

Diss. Nr. 5437

CREATINKINASE-ISOENZYME UND MYOFIBRILLEN-STRUKTUR

ABHANDLUNG

zur Erlangung

des Titels eines Doktors der Naturwissenschaften

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN

HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

THEO WALLIMANN

Dipl. Naturwissenschaftler ETHZ

geboren am 13. Oktober 1946

von Alpnach-Dorf (Kt. Obwalden)

angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. H. M. Eppenberger, Referent

Prof. Dr. H. Ursprung, Korreferent

1975

A B S T R A C T

M-line protein, purified from chicken skeletal muscle according to MORIMOTO and HARRINGTON (1972), is shown to be identical to MM-CPK, the muscle form of creatine kinase. By means of the indirect immunofluorescence and immunoferritin techniques, MM-CPK can be localized within the M-line, a specific region of the myofibrillar contractile apparatus. The MM-CPK tightly and specifically bound to the M-line is a small but significant fraction (ca. 7%) of total cellular CPK. Preincubation with anti-MM-CPK antiserum prevents extraction of MM-CPK with concomitant disappearance of a visible M-line at low ionic strength. It is proposed that MM-CPK is an integral part of the myofibrillar structure, based on the known dimensions and properties of MM-CPK and the stoichiometry of its binding to myofibrils, it is further proposed that the transverse m-bridges seen in electron-microscopic sections through the M-line are CPK molecules. The function of CPK at different subcellular locations is discussed; the available evidence suggests that the MM-CPK bound at the M-line is sufficient to regenerate all the ATP hydrolysed during a muscle contraction.

In the chicken M-line bound MM-CPK is found in both twitch and tonic skeletal muscles. Chicken heart contains almost exclusively the BB-CPK isoenzyme. About 3% of the BB-CPK in chicken heart cells is tightly bound to the Z-lines of the myofibrils.

The isoenzyme-specific localisation of CPK to different regions of the myofibril in different tissues is also observed, although with lesser degree of specificity, in in vitro experiments in which washed or extracted myofibrils are incubated with exogenous MM- and BB-CPK.

ZUSAMMENFASSUNG

Das von MORIMOTO and HARRINGTON '72 charakterisierte M-line-Protein, isoliert aus der M-Linie von adulten Hühner-Brustmuskelfibrillen, wurde mit biochemischen und immunologischen Methoden als Muskelform der Creatinkinase (MM-CPK) identifiziert. Beide Proteine können mit Puffer von niedriger Ionenstärke aus Hühner-Skelettmuskelfibrillen extrahiert werden und weisen im Bereich der Streuung der Methoden vergleichbare Molekulargewichte, vergleichbare Aminosäuren-Zusammensetzung und eine vergleichbare spezifische CPK-Aktivität auf. Sie bestehen aus zwei identischen Untereinheiten (Dimeren) und zeigen eine identische elektrophoretische Mobilität in Zellulose-polyacetat-, Polyacrylamid- und SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese-Systemen. Das elektrophoretische Muster der Peptidfragmente nach Bromcyan-Spaltung beider Proteine ist ebenfalls identisch. Die immunologische Identität der beiden Proteine konnte durch OUCHTER-LONY-Doppelimmundiffusions-Teste gezeigt werden. M-line-Protein und MM-CPK weisen dieselbe myofibrilläre Lokalisation auf. Durch indirekte Immunfluoreszenz- und Immunferritin-Technik konnte MM-CPK in der H-Region resp. in der M-Linie von Hühner-Skelettmuskelfibrillen von "fast-twitch"-, "slow-twitch"- und "slow-tonic"-Muskeln des adulten Huhnes lokalisiert werden. Nach mehrmaligem Waschen von Myofibrillen mit Puffer von relativ hoher, physiologischen Bedingungen entsprechender Ionenstärke, blieb mindestens 7% der gesamten CPK-Aktivität eines Hühner-Skelettmuskelgewebes spezifisch in der M-Linie gebunden. Die Spezifität der Bindung wurde durch Anwendung von physiologischen Salzlösungen und Puffern, die Substrate und Kofaktoren der CPK-Reaktion enthielten, geprüft. Die myofibrillär gebundene CPK konnte durch relativ kurze Behandlung der Myofibrillen mit Puffer von niedriger Ionenstärke quantitativ extrahiert werden, wobei gleichzeitig die elektronendichte M-Linien-Struktur verschwand. Durch vorhergehende Inkubation der Myofibrillen mit Anti-MM-CPK-Serum wurde diese Extraktion verhindert, und gleichzeitig blieb die M-Linien-Struktur der Myofibrillen erhalten. Exogen zugegebene MM-CPK konnte wieder zurück an M-Linien-extrahierte Myofibrillen binden.

