

**Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd**

Proteiny sarkomery

Bakalářská práce

Autor: Eva Masná

Vedoucí práce: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2018

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology
Department of Biological and Biochemical Sciences

Sarcomeric proteins

Bachelor thesis

Autor: Eva Masná

Supervisor: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eva Masná**
Osobní číslo: **C15237**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Proteiny sarkomery**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Zpracujte literární rešerši zaměřenou na téma svalové kontrakce příčně pruhované svaloviny člověka. V práci se nejprve zaměřte na popis struktury, jež se svalové kontrakce u příčně pruhované svaloviny účastní. Po uvedení jejich funkcí a morfologických vlastností dále uveďte přehled proteinů, jež jsou v současné době známy, že se na kontrakci podílejí. U těchto proteinů, včetně těch méně známých, pak detailně popište strukturu, funkci, význam, atd.
- 2) Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed, apod.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

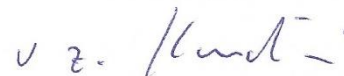
Datum zadání bakalářské práce: **27. listopadu 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30.6 2018

Eva Masná

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Tomášovi Roušarovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a věnovaný čas při zpracování této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato práce je věnována proteinům, které jsou součástí sarkomery. Zabývá se popisem struktury a funkce známých bílkovin podílejících se na kontrakci svalů jako je aktin a myozin, ale také dalším, například fixačním proteinům tvořícím sarkomeru. V práci se také nacházejí informace o svalových enzýmech nebo mechanismu kontrakce kosterního svalstva.

Klíčová slova

Sarkomera, proteiny, svalová kontrakce, sval.

ANNOTATION

The bachelor thesis focuses on the description of proteins located in the sarcomere. It deals with the basic description of the structure and the function of the known proteins involved in the process of striated muscle contraction such as actin and myosin, but also focuses on the other proteins, for instance fixating proteins which create the sarcomere. In addition, the thesis concentrates on muscle enzymes as well as the mechanism of muscle contraction.

Key words

Sarcomere, proteins, muscle contraction, muscle.

OBSAH

ÚVOD.....	13
1. SVALOVÁ KONTRAKCE.....	14
1.1 Excitačně-kontrakční vazba.....	14
2. SARKOMERA.....	16
2.1 Struktura.....	16
2.1.1 Myofibrily.....	17
3. AKTIN.....	19
3.1 Typy aktinu.....	19
3.1.1 G-aktin.....	19
3.1.2 F-aktin.....	20
3.1.3 Polymerace F-aktinu.....	21
3.2 Aktin-vázající proteiny.....	23
3.2.1 Thymosin.....	23
3.2.2 Kofilin.....	23
3.2.3 Profilin.....	24
3.2.4 Arp 2/3 komplex.....	24
3.2.5 Gelsolin.....	24
3.2.6 Tropomyozin.....	24
3.2.7 Troponiny.....	25
4. MYOZIN.....	26
4.1 Myozin II.....	26
4.2 Myozin I.....	27
4.3 Myozin V.....	28
4.4 Myozin VI.....	28
5. VELKÉ SARKOMERICKÉ PROTEINY.....	29
5.1 Titin.....	29
5.2 Obskurin.....	30

5.2.1	Obskurinu podobný protein 1.....	31
5.3	Nebulin.....	32
6.	PROTEINY M-LINIE.....	34
6.1	Myomezin 1	34
6.2	M-protein	34
6.3	Myomezin 3	34
7.	FIXAČNÍ PROTEINY	36
7.1	Desmin	36
7.2	Vimentin a nestin	36
7.3	Plektin	37
7.4	Dystrofin	37
8.	ENZYMY SARKOMERY A MYOGLOBIN	39
8.1	Kreatinkináza	39
8.2	Laktátdehydrogenáza	40
8.3	ATPáza.....	40
8.4	Myoglobin.....	40
	ZÁVĚR	42
9.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	43

SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

OBRÁZEK 1: SCHÉMA STRUKTURY EXCITAČNĚ-KONTRAKČNÍ VAZBY	15
OBRÁZEK 3: MODEL STRUKTURY G-AKTINU.....	20
OBRÁZEK 4: STRUKTURA F-AKTINU	21
OBRÁZEK 5: PROCES POLYMERACE F-AKTINU	22
OBRÁZEK 6: SCHÉMA STRUKTURY MYOZINU II A JEHO INTERAKCE S AKTINEM.....	27
OBRÁZEK 7: SCHÉMA POLOVINY SARKOMERY KOSTERNÍHO SVALU A USPOŘÁDÁNÍ TITINU	30
OBRÁZEK 8: STRUKTURA SARKOMERY VYZNAČUJÍCÍ VELKÉ SARKOMERICKÉ PROTEINY	33
OBRÁZEK 9: HLAVNÍ OBLASTI SARKOMERY	35
OBRÁZEK 10: SCHÉMA VLÁKEN KOSTERNÍHO SVALSTVA	38
OBRÁZEK 11: MODEL MYOGLOBINU.....	41

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABP	aktin-vázající proteiny
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
A-proužek	anizotropní proužek
FnIII	fibronectin III
Ig	imunoglobulin
I-proužek	izotropní proužek
LD	laktátdehydrogenáza
Myo1c	myosin 1C
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NM1	jaderný myozin I
OBSL1	obskurinu podobný protein 1
PPAK	prolin-prolin-alanin-lysin
PEVK	prolin-kyselina glutamová-valin-lysin
TnC	troponin-C
TnI	troponin-I
Tm	tropomyozin
TnT	troponin-T

ÚVOD

Svalová kontrakce je důležitý děj, který v případě kosterního svalu umožňuje lokomoci neboli schopnost pohybu. Podstatou svalové kontrakce je vzájemné působení aktinu a myozinu, kdy díky energii ATP dojde k vzájemnému zasunutí myofibril a tím ke zkrácení sarkomery. Proteiny sarkomery tak hrají důležitou roli při kontrakci svalů. Cílem těchto proteinů je nejen schopnost svalového stahu, ale také stabilita svalového vlákna, komunikace se sarkoplazmatickým retikulem nebo enzymatická funkce.

V posledních několika letech bylo zjištěno, že kromě hlavních dvou sarkomerických proteinů aktinu a myozinu plní důležitou roli také fixační proteiny nebo tzv. velké proteiny, z nichž např. titin je očividně nejdelším lidským proteinem. Mnoho z těchto proteinů navíc tvoří více izoform, z nichž každá plní různou funkci.

1. Svalová kontrakce

Svalový stah příčně-pruhované svaloviny je uskutečněn pomocí volního nervového systému, kdy je neurotransmiter acetylcholin schopen přenést nervový podnět přes nervosvalovou ploténku až do svalového vlákna. Zde dojde ke vzniku akčního potenciálu, depolarizace a následně k repolarizaci. Velmi důležitou roli při kontrakci kromě aktinu a myozinu hrají Ca^{2+} ionty, troponiny a tropomyoziny. Za spotřeby ATP je myozin schopen se posouvat po aktinovém filamentu, dochází k zasunutí aktinových a myozinových vláken do sebe, čímž vytváří podstatu svalového stahu. Konec svalové kontrakce se nazývá relaxace, kdy dochází k návratu svalových vláken do původního stavu.

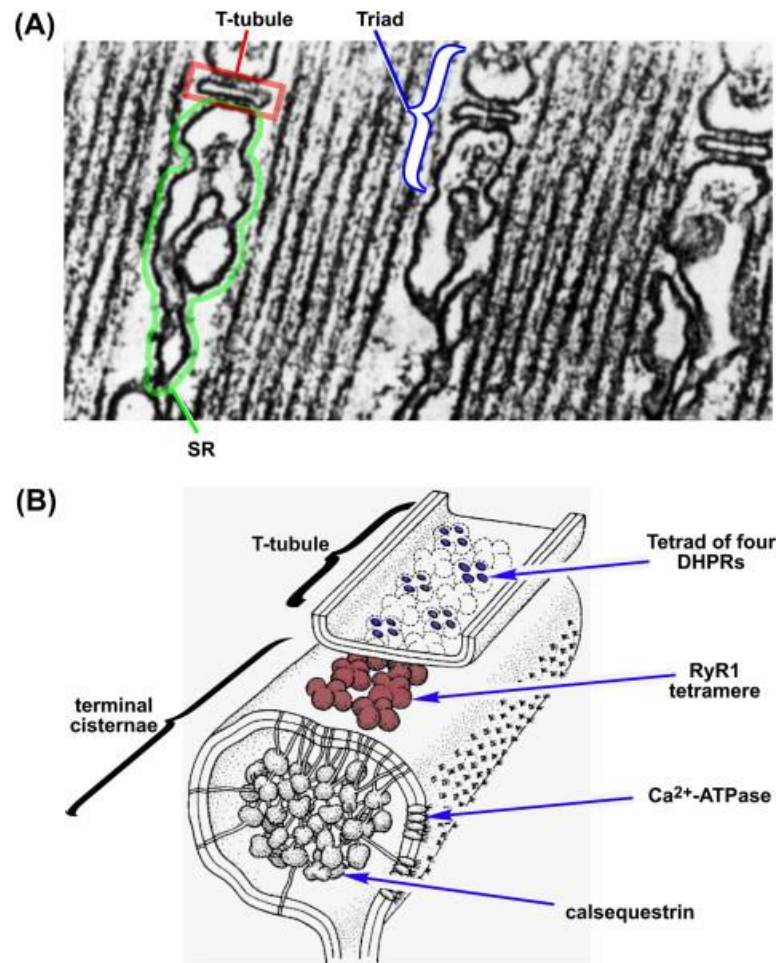
Chemická synapse mezi svaly a nervovou soustavou má název neurosvalová ploténka. Vzruch způsobuje posun synaptických váček, ze kterých dojde pomocí Ca^{2+} k uvolnění mediátorů (acetylcholin) do synaptické štěrbině. Acetylcholin se váže na nikotinové receptory, jež se nachází na sarkolemě. Při aktivaci těchto receptorů dojde k depolarizaci (Na^+ se vplavuje do buňky), následně vznikne akční potenciál a repolarizace. Kontrakce příčně pruhovaných svalů je regulována koncentrací Ca^{2+} . Vápenaté ionty se váží na tropomyozin-troponinový komplex. Troponin-C má dvě vazebná místa s vysokou afinitou pro Ca^{2+} a Mg^{2+} na C-terminální části a dvě vazebná místa s nižší afinitou na N-konci, které vážou Ca^{2+} reverzibilně během aktivace. V nepřítomnosti dostatečné koncentrace Ca^{2+} jsou na polymerovaných F-aktinech vazebná místa pro myozin blokována tropomyozinem, přičemž nastává tzv. blokový stav. V opačném případě při aktivaci se Ca^{2+} váže na troponin-C a dochází ke změně struktury celého komplexu. Tyto změny zapříčiňují pohyb tropomyozinu a tím nastává odhalení vazebného místa na aktinu pro myozin (Agianian et al. 2004).

1.1 Excitačně-kontrakční vazba

Excitačně-kontrakční vazba (obr.1) je činnost svalů, jenž přenáší elektrické signály plazmatické membrány na vzestup koncentrace intracelulárního Ca^{2+} spouštějícího kontrakci myofibrilů. Kontrakce v kosterních svalech závisí na komunikaci mezi sarkoplazmatickým retikulem, plazmatickou membránou a T-tubuly. Tuto vazbu mezi plazmatickou membránou a sarkoplazmatickým retikulem zprostředkovávají kanály sarkoplazmatického retikula, které umožňují uvolňování vápenatých iontů, napěťové kalciové kanály typu L, známé také jako $\alpha 1s$ -dihydropyridinový receptor ($\alpha 1s$ -DHPR). Nachází se přímo v sarkolemě také s ryanodinovým receptorem typu 1 (RyR1) a jsou

umístěny přes membránu sarkoplazmatického retikula. Konformační změna kalciového kanálu typu L vyvolaná depolarizací v průběhu excitace sarkolemy způsobuje otevření kanálů RyR, čímž dojde k uvolňování vápenatých iontů ze sarkoplazmatického retikula do cytozolu.

