ l na měření specifické enzymatické aktivity CK a 50 μ l na stanovení celkového obsahu proteinů a zbytek frakce byl použit na SDS-elektroforézu pro identifikaci čistoty proteinů (Mini Protean II, Hoefler SE 600).

2.1.6. SDS elektroforéza

Elektroforéza využívá pohybu nabitých částic v stejnosměrném elektrickém poli v polyakrylamidovém gelu. Směs látek se při ní dělí podle velikosti náboje, velikosti a tvaru molekuly, aj.

Příprava a zpracování vzorků na SDS-elektroforézu

Vzorky byly zpracovávány pomocí SDS-elektroforézy na Mini Protean II (velikost gelu 100x82 mm) a Hoefler SE 600 (elektroforéza většího rozměru, velikost gelu 180x160 mm).

a) Mini Protean II, Bio-Rad

Zbytek frakce z kapalinové chromatografie byl zahuštěn na mikrokonech „cut-off 30“ (Amicon) na objem 10 – 15 µl. Zahuštěné frakce byly naředěny vzorkovým pufrům (složení viz příloha 7.2.3.) v poměru 1:1, denaturovány varem 2 minuty a nanoseny v objemu 20 µl na dráhu na připravený polyakrylamidový gel. SDS-elektroforéza Mini Protean II byla prováděna za standardních podmínek 210 V a 64 mA po dobu cca 90 minut. Dělicí polyakrylamidový gel byl 12% a zaostřovací gel 5% (viz příloha 7.2.3.).

b) Hoefer SE 600, Pharmacia Biotech Inc.

Frakce z kapalinové chromatografie byly zahuštěny na mikrokonech „cut-off 30“ (Amicon) na 20 - 25 µl. Zahuštěné frakce byly naředěny vzorkovým pufrům (složení viz příloha 7.2.3.) v poměru 1:1, denaturovány varem 2 minuty a nanoseny v objemu 40 µl na dráhu na připravený polyakrylamidový gel. Pro tuto identifikaci proteinů byl použit 10 % dělicí polyakrylamidový gel (menší zesíťování) a 5 % zaostřovací gel (viz příloha 7.2.3.). SDS-elektroforéza Hoefer SE 600 byla prováděna za standardních podmínek 100 V a 16 mA po dobu cca 16 hodin (přes noc).

Separované proteiny byly detekovány pomocí modifikované metody Coomassie brilliant blue (CBB) a Bismark brown R (BBR) v poměru 1:0,75. Tato metoda je rychlejší a citlivější (Choi et al., 1996), než barvení pomocí samotné CBB. Gel byl barven (viz příloha 7.2.3.) po dobu 20 minut a poté byl odbarvován roztokem methanolu, kys.octové a vody v poměru 40:7:53, který byl pravidelně měněn až do úplného odbarvení pozadí gelu. Takto připravené gely byly skladovány v 1% kyselině octové při 4°C.

2.1.7. Měření aktivity CK

Aktivita CK byla stanovena metodou spřažených enzymatických reakcí podle Bergmayera (Bergmayer, 1963):



Principem metody je fosforylace ADP na ATP fosfokreatinem (PCr) za účasti enzymu kreatinkinázy (CK). ATP bylo využito k fosforylaci D-glukosy (D-Glu) za účasti enzymu hexokinázy (HK) na D-Glukosa-6-fosfát (D-Glu-6-P), který byl dehydrogenován na D-glukono- δ -lactone-6-P za přítomnosti NADP. Změna koncentrace NADPH byla určena změnou absorbance při 339 nm.

Vzorek, který představoval část frakce (15 μ l) z kapalinové chromatografie, eluátu myofibrilární frakce (10 μ l), či značená CK (10 μ l), byl naředěn zásobním pufovacím roztokem (viz příloha 7.2.4.) a proměřován ve spektrofotometru výše uvedenými enzymatickými reakcemi. V případě vzorku z eluátu myofibrilární frakce byl poměr ředění vzorku k zásobnímu roztoku 1:250, v případě frakce z kapalinové chromatografie byl poměr ředění 1:9 a v případě značené CK byl poměr ředění 1:99.

Roztoky na měření enzymatické aktivity CK a postup při měření (viz příloha 7.2.4.).

2.1.8. Stanovení proteinů Lowryho metodou (Lowry et al., 1951)

Vzorek nebo standard BSA (bovin serum albumin, 1 mg/1 ml) byl pečlivě promíchán a naředěn redestilovanou H₂O do 0,5 ml. K 0,5 ml vzorku nebo standardu bylo přidáno 2,5 ml roztoku D (viz příloha 7.2.5.) a ponecháno v klidu 15 minut při pokojové teplotě. Homogenní světle nažloutlé zbarvení svědčilo o proběhlé reakci.

Po 15 minutách bylo přidáno 0,25 ml roztoku C (viz příloha 7.2.5.), ihned protřepáno a necháno v klidu stát 30-35 minut při pokojové teplotě. Barevný komplex je stabilní v rozmezí 5 minut až několika hodin.

Kalibrační křivka zásobního roztoku BSA (1 mg/1 ml) byla spektrofotometricky stanovena z následujících koncentrací při 670 nm:

BSA [mg/ml]	BSA [μ l]	redest.HO [μ l]
0,000	0	500
0,050	25	475
0,075	37	463
0,100	50	450
0,150	75	425
0,300	150	350
0,500	250	250

Následně byl vzorek byl pečlivě protřepán a měřen v tripletech.

U neznámého vzorku byla stanovena optimální koncentrace měřením řádově rozdílných ředění.

2.1.9. Dvourozměrná elektroforéza (2D)

Komplexní směsi proteinů nelze řádně rozdělit jednorozměrnou elektroforézou. Proto se užívá dvourozměrné dělení proteinů (2D-elektroforézy), s poněkud odlišným uspořádáním v každém směru, čímž lze rozdělit přes tisíc proteinů na jediném gelu. 2D-elektroforéza v pravém slova smyslu, na polyakrylamidovém gelu, byla dotvořena O'Farrellem v roce 1975 a používá se s obměnami dodnes. Podle něho 2D-elektroforéza využívá dvou principů (rozměrů) dělení proteinů. Pro první rozměr se používá *izoelektrická fokusace* (IEF) a pro druhý rozměr *SDS-elektroforézu* v polyakrylamidovém gelu. Použitím 2D-elektroforézy získáme proteinovou mapu, která charakterizuje proteiny v horizontálním směru podle izoelektrického bodu (pI) proteinu a ve vertikálním směru podle jeho molekulové hmotnosti (MW).

Příprava vzorku pro 2D-elektroforézu

Pro 2D-elektroforézu byla použita frakce z kapalinové chromatografie, která na jednorozměrné SDS-elektroforéze (Mini Protean II) obsahovala pouze jeden pruh v oblasti 42 kD, což odpovídá Mw monomeru CK. Frakce byla přečištěna pomocí TCA precipitace (viz příloha 7.2.6.), a solubilizována ve 300 μ l rehydratačního pufru (viz příloha 7.2.6.) s obsahem močoviny a detergentu. Takto připravený vzorek byl nanesen na strip pasivní rehydratací.

Rehydratovaný 17 cm dlouhý strip, s rozsahem pH gradientu 3-10 pH, byl fokusován na přístroji Proteanu IEF Cell při 20°C až po dosažení 40-60.000 volt-hodin podle návodu výrobce (Bio-Rad). Nastavení přístroje zaručovalo přiměřenou velikost napětí tak, aby proud nepřesáhl 50 μ A na strip (viz příloha 7.2.6.).

Pro analýzu druhého rozměru byl připraven 10% polyakrylamidový gel (viz příloha III). Strip byl umístěn na startovací linii připraveného gelu a zalit 1% roztokem agarózy. Elektroforetické dělení proběhlo na Hoefer SE 600 za standardních podmínek 10 mA po dobu 30 minut a následně 80 mA cca 3 hodiny.

Detekce proteinu byla provedena pomocí barvení stříbrem (Blum et al. 1987; viz příloha 7.2.7.) po fixaci v roztoku 45% ethanolu a 10% kyseliny octové a důkladném opláchnutí ve vodě následovala senzitivace v 0,02% roztoku thiosíranu sodného. Po oplachu gelu vodou byl inkubován v 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného 20 min ve tmě. Opět opláchnut vodou a vyvolání bylo provedeno pomocí 2% roztoku uhličitanu sodného s přídatkem 0,04% formaldehydu. Po dosažení optimálního kontrastu bylo vyvolání zastavováno 45% ethanolem a 10% kyselinou octovou. Takto obarvené gely byly uchovávány v 1% roztoku kyseliny octové při 4°C nebo usušeny mezi dvěma celofány na vzduchu.

2.1.10. Hmotnostní spektrometrie – MALDI-TOF

K identifikaci proteinů byla využívána hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (z anglického Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time Of Flight). Technika MALDI umožňuje šetrnou ionizaci biomakromolekul. Principem MALDI je určení molekulové hmotnosti peptidu, nebo jeho fragmentu po specifickém štěpení, na základě poměru uděleného náboje a hmotnosti (TOF). Těžší částice doletí na detektor později, tzn. dodáme-li všem částicím stejnou kinetickou energii, bude jejich rychlost klesat s rostoucí hmotností.

Prvním krokem přípravy vzorku je štěpení proteázou, následuje kokrytalizace analysované látky s matricí na terčíku. Matrice je organická látka, schopná absorbovat UV záření, nejčastěji aromatická kyselina. Výsledná směs je vystavena působení UV laseru, který uvolňuje matrici a analyt z povrchu terčíku. Matrice, která absorbovala UV záření, zvolna předává energii vzorku a tím dochází k jeho ionizaci. Analyzátor doby letu umožňuje rozlišit populace iontů, které při použitém urychlovacím napětí prolétávají od iontového zdroje k detektoru v závislosti na své hmotnosti různými rychlostmi, tedy po různou dobu. Na základě kalibrace hmotnostním standardem jsou změřené doby letu přepočítány na poměr hmoty ku náboji.

Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie zahrnuje dvě základní techniky – peptidové mapování a proteinové mikrosekvenování.

Při peptidovém mapování je izolovaný protein rozštěpen v roztoku nebo v gelu specifickou proteázou. Po změření přesných hmotností vzniklých peptidů se porovnávají získaná spektra s databázemi. Jelikož každý protein poskytuje unikátní sadu peptidů, lze jej

na základě přesných hmotností těchto peptidů jednoznačně identifikovat. Toto však platí pouze pro proteiny, jejichž sekvence jsou známy. Pokud je analyzovaný protein neznámý, musí se zvolit technika mikrosekvenování. Podstatou mikrosekvenování je naměření kolisních spekter peptidů získaných fragmentací, ze kterých lze poté vyčíst částečné inertní sekvence daného proteinu. Takto lze identifikovat protein na základě sekvence jednoho peptidu, a proto je možné identifikovat i proteiny, jejichž sekvence je známá jen částečně.

Technika mikrosekvenování se využívá také pro analýzu komplexních směsí proteinů. Směs je nejprve štěpena proteázou, poté jsou vzniklé peptidy separovány kapalinovou chromatografií a přímo analyzovány hmotnostním spektrometrem. Pomocí tohoto přístupu je možno úspěšně identifikovat až stovky proteinů ze směsi.

Příprava vzorku pro hmotnostní spektrometrii

Proteiny identifikované pomocí MALDI-TOF byly získány z SDS-elektroforézy (Hoefer SE 600), na které byla separována vybraná frakce z kapalinové chromatografie. Vzorky pro hmotnostní spektrometrii byly získány vyříznutím 2 proužků z gelů v úrovni standardu CK, obarvených CBB a BBR. Získané proužky gelu byly nejprve nakrájeny na kostky o hraně přibližně 1 mm a posléze odbarvovány v roztoku 0,01M DTT, 0,05 M N-ethylmorpholin acetátu (pH 8,1) v 50% acetonitrilu. Po odbarvení byl gel omyt vodou, sražen acetonitrilem a po odsátí supernatantu vysušen na koncentrátoru Speed-Vac. Vysušený gel byl rehydratován roztokem trypsinu (50 ng/μl) v pufru pro štěpení a inkubován při 37 °C přes noc. Supernatant byl doplněn na výsledných 30 % acetonitrilu a roztok byl použit k dalším analýzám.

Měření byla prováděna na zakázku v ČAV na přístroji BIFLEX II (Bruker-Franzen, SRN) vybaveném dusíkový laserem (337 nm) a bezmřížkovým iontovým zdrojem se zpožděnou extrakcí iontů. Urychlující napětí bylo 19 kV a napětí na reflektoru 20 kV. Spektra byla kalibrována externě monoizotopickým iontem $[M+H]^+$ standardního peptidu angiotenzinu II ($m/z = 1296,69$). Pro měření bylo 0,5 μl vzorku nanášeno na terčík a při laboratorní teplotě ponecháno odpařit do sucha. Následně byly vzorky převrstveny 0,5 μl roztoku matrice (α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina) a terčík byl ponechán při laboratorní teplotě, dokud nedošlo ke kompletní krystalizaci matrice.

Majoritním „píkům“ z naměřeného spektra byla přiřazena hodnota poměru hmoty k náboji (m/z). Takto získaný soubor m/z byl pomocí programu Mascot [<http://www.matix.science.com>, #866] srovnáván s databází NCBIInr [<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/README>, #867].

2.1.11. Izolace myofibril pro vytěšňovací experimenty

Svalová tkáň byla pro tento typ experimentu získána z 1,5 ročních králíků, kmene Chinchila o hmotnosti 2,8 – 3,2 kg. Králíci byli usmrceni rychlou cervikální dislokací a vykrvení. Okamžitě po té byl izolován pravý a levý m.psoas major a umístěn do bezvápníkového izotonického roztoku (viz příloha 7.2.1., ad 3) pokojové teploty.

Myofibrily byly připraveny stejným postupem, jak je již uvedeno výše s následující modifikací: $MgCl_2$ (2.5 mM) byl přidán do homogenizačního media po třetím promývacím cyklu, aby se předešlo degradaci aktinových filament. Byly používány intaktní myofibrily a eluované v nízkoiontovém mediu (viz příloha 7.2.1., ad 2). U intaktních myofibril byl proveden vazebný experiment (viz níže) ihned po izolaci myofibril, naproti tomu u eluovaných myofibril byl vazebný experiment proveden až po odmytí myofibrilání CK nízkoiontovým mediem (Ventura-Clapier et al., 1987).

Proteinový obsah/profil v eluátu byl detekován pomocí SDS-PAGE (mini protean). Gely byly barveny stříbrem podle Blum et al. (1987, viz příloha 7.2.7.).

Délky sarkomer a intenzita fluorescence byly kvantifikovány pomocí kvantifikačního modu Leica ConfocalSoftwaru (LCS Lite) and ImageJ softwaru, v uvedeném pořadí.

Koncentrace proteinů izolovaných myofibril byla stanovena Lowryho metodou (viz příloha 7.2.5.).

2.1.12. Vazebný experiment

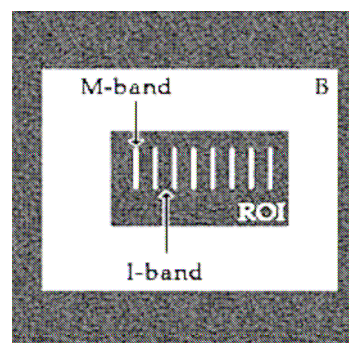
Nahrazení přirozeně vázané CK v M-linii sarkomery pomocí externí - fluorescenčně značené CK bylo provedeno podle Kraft et al. (1995) následujícím způsobem. Purifikované myofibrily v koncentraci 8-12 mg proteinu / ml byly inkubovány v celkovém objemu 100 μ l relaxačního media (viz příloha 7.2.1., ad 4) s 2,5 μ l CK-IAF (5 mg/ml) na krycím sklíčku po dobu 10 min při 20°C. Tento vazebný experiment byl prováděn buď bez přítomnosti CK substrátů a nebo vždy s jedním substrátem, případně s jejich párem, v klidových fyziologických koncentracích, tj. (5 mM ATP, 12 mM PCr, 8 mM Cr a 0.62 IM ADP) (Stefl et al., 1999).

Přítomnost substrátů čerstvě připravených myofibril byla testována použitím spřažených enzymatických reakcí (Gerhardt, 1983; Wahlefeld and Siedel, 1985).

Fluorescencí značení myofibril pomocí konjugátu Phalloidin-Alexa 663 bylo použito k lokalizaci místa vazby CK-IAF na myofibrilách. Tato lokalizace byla provedena použitím konfokální mikroskopie na úrovni A a I- bandu. Avšak je dobře známo, že CK interaguje s M-linií sarkomery v A-pruhu, proto budeme prezentovat interakci v M-linii navzdory nižšímu rozlišení konfokálního mikroskopu.

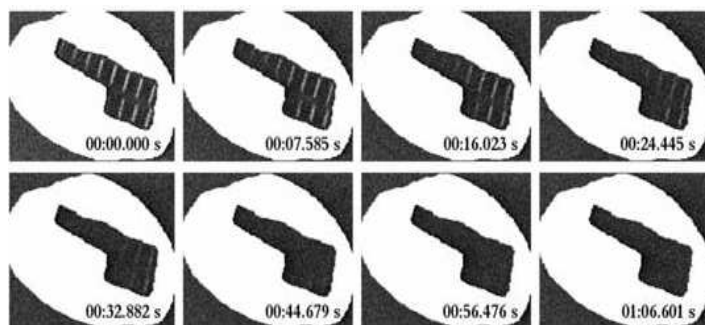
2.1.13. Měření FLIP a hodnocení dat

Výměnná reakce CK-IAF v M-linii byla sledována výlučně konfokální mikroskopií s použitím metody Fluorescence Lost in Photobleaching (FLIP) podle následujícího schématu (obr.2). Myofibrily jsou inkubované s CK-IAF do ustavení rovnováhy a získání vysoké intenzity fluorescence v M-liniích myofibrily. Poté je myofibrila obklopena oblastí s kontinální vysokou intenzitou laseru za účelem vybělení tohoto okolí. Ztráta fluorescence v centrální části (M- linie) je následkem pohybu fluorescenčně značených molekul CK-IAF z okolí směrem k M-linii a obráceně, kdy musí přejít přes vybělovaný region a tam nevratně ztratí svoji



obr.2 Schema FLIP

fluorescenci. Proto stanovujeme výměnu CK molekul v M-linii jako pokles fluorescence v M-linii a rychlost jejího poklesu obr.3.



obr.3 Ztráta fluorescenčního signálu. Obrázek z konfokálního mikroskopu. Autor obrázku Žurmanová.

FLIP měření bylo provedeno na konfokálním mikroskopu (Leica SP2A OBS) s 63/1.2 NA vodním imersním objektivem s použitím Argon laser a vlnovou délkou 488 nm

(10 mW) k excitaci IAF značky. Vybělení bylo provedeno na uzavřeném regionu v blízkosti myofibril s 488 nm laserem zesíleným na 25% výkonu. Ztráta fluorescence byla monitorována v nízké intenzitě laseru (v 5% výkonu) v 1.686 s intervalech po 40 snímcích

s totálním akvizičním časem 67 s. Výměna CK-IAF mezi myofibrilami a jejich okolím byla sledována jako pokles fluorescence na myofibrilách.

Myofibrily značené za stejných podmínek konjugátem Phalloidin-FITC byly užity jako kontrola vybělení. Měření FLIP bylo opakováno 6-20 krát k získání dostatečně velkého souboru dat.

Průměrné hodnoty poklesu fluorescenční intenzity získány z M-linií každé skupiny byly normalizovány k 100% na začátku FLIP měření.

Experimentální hodnoty byly proloženy dvouexponenciální křivkou. Všechny rychlosti výměny prezentované v obr 9, 10 (viz kapitola výsledky) jsou prezentovány dvěma hodnotami pro vzájemné porovnání: derivace v páté sekundě a procentuální pokles na konci experimentu (67 sec) jsou proporcionální sledovaným rychlostem výměny. Intenzita signálů je uvedena jako průměr. \pm S.E.M., n je počet myofibrilárních preparací. Rozdíly mezi skupinami byly porovnány analýzou variance (ANOVA) a po potvrzení normálního rozložení χ^2 -testem. V případě, že nebylo potvrzeno normální rozložení byl použit ne-parametrický Kruskal–Wallisův test. Porovnání bylo provedeno v intervalech: 5, 10, 20, 40 a 60 s po startu měření FLIP. Rozdíly byly přijaty na hladině významnosti $P < 0.05$ (použitím Bonferroni multiplex comparison metodu).

2.2. Fyzikální metody

2.2.1 Fluorescenční metody

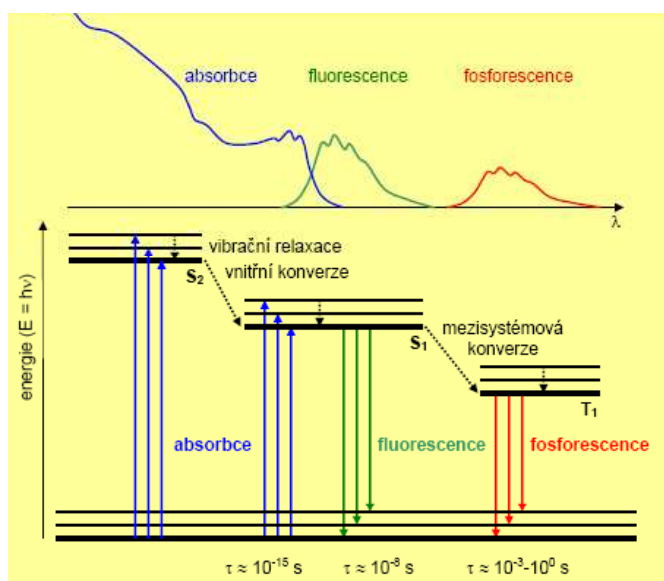
Fluorescenční metody se stále více používají nejen v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, ale i v klinické chemii, genetických analýzách a dalších oborech. V biomedicíně se jedná především o identifikaci a dělení buněk v průtokové cytometrii, zobrazování buněčných složek ve fluorescenční mikroskopii a analýze obrazu, studium změn konformací a dynamiky buněčných systémů, aplikace v různých testech jako je ELISA a další, kdy fluorescenční značky často nahrazují metody využívající radionuklidové zářiče.

V následujícím odstavci bych ráda shrnula základní definice používané ve fluorescenčních metodikách doložené obr.4, znázorňujícím zjednodušené schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavy emitující molekuly.

Absorbovaná zářivá energie, která převádí absorbující částice na vyšší energetické hladiny, se většinou předává srážkami okolním molekulám a mění se v teplo. Jsou však případy, kdy se větší či menší část zářivé energie absorbované za vhodných okolností opět vyzáří.

Fluorescence: o fluorescenci se jedná, když excitovaný elektron je opačného spinu než jeho párový elektron, který zůstává na základním orbitalu. Excitovaná molekula „se zbaví nadbytečné energie“ (přejde do základního stavu) tím, že ji vyzáří v podobě fotonu. Toto emitované záření je ve spektrofluorimetru zpracováváno emisním monochromátorem tak, aby pomocí detekčního zařízení mohlo být zjištěno, jaká je intenzita světla emitovaného při různých vlnových délkách. Fluorescenční spektrum je tedy závislost intenzity fluorescence na vlnové délce.

Fosforescence: je emise světla, při které elektron má stejný spin, takže se může přímo vrátit zpět do základního



Obr.4 Schéma zářivých a nezářivých přechodů mezi elektronově vibračními stavysložité molekuly (forma Jablonského diagramu).

orbitalu. Ve srovnání s fluorescencí má fosforescence dlouhou dobu dohasínání ($10^2 - 10^4$ s). Protože molekula tak dlouho setrvává v excitovaném stavu, má mnohem větší možnost zbavit se přebytečné energie nezářivým způsobem.

Ke své práci jsem využila značení CK fluorescenčními značkami a pomocí metody FRET (fluorescenční rezonanční přenos energie) a anizotropie byly měřeny konformační změny molekuly CK v závislosti na navázaných substrátech.

2.2.1.1. Měření konformačních změn pomocí FRET

Přenos elektronové energie se uskutečňuje mechanizmy zářivými nebo nezářivými. K zářivému (triviálnímu) přenosu energie dochází, když excitovaná molekula donoru emituje záření, které je následně reabsorbováno molekulou akceptoru.

K excitaci nezářivým přenosem energie (**FRET**) dochází, když ve směsi molekul dochází k absorpci pouze molekulami donoru, avšak konečným výsledkem jsou excitované molekuly akceptoru, které budící záření neabsorbují. Při tomto přenosu energie tedy nedochází k emisi světla donorem. Přenos energie je výsledkem elektrostatické interakce mezi molekulami akceptoru a donoru.

FRET se může měřit dvojitým způsobem:

- 1) emisí akceptoru
- 2) emisí nebo-li anizotropií donoru za přítomnosti akceptoru

Rezonanční přenos energie lze charakterizovat rychlostní konstantou (k_{DA}), která vyjadřuje pravděpodobnost přenosu; určující složkou je dipól-dipólový přenos energie, pro nějž byl odvozen Försterův vzorec

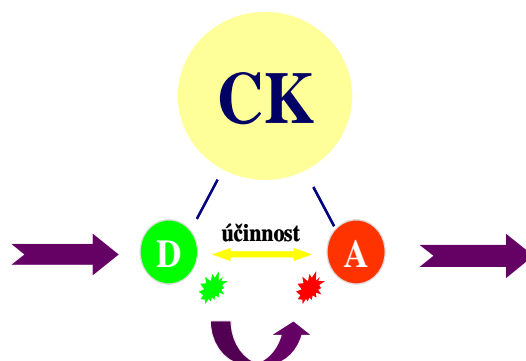
$$k_{DA} = (1/\tau_D) (R_0/R_{DA})^6$$

τ_D – doba dohasínání fluorescence donoru,

R_0 – vzdálenost ve které je pravděpodobnost přenosu energie rovna pravděpodobnosti vnitřní deaktivace vzbuzeného stavu molekuly,

R_{DA} – vzdálenost mezi donorem a akceptorem.

Rezonanční přenos energie je tedy silně závislý na vzdálenosti donoru



Obr.5 Schéma rezonačního přenosu energie, D – donor; A- akceptor

a akceptoru (obr.5). FRET tak umožňuje popisovat konformační chování molekuly enzymu (CK) na základě měnící se vzdálenosti donor-akceptor.

