



Doctoral Thesis

Biochemical and physiological aspects of mitochondrial creatine kinase

Author(s):

Wyss, Markus

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000668258> →

Rights / License:

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

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH Nr. 9777

**Biochemical and physiological aspects of
mitochondrial creatine kinase**

ABHANDLUNG
Zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Markus Wyss

Dipl. Natw. ETH

geboren am 23. 6. 1963
von Rickenbach (LU)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. H.M. Eppenberger, Referent
PD Dr. T. Wallimann, Korreferent
Prof. Dr. E. Carafoli, Korreferent

1992

Summary

In a literature review, the important findings on the biochemistry and physiology of mitochondrial creatine kinase (Mi-CK) since its discovery in 1964 are summarized and complemented by hypotheses about the involvement of Mi-CK in mitochondrial contact sites, in export of high-energy phosphates from the mitochondrial matrix to the cytosol, and in whole cellular energy metabolism. Most importantly, it is proposed here that essential functions of the CK/PCr system are to *reduce transient times* to reach a new steady state of adenine nucleotide concentrations and to *avoid oscillations* of [ADP] and [ATP] upon abrupt changes in workload.

Purification and biophysical characterization of Mi_a -CK from chicken brain allowed the unequivocal proof that the former and Mi_b -CK from chicken heart are two distinct isoenzymes differing in primary structure, K_m value for PCr, isoelectric points and pH optima. Gel permeation chromatography, direct mass measurements of individual molecules by scanning transmission electron microscopy, and analytical ultracentrifugation confirmed the existence of two different oligomeric forms, dimeric and octameric Mi_a -CK, with molecular masses of 85 kDa and 306-352 kDa and with sedimentation coefficients of 4.9-5.3 and 11.6-12.0 S, respectively.

In addition, it was tested if Mi_a - and Mi_b -CK can form heterodimeric and heterooctameric molecules with subunits of other CK isoenzymes. By denaturation in urea or guanidine hydrochloride and subsequent renaturation, Mi_aMi_b -CK and surprisingly also Mi_aM -CK heterodimers could be generated. In contrast, no heterodimers were obtained between Mi_b - and M- or B-CK. Furthermore, reoctamerization of a mixture of Mi_a - and Mi_b -CK homodimers led to the formation of Mi_aMi_b -CK heterooctamers. In these heterooctamers, the Mi_a - and Mi_b -CK homodimers remained the fundamental building blocks. No subunit exchange between adjacent dimers within the heterooctamer could be observed even after storage for three months at 4°C. The relevance of these data on the structural organization of the Mi-CK octamer and on the physiological aspects of tissue-specific isoenzyme expression is discussed.

Purification of Mi-CK from sea urchin sperm and subsequent characterization by gel permeation chromatography and electron microscopy also revealed octameric Mi-CK molecules, thus suggesting that the octameric structure of Mi-CK is absolutely conserved from echinoderms to mammals and is essential for proper Mi-CK function.

In a further part, the effect of thyroid hormones on CK isoenzymes was investigated, since i) Mi-CK isoenzymes are thought to be displaced from thermodynamic equilibrium and thus represent attractive sites for efficient enzymatic regulation, ii)

thyroid hormones, besides their well-known regulation of transcription by binding to nuclear receptors, were also suggested to have direct effects on mitochondria, and iii) incubation of rat heart mitochondria with ^{125}I -labelled N-bromoacetyl-3,5,3'-triiodo-L-thyronine (BrAcT₃), a thyroid hormone analogue with an alkylating side chain, in a previous study had resulted in the selective labelling of a protein doublet around M_r 45'000 on SDS-polyacrylamide gels (Rasmussen et al., FEBS Lett. 255, 385-390, 1989). In fact, this protein doublet has now been identified as Mi-CK. Immunoblotting experiments with cytoplasmic and mitochondrial fractions of rat heart, brain, and liver, as well as inactivation studies with the purified chicken CK isoenzymes further demonstrated that indeed all four CK isoenzymes (Mi_a-, Mi_b-, M- and B-CK) were selectively labelled by BrAcT₃. However, in contrast to their bromoalkyl derivatives, thyroid hormones themselves did not compete for CK labelling, suggesting that it is not the thyroid hormone moiety but rather the bromoacetyl-driven alkylation of the highly reactive "essential" thiol group of CK which accounts for this selective labelling. Therefore, the assumption of CK isoenzymes as thyroid hormone-binding proteins has to be dismissed. Instead, bromoacetyl-based reagents may allow a very specific covalent modification and inactivation of CK isoenzymes *in vitro* and *in vivo*.

