

Purification and characteriization of the heterogeneous brain-type creatine kinase in chicken, study of the functional aspects of this heterogeneity in different tissues

Doctoral Thesis

Author(s):

Quest, Andrew Frederick Geoffery

Publication date:

1988

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000475570>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH No. 8539

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF THE HETEROGENEOUS BRAIN-TYPE
CREATINE KINASE IN CHICKEN. STUDY OF THE FUNCTIONAL ASPECTS OF
THIS HETEROGENEITY IN DIFFERENT TISSUES.

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZUERICH

for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
ANDREW FREDERICK GEOFFERY QUEST

dipl. natw. ETH
born May 22, 1956
citizen of Obersiggenthal, AG

accepted on the recommendation of
Prof. H.M. Eppenberger, examiner
Prof. K.H. Winterhalter, coexaminer
PD Dr. T. Wallimann, coexaminer

Zuerich, 1988

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'H.M. Eppenberger', with a long horizontal flourish extending to the right.

6.1 S U M M A R Y

=====

By indirect immunofluorescence labelling both with frozen sections of intact chicken retina and isolated chicken rod outer segments (ROS), the presence of the creatine kinase brain isoform (B-CK) in the ROS compartment of photoreceptor cells was established. Poor structural conservation of these delicate, predominantly lipid composed structures, made a precise localization in chicken ROS at the electron microscope level impossible. Structurally well preserved bovine ROS were useless in this respect because the available anti-chicken B-CK antibodies did not cross-react with the bovine antigen under the labelling conditions used.

Additional biochemical support for the presence of B-CK in outer segments was obtained from activity measurements with bovine ROS, which were easier to prepare. About 1 - 5% of total retina CK activity was estimated to be present in the outer segment compartment, which, assuming the specific activity of chicken and bovine B-CK to be similar, corresponds to an upper limit ratio between B-CK and rhodopsin of 1:100 or roughly 10^7 B-CK copies per outer segment (see Hamm & Bownds, 1987). Thus B-CK and cGMP phosphodiesterase seem to be present in similar amounts in ROS. This B-CK activity is capable of replenishing the entire outer segment ATP pool (in frog outer segments 3.8 mM; see Robinson & Hagins, 1979) within a second.

The lack of other major ATP replenishing systems like mitochondria, the low levels of glycolytic enzymes and the severely impaired diffusion in outer segments indicate that the creatine phosphate (CP)-shuttle system could be of fundamental importance for energy supply to this subcellular compartment from inner segment mitochondria. On the other hand, ATP plays a major role in regulation of the cGMP mediated phototransduction mechanism eventually leading to closure of the light-sensitive ion channels ($g_{h\nu}$) in rod outer segment plasma membranes. Considering the stringent control imposed on each of the signal cascade amplification steps, a regulation of CK activity seems almost vital to precisely determine the resulting amplification factor. The general importance of CP, and thus also of creatine kinase, for vision is underlined by the effects of a human autosomal, recessive disease called hyperornithinemia, suggested to be involved in retinal and choroidal gyrate atrophy.

To characterize chicken B-CK, known to be heterogeneous with respect to isoelectric points on 2D-gels (subspecie monomer nomenclature b1, b1* and b2), which seemed interesting from a regulatory point of view, a new purification scheme was devised. This scheme involved ammonium sulfate fractionation, the specific elution of B-CK from Sepharose Blue CL-6B affinity matrix with ADP and FPLC anion exchanger chromatography on a Mono Q HR 5/5 column as the concluding step. Final product quality was mainly determined by the affinity chromatography step. The method is rapid, operates with high activity yields (> 50%) of pure (>99%) protein, and could easily be modified to purify B-CK not only from heart tissue extracts, which were used as a model system, but also from gizzard, brain and retina extracts with comparable efficiency (specific activity of 300 - 400 EU/mg). In the final step of the purification, dimeric B-CK was resolved into two activity peaks, termed type I and II B-CK, by isocratic elution from the Mono Q column at a concentration of 150 mM sodium chloride.