2.2.1.2. Steady-state fluorescenční spektroskopie

Techniky měření fluorescence mohou být formálně děleny na dvě skupiny. Nejběžnější a technicky relativně nejjednodušší je steady-state fluorescenční spektroskopie, při které vzorek trvale ozařujeme excitačním světlem a trvale registrujeme v čase emisi vzorku. Takto byla naměřena:

- a) emisní spektra fluorescence čtyř Trp zbytků v monomeru CK a dále
- b) zhášení Trp fluorescence akrylamidem.

2.2.1.3. Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Při druhém typu měření, časově rozlišená fluorescenční spektroskopie, je vzorek ozářen dostatečně krátkým pulzním světlem a následná emise je měřena v ns časových intervalech. Takto byly získány výsledky:

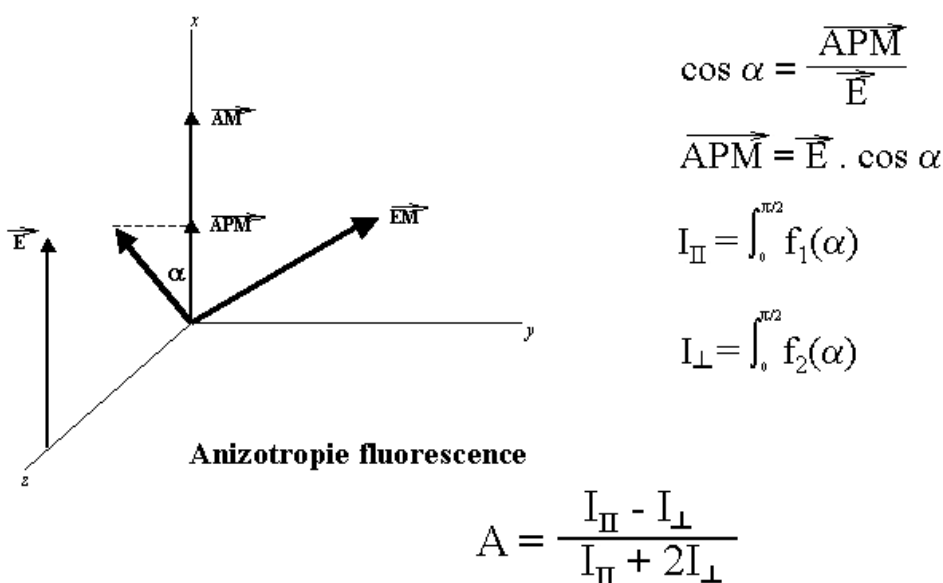
- a) poklesu intenzity fluorescence
- b) poklesu anizotropie

2.2.1.3.1. Anizotropie

Zatímco pokles intenzity fluorescence je lehce pochopitelný a bude registrován jako exponenciální pokles intenzity emise v čase, metoda anizotropie vyžaduje stručné přiblížení.

Metoda anizotropie vychází z jevu, který se popisuje jako „fotoselekce fluorofor“ (obr.6). Fluorofory se chovají jako vektory. Při jejich ozáření polarizovaným světlem (jejich vektor je na obrázku označen \vec{E}) absorbují kvantově ty fluorofory, které jsou orientovány rovnoběžně s vektorem polarizovaného světla \vec{E} a jejich stejně veliký absorpční moment \vec{AM} je na obrázku vyznačen 1 vektorem, fixovaný na osu x.

FOTOSELEKCE FLUOROFOR



Obr.6 Obrázek znázorňuje fotoselekcii fluorofor a vyjádření anizotropie fluorescence.

Uvažujeme dále, že se tento fluorofor bude v prostoru pohybovat, tedy jeho absorpční přechodový moment \vec{APM} , při excitaci velikosti \vec{E} , bude menší než \vec{E} či \vec{AM} a tedy bude roven součinu $\vec{E} \cdot \cos \alpha$. Tolik k fotoselekcii fluorofor.

Po excitaci polarizovaným světlem bude emise tohoto fluoroforu také polarizovaná. Velikost emise je vyjádřena „anizotropií“. Do vyzáření fotonu se náš vektor na obrázku ještě někam pohne, a tak jeho emisní vektor \vec{EM} bude jiný. Jeho velikost je buď jako \vec{AM} ve speciálním případě fluoroforu, rovnoběžně s osou x, nebo obecně třeba tak, jak je na obrázku vektor \vec{EM} .

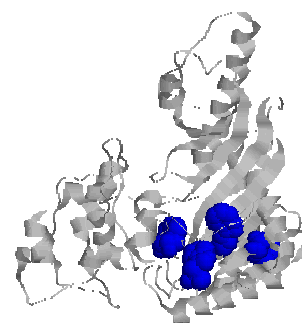
Intenzita emise se bude měřit vhodným polarizovaným detektorem. Když bude polarizátor orientovaný paralelně ke směru polarizované excitace, registrovanou intenzitu označíme jako I_{\parallel} . Když bude polarizátor rychle otočen kolmo k vektoru excitace, měřenou intenzitu značíme I_{\perp} . Anizotropie A je pak dána výše uvedeným zlomkem. Je to tedy

bezrozměrná veličina, nezávislá na koncentraci vzorku (intenzitě emise), protože rozdíl intenzit v čitateli ($I_{II} - I_L$) je normalizován celkovou intenzitou, tj. jmenovatelem zlomku.

2.2.2. Fluorescenční značení MM-CK molekuly pro měření jejích konformačních změn

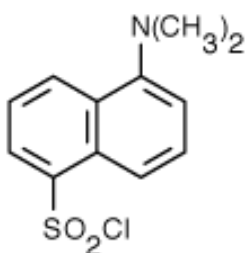
2.2.2.1. Neznačená CK

Přirozenými fluorofory proteinů jsou aromatické aminokyselinové zbytky tryptofanu (Trp), tyrozinu (Tyr) a fenylalaninu (Phe). Jejich absorpční pás leží v rozsahu 240 až 300 nm a emise je rovněž v ultrafialové oblasti. Dominantním fluoroforem je Trp, resp. jeho indolová skupina, neboť má mnohem širší emisní spektrum než Tyr, jehož fluorescenci umožňuje jeho fenolový kruh. Fluorescence Trp zbytků je velmi citlivá na vlastnosti okolí molekuly, a proto ji lze úspěšně použít pro sledování konformačních změn proteinů. Ve všech následujících experimentech s využitím vnitřní fluorescence molekuly CK jsem využila právě Trp zbytky jako donoru, neboť pozice všech čtyř Trp zbytků (obr.7) na velké doméně je pro měření konformačních změn výhodná. To předpokládá umístění externí fluorescenční značky na druhou (malou) doménu CK molekuly.



Obr.7 Monomer (CK). Na velké doméně jsou vyznačeny 4 tryptofany: 211, 218, 228, 273

2.2.2.2. Značení CK dansylchloridem



Obr.8 Dansylchlorid

Dansylchlorid (DNCl, obr.8) je prvním vhodným akceptorem emise Trp zbytků.

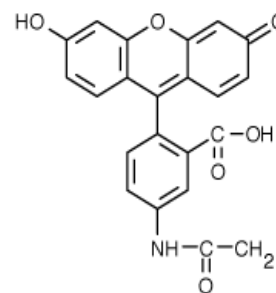
V prvním kroku značení jsem reverzibilně přikryla cysteiny (Cys), abych zamezila navázání DNCl na aktivní místa Cys zbytků a zachovala tak funkčnost CK. 100 μM CK reagovalo se 100-násobným molárním nadbytkem tetrathionátu sodného (TTNa). Výsledný objem 1,2 ml odpovídal 30 μM CK. CK s TTNa

byla inkubována 10 minut při pokojové teplotě. Následně jsem přidala ve 20-násobném molárním nadbytku DNCl a nechala inkubovat ve tmě 2 hodiny na ledu v lednici. Přičemž jsem každých 10 minut 5-krát obrátila mikrozkušavku se vzorkem, abych měla jistotu, že se DNCl dobře naváže na všechny dostupné lyziny. Po 2 hodinové inkubaci jsem označenou CK promyla redukčním roztokem (roztok B, viz příloha 7.2.8.) s použitím filtrace (centrikon „cut-off 30“) při otáčkách 6000 rpm. Následkem toho došlo k redukci Cys zbytků, které byly původně oxidovány TTNa. Značenou CK jsem 3-krát promyla, doplnila redukčním roztokem a nechala přes noc inkubovat v lednici na ledu. Následující den jsem vzorek ještě 2-krát promyla a doplnila na výslednou koncentraci 30 μM CK. Výsledkem byla značená CK pro použití k následujícím měření (viz příloha 7.2.8.).

2.2.2.3. Značení CK pomocí IAF

5-iodoacetamid fluorescein (5-IAF, Molecular Probes Inc. Oregon, obr.9) je dalším vhodným akceptorem emise Trp zbytků.

5-IAF se specificky váže na Cys zbytky. Monomer CK obsahuje 4 Cys zbytky a jeden z nich v poloze 283 je aktivním místem. Proto jsme se rozhodli zcela empiricky vyzkoušet, zda jejich redukce umožní současně ochranu aktivního místa a navázání 5-IAF na volný Cys zbytek. Opět jsem tedy zredukovala Cys zbytky na molekule CK, inkubací 167 μM CK se 100-



Obr.9 5-iodoacetamidofluorescein (5-IAF)

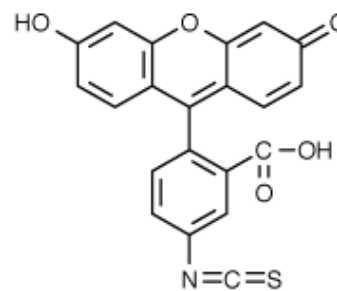
násobným molárním nadbytkem TTNa, po dobu 10 min při pokojové teplotě. Po zakrytí Cys zbytků reagovala 50 μM CK s 2-násobným molárním nadbytkem 5-IAF 2 hodiny ve tmě, při pokojové teplotě na kolébce. Po 2hod inkubaci CK s 5-IAF jsem nenavázaný fluorescein odstranila promytím redukčním roztokem (roztokem C, viz příloha 7.2.9.) s použitím filtrace (centrikon „cut-off 30“) při otáčkách 6000 rpm a zredukovala tak oxidované Cys zbytky. Značenou CK jsem doplnila redukčním roztokem a nechala přes noc inkubovat v lednici na ledu. Následující den jsem vzorek ještě 4-krát promyla roztokem C (viz příloha 7.2.9.) a doplnila na výslednou koncentraci 50 μM CK. Výsledkem byla naznačená CK pro použití k následujícím měření (viz příloha 7.2.9.).

2.2.2.4. Značení CK pomocí FITC

Posledním použitým akceptorem Trp fluorescence je fluorescein-5-isothiocyanate (FITC, Molecular Probes Inc. Oregon, obr.10).

FITC se váže specificky na Lys zbytky, a proto nebylo nutné redukovat Cys zbytky k zachování aktivity CK. 116 μ M CK reagovala s 193 μ M FITC 4 hodiny ve tmě, při pokojové teplotě. Vzorek byl po celou dobu umístěn na kolébce. Po 4-hodinové inkubaci CK s FITC,

jsem nenavázaný fluorescein odseparovala promytím roztoku B (viz příloha 7.2.10.) s použitím filtrace (centrikon „cut-off 30“) při otáčkách 6000 rpm. Značenou CK jsem 4-krát promyla roztokem B (viz příloha 7.2.10.) a doplnila na výslednou koncentraci 50 μ M CK. Výsledkem byla značená CK pro použití k následujícím měření (viz příloha 7.2.10.).



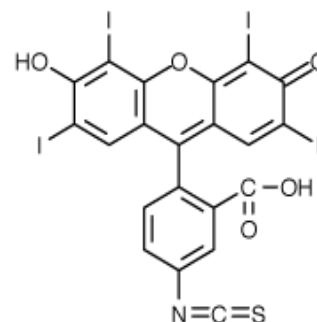
Obr.10 Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC)

2.2.2.5. Dvojitý značení CK pomocí IAF a ErITC

Při tomto způsobu značení jsem jako donor použila 5-IAF (obr.9) a jako akceptor erythrosin-5-isothiocyanate (ErITC, Molecular Probes Inc. Oregon, obr.11). Prvním krokem bylo naznačení CK donorem (5-IAF) a po jeho navázání, jsem CK naznačila akceptorem (ErITC).

Nejprve jsem opět zredukovala Cys zbytky na molekule CK, kdy 167 μ M CK reagovala se 100-násobným molárním nadbytkem TTNa, abych zachovala aktivní místa na CK. Inkubace s TTNa trvala 10min při pokojové teplotě. Po zakrytí cysteinů reagovala 50 μ M

CK s 2-násobným molárním nadbytkem 5-IAF 2 hodiny ve tmě, při pokojové teplotě. Vzorek byl umístěn na kolébce. Po 2hod inkubaci CK s 5-IAF jsem nenavázaný fluorescein odstranila promytím roztokem B (viz příloha 7.2.11.) s použitím filtrace (centrikon „cut-off 30“) při otáčkách 6000 rpm. Po odmytí volného (nenavázaného) 5-IAF, 50 μ M CK reagovala se 70 μ M ErITC ve tmě na kolébce při pokojové teplotě po dobu 4



Obr.11 Erythrosin-5-isothiocyanate (ErITC)

hodin. Po 4-hodinové inkubaci jsem nenavázaný ErITC odstranila promytím redukčním roztokem C (viz příloha 7.2.11.) s použitím filtrace (centrikon „cut-off 30“) při otáčkách 6000 rpm. CK byla přes noc v lednici v roztoku C (viz příloha 7.2.11.) a tak byly původně zredukované Cys zbytky zpět oxidovány DTT. Následující den jsem CK převedla do roztoku D (viz příloha 7.2.11.) 4-násobným použitím filtrace (centrikon „cut-off 30“) při otáčkách 6000 rpm a doplnila na koncentraci 50 μM CK. Výsledkem byla naznačená CK pro použití k následujícím měření (viz příloha 7.2.11.).

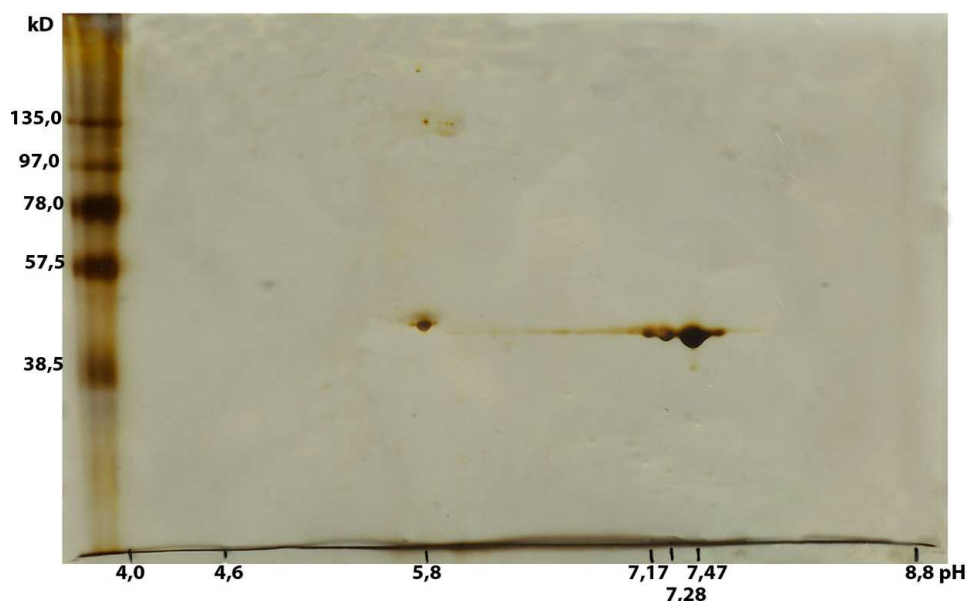
2.2.2.6. Dvojitý značení CK pomocí FITC a ErITC

Při tomto způsobu značení jsem použila jako donor FITC a jako akceptor ErITC. Nebylo nutné redukovat Cys zbytky k zachování aktivity CK, protože FITC se váže na Lys. 116 μM CK reagovala s 193 μM FITC 4 hodiny ve tmě, při pokojové teplotě. Vzorek byl po celou dobu umístěn na kolébce. Po 4hod inkubaci CK s FITC jsem nenavázaný fluorescein odseparovala promytím roztoku B (viz příloha 7.2.12.) s použitím filtrace (centrikon „cut-off 30“) při otáčkách 6000 rpm. Po odmytí volného (nenavázaného) FITC, 50 μM CK reagovala s 96 μM ErITC ve tmě na kolébce při pokojové teplotě po dobu 4 hodin. Po 4-hodinové inkubaci byl nenavázaný ErITC odseparován promytím roztoku B (viz příloha 7.2.12.) s použitím filtrace (centrikon „cut-off 30“) při otáčkách 6000 rpm. Značenou CK jsem ještě 4-krát promyla roztokem B (viz příloha 7.2.12.) a doplnila na výslednou koncentraci 50 μM CK. Výsledkem byla značená CK pro použití k následujícím měření (viz příloha 7.2.12.).

3. VÝSLEDKY

3.1. Purifikace myofibrilární CK

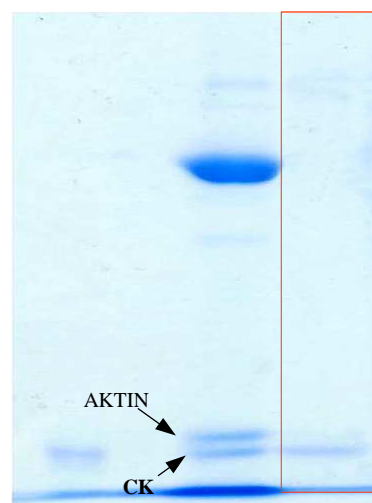
MM-CK byla purifikována pomocí nízkoiontového media z m. psoas (viz metodika, příloha 7.2.1., ad 1), postupně ultrafiltrací a ultracentrifugací (viz metodika). Proteiny z čisté myofibrilární frakce byly uvolňovány pomocí kapalinové chromatografie, lineárním růstem koncentrace soli v elučním pufru při pH 8,7. V rozsahu 10-40 mS byly postupně separovány veškeré proteiny čisté myofibrilární frakce. Eluční čas, kdy se začaly uvolňovat proteiny, byl 10 minut, při průtoku 1 ml/min (viz příloha 7.2.2., kapitola metodika). Jednotlivé frakce z kapalinové chromatografie byly následně zahuštěny na mikrokonech „cut off 30“ na minimální objem přibližně 10 µl a takto zahuštěné vzorky byly puštěny na SDS-elektroforézu, Mini Protean II (viz metodika). Frakce z kapalinové chromatografie, která se jevila jako čistá CK, byla následně dvourozměrně rozdělena podle



Obr.1 Frakce z kapalinové chromatografie, která se na SDS-elektroforéze, Mini Protean II jevila jako čistá CK, byla následně rozdělena na 2D-elektroforéze. Byly detekovány 3 různé izoformy CK s izoelektrickými body v pH 7,17, 7,28 a 7,47. Zároveň byla detekována přítomnost dalšího proteinu stejné molekulové hmotnosti jako CK (43 kDa). Pozdější výsledky ukázaly, že se jedná o aktin. (Malacova et al., 2004; viz příloha 7.3.1.).

izoelektrického bodu. Na 2D-elektroforéze (obr.1) byly detekovány tři různé izoformy CK s izoelektrickými body v pH 7,17, 7,28 a 7,47 (Malacova et al., 2004; viz příloha 7.3.1.). Zároveň byla detekována přítomnost dalšího proteinu stejné molekulové hmotnosti jako CK. Tato molekulová hmotnost odpovídá též aktinu. Protože 2D-elektroforéza ukázala přítomnost 2 proteinů ve frakci, která se na Mini Protean II jevila jako čistá CK, bylo nutné

změnit eluční profil na kapalinové chromatografii. Eluční pufr byl změněn na pH 9 a v rozsahu 5-62 mS byly postupně separovány veškeré proteiny čisté myofibrilární frakce. Eluční čas, kdy se uvolňovaly proteiny, byl 12 minut, při průtoku 1 ml/1 min. Jednotlivé frakce byly opět zahuštěny na mikrokonech „cut off 30“ na minimální objem přibližně 10 µl a takto zahuštěné vzorky byly puštěny na SDS-elektroforézu, Mini Protean II (viz metodika). Frakce č.17 obsahovala 2 proteiny což potvrdila i detekce na SDS-elektroforéze (obr.2, Hoefer SE 600, 10% dělicí gel). Tyto 2 proteiny byly pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovány jako aktin (obr.3, pokrytí sekvence 45%) a CK (obr.4, pokrytí sekvence 58%). Ve frakci č.16 byla získána čistá CK s molekulovou hmotností 43 kDa a specifickou enzymatickou aktivitou 82,35 IU/mg.



Obr.2 Pomocí SDS-elektroforézy, Hoefer SE 600 a při změněných elučních podmínkách, byly rozděleny aktin a CK (frakce 17). Frakce 16 odpovídala čisté CK a ST je standard komerční CK.

Pro vyhodnocení výsledků na Maldi-Tof, byl použit program Mascot. Bylo hledáno proti databázi NCB/nr a tolerance byla 0,7 Da.

MCDEDETTALVCDNGSGLVK**AGFAGDDAPRAVFP**SIVGRPR**HQGMVGMGQKDSYVGDEAQ**
SKRGILTLKYPIEHGIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREKMTQIM
FETFNVPAMYVAIQAVLSLYASGRTTGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMRLDLAGR**DLTD**
YLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEKLCYVALDJENEMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGN
ERFRCPETLFQPSFIGMESAGIHETTYSIMKCDIDIR**KDLYANNVMSGGTTMYPGIADRMQKE**
ITALAPSTMKIKI**HAPPERK**YSVWIGGSILASLSTFQQMWITK**QEYDEAGPSIVHRKCF**

Obr.3 Hodnoceno na základě 18 hodnot m/z. Pokrytí sekvence 45% odpovídá aktinu

MPFGNTHNKFKLNYKSQEEY**PDLSKHNNHMAKVLT**PDLYNKLRDKETPSGFTLDDVIQTGVNDP
GHPFIMTVGCVAGDEESYTVFK**DLFDPIHQDRHG**GFKPTDKHKTDLNHENLKGDDLDPNYVLSS
RVRTGRSIK**GYTLPPHCSR**GERRAVEKLSVEALNSLTGEFKGKYYP**PLKSMTEQEQQQLIDHFLF**
DKPVSPLLLASGMARDWPDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLR**VISMEKGGNMKEVFRRCVGL**
QKIEEIFKKAGHPFMWNEHLGYVLTCPSNLGTGLRGGVHVVKLANLSKHPK**FEEILTRLRLQKRG**
TGGVDTAAVGA**VFDISNADRLGSSEVEQVQLVVDG**VKLMVEMEK**KLEKQSIDDMIPAQK**

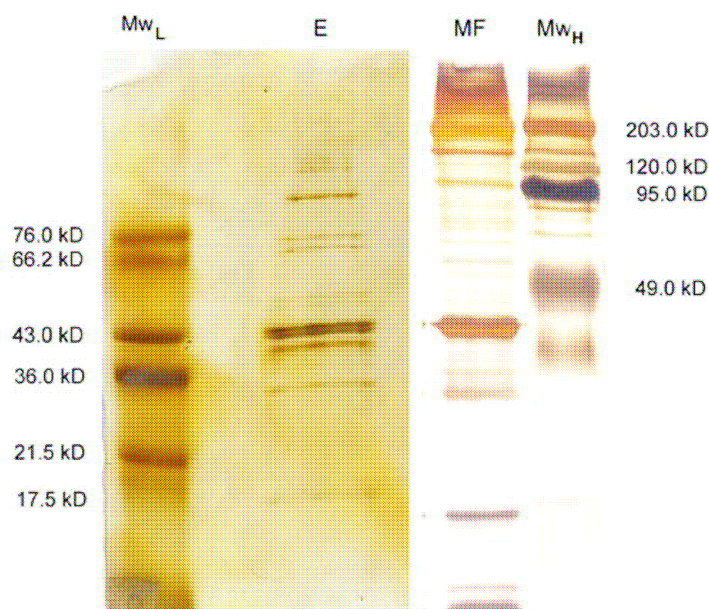
Obr.4 Hodnoceno na základě 24 hodnot m/z. Pokrytí sekvence je 58% a molekulová hmotnost 43 kDa odpovídá CK.

3.2. Charakterizace myofibril

Pro experiment výměny CK v M-linii sarkomery byly purifikované myofibrily standardizovány následujícími kroky.

Prvním bylo ověření zda neobsahují substráty CK, neboť jejich vliv jsme chtěli měřit. Absence ATP, ADP, PCr a Cr, byla potvrzena enzymatickými metodami v obou preparacích (viz metodika). Jako druhá byla potvrzena jejich schopnost kontrakce změněním délky sarkomery. Relaxované myofibrily měly délku $2.1 \pm 0.2 \mu\text{m}$ a po kontrakci vyvolané 5 mM ATP a 7 mM CaCl_2 se zkrátily na $1.6 \pm 0.12 \mu\text{m}$. Třetí charakteristikou byla specifická enzymatická aktivita CK určená pro „intaktní“ a „eluované“ myofibrily 0.4 ± 0.02 IU/mg proteinu a 0.01 ± 0.008 IU/mg proteinu v uvedeném pořadí.

SDS-PAGE separace proteinů eluovaných myofibril ukázala, že eluce nízkointovým médiem odstranila z myofibril nejen pouze CK (43 kDa), ale též vymyla proteiny o vyšší molekulové hmotnosti (120, 80, 70 kDa) a nižší molekulové hmotnosti než 43 kDa (obr.5). Eluce významně změnila chování myofibril ve výměnném experimentu. Měření pohybu molekul CK metodou FLIP prokázalo ireverzibilní vazbu CK-IAF (bez substrátů) oproti intaktním myofibrilám. Proto byly „eluované“ myofibrily vyřazeny z dalšího měření.