Nedávno bylo prokázáno, že myogenní progenitory pocházející z pluripotentních kmenových buněk, získávají během prvních dvou týdnů od jejich diferenciace specifickou vazbu k excitačně-kontrakční vazbě kosterního svalu (*Lainé et al. 2018*).



Obrázek 1: Schéma struktury excitačně-kontrakční vazby (A) Elektronová mikrografie ukazující triádové spojení v podélném řezu kosterního svalu ryby. T-tubuly (červená) jsou ohraničeny částmi SR (zelená), kontraktilní proteiny jsou orientovány podélně, DHPR a RyR1 se sdružují s jinými junkčními proteiny za vzniku makromolekulárního komplexu, který rozprostírá spojení triád (modrá). (B) Trojrozměrné schéma SR a triády: spojovací membrány, DHPR a RyR. Kanály RyR1 Ca^{2+} (červená) jsou zarovnané ve dvojité řadě se šikmými rozestupy tak, že každý RyR1 vytváří více kontaktních míst se sousedními RyR1. Tetrády čtyř DHPR (modrá) se v T-tubulech spojují s každým dalším RyR1. Schéma znázorňuje také calsequestrin (kalcium-vázající protein v SR) a Ca^{2+} -ATPázu (*Heiny and Meissner 2012*)

2. Sarkomera

Svalové vlákno je základní stavební jednotkou kosterního svalstva. U kosterního svalstva je charakteristické jako syncytium neboli soubuní. Jedná se tedy o mnohojaderný útvar. Povrch svalového vlákna je kryt membránou (sarkolemou), pod kterou se nachází cytoplazma svalového vlákna (sarkoplazma) a v ní jsou podélně orientovány fibrily obsahující kontraktinální proteiny. Myofibrily lze pod světelným mikroskopem vidět jako světlé – izotropní (jednolomné) a tmavé – anizotropní (dvojlomné) úseky, které jsou ohraničeny Z–liniemi tzv. telofragmou. Takto pravidelně ohraničený úsek Z–liniemi se nazývá sarkomera. Jedná se o nejmenší kontraktinální část svalů a její struktura umožňuje koordinovat svalové kontrakce (*Paulin and Li 2004*), (*Ertbjerg and Puolanne 2017*).

2.1 Struktura

Sarkomera je v klidovém stavu dlouhá asi 2,3 μm a při kontrakci se zkracuje přibližně o jednu třetinu délky. Je ohraničena z obou stran Z–liniemi, tvořené převážně α -aktininem (CapZ), které jsou součástí I–proužku (tzv. opticky izotropní úsek). Zralé Z–linie jsou složeny ze stovek proteinů prostupují filamenti a upevňují se až na sarkolemu (*Knöll 2011*), (*Carlisle et al. 2018*). Do těchto linií jsou ukotvena pouze tenká aktinová filamenta. Zesítnění aktinových vláken mezi sousedními aktinovými vlákny je uskutečněno pomocí proteinu α -aktinu. Takto vytvořená struktura nabízí dostačující počet mezer potřebných pro průchod myozinových vláken v Z–linii (*Rode et al. 2016*).

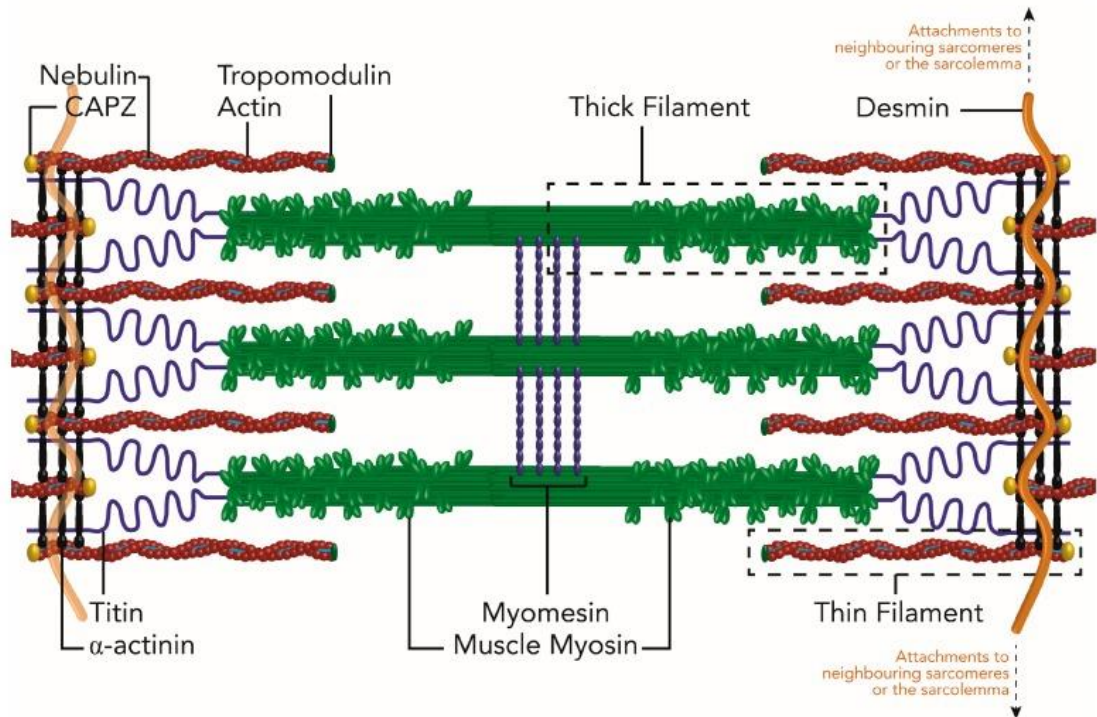
V centru sarkomery se nachází A–proužek (tzv. opticky anizotropní úsek) složený z tlustých myozinových filament. V tomto místě dochází k překryvu aktinových a myozinových vláken, avšak ve středu A–proužku se nachází H–proužek, kde nedochází k překryvu těchto dvou proteinů. Střední část H–proužku tvoří M–linie, kde jsou zakotvená myozinová filamenta pomocí bílkoviny myomezinu. Do oblasti H–proužku zasahuje také protein titin, který začíná na Z–linii a ukotvuje se v M–linii. Titin fixuje tlustá vlákna v tmavším A–proužku při svalové kontrakci. M–linii zesilují sousedící myozinová vlákna, která jsou zesíťovaná nejen proteinem myomezinem, ale také obskurinem aj. (obr.2). V cytoskeletonu M–linie se kromě těchto proteinů nachází také několik metabolických enzymů, jako např. keratinkináza podílející se na energetice kontrakce (*Gautel and Djinović-Carugo 2016*). Střídáním těchto linií vzniká pruhovaný vzhled příčně pruhovaných svalů, který pod mikroskopem vytváří světlé a tmavé úseky.

2.1.1 Myofibrily

Myofibrily neboli svalová vlákénka tvoří kontraktilní část svalového vlákna. Každá myofibrila je složená z asi 1500 myozinových a 3000 aktinových filament. Za sarkolemou se nachází endoplazmatické (sarkoplazmatické) retikulum, ve kterém je vysoká koncentrace vápenatých a hořečnatých iontů, které se podílí na kontrakci svalů. Mezi přechodem anizotropních a izotropních úseků dochází k vychlípení cytoplazmatické membrány do vlákna a tím vytvoření tzv. T-tubulů (obr.1). Myofibrily jsou složeny z kontraktilních bílkovin zejména z aktinu a myozinu, a integrována v parakrystalickém pořadí pomocí cytoskeletárních proteinů (*Gautel and Djinović-Carugo 2016*), které potom tvoří tlustá (myozinová) nebo tenká (aktinová) filamenta.

Tenká filamenta se nacházejí v izotropních úsecích sarkomery. Jsou široká o průměru asi 7 nm a dlouhá 1,5 μm . Tato vlákna jsou nejtenčí ze všech vláken cytoskeletu sarkomery. Tenká vlákna jsou převážně složená z troponinu, tropomyozinu a aktinu, který je monomerní glomerulární bílkovinou (G-aktin) tvořící vláknitý polymer tzv. F-aktin. Protože všechny monomery jsou orientovány jedním směrem, tak jsou aktinová vlákna polarizovaná (*Khaitlina 2014*). Dva takovéto vzájemně obtočené polymery tvoří dvoušroubovici aktinového filamenta. Na jednu otočku dvoušroubovice připadá 14 molekul G-aktinu (*Dominguez and Holmes 2011*). Dále se kolem aktinových vláken nachází velký protein nebulin regulující jejich délku během sestavování sarkomery.

Myozinová filamenta, která se nachází pouze v tmavším proužku sarkomery, jsou dlouhá okolo 1,6 μm a tlustá asi 15 nm v průměru. Tato vlákna jsou tvořena asi z 200 myozinových molekul – myozin II, který je složený ze dvou polypeptidových řetězců, které se navzájem obtácejí. Každé z myozinových vláken je obklopeno šesti aktinovými vlákny v oblasti překrytí, každé aktinové vlákno má ale tři sousední myozinová vlákna (*Ertbjerg and Puolanne 2017*). Při kontrakci svalů se myozinová filamenta s aktinovými proti sobě posouvají a dochází k jejich překryvu, což je podstatou svalové kontrakce.



Obrázek 2: Struktura sarkomery: Schéma znázorňuje zjednodušenou strukturu sarkomery, v níž se nachází Z-linie složená převážně z α -aktininu = CapZ, vytvářející hranice sarkomery. V Z-linii se vyskytuje také desmin, stabilizující strukturu sarkomery. Tenká filamenta tvořená aktinem, nebulinem a tropomodulinem interagují s tlustými myozinovými vlákny a myomezin tvoří střed sarkomery, tzv. M-linii (Carlisle et al. 2018)

3. Aktin

Aktin je jednou z nejčastějších bílkovin eukaryotických buněk, protože tvoří aktinová tenká vlákna. Tento protein se vyskytuje buď jako kulovitý monomer G-aktin (s molekulovou hmotností 42 kDa), nebo se 400 těchto jednotlivých monomerů spojí pomocí hydrolyzy ATP, které vytvoří vláknitý polymer F-aktin dlouhý okolo 10 nm (*Khaitlina 2014*). Každá molekula monomerního aktinu v tenkém vláknu obsahuje specifické místo, na které se může navázat myozinová hlava.

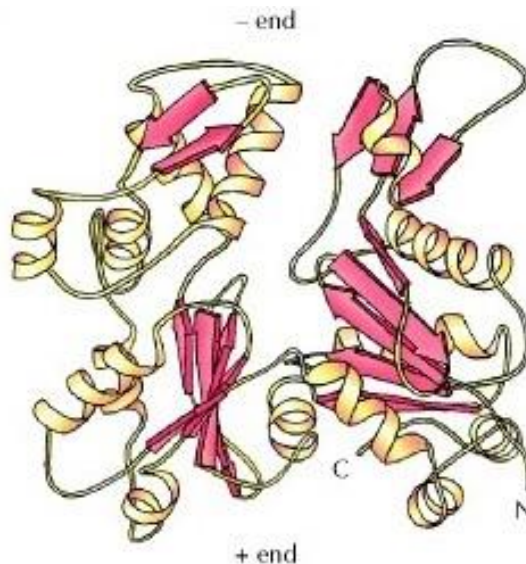
Aktin se kromě svalové kontrakce účastní pohybu buněk, buněčného dělení a intracelulárního transportu, jako např. pohyb vezikul a organel. Aktin může vykonávat více funkcí díky tomu, že obratlovci mají šest různých genů, které kódují více proteinových izoformem Aktin má tedy šest izoform rozdělených podle jejich izoelektrického bodu do tříd α , β a γ . Izoformy mohou být také rozděleny na svalové a cytoplazmatické. Primárně exprimovány v kosterním, srdečním a hladkém svalu jsou α -aktiny. Zbývající dvě izoformy β -aktin a γ -aktin jsou exprimovány všudypřítomně (*Perrin and Ervasti 2010*).

3.1 Typy aktinu

Podrobnosti o struktuře aktinového filamenta byly zjištěny pomocí diagramů rentgenových vláken z orientovaných gelů F-aktinu, které vznikají z koncentrovaných roztoků F-aktinu, a také prostřednictvím elektronové mikroskopie. S pomocí těchto studií došlo k vytvoření atomového modelu aktinového filamentu (*Dominguez and Holmes 2011*).