By comigration with immunoprecipitated, in vitro translation products, derived from a full-length B-CK cDNA clone B10-1 (Schaefer, 1986; Perriard et al., 1987), on two-dimensional gels, it was shown that in type I B-CK fractions only b1 (b1*) B-CK monomers were present, while type II fractions contained b1 (b1*) and b2 monomers. Since the monomers b1(b1*) and b2 are present in a 1:1 ratio in all tissues studied, the 1:3 type I to II dimer activity ratio resolved on the Mono Q column for heart-derived B-CK indicated that dimerization is a random association process in this tissue.

Chromatofocussing in urea on an FPLC Mono P HR 5/20 column led to the separation of b1 and b2, the two major monomer constituents of chicken B-CK isoelectric heterogeneity, which could then be further characterized. Additionally, a minor species migrating very close to b1 on two-dimensional gels, termed b1*, was unequivocally identified. By quantitative amino acid analysis it was shown that b1 and b2 B-CK monomers differ significantly in their serine content, but are otherwise extremely alike. Thus, the two monomers must be encoded for by different mRNAs and cannot be derived from one another by for instance post-translational modification. Peptide mapping and sequence analysis experiments showed the difference between b1 and b2 to be located at the N-terminal end of the protein; together with data available on a partial-length B-CK cDNA clone called 18c (Hossle, 1987; Perriard et al., 1987), these results strongly support the idea that b1 and b2 are derived from a single gene by constitutive, alternative splicing of two different exons coding for the N-terminal region. Unfortunately, this idea could not be conclusively proved by protein sequencing because the N-terminus of the b2 monomer was blocked. The first 30 amino acids of the b1 protein, derived by sequencing the b1 N-terminus, correlated exactly with cDNA derived sequence data for chicken B-CK, which have been published (Babbitt et al., 1986).

The rechromatography of Mono Q B-CK peak fractions on a Mono P column under native conditions proved the observed Mono Q activity peak ratios to be stable entities, not dependent on the isolation conditions. The observed differences in activity peak ratios between "muscle-like" (heart, gizzard) and "neural" (brain, retina) B-CK containing chicken tissues, resolved on the Mono Q column, were therefore interpreted as evidence for tissue specific regulation of dimerization between b1 and b2 B-CK monomers. The significance of this mechanism was underlined by the identification of a minor MB-CK fraction in chicken brain tissue extracts, in which the b2 monomer was preferably associated with M-CK. A role of this b2 monomer as a "bird-specific" CK vector for subcellular localization has been discussed. Regulation of oligomerization seems a reasonable way of specifying CK dimer composition in a system where apparently pre-translational control is missing (constitutive alternative splicing).

To assess the physiological significance of B-CK heterogeneity in general, Mono Q peak fractions of B-CK from different chicken tissues (heart, gizzard, brain) were kinetically characterized under CP limiting conditions. A kinetic heterogeneity was identified, which did not correlate with the presence of monomer b2, but rather with the minor species b1*. A simple kinetic model was proposed in which both b1b1* and b2b1* B-CK dimers have lower Km values (0.8 mM CP) compared to the normal value found for b1b1 and b1b2 B-CK dimers (1.6 mM CP). The minor species b1* has not been characterized so far, but a comparison with literature data revealed that it most likely is a phosphorylation product of b1. Preliminary experiments to varify this hypothesis were unsuccessful so far.