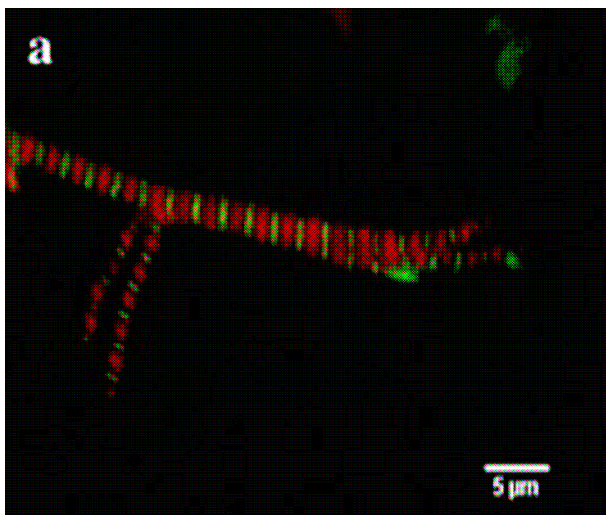


Obr.5 Proteinové profily „intaktních“ myofibril (MF) a supernatantu eluovaného z myofibril použitím nízkointového media (E). (MwL) Nízko-molekulární standard, (MwH) vysokomolekulární standard (Zurmanova et al., 2007, viz příloha 7.3.3.).

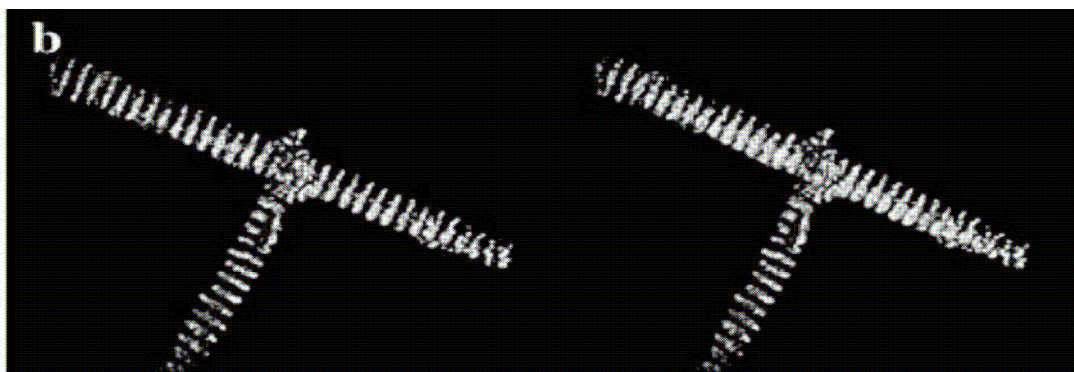
3.3. Vazba CK-IAF v M-linii izolovaných myofibril

Místo vazby CK-IAF na myofibrilách bylo detekováno pomocí konfokální mikroskopie. Červeně jsou obarvená aktinová vlákna v oblasti I-pruhu a zeleně CK-IAF. Střídání zelených a červených pruhů potvrzuje vazbu CK mezi dvěma I-pruhy (obr.6).

Nespecifická adheze CK-IAF molekul a jejich axiální distribuce v lumen myofibril (které by mohlo ovlivnit měření FLIP), byly vyloučeny pomocí xyz projekce a následné 3D rekonstrukce dat. Výsledná vizualizace CK-IAF pomocí konfokálního mikroskopu ukázala „disky“ z CK-IAF molekul asociovaných v M-linii bez penetrace v axiálním směru (obr.7). Tento výsledek nám umožnil studovat výměnu CK-IAF molekuly v reálném čase v planárním systému souřadnic xy.



Obr.6 Lokalizace CK-IAF v M-linii myofibrily vizualizované konfokální mikroskopií. Phalloidin-Alexa 633 (červené pruhy) značí aktinová filamenta uvnitř I-pruhu a zelené pruhy označují CK-IAF v M-linii (Zurmanova et al., 2007; viz příloha 7.3.3.).



Obr.7 3D rekonstrukce CK-IAF asociované v M-linii izolovaných myofibril, kde je patrná vazba CK v M-linii bez axiální distribuce (Zurmanova et al., 2007; viz příloha 7.3.3.).

3.4. Měření FLIP

Výsledky prezentované v grafu (obr.8) ukazují slabou, ale specifickou interakci CK-IAF bez přítomnosti

substrátů v M-linii. Tato vazba se významně liší ($P < 0.05$) od kontroly vybělení (Phalloidin-FITC konjugát pevně vázán v I-pruhu), jejíž fluorescence poklesla o 40% v 67 sekundě

FLIP

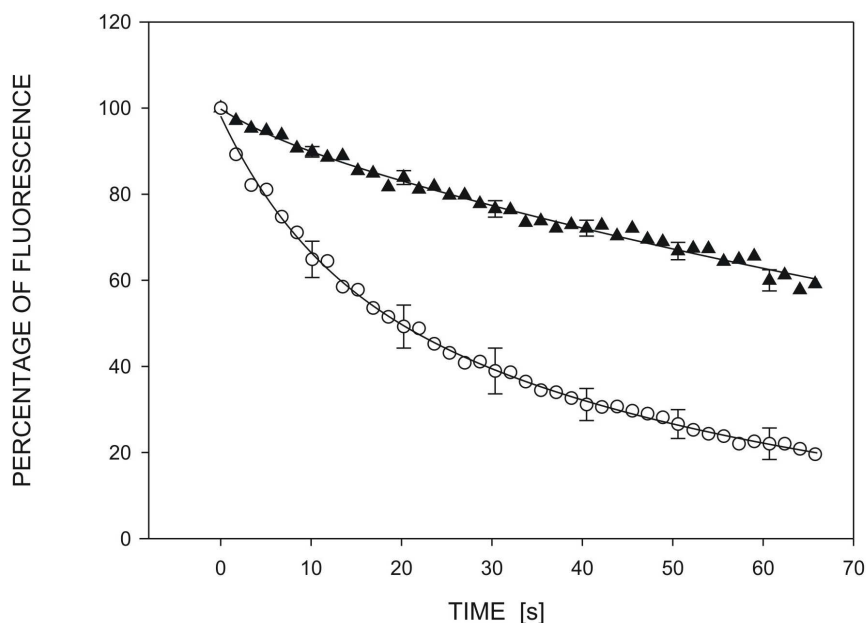
experimentu,

přičemž derivace v 5-té sekundě

byla rovna -0.96

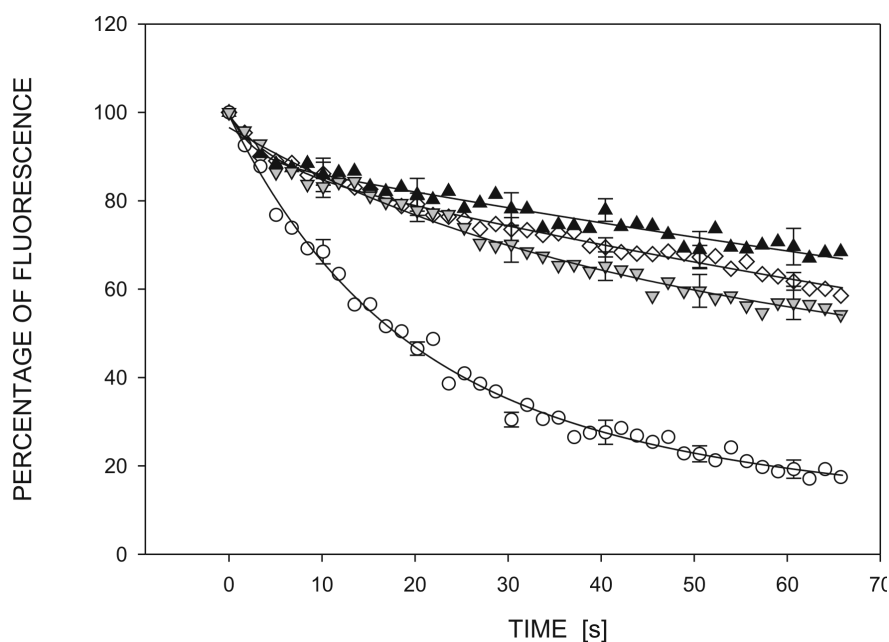
(viz metoda). Tyto dvě charakteristické hodnoty úbytku fluorescence byly porovnány v oblasti M-linie, I-pruhu a blízkém okolí. Intenzita fluorescence CK-IAF (bez substrátů) poklesla o 80% a derivace dosáhla hodnoty -3.08 , což jsou významně odlišné hodnoty od Phalloidin – FITC kontroly bělení. Intenzity fluorescence v I-pruhu a okolí byly velmi nízké a identické.

CK-IAF (v přítomnosti substrátů) vykazovala velmi pomalý pokles fluorescence v průběhu celého experimentu (obr.9). Tento pokles není významně odlišný od kontroly vybělení, avšak liší se ($P < 0.05$) od signálu CK-IAF (bez substrátů). Jednotlivé hodnoty derivace/pokles pro CK-IAF s navázanými jednotlivými substráty jsou následující: ATP: $-1.30/16\%$, PCr: $-1.10/46\%$, ATP-Cr: $-0.95/33\%$. Příslušné hodnoty pro ADP (nejsou v obr.9) jsou $0.98/25\%$. Mezi jednotlivými substráty nejsou významné rozdíly. V tomto ohledu se derivace pohybuje v rozmezí -0.95 až -1.30 s následujícími poklesy intenzity fluorescence od 16% do 46%.



Obr.8 Úbytek fluorescenční intenzity ze dvou kompartmentů, které reprezentují následující rychlosti pohybu značených molekul CK, které byly vyhodnoceny v časové závislosti pomocí FLIP metody. Hodnoty jsou vyjádřeny \pm S.E.M. ($n = 6$, počet preparací myofibril) a reprezentují: Phalloidin- FITC konjugát pevně vázán v I bandu jako kontrola vybělení (▲), CK-IAF (bez substrátů) asociované v M-linii (○). Rychlost výměny CK-IAF (bez substrátů) molekule významně liší od kontroly vybělení ($P < 0.05$) (Zurmanova et al., 2007; viz příloha 7.3.3.).

Pokles intenzity fluorescence pro CK-IAF (bez substrátů) byl opakovaně měřen jako kontrola ke skupině CK-IAF se substráty (obr.9) a dosahovali hodnot - 3.26/82%. Obě skupiny měření (obr 8, 9) se významně neliší ($P < 0.05$).



Obr.9 Pokles intenzity fluorescence v M-linii sarkomery, který odpovídá výměně molekul CK-IAF v čase, měřený metodou FLIP. (▲), (◇) a (▼) reprezentují pokles int. fluorescence CK-IAF molekul s navázanými substráty, který se neliší od kontroly (neuvedeno) ($P < 0,05$). (○) reprezentují pokles int. fluorescence CK bez substrátů, který se liší od CK-IAF se substráty ($P < 0,05$). Uvedené hodnoty jsou průměry \pm S.E.M. ($n=6$) (Zurmanova et al., 2007; viz příloha 7.3.3.).

3.5. pH závislost CK-IAF interakce v M-linii

Hodnota pH má velký vliv na interakci CK-IAF s myofibrilami a množství vyměněné CK-IAF v M-linii může být relativně vyjádřeno jako poměr intenzity fluorescence v M-linii a jeho okolí. Hodnoty poměru byly měřeny následujícím způsobem. V kyselém pH (pH 6.8 – 6.9) jsme nepozorovali žádný fluorescenční signál v M-linii v průběhu výměnného experimentu a proto poměr byl 1. V neutrálním pH se objevila výměnná reakce v poměru 2.45 ± 0.15 a dosáhla svého maxima 5.67 ± 1.26 v mírně alkalickém prostředí (pH 7.1 – 7.15). V rozsahu tohoto pH byly následující FLIP experimenty prováděny. V $\text{pH} \geq 7.2$ byl fluorescenční signál v M-linii slabý nebo žádný a poměr klesl na 1.2 ± 0.02 .

3.6. Měření konformačních změn CK

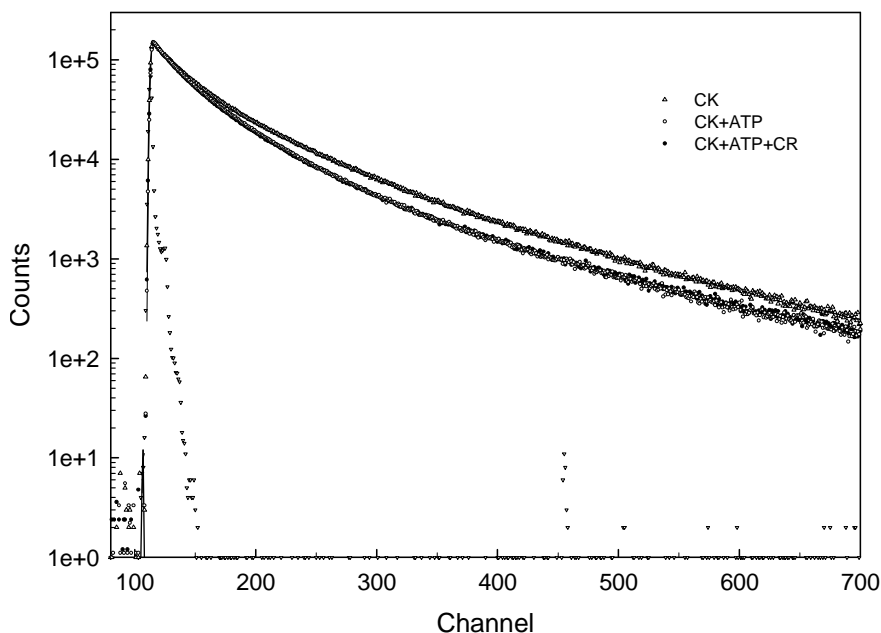
Za účelem shromáždit experimentální data týkající se konformačních změn CK odpovídající třem různým stavům: CK bez substrátů, CK s jedním substrátem (ATP) a CK se dvěma substráty (ATP+Cr), jsme sledovali emisi vnitřních Trp zbytků, stejně jako fluorescenci CK značené DC, FITC, IAF, FITC+ErITC a IAF+ErITC pomocí steady-state a časově rozlišených fluorescenčních metod.

3.6.1. Neznačená CK

Specifická enzymatická aktivita pro neznačenou CK, byla pro následující fluorescenční experimenty 250 IU/mg proteinu.

3.6.1.1 Střední doby života

Monomer CK obsahuje 4 vnitřní Trp zbytky, které jsou všechny lokalizované na velké doméně (viz. obr.3, viz metodika). Trp absorbují při 280 nm a jejich emise je v oblasti 350 nm. Následující poklesy fluorescence pro tři různé konformační stavy jsou shrnuty na obr.10



(Hornikova et al., 2008; viz příloha

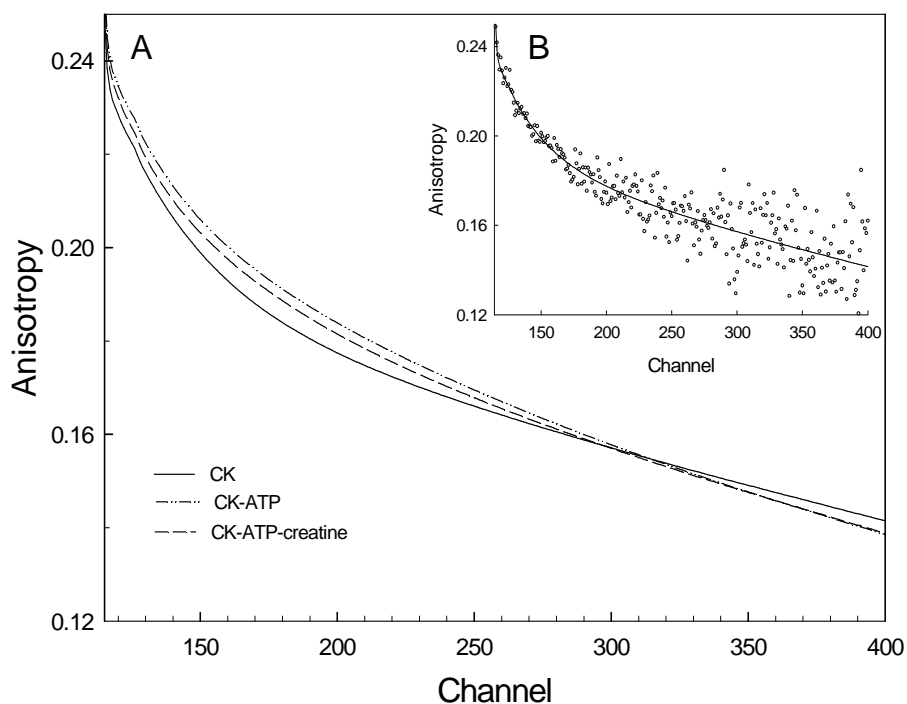
Obr.10 Efekt ATP and Cr na dohasínání Trp fluorescence CK molekuly; (p) – neznačená CK, (■) – CK s 5 mM ATP, (★) – CK s 5 mM ATP and 5 mM Cr, (σ) – přístrojová odezva. Časová stupnice se rovná 0.037 ns/channel (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.).

7.3.4.). Všechny vzorky vykazovaly komplexně multikomponentní pokles fluorescence. Experimentální hodnoty obr.10 ukazují, že fluorescenční střední doby života CK se signifikantně zkracují v závislosti na dodávce ATP. To jasně ukazuje na konformační změnu indukovanou vazbou substrátu, která ovlivnila změnu okolí Trp zbytků. Následná vazba Cr ke CK-ATP způsobilo mírný nárůst střední doby života. Konkrétní data ukázala, že střední doby života vnitřích Trp zbytků jsou 2.72, 2.38 a 2.42 ns pro CK, CK-ATP a CK-ATP+Cr. Střední chyba průměru těchto hodnot je ± 0.05 ns.

3.6.1.2. Časově rozlišná fluorescenční anizotropie (steady state)

Pokles anizotropie jsme použili jako další ukazatel konformační změny CK po navázání ligandu. Obr.11A (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.) ukazuje srovnání poklesu emise

anizotropie pro CK bez ligandů (plná čára), v přítomnosti 5 mM ATP (tečkovaná čára) a současně přítomnost 5 mM ATP a 5 mM Cr (čárkovaná čára). Křivky reprezentují nejlepší



Obr.11 Srovnání křivek dohasínání anizotropie fluorescence tryptofanu CK molekuly bez a s navázanými substráty. **A** – fit dohasínání anizotropie samotné CK (plná čára), CK s 5 mM ATP (tečkovaná čára), and CK v přítomnosti 5 mM ATP and 5 mM Cr (čérchovaná čára); **B** - příklad experimentálního dohasínání anizotropie nezačené CK. Časová stupnice se rovná 0.037 ns / channel (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.).

proložení dat. Pro přehlednost jsou experimentální hodnoty vynechány. Kvalita experimentálních dat a hustota experimentálních bodů ej ukázáno na obr.11B (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.), který popisuje pokles anizotropie CK bez substrátů. Při pohledu na obr.11A je zřejmé, že křivky mají odlišné charakteristiky poklesu anizotropie.

Toto pozorování je v souladu s hypotézou rozdílných konformačních změn, které CK získává v nepřítomnosti či přítomnosti substrátů. Výsledky nelineární analýzy nejmenších čtverců jsou shrnuty v Tab.1 (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.). Dlouhé korelační

Sample	β_1	ϕ_1 (ns)	β_2	ϕ_2 (ns)
CK	0.05	1.2	0.19	35
CK-ATP	0.04	1.1	0.20	27
CK-ATP-Cr	0.04	1.1	0.20	29

Tab.1 Dohasínání anizotropie fluorescence trp zbytků CK molekuly. Tři CK vzorky odpovídají třem různým konformačním stavům molekuly CK: CK, CK-ATP a CK-ATP+Cr. β - amplituda, ϕ - rotační korelační čas (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.).

konformačním přechodem CK molekuly. Tab. 1 ukazuje, že samotná CK vykazuje nejkratší depolarizaci $\phi_2 = 35$ ns. Tento výsledek odpovídá představě „open“ inaktivní konformace CK bez navázaných substrátů. Nejmenší $\phi_2 = 27$ ns byla naměřena pro CK – ATP a mírný návrat k delší $\phi_2 = 29$ ns pro CK – ATP+Cr komplex, což svědčí o jejich „closed“ a „intermediary“ konformaci vzhledem k samotné CK.

časy ϕ_2 , charakterizující celkovou rotaci biopolymeru, závisí převážně na molekulové hmotnosti proteinu, jeho tvaru a viskozitě solventu. Vzhledem k tomu, že molekulová hmotnost ligandů (ATP = 551 Da, Cr = 131 Da) je zanedbatelná vzhledem k hmotnosti proteinu (86000 Da), můžeme přiřadit změny ve ϕ_2 hydrodynamickým parametrům indukovaným

3.6.1.3. Zhášení fluorescence akrylamidem

Ke koliznímu zhášení dochází, když je excitovaný fluorofor nezáživě deaktivovaný kontaktem s molekulou zhášedla. Akrylamid (elektron postrádající molekula) byl jako účinný zhášeč. Mechanismus zhášení je pravděpodobně založen na přenosu elektronu

Sample	K_{SV} (M^{-1})	$\bar{\tau}$ (ns)	k_q ($M^{-1}s^{-1}$)
CK	5.52	2.72	1.9×10^9
CK-ATP	4.97	2.38	2.1×10^9
CK-ATP-Cr	4.72	2.42	2.0×10^9

Tab.2 Naměřené hodnoty zhášení fluorescence Trp akrylamidem (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.).

odpovídá dostupnosti vnitřních Trp zbytků pro zhášeč, který závisí na přítomnosti

z Trp na akrylamid (Brochon, 1994), jehož přenos je ovlivňován prostředím. Výsledky zhášení jsou prezentovány v Tab.2 a obr.12 (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.). Různý sklon Stern-Volmerova vynesení (obr.12)

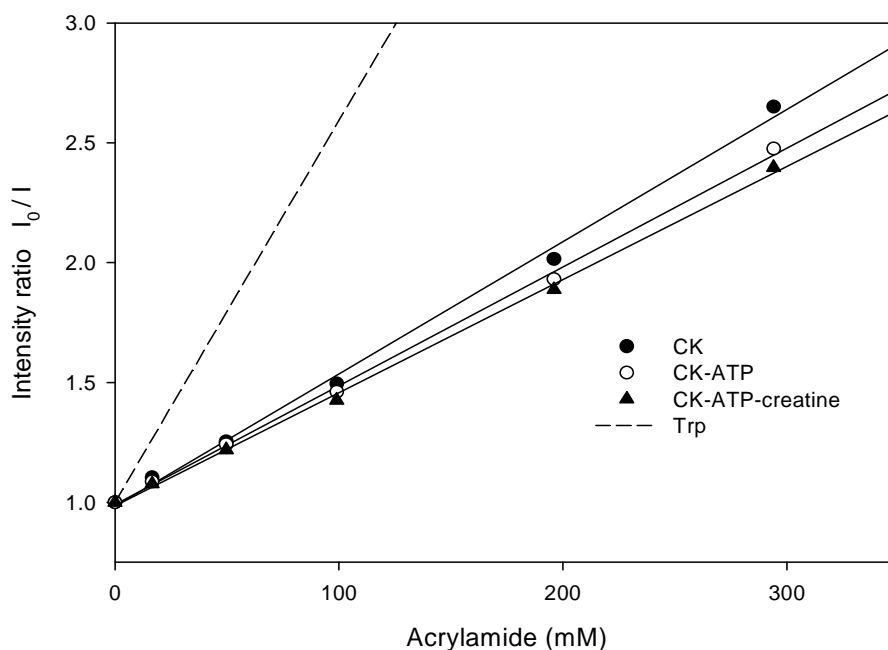
substrátů enzymu. Srovnáním se zhášením volných Trp v pufru indikuje, že všechny Trp zbytky v CK

jsou značně značně chráněné od rozpouštědla. Bimolekulární konstanta zhášení k_q odráží účinnost zhášení.

Výsledky uvedené v Tab.2 ukazují, že účinnost zhášení je největší u samotné CK. To odpovídá

rozvolněné

strukturu CK molekuly s vysokou permeabilitou pro akrylamid. CK-ATP komplex vykazuje nejnižší dostupnost Trp zbytku pro zhášeč, což odpovídá kompaktní strukturu CK molekuly. Komplex CK-ATP+Cr prokazuje střední účinnost zhášení. Závěrem lze říci, že výsledky zhášení jsou zcela v souladu s výsledky fluorescenční anizotropie a podporují rozdílnou strukturální konformaci CK molekuly v přítomnosti různých substrátů konkrétně „open“ konformaci bez navázaných substrátů, „closed“ konformaci s navázaným ATP a „intermediary“ konformaci s navázanými dvěma substráty ATP+Cr.

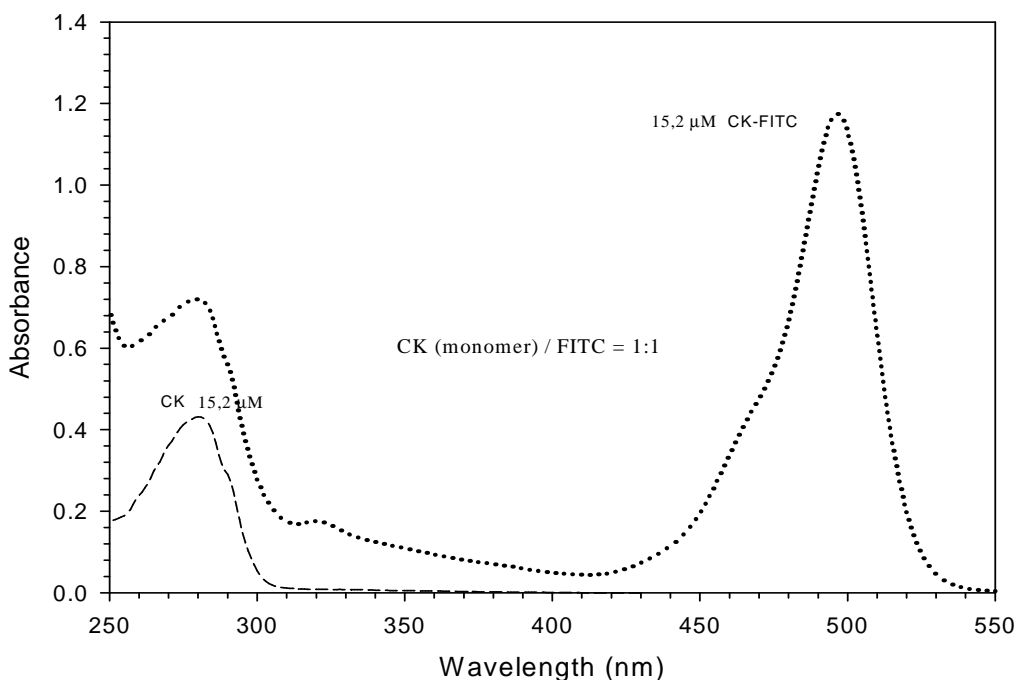


Obr.12 Akrylamidové zhášení fluorescence tryptofanů. Stern-Volmer plot pro samotnou CK (●), CK s ATP (○) a CK s ATP+Cr(▲). Pro srovnání we included fluorescence quenching of free tryptophan in an aqueous solution (dashed line). Zhášení bylo vypočítáno assuming the mean fluorescence lifetime of 2.7 ns and the bimolecular quenching constant of Trp by acrylamide $k_q=5.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Efting and Ghiron, 1976; **Hornikova et al., 2008**; viz příloha 7.3.4.).