3.1.1 G-aktin

G-aktin (obr. 3) má strukturu rozdělenou do čtyř domén, asi 40 % struktury má tvar α -helix šroubovice a ve středu G-aktinu se nachází štěrbina pro navázání ATP při polymeraci (po sestavení vlákna hydrolyzuje na ADP a fosfát) nebo ADP, které má však mnohem nižší afinitu k tomuto místu než ADP. ATP se dále váže na Mg^{2+} nebo Ca^{2+} a teprve potom může dojít k polymerizaci vlákna (*Mofrad and Kamm 2006*).

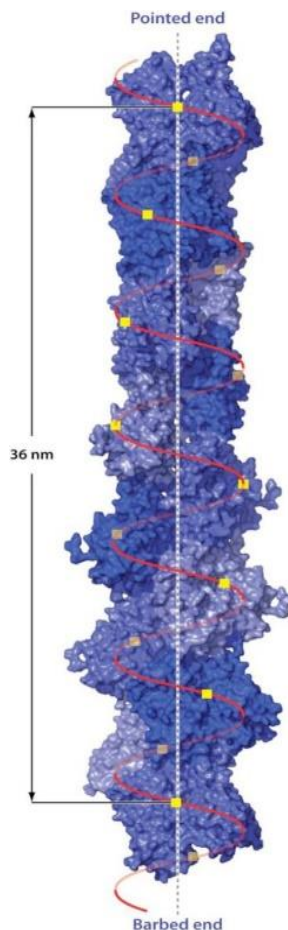


Obrázek 3: Model struktury G-aktinu (Cooper 2000)

3.1.2 F-aktin

Polymerovaný aktin, neboli F-aktin (obr. 4), tvoří aktinové filamentum, které je součástí sarkomery a účastní se kontrakce. Mimo to je také součástí cytoskeletu u eukaryotických buněk. Strukturu tvoří aktinové monomery, a tím že jsou orientovány v jednom směru, mají aktinová vlákna zřetelnou polaritu díky čemuž obsahují (+) a (-) konec, přičemž na (+) konci dochází k rychlejšímu přidávání monomerů (asi pětkrát až desetkrát) aktinu a tím k rychlejšímu růstu vlákna (Rangamani et al. 2014), (Cooper 2000). Sestavování F-aktinu může být sledováno pomocí regulace iontové síly, kdy v roztoku, který má nízkou iontovou sílu dojde k depolymerizaci aktinového vlákna, a naopak pokud je tato síla zvýšena na fyziologickou hodnotu, dochází k spontánní polymerizaci. Pro to, aby vlákno mohlo být sestaveno, je však nejprve potřeba nejméně tří G-aktinů, které se ve vláknech otáčejí o 166° (Cooper 2000).

Monomery aktinu jsou navzájem spojeny slabými vazbami a díky tomu se na koncové části vlákna mohou snadněji připojovat. Pomocí těchto slabých vazeb mají aktinová filamenta reverzibilní dynamickou strukturu. Aktinová vlákna v elektronovém mikroskopu ukázala, že F-aktin má levicovou symetrii s 13 molekulami monomerů, které se každých 6 závitů ve vláknech opakují (Dominguez and Holmes 2011).



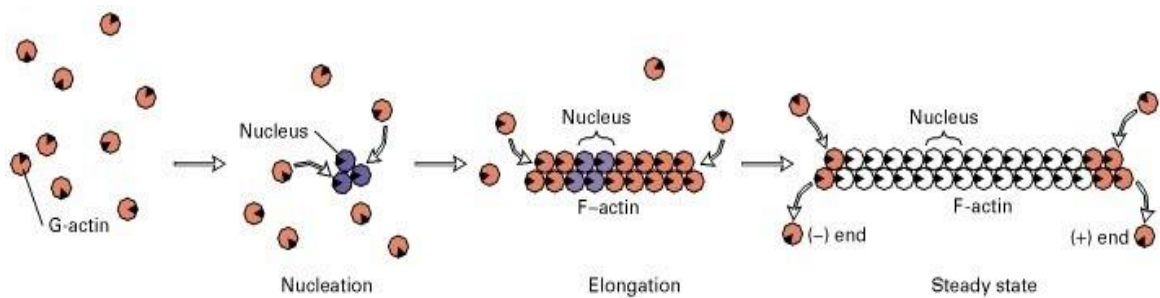
Obrázek 4: Struktura F-aktinu: Šroubovitá struktura polymerizovaného F-aktinu pocházející z kryo-elektronové mikroskopie, *pointed end* = (-) konec, *barbed end* = (+) konec (Dominguez and Holmes 2011)

3.1.3 Polymerace F-aktinu

Dynamická funkce aktinu, kdy dochází k reverzibilnímu ději (polymeraci a depolymeraci), je kromě stavby aktinového vlákna jednou z důležitých funkcí buněčné motility nebo fagocytózy (Cardelli *et al.* 2009). Polymerace aktinových vláken (obr. 5) probíhá ve třech fázích: nukleace, prodloužení a stavu ustálení. Aby aktin fungoval jako motor vytvářející sílu, musí být zapotřebí dostatečná zásoba monomerního aktinu, který je schopen polymerace. Dostatečný počet G-aktinů je zajišťován pomocí reverzibilního zásobníku monomerů a také prostřednictvím zvýšené genové exprese (Xue and Robinson 2013).

V první fázi dochází k *de novo* nukleaci G-aktinů na krátké oligomery (tři monomery), které tvoří stabilní matici pro tvorbu vlákna. Následně v druhé fázi dojde k prodloužení aktinového filamenta přidáním dalších aktinových monomerů na oba konce tohoto oligomeru. Růstem polymerizovaného F-aktinu se dále koncentrace monomerů aktinů snižuje. Ve třetí fázi dochází k ustálení stavu, kdy se monomery vyměňují

s podjednotkami na konci vlákna, avšak nedochází ke změně objemu vlákna. Při tvorbě aktinového filamentu se po přidání ATP-G-aktinových monomerů do vlákna ATP hydrolyzuje na ADP. Díky tomu se většina vlákna skládá z ADP-F-aktinu, avšak konec vlákna tvoří ATP-F-aktin (Lodish 2008). Rychlost růstu aktinového filamentu závisí na koncentraci G-aktinu, a tedy rychlost polymerace je také rovna rychlosti disociace. Pokud dojde ke kritické koncentraci G-aktinu, tak jsou monomery a vlákna v rovnováze (Cooper 2000).



Obrázek 5: Proces polymerace F-aktinu: Volné aktinové monomery, fáze nukleace, fáze prodloužení a ustálená fáze (Cooper 2000)

3.2 Aktin-vázající proteiny

Aktin má schopnost vázat se na velký počet bílkovin, tj. na tzv. *Actin Binding Proteins* a mnoho typů těchto proteinů se váže na stejná místa aktinu. Existuje poměrně velké množství ABP.

Tabulka 1: Výčet aktin-vázajících proteinů a jejich funkcí

Název	Funkce
thymosin β_4	Stabilizace G-aktinu a zábrana polymerace
kofilin	Indukce konverze F-aktinu na G-aktin
profilin	Podpora polymerace vlákna
Arp2/3	Zesítnění aktinových vláken
gelsolin	Zkracování průměrné délky aktinových vláken
tropomyozin	Regulace kontrakce
troponin	Regulace kontrakce

3.2.1 Thymosin

V pohyblivých buňkách je zapotřebí velké zásoby monomerů, která podle potřeby uvolňuje monomerní aktin a toho může dosáhnout např. thymosin (*Winder and Ayscough 2005*). Protein thymosin β_4 je malý protein o molekulové hmotnosti 5 kDa. Patří mezi hlavní aktinové monomerní vazebné proteiny. Je schopen interagovat, začlenit se do specifického místa G-aktinu a následně zabránit růstu polymerního vlákna (*Mofrad and Kamm 2006*).

3.2.2 Kofilin

Kofilin je malá globulární bílkovina, která se váže jak na G-aktin, tak na F-aktin a má mnohem větší afinitu k aktinu navázaném na ADP než na ATP (*Wioland et al. 2017*). Kofilin patří mezi aktin depolymerizující proteiny. Dnes je již známo, že se může také podílet na polymerizaci aktinového vlákna. Zda se však účastní depolymerace či polymerace, závisí na jeho koncentraci vůči aktinu. Díky *in vitro* studiím je prokázáno, že pokud je koncentrace kofilinu k aktinu nižší jak 1 %, tak dojde k depolymerizaci. Naopak pokud je koncentrace kofilin/aktin 1:2 až 1:10, tak se kofilin bude podílet na stabilizaci F-aktinu (*Bamburg and Bernstein 2010*).

3.2.3 Profilin

Profilin je malý cytozolový protein s molekulovou hmotností 15 kDa. Tato bílkovina má vysokou afinitu k monomernímu G-aktinu, podporuje výměnu nukleotidů, tj. ADP za ATP v aktinových monomerech. Profilin rovněž inhibuje hydrolýzu ATP, čímž vzniká větší afinita na (+) konci G-aktinu, a tím podporuje růst polymerizovaného vlákna především na tomto konci (*Mofrad and Kamm 2006*), (*Rangamani et al. 2014*).

3.2.4 Arp 2/3 komplex

Arp 2/3 komplex obsahuje 7 bílkovinných podjednotek – 5 nových polypeptidů a 2 bílkoviny podobné aktinu. Arp 2/3 komplex hraje důležitou roli při tvorbě F-aktinu. Je schopen *de novo* zahájit nukleaci, následně polymerizaci a také rozvětvení a zesílení aktinového vlákna do cytoskeletární formy. Aby mohl tento komplex vytvářet nové vlákno, musí být nejprve aktivován proteiny WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome proteins*) a též předcházejícím aktinovým vláknem (*Dayel and Mullins 2004*).

3.2.5 Gelsolin

Gelsolin je rozčleněn do 6 domén (G1-G6), přičemž domény G1 a G4 obsahují vazebná místa pro aktin. Jeho regulace závisí na koncentraci Ca^{2+} (*Dominguez and Holmes 2011*). Takto aktivovaný gelsolin se naváže na již existující aktinová vlákna, chrání je a zabraňuje přidávání dalších monomerů k (+) koncům aktinového vlákna (*McGough et al. 2003*).

3.2.6 Tropomyozin

Tropomyozin je další z aktin-vázajících proteinů, který je schopen regulace kontrakce ve svalech, kde se vykytuje v monomerní formě (*Ozawa et al. 2017*). Polymeruje do tvaru dvouvláknové šroubovice, a tak obaluje obě strany aktinového vlákna. Společnou interakci s troponinem stabilizují strukturu tohoto tenkého vlákna a umožňují regulovat interakci aktin-myozin tím, že v klidové fázi při nízké koncentraci Ca^{2+} se Tm naváže na troponin, tím pak zabrání spojení vazebného místa aktinu s myozinem (*Geeves et al. 2015*). Poté, když se Ca^{2+} uvolní do sarkoplazmy a naváže se na troponin-C, dojde ke změně konformace této troponinové izoformy. Nakonec se obnaží vazebné místo pro myozin tak, aby mohlo dojít ke svalové kontrakci.

3.2.7 Troponiny

Troponinový komplex obsahuje 3 troponinové jednotky. Patří sem troponin-C, který má schopnost vázat se na Ca^{2+} , dále troponin-T, vytvářející vazbu s tropomyozinem, a troponin-I, jenž inhibuje aktinové místo před navázáním myozinu. Troponiny-T (TnT) a I (TnI) jsou specifické především pro svaly myokardu, kdežto troponin-C (TnC) se nachází ve svalech srdečních, ale také kosterních (*Marín-García 2014*). Komplex TnT vázající se na Tm je velmi důležitý při kontrakci příčně pruhovaného svalstva. TnT (30-35 kDa) je ve své N-koncové oblasti variabilní, zatímco střední a C-koncové části jsou poměrně konzervativní.