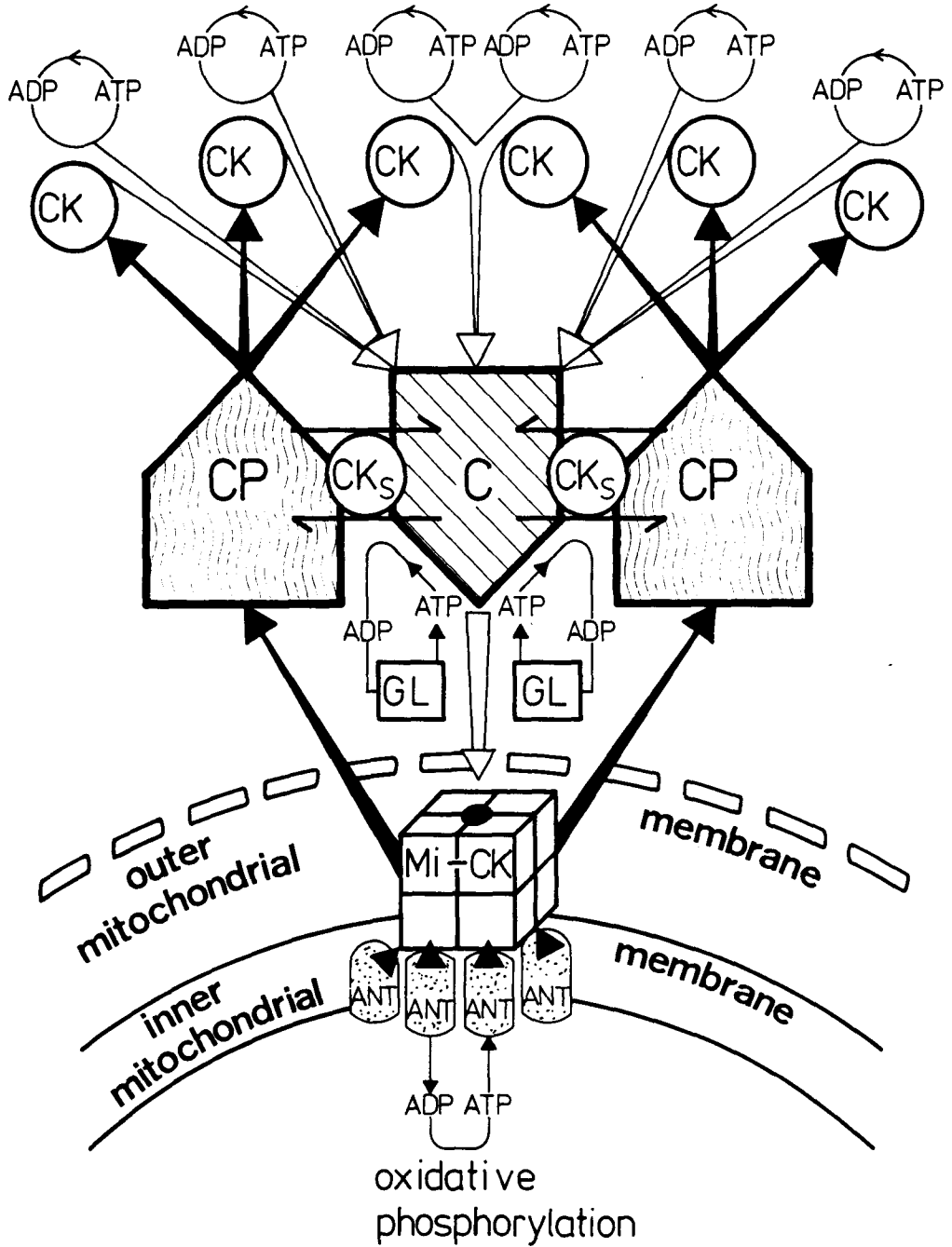
This prospective b1 phosphorylation product, which to date only can be purified from tissue extracts in urea, provides a first mechanistic possibility to understanding how ATP could be specifically generated locally within a cell, not only as an energy source but also as a regulatory molecule. Such a local, monomolecular "switch" for ATP production, relying on the presence of highly diffusible, metabolically inert CP, would render regulatory ATP effects independent of "unpredictable" (from a cell's point of view) diffusion restraints imposed by the highly fluctuating parameter "cytosolic organization". The fact that "soluble" CK isozymes are known to be associated with a multitude of structural and functional subcellular sites makes this proposal all the more attractive!

Although no striking advantage has become apparent yet, oligomerization seems to have been a prevailing determinant in creatine kinase evolution. The different cooperativity indices (Hill plots) found for type I and II B-CK fractions isolated on the Mono Q column, as well as the fact that the outcome of B-CK dimerization is specified in a tissue-dependent manner, underline this observation. Perhaps the most promising CK isozyme candidate in this respect is Mi-CK, which has been shown to exist in an octameric state. Experiments determining how Mi-CK oligomerization status (dimer vs. octamer) could be specified have only just started, but already reveal factors as diverse as protein concentration, nucleotides, lipids etc. to be important.

The minor kinetic differences established between dimeric and octameric Mi-CK molecules probably will become more apparent once analysis methods are refined and especially when the parameter "structural association" can be incorporated into such kinetic models!