3.6.2. CK značená pomocí FITC

Za účelem ověření výsledků získaných pomocí Trp fluorescence, jsme provedli experiment stanovení anizotropie u CK značené FITC (CK-FITC). Pro potvrzení, že značení nepoškodilo CK strukturu, jsme změřili specifickou enzymatickou aktivitu CK, které odpovídala 50 IU/mg.

Absorbance značené CK při 494 nm odpovídá poměru značení 1:1 při známé koncentraci 15.2 μM CK a CK-FITC (obr.13).

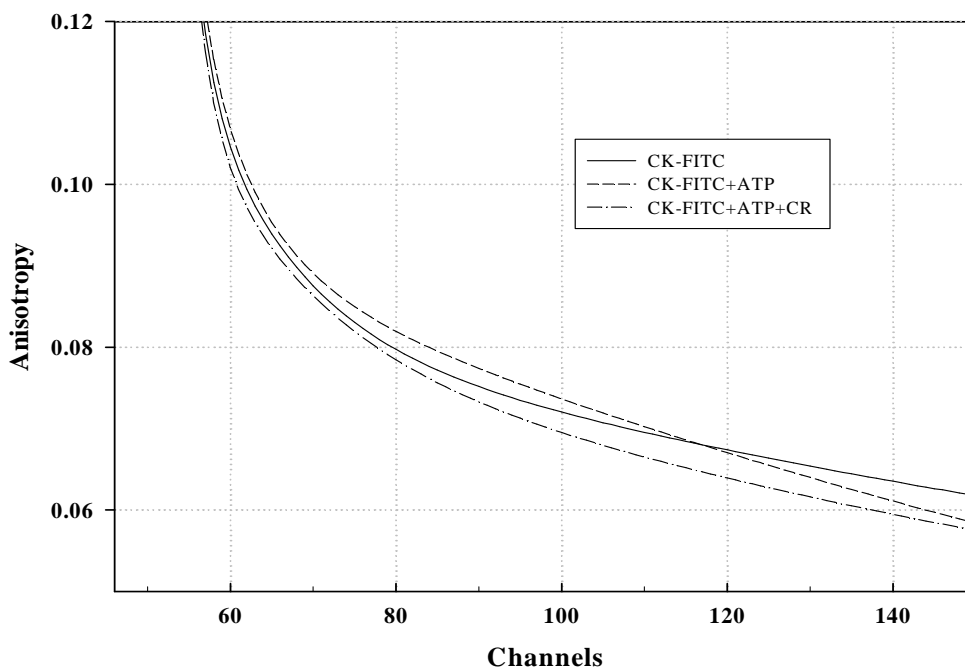


Obr.13 Měření absorbance CK (čárkovaná křivka) a CK-IAF (tečkovaná křivka) o známé koncentraci a zjištění poměru zastoupení CK:IAF = 1:1. (Horníková - nepublikovaný výsledek)

Výsledky fluorescenční anizotropie jsou shrnuty v Tab.3 a obr.14. Důležité je, že nejdelší korelační čas odpovídající 34 ns byl pro samotnou CK, a následující dva 27 a 30 ns patřily k CK-ATP a CK-ATP+Cr v uvedeném pořadí. Pokles anizotropie a tři korelačních časů jsou v nádherné shodě získané emisí Trp zbytků neznačené CK. Uvedená data ukazují, že předchozí inaktivní a otevřená struktura CK se stává více kompaktní po vazbě ATP a formace inaktivního komplexu CK-ATP+Cr způsobuje částečné rozvolnění této sevřené struktury.

Sample	β_1	ϕ_1 (ns)	β_2	ϕ_2 (ns)	β_3	ϕ_3 (ns)
CK	0.17	0.12	0.05	1.1	0.08	34
CK-ATP	0.15	0.15	0.06	1.0	0.09	27
CK-ATP-CR	0.17	0.15	0.05	1.4	0.08	30

Tab.3 Dohasínání anizotropie fluorescence FITC navázaným na CK. CK vzorky jsou stejné jako v tab.1. (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4.).

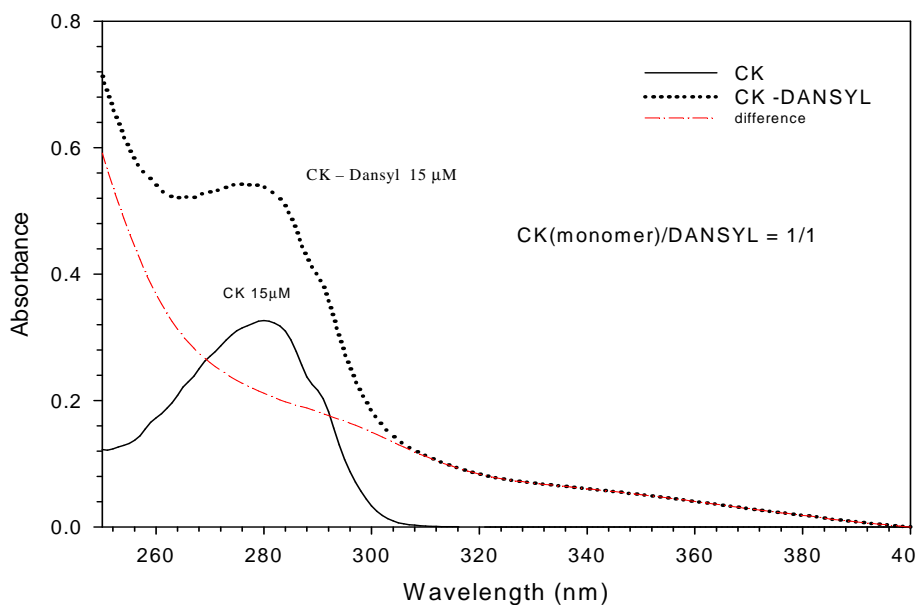


Obr.14 Fitované křivky dohasínání anizotropie fluorescence FITC. (Horníková - nepublikovaný výsledek)

3.6.3. CK značená dansylchloridem

Pro potvrzení hypotézy a ověření Trp fluorescence jsme také měřili značenou CK pomocí DNCl.

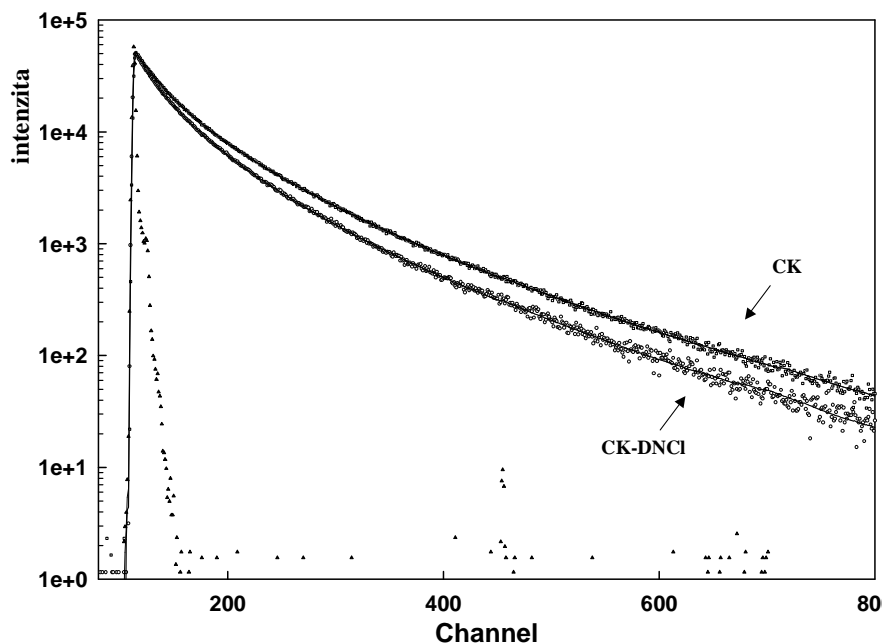
Specifická enzymatická aktivita CK dosáhla hodnoty 40 IU/mg, což odpovídá neporušené struktuře značením. Aby se daly dobře měřit konformační změny pomocí



Obr.15 Měření absorbance CK (plná křivka) a CK-DNCl (tečkovaná křivka) o známé koncentraci a zjištění poměru zastoupení CK:DNCl = 1:1. (Horníková - nepublikovaný výsledek)

FRET, je důležité, aby na 1 monomeru CK byla navázána 1 molekula DNCl. Obr.15 znázorňuje poměr zastoupení CK a DNCl měřené jejich absorbancí. Z proměřených spekter pro čistou CK a CK dansylovanou vyplývá, že na 1 monomeru CK je navázána 1 molekula DNCl. Tento výsledek je dobrý předpoklad pro měření konformačních změn molekuly CK pomocí metody FRET. Na obr.16 můžeme vidět dohasínání intenzity fluorescence Trp zbytků. Můžeme zde sledovat 2 doby života: 1) čisté nedansylované molekuly CK a 2) dansylované CK.

Z těchto křivek jsme mohli vypočítat life-time Trp zbytků pro CK a CK s navázanými substráty Tab.4. Klesl z hodnot, které odpovídají čisté CK (τ (ns) CK) na hodnoty, které odpovídají dansylované CK (τ (ns) CK-



Obr.16 Dohasínání intenzity fluorescence Trp zbytků pro CK a CK-DNCl. (Horníková – nepublikovaný výsledek).

DNCl) a potvrdili nám tak přítomnost rezonančního přenosu - FRET. Ze středních dob života se také vypočítala vzdálenost mezi Trp a DNCl, která činí 2,8 nm. Podle výsledku FRETu můžeme odvodit, že molekula DNCl je navázána na nevhodném místě vzhledem

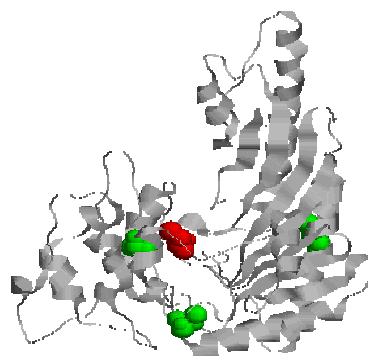
k Trp, tedy ne na malé doméně. Pravděpodobně někde blízko aktivního místa molekuly CK.

sample	τ (ns) CK	τ (ns) CK-DNCl	FRET %
CK	2.72	2.28	16.2
CK-ATP	2.38	1.96	17.2
CK-ATP+CR	2.42	1.97	13.6

Tab.4 Life-time pro čistou CK (1.sloupec) a dansylovanou CK (2.sloupec). Poslední sloupec reprezentuje FRET vyjádřený v procentech. (Malacova et al., 2005; viz příloha 7.3.2.)

3.6.4. CK značená pomocí IAF

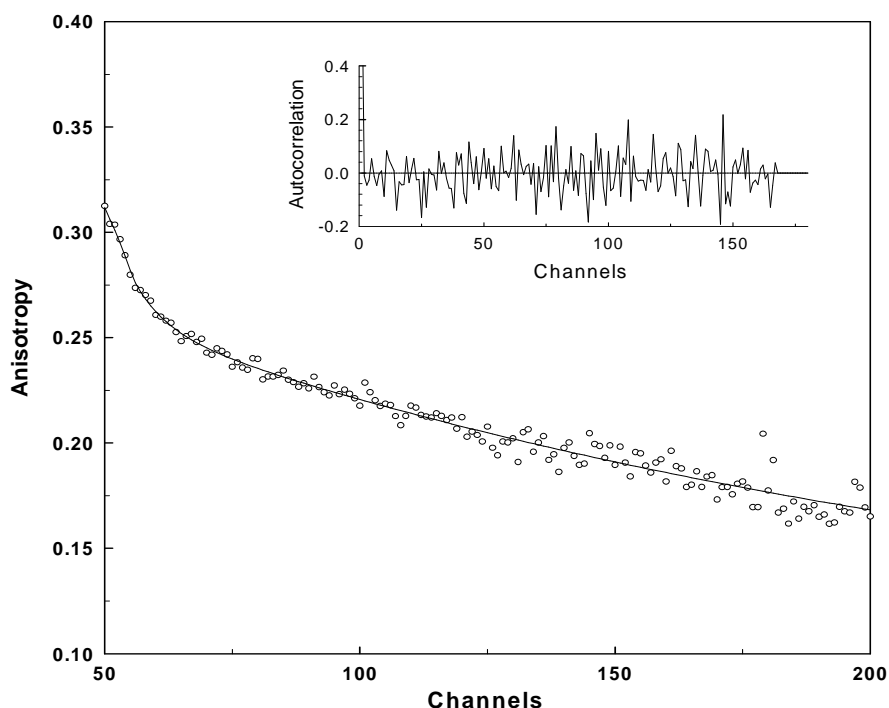
IAF se specificky váže na Cys zbytky. Molekula CK (její monomer) má 4 cys zbytky (obr.17), a jeden z nich v poloze 283 je aktivním místem. Proto jsme se rozhodli zcela empiricky vyzkoušet, zda jejich redukce umožní současně ochranu aktivního místa a navázání IAF na volný Cys zbytek. Zjistili jsme, že i přes redukci cys zbytků se IAF navázal. Pro ověření, zda značení nepoškodilo CK strukturu, jsme změřili specifickou enzymatickou aktivitu CK, které



Obr.17 Monomer CK se 4-mi cysteiny v poloze 74, 146, 254 a 283. Červeně je označen cys 283, který je aktivním místem CK molekuly. (autor obrázku Horníková)

odpovídala 80 IU/mg. Výsledky fluorescenční anizotropie (obr.18) nám dávají pouze jeden rotační korelační čas 37 ns, který reprezentuje rotaci celé molekuly CK. To odpovídá hodnotě určené pomocí fluorescence Trp zbytků, přidání ATP a Cr vedlo s vysokou pravděpodobností

k agregaci. IAF je navázán na velmi kompaktní část makromolekuly CK, takže depolarizace jeho fluorescence je dána převážně rotací molekuly CK jako celku.



Obr.18 Dohasínání anizotropie fluorescence CK označené IAF, $\lambda_{exc}=455$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm, časové rozlišení 0.1 ns/ch. (Horníková – nepublikovaný výsledek).

3.6.5. CK dvojité značená pomocí FITC a ErITC

Pro ověření, zda značení nepoškodilo CK strukturu, jsme změřili specifickou enzymatickou aktivitu CK, které odpovídala pro CK-FITC 50 IU/mg a pro CK-FITC+ErITC byla 15 IU/mg.

Výsledky prezentované v Tab.5 znázorňují přenos energie – lifetime značené CK.

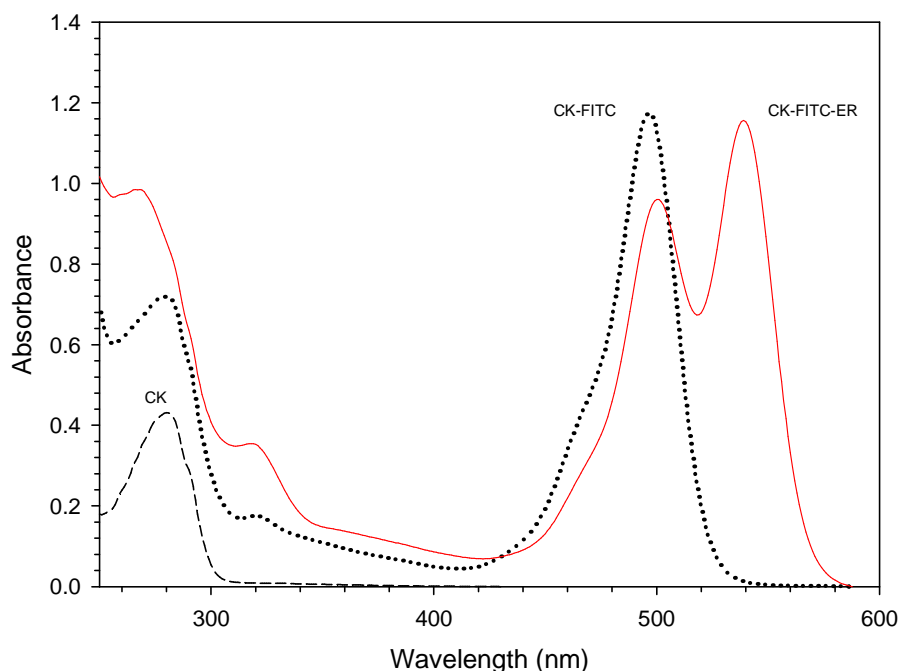
sample	τ (ns)
CK-FITC	3.9
CK-FITC-ErITC	3.6
CK-FITC-ErITC+ATP	3.6
CK-FITC-ErITC+ATP+Cr	3.6

Tab.5 τ (ns) – střední doby života pro jednotlivé stavy CK. Je patrná změna mezi donorem a akceptorem, po přidání substrátu (5mM ATP a 5mM Cr) nedocházelo k žádné změně a proto tato metoda nepřispěla k ověření konformačních změn CK. (Horníková – nepublikovaný výsledek).

Ukazují patrný přenos energie při značení CK donorem a akceptorem. Po navázání substrátů již přenos energie není patrný. Z toho vyplývá, že fluorescenční značky (tedy donor-akceptor) nejsou navázány na vhodném místě molekule CK a tudíž není patrný rozdíl v přenosu energie při změně konformace CK, tzn. při navázání substrátů.

Pro správné měření konformačních změn pomocí FRET, je dobré mít donor a akceptor ve vhodném poměru zastoupení, tedy 1:1. Pro proměření absorbancí CK, CK-FITC a CK-

FITC+ErITC o známé koncentraci byl poměr zastoupení mezi FITC a ErITC byl 1:0.9, tedy ne úplně vhodný. To může mít vliv na negativní výsledky z proměrování FRET.



Obr.19 Měření absorpance CK (čárkovaná křivka), CK-FITC (tečkovaná křivka) a CK-FITC+ErITC (červená křivka) o známé koncentraci. Výpočtem byl zjištěn poměr zastoupení FITC:ErITC = 1:0,9. (Horníková – nepublikovaný výsledek).

3.6.6. CK dvojitě značená pomocí IAF a ErITC

Protože předchozí experimenty ukázaly, že IAF se naváže na CK a nepoškodí strukturu CK, rozhodli jsme se také vyzkoušet použít IAF jako donor a ErITC jako akceptor a změřit konformační změny CK pomocí FRET. Tab.6 znázorňuje přenos energie

sample	τ (ns)
CK-IAF	4.3
CK-IAF-ErITC	3.8
CK-IAF-ErITC+ATP	3.7
CK-IAF-ErITC+ATP+Cr	3.7

Tab.6 τ (ns) – střední doby života pro jednotlivé stavy CK. Je patrná změna mezi donorem a akceptorem, po přidání substrátu (5mM ATP a 5mM Cr) nedocházelo k žádné změně a proto tato metoda nepřispěla k ověření konformačních změn CK (Horníková – nepublikovány výsledky).

– lifetime značené CK. Výsledky ukazují patrný přenos energie při značení CK donorem a akceptorem. Po navázání substrátů již přenos energie není patrný. Z toho vyplývá, že fluorescenční značky (tedy donor-akceptor) nejsou navázány na vhodném místě molekule CK a tudíž není patrný rozdílný přenos energie při změně

konformace CK, tzn. změně vzdálenosti malé a velké domény při navázání substrátů. Také poměr zastoupení donor-akceptor byl nevyhovující, tedy monomer CK byl 14% značen donorem a 44% značen akceptorem.

Pro ověření, zda značení nepoškodilo CK strukturu, jsme změřili specifickou enzymatickou aktivitu CK, které odpovídala 80 IU/mg pro CK-IAF a pro CK-IAF+ErITC byla 22 IU/mg.

4. DISKUZE

Purifikace myofibrilární CK

Čistá myofibrilární frakce obsahuje 40% proteinů z původních 100% v homogenátu. Do pátého cyklu (promytí) proteiny poměrně rychle klesají a od 6. cyklu je úbytek pozvolný a výrazně se nemění. Je zajímavé, že aniž bychom statisticky zjišťovali korelaci poklesu proteinů s aktivitou při stejné proceduře, procentuální aktivita myofibrilární frakce vymýváním klesá obdobným způsobem. Ze 100% aktivity měřené v homogenátu, klesá během prvních 5-ti promytí k 1% a tento úbytek aktivity se dalšími promývacími cykly již prakticky nemění (Gregor et al., 1999).

Přítomnost molekul aktinu v eluátu čistých myofibril, značně komplikovala proces purifikace, neboť se překrýval na gelu SDS-elektroforézy (Mini Protean II) s námi purifikovanou kreatinkinázou vzhledem k velmi blízké molekulové hmotnosti. Až po provedení 2D-elektroforézy/Hoefffer byla odhalena jeho přítomnost identifikací peptidů pomocí MALDI-TOF. Patrně se jedná o depolymerizovaný F-aktin vlivem media s nízkým obsahem iontů (Lodish et al., 2003), které bylo používáno pro eluci CK z M-linie myofibrily. Globulární aktin z cytosolu je s vysokou pravděpodobností odstraněn již v průběhu promývacích cyklů při purifikaci myofibrilární frakce.

Výsledky 2D-elektroforézy z těžé frakce č.13 detekovaly tři izoelektrické body (pI) v mírně bazické oblasti pH 7.17, 7.28 a 7.47. K podobným hodnotám došel Rosenberg et al. (1981) u krysí MM-CK, kde rozlišil dvě izoformy též v bazické oblasti (7.5 a 7.4). U jiných savců se většinou vyskytují hodnoty pI MM-CK kosterního svalu v kyselé oblasti pH. Hershenson et al. (1986) naměřili v kosterním svalu králíka 5 izoform CK s odlišným pI v rozsahu 6.09-6.9. Dále Takasawa ve své práci, kde studoval CK kosterního svalu vepře uvádí tři hodnoty pI. Jedna majoritní frakce s izoelektrickým bodem 6.57 a dvě minoritní frakce s pI 6.74 a 6.34 (Takasawa and Shiokawa., 1983). Primární sekvence těchto izoform odhalily jejich rozdílnou strukturu v N-koncové části (Takasawa et al., 1983). To by vysvětlovalo specializovanou funkci N-koncových aminokyselin, kterou Hornemann a Stolz (Hornemann et al., 2000b; Stolz and Wallimann, 1998) hypoteticky uvažují jako zodpovědnou za vazbu do myofibrily.

Zajímavým nálezem je práce George(a) et al. (1984). MM-CK purifikovaná z tkáně psího myokardu zde existuje jako jednotná pI forma, ale při uvolnění do plazmy se

vyskytuje ve třech formách. Výsledky z chromatofokusace ukázaly tři formy MM1, MM2 a MM3 lišící se svými izoelektrickými body 7.58, 7.43 a 7.30, přičemž MM1 a tkáňová CK (MMt) mají identickou peptidovou mapu, ale MM2 a MM3 se lišily nejméně v jedné aminokyselině v C-konci.

Při purifikaci CK kapalinovou chromatografií jsme eluovali čistou CK frakci při 330 mM NaCl, pH 9. Takasawa (Takasawa and Shiokawa, 1981) používal oproti nám slabý anex (DEAE cellulosu) pro purifikaci cytosolické MM-CK z vepře a čistý enzym získal při 10-krát nižších koncentracích soli (20 mM), při nižším pH media (8,7), ve srovnání s mou prací. To je v souladu s nižším pI CK vepře (majoritní izoforma 6,57), oproti námi naměřené hodnotě u potkana (majoritní izoforma 7,17).

Mnou naměřená specifická enzymatická aktivita purifikované CK 82,35 IU/mg je 3,4-krát nižší než je specifická aktivita komerčně dodávané CK 280 IU/mg mnou opakovaně naměřené. Je ale také více než 10-krát vyšší než specifická enzymatická aktivita permeabilizovaných vláken, která kolísá podle typu permeabilizace od 2,8 do 6,97 IU/mg (Gregor et al., 1999) a zhruba 140-krát vyšší než specifická enzymatická aktivita CK čisté myofibrilární frakce (Gregor et al., 2003a).

Permeabilizovaná vlákna zahrnují kromě myofibrilární též cytosolickou formu CK (která může být částečně odmyta) a mitochondriální CK, která může interferovat v rozsahu 5-20% (Wegman et al., 1992). Specifická enzymatická aktivita čisté myofibrilární frakce poklesla na 0,42% CK aktivity v průběhu purifikace myofibrilární frakce. Oproti permeabilizovaným vláknům obsahuje již pouze strukturálně vázanou CK v M-linii sarkomery a veškeré ostatní izoformy CK již byly odmyty (Gregor et al., 1999). Při dalších krocích purifikace čistého enzymu z myofibril dochází k postupnému nárůstu specifické enzymatické aktivity CK až na 82,35 IU/mg. CK aktivita byla měřena enzymaticky (Bergmayer, 1963) a její reprodukovatelnost byla potvrzována měřením enzymatické aktivity komerčně dodávané CK. Mnou naměřená hodnota specifické enzymatické aktivity u purifikované CK dosahuje 24% (350 IU/mg) nebo 30% (280 IU/mg) aktivity komerčně dodávané CK. Tato snížená hodnota může mít dvě příčiny. Přítomnost velmi malého množství jednotlivých balastních proteinů, které jsou pod hladinou detekce na gelu SDS-elektroforézy. Druhým, pravděpodobnějším důvodem, může být předpokládaná částečná denaturace proteinu v průběhu purifikace.

Celkový výtěžek CK je 0,09 mg ve 30 g tkáně, což odpovídá 4,28% totálního obsahu CK purifikované z kosterního svalu, kterou udává Kuby (Kuby et al., 1954a). Tato hodnota je mírně nižší oproti nálezům 5-10% u kosterního svalu a 2% u srdečního svalu (Wallimann et al., 1977; Turner et al., 1973). Kuby udává ve své práci specifickou enzymatickou aktivitu purifikované rekrystalizované CK 52,3 IU/mg. Mnou naměřená hodnota je zhruba o 37% vyšší.