In vitro studie používající troponinový komplex ukázaly, že přítomnost N-koncové oblasti TnT potencuje ATP-ázovou aktivitu (*Wei and Jin 2016*). TnT je kódovaný různými geny, čímž vznikají jeho dvě odlišné formy, kdy se jedna z nich nachází ve svalu srdečním a druhá v příčně pruhovaném. Kromě funkce TnT umožnit kontraktilitu svalů se jeho forma nacházející se v myokardu uplatňuje při diagnostice onemocnění srdce (*Xu et al. 2013*).

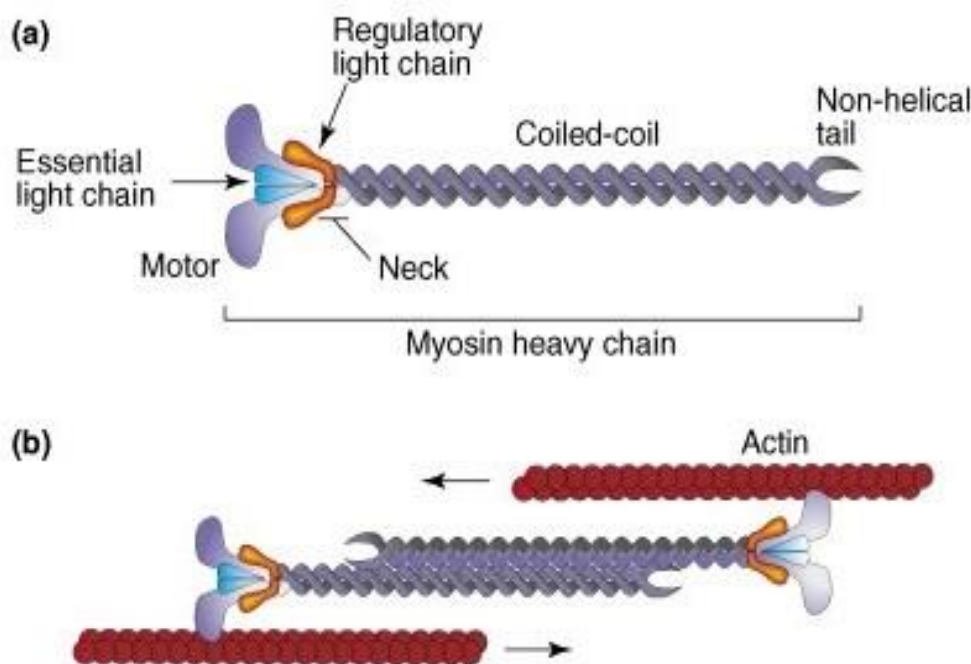
TnC (18 kDa) hraje klíčovou roli pro provedení svalové kontrakce. Při depolarizaci se uvolní Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula a s jeho zvyšující se koncentrací dojde k navázání na TnC. Ionty Ca^{2+} umožňují změnu konformace troponin-tropomyozinového komplexu, tím dojde k odhalení vazebného místa na aktinu pro myozin. Poté se Ca^{2+} transportuje zpátky do sarkoplazmatického retikula, komplex troponinu s tropomyozinem se navrátí do předchozí konformace a nastane svalová relaxace (*Bhagavan and Ha 2011*), (*Saenger and Korpi-Steiner 2017*).

4. Myozin

Myozin se řadí mezi tzv. molekulární motory, které plní významnou roli při kontrakci svalů nebo buněčném transportu. Existuje asi 20 různých tříd myozinů, přičemž myoziny téže třídy jsou si podobné svými konci. Lidský genom obsahuje okolo 40 myozinových genů kódujících 12 tříd (*Krendel and Mooseker 2005*). Nejznámější je myozin I, myozin II, myozin V a myozin VI.

4.1 Myozin II

Myozin II - dimer (obr.6) se účastní kontrakce srdečního svalu, kde se také nachází. Přeměňuje chemickou energii ve formě ATP na energii mechanickou, čímž vytváří pohyb. Jedná se o velkou molekulu složenou z šesti polypeptidových řetězců: dva těžké řetězce ($M_r = 200$ kDa) a čtyři lehké řetězce ($M_r = 20$ kDa). Na jedné ze stran dochází ke vzájemnému obtočení těžkých řetězců, jež vytváří tzv. tyčinkovitou α -helikální část tvořící tělo tlustých myozinových filament. Na straně druhé dochází ke svinutí těchto řetězců, které potom tvoří dvě globulární, tzv. myozinové hlavy. Ty mohou být pomocí krčků, jež mají schopnost ohybu díky enzymu ATP-hydrolázy, schopné interagovat s aktinovými filamenty, protože mají na svém povrchu vazebné místo pro aktin. Tato oblast se nachází v křížovém můstku myozinu na myozinové hlavě nebo v motorové doméně, kde se vyskytuje místo pro navázání ATP. To se zužuje a následně následně vytváří α -helikální krk. Dvě malé proteinové podjednotky: esenciální lehký řetězec (ELC) a regulační lehký řetězec (RLC) obklopují každou oblast hrdla α -helikální šroubovice a poskytují jim mechanickou oporu (*Stull et al. 2011*). Každé tlusté vlákno obsahuje okolo 300 myozinových hlav vyčnívajících z jeho povrchu. Ty z něj vycházejí v pravidelně opakujících se intervalech každých 14,3 nm. Kromě toho je myozin schopen se svým tělem navázat na titin a popřípadě další molekuly (*Feher 2012*). Nedávné studie prokázaly, že jedna z myozinových hlav napomáhá té druhé umožnit její potřebnou orientaci k interakci s aktinem, čímž napomáhá k maximálnímu výkonu uskutečnění svalové kontrakce (*Haraguchi et al. 2013*).



Obrázek 6: Schéma struktury myozinu II a jeho interakce s aktinem. (a) Struktura monomeru myozinu II zobrazující lehké, těžké řetězce a jejich ELC a RLC domény, myozinové hlavy (myozinový motor), krk (spojovací část), tělo myozinového vlákna a koncové části. (b) Myozin II sestavený do bipolárních vláken pomocí C-konce a N-konec se váže na aktinové filameny. Aktivace motorické domény vede natažení aktinových vláken ve směru šipky (Clark et al. 2007)

4.2 Myozin I

Protein myozin I (monomer) byl poprvé objeven u nižších eukaryot. Jedná se o molekulární motor, který se jako monomer nachází téměř ve všech buňkách tkání a účastní se buněčného transportu. Mimo jiné se nachází také ve vnitřním uchu, kde se podílí na správné funkci stereocilií vláskových buněk (Batters et al. 2004). Do této třídy patří také myozin 1c, jenž má relativně krátké tělo a jeho koncovými částmi je schopen interagovat s dalšími bílkovinami. U člověka je tento protein kódován genem MYO1C, díky čemuž vznikají tři izoformy proteinu: izoforma Myo1c B, jaderný myozin I (NM1) a nejdelší izoforma Myo1c A. NM1 se nachází hlavně v jádře buňky a Myo1c převážně v cytoplasmě.

Bylo zjištěno, že při knockoutu NM1 kultivované myší fibroblasty projevují sníženou odolnost vůči hypotonickému prostředí. NM1 tudíž podporuje udržení napětí buněčné membrány, podle atomové mikroskopie pak ztráta NM1 vede ke zvýšení elasticity plazmatické membrány okolo aktinového cytoskeletu (Venit et al. 2016).

4.3 Myozin V

Myozin V (dimer) se podílí na buněčném transportu organel, mRNA, lipidů a proteinových vezikul. Důležité části jsou myozinová hlava, jež obsahuje vazebné místo pro navázání aktinu, a globulární část na koncové části myozinu, na který se napojuje buněčný náklad. U lidí se objevují pouze tři typy myozinu V (Va, Vb a Vc) (*Nascimento et al. 2013*).

4.4 Myozin VI

Myozin VI může fungovat jako monomer, ale také jako dimer. Má jedinečné funkce, protože se jako jediný z myozinů pohybuje směrem k (-) konci aktinového vlákna. Vyskytuje se ve vezikulech nebo částech Golgiho aparátu a podílí se na buněčné endocytóze (*Tumbarello et al. 2013*).

5. Velké sarkomerické proteiny

Sarkomera, jakožto nejmenší svalová jednotka, je sestavena kromě výše uvedených proteinů, tj. aktinu a myozinu, také z poměrně velkých proteinů, jejichž molekulová hmotnost je mnohonásobně větší. Patří sem zejména nebulin, titin a obskurin. Tyto proteiny tvoří nedílnou část sarkomery.

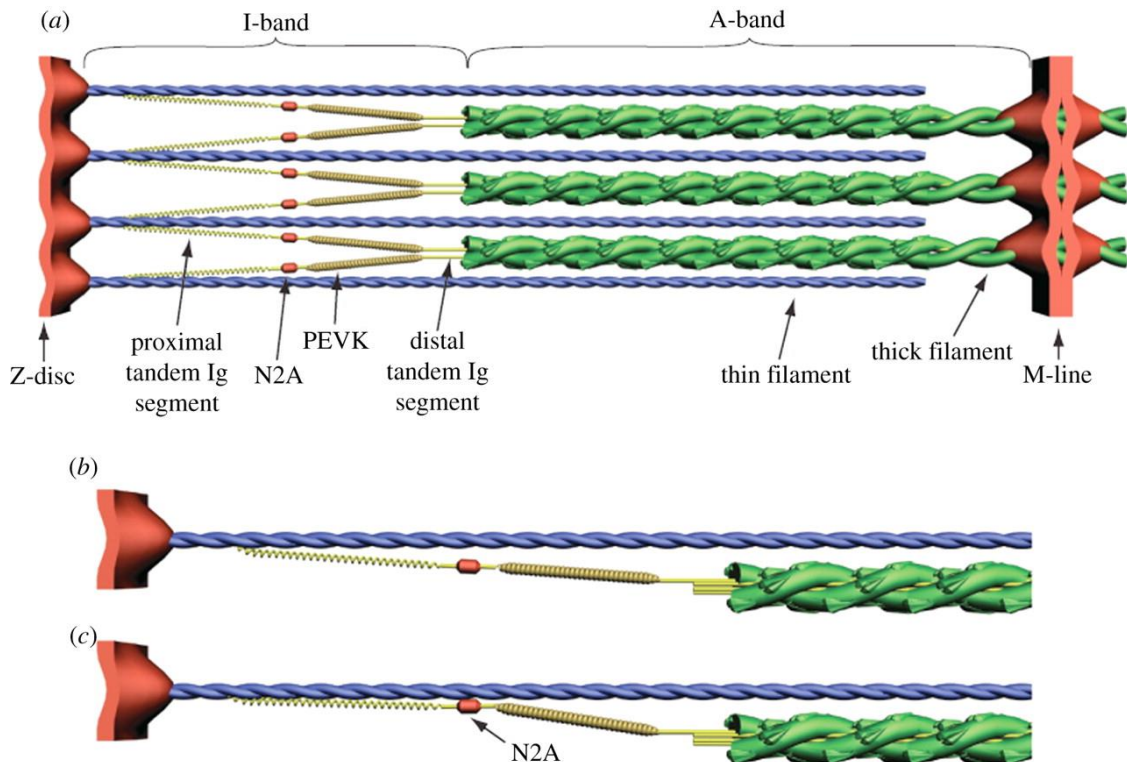
5.1 Titin

Tlustá myozinová vlákna obsahují kromě myozinu II také titin, který je jejich nedílnou součástí. Titin, neboli dříve také konektin, je obrovský protein s molekulovou hmotností 3-3,7 MDa. Jedná se o největší známý protein, jenž byl v lidském těle zaznamenán. Titin se šíří od Z-linií, kde je ukotven pomocí svého N-konce k M-liniím, a po celé své délce poskytuje vazebná místa pro α -aktin, myozin a také pro M-protein, který způsobuje navázání myozinových vláken do M-linie oblasti sarkomery. Předpokládá se, že titin slouží jako matrice k sestavování myozinového filamenta (*Feher 2012*). Tento obrovský protein s modulární strukturou obsahuje imunoglobulinové (Ig) a fibronektinové (Fn III) oblasti, přičemž Ig doména se nachází pouze v oblasti I-proužku sarkomery (*Tonino et al. 2017*).