Finally, the ATP binding site of chicken heart Mi_b-CK has been studied by modifying the purified enzyme with a ^{14}C -labelled ATP analogue, CIRATP, in which the reactive label was covalently bound to the γ -phosphate group of ATP. The modified enzyme was digested by pepsin, and a single radioactive nonapeptide was isolated by HPLC. Amino acid analysis and direct sequence determination revealed that the isolated peptide corresponds to amino acids 335-343 within the C-terminal region of Mi_b-CK; this peptide is highly preserved throughout evolution. Asp-335 is very likely the site of modification by CIRATP. The specificity of the ATP analogue for the active site of creatine kinase was demonstrated by the inhibition of the enzymatic activity of Mi_b-CK by CIRATP and by the prevention of this inhibition by ADP.

Zusammenfassung

Die biochemischen und physiologischen Fortschritte, die auf dem Gebiete der mitochondrialen Kreatinkinase (Mi-CK) seit ihrer Entdeckung im Jahre 1964 erzielt wurden, sind in einem ersten Kapitel zusammengefasst und werden durch Hypothesen über die Beteiligung von Mi-CK an mitochondrialen Kontaktstellen, am Export von Hochenergiephosphaten aus der mitochondrialen Matrix ins Cytosol, als auch am gesamten Energiestoffwechsel ergänzt. Insbesondere wird postuliert, dass *Verkürzung von Transitionszeiten* zum Erreichen eines neuen Fließgleichgewichts der Adeninnukleotidkonzentrationen sowie *Verhinderung von [ADP]- und [ATP]-Oszillationen* bei abrupten Änderungen der Belastung essentielle Funktionen des CK/PCr-Systems darstellen.

Reinigung und biophysikalische Charakterisierung von mitochondrialer Kreatinkinase aus Hühnerhirn erlaubten den eindeutigen Schluss, dass Hühnerhirn-Mi_a-CK und Hühnerherz-Mi_b-CK zwei verschiedene Isoenzyme darstellen, die sich in Primärstruktur, K_m-Wert für PCr, isoelektrischen Punkten und pH-Optima unterscheiden. Gelfiltrationsanalyse, direkte Massenmessung von Einzelmolekülen durch "Scanning" Transmissions-Elektronenmikroskopie sowie analytische Ultrazentrifugation bestätigten, dass Mi_a-CK in zwei verschiedenen oligomeren Formen vorliegen kann, dimerer und oktamerer Mi_a-CK mit Molekulargewichten von 85 und 306-352 kDa sowie Sedimentationskoeffizienten von 4.9-5.3 und 11.6-12.0 S, genau wie dies schon in früheren Untersuchungen für Hühnerherz-Mi_b-CK gezeigt worden war.

Des weiteren wurde untersucht, ob Mi_a- und Mi_b-CK Heterodimere oder Heterooktamere mit anderen CK-Untereinheiten bilden können. Bei Denaturierung durch Harnstoff oder Guanidin-Hydrochlorid und nachfolgender Renaturierung bildeten sich Mi_aMi_b-CK- und überraschenderweise auch Mi_aM-CK-Heterodimere. Demgegenüber fanden sich keine Mi_aB-, Mi_bM- und Mi_bB-CK-Heterodimere. Reoktamerisierung einer Mischung von Mi_a- und Mi_b-CK-Homodimeren ergab Mi_aMi_b-CK-Heterooktamere, in denen Mi_a- und Mi_b-CK-Homodimere die Grundbausteine blieben. So wurde selbst nach dreimonatiger Lagerung bei 4°C kein Austausch von Untereinheiten zwischen benachbarten Dimeren innerhalb eines Oktamers festgestellt. Die Bedeutung dieser Daten für die Struktur nativer Mi-CK und für die Gewebe-spezifische Isoenzymexpression wird diskutiert.