Die Befunde über das biochemische Verhalten der M-Linien-Proteine und ihrer Lokalisation in der M-Linie können in das von KNAPPEIS and CARLSEN '68 auf Grund von elektronenmikroskopischen Ultrastrukturanalysen vorgeschlagene M-Linien-Modell integriert werden. Auf Grund dieses Modells wird in der vorliegenden Arbeit die Identität von MM-CPK mit den m-Brücken vorgeschlagen, da MM-CPK die für die m-Brücken geforderten Kriterien sowohl in qualitativer als auch in quantitativer Hinsicht erfüllt. Das experimentell gefundene molare Verhältnis von MM-CPK zu Myosin und die molekularen Dimensionen von MM-CPK resp. M-line-Protein stimmen gut mit den Werten für die m-Brücken im M-Linien-Modell überein.

Anhand eines Funktionsmodells eines integrierten CPK-Systems (sarkoplasmatische, mitochondriale und myofibrilläre CPK) wird gezeigt, dass die M-Linien-gebundene MM-CPK (d. s. mindestens 7 % der gesamten CPK-Aktivität) auf Grund des molaren Verhältnisses zu Myosin in den Myofibrillen und der im Vergleich zur Myosin-ATPase-Reaktion ca. 20 - 40 mal schnelleren Umsatzgeschwindigkeit (V_{max}) der MM-CPK-Reaktion durchaus in der Lage wäre, das, während einer Kontraktion durch die Myosin-ATPase hydrolysierte ATP, im myofibrillären Raum direkt zu regenerieren.

Es wird gezeigt, dass MM-CPK als integraler Bestandteil der M-Linien-Struktur von Hühner-Skelettmuskelfibrillen betrachtet werden muss.

Die Funktion der M-Linie resp. der M-Linien-gebundenen CPK sowie der Zusammenhang von M-Linie, Muskeltyp und MM-CPK werden eingehend diskutiert.

In Hühner-Herzmuskelgewebe findet sich ausser einer relativ kleinen Menge von MB-CPK fast ausschliesslich das BB-CPK-Isoenzym und im Gegensatz zu Skelettmuskelgewebe in den Herzmyofibrillen weder eine M-Linien-Struktur noch in der M-Linien-Region gebundene MM-CPK. Dagegen waren aber mindestens 3% der gesamten aktiven CPK-Moleküle des Herzmuskelgewebes spezifisch in der Z-Region von adulten Hühner-Herzmuskelfibrillen gebunden. Die Lokalisation der CPK-Isoenzyme in nativen, adulten Herz- und Skelettmuskelgewebe des Huhnes ist "in vivo" insofern spezifisch, als dass MM-CPK in der M-Linie der Skelettmuskelgewebe und BB-CPK in der Z-Linien-Region der Herzmyofibrillen gefunden wird.

Die CPK-Isoenzyme wurden auch während der Ontogenese in Myofibrillen von Hühner-Skelettmuskel lokalisiert. Dabei besteht offenbar "in vivo" insofern eine absolute Isoenzympezifität der CPK als in der M-Linie von Skelettmuskelgewebe verschiedener Embryonalstadien des Huhnes ausschliesslich MM-CPK, nie aber MB- oder BB-CPK gefunden werden konnte. Letztere konnte in der I-Region resp. Z-Linien-Region lokalisiert werden. Der adaptive Wert der verschiedenen CPK-Isoenzymformen könnte somit neben den katalytischen Unterschieden offenbar darin bestehen, dass die verschiedenen CPK-Isoenzyme mit unterschiedlichen Komponenten des kontraktilen Apparates und damit mit unterschiedlichen Regionen innerhalb der Myofibrillen interagieren können.

Unter bestimmten experimentellen "in vitro"-Bedingungen war die Spezifität der homodimeren CPK-Isoenzyme, ausschliesslich an die M-Linie (MM-CPK) oder ausschliesslich an die Z-Linie (BB-CPK) zu binden, nicht absolut, d. h. auch BB-CPK konnte, wenn auch in vermindertem Ausmass, an die M-Linien-Region von extrahierten Skelettmuskelfibrillen binden. Die Spezifität der Bindung der CPK-Isoenzyme an verschiedene Sarkomer-Regionen konnte aber durch Kurzzeit-Kompetitions-Reinkubationsexperimente gezeigt werden.