Titin (obr.7) je elastický protein, který má schopnost chovat se jako tzv. molekulární pružina. Oblast I-proužku titinu se skládá ze segmentů N2A a PEVK, které jsou součástí Ig domény. PEVK segment je oblast bohatá na prolin, obsahující také glutamovou kyselinu, valin, lysin, a má schopnost interagovat s aktinovými vlákny. Délka PEVK oblasti je v srdečním a kosterním svalu různá. Na základě sekvenční analýzy bylo prokázáno, že se tato doména skládá také z opakujících se segmentů PPAK a polyE. PPAK je sekvence, která nejčastěji začíná těmito aminokyselinami: dvěma proliny, alaninem a lysinem. PolyE oblast obsahuje převážně glutamát. PEVK segment se váže na polymerovaný aktin po celé jeho délce a jeho vazebná síla se zvyšuje s obsahem polyE sekvence. Vzájemná interakce PEVK s nebulinem a aktinem je možná v případě, že je titin napnutý, teprve potom dochází v myofibrilách ke slabé vazbě PEVK na aktin, avšak přesné mechanismy vazby PEVK-aktin jsou zatím z velké části neznámé (*Linke et al. 2002*), (*Nagy et al. 2004*).

N2A oblast se nachází v proximální části Ig oblasti, která se prodlužuje při nízké síle. N2A funguje jako mechanický snímač chránící sval před jeho příliš velkým roztahením (*Tiffany et al. 2017*). Bylo prokázáno, že u aktivního svalu vazba Ca^{2+} zvyšuje tuhost v titinu, ale pouze v malé míře. Předpokládá se, že Ca^{2+} je vázán na N2A oblasti

titinu a zvyšuje tuhost tím, že brání vyrovnání sil v proximálních Ig doménách, jež vznikly během pasivního roztažení (King et al. 2011).



Obrázek 7: (a) Schéma poloviny sarkomery kosterního svalu a uspořádání titinu: Z-linie, proximální část Ig segmentu, N2A segment, PEVK segment, distální část Ig segmentu, tenká vlákna, tlustá vlákna a M-linie. Tlusté filamentum (zelené vlákno) je pro jednoduchost znázorněno jako dvouvláknové, ve skutečnosti je trojvláknové. (b) Sarkomera v odpočívajícím stavu při nízké koncentraci Ca^{2+} . (c) Sarkomera při vysoké koncentraci Ca^{2+} , kdy je N2A segment navázány na tenké (modré) vlákno (Nishikawa et al. 2011)

5.2 Obskurin

Obskurin (800 kDa) také patří mezi velké proteiny sarkomery. Izoforma obskurin A je na rozdíl od nebulinu a titinu koncentrován hlavně v periferních částech Z-linií a M-linií, kde je schopen lépe komunikovat s membránou. Podle studií bylo však zjištěno, že se obskurin nachází přednostně v M-liniích zralých myofibril. Díky tomu je kromě vazby s titinem schopen vázat také ankyrin 1 a ankyrin 2, které jsou součástí sarkoplazmatického retikula, a tím vytvořit vazbu mezi myofibrily a sarkoplazmatickým retikulem (Kontogianni-Konstantopoulos and Bloch 2005), (Sauer et al. 2010). Obskurin (obr. 8) je rovněž jako titin složen z FnIII a Ig domén, přičemž N-konec Ig domény tvoří v M-linii komplex s C-koncem titinu a N-koncem myomesinu. Dále C-konec titinu interaguje s N-koncem *obscurin-like 1* proteinu, jenž je podobný bílkovině obskurinu, avšak transkribován jiným genem (Manring et al. 2017).

Kromě Ig a FnIII domény obsahuje obskurin také izoleucin-glutaminovou (IQ) doménu, která je hlavním místem pro navázání Ca^{2+} kalmodulinem. Dále obsahuje SH3 doménu, jež je schopna interakce s proteinovými sekvencemi bohatých na prolin a RhoGEF (Rho guaninový nukleotid) známý jako DH doména nebo PH doména (Bowman *et al.* 2007).

Součástí M-linie, kde se obskurin nachází, není pouze bílkovina myozin, ale také několik proteinů sloužících jako matrice pro myozinová vlákna hrající důležitou roli při jejich sestavování během myofibrinogeneze. Patří sem M-protein, myomesin, titin, obskurinu podobný protein 1 a sMyBP-C (myozin vázající protein), jenž je specifický pro kosterní svalstvo (Manring 2017). Různé experimenty dokázaly, že obskurin je schopen pomocí svého C-konce tvořit komplex s myozinem a tím regulovat tvorbu A-proužku (Kontogianni-Konstantopoulos *et al.* 2004). Ztráta aktivity obskurinu ve skeletárních svalech potencuje nestabilitu M-linie v sousedních myofibrilách, čímž dojde ke sníženému zapojení myozinu do zralých myozinových vláken.

5.2.1 Obskurinu podobný protein 1

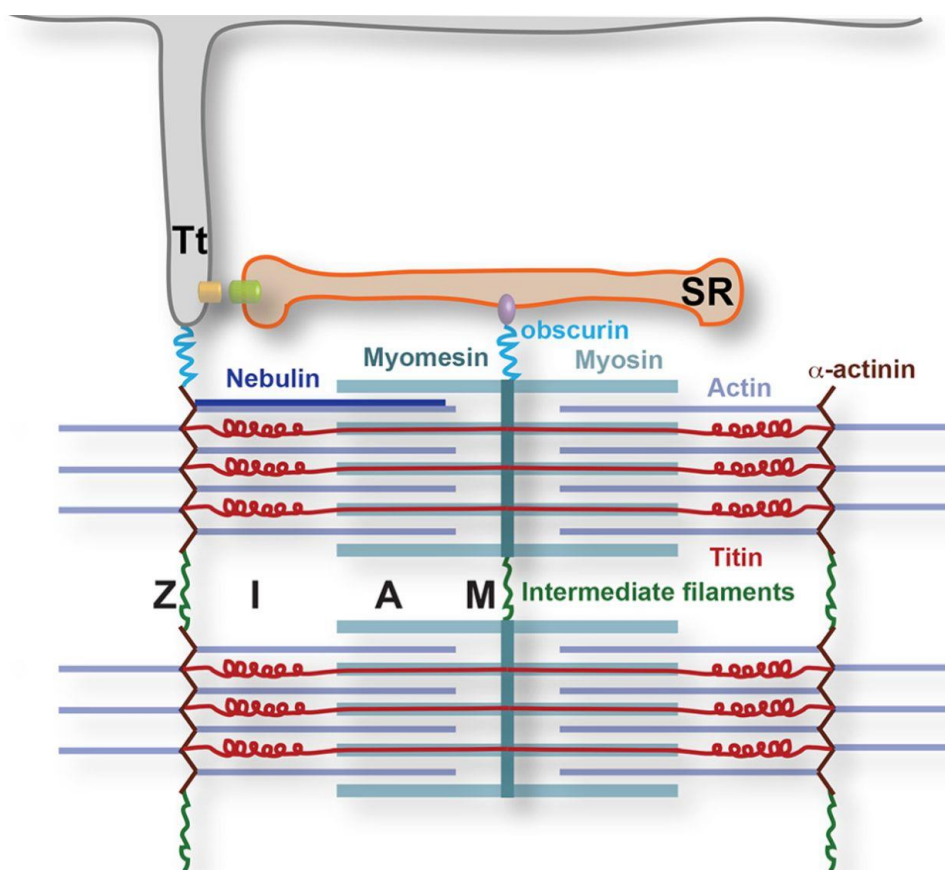
Obskurinu podobný protein 1 je nedílnou součástí sarkomery. Nachází se v M-linii a Z-disku, je schopen interakce s titinem a myomesinem, tzn. že jeho funkce jsou velmi podobné obskurinu, odkud pochází také jeho název. Tento protein vyrovnává při ztrátě obskurinu zachování stavby M-linie a obskurin hraje klíčovou roli při vytváření sarkoplazmatického retikula (Cunha and Mohler 2009). OBSL1 se nachází mezi myofibrily a je schopen stabilizovat jejich strukturu. Obsahuje Ig a FnIII domény, které jsou podobné těm v N-konci obskurinu, postrádá však vazebná místa pro ankyrin, SH3, DH-PH a kinázové domény (Geisler *et al.* 2007), (Pernigo *et al.* 2010). Geny kódující OBSL1 a obskurin patří do nové skupiny homologních genů odvozených od Unc-89/OBSL, což je protein zodpovědný za sestavení M-linie. OBSL1 je exprimován v širokém spektru tkání, díky čemuž má tři izoformy, a to izoformu A (210 kDa), B (110 kDa) a C (150 kDa). Isoformy A a C se nachází ve tkáních mimo srdce, kdežto izoforma B je exprimována do myokardu a placenty (Pulavarti *et al.* 2014).

5.3 Nebulin

Účinná kontrakce kosterních svalů je uskutečněna pomocí regulace délky aktinového vlákna. Mnoho experimentů prokázalo, že se nebulin podílí především na stabilizaci F-aktinu a tím umožňuje aktinovým vláknům dosáhnout patřičné délky (Chu *et al.* 2016). Nebulin (obr. 8) je velký vláknitý protein kódovaný pouze jedním genem, který má molekulovou hmotnost v rozmezí 500-900 kDa. Molekuly nebulinu pokrývají tenká aktinová vlákna po jejich celé délce, napojují se C-koncem v Z-liniích a N-koncem na tropomodulin, protein, který uzavírá (-) konec aktinu a reguluje jeho délku (Meyer and Wright 2013). Bílkovina nebulin se skládá ze 185 za sebou jdoucích modulů 35 aminokyselin a každý z těchto modulů interaguje s jedním aktinovým monomermem tenkého vlákna. Kromě toho moduly v sekvenci 9-162 jsou uspořádány do sad, jež se sedmkrát opakují a vytvářejí tak druhý konzervativní motiv odpovídající periodicitě komplexu tropomyozin-troponin (Pappas *et al.* 2008).

Funkce nebulinu byla v minulosti poměrně nejasná a předpokládalo se, že jeho úloha spočívá v regulaci délky tenkého vlákna, a tvoří tak tzv. molekulární pravítko. Pomocí knock-outovaného myšního modelu v nebulinu (NEB-KO) bylo prokázáno, že má však mnoho dalších funkcí. Mezi ně patří např. pomocná funkce při řízení svalové kontrakce, uplatnění při homeostáze Ca^{2+} nebo při sestavování Z-linií sarkomery (Labeit *et al.* 2011). Nebulin se kromě příčně pruhovaného svalstva nachází také ve svalu srdečním. Několik studií používající metody RT-PCR (real-time PCR) spolu s imunofluorescenčním barvením prokázaly přítomnost nebulinu v myokardu, ale pouze ve velmi nízkých koncentracích (Chu *et al.* 2016).

Nedávno bylo zjištěno, že mutace genu pro nebulin způsobuje autozomálně recesivní genetické onemocnění tzv. kongenitální nemalinovou myopatii. Jedná se o neuromuskulární poruchu, při které dochází k silné svalové slabosti.



Obrázek 8: Struktura sarkomery vyznačující velké sarkomerické proteiny: Tt, T-tubuly; SR, sarkoplazmatické retikulum; Z, Z-linie; I, izotropní úsek; A, anizotropní úsek; M, M-linie (Gautel and Djinović-Carugo 2016)

6. Proteiny M-linie

M-linie (obr.9) je část sarkomery, jež propojuje vlákna myozinu a titinu v jejím středu. Kromě těchto dvou proteinů se zde nachází také myomezin 1, M-protein (myomezin 2) a myomesin 3. Myomezin 1 je exprimován všudypřítomně v příčně-pruhovaném svalstvu, M-protein se nachází v srdci a v rychlých svalových vláknech a myomesin 3 je detekován převážně v pomalých svalových vláknech (*Schoenauer et al. 2008*).

