

PhD értekezés

**A titin PEVK domén aktinkötő és mechanikai
tulajdonságai**

Nagy Attila

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

Pécs

2006

| | |
|---------------------------|--|
| A program megnevezése: | Biokémia és molekuláris biológia |
| Programvezető: | Dr. Sümegi Balázs |
| Az alprogram megnevezése: | Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel |
| Alprogramvezető: | Dr. Somogyi Béla |
| Témavezető: | Dr. Kellermayer Miklós S. Z. |

„If the doors of perception were cleansed everything would appear to man as it is: Infinite.”

„Ha az észlelés kapui tiszták lennének, az ember mindent olyannak látna, amilyen valójában: Határtalannak.”

William Blake

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik segítettek e munka elvégzésében.

Mindenekelőtt és mindenek fölött köszönettel tartozom ifj. Dr. Kellermayer Miklósnak támogatásáért, tudásáért, barátságáért, türelméért és emberi példamutatásáért.

Köszönöm