Thus, within the past few years a picture of CK as a highly versatile enzyme, subject to many regulatory restraints, both at the pre- and particularly post-translational level, has been developing. Due to its subcellular distribution CK not only can potentially control energy metabolism but, by virtue of its capacity to specifically increase local ATP concentrations, CK could also be an important determinant of cytoskeletal organization and cellular homeostasis. Studying the ATP-dependent regulation of ion channel activity in neurons should be a particularly rewarding task for the future. Both of these global CK functions are summarized in the following digrams. To emphasize this "ATP-distributing" aspect of CK function, communicating between mitochondria and cytoplasm rather than providing an active transport mechanism, "CP-bicycle" seems more appropriate than the term "CP-shuttle" currently used in literature.

Summary figure 1. (Legend on page 223)



Summary figure 1. The phosphocreatine bicycle (Scheme designed by T. Wallimann).

An octameric Mi-CK molecule bound to the inner mitochondrial membrane is depicted. The equilibrium state between dimeric and octameric enzyme could for instance depend on the nucleotides present in the inter-mitochondrial membrane space. Functionally relevant interactions between octameric Mi-CK and the adenine nucleotide translocator (ANT), responsible for replenishing the metabolically inert, cytosolic CP pool, could be additionally stabilized by unspecific electrostatic interactions with strongly negatively-charged, mitochondrial lipids like cardiolipin (\blacktriangle). This stimulus-induced CP-producing unit should be envisaged as a highly flexible and dynamic structure, best comparable perhaps to the transient, light-dependent rhodopsin/ G-protein complex on rod outer segment disk membranes, rather than to static, fixed-stoichiometry complexes!

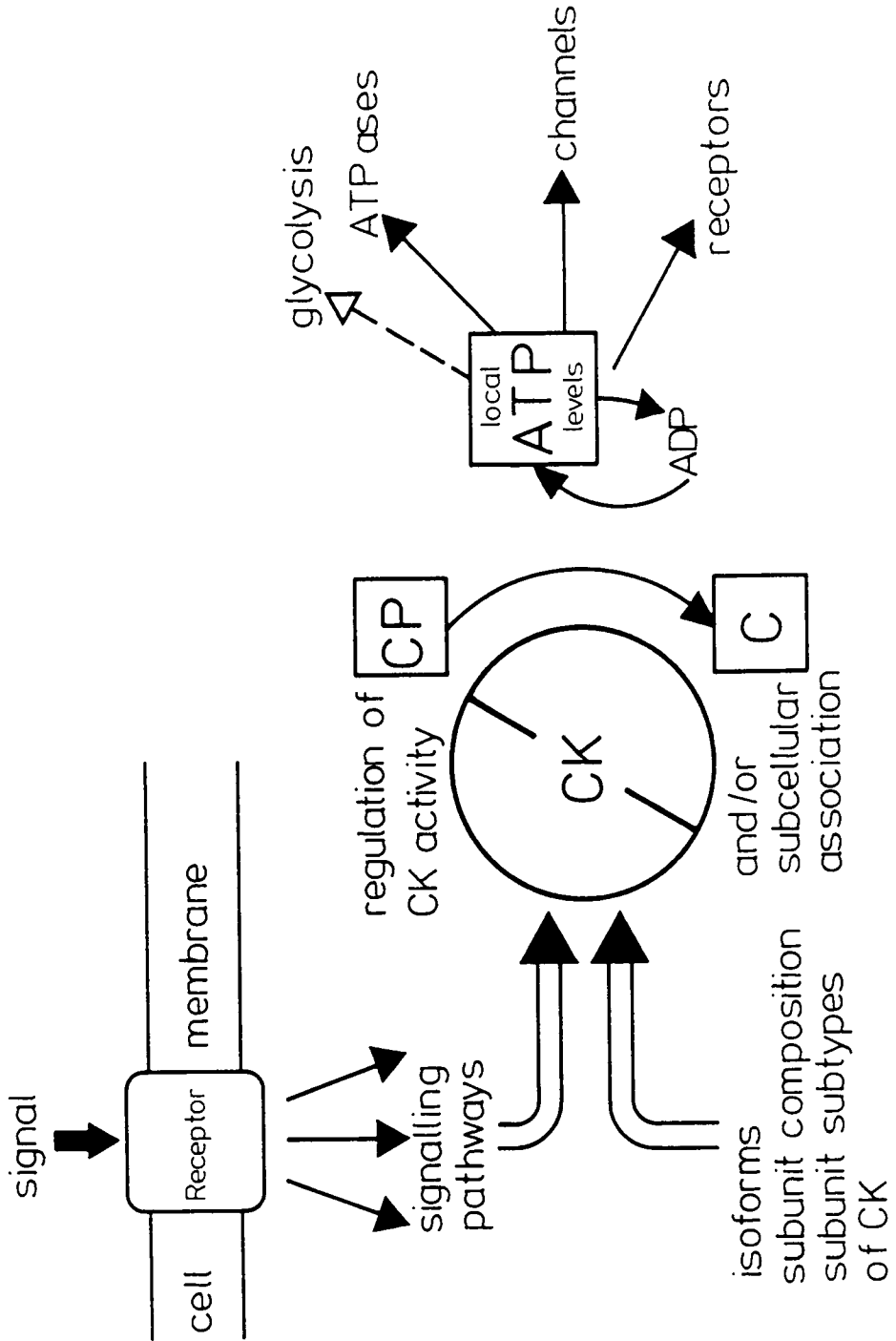
The cytosolic CP pool is remarkable in several ways: (i) CP is an inert, high energy phosphate compound, only utilizable by creatine kinase, which does not interfere with metabolism as does ATP; (ii) for this reason creatine phosphate and creatine concentrations can be much larger than adenine nucleotide concentrations (30 mM CP in muscle) and (iii) the CP/C ratio can be as high as 2x in a fully charged cell (see blocks in diagram). The latter two points considerably increase the diffusional advantage of the phosphagen compared to the adenine nucleotide pool, which definitely will be of importance to any cellular system with high energy requirements.