6.1 Myomezin 1

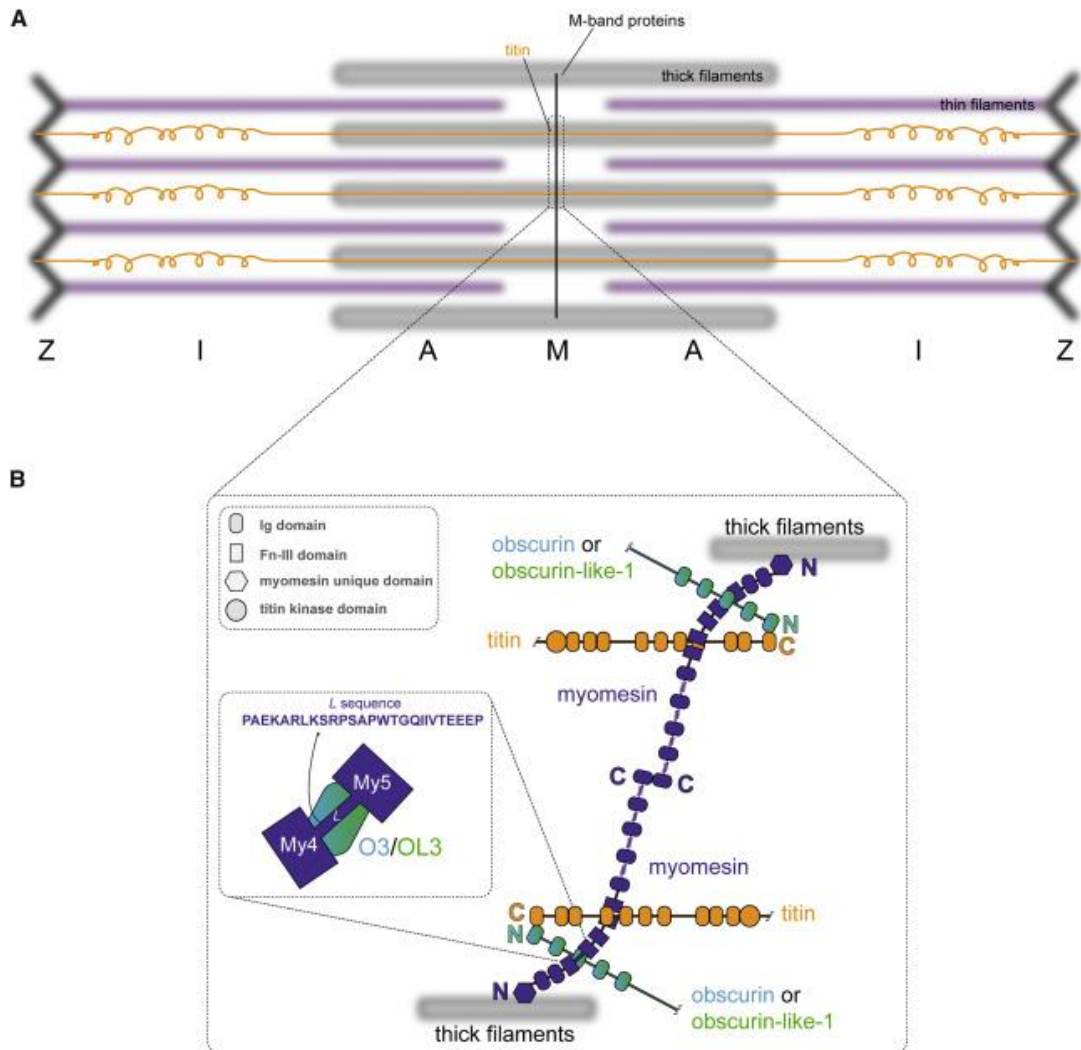
Myomezin 1 (185 kDa) je protein nacházející se v M-linii, který obsahuje struktury třídy I (FnIII) a třídy II (C2-imunoglobulin) (*Reddy et al. 2008*). Po N-koncové doméně následují tyto dvě struktury v pořadí sedm Ig domén a následně pět FnIII domén. Dále N-konec myomezinu (doména 1) se váže na myozin a domény 4-6 interagují s C-koncem titinu. Myomezin 1 je schopen také vytvářet dimery, jež v M-linii zesítují a stabilizují myozinová a titinová vlákna. Při svalové kontrakci se mohou dimery myomezinu roztáhnout mezi myozinová vlákna, takovýto myomezin se poté může chovat jako titin (*Siegert et al. 2011*). Myomezin 1 je také nezbytný pro integraci obskurinu nebo jeho homologu obskurinu podobný protein 1 (*Pernigo et al. 2017*).

6.2 M-protein

M-protein má podobné složení jako obrovský protein titin. C-konec se skládá z pěti Ig domén, které se objevují v pravidelných intervalech. Během pozdního embryonálního vývoje je exprimován v myokardu a také v rychlých svalových vláknech (*Pinotsis et al. 2008*). M-protein a myomezin mají stejné uspořádání domén a aminokyselinových sekvencí asi z 50 %, což znamená, že vznikly z identického genu (*Langel et al. 2005*).

6.3 Myomezin 3

Poměrně nový člen skupiny myomezinů – protein myomezin 3 – je složen z Ig a FnIII domén stejně jako myomezin 1 a M-protein. Tento protein je exprimován v různých druzích příčně pruhovaných svalů, nejvíce však v kosterních svalech novorozenců a také v pomalých svalových vláknech. Gen myomezinu 3 je velmi podobný svou strukturou genům myomezinu 1 a M-proteinů. Podle uspořádání aminokyselin je jejich identita ze 40 % shodná (*Schoenauer et al. 2008*).



Obrázek 9: (A) Hlavní oblasti sarkomery: Z-Zdisk, I-izotropní úsek, A-anizotropní úsek, M-M-linie (B) Modulární myomezin, titin, proteiny obskurin a obskurinu podobný protein 1 tvoří složitou síť v M-linii vytvořenou s C-terminálními myomezinovými dimery, které zesilují myozinové filamenty. Obrázek vyzdvihuje interakci mezi myomezinem a obskurin/ obskurinu podobný protein 1 která byla mapována mezi myomezin fibronektinovými (FnIII) doménami My4 a My5 a imunoglobulinovou (Ig) doménou obskurinu/ obskurinu podobný protein 1 respektive O3/OL3 (Pernigo et al. 2017)

7. Fixační proteiny

Jako fixační proteiny (obr.10) se označují proteiny: desmin, nestin, vimentin a další. Tyto proteiny jsou součástí intermediálních vláken, kde hrají důležitou roli. Další bílkoviny jako plectin a dystrofin nejsou součástí těchto vláken, avšak tvoří s nimi vazby. Plectin navíc interaguje také s vimentinem a aktinem, dystrofin zase s aktinem a lamininem.

7.1 Desmin

Desmin, také znám jako skeletin, má molekulovou hmotnost 53 kDa a patří do rodiny proteinů nacházejících se v intermediálních vláknech. Tato vlákna pod elektronovou mikroskopií vykazují průměr 8-14 nm a jejich tloušťka se tedy pohybuje mezi velikostí mikrofilament a myozinových vláken. Stejně jako ostatní intermediální proteiny je desmin exprimován také v hladkém, kosterním a srdečním svalu (*Bär et al. 2004*). Desmin se nachází převážně v Z-liniích pruhovaných svalů a buňkách hladkých svalů. Vytváří trojrozměrnou síť okolo myofibriální Z-linie a tím udržuje uspořádání architektury svalů. Desmin také vytváří podélné spojení mezi periferiemi po sobě následujících Z-linií a podél plazmatických membrán buněk pruhovaného svalů (*Kreplak et al. 2008*). Doposud bylo pro gen lidského desminu nalezeno více než 40 mutací, které způsobují svalová onemocnění. Všechny tyto mutace vytvářejí odlišnou podskupinu myofibriální myopatie tzv. desmopatie, charakterizované rozpadem Z-linií a myofibrilů, stejně jako akumulací desminu, plectinu a dalších proteinů do velkých intracelulárních agregátů (*Kreplak and Bär 2009*).

7.2 Vimentin a nestin

Vimentin je protein exprimovaný převážně ve fibroblastech, oční čočce a buňkách mezenchymálního původu. Na rozdíl od desminu, jehož exprese převládá ve zralých myofibrilech, je vimentin spolu s nestinem, dalším proteinem intermediálních vláken, exprimován v časných fázích diferenciaci buněk. Přesná úloha exprese těchto proteinů je do značné míry neznámá. Vimentin i nestin vykazují vysokou expresi s rychlou regulací v poškozeném svalu a následně sníženou expresi v regenerujících myofibrilech (*Vaittinen et al. 2001*).

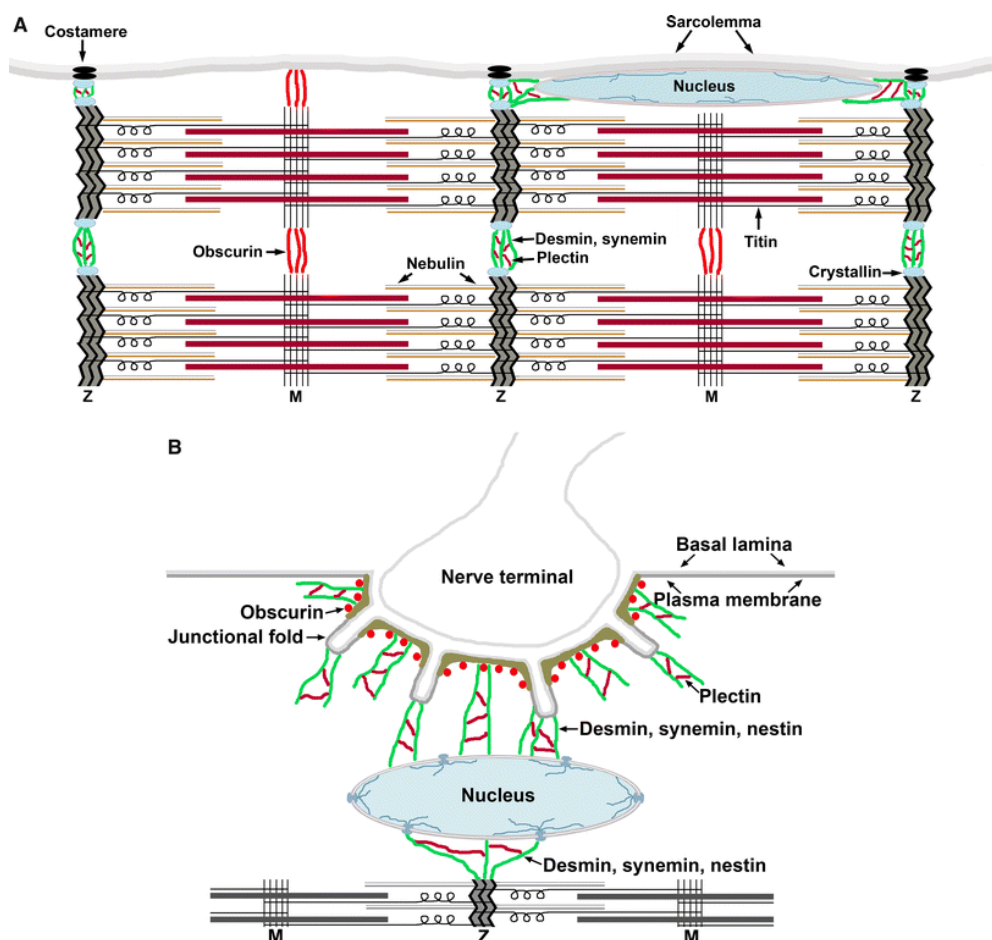
7.3 Plektin

Plektin je velký protein, který se skládá z N-koncových a C-koncových globulárních domén oddělených 200 nm dlouhým vláknem. N-konec obsahuje doménu vázající aktin, je schopná vazby s integrinem- β 4, vimentinem a dalšími. C-konec obsahuje vazebná místa pro intermediální vlákna nebo podjednotku γ 1 AMP kinázy, proteinkinázu C a RACK1: receptor pro aktivovanou kinázu C.

Tento protein je v kosterním svalu exprimován především v Z-liniích a na sarkolemě. Existuje více než 8 izoform, které se liší pouze ve svých N-koncových částech, z nichž 4 (plektin 1a, 1b, 1d a 1f) se nacházejí ve velkých koncentracích ve svalové tkáni. Isoformy plektin 1 a 1f jsou proteiny asociované se sarkolemou, zatímco plektin 1d se nachází pouze v Z-liniích. Plektin 1a ukotvuje keratin intermediálních vláken na hemidesmozómy v bazálních keratinocytech a hraje specifickou roli v migraci fibroblastů (*Rezniczek et al. 2007*).