Je to obecná otázka, zdali interakce enzymu se strukturálními proteiny lokalizovanými v subcelulárních strukturách jeho výskytu, mají význam pro řízení jejich aktivity. Fyziologický komponent zmíněný v úvodu, který řídí aktivitu CK, obrátil naši pozornost k přirozené interakci CK s myofibrilami.

Myofibrily mohou být považovány za nejjednodušší strukturu, která si uchovává svojí fyziologickou funkci, tj. kontrakci. Současně nám umožňuje přístup na molekulární úrovni k CK – myofibrilární interakci, která by mohla ovlivňovat její enzymatickou aktivitu. Pro takovou interakci jsou důležité dvě věci: výměna CK mezi dvěma uvedenými kompartmenty, a vazba, která drží CK a proteiny M-linie pospolu. Obě jsou obsahem naší práce.

Myofibrily jako experimentální objekt

Purifikované myofibrily si zachovávají svojí fyziologickou funkci, která byla potvrzena schopností kontrakce, CK aktivitou $0,4 \pm 0,02$ IU/mg odpovídající Ventura-Clapier et al. (1987) a našim předchozím nálezům (Gregor et al., 2003a).

Eluce CK z myofibril (eluované myofibrily) pomocí nízkointového media byla účinná a snížila specifickou aktivitu CK na $0,01 \pm 0,008$ IU/mg. Cílem eluce bylo získání jednoduchého kinetického modelu. Avšak FLIP experiment ukázal, že nahrazení nativní CK za CK-IAF je v M-linii pevně vázaná. Na základě toho byly eluované myofibrily vyloučeny z experimentu. Následná SDS-PAGE analýza ukázala ztrátu dalších strukturních proteinů z myofibril, kromě očekávané CK (43 kDa) (obr.5–viz výsledky). Zejména aktin (vyšší bend, 43 kDa) společně s CK (nižší bend, 43 kDa) byly potvrzeny hmotnostní spektrometrií. Některé další vysokomolekulární proteiny okolo 70, 80 a 120 kDa byly detekovány pomocí SDS-PAGE. V nižší MW se jednalo o dva pruhy v oblasti 20 a 30 kDa. 30 kDa by mohl být DRAL-FHL2, který zprostředkovává kotvu CK s titinem (Lange et al., 2002; Lange et al., 2005). Obr.5 (viz výsledky) ukazuje, že nízkointové medium mohlo poškodit strukturu sarkomery v oblasti menších proteinů. Tento způsob

mohl odkrýt některé nespecifické interakce CK v M-linii. Tento výsledek též ukazuje, že malé proteiny jsou stejně nezanedbatelné pro přirozenou interakci CK v M-linii stejně tak jako její hlavní partneři myomesin a M-protein.

pH závislost CK-IAF interakce v M-linii sarkomery

Výsledky ukazují silnou pH závislost s myofibrilami v M-linii sarkomery. V slabě kyselém prostředí je vazba nativní CK tak silná, že zcela vylučuje výměnu CK mezi okolím a M-linií. Tyto nálezy korespondují s pozorováním silné pH závislosti na interakci mezi CK a myomezinu (Hornemann et al., 2003). Tento fakt může být hypoteticky vysvětlen fyziologickou funkcí CK, jako pH pufru (Adams et al., 1990) a ATP pufru v oblasti fyziologických hodnot změny pH při kotrakci (Chase and Kushmerick, 1988). Též „energy channelling“ mezi CK a myozin ATPázou dosahuje maxima při pH 6.95 (Gregor et al., 2003a), to by mohlo pomoci vysvětlit význam silné vazby v M-linii při okyselení. Proces výměny CK dosahuje maximální rychlosti v mírně bazickém prostředí pH 7.10-7.17, což je v souladu s předchozími daty (Ventura-Clapier et al., 1987), které ukazují rekonstrukci CK v M-linii při pH 7.1. Slabší interakce CK též může být vysvětlena jejím pI v mírně alkalické oblasti (Malacova et al., 2004; viz příloha 7.3.1; Wright-Weber et al., 2006). Na druhé straně Kraft et al. (1995) použil neutrální pH na výměnu CK molekul v permeabilizovaných vláknech. V tomto pH jsme pozorovali pouze částečnou a pomalou výměnu CK-IAF molekul v M-linii.

Úloha CK substrátů

Výsledky prezentované v obr.6, 7 (viz výsledky) opravňují použití metody FLIP metody v planárním systému dvou souřadnic. Výsledné hodnoty obr.8, 9 (viz výsledky) nám umožňují kvantifikovat výměnu CK a recipročně usuzovat sílu vazby. V mírně alkalických podmínkách (7.1 – 7.15) je výměna mezi nativně vázanou a externí CK-IAF velmi rychlá (v sec) (obr.8, viz výsledky). Rychlost výměny v přítomnosti substrátů je až 60-krát pomalejší (v min) v průběhu ustálení rovnováhy. FLIP experiment ukázal, jak konformační změna CK molekuly indukovaná vazbou substrátů, ovlivňuje proces výměny mezi M-linií a okolím. Tyto výsledky ukazují silnější vazbu CK způsobenou vazbou substrátů. ATP indukovaná autofosforylace svalové CK (Stolz et al., 2002) a nukleotidilace (Satyajit et al., 1999) může též ovlivnit tuto interakci s myofibrilami, stejně jako konformační změna způsobená vazbou substrátů (Lahiri et al., 2002; Mejsnar et al., 2002; Mejsnar et al., 2005).

V této práci ukazujeme, že substráty zpomalily rychlost výměny CK molekuly ve velmi úzkém rozmezí pH. To svědčí o tom, že síla vazby mezi CK a M-linií se zvýšila. Na základě těchto výsledků shrnujeme, že silná strukturální vazba CK vyžaduje přítomnost substrátů.

Měření konformačních změn CK

Jsou dvě obecně přijímané skutečnosti, které podstatně ovlivňují absolutní hodnoty enzymové aktivity. Enzymy pracují velmi pod jejich maximální aktivitou (jak bylo měřeno v homogenátu nebo volně v roztoku) v subcelulární struktuře in situ. Tedy v porovnání s hodnotami prezentovanými v sekci s výsledky, je specifická aktivita myofibrilárně vázané CK v purifikované myofibrilární frakci - ve shodě s předešlými nálezy (Ventura-Clapier R et al., 1987; Zurmanova et al., 2007; Gregor et al., 2003a) – o dva řády nižší. Nicméně relativně specifické aktivity stejného řádu pro neznačenou a FITC-značenou CK značí biologicky funkční CK molekulu užitou v našich experimentech.

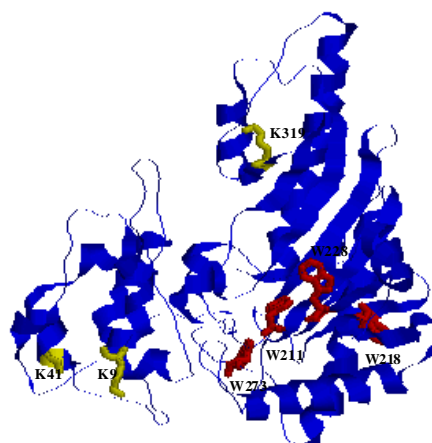
Indol, heterocyklický benzen-pyrolový hybridní postranní řetězec tryptofanu, je obecně znám pro svou aromatickou reaktivitu a pro spektroskopické následky rozšířeného elektronového systému. Indolová fluorescence je známa pro svou vysokou citlivost na její lokální mikroprostředí (Lakowicz, 1999; Eftink, 2000). Trp zbytky jsou tedy ideální vnitřní fluorofory pro sondování i malých konformačních změn, které postihují jejich lokální interakce s proteinem. Všechny tři fluorescenční anizotropie z obr.11A (viz výsledky) byly prokázány, že obsahují dva korelační časy prezentované v Tab.1 (viz výsledky). Rychlejší komponenta s korelačním časem blízkým 1 ns je vztažena k segmentovému pohybu proteinu. Amplituda segmentové mobility je vztažena k amplitudě segmentového pohybu beta1. Čím vyšší je segmentová svoboda proteinu, tím vyšší by měla být tato amplituda beta1. Malý pokles beta1 je tedy známkou CK rigidizace za přítomnosti substrátů.

Výsledky verifikační série experimentů s FITC značenou CK jsou shrnuty v Tab 3 (viz výsledky). Bylo zjištěno, že úbytky anizotropie obsahují 3 komponenty (prezentované v příslušných sloupcích). 3. komponenta, jako hlavní shrnutí, je diskutována ve výsledcích. První dvě komponenty odrážejí rychlou depolarizaci emise. Suma korespondujících amplitud (beta 1 a 2) značí, že tyto dva pohyby vysvětlují většinu fluorescenční depolarizace, která je následkem relativně široké pohybové svobody vnějšího FITCu v proteinové struktuře. Odhalený poměr naší CK značící procedury k FITC (1:1) potvrdil

naše očekávání, že 3 možná místa pro vazbu FITC nedávno identifikovaná (Gregor et al., 2003c) a označená v obr.1 jsou náhodně obsazena pouze po jednom fluoroforu.

Časově rozlišená fluorescenční anizotropie odráží depolarizaci emise způsobenou buď vnitřními (Trp) nebo vnějšími (FITC) pohyby fluoroforu. V proteinech zahrnují tyto pohyby rychlé kolísání postranních řezců fluoroforu (s

korelačním časem v ps), pomalejší segmentový pohyb (blízko 1 ns) a rotační difúzi celé makromolekuly, která nese informaci o tvaru a velikosti proteinu (viz Φ_2, Φ_3 v Tab.1 a 3 viz výsledky). Tato metodologie je tedy neocenitelný nástroj pro ohodnocení vnitřní flexibility a celkových hydrodynamických parametrů proteinu (Lakowicz, 1999).



Obr.1 Monomer CK, žlutě vyznačeny vazebná místa pro FITC a červeně jsou označeny vnitřní Trp. (Hornikova et al., 2008; viz příloha 7.3.4).

5. ZÁVĚR

Práce prokázala adekvátními chemickými a fyzikálními metodami následující vlastnosti myofibrilární kreatinkinázy (EC 2.7.3.2) (CK), vyčistěné z čisté myofibrilární frakce krysího a králíčího svalu m. psoas.

1) Sekvenční 2D SDS elektroforéza odhalila tři izoelektrické body v úzkém rozsahu fyziologického pH 7.17, 7.28 a 7.47. Specifická enzymatická aktivita CK byla 82.35 IU/mg.

2) Rychlost výměny fluorescenčně značené CK-IAF mezi M-liníí izolovaných myofibril a okolím (nepřímo úměrně vypovídající o síle vazby CK molekuly v M-linii), měřená v rovnovážném stavu metodou FLIP, se zpomaluje okyselením okolního prostředí v rozmezí pH 6.5 – 7.2.

3) Rychlost výměny CK-IAF molekuly je ovlivněna přítomností substrátů (pH 7.10 – 7.17), když rychlosti CK se substráty (konformace „closed“ a „intermediary“) jsou průkazně sníženy oproti rychlosti CK bez substrátů (v konformaci „open“).

Specifická enzymatická aktivita při těchto pokusech se snižovala podle vazby v myofibrilách až o dva řády k hodnotě 0.40 IU/mg.

4) Měření *steady-state* fluorescence vnitřních tryptofanových zbytků nezačené CK prokázala a) trojí pokles fluorescence v čase podle vazby substrátů, b) změnu střední doby života *lifetime* 2.72 ns volné CK, vlivem vazby ATP (2.38 ns) a vazbou ATP+Cr (2.42 ns).

5) Zhášení fluorescence vnitřních tryptofanových zbytků akrylamidem bylo podle Stern-Volmerovy rovnice trojí velikosti pro CK, CK-ATP, CK-ATP+Cr.

6) Metodami *time-resolved* fluorescence sledováním úbytku anizotropie byly pro tři konformace nezačené CK zjištěny rotační korelační časy molekuly: CK=35 ns, CK-ATP=27 ns, CK-ATP+Cr=29 ns.

Specifická aktivita nezačené CK při fluorescenčních měřeních byla 250 IU/mg.

7) Výsledky pod body 4,5,6 byly potvrzeny stejnými metodami měření *steady-state* a *time-resolved* fluorescence molekuly CK značené FITC. Příslušné rotační časy pro CK-FITC molekulu byly ve stejném pořadí: 34, 27 a 30 ns.

Specifická aktivita CK-FITC byla při těchto pokusech 50 IU/mg.

8) Na molekule CK značené dansylchloridem, dvojitě značené FITC+ErITC a IAF+ErITC a byl prokázán *fluorescenční rezonanční energetický přenos* FRET.

6. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

Ackerman JJ, Grove TH, Wong GG, Gadian DG, Radda GK: Mapping of metabolites in whole animals by ³¹P NMR using surface coils. *Nature*, **283**:167-170, 1980.

Adams GR, Foley JM, Meyer RA: Muscle buffer capacity estimated from pH changes during rest-to-work transitions. *J Appl Physiol.*, **69**:968-972, 1990.

Agarkova I, Auerbach D, Ehler E, Perriard JC: A novel marker for vertebrate embryonic heart, the EH-myomesin isoform. *J. Biol. Chem.*, **275**:10256-10264, 2000.

Agarkova I, Ehler E., Lange S., Schoenauer R., Perriard, JC: M-band: a safeguard for sarcomere stability? *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **24**:191-203, 2003.

Andrade FH, Merriam AP, Guo W, Cheng G, McMullen CA, Hayess K, Ven PF van der, Porter JD: Paradoxical absence of M lines and downregulation of creatine kinase in mouse extraocular muscle. *J. Appl. Physiol.*, **95**:692-699, 2003.

Andrienko T, Kuznetsov AV, Kaambre T, Usson Y, Oroscio A, Appaix F, Tiivel T, Sikk P, Vendelin M, Margreiter R, Saks VA: Metabolic consequences of functional complexes of mitochondria, myofibrils and sarcoplasmic reticulum in muscle cells. *J. Exp. Biol.*, **206(Pt 12)**:2059-72, 2003.

Arrio-Dupont M, De Nay D: Compartmentation of high-energy phosphates in resting and beating heart cells. *Biochim Biophys Acta* **851**: 249-256, 1986.

Arrio-Dupont M, Bechet JJ, d'Albis A: A model system of coupled activity of co-immobilized creatine kinase and myosin. *Eur J Biochem* **207**: 951-955, 1992.

Ashby B, Frieden C, Bischoff R: Immunofluorescent and histochemical localization of AMP deaminase in skeletal muscle. *J Cell Biol* **81**:361-373, 1979.

Bagnato P, Barone V, Giacomello E, Rossi D, Sorrentino V: Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J. Cell Biol.*, **160**:245-253, 2003.

Bahler M, Wallimann T, Eppenberger HM: Myofibrillar M-band proteins represent constituents of native thick filaments, frayed filaments and bare zone assemblages. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **6(6)**:783-800, 1985.

Bach I: The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev.* **91**:5-17, 2000.

Balaban RS: Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol.*, **258**: C377-89, 1990.

Balaban RS, Kantor HL, Katz LA, Briggs RW: Relation between work and phosphate metabolite in the in vivo paced mammalian heart. *Science*, **232**: 1121-1123, 1986.

Bantle S, Keller S, Haussmann I, Auerbach D, Perriard E, Muhlebach S, Perriard JC: Tissue-specific isoforms of chicken myomesin are generated by alternative splicing. *J. Biol. Chem.*, **271**:19042-19052, 1996.

Barbour RL, Ribaud J, Chan SH: Effect of creatine kinase activity on mitochondrial ADP/ATP transport. Evidence for a functional interaction. *J Biol Chem* **259**: 8246-8251, 1984.

Belousova LV, Fedosov SN, Orlova EV, Stel'mashchuk Vya: The structural features of beef heart mitochondrial creatine kinase. *Biochem Int*, **24**: 51-58, 1991.

Bennett P, Offer G, Pepe FA: Ultrastructural localization of C-protein, X-protein and H-protein in rabbit muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **7**:550-567, 1986.

- Bergmeyer HU:** Methods of Enzymatic Analysis, vol III. third ed.; Phosphotransferases: creatine kinase, Verlag Chemie, Weinheim, pp.508–518, 1963.
- Bessman SP, Geiger PJ:** Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. *Science*, **211**(4481):448-52, 1981.
- Bessman SP, Carpenter CL:** The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**:831-62, 1985.
- Bickerstaff GF and Price NC:** Creatine kinase: A review of some recent work on the mechanism and subunit behavior of the enzyme. *Int J Biochem.*, **9**:1–8, 1978.
- Bittl JA and Ingwall JS:** Reaction rates of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. A 31P NMR magnetization transfer study. *J Biol Chem*, **260**: 3512-3517, 1985.
- Blum H, Beier H, Gross HJ:** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels *Electrophoresis*, **8**: 93-99, 1987.
- Bowditch J, Nigdikar S, Brown AK, Dow JW:** 5'-Nucleotidase activity of isolated mature rat cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta*, **845**: 21-26, 1985.
- Brdiczka D, Kaldis P, Wallimann T:** In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin. *J. Biol. Chem.*, **269**:27640-27644, 1994.
- Brdiczka D, Beutner G, Rück A, Dolder M, Wallimann T:** The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. *Biofactors*, **8**:235-242, 1998.
- Bremel RD, Weber AM:** Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nature*, **238**:97-101, 1972.
- Brochon JC:** Maximum entropy method of data analysis in time-resolved spectroscopy. *Methods Enzymol.* **240**:262-311, 1994.
- Brown CS, Cunningham LW:** Reaction of reactive sulfhydryl groups of creatine kinase with dansyl chloride. *Biochemistry*, **9**:3878-3885, 1970.
- Buechter DD, Medzihradszky KF, Burlingame AL, Kenyon GL:** The active site of creatine kinase. Affinity labeling of cysteine 282 with N-(2,3-epoxypropyl)-N-amidinoglycine. *J. Biol. Chem.*, **267**:2173-2178, 1992.
- Burt CT, Glonek T, Barany M:** Analysis of phosphate metabolites, the intracellular pH, and the state of adenosine triphosphate in intact muscle by phosphorus nuclear magnetic resonance. *J Biol Chem*, **251**: 2584-2591, 1976.
- Cain DF and Davies RE:** Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **8**: 361-366, 1962.
- Cande WZ:** Creatine kinase role in anaphase chromosome movement. *Nature*, **304**: 557-558, 1983.
- Caravatti M, Perriard JC, Eppenberger HM:** Developmental regulation of creatine kinase isoenzymes in myogenic cell cultures from chicken. Biosynthesis of creatine kinase subunits M and B. *J Biol Chem* **254**:1388-1394, 1979.
- Carling D, Woods A, Thornton C, Cheung PC, Smith FC, Ponticos M, Stein SC:** Molecular characterization of the AMP-activated protein kinase and its role in cellular metabolism. *Biochem Soc Trans* **25**: 1224-1228, 1997.
- Connett RJ:** Analysis of metabolic control: new insights using scaled creatine kinase model. *Am J Physiol* **254**: R949-959, 1988.

- Cooper J, Trinick J:** Binding and location of AMP deaminase in rabbit psoas muscle myofibrils. *J Mol Biol* **177**: 137-152, 1984.
- Cox JM, Davis CA, Chan C, Jourden MJ, Jorjorian AD, Brym MJ, Snider MJ, Borders CL Jr, Edmiston PL:** Generation of an active monomer of rabbit muscle creatine kinase by sitedirected mutagenesis: the effect of quaternary structure on catalysis and stability. *Biochemistry*, **42**:1863–1871, 2003.
- Craig R, Offer G:** The location of C-protein in rabbit skeletal muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **192**(1109):451-61, 1976.
- Danowski BA, Imanaka-Yoshida K, Sanger JM, Sanger JW:** Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J. Cell Biol.*, **118**:1411–1420, 1992.
- David SS, Haley BE:** ATP nucleotidylation of creatine kinase. *Biochemistry*, **38**:8492-8500, 1999.
- Degani Y. and Degani C:** Subunit-selective chemical modifications of creatine kinase. Evidence for asymmetrical association of the subunits. *Biochemistry*, **18**:5917–5923, 1979.
- Eder M, Schlattner U, Becker A, Wallimann T, Kabsch W, Fritz-Wolf K:** Crystal structure of brain-type creatine kinase at 1.41 Å resolution. *Protein Sci.*, **8**:2258-2269, 1999.
- Eder M, Stolz M, Wallimann T, Schlattner U:** A conserved negatively charged cluster in the active site of creatine kinase is critical for enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, **275**:27094-27099, 2000a.
- Eder M, Fritz-Wolf K, Kabsch W, Wallimann T, Schlattner U:** Crystal structure of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase. *Proteins*, **39**:216-225, 2000b.
- Edman AC, Squire JM, Sjöström M:** Fine structure of the A-band in cryo-sections. Diversity of M-band structure in chicken breast muscle. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.*, **100**:1–12, 1988.
- Edmiston PL, Schavolt KL, Kersteen EA, Moore NR, Borders CL:** Creatine kinase: a role for arginine-95 in creatine binding and active site organization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1546**:291-298, 2001.
- Eftink MR:** Intrinsic fluorescence of proteins. In: Topics in fluorescence spectroscopy, vol.6, J.R.Lakowicz ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 1-15, 2000.
- Eftink MR, Ghiron CA:** Fluorescence quenching of indole and model micelle systems. *J.Phys.Chem.* **80**:486-493, 1976.
- Ellington WR, Roux K, Pineda AO:** Origin of octameric creatine kinases. *FEBS Lett.*, 425, 1998.
- Ellington, WR:** Evolution and physiological roles of phosphagen systems. *Annu. Rev. Physiol.*, **63**:289-325, 2001.
- Ennor AH, Morrison JF:** Biochemistry of the phosphagens and related guanidines. *Physiol. Rev.*, **38**:631-674, 1958.
- Eppenberger HM, Dawson DM, Kaplan NO:** The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. *J Biol Chem*, **242**:204-209, 1967.
- Fisher SE and Whitt GS:** Evolution of isozyme loci and their differential tissue expression. Creatine kinase as a model system. *J Mol Evol*, **12**:25-55, 1978.
- Fischer RS, Fowler VM:** Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol.*, **13**:593–601, 2003.
- Fitch CD, Shields RP, Payne WF, Dacus JM:** Creatine metabolism in skeletal muscle. *J Biol Chem*, **243**:2024-2027, 1968.
- Flick MJ, Konieczny SF:** The muscle regulatory and structural protein MLP is a cytoskeletal binding partner of betaSpectrin. *J. Cell Sci.*, **113**:1553–1564, 2000.

- Forstner M, Kriechbaum M, Laggner P, Wallimann T:** Changes of creatine kinase structure upon ligand binding as seen by small-angle scattering. *J. Mol. Struct.*, **383**:217-222, 1996.
- Forstner M, Kriechbaum M, Laggner P, Wallimann T:** Structural changes of creatine kinase upon substrate binding. *Biophys. J.*, **75**:1016-1023, 1998.
- Foucault G, Vacher M, Cribier S, Arrio-Dupont M:** Interactions between beta-enolase and creatine kinase in the cytosol of skeletal muscle cells. *Biochem. J.*, **346**:127-131, 2000.
- Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T, Kabsch W:** Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature*, **381**:341-345, 1996.
- From AH, Zimmer SD, Michurski SP, Mohanakrishnan P, Ulstad VK, Thoma WJ, Ugurbil K:** Regulation of the oxidative phosphorylation rate in the intact cell. *Biochemistry*, **29**: 3731-3743, 1990.
- Furst DO, Gautel M:** The anatomy of a molecular giant: how the sarcomere cytoskeleton is assembled from immunoglobulin superfamily molecules. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **27(4)**:951-959, 1995.
- Furter R, Furter-Graves EM, Wallimann T:** Creatine kinase: the reactive cysteine is required for synergism but is nonessential for catalysis. *Biochemistry*, **32**:7022-7029, 1993.
- Gautel M., Leonard K, Labeit S:** Phosphorylation of KSP motifs in the C-terminal region of titin in differentiating myoblasts. *EMBO J.*, **12(10)**:3827-34, 1993.
- George S, Ishikawa Y, Perryman MB, Roberts R:** Purification and characterization of naturally occurring and in vitro induced multiple forms of MM creatine kinase. *J. Biol. Chem.*, **259**:2667-2674, 1984.
- Gerhardt W:** Phosphotransferases: creatine kinase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. III. 3rd edn, Verlag Chemie, Weinheim, pp 508–518, 1983.
- Gilliland GL, Sjolín L, Olsson G:** Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of two crystal forms of bovine heart creatine kinase. *J. Mol. Biol.*, **170**:791-379, 1983.
- Granjon T, Vacheron MJ, Vial C, Buchet R:** Structural changes of mitochondrial creatine kinase upon binding of ADP, ATP, or Pi, observed by reaction-induced infrared difference spectra. *Biochemistry*, **40**:2988-2994, 2001.
- Granzier H, Labeit S:** Cardiac titin: an adjustable multifunctional spring. *J. Physiol.*, **541**:335–342, 2002.
- Gregor M, Mejsnar J, Janovska A, Zurmanova J, Benada O, Mejsnarova B:** Creatine kinase reaction in skinned rat psoas muscle fibers and their myofibrils. *Physiol. Res.*, **48**:27-35, 1999.
- Gregor M, Janovska A, Stefl B, Zurmanova J, Mejsnar J:** Substrate channelling in a creatine kinase system of rat skeletal muscle under various pH conditions. *Exp Physiol.*, **88(1)**:1-6, 2003a.
- Gregor M, Kubala M, Amler E, Mejsnar J:** Frequency-domain lifetime fluorometry of double-labelled creatine kinase. *Physiol. Res.*, **52(5)**:579-585, 2003b.
- Gregor M, Man P, Zurmanova J, Mejsnar J:** Characterization of Binding Sites of Fluorophores on Creatine Kinase Molecule. *Physiol. Res.*, **52**:27P, 2003c.
- Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S:** Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**:18–25, 1999.
- Gregorio CC, Perry CN, McElhinny AS:** Functional properties of the titin/connectin-associated proteins, the muscle-specific RING finger proteins (MURFs), in striated muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **26(6-8)**:389-400, 2005.
- Gross M. and Wallimann T:** Kinetics of assembly and dissociation of the mitochondrial creatine kinase octamer. A fluorescence study. *Biochemistry*, **32**:13933–13940, 1993.