Bulk soluble cytosolic creatine kinase (CKs) is in equilibrium with discrete, structurally or functionally associated CK subpopulations (CKa), for instance:

- (1) CK bound to myofibrils, compartmentally coupled to actomyosin ATPase;
- (2) CK bound to sarcoplasmic reticulum, coupled to Ca^{2+} ATPase;
- (3) CK bound to sarcolemma, coupled to Na^+/K^+ ATPase;
- (4) CK associated with acetylcholine receptor rich post-synaptic membranes, coupled to energy requirements and signal transduction?
- (5) CK in photoreceptor cells, coupled to Na^+/K^+ ATPase in inner segment, energy requirement and phototransduction in outer segments ?
- (6) CK in sperm tail, coupled to dynein-tubulin ATPase.
etc.

These CK subpopulations, supplied with inert CP from the cytosolic pool, are responsible for a coordinated distribution of ATP within the cell, both to meet energy requirements and to mediate regulatory effects, which are independent of diffusional restraints imposed by cytosolic organization. Being "monomolecular" CK is surely more "flexible" as an ATP distributor than glycolytic enzyme complexes (GL), also known to be structurally associated despite their general classification as soluble, cytosolic enzymes. Recently, a highly interesting connection between ATP derived from glycolytic enzyme complexes and regulation of K^+ channel activity was established for cardiac myocytes. Conclusive experiments testing CK in this respect are still missing!

Summary figure 2. (Legend on page 225)



Summary figure 2. CK-dependent regulatory control of ATP production.

In this figure the regulatory potential of CK has been summarized. An incoming signal (receptor) may activate one or more signal transduction pathways, in which protein kinases generally play an important role. One, or perhaps several such kinases could specifically modify functionally associated CK subpopulations and thereby increase local ATP concentrations, which might not only feed ATPases or manipulate ion channel activity (e.g. K^+ channels) as a positive input answer, but also could trigger inhibitory mechanisms leading to input signal quench, as suggested in phototransduction. In cellular systems with high energy flux rates, signal-dependent ATP consumption would have to be met by coupled CP production at the mitochondrial surface. Long term regulation and functional adaption of CK activity during development is achieved by differential isozyme expression, short term regulation by post-translational modification. By influencing both long- and short term enzyme distribution, oligomerization plays a central role in determining enzyme functionality.