7.4 Dystrofin

Dystrofin je bílkovina exprimovaná v srdečním i kosterním svalu a je součástí s dystrofinem-asociovaného proteinového komplexu. N-konec dystrofinu interaguje s aktinem a WW doména je oblast, která se váže na β -dystroglykan, jenž je součástí dystroglykanového subkomplexu. Tento subkomplex je schopen interakce s lamininem jako složkou bazální membrány, čímž se vytvoří vazba mezi intercelulárním proteinem, aktinem a extracelulární matricí. Další subkomplex proteinového komplexu asociovaného s dystrofinem obsahuje čtyři transmembránové proteiny (α , β , γ a δ -sarkoglykan). Každý z těchto proteinů je zapojený do různých druhů svalových dystrofií, protože všechny tyto čtyři bílkoviny tvoří sarkoglykanový komplex. Třetí subkomplex zahrnuje α -dystrobrevin a syntefin α 1, β 1 a β 2. Tyto intercelulární proteiny se váží přímo na dystrofin, přičemž N-konec α -dystrobrevinu je asociován se sarkoglykanovým komplexem (*Mizuno et al. 2001*).



Obrázek 10: (A) Schéma vláken kosterního svalstva: Myofibrily (aktinová a myozinová vlákna) jsou pomocí obskurinu, který se nachází v M-linii, ukotvené v sarkolemě. Desmin se syneminem propojují myofibrily v Z-liniích a tím spojují periferní myofibrily se sarkolemou a jádrem přes plectin a krystalin. (B) Model znázorňující polovinu sarkomery a terminální konec nervové buňky: terminální konec, synaptická štěrbina a jádro. Obskurin se nachází v blízkosti plazmatické membrány, zatímco desmin, synemin, nestin a plectin jsou více zastoupeny okolo spojovacích záhybu mezi jádrem a myofibrily (Carlsson et al. 2008)

8. Enzymy sarkomery a myoglobin

Enzymy jsou bílkoviny s katalytickou aktivitou, které mají schopnost určovat nejen povahu, ale také rychlost chemické reakce probíhající převážně v aktivním místě enzymů. Enzymy se nacházejí ve všech živých systémech. Jejich základní složkou je bílkovina, dále pak kofaktor nebo prostetická skupina, které se na ni vážou. Jsou to látky velice specifické, jež vždy přeměňují pouze omezené spektrum substrátů. Hlavní enzymy nacházející se v kosterním svalu jsou kreatinkináza, laktátdehydrogenáza a ATPáza.

8.1 Kreatinkináza

Kreatinkináza (CK) s molekulovou hmotností 82 kDa je enzym nacházející se jak v cytozolu, tak v mitochondriích. Skládá se ze dvou polypeptidových jednotek M a B. Tyto podjednotky následně tvoří tři dimery, izomery: CK-MM (nacházející se převážně ve svalech), CK-MB (v srdečním svalu) a CK-BB (v mozku).

CK-MM katalyzuje reverzibilní fosforylaci kreatinu na kreatinfosfát a naopak. Kreatinfosfát slouží jako zásobárna energie a přenosová energetická molekula dopravující fosfo-skupinu z místa tvorby energie (ATP), tj. z mitochondrie, na místa spotřeby energie, tj. k myofibrilám (*Spindler et al. 2002*). Enzym CK-MM interaguje s oblastí M-linie u sarkoplazmatického retikula. Kromě funkce udržení energetické homeostázy a poskytování stabilního zásobování kreatinfosfátu tento enzym pomáhá udržovat aktivitu také Ca^{2+} -ATP-ázy sarkoplazmatického retikula a dalších energeticky závislých enzymů. Při svalových myopatiích např. extracelulární rhabdomyolýze, kdy se jedná o rozpad svalových vláken kosterního svalu, dochází k uvolňování intracelulárních látek (CK-MM, myoglobin, vápník a draslík) z postižených myocytů do krve. Proto je CK-MM hlavním enzymovým markerem při postižení svalových vláken skeletárního svalstva, přičemž jeho zvýšená aktivita může být způsobena také fyzickou námahou (*Heled et al. 2007*).

8.2 Laktátdehydrogenáza

Laktátdehydrogenáza je enzym patřící mezi oxidoreduktázy a katalyzuje reverzibilní přeměnu laktátu na pyruvát. Tato reakce je známá jako anaerobní fermentace, při které se tvoří NAD^+ , jenž je potřebný pro generování ATP k udržení glykolýzy. Existuje několik izoenzymů laktátdehydrogenázy tvořené dvěma formami. M podjednotka se nachází převážně v anaerobních tkáních, jako jsou kosterní svaly a játra. H forma převládá v aerobních tkáních, jako např. srdeční sval. Byl identifikován také třetí typ – X forma (LDX nebo LD6), která je však pouze ve varlatech. Identita sekvence aminokyselin mezi formami H a M je asi okolo 75 %. Jednotlivé podjednotky se mohou vzájemně kombinovat a vytvářet tetramery, jejichž struktury jsou dost konzervativní. Existuje tedy 6 izoenzymů: LD1 až LD6 (*Read et al. 2001*). Laktátdehydrogenáza se používá také jako marker poškození tkáně, jako například infarkt myokardu, onemocnění plic, jater nebo při akutní pankreatitidě. Mimo to je také používán jako nádorový marker a jeho koncentrace může být sledována během léčby rakovinových onemocnění (*Stankovic Stojanovic and Lionnet 2016*).

8.3 ATPáza

ATPáza je enzym, který katalyzuje přeměnu ATP na ADP a fosfát. ATPáza je membránový transportní protein, má schopnost čerpat Ca^{2+} z buňky pomocí ATP jako zdroje energie a udržovat jejich konstantní koncentraci. Ca^{2+} -ATPáza je polypeptid s molekulovou hmotností 100 kDa patřící do rodiny ATPáz typu P. Je kódovaná skupinou tří genů – SERCA 1, 2 a 3, jež jsou vysoce konzervované, avšak lokalizované na různých chromochomech. Má cca 10 izoforem s různou tkáňovou specifikou. Funkce Ca^{2+} -ATPázy je modulována endogenními molekulami: fosfolambanem a sarkolipinem (*Periasamy and Kalyanasundaram 2007*).

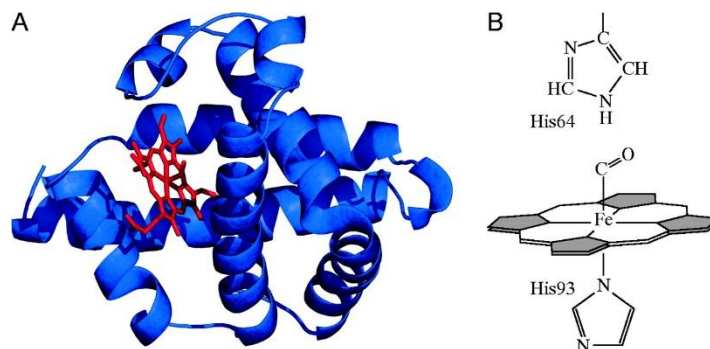
8.4 Myoglobin

Myoglobin (obr.11) je cytoplazmatický protein, který je složen z jednoho polypeptidového řetězce. Nachází se převážně v myocytech srdce a v kosterních svalových vláknech. Myoglobin má strukturní i funkční podobnost s hemoglobinem, odkud pochází také jeho název. Je schopen reverzibilně vázat kyslík, přičemž může usnadnit transport kyslíku z červených krvinek do mitochondrií v období zvýšené metabolické aktivity. Slouží pak také jako zásobník kyslíku. Myoglobin váže kyslík

pomocí svého hemového zbytku, jenž obsahuje porfyrinový kruh v komplexu s ionty železa (Ordway and Garry 2004).

Dále plní zásadní funkci v systému transportu kyslíku a v jeho skladování ve svalových buňkách. Tento systém umožňuje zachovat svalovou pracovní aktivitu a vysokou úroveň oxidativní fosforylace při dlouhodobém nedostatku kyslíku. Množství proteinu je závislé na metabolické aktivitě svalů, navíc má vzájemný vztah s aktivitou terminálních oxidačních enzymů. Myoglobin se nachází v těsné blízkosti mitochondrií, proto lze předpokládat, že se může účastnit při fungování respiračního řetězce (Postnikova et al. 1999).

Při chronické hypoxii dochází ke svalové ztrátě a následně ke snížení oxidační kapacity. Pokud je zařazena fyzická aktivita při hypoxii, může docházet ke zvýšení oxidační kapacity a k hypertrofii. Poté následuje zvýšení míry transportu kyslíku do mitochondrií, které vzniká při vzestupu exprese myoglobinu. Myoglobin usnadňuje difúzi kyslíku do buňky, přičemž slouží jako kyslíkový pufr. Nedostatečný příjem kyslíku tedy omezuje hypertrofii a zvýšená exprese myoglobinu slouží jako prevence při svalových atrofiích či hypoxiích (Peters van der Linde et al. 2017).



Obrázek 11: Model myoglobinu: (A) Matrice myoglobinu je složená z osmi α -helikálních šroubovic (modrá, jenž obklopuje centrální oblast obsahující hemovou skupinu (červená). Tato skupina je schopná vázat ligandy jako je kyslík a jiné. (B) Protohemová skupina je ukotvena či stabilizována histidinovými zbytky: His64 nahoře a His93 dole (Ordway and Garry 2004)

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo podat informace o strukturách a funkcích proteinů, jež jsou součástí sarkomery. Je zde ukázáno, že bílkovin účastnících se svalové kontrakce je celá řada a nejedná se pouze jen o základní proteiny jako jsou aktin, myozin nebo troponiny.

Je zde také popsána funkce proteinů, které jsou zodpovědné za polymeraci aktinového vlákna nebo naopak jeho stabilizaci v monomerní podobě. Dále myozin a jeho různé izoformy, jež mají odlišné funkce jako např. buněčný transport nebo buněčná endocytóza. Významnou skupinou sarkomerních proteinů jsou také proteiny M-linie, fixační proteiny nebo velké proteiny, z nichž největší a v dnešní době nejkoumanější je titin sloužící jako molekulární pružina, čímž také napomáhá zabránit přetěžování sarkomery a stabilizuje tím tlusté myofilamentum. Úloha mnoha těchto proteinů se však v dnešní době stále ještě studuje. Dle mého názoru je studium funkce a struktury sarkomerních proteinů zásadní v pochopení svalové kontrakce, jelikož tím může napomáhat např. k vylepšení léčby různých typů svalových dystrofií a dalších onemocnění kosterního svalstva.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Agianian, B. e. a. (2004). "A troponin switch that regulates muscle contraction by stretch instead of calcium." The EMBO journal **23**(4): 772-779.
2. Bamburg, J. R. and B. W. Bernstein (2010). "Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond." F1000 biology reports **2**: 62.
3. Bär, H., S. V. Strelkov, et al. (2004). "The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation?" Journal of structural biology **148**(2): 137-152.
4. Batters, C., C. P. Arthur, et al. (2004). "Myo1c is designed for the adaptation response in the inner ear." The EMBO journal **23**(7): 1433-1440.
5. Bhagavan, N. V. and C.-E. Ha (2011). Chapter 19 - Contractile Systems. Essentials of medical biochemistry. San Diego, Academic Press: 241-259.
6. Bowman, A. L., A. Kontrogianni-Konstantopoulos, et al. (2007). "Different obscurin isoforms localize to distinct sites at sarcomeres." FEBS letters **581**(8): 1549-1554.
7. Cardelli, L., E. Caron, et al. (2009). "A process model of actin polymerisation." electronic notes in theoretical computer science **229**(1): 127-144.
8. Carlisle, C., K. Prill, et al. (2018). "Chaperones and the proteasome system: Regulating the construction and demolition of striated muscle." International journal of molecular sciences **19**(1): 32.
9. Carlsson, L., J.-G. Yu, et al. (2008). "New aspects of obscurin in human striated muscles." Histochemistry and cell biology **130**(1): 91-103.
10. Clark, K., M. Langeslag, et al. (2007). "Myosin II and mechanotransduction: a balancing act." Trends in cell biology **17**(4): 178-186.
11. Cooper, G. M. (2000). The cell: A molecular approach, ASM Press.
12. Cunha, S. R. and P. J. Mohler (2009). "Ankyrin protein networks in membrane formation and stabilization." Journal of cellular and molecular medicine **13**(11-12): 4364-4376.
13. Dayel, M. J. and R. D. Mullins (2004). "Activation of Arp2/3 Complex: Addition of the first subunit of the new filament by a WASP protein triggers rapid ATP hydrolysis on Arp2." PLoS biology **2**(4): e91.
14. Dominguez, R. and K. C. Holmes (2011). "Actin structure and function." Annual review of biophysics **40**: 169-186.