- Gross M, Furter-Graves EM, Wallimann T, Eppenberger HM, Furter R:** The tryptophan residues of mitochondrial creatine kinase: roles of Trp-223, Trp-206, and Trp-264 in active-site and quaternary structure formation. *Protein Sci.*, **3**:1058-1068, 1994.
- Grossman SH and Mollo E:** Physical and serological comparison and hybridization of isozymes of creatine kinase from primates. *Int. J. Biochem.*, **10(4)**:367-81, 1979.
- Grossman SH:** Conformational heterogeneity of creatine kinase determined from phase resolved fluorometry. *Biophys J.*, **59(3)**:590-7, 1991.
- Grossman SH, France RM, Mattheis JR:** Heterogeneous flexibilities of the active site domains of homodimeric creatine kinase: effect of substrate. *Biochim. Biophys. Acta*, **1159**:29-36, 1992.
- Grove BK, Kurer V, Lehner C, Doetschman TC, Perriard JC, Eppenberger HM:** A new 185,000-dalton skeletal muscle protein detected by monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.*, **98(2)**:518-24, 1984.
- Gyulai L, Roth Z, Leigh JS Jr, Chance B:** Bioenergetic studies of mitochondrial oxidative phosphorylation using ³¹P phosphorus NMR. *J Biol Chem*, **260**:3947-3954, 1985.
- Haas RC and Strauss AW:** Separate nuclear genes encode sarcomere-specific and ubiquitous human mitochondrial creatine kinase isoenzymes. *J Biol Chem*, **265**:6921-6927, 1990.
- Haas RC, Korenfeld C, Zhang ZF, Perryman B, Roman D, Strauss AW:** Isolation and characterization of the gene and cDNA encoding human mitochondrial creatine kinase. *J Biol Chem*, **264**: 2890-2897, 1989.
- Hagemann H, Marcillat O, Buchet R, Vial C:** Magnesium-adenosine diphosphate binding sites in wild-type creatine kinase and in mutants: role of aromatic residues probed by Raman and infrared spectroscopies. *Biochemistry*, **39**:9251-9266, 2000.
- Hamada M, Kuby SA:** Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases. XIII. Kinetic properties of the crystalline rabbit muscle ATP-AMP transphosphorylase (adenylate kinase) and a comparison with the crystalline calf muscle and liver adenylate kinases. *Arch Biochem Biophys*, **190**: 772-779, 1978.
- Hemmer W, Skarli M, Perriard JC, Wallimann T:** Effect of okadaic acid on protein phosphorylation patterns of chicken myogenic cells with special reference to creatine kinase. *FEBS Lett.*, **327**:35-40, 1993.
- Henkin J:** Photolabeling reagent for thiol enzymes. Studies on rabbit muscle creatine kinase. *J. Biol. Chem.*, **252**:4293-4297, 1977.
- Hershenson S, Helmers N, Desmuelles P, Stroud P:** Purification and crystallization of creatine kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **264**:3732-3736, 1986.
- Hornemann T, Rutishauser D, Wallimann T:** Why is creatine kinase a dimer? Evidence for cooperativity between the two subunits. *Biochim Biophys Acta*, **1480**:365-373, 2000a.
- Hornemann T, Stolz M, Wallimann T:** Isoenzyme-specific interaction of muscle-type creatine kinase with the sarcomeric M-line is mediated by NH(2)-terminal lysine charge-clamps. *J. Cell Biol.*, **149(6)**:1225-34, 2000b.
- Hornemann T, Kempa S, Himmel M, Hayess K, Furst DO, Wallimann T:** Muscle-type creatine kinase interacts with central domains of the M-band proteins myomesin and M-protein. *J. Mol Biol.*, **332(4)**:877-87, 2003.
- Hornikova D, Herman P, Mejsnar J, Vecer J, Zurmanova J:** Creatine kinase structural changes induced by substrates. *BBA - proteins and proteomics*, **accept**.
- Horowitz R, Maruyama K, Podolsky RJ:** Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **109**:2169-2176, 1989.

Horowitz R: Nebulin regulation of actin filament lengths: new angles. *Trends Cell Biol.*; **16(3)**:121-124, 2006.

Hossle JP, Schlegel J, Wegmann G, Wyss M, Bohlen P, Eppenberger HM, Wallimann T, Perriard JC: Distinct tissue specific mitochondrial creatine kinases from chicken brain and striated muscle with a conserved CK framework. *Biochem Biophys Res Commun*, **151**: 408-416, 1988.

Chance B and Williams GR: Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem*, **217**: 409-427, 1955.

Chance B, Leigh JS Jr, Clark BJ, Maris J, Kent J, Nioka S, Smith D: Control of oxidative metabolism and oxygen delivery in human skeletal muscle: a steady-state analysis of the work/energy cost transfer function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**: 8384-8388, 1985.

Chance B, Leigh JS Jr, Kent J, McCully K, Nioka S, Clark BJ, Maris JM, Graham T: Multiple controls of oxidative metabolism in living tissues as studied by phosphorus magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**: 9458-9462, 1986.

Chase PB, Kushmerick MJ: Effect of pH on contraction of rabbit fast and slow skeletal muscle fibers. *Biophys J.*, **53**:935-946, 1988.

Chen ZP, McConell GK, Michell BJ, Snow RJ, Canny BJ, Kemp BE: AMPK signaling in contracting human skeletal muscle: acetyl-CoA carboxylase and NO synthase phosphorylation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E1202-1206, 2000.

Choi JK, Yoon SH, Hong HY, Choi DK, Yoo GS: A modified Coomassie blue staining of proteins in polyacrylamide gels with Bismark brown R. *Anal Biochem.*, **236(1)**:82-4, 1996.

Iyengar MR: Creatine kinase as an intracellular regulator. *J Muscle Res Cell Motil* **5**: 527-534, 1984.

Infante AA, Davies RE: The effect of 2,4-dinitrofluorobenzene on the activity of striated muscle. *J Biol Chem* **240**: 3996-4001, 1965.

Ingwall JS, Atkinson DE, Clarke K, Fetters JK: Energetic correlates of cardiac failure: changes in the creatine kinase system in the failing myocardium. *Eur Heart J* **11**: Suppl B:108-115, 1990.

Jacobs H, Heldt HW, Klingenberg M: High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **16**: 516-521, 1964.

Jacobus WE, Lehninger AL: Creatine kinase of rat heart mitochondria. Coupling of creatine phosphorylation to electron transport. *J Biol Chem* **248**: 4803-4810, 1973.

Jacobus WE, Moreadith RW, Vandegaer KM: Control of heart oxidative phosphorylation by creatine kinase in mitochondrial membranes. *Ann N Y Acad Sci* **414**: 73-89, 1983.

James P, Wyss M, Lutsenko S, Wallimann T, Carafoli E: ATP binding site of mitochondrial creatine kinase. Affinity labelling of Asp-335 with C1RATP. *FEBS Lett.*, **273**:139-143, 1990.

Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, Mayer SE: Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ Res*, **49**:892-900, 1981.

Kammermeier H: Why do cells need phosphocreatine and a phosphocreatine shuttle. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **19**:115-118, 1987.

Kammermeier H: Meaning of energetic parameters. *Basic Res. Cardiol.*, **88**:380-384, 1993.

Keller A, Demeurie J, Merkulova T, Geraud G, Cywiner-Golenzer C, Lucas M, Chatelet FP: Fibre-type distribution and subcellular localisation of alpha and beta enolase in mouse striated muscle. *Biol. Cell*, **92**:527–535, 2000.

Kenny PA, Liston EM, Higgins DG: Molecular evolution of immunoglobulin and fibronectin domains in titin and related muscle proteins. *Gene*, **232**:11–23, 1999.

Kenyon GL, Reed GH: Creatine kinase: structure-activity relationships. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **54**:367–426, 1983.

Keutel HJ, Jacobs HK, Okabe K, Yue RH, Kuby SA: Studies on adenosine triphosphate transphosphorylases. VII. Isolation of the crystalline adenosine triphosphate--creatine transphosphorylase from calf brain. *Biochemistry*, **7**:4283–4290, 1968.

Knappes GG, Carlsen F: The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **38**:202–211, 1968.

Kontrogianni-Konstantopoulos A, Jones EM, Van Rossum DB, Bloch RJ: Obscurin is a ligand for small ankyrin 1 in skeletal muscle. *Mol. Biol. Cell*, **14**(3):1138–48, 2003.

Kontrogianni-Konstantopoulos A, Catino DH, Strong, JC, Randall WR, Bloch RJ: Obscurin regulates the organization of myosin into A bands. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **287**(1):C209–217, 2004.

Korge P, Byrd SK, Campbell KB: Functional coupling between sarcoplasmic-reticulum-bound creatine kinase and Ca(2+)-ATPase. *Eur J Biochem* **213**: 973–980, 1993.

Kraft T, Messerli M, Rothen-Rutishauser B, Perriard JC, Wallimann T, Brenner B: Equilibration and exchange of fluorescently labeled molecules in skinned skeletal muscle fibers visualized by confocal microscopy. *Biophys. J.*, **69**(4):1246–58, 1995.

Kraft T, Hornemann T, Stolz M, Nier V, Wallimann T: Coupling of creatine kinase to glycolytic enzymes at the sarcomeric I-band of skeletal muscle: a biochemical study in situ. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, **21**:691–703, 2000.

Kuby SA and Noltmann EA: ATP-creatine transphosphorylase. In: *The Enzymes* 2 ed. Vol. 6. pp 515–603. Boyer, P.D., Ed., Academic Press, New York, 1962.

Kuby SA, Noda L, Lardy HA: Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle. *J Biol Chem*, **209**:191–201, 1954a.

Kuby SA, Noda L, Lardy HA: Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. III. Kinetic studies. *J Biol Chem*, **210**:65–95, 1954b.

Kushmerick MJ: Skeletal muscle: a paradigm for testing principles of bioenergetics. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**:555–569, 1995.

Kushmerick MJ, Davies RE: The chemical energetics of muscle contraction. II. The chemistry, efficiency and power of maximally working sartorius muscles. Appendix. Free energy and enthalpy of atp hydrolysis in the sarcoplasm. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **174**: 315–353, 1969.

Labeit S, Kolmerer B: Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, **270**(5234):293–296, 1995.

Lakowicz JR: Principles of fluorescence spectroscopy, second ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.

Lahiri SD, Wang PF, Babbitt PC, McLeish MJ, Kenyon GL, Allen KN: The 2.1 °A structure of *Torpedo californica* creatine kinase complexed with the ADP-Mg²⁺-NO⁻³-creatine transitionstate analogue complex. *Biochemistry*, **41**:13861–13867, 2002.

- Lange S, Auerbach D, McLoughlin P, Perriard E, Schafer BW, Perriard JC, Ehler E:** Subcellular targeting of metabolic enzymes to titin in heart muscle may be mediated by DRAL/FHL-2. *J. Cell Sci.*, **115**:4925–4936, 2002.
- Lange S:** The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science*, **308**:1599–1603, 2005.
- Lange S, Agarkova D, Perriard JC, Ehler E:** The sarcomeric M-band during development and disease. *J Muscle Res Cell Motil.*, **26(6–8)**:375–379, 2005.
- Lehninger AL:** Principles of Biochemistry, 1982
- Levin RM, Longhurst PA, Levin SS, Haugaard N, Wein AJ:** Creatine kinase activity of urinary bladder and skeletal muscle from control and streptozotocin-diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, **97**:153-159, 1990.
- Levitsky DO, Levchenko TS, Saks VA, Sharov VG, Smirnov VN:** The role of creatine phosphokinase in supplying energy for the calcium pump system of heart sarcoplasmic reticulum. *Membr Biochem*, **2**: 81-96, 1978.
- Lin L, Perryman MB, Friedman D, Roberts R, Ma TS:** Determination of the catalytic site of creatine kinase by site-directed mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1206**:97-104, 1994.
- Lim MS, Walch MP:** Phosphorylation of skeletal and cardiac muscle C-Proteins by catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Arch. Biochem. Cell. Biol.*, **64**:622-630, 1986.
- Lui NS, Cunningham L:** Cooperative effects of substrates and substrate analogs on the conformation of creatine phosphokinase. *Biochemistry*, **5**:144-149, 1966.
- Liu ZJ, Zhou JM:** Spin-labeling probe on conformational change at the active sites of creatine kinase during denaturation by guanidine hydrochloride. *Biochim. Biophys. Acta*, **1253**:63-68, 1995.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CHA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J:** Molecular cell biology; Metabolism and movement of lipids. 743-778, 2003.
- Loew A, Bax B:** Purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of bovine cytosolic brain-type creatine kinase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **54**:989-990, 1998.
- Lohman K:** Über die enzymatische aufspaltung der kreatinephosphorsäure; zugleich ein beitrag zum chemismus der muskelkontraktion. *Biochem. Z.*, **271**:264-277, 1934.
- Lowenstein JM:** Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol Rev*, **52**: 382-414, 1972.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**:265-275, 1951.
- Luther PK, Squire JM:** Three-dimensional structure of the vertebrate muscle A-band. II. The myosin filament superlattice. *J. Mol. Biol.*, **141**:409–439, 1980.
- Maggio ET, Kenyon GL, Markham GD, Reed GH:** Properties of a CH₃-blocked creatine kinase with altered catalytic activity. Kinetic consequences of the presence of the blocking group. *J Biol Chem.*, **252**:1202–1207, 1977.
- Malacova D, Zurmanova J, Mejsnar J:** Three isoelectric points of creatine kinase M-subunit, purified from myofibrils. *Physiol. Res.*, **53**:22P, 2004.
- Malacova D, Herman P, Mejsnar J, Vecer J, Zurmanova J:** Fluorescence resonance energy transfer (FRET) in dansylated creatine kinase molecule. *Physiol. Res.*, **54**:31P, 2005.

Mani RS and Kay CM: Physicochemical studies on the creatine kinase M-line protein and its interaction with myosin and myosin fragments. *Biochim Biophys Acta* **453**: 391-399, 1976.

Masaki T, Takaiti O: M-protein. *J. Biochem. (Tokyo)*, **75**(2):367–380, 1974.

Matthews PM, Bland JL, Gadian DG, Radda GK: A ³¹P-NMR saturation transfer study of the regulation of creatine kinase in the rat heart. *Biochim Biophys Acta*, **721**: 312-20, 1982.

Mazon H, Marcillat O, Forest E, Vial C: Changes in MM-CK conformational mobility upon formation of the ADP-Mg²⁺-NO⁻³ - creatine transition state analogue complex as detected by hydrogen/ deuterium exchange. *Biochemistry*, **42**:13596–13604, 2003.

McClellan G, Weisberg A, Winegrad S: Energy transport from mitochondria to myofibril by a creatine phosphate shuttle in cardiac cells. *Am. J. Physiol.*, **245**(5 Pt 1):C423-7, 1983.

McElhinny AS, Kakinuma K, Sorimachi H, Labeit S, Gregorio CC: Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1. *J. Cell Biol.*, **157**(1):125-36, 2002.

McGilvery RW and Murray TW: Calculated equilibria of phosphocreatine and adenosine phosphates during utilization of high energy phosphate by muscle. *J Biol Chem*, **249**:5845-5850, 1974.

McLoughlin P, Ehler E, Carlile G, Licht JD, Schafer BW: The LIM-only protein DRAL/FHL2 interacts with and is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J. Biol. Chem.*, **277**(40):37045-53, 2002.

McPherson A: A preliminary crystallographic investigation of rabbit muscle creatine kinase. *J. Mol. Biol.*, **81**:83-86, 1973.

Mejsnar JA, Herman P, Malacova D, Vecer J, Zurmanova J: The substrate-dependent three conformations of muscle creatine kinase. *Physiol Res.*, **54**:33P, 2005.

Mejsnar JA, Sopko B, Gregor M: Myofibrillar creatine kinase activity inferred from a 3D model. *Physiol. Res.*, **51**:35-41, 2002.

Messmer CH, Kagi JH: Tryptophan residues of creatine kinase: a fluorescence study. *Biochemistry*, **24**:7172-7178, 1985.

Meyer RA: A linear model of muscle respiration explains monoexponential phosphocreatine changes. *Am J Physiol*, **254**: C548-553, 1988.

Meyer RA, Brown TR, Kushmerick MJ: Phosphorus nuclear magnetic resonance of fast- and slow-twitch muscle. *Am J Physiol*, **248**:C279-287, 1985.

Millman BM: The filament lattice of striated muscle. *Physiol Rev.*, **78**:359-391, 1998.

Milner-White EJ and Watts DC: Inhibition of adenosine 5'-triphosphate-creatine phosphotransferase by substrate anion complexes. *Biochem J.*, **122**:727–740, 1971.

Mommaerts WF: Energetics of muscular contraction. *Physiol Rev*, **49**:427-508, 1969.

Mommaerts WF, Wallner A: The break-down of adenosine triphosphate in the contraction cycle of the frog sartorius muscle. *J. Physiol.*, **193**:343-357, 1967.

Morrison JF and James E: The mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate-creatine phosphotransferase. *Biochem J.*, **97**:37–52, 1965.

Morrison JF and Cleland WW: Isotope exchange studies of the mechanism of the reaction catalyzed by adenosine triphosphate: creatine phosphotransferase. *J Biol Chem.*, **241**:673–683, 1966.

- Morrison JF and White A:** Isotope exchange studies of the reaction catalyzed by ATP: creatine phosphotransferase. *Eur J Biochem.*, **3**:145–152, 1967.
- Morrison JF:** Arginine kinase and other invertebrate guanidino kinases. In: *The Enzymes*. Vol. 8. pp.457–486. Boyer, P.D., Ed., Academic Press, New York., NY, 1973.
- Mu J, Brozinick JT, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ:** A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell* **7**: 1085-1094, 2001.
- Muller JM, Isele U, Metzger E, Rempel A, Moser M, Pscherer A, Breyer T, Holubarsch C, Buettner R, Schule R:** FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J.*, **19**(3):359-69, 2000.
- Mühlebach SM, Gross M, Wirz T, Wallimann T, Perriard JC, Wyss M:** Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes. *Mol Cell Biochem*, **133-134**:245-262, 1994.
- Murali N, Jarori GK, Rao BD:** Two-dimensional transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy (TRNOESY) studies of nucleotide conformations in arginine kinase complexes. *Biochemistry*, **33**:14227-14236, 1994.
- Nave R., Fürst DO, Weber K:** Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *J. Cell Biol.*, **109**(5):2177–2187, 1989.
- Needham DM, Needham J, Baldwin E, Yudkin Y:** A comparative study of the phosphagens, with some remarks on the origin of the vertebrates. *Nature*, **110**:260-294, 1932.
- Nevinsky GA, Ankilova VN, Lavrik OI, Mkrtychyan ZS, Nersesova LS, Akopyan JI:** Functional non-identity of creatine kinase subunits of rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett*, **149**:36–40, 1982.
- Noda L, Kuby SA, Lardy HA:** Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. II. Homogeneity and physiochemical properties. *J Biol Chem*, **209**:203-210, 1954a.
- Noda L, Kuby SA, Lardy HA:** Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. IV. Equilibrium studies. *J Biol Chem*, **210**:83-95, 1954b.
- Obermann WM, Plessmann U, Weber K, Furst DO:** Purification and biochemical characterization of myomesin, a myosin-binding and titin-binding protein, from bovine skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.*, **233**(1):110-5, 1995.
- Obermann WM, Gautel M, Weber K, Furst DO:** Molecular structure of the sarcomeric M-band: mapping of titin and myosin binding domains in myomesin and the identification of a potential regulatory phosphorylation site in myomesin. *EMBO. J.*, **16**:211–220, 1997.
- O'Gorman E, Fuchs KH, Tittmann P, Gross H, Wallimann T:** Crystalline mitochondrial inclusion bodies isolated from creatine depleted rat soleus muscle. *J. Cell. Sci.*, **110**:1403-1411, 1997.
- Olcott MC, Bradley ML, Haley BE:** Photoaffinity labeling of creatine kinase with 2-azido- and 8-azidoadenosine triphosphate: identification of two peptides from the ATP-binding domain. *Biochemistry*, **33**:11935-11941, 1994.
- O'Sullivan WJ:** The reaction of creatine kinase with dithiobisnitrobenzoic acid. Formation of derivatives of the enzyme. *Int. J. Protein Res.*, **3**:139-147, 1971.
- Pardo JV, Siliciano JD, Craig SW:** A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ('costameres') mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**:1008–1012, 1983.
- Patel TJ, Lieber RL:** Force transmission in skeletal muscle: from actomyosin to external tendons. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, **25**:321–363, 1998.
- Perraut C, Clottes E, Leydier C, Vial C, Marcillat O:** Role of quaternary structure in muscle creatine kinase stability: tryptophan 210 is important for dimer cohesion. *Proteins*, **32**:43-51, 1998.

Perriard JC, Caravatti M, Perriard ER, Eppenberger HM: Quantitation of creatine kinase isoenzyme transition in differentiating chicken embryonic breast muscle and myogenic cell cultures by immunoadsorption. *Arch Biochem Biophys*, **191**:90-100, 1978.

Perry SV: Creatine phosphokinase and the enzymic and contractile properties of the isolated myofibril. *Biochem. J.*, **57**(3):427-34, 1954.

Pierobon-Bormioli S: Transverse sarcomere filamentous systems: 'Z-and M-cables'. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **2**:401-413, 1981.

Pizon V, Iakovenko A, Ven PF, van der Kelly R, Fatu C, Furst DO, Karsenti E, Gautel M: Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein. *J. Cell. Sci.*, **115**(Pt 23):4469-82, 2002.

Ponticos M, Lu QL, Morgan JE, Hardie DG, Partridge TA, Carling D: Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J* **17**: 1688-1699, 1998.

Price NC and Hunter MG: Non-identical behaviour of the subunits of rabbit muscle creatine kinase. *Biochim Biophys Acta*, **445**:364-376, 1976.

Price MG, Gomer RH: Skelemin, a cytoskeletal M-disc periphery protein, contains motifs of adhesion/recognition and intermediate filament proteins. *J. Biol. Chem.*, **268**:21800-21810, 1993.

Quemeneur E, Eichenberger D, Goldschmidt D, Vial C, Beauregard G, Potier M: The radiation inactivation method provides evidence that membrane-bound mitochondrial creatine kinase is an oligomer. *Biochem Biophys Res Commun*, **153**:1310-1314, 1988.

Quemeneur E, Marcillat O, Eichenberger D, Vial C: Isoelectric point heterogeneity of the two oligomeric forms of heart mitochondrial creatine kinase. *Biochem. Int.*, **18**:365-371, 1989.

Quest AF, Eppenberger HM, Wallimann T: Purification of brain-type creatine kinase (B-CK) from several tissues of the chicken: B-CK subspecies. *Enzyme*, **41**:33-42, 1989.

Quest AF, Eppenberger HM, Wallimann T. Two different B-type creatine kinase subunits dimerize in a tissue-specific manner. *FEBS Lett*, **262**:299-304, 1990.

Raimbault C, Buchet R, Vial C: Changes of creatine kinase secondary structure induced by the release of nucleotides from caged compounds. An infrared difference-spectroscopy study. *Eur. J. Biochem.*, **240**:134-142, 1996.

Rao BD, Cohn M: ³¹P nuclear magnetic resonance of bound substrates of arginine kinase reaction: chemical shifts in binary, ternary, quaternary, and transition state analog complexes. *J. Biol. Chem.*, **252**:3344-3350, 1977.

Rao JK, Bujacz G, Wlodawer A: Crystal structure of rabbit muscle creatine kinase. *FEBS Lett.*, **439**:133-137, 1998.

Reed GH, Cohn M: Structural changes induced by substrates and anions at the active site of creatine kinase. Electron paramagnetic resonance and nuclear magnetic relaxation rate studies of the manganous complexes. *J. Biol. Chem.*, **247**:3073-3081, 1972.

Robin Y: Biological distribution of guanidines and phosphagens in marine annelida and related phyla with a note on pluriphosphagens. *Comp. Biochem. Physiol.*, **12**:347-367, 1964.

Robin Y: Phosphagens and molecular evolution in worms. *Biosystems*, **6**:49-56, 1974.

Rojo M, Hovius R, Demel RA, Nicolay K., Wallimann: Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J Biol Chem* **266**: 20290-20295, 1991b.

- Rojo M, Wallimann T:** The mitochondrial ATP/ADP carrier: interaction with detergents and purification by a novel procedure. *Biochim Biophys Acta* **1187**: 360-367, 1994.
- Rosenberg UB, Eppenberger HM, Perriard JC:** Occurrence of Heterogenous Forms of the Subunits of Creatine Kinase in Various Muscle and Nonmuscle Tissues and Their Behaviour during Myogenesis. *Eur J Biochem* **116**: 87-92, 1981.
- Rosevear PR, Desmeules P, Kenyon GL, Mildvan AS:** Nuclear magnetic resonance studies of the role of histidine residues at the active site of rabbit muscle creatine kinase. *Biochemistry*, **20**:6155-6164, 1981.
- Rossi AM, Eppenberger HM, Volpe P, Cotrufo R, Wallimann T:** Muscle-type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios. *J. Biol. Chem.*, **265**:5258-5266, 1990.
- Roustan C, Kassab R, Pradel LA, van Thoai N:** Interaction of ATP:guanidine phosphotransferases with their substrates, studies by differential spectrophotometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **167**:326-338, 1968.
- Russell MW, Raeker MO, Korytkowski KA, Sonneman KJ:** Identification, tissue expression and chromosomal localization of human Obscurin-MLCK, a member of the titin and Dbl families of myosin light chain kinases. *Gene*, **282(1-2)**:237-46, 2002.
- Saks VA, Ventura-Clapier R:** Biochemical organization of energy metabolism in muscle. *J. Biochem. Org.*, **1**:9-29, 1992.
- Saks AV, Wallimann T, Schlattner U:** Calcium and energy transfer. *J. Physiol.*, **565(Pt 2)**:703, 2005.
- Satyajit SM, Boyd D, Haley E:** ATP Nucleotidylation of creatine kinase. *Biochemistry*, **38**:8492-8500, 1999.
- Savabi F:** Interaction of creatine kinase and adenylate kinase systems in muscle cells. *Mol. Cell. Biochem.*, **133-134**:145-152, 1994.
- Seraydarian MW, Abbott BC:** The role of the creatine--phosphorylcreatine system in muscle. *J Mol Cell Cardiol.*, Oct;**8(10)**:741-6, 1976.
- Sharov VG, Saks VA, Smirnov VN, Chazov EI:** An electron microscopic histochemical investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **468(3)**:495-501, 1977.
- Sheikh S, Mukunda K, Katiyar SS:** Evidence for proximal cysteine and lysine residues present at the nucleotide domain of rabbit muscle creatine kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1203**:276-281, 1993.
- Shen YQ, Tang L, Zhou HM, Lin ZJ:** Structure of human muscle creatine kinase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **57**:1196-1200, 2001.
- Schimerlik MI and Cleland WW:** Inhibition of creatine kinase by chromium nucleotides. *J Biol Chem.*, **248**:8418-8423, 1973.
- Schlattner U, Forstner N, Eder M, Stachowiak O, Fritz-Wolf K, Wallimann T:** Functional aspects of the X-ray structure of mitochondrial creatine kinase: a molecular physiology approach. *Mol. Cell. Biochem.*, **184**:125-140, 1998.
- Schlattner U, Wallimann T:** A quantitative approach to membrane binding of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase using surface plasmon resonance. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **32**:123-131, 2000.
- Schlattner U, Dolder M, Wallimann T, Tokarska-Schlattner M:** Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J. Biol. Chem.*, **276(51)**:48027-30, 2001.