6.2 ZUSAMMENFASSUNG

=====

Mittels indirekter Immunfluoreszenzmarkierung an Hühnerretina-gefrierschnitten und an isolierten Rezeptorzellaussensegmenten (ROS) von Hühnern wurde B-CK in den ROS nachgewiesen. Die schlechte Strukturhaltung dieser labilen, vorwiegend aus Lipiden bestehenden Zellkompartimente, verunmöglichte eine präzise B-CK Lokalisation in Hühner ROS auf dem EM Niveau. Die strukturell gut erhaltenen Kuh ROS eigneten sich nicht für Lokalisationsexperimente, weil die vorhandenen anti-hühner B-CK Antikörper unter den verwendeten Bedingungen nicht mit dem Kuhartigen kreuzreagierten.

Durch Aktivitätsmessungen mit den leicht präparierbaren Kuh ROS wurde die Anwesenheit von B-CK in den ROS biochemisch untermauert. Der CK Anteil in diesem Kompartiment wurde auf 1- 5% der gesamten Menge dieses Enzyms in Retina geschätzt. Unter der Annahme, dass Hühner und Kuh B-CK dieselbe spezifische Aktivität haben, entspricht dies einem B-CK zu Rhodopsin Verhältnis von 1:100, oder anders ausgedrückt kommen pro ROS rund 10^7 B-CK Kopien vor. Somit sind B-CK und die cGMP Phosphodiesterase (PDE) in etwa gleichen Mengen in diesem Kompartiment vorhanden. Die CK im Aussensegment genügt um den gesamten ATP Gehalt dieses Kompartiments innerhalb einer Sekunde zu erzeugen (ATP in Frosch Aussensegmenten, 3.8 mM; Robinson & Hagins, 1979).

Das Fehlen anderer, wichtiger, ATP-regenerierender Systeme wie Mitochondrien, die geringe Menge an glykolytischen Enzymen (Berger et al., 1980), sowie die stark behinderte Diffusion in den Aussensegmenten deuten an, dass der CP-Shuttle sehr wichtig sein könnte für die Energieversorgung dieses subzellulären Kompartiments. Andererseits reguliert ATP die cGMP PDE, die durch cGMP-Hydrolyse eine Schlüsselrolle bei der licht-stimulierten Schließung der Ionenkanäle an der Plasmamembran ($g_{h\nu}$) spielt. Angesichts der strikten Kontrolle, die jede Amplifikationsstufe der Phototransduktion unterliegt, erscheint eine direkte Regulation der CK Aktivität ebenfalls als sinnvoll, wenn nicht sogar notwendig, um den Verstärkungsfaktor der cGMP Kaskade genau festzulegen. Die allgemeine Bedeutung von CP, und damit auch von CK, für den Sehvorgang wird durch die Folgen einer autosomalen, rezessiven Krankheit bei Menschen, genannt Hyperornithinämie, die wahrscheinlich Atrophien von Retina und Choroid verursacht, unterstrichen.

Um Hühner B-CK zu charakterisieren, die bezüglich IEP auf 2D-gelen heterogen ist (Nomenklatur der Subspezies: b1, b1*, b2) und damit für das Studium der Enzymregulation interessant erschien, wurde ein neues Reinigungsverfahren entwickelt, das eine Ammonsulfatfraktionierung, die spezifische Elution von einer Sepharose Blue CL-6B Affinitätsmatrix mit ADP sowie FPLC Anionenaustauscherchromatographie auf einer Mono Q HR 5/5 Kolonne beinhaltet. Die Qualität des Endproduktes wird hauptsächlich durch die spezifische Elution von der Affinitätsmatrix bestimmt. Die Methode, die mit Herzgewebeextrakten entwickelt wurde, ist schnell, arbeitet mit hohen Ausbeuten (>50%), liefert reines Protein (>99%) und lässt sich leicht abwandeln um B-CK mit ähnlicher Effizienz (Spezifische Aktivität 300 - 400 EU/mg) aus verschiedenen Geweben wie Kaumagen, Hirn und Retina zu reinigen. In der letzten Reinigungsstufe wurden zwei B-CK Dimerpeaks, genannt Typ I und II, unter isokratischen Bedingungen auf der Mono Q Säule bei 150 mM NaCl aufgelöst.