Reinigung von Mi-CK aus Seeigelspermien und nachfolgende Charakterisierung durch Gelfiltrationsanalyse und Elektronenmikroskopie zeigte, dass Mi-CK selbst in diesen "niederen" Spezies Oktamere bildet. Die ausgeprägte Konservierung dieser

oligomeren Struktur von den Echinodermen bis zu den Säugetieren ist ein starkes Indiz dafür, dass sie für die physiologische Funktion von Mi-CK essentiell ist.

Da vermutet wird, dass Mi-CK-Isoenzyme *in vivo* zumindest bei hoher Stoffwechselbelastung nicht im thermodynamischen Gleichgewicht sind und deshalb attraktive Ansatzpunkte für enzymatische Regulation darstellen, da Schilddrüsenhormone neben der Regulation der Transkription über nukleäre Rezeptoren offenbar auch direkte Effekte auf Mitochondrien haben, und da Inkubation von Rattenherzmitochondrien mit dem ^{125}I -markierten, alkylierenden Schilddrüsenhormonanalogue N-Bromacetyl-3,5,3'-triiod-L-thyronin in einer früheren Studie zur selektiven Markierung einer Proteindoppelbande um 45 kDa auf SDS-Polyacrylamidgelen geführt hatte (Rasmussen et al., FEBS Lett. 255, 385-390, 1989), wurde der Effekt von Schilddrüsenhormonen auf die CK-Isoenzyme etwas genauer untersucht. Tatsächlich stellt die durch BrAcT_3 markierte Doppelbande Mi-CK dar. Des weitern zeigten Immunblot-Experimente mit zytosolischen und mitochondrialen Fraktionen von Rattenherz, -hirn und -leber sowie Inaktivierungsversuche mit den gereinigten Hühner-CK-Isoenzymen, dass gar alle vier CK-Isoenzyme Mi_a -, Mi_b -, M- und B-CK durch BrAcT_3 selektiv markiert werden. Leider kompetitierten nicht-modifizierte Schilddrüsenhormone *nicht* mit der BrAcT_3 -Markierung, was darauf hindeutet, dass die beobachtete Selektivität nicht auf einer Schilddrüsenhormon-Bindungsstelle des Mi-CK-Moleküls beruht, sondern auf der aussergewöhnlichen Reaktivität der Bromacetylgruppe mit der hochreaktiven essentiellen Thiolgruppe pro CK-Untereinheit. Dementsprechend fallen CK-Isoenzyme als Schilddrüsenhormon-Bindungsprotein ausser Betracht. Umgekehrt könnten sich Bromacetylverbindungen *in vitro* und *in vivo* als sehr spezifische Reagenzien für die kovalente Modifizierung und Inaktivierung von CK-Isoenzymen herausstellen.

Schliesslich wurde durch Inkubation gereinigter Hühnerherz- Mi_b -CK mit ^{14}C -markiertem CIRATP, einem ATP-Analogen, bei dem ein reaktiver Rest kovalent an die γ -Phosphatgruppe von ATP gebunden ist, die ATP-Bindungsstelle von Mi_b -CK untersucht. Das modifizierte Enzym wurde durch Trypsin verdaut und ein einziges markiertes Nonapeptid durch HPLC isoliert. Aminosäureanalyse und direkte Sequenzbestimmung ergaben, dass das isolierte Peptid den Aminosäuren 335-343 der C-terminalen Region von Mi_b -CK entspricht, einem Abschnitt, der während der Evolution sehr stark konserviert blieb. Mit aller Wahrscheinlichkeit wird Asp-335 durch CIRATP modifiziert. Hemmung der enzymatischen Aktivität von Mi_b -CK durch CIRATP und Schutz vor dieser Hemmung durch Vor- oder Co-Inkubation mit ADP bestätigten die Spezifität des ATP-Analogen für die aktive Tasche des CK-Moleküls.