Schlattner U, Gehring F, Vernoux N, Tokarska-Schlattner M, Neumann D, Marcillat O, Vial C, Wallimann T: C-terminal lysines determine phospholipid interaction of sarcomeric mitochondrial creatine kinase. *J. Biol. Chem.*, **279(23)**:24334-42, 2004.

Schlegel J, Zurbriggen B, Wegmann G, Wyss M, Eppenberger HM, Wallimann T: Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships. *J Biol Chem*, **263**:16942-16953, 1988a.

Schlegel J, Wyss M, Schurch U, Schnyder T, Quest A, Wegmann G, Eppenberger HM, Wallimann T: Mitochondrial creatine kinase from cardiac muscle and brain are two distinct isoenzymes but both form octameric molecules. *J Biol Chem*, **263**:16963-16969, 1988b.

Schnyder T, Engel A, Lustig A, Wallimann T: Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. II. Characterization of dimers and octamers by ultracentrifugation, direct mass measurements by scanning transmission electron microscopy, and image analysis of single mitochondrial creatine kinase octamers. *J Biol Chem*, **263**:16954-16962, 1988.

Schnyder T, Sargent DF, Richmond TJ, Eppenberger HM, Wallimann T: Crystallization and preliminary X-ray analysis of two different forms of mitochondrial creatine kinase from chicken cardiac muscle. *J. Mol. Biol.*, **216**:809-812, 1990.

Schnyder T, Winkler H, Gross H, Eppenberger HM, Wallimann T: Crystallization of mitochondrial creatine kinase. Growing of large protein crystals and electron microscopic investigation of microcrystals consisting of octamers. *J. Biol. Chem.*, **266**:5318-5322, 1991.

Schulte HR, Weijers PJ, Wit-Peeters EM: The localization of mitochondrial creatine kinase, and its use for the determination of the sidedness of submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta*, **291**:764-773, 1973.

Sisternans EA, Klaassen CH, Peters W, Swarts HG, Jap PH, De Pont JJ, Wieringa B: Co-localization and functional coupling of creatine kinase B and gastric H⁺/K⁺-ATPase on the apical membrane and the tubulovesicular system of parietal cells. *Biochem J* **311**: 445-451, 1995.

Sjostrom M, Squire JM: Fine structure of the A-band in cryo-sections. The structure of the A-band of human skeletal muscle fibres from ultra-thin cryo-sections negatively stained. *J. Mol. Biol.*, **109**:49-68, 1977.

Solaro RJ, Pang DC, Briggs PN: The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100. *Biochim Biophys Acta* **245**: 259-262, 1971.

Soldati T, Schafer BW, Perriard JC: Alternative ribosomal initiation gives rise to chicken brain-type creatine kinase isoproteins with heterogeneous amino termini. *J. Biol. Chem.*, **265**:4498-4506, 1990.

Stefl B, Mejsnar JA, Janovska A: Energy metabolism of rat skeletal muscle modulated by the rate of perfusion flow. *Exp. Physiol.*, **84**:651-663, 1999.

Stefl B, Mejsnar JA, Karasová J: Levels of energy-related metabolites in intact and isolated perfused-superfused rat skeletal muscles. *Physiol Res*, **43**:175-180, 1994.

Steiner F, Weber K, Furst D: M-band proteins myomesin and skelemin are encoded by the same gene: analysis of its organisation and expression. *Genomics*, **56**:78-89, 1999.

Stolz M, Wallimann T: Myofibrillar interaction of cytosolic creatine kinase (CK) isoenzymes: allocation of N-terminal binding epitope in MM-CK and BB-CK. *J. Cell Sci.*, **111**:1207-1216, 1998.

Stolz M, Kraft T, Wallimann T: The isoenzyme-diagnostic regions of muscle-type creatine kinase, the M-260 and M-300 box, are not responsible for its binding to the myofibrillar M-band. *Eur. J. Cell. Biol.*, **77**:1-9, 1998.

Stolz M, Hornemann T, Schlattner U, Wallimann T: Mutation of conserved active-site threonine residues in creatine kinase affects autophosphorylation and enzyme kinetics. *Biochem. J.*, **363(Pt 3)**:785-792, 2002.

- Strehler EE, Carlsson E, Eppenberger HM, Thornell LE:** Ultrastructural localization of M-band proteins in chicken breast muscle as revealed by combined immunocytochemistry and ultramicrotomy. *J. Mol. Biol.*, **166**:141–158, 1983.
- Takasawa T, Shiokawa H:** Isolation and Properties of Creatine Kinase from porcine skeletal muscle. *J Biochem* **90**: 195-204, 1981.
- Takasawa T, Shiokawa H:** Isolation of Three Creatine Kinase MM from Porcine Skeletal Muscle. *J Biochem* **93**: 375-382, 1983.
- Takasawa T, Onodera M, Shiokawa H:** Properties of Three Creatine Kinase MM from porcine Skeletal Muscle. *J Biochem* **93**: 389-395, 1983.
- Thornell LE, Carlsson E, Kugelberg E, Grove BK:** Myofibrillar M-band structure and composition of physiologically defined rat motor units. *Am. J. Physiol.*, **253(3 Pt 1)**:C456-68, 1987.
- Trask RV, Strauss AW, Billadello JJ:** Developmental regulation and tissue-specific expression of the human muscle creatine kinase gene. *J Biol Chem*, **263**:17142-17149, 1988.
- Trinick J, Lowey S:** M-protein from chicken pectoralis muscle: isolation and characterization. *J. Mol. Biol.*, **113(2)**:343–368, 1977.
- Tskhovrebova L, Trinick J:** Titin: properties and family relationships. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**:679–689, 2003.
- Turner DC, Wallimann T, Eppenberger HM:** A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70(3)**:702-705, 1973.
- Uyeda K, Racker E:** Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism. 8. The regulatory function of phosphate in glycolysis. *J Biol Chem*, **240**:4689-4693, 1965.
- van Thoai N:** Homologous phosphagen kinases. In *Homologous enzymes and biochemical evolution*, N. van Thoai, J. Roche, ed. (New York: Gordon & Breach), pp.199-229, 1968.
- Vaughan KT, Weber FE, Fischman DA:** cDNA cloning and sequence comparisons of human and chicken muscle C-protein and 86kD protein. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **46**:167-77, 1992.
- Veech RL, Lawson JW, Cornell NW, Krebs HA:** Cytosolic phosphorylation potential. *J Biol Chem*, **254**:6538-6547, 1979.
- Vendelin M, Eimre M, Seppet E, Peet N, Andrienko T, Lemb M, Engelbrech J, Seppet EK, Saks VA:** Intracellular diffusion of adenosine phosphates is locally restricted in cardiac muscle. *Mol. Cell. Biochem.*, **256-257(1-2)**:229-241, 2004.
- Ventura-Clapier R, Saks VA, Vassort G, Lauer C, Elizarova GV:** Reversible MM-creatine kinase binding to cardiac myofibrils. *Am. J. Physiol.*, **253**:C444-455, 1987.
- Vinkemeier U, Obermann W, Weber K, Fürst DO:** The globular head domain of titin extends into the center of the sarcomeric M band. cDNA cloning, epitope mapping and immunoelectron microscopy of two titin-associated proteins. *J. Cell Sci.*, **106(Pt 1)**:319–330, 1993.
- Wahlefeld AW, Siedel J:** Metabolites 3: lipids, amino acid related compounds: creatinine and creatine. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of enzymatic analysis*, vol. **VIII**. 3rd edn, Verlag Chemie, Weinheim, pp 488–507, 1995.
- Wallimann T, Turner DC, Eppenberger HM:** Localization of creatine kinase isoenzymes in myofibrils. I. Chicken skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **75(2 Pt 1)**:297-317, 1977.
- Wallimann T, Eppenberger HM:** Localization and function of M-line-bound creatine kinase. M-band model and creatine phosphate shuttle. *Cell. Muscle Motil.*, **6**:239-285, 1985.

- Wallimann T, Schnyder T, Schlegel J, Wyss M, Wegmann G, Rossi AM, Hemmer W, Eppenberger HM, Quest AF:** Subcellular compartmentation of creatine kinase isoenzymes, regulation of CK and octameric structure of mitochondrial CK: important aspects of the phosphoryl-creatine circuit. *Prog Clin Biol Res*, **315**:159-176, 1989.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM:** Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the "PCr-circuit" for cellular energy homeostasis. *Biochem. J.*, **281**:21-40, 1992.
- Wallimann T, Hemmer W:** Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol. Cell. Biochem*, 133-134:193-220, 1994
- Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, O'Gorman E, Ruck A, Brdiczka D:** Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors*, **8**:229-234, 1998.
- Wang K, Ramirez-Mitchell R:** A network of transverse and longitudinal intermediate filaments is associated with sarcomeres of adult vertebrate skeletal muscle. *J. Cell Biol.*, **96**:562-570, 1983.
- Wang XC, Zhou HM, Wang ZX, Tsou CL:** Is the subunit the minimal functional unit of creatine kinase? *Biochim Biophys Acta*, **1039**:313-317, 1990.
- Wang ZX and Pan XM:** Kinetic differentiation between ligand-induced and pre-existent asymmetric models. *FEBS Lett.*, **388**:73-75, 1996.
- Watts DC:** Creatine kinase (adenosine 5_′-triphosphate-creatine phosphotransferase). In: *The Enzymes*. Vol. 8. pp. 383-455. Boyer, P.D., Ed., Academic Press, New York, NY, 1973.
- Wegmann G, Zanolla E, Eppenberger HM, Wallimann T:** In situ compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: the acto-myosin overlap zone as a molecular sieve. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **13**:420-435, 1992.
- West JJ, Nagy B, Gergely J:** Free adenosine diphosphate as an intermediary in the phosphorylation by creatine phosphate of adenosine diphosphate bound to actin. *J Biol Chem*, **242**:1140-1145, 1967.
- Williams MW, Bloch RJ:** Differential distribution of dystrophin and beta-spectrin at the sarcolemma of fast twitch skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **20**:383-393, 1999.
- Winder WW:** Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* **91**: 1017-1028, 2001.
- Wirz T, Brandle U, Soldati T, Hossle JP, Perriard JC:** A unique chicken B-creatine kinase gene gives rise to two B-creatine kinase isoproteins with distinct N termini by alternative splicing. *J Biol Chem*, **265**:11656-11666, 1990.
- Witt SH, Granzier H, Witt CC, Labeit S:** MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J. Mol. Biol.*, **350**(4):713-22, 2005.
- Wood TD, Guan Z, Borders CL, Chen LH, Kenyon GL, McLafferty FW:** Creatine kinase: essential arginine residues at the nucleotide binding site identified by chemical modification and high-resolution tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**:3362-3365, 1998.
- Wright-Weber B, Held BC, Brown A, Grossman SH:** Immunological and physical comparison of monomeric and dimeric phosphagen kinases: some evolutionary implications. *Biochim Biophys Acta*, **1760**(3):364-371, 2006.
- Wyss M, Schlegel J, James P, Eppenberger HM, Wallimann T:** Mitochondrial creatine kinase from chicken brain. Purification, biophysical characterization, and generation of heterodimeric and heterooctameric molecules with subunits of other creatine kinase isoenzymes. *J Biol Chem*, **265**:15900-15908, 1990.

Wyss M, Smeitink J, Wevers R, Wallimann T: Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, **1102**:119-166, 1992.

Yamada T, Sugi H: Regulation of glycogenolysis in contracting frog skeletal muscle studied by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Prog Clin Biol Res*, **315**:149-157, 1989.

Young P, Ehler E, Gautel M: Obscurin, a giant sarcomeric Rho guanine nucleotide exchange factor protein involved in sarcomere assembly. *J. Cell Biol.*, **154(1)**:123-136, 2001.

Zhao TJ, Yan YB, Liu Y, Zhou HM: The generation of the oxidized form of creatine kinase is a negative regulation on muscle creatine kinase. *J. Biol. Chem.* **282**:12022-12029, 2007.

Zhou G, Somasundaram T, Blanc E, Parthasarathy G, Ellington WR, Chapman MS: Transition state structure of arginine kinase: implications for catalysis of bimolecular reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**:8449-8454, 1998.

Zhou G, Ellington WR, Chapman MS: Induced fit in arginine kinase. *Biophys. J.*, **78**:1541-1550, 2000.

Zurmanova J, Difato F, Malacova D, Mejsnar J, Stefl B, Zahradnik I: Creatine kinase binds more firmly to the A-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates. *Moll Cell Biochem.*, **305(1-2)**:55-61, 2007.

7. PŘÍLOHY

7.1. LITERÁRNÍ ÚVOD

7.1.1. Přehled genové exprese izoform CK a porovnání primárních struktur
(<http://www.genecards.org>)

CK alignment

>brain CKB

MPFSNSHNALKLRFPAAEDEFDL SAHNNHMAKVLTPELYAELRAKSTPSGFTLDDVIQTGVDNPGHPYIM
TVGCVAGDEESYEVFKDLFDPIIEDRHGGYKPSDEHKTDLNPDLNQQGDDLDPNYVLSRVRTGRSIRGF
CLPPHCSRGERRAIEKLAVEALSSLDGDLAGRYYALKSMTEAEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMARD
WPDARGIWHNDNKTFVLVWVNEEDHLRVISMQKGGNMKEVFRFCTGLTQIETLFSKDYEFMWNPHLGYI
LTCPSNLGTGLRAGVHIKLPNLGKHEKFSEVLKRLRLQKRGTGGVDTAAVGGVFDVSNADRLGFSEVELV
QMVVDGVKLLIEMEQRLEQQQAIDDLMPAQK

>muscle CKM

MPFGNTHNKFKLNYKPEEEYPDL SKHNNHMAKVLTLELYKCLRDKETPSGFTVDDVIQTGVDNPGHPFIM
TVGCVAGDEESYEVFKELFDPIISDRHGGYKPTDKHKTDLNHENLKGDDLDPNYVLSRVRTGRSIRKGY
TLPPHCSRGERRAVEKLSVEALNSLTGEFKGKYPLKSMTEKEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMARD
WPDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVISMEKGGNMKEVFRFCVGLQKIEEIFKKAGHPFMWNQHLGYV
LTCPSNLGTGLRGGVHVKLAHLSKHPKFEEILTRLRLQKRGTGGVDTAAVGVSFVFDVSNADRLGSSEVEQV
QLVVDGVKLMVEMEKKLEKQSIDDMIPAQK

>CKMT1A

MAGPFSRLLSARPGRLRLLAGAGSLAAGFLLRPEPVRAASERRRLYPPSAEYPDLRKHNNCMASHLTPA
VYARLCDKTTPTGWTLDQCIQTGVDNPGHPFIKTVGMVAGDEETYEVFADLFDPIQERHNGYDPRMTKH
TTDL DASKIRSGYFDERYVLSRVRTGRSIRGLSLPACTRAERREVERVVDALSGLKGDLAGRYRSL
EMTEAEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLTAAGMARDWPDARGIWHNNEKSFLIWWNEEDHTRVISMEKGGNMK
RVFERFCRGLKEVERLIQERGWEFMWNERLGYILTCPSNLGTGLRAGVHIKLPKSKDSRFPKILENRLR
QKRGTGGVDTAATGGVFDISNLDRLGKSEVELVQLVIDGVNYLIDCERRLERGQDIRIPTPVIHTKH

>CKMT1B

MAGPFSRLLSARPGRLRLLAGAGSLAAGFLLRPEPVRAASERRRLYPPSAEYPDLRKHNNCMASHLTPA
VYARLCDKTTPTGWTLDQCIQTGVDNPGHPFIKTVGMVAGDEETYEVFADLFDPIQERHNGYDPRMTKH
TTDL DASKIRSGYFDERYVLSRVRTGRSIRGLSLPACTRAERREVERVVDALSGLKGDLAGRYRSL
EMTEAEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLTAAGMARDWPDARGIWHNNEKSFLIWWNEEDHTRVISMEKGGNMK
RVFERFCRGLKEVERLIQERGWEFMWNERLGYILTCPSNLGTGLRAGVHIKLPKSKDSRFPKILENRLR
QKRGTGGVDTAATGGVFDISNLDRLGKSEVELVQLVIDGVNYLIDCERRLERGQDIRIPTPVIHTKH

>CKMT2

MASIFSKLLTGRNASLLFATMGTSVLTTGYLLNRQKVCAEVREQPRLFPPSADYPDLRKHNNCMAECLTP
 AIYSKLRNKVTPNGYTLQCIQTGVDNPGHPFIKTVGMVAGDEESYEVFADLFDVPIKLRHNGYDPRVMK
 HTTDL DASKITQGQFDEHYVLSRVRTGRSIRGLSLPPACTRAERREVENVAITALEGLKGDLAGRYYKL
 SEMTEQDQQRLIDDHFLFDKPVSPLLTCAGMARDWPDARGIWHNYDKTFLIWIWNEEDHTRVISMEKGGNM
 KRVFERFCRGLKEVERLIQERGWEFMWNERLGYILTCPSNLGTGLRAGVHVRIPKLSKDPFRFSKILENLR
 LQKRGTGGVDTAAVADVDISNIDRIGRSEVELVQIVIDGVNYLVDCEKKLERGQDIKVPPLPQFGKK

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

muscle	MPFGNTHNKFKLNYKPEEEYPDLSKHNNHMAKVLTLLEYKLRDKETPSGFTVDDVIQTG	60
brain	MPFSNSHNALKLRFPAEDEFDLSAHNNHMAKVLTPELYAELRAKSTPSGFTLDDVIQTG	60
	.*:** :** . : .**:*: * :*** ** * :** * .*****:*****	
muscle	VDNPGHPFIMTVGCVAGDEESYEVFKELFDPIISDRHGGYKPTDKHKTDLNHENLKGDD	120
brain	VDNPGHPYIMTVGCVAGDEESYEVFKDLFDPIIEDRHGGYKPSDEHKTDLNPDNLQGGDD	120
	*****:*****:*****:*****.*****:*****:*****:*****:*****	
muscle	LDPNYVLSRVRTGRSIRKGYTLPPHCSRGERRAVEKLSVEALNSLTGEFKGKYYPLKSMT	180
brain	LDPNYVLSRVRTGRSIRGFCLPPHCSRGERRAIEKLAVEALSSLDGDLAGRYYALKSMT	180
	*****:*****:*****:*****:*****.*** * : : * :** .*****	
muscle	EKEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMARDWPDARGIWHNDNKSFLVWVNEEDHLRVISM	240
brain	EAEQQQLIDDHFLFDKPVSPLLLASGMARDWPDARGIWHNDNKTFLVWVNEEDHLRVISM	240
	* *****:*****	
muscle	EKGGNMKEVFRFCVGLQKIEEIFKKAGHPFMWNQHLGYVLTCPNSLGTGLRGGVHVKLA	300
brain	QKGGNMKEVFRFCTGLTQIETLFSKDYEFMWNPHLGYILTCPSNLGTGLRAGVHIKLP	300
	:***** **.* ** :** :** . : :*** ***:*****.***:**.	
muscle	HLSKHPKFEEILTRLRLQKRGTGGVDTAAVGSVFDVSNADRLGSSEVEQVQLVVDGVKLM	360
brain	NLGKHEKFSEVLKRLRLQKRGTGGVDTAAVGGVFDVSNADRLGFSEVELVQMVVDGVKLL	360
	:*.* **.*:**.* *****.***** ** * ** :*****:	
muscle	VEMEKKLEKQSIDDMIPAQK	381
brain	IEMEQRLEQQQAIDDLMPAQK	381
	:***:**:**:***:***	

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

CKMT1A	MAGPFSRLLSARPGRLRLALAGAGSLAAGFLLRPEPVRAAS-ERRRLYPPSAEYPDLRKH	59
CKMT1B	MAGPFSRLLSARPGRLRLALAGAGSLAAGFLLRPEPVRAAS-ERRRLYPPSAEYPDLRKH	59
CKMT2	MASIFSKLLTGRNASLLFATMGTSVLTTGYLLNRQKVCAEVREQPRLFPPSADYPDLRKH	60
	** . **:*:*. * . ** * :. :**:*:*** . : * * * : ** :*****:*****	
CKMT1A	NNCMASHLTPAVYARLCKDTPPTGWTLQCIQTGVDNPGHPFIKTVGMVAGDEETYEVFA	119
CKMT1B	NNCMASHLTPAVYARLCKDTPPTGWTLQCIQTGVDNPGHPFIKTVGMVAGDEETYEVFA	119
CKMT2	NNCMAECLTPAIYSKLRNKVTPNGYTLQCIQTGVDNPGHPFIKTVGMVAGDEESYEVFA	120
	*****. *****:*** * :*.* * :*****:*****:*****:*****	
CKMT1A	DLFDVPIQERHNGYDPTMKHTTDL DASKIRSGYFDERYVLSRVRTGRSIRGLSLPPAC	179


```

CKMT1B      ERGWEFMWNERLGYILTCPSNLGTGLRAGVHIKLPKLSKDSRFPKILENLRQLQKRGTTGGV 358
CKMT2      ERGWEFMWNERLGYILTCPSNLGTGLRAGVHVRIPKLSKDPFRFSKILENLRQLQKRGTTGGV 359
brain      SKDYEFMWNPHLGYILTCPSNLGTGLRAGVHIKLPNLGKHEKFSEVLKRLRLQKRGTTGGV 325
muscle     KAGHPFMWNQHLGYVLTCPNLGTGLRGGVHVLAHLKHPKFEELTRLRLQKRGTTGGV 325
          . .   **** :***:*****.***::: . *. * . :* :* .*****

CKMT1A      DTAATGGVFDISNLDRLGKSEVELVQLVIDGVNYLIDCERRLERGQDIRIPTPVIHTKH- 417
CKMT1B      DTAATGGVFDISNLDRLGKSEVELVQLVIDGVNYLIDCERRLERGQDIRIPTPVIHTKH- 417
CKMT2      DTAAVADVYDISNIDRIGRSEVELVQIVIDGVNYLVDCEKKLERGQDIKVPPLPQFGKK 419
brain      DTAAVGGVFDVSNADRLGFSEVELVQMVVDGVKLLIEMEQRLEQQQAIDDLMPAQK---- 381
muscle     DTAAVGSVFDVSNADRLGSSEVEVQLVVDGVKLMVEMEKKLEKQSIDDMIPAQK---- 381
          ****. . .*:*** **:* **** **:****: ::: *::**:* * * :

```

7.1.2. Sekvence kreatinkinázy (EC 2.7.3.2); M – izoforma; králík

1 MPFGNTHNKY KLNKSEEEY PDLKHNHNM AKVLTPDLYK KLRDKETPSG FTLDDVIQTG
61 VDNPGHPFIM TVGCVAGDEE SYTVFKDLFD PIIQDRHGGF KPTDKHKTDL NHENLKGGDD
121 LDPHYVLSSR VRTGRSIKGY TLPPHCSRGE RRAVEKLSVE ALNSLTGEFK GKYYPLKSMT
181 EQEQQLIDD HFLFDKPVSP LLLASGMARD WPDARGIWHN DNKSFLVWVN EEDHLRVISM
241 EKGGNMKEVF RRFCVGLQKI EEIFKKAGHP FMWNEHLGYV LTCPSNLGTG LRGGVHVKLA
301 HLSKHPKFEE ILTRLRLQKR GTGGVDTA AV GSVFDISNAD RLGSEVEQV QLVVDGVKLM
361 VEMEKKLEKG QSIDDMIPAQ K

A	Alanin	G	Glycin	M	Methionin	S	Serin
C	Cystein	H	Histidin	N	Asparagin	T	Threonin
D	Asparagová kyselina	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin
E	Glutamová kyselina	K	Lysin	Q	Glutamin	W	Tryptofan
F	Fenylalanin	L	Leucin	R	Arginin	Y	Tyrosin

7.2. METODIKA PRÁCE

7.2.1. Složení použitých médií pro přípravu myofibrilární frakce a eluci CK z myofibril

ad 1) Homogenizační medium, nastavit pH=7.0 KOH (Wallimann and Eppenberger, 1985)

	MW	Molarita	ad 1000ml
KCl	74,55	0,1 M	7,460 g
EGTA	380,40	1 mM	0,380 g
EDTA	372,24	5 mM	1,860 g
DTT	154,20	5 mM	0,771 g
PMSF	174,20	0,1 mM	17 mg
NaN₃	65,10	3 mM	195 mg

ad 2) Medium s nízkým obsahem iontů, nastavit pH=7.1 KOH (Arrio-Dupont and De Nay, 1986)

	MW	Molarita	ad 1000ml
EDTA	372,24	3 mM	1,120 g
MOPS	209,27	20 mM	4,190 g
D-MANITOL	182,18	230 mM	41,900 g
DTT	154,20	5 mM	0,771 g

ad 3) Bezvápňkový izotonický roztok, nastavit pH=7.0 KOH

	MW	Molarita	ad 1000ml
NaCl	58,44	121 mM	7 g
EGTA	380,40	1 mM	0,380 g
EDTA	372,24	5 mM	1,860 g
DTT	154,20	0,2 mM	30,84 mg
PMSF	174,20	0,1 mM	17 mg
NaN₃	65,10	3 mM	195 mg

ad 4) Relaxační pufr, nastavit pH=7.1 KOH

	MW	Molarita	ad 1000ml
HEPES	238,3	20 mM	4,77 g
MgCl₂	95.20	1,2 mM	114,24 mg
EGTA	380,40	5 mM	1,9 g
EDTA	372,24	1 mM	0,372 g
DTT	154,20	2 mM	30,84 mg
PMFS	174,20	0,1 mM	17 mg
NaN₃	65,10	3 mM	195 mg
Propionát draselný		100 mM	
Ap₅A	916,4	0,2 mM	183 mg

7.2.2. Eluční protokoly

Protokol eluce:

Ekvilibrační pufr (Buffer A) pH = 8,72

Eluční pufr (Buffer B) pH = 8,7

step number	start (ml)	step
1	0,0	Collect Fractions of size 1.00 ml during entire run
2	0,0	Isocratic Flow with 100% Buffer A: 5 mM Tris, pH 8.72, 0% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.7 at 1.00 ml/min for 1.0 ml
3	1,0	Static Loop: Inject 1.0 ml sample at 1.00 ml/min for 1 min
4	2,0	Isocratic Flow with 100% Buffer A: 5 mM Tris, pH 8.72, 0% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.7 at 1.00 ml/min for 5.0 ml
5	7,0	Linear gradient with 0% to 50% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.7 at 1.00 ml/min for 12.0 ml
6	19,0	Linear gradient with 50% to 100% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.7 at 1.00 ml/min for 6.0 ml
7	25	Isocratic Flow with 0% Buffer A: 5 mM Tris, pH 8.72, 100% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.7 at 1.00 ml/min for 3.0 ml
8	28	Isocratic Flow with 100% Buffer A: 5 mM Tris, pH 8.72, 0% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.7 at 1.00 ml/min for 3.0 ml
9	31	Isocratic Flow with 0% Buffer A: 5 mM Tris, pH 8.72, 100% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.7 at 1.00 ml/min for 5.0 ml
10	36	End of protocol

Protokol eluce: - změna elučních podmínek = změna pH

Ekvilibrační pufr (Buffer A) pH = 9,02

Eluční pufr (Buffer B) pH = 9,0

step number	Start (ml)	step
1	0.0	Collect Fractions of size 1.00 ml during entire run
2	0.0	Isocratic Flow with 100% Buffer A: 5 mM Tris, pH 9.02, 0% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 9.0 at 1.00 ml/min for 1.0 ml
3	1.0	Static Loop: Inject 1.0 ml sample at 1.00 ml/min for 1 min
4	2.0	Isocratic Flow with 100% Buffer A: 5 mM Tris, pH 9.02, 0% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 9.0 at 1.00 ml/min for 5.0 ml
5	7.0	Linear gradient with 0% to 50% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 9.0 at 1.00 ml/min for 12.0 ml
6	19.0	Linear gradient with 50% to 100% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 9.0 at 1.00 ml/min for 6.0 ml
7	25.0	Isocratic Flow with 0% Buffer A: 5 mM Tris, pH 9.02, 100% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 9.0 at 1.00 ml/min for 3.0 ml
8	28.0	Isocratic Flow with 100% Buffer A: 5 mM Tris, pH 9.02, 0% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 9.0 at 1.00 ml/min for 3.0 ml
9	31.0	Isocratic Flow with 0% Buffer A: 5 mM Tris, pH 9.02, 100% Buffer B: 5 mM Tris, 1 M NaCl, pH 9.0 at 1.00 ml/min for 5.0 ml
10	36.0	End of protocol

7.2.3. SDS-elektroforéza, zásobní roztoky

Roztok A: 29,4 g akrylamidu a 0,8 g N,N-methylenbisakrylamidu se rozpustí v H₂O a doplní na 100 ml H₂O. Roztok se přefiltruje přes 0,22 µm a skladuje v tmavé láhvi při 4°C. Roztok A by neměl být starší než 1 měsíc.