Durch Komigration mit immunpraezipitierten, in vitro Translationsprodukten, von einem B-CK cDNS Klon genannt B10-1 (Schaefer, 1986; Perriard et al., 1987), auf 2D-gelen wurde gezeigt, dass Typ I B-CK Fraktionen nur b1(b1*) Monomere enthalten, in Typ II Fraktionen aber sowohl b1(b1*) als auch b2 Monomere vorkommen. Da die Monomere b1(b1*) und b2 in allen bisher untersuchten Geweben in einem 1:1 Verhaeltnis vorkamen, wurde das 1:3 Typ I zu Typ II B-CK Dimerpeakverhaeltnis, das fuer Herz B-CK gefunden wurde, als Beweis fuer eine zufaellige Dimerisierung der Monomere in diesem Gewebe ausgelegt.

Mittels Chromatofokussieren in harnstoffhaltigen Puffern auf einer Mono P HR 5/20 Kolonne, konnten die Hauptkomponenten der isoelektrischen Heterogenitaet, die beiden Monomere b1 und b2, vollstaendig getrennt werden. Ausserdem liess sich die Subspezies b1*, die auf 2D-gelen sehr nahe bei b1 wandert, in intermediaeren Peakfraktionen anreichern. Durch quantitative Aminosaeureanalyse wurde gezeigt, dass sich b1 und b2 ausser im Seringehalt kaum unterscheiden. Damit muessen diese beiden Monomere durch verschiedene mRNS codiert sein und koennen nicht durch posttranslationelle Modifikation auseinander hervorgehen. Verdauungsexperimente mit Proteasen und Sequenzanalysen haben Unterschiede zwischen b1 und b2 im N-terminalen Sequenzbereich festgelegt. Zusammen mit den Angaben ueber einen 18c genannten cDNS Klon (Hossle, 1987; Perriard et al., 1987) unterstuetzen diese Resultate die gaengige Arbeitshypothese wonach die Monomere b1 und b2 Produkte desselben Gens sind, deren mRNS durch konstitutives, alternatives Splicing zweier Exone, die fuer den N-terminus kodieren, gebildet werden. Leider konnte diese Idee nicht endgueltig durch die N-terminale Sequenzanalyse von b2 bestaetigt werden, da dieser blockiert war. Die ersten dreissig Aminosaeuren von b1, die mittels N-terminaler Sequenzanalyse identifiziert wurden, stimmten genau mit den cDNS abgeleiteten Angaben fuer B-CK, die schon publiziert worden sind (Babbitt et al., 1986), ueberein.

Die Rechromatographie der Mono Q B-CK Peakfraktionen auf Mono P unter nativen Bedingungen zeigte, dass die Peakverhaeltnisse stabil sind und nicht von den Isolationsbedingungen abhaengen. Die unterschiedlichen Peakverhaeltnisse, die auf der Mono Q Kolonne aufgeloeset wurden, je nach dem ob B-CK von Herz und Kaumagen (muskelaehnlich) oder Hirn und Retina (neural) analysiert wurde, sind als Beweis fuer das Vorhandensein einer gewebsspezifischen Regulation der B-CK Dimerisierung ausgelegt worden. Dieser Befund wurde untermauert durch die Entdeckung einer kleinen MB-CK Population in Huehnerhirnextrakten, bei denen M-CK vorwiegend mit dem b2 Monomer assoziiert ist. Eine moegliche Rolle des b2 Monomers als "vogel-spezifischer" Vektor fuer die subzellulaere Verteilung von CK wurde besprochen. Die Regulation der Oligomerisierung erscheint als eine ergaenzende Moeglichkeit, wo die prae-translationelle Kontrolle (konstitutives, alternatives Splicing) der Monomerverhaeltnisse (1:1) limitiert ist, um die B-CK Dimerzusammensetzung zu bestimmen.

