

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 neznačené 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 neznačené CK zjištěny rotační korelační časy molekuly: CK=35 ns, CK-ATP=27 ns, CK-ATP+Cr=29 ns.

Specifická aktivita neznačené 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.