15. Ertbjerg, P. and E. Puolanne (2017). "Muscle structure, sarcomere length and influences on meat quality: A review." Meat science **132**(Supplement C): 139-152.
16. Feher, J. (2012). 3.5 - Contractile Mechanisms in Skeletal Muscle. Quantitative Human Physiology. Boston, Academic Press: 249-258.
17. Gautel, M. and K. Djinović-Carugo (2016). "The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion." The journal of experimental biology **219**(2): 135-145.
18. Geeves, M. A., S. E. Hitchcock-DeGregori, et al. (2015). "A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms." Journal of muscle research and cell motility **36**(2): 147-153.
19. Geisler, S. B., D. Robinson, et al. (2007). "Obscurin-like 1, OBSL1, is a novel cytoskeletal protein related to obscurin." Genomics **89**(4): 521-531.
20. Haraguchi, T., K. Honda, et al. (2013). "Function of the head–tail junction in the activity of myosin II." Biochemical and biophysical research communications **440**(4): 490-494.
21. Heiny, J. A. and G. Meissner (2012). Chapter 45 - Excitation—contraction coupling in skeletal muscle A2 - Sperelakis, Nicholas. Cell physiology source book (fourth edition). San Diego, Academic press: 783-800.
22. Heled, Y., M. S. Bloom, et al. (2007). "CM-MM and ACE genotypes and physiological prediction of the creatine kinase response to exercise." Journal of applied physiology **103**(2): 504-510.
23. Chu, M., C. C. Gregorio, et al. (2016). "Nebulin, a multi-functional giant." The journal of experimental biology **219**(2): 146-152.
24. Khaitlina, S. Y. (2014). "Intracellular transport based on actin polymerization." Biochemistry (Moscow) **79**(9): 917-927.
25. King, N. M. P., M. Methawasin, et al. (2011). "Mouse intact cardiac myocyte mechanics: cross-bridge and titin-based stress in unactivated cells." The journal of general physiology **137**(1): 81-91.
26. Knöll, R., et al. (2011). "The Sarcomeric Z-disc and Z-discopathies." Journal of biomedicine and biotechnology **2011**: 569628.
27. Kontogianni-Konstantopoulos, A. and R. J. Bloch (2005). "Obscurin: a multitasking muscle giant." Journal of muscle research & cell motility **26**(6): 419-426.

28. Kontrogianni-Konstantopoulos, A., D. H. Catino, et al. (2004). "Obscurin regulates the organization of myosin into A bands." American journal of physiology-cell physiology **287**(1): C209-C217.
29. Krendel, M. and M. S. Mooseker (2005). "Myosins: Tails (and heads) of functional diversity." Physiology **20**(4): 239-251.
30. Kreplak, L. and H. Bär (2009). "Severe myopathy mutations modify the nanomechanics of desmin intermediate filaments." Journal of molecular biology **385**(4): 1043-1051.
31. Kreplak, L., H. Herrmann, et al. (2008). "Tensile properties of single desmin intermediate filaments." Biophysical journal **94**(7): 2790-2799.
32. Labeit, S., C. A. C. Ottenheijm, et al. (2011). "Nebulin, a major player in muscle health and disease." The FASEB journal **25**(3): 822-829.
33. Lainé, J., G. Skoglund, et al. (2018). "Development of the excitation-contraction coupling machinery and its relation to myofibrillogenesis in human iPSC-derived skeletal myocytes." Skeletal muscle **8**: 1.
34. Lange, S., M. Himmel, et al. (2005). "Dimerisation of myomesin: Implications for the structure of the sarcomeric M-band." Journal of molecular biology **345**(2): 289-298.
35. Linke, W. A., M. Kulke, et al. (2002). "PEVK Domain of Titin: An entropic spring with actin-binding properties." Journal of structural biology **137**(1): 194-205.
36. Lodish, H. (2008). Molecular cell biology, W. H. Freeman.
37. Manring, H. R., O. A. Carter, et al. (2017). "Obscure functions: the location–function relationship of obscurins." Biophysical reviews **9**(3): 245-258.
38. Manring, H. R. e. a. (2017). "Obscure functions: the location–function relationship of obscurins." Biophysical reviews **9**(3): 245-258.
39. Marín-García, J. (2014). Chapter 12 - Cardiomyopathies: A comparative analysis of phenotypes and genotypes. Post-genomic cardiology (second edition). Boston, Academic press: 363-426.
40. McGough, A. M., C. J. Staiger, et al. (2003). "The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions." FEBS letters **552**(2-3): 75-81.
41. Meyer, L. C. and N. T. Wright (2013). "Structure of giant muscle proteins." Frontiers in physiology **4**: 368.

42. Mizuno, Y., T. G. Thompson, et al. (2001). "Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with α -dystrobrevin and desmin." Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America **98**(11): 6156-6161.
43. Mofrad, M. R. K. and R. D. Kamm (2006). Cytoskeletal mechanics: Models and measurements in cell mechanics, Cambridge University Press.
44. Nagy, A., P. Cacciafesta, et al. (2004). "Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal muscle titin." Journal of cell science **117**(24): 5781-5789.
45. Nascimento, A. F. Z., D. M. Trindade, et al. (2013). "Structural insights into functional overlapping and differentiation among myosin V motors." The journal of biological chemistry **288**(47): 34131-34145.
46. Nishikawa, K. C., J. A. Monroy, et al. (2011). "Is titin a 'winding filament'? A new twist on muscle contraction." Proceedings of the royal society B: Biological sciences.
47. Ordway, G. A. and D. J. Garry (2004). "Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle." Journal of experimental biology **207**(20): 3441-3446.
48. Ozawa, H., K. Umezawa, et al. (2017). "Structural and dynamical characteristics of tropomyosin epitopes as the major allergens in shrimp." Biochemical and biophysical research communications.
49. Pappas, C. T., N. Bhattacharya, et al. (2008). "Nebulin Interacts with CapZ and regulates thin filament architecture within the Z-disc." Molecular biology of the cell **19**(5): 1837-1847.
50. Paulin, D. and Z. Li (2004). "Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle." Experimental cell research **301**(1): 1-7.
51. Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram (2007). "SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease." Muscle & nerve **35**(4): 430-442.
52. Pernigo, S., A. Fukuzawa, et al. (2017). "Binding of myomesin to obscurin-like-1 at the muscle M-band provides a strategy for isoform-specific mechanical protection." Structure **25**(1): 107-120.
53. Pernigo, S., A. Fukuzawa, et al. (2010). "Structural insight into M-band assembly and mechanics from the titin-obscurin-like-1 complex." Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America **107**(7): 2908-2913.

54. Peters, E. L., S. M. van der Linde, et al. (2017). "IGF-1 Attenuates hypoxia-induced atrophy but inhibits myoglobin expression in C2C12 skeletal muscle myotubes." International journal of molecular sciences **18**(9): 1889.
55. Pinotsis, N., S. Lange, et al. (2008). "Molecular basis of the C-terminal tail-to-tail assembly of the sarcomeric filament protein myomesin." The EMBO journal **27**(1): 253-264.
56. Postnikova, G. B., S. V. Tselikova, et al. (1999). "Myoglobin content in skeletal muscles of hibernating ground squirrels rises in autumn and winter." Comparative biochemistry and physiology part A: Molecular & integrative physiology **124**(1): 35-37.
57. Pulavarti, S. V., Y. J. Huang, et al. (2014). "Solution NMR structures of immunoglobulin-like domains 7 and 12 from obscurin-like protein 1 contribute to the structural coverage of the human cancer protein interaction network." Journal of structural and functional genomics **15**(4): 209-214.
58. Rangamani, P., G. Y. Xiong, et al. (2014). "Multiscale modeling of cell shape from the actin cytoskeleton." Progress in molecular biology and translational science **123**: 143-167.
59. Read, J. A., V. J. Winter, et al. (2001). "Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase." Proteins: Structure, function, and bioinformatics **43**(2): 175-185.
60. Reddy, K. B., J. E. B. Fox, et al. (2008). "Nuclear localization of myomesin-1: possible functions." Journal of muscle research and cell motility **29**(1): 1-8.
61. Rezniczek, G. A., P. Konieczny, et al. (2007). "Plectin 1f scaffolding at the sarcolemma of dystrophic muscle fibers through multiple interactions with β -dystroglycan." The journal of cell biology **176**(7): 965-977.
62. Rode Christian and e. al (2016). "Myosin filament sliding through the Z-disc relates striated muscle fibre structure to function." Proceedings of the royal society B: biological sciences **283**(1826): 20153030.
63. Saenger, A. K. and N. Korpi-Steiner (2017). Chapter one - Advances in cardiac biomarkers of acute coronary syndrome. Advances in clinical chemistry. G. S. Makowski, Elsevier. **78**: 1-58.
64. Sauer, F., J. Vahokoski, et al. (2010). "Molecular basis of the head-to-tail assembly of giant muscle proteins obscurin-like 1 and titin." EMBO reports **11**(7): 534-540.

65. Schoenauer, R., S. Lange, et al. (2008). "Myomesin 3, a Novel structural component of the M-band in striated muscle." Journal of molecular biology **376**(2): 338-351.
66. Siegert, R., A. Perrot, et al. (2011). "A myomesin mutation associated with hypertrophic cardiomyopathy deteriorates dimerisation properties." Biochemical and biophysical research communications **405**(3): 473-479.
67. Spindler, M., R. Niebler, et al. (2002). "Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism." American journal of physiology-heart and circulatory physiology **283**(2): H680-H687.
68. Stankovic Stojanovic, K. and F. Lionnet (2016). "Lactate dehydrogenase in sickle cell disease." Clinica chimica acta **458**: 99-102.
69. Stull, J. T., K. E. Kamm, et al. (2011). "Myosin light chain kinase and the role of myosin light chain phosphorylation in skeletal muscle." Archives of biochemistry and biophysics **510**(2): 120-128.
70. Tiffany, H., K. Sonkar, et al. (2017). "The insertion sequence of the N2A region of titin exists in an extended structure with helical characteristics." Biochimica et biophysica acta (BBA) - Proteins and proteomics **1865**(1): 1-10.
71. Tonino, P., B. Kiss, et al. (2017). "The giant protein titin regulates the length of the striated muscle thick filament." Nature communications **8**(1): 1041.
72. Tumbarello, D. A., J. Kendrick-Jones, et al. (2013). "Myosin VI and its cargo adaptors – linking endocytosis and autophagy." Journal of cell science **126**(12): 2561-2570.
73. Vaittinen, S., R. Lukka, et al. (2001). "The expression of intermediate filament protein nestin as related to vimentin and desmin in regenerating skeletal muscle." Journal of neuropathology & experimental neurology **60**(6): 588-597.
74. Venit, T., A. Kalendová, et al. (2016). "Nuclear myosin I regulates cell membrane tension." Scientific reports **6**: 30864.
75. Wei, B. and J. P. Jin (2016). "TNNT1, TNNT2, and TNNT3: Isoform genes, regulation, and structure-function relationships." Gene **582**(1): 1-13.
76. Winder, S. J. and K. R. Ayscough (2005). "Actin-binding proteins." Journal of cell science **118**(4): 651.
77. Wioland, H., B. Guichard, et al. (2017). "ADF/cofilin accelerates actin dynamics by severing filaments and promoting their depolymerization at both ends." Current biology **27**(13): 1956-1967.e1957.

78. Xu, R.-Y., X.-F. Zhu, et al. (2013). "High-sensitive cardiac troponin T." Journal of geriatric cardiology : JGC **10**(1): 102-109.
79. Xue, B. and R. C. Robinson (2013). "Guardians of the actin monomer." European journal of cell biology **92**(10): 316-332.