Um die allgemeine physiologische Bedeutung der B-CK Heterogenitaet zu erfassen, wurden Mono Q B-CK Peakfraktionen verschiedener Herkunft (Herz, Kaumagen und Hirn) kinetisch charakterisiert unter Bedingungen wo CP limitierend war. Eine kinetische Heterogenitaet wurde entdeckt, die mit der Anwesenheit von b1* und nicht mit der von b2 in Zusammenhang gebracht werden

konnte. Ein einfaches kinetisches Modell wurde eingefuehrt, in dem den blb1* und b2b1* B-CK Dimeren einen vergleichsmaessig niedrigeren Km-wert von 0.8 mM CP gegenueber 1.6 mM CP der blb1 und blb2 B-CK Dimere zugeordnet wurde. Die Spezies bl* wurde bisher nicht genauer charakterisiert, aber der Vergleich mit Literaturangaben zeigte, dass es sich wahrscheinlich um ein Phosphorylierungsprodukt von bl handelt. Erste Versuche diese Annahme zu bestaetigen sind bisher erfolglos geblieben.

Dieses vermeintliche Phosphorylierungsprodukt von CK, das bisher nur auf der Mono P Kolonne in harnstoffhaltigen Puffern isoliert werden konnte, bietet eine erste mechanistische Moeglichkeit um zu verstehen wie ATP, das sowohl als "Energietraeger" wie auch regulatorisch wirken kann, gezielt an jeder beliebigen Stelle in einer Zelle hergestellt werden koennte. Ein solcher, monomolekularer Schaltmechanismus fuer die ATP-produktion, der nur abhaengig waere von der Anwesenheit des metabolisch inerten und bezueglich Diffusion wesentlich vorteilhafteren, Kreatinphosphats (CP), wuerde die ATP-abhaengige, regulatorische Prozesskontrolle in einer Zelle von unberechenbare, die Diffusion stark beeintraechtigende Parameter wie die "zytosolische Organisation", befreien. Die Tatsache, dass zytosolische CK-isoenzyme mit vielen zellulaeren Substrukturen bzw. Funktionen assoziiert sein koennen, unterstreicht die potentielle Bedeutung von diesem Mechanismus.

Obwohl bisher keine aussergewoehnlichen Vorteile der Enzym-oligomerisierung auffielen, scheint dies eine wichtige Determinante in der Evolution von CK gewesen zu sein. Die unterschiedlichen Kooperativitaeten (Hill plot), die fuer Typ I und II B-CK Fraktionen gefunden wurden, sowie die Tatsache dass die B-CK Dimerisierung gewebsspezifisch reguliert wird, unterstuetzen diesen Befund. Das wahrscheinlich interessanteste Isoenzym, um CK in dieser Hinsicht zu untersuchen, duerfte MiCK sein. Experimente um Faktoren zu bestimmen, die den Oligomerisierungszustand (Dimer vs. Oktamer) von Mi-CK beeinflussen, haben gezeigt dass diese sehr vielfaeltiger Art (Proteinkonzentration, Nucleotide, Lipide usw.) sein koennen. Die bisher kaum signifikanten kinetischen Unterschiede, die bisher zwischen dimeres und oktameres Mi-CK gefunden wurden, duerften verstaerkt werden, wenn Parameter wie die "strukturelle Assoziation" mitberuecksichtigt werden koennen bei der kinetischen Modellierung.

Damit ist in den letzten Jahren ein Bild von CK als ein ein sehr vielseitiges Enzym entstanden, das auf der prae- und insbesondere auf der post-translationellen Seite reguliert wird. Wegen der vielfaeltigen Moeglichkeiten fuer subzellulaere Assoziation bietet CK nicht nur eine Moeglichkeit zur Kontrolle des Energiemetabolismus, sondern gerade wegen der Faehigkeit zur gezielten ATP Produktion koennte dieses Enzym eine wichtige Rolle bei anderen umfassenden Funktionen wie zytoskeletale Organisation und zellulaere Homeostase spielen. Diese globalen CK Funktionen sind in den beiden beigelegten Schemen zusammengefasst. Um den Aspekt der ATP Verteilung durch CK hervorzuheben, das eher zwischen Mitochondrien und Zytoplasma vermittelt als eine aktive Transportmoeglichkeit bereitzustellen, wurde die Bezeichnung "CP-bicycle" dem, in der Literatur verwendeten, Begriff "CP-shuttle" vorgezogen.