Roztok B: 10 g SDS na 100 ml H₂O. Roztok se skladuje při pokojové teplotě.

Roztok C: 9,1 g Tris se rozpustí v H₂O, upraví pH kyselinou chlorovodíkovou (HCl) na pH=8.8 a doplní H₂O na 100 ml. Roztok se skladuje při 4°C.

Roztok D: 3 g Tris se rozpustí v H₂O, upraví pH HCl na pH=6.8 a doplní H₂O na 100 ml. Roztok se skladuje při 4°C.

Roztok E: 30,3 g Tris, 144 g glycinu, 10 g SDS a doplnit H₂O na 1000 ml. Roztok se skladuje při pokojové teplotě.

Roztok F: 10 mg bromfenolové modři se rozpustí v 1 ml roztoku D. Roztok se skladuje v -20°C.

Roztok G: 1 g persíranu amonného se rozpustí a doplní na 10 ml H₂O. Roztok se skladuje se při -20°C.

Elektrodový pufr: 100 ml roztoku E se naředí 900 ml H₂O.

Vzorkový pufr: používá se k ředění vzorku v poměru 1 : 1 pro SDS-elektroforézu. Vzorkový pufr se skladuje při -20°C. Bromfenolová modř obsažená ve vzorkovém pufru slouží ke zviditelnění „čela“ při elektroforéze.

Složení vzorkového pufru: 2,4 ml roztoku D
2 ml roztoku B
1 ml glycerolu
4 ml H₂O
0,1 ml roztoku F
0,5 ml 0,1 M DTT

Množství roztoků pro přípravu polyakrylamidového gelu (různé hustoty) o tloušťce 1 mm pro Mini Protean II, Bio-Rad. Uvedené množství je pro 2 gely.

dělicí gel	12%	10%	zaostřovací gel	5%
A (ml)	4	3,4		0,8
B (μl)	100	100		50
C (ml)	5	5	D (ml)	2,5
H ₂ O (ml)	0,8	1,4		1,6
TEMED (μl)	5	5		5
G (μl)	100	100		50

Barvicí roztok Coomassie brilliant blue a Bismark brown R: byl připraven smícháním roztoků 0,2% (w/v) CBB a 0,05% (w/v) BBR, které se rozpustí v methanol:kys.octová:voda = 40 : 7 : 53 s každým procentovým dílem 1 : 0,75.

Odbarvovací roztok: methanol : kys.octová : voda = 40 : 7 : 53

Množství roztoků pro přípravu polyakrylamidového gelu (různé hustoty) o tloušce 1 mm pro Hoefer SE 600. Uvedené množství je pro 2 gely.

dělicí gel	12%	10%	zaostřovací gel	5%
A (ml)	20,8	17,4		4,4
B (μl)	520	520		260
C (ml)	13	13	D (ml)	6,5
H ₂ O (ml)	17,4	20,8		14,8
TEMED (μl)	20	20		20
G (μl)	235	235		235

7.2.4. Složení roztoků na stanovení aktivity CK v kyvetě ($v_{\Sigma} = 100$ ml)

Roztok č. 1 – zásobní pufrovací roztok

115 mM imidazol

11,5 mM octan hořečnatý

2,3 mM EDTA

- rozpustit v redestilované H_2O , upravit pH na 7.5 1 M kyselinou octovou a doplnit do 100 ml redestilovanou H_2O .

Roztok č. 2 – zásobní reagenční roztok pro CK

2,3 mM ADP

5,8 mM AMP

11,5 μ M Ap_5A

23 mM D-glukóza

2,3 mM NADP

- následující chemikálie rozpustit v roztoku č. 1, upravit pH=7.1 – 7,15 1 M kyselinou octovou a doplnit roztokem č. 1 do 100 ml. Roztok č. 2 rozlít do menších lahviček a zamrazit při -20 °C.

Roztok č. 3 – reagenční měřicí roztok

23 mM NAC

- **lahvičku s roztokem č. 2 rozmrazit na pokojovou teplotu, přidat NAC a upravit pH=6,7 1 M kyselinou octovou. Roztok č. 3 připravovat bezprostředně před použitím.**

Roztok č. 4 – substrát

345 mM PCr

- navážený PCr rozpustit v 10 ml redestilované H_2O .

Roztok pro ředění komerční CK – zásobní pufrovací roztok

115 mM imidazol

11,5 mM octan hořečnatý

2,3 mM EDTA

23 mM NAC

- chemikálie rozpustit v redestilované H₂O, upravit pH=6,7 1 M kyselinou octovou a doplnit do 50 ml redestilovanou H₂O.

Množství roztoků a chemikálií pipetované do kyvety pro 1 měření aktivity CK

2 ml roztoku č. 3

5 µl HK pro 1500U/ml

6,5 µl G6P-DH pro 700U/ml

100 µl vzorku či komerční CK (3 µg/ml)

START 5 minut počkat

200 µl roztoku č. 4

důkladně promíchat na magnetické míchače

Stabilita roztoků:

Roztok č. 1: při 4 °C 3 měsíce

Roztok č. 2: v -20 °C 2 měsíce

Roztok č. 3: při 4 °C 5 dní

při pokojové teplotě 24 hodin

v -20 °C 2 – 3 týdny

Roztok č. 4: při 4 °C 3 měsíce

v -20 °C12 měsíců

7.2.5. Složení roztoků pro měření proteinů / Lowry 1951

Roztok A:

2% Na_2CO_3 do 0,1 M NaOH (2 g Na_2CO_3 /100 ml 0,1 M NaOH)

- roztok A se může skladovat maximálně 48 hodin

Roztok B:

0,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 0,5 g NaK vinanu do 50 ml redestilované H_2O

- do hotového roztoku B přidat pecičku NaOH. Roztok B se může skladovat maximálně 3 týdny.

Roztok C:

Folin-Ciocalteu fenolové reagens rozředit s redestilovanou H_2O 1 : 2, vždy těsně před použitím

Roztok D:

rozředit 50 A : 1 B, vždy těsně před použitím

7.2.6. TCA precipitace

Roztoky: 24% kyselina trichloroctová (24 g CCl_3COOH + 76 ml H_2O)

- výsledná koncentrace TCA musí být 6%, tzn. že vzorek : TCA bude 3 : 1. Takto naředěný vzorek 10krát promíchám v mikrozkuhavce a nechám precipitovat 1 hodinu na ledu v ledničce. Po hodině vzorek stočím na max. otáčky po dobu 10 minut. Supernatant odpipetuji a vzorek naředím vychlazeným 96% EtOH, abych se zbavila veškeré TCA obsažené ve vzorku. Opět stočím při max. otáčkách po dobu 5 minut. Takto připravený vzorek byl naředěn rehydratačním pufrům.

Rehydratační pufr – rozpouštění min 1 hodinu

7 M UREA

2 M THIOUREA

4% CHAPS

1% Ampholiny (Amersham Pharmacia Biotech)

1% DTT

krystal bromfenolové modři

Podmínky fokusace:

Limit 50 μA , 20°C

150 V	750 Vh
500 V	500 Vh
3500 V	42000 Vh

Ekvilibrační pufr I – inkubace 15 minut při pokojové teplotě

2% SDS

6 M UREA

0,1 mM EDTA

0,1% bromfenol blue

50 mM Tris-HCl, pH 6,8

30% glycerol

1% DTT

Ekvilibrační pufr II – inkubace 15 minut při pokojové teplotě

2% SDS

6 M UREA
0,1 mM EDTA
0,1% bromfenol blue
50 mM Tris-HCl, pH 6,8
30% glycerol
2,5% iodacetamid

7.2.7. Barvení stříbrem – protokol (Blum et al., 1987)

1. Fixace

Gel fixujeme od **1 hod do 3 dnů** na kolébce (třepačce) **ve fixačním roztoku, při pokojové teplotě**. (pokud gel fixujeme přes noc a déle, nemusí být na kolébce). Použít **50ml fixačního roztoku/gel:**

45% methanol	450ml 100% methanol
10% kys.octová	100ml konc. kys. octové
mQ voda	do 1000ml
0,018% formaldehyd	50 μ l 37% formaldehydu/100ml fix.roztoku – přidat těsně před použitím!!

2. Promývání EtOH

Gel promýt **3x20 min v 50% ethanolu** (gel zbledá).

3. Promývání 0,02% Na-thiosulfátem

Gel promýt **2x30sec** $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, dbát na čas (bílý gel zase zprůhlední).

příprava: 2g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ /1000ml mQ vodu

4. Promývání H₂O

Gel důkladně promýt **mQ vodou 3x20sec** (musí se odstranit Na-thiosulfát).

5. Barvení stříbrem

Do roztoku AgNO_3 (100ml) přidat **těsně před barvením 75 μ l 37% formaldehydu** (0,027%). Poté vložit do takto připraveného roztoku gel (50ml/gel). Barvit **20 min ve tmě na kolébce**.

ROZTOK AgNO_3 PŘIPRAVIT VŽDY ČERSTVÝ!!!

0,2% roztok AgNO_3 (100ml) 0,2g AgNO_3 /100ml mQ vodu

- roztok míchat minimálně 20 min

6. Promývání H₂O

Gel promýt **3x10 sec mQ vodou**.

7. Vyvíjení

Do vyvíjecího roztoku přidám **těsně před vyvíjením 50 μ l 37% formaldehydu** (0,18%, jinak je gel neprůhledný) a vyvíjím gel tak dlouho, až jsou vidět tmavé pruhy.

vyvíjecí roztok:

2,9% Na ₂ CO ₃	50ml 6% Na ₂ CO ₃ (15g/250ml mQ vody)
0,0004% Na-thiosulfat	2ml 0,02% Na-thiosulfat
mQ voda	50ml

8. Promývání H₂O

Jakmile se objeví tmavé proužky, rychle gel promýt mQ vodou (několik sekund)

9. Zastavení reakce

Reakce se zastaví roztokem o **složení:**

45% methanol	45ml 100% methanolu
10% kys. octová	10ml konc. kys. octové
mQ voda	do 100ml

- pokud se nechá gel vyvíjet déle, tak bendy tloustnou = slíjí se bendy

10. Sušení

Gel vložím mezi 2 celofány, které pořádně vypnu, odstraním bubliny a nechám uschnout na vzduchu do druhého dne.

7.2.8. Protokol pro značení CK dansylchloridem (Grossmann, 1991)

ROZTOKY:

A) 50 mM Hepes , pH 8 50 ml

- 595 mg Hepes / 50 ml H₂O

B) 50 mM Hepes + 2mM DTT, pH 8 (redukční roztok) 25 ml

- 7,715 mg DTT / 25 ml roztok A

C) Zásobní roztok CK (100 μM)

- 2,15 mg CK / 0,5 ml roztok A

D) Zásobní roztok tetrathionátu sodného (TTH) (3 mM)

- 1,378 mg TTH / 1,5ml roztok A

E) Zásobní roztok Dansylchloridu (DNCl) (600 μM)

- 2,67mg DC / 1ml DMF

ZNAČENÍ CK:

1) Reverzibilní přikrytí cysteinu 283 – oxidace TTH

- 360μl zásobního roztoku CK reaguje s 840 μl roztoku D

- inkubace 10 min při pokojové teplotě

2) Konjugace s DNCl

- přidat 60μl roztoku E, finální koncentrace DNCl = 30 μM

- inkubace 2 hod ve tmě na ledu (0,1 °C), každých 10 min 5krát obrátit

3) Separace od volného DC a redukce cysteinu 283

- stočit vzorek na 1/3 a promýt 3krát roztokem B na centriconech „cut off 30“ při 6000 rpm a nechat inkubovat přes noc v lednici v roztoku B (redukce cysteinů DTT)

- ráno stočit a 3krát promýt roztokem B a doplnit na konečnou koncentraci 30 μM CK

7.2.9. Protokol pro značení CK pomocí IAF

ROZTOKY

A) Imidazolový pufr, pH 7,5 50 ml

- 50 mM imidazol, 170,25 mg imidazolu / 50 ml
- 20 mM KCl, 74,5 mg KCl / 50ml

B) 20 mM Tris pufr, pH 9 30 ml

- 72,9 mg Tris / 30ml

C) 20 mM Tris + 2 mM DTT, pH 9,5 (redukční roztok) 30 ml

- 72,9 mg Tris + 92,55 mg DTT / 30ml

D) 50 mM Hepes, pH 9,5 50 ml

- 595 mg Hepes / 50ml

E) Zásobní roztok CK (167 µM)

- 3,6 mg CK / 0,5 ml roztoku A

F) Zásobní roztok TTH (16,7 mM)

- 5,115 mg TTH / 1 ml roztoku A

G) Zásobní roztok IAF (1,2 mM)

- 0,309 mg IAF / 0,5 ml DMF

ZNAČENÍ CK

1) Reverzibilní přikrytí cysteinu 283 – oxidace TTH

- 360 µl zásobního roztoku CK reaguje 840 µl roztoku F
- inkubace 10 min při pokojové teplotě

2) Konjugace s IAF

- přidat 100 µl roztoku G, finální koncentrace IAF = 100 µM
- inkubace 2 hod při pokojové teplotě ve tmě, na kolébce

3) Separace od volného IAF a redukce cysteinu 283

- vzorek stočit na 1/3 a 4krát promýt roztokem C na centrikonech „cut-off 30“ při 6000 RPM a nechat inkubovat přes noc v lednici v roztoku C (redukce cysteinů DTT)

4) Dokončení

- ráno stočit a 3krát promýt v roztoku D a doplnit na konečnou koncentraci 50 µM CK

7.2.10. Protokol pro značení CK pomocí FITC

ROZTOKY

A) Carbonát/bicarbonátový (CB) pufr, pH 9,5 50 ml

- 172 mg Na₂CO₃ + 344 mg NaHCO₃ / 50 ml

B) 20 mM Tris pufr, pH 9,5 30 ml

- 72,9 mg Tris / 30ml

C) Zásobní roztok CK (116 μM)

- 5 mg CK / 1 ml roztoku A

D) Zásobní roztok FITC (25,7 mM)

- 1 mg FITC / 100 μl DMF

ZNAČENÍ CK

1) Konjugace CK s FITC

- 0,5 ml zásobního roztoku CK reaguje s 3,8 μl roztoku D, 15μg FITC / 1 mg CK, finální koncentrace FITC = 192,7 μM

- inkubace 4 hod při pokojové teplotě ve tmě, na kolébce

2) Separace od volného FITC

- vzorek stočit na 1/3 a 4krát promýt roztokem B na centrikonech „cut-off 30“ při 6000 RPM

- po posledním točení se vzorek doplní roztokem B na konečnou koncentraci 50 μM CK

7.2.11. Protokol pro dvojí značení CK pomocí IAF + ErITC

ROZTOKY

A) Imidazolový pufr, pH 7,5 50 ml

- 50 mM imidazol, 170,25 mg imidazolu / 50 ml
- 20 mM KCl, 74,5 mg KCl / 50ml

B) 20 mM Tris pufr, pH 9 30 ml

- 72,9 mg Tris / 30ml

C) 20 mM Tris + 2 mM DTT, pH 9,5 (redukční roztok) 30 ml

- 72,9 mg Tris + 92,55 mg DTT / 30ml

D) 50 mM Hepes, pH 9,5 50 ml

- 595 mg Hepes / 50ml

E) Zásobní roztok CK (167 µM)

- 3,6 mg CK / 0,5 ml roztoku A

F) Zásobní roztok TTH (16,7 mM)

- 5,115 mg TTH / 1 ml roztoku A

G) Zásobní roztok IAF (1,2 mM)

- 0,309 mg IAF / 0,5 ml DMF

H) Zásobní roztok ErITC (0,84 mM)

- 0,374 mg / 0,5 ml DMF

ZNAČENÍ CK

1) Reverzibilní přikrytí cysteinu 283 – oxidace TTH

- 360 µl zásobního roztoku CK (E) reaguje s 840 µl roztokem F
- inkubace 10 min při pokojové teplotě

2) Konjugace s IAF

- přidat 100 µl roztoku G, finální koncentrace IAF = 100 µM
- inkubace 2 hod při pokojové teplotě ve tmě, na kolébce

3) Separace od volného IAF

- vzorek stočit na 1/3 a 4krát promýt roztokem B na centrikonech „cut-off 30“ při 6000 RPM a doplnit na 0,5 ml

4) Konjugace s ErITC

- k 0,5 ml CK+IAF přidat 100 μ l roztoku H, finální koncentrace ErITC = 70 μ M
- inkubace 4 hod při pokojové teplotě ve tmě, na kolébce

5) Separace od volného ErITC a redukce cysteinu 283

- vzorek stočit na 1/3 a 4krát promýt roztokem C na centrikonech „cut-off 30“ při 6000 RPM a nechat inkubovat přes noc v lednici v roztoku C (redukce cysteinů DTT)

6) Dokončení

- ráno stočit a 4krát promýt v roztoku D a doplnit na konečnou koncentraci 50 μ M CK

7.2.12. Protokol pro dvojí značení CK pomocí FITC + ErITC

ROZTOKY

A) Karbonát/bikarbonátový (CB) pufr, pH 9,5 50 ml

- 172 mg Na₂CO₃ + 344 mg NaHCO₃ / 50 ml

B) 20 mM Tris pufr, pH 9,5 30 ml

- 72,9 mg Tris / 30ml

C) Zásobní roztok CK (116 µM)

- 5 mg CK / 1 ml roztoku A

D) Zásobní roztok FITC (25,7 mM)

- 1 mg FITC / 100 µl DMF

E) Zásobní roztok ErITC (0,42 mM)

- 0,187 mg ErITC / 0,5 ml DMF

ZNAČENÍ CK

1) Konjugace CK s FITC

- 0,5 ml zásobního roztoku CK reaguje s 3,8 µl roztoku D, 15µg FITC / 1 mg CK, finální koncentrace FITC = 192,7 µM

- inkubace 4 hod při pokojové teplotě ve tmě, na kolébce

2) Separace od volného FITC

- vzorek stočit na 1/3 a 4krát promýt roztokem B na centrikonech „cut-off 30“, při 6000 RPM

- po posledním točení se vzorek doplní roztokem B na 0,5 ml

3) Konjugace CK s ErITC

- k 0,5 ml CK+FITC přidat 114 µl roztoku E, finální koncentrace ErITC = 96 µM

- inkubace 4 hod při pokojové teplotě ve tmě, na kolébce

4) Dokončení

- vzorek stočit na 1/3 a 4krát promýt roztokem B na centrikonech „cut-off 30“, při 6000 RPM

- po posledním točení se CK doplní roztokem B na konečnou koncentraci 50 µM CK

7.3. VÝSLEDKY

7.3.1. Three isoelectric points of the creatine kinasem-subunit, purified from myofibrils

THREE ISOELECTRIC POINTS OF THE CREATINE KINASE M-SUBUNIT, PURIFIED FROM MYOFIBRILS

D. Malacova, J.. Zurmanova, J. Mejsnar

Department of Physiology and Developmental Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

One of the molecular problems of muscle energetics which remains unclear, is an operation principle of enzyme molecules in energetic reactions. Myofibrillar creatine kinase (EC 2.7.3.2.) (CK) is a homodimeric enzyme, consisting of two M-subunits, with molar mass of 43 kDa. Computed force fields indicate that the substrate-induced energy minimizing principle is not a sufficient condition for the regulation of enzymatic activity (1). Lifetime fluorometry of double labeled CK verified the resolution range of the method for measurements of conformational changes (2). For the further progress of a loading protocol with fluorophores, an identity of the M-subunit was revealed, using mass spectroscopy (MALDI) and sequential 2D SDS electrophoresis methods. MMCK from the rat psoas muscle was eluted from a pure myofibrillar fraction by our procedure, using a low ionic strength medium and subsequently purified by liquid chromatography techniques. The M-subunit was detected by SDS electrophoresis as a single band, corresponding to 43 kDa. However, MALDI detected the band overlaid with the band of actin. Chromatofocusing results and 2D SDS electrophoresis identified three subunits of MMCK (M1, M2, M3) of different isoelectric points within a narrow range of pH, being 7.17, 7.28 and 7.47, respectively.

1. Mejsnar J et al.: *Physiol. Res.* 51: 35-41, 2002.

2. Gregor M et al.: *Physiol. Res.* 52: 579-585, 2003.

Supported by grant No. VZ 113100003.

7.3.2. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) in dansylated creatine kinase molecule

FLUOFRESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET) IN DANSYLATED CREATINE KINASE MOLECULE

D. Malacova¹, P. Herman², J. Mejsnar¹, J. Vecer², J. Zurmanova¹

Charles University Prague, ¹Faculty of Science, ²Faculty of Mathematics and Physics, Czech Republic

The aim of our study is to bring more light on how conformational changes underlying the cellular control of enzyme activity should be measured. The present study follows up on the purification of creatine kinase (CK) EC 2.7.3.2 from myofibrils (1) and the search for the appropriate fluorophores for FRET. The former combination of donor - acceptor pair, ErITC-IAF blocked CK activity (Cys283 by IAF) (2) and a tested fluorophore FITC, was randomly bound at three sites of the molecule (3). Reaction of CK with dansyl chloride, under reversibly protected cysteines, was carried out as described (4), with a modification of the procedure, when dialysis was replaced by Centricons YM-30 (Millipore, 30 000 MW cut-off). The absorbances at 280 and 340 nm indicate that one mole of the dansyl group has reacted per mole of monomeric CK. The specific enzyme activity of dansylated CK dissolved in 50 mM Hepes buffer pH 8.0: 45.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ confirmed a successful protection of cysteines during dansylation. Fluorescence decays and anisotropy-measuring apparatus were based on a laser excitation source and a photon counting detection (Hamamatsu), with excitation at 298 nm and fluorescence collection at 360 nm. The intrinsic tryptophans' fluorescence life time for "CK, CK-ATP and CKATP- creatine" decreased from 2.72, 2.38 and 2.42 ns to 2.28, 1.96 and 1.97 ns, respectively, indicating presence of an efficient FRET, being equal to 16.2, 17.6 and 13.6 %, respectively. However, in all three cases the calculated donor - acceptor distances were found to be close to 2.8 nm. Data indicates that the labelled segment of the protein does not significantly change the distance to the tryptophans after binding to both substrates. In order to follow physiological conformational changes we will identify a different place for the attachment of the label.

1. Maláčová D et al: *Physiol. Res.* 53: 22P, 2004.

2. Gregor M et al.: *Physiol. Res.* 52: 579-585, 2003.

3. Gregor M et al.: *Physiol. Res.* 52: 27P, 2003.

4. Grossman S H: *Biophys. J.* 59: 590-597, 1991.

Supported by grants VZ 113100003, VZ 113200001, NATO grant CLG978934

7.3.3. Creatine kinase binds more firmly to the M-band of rabbit skeletal muscle myofibrils in the presence of its substrates

7.3.4. Creatine kinase structural changes induced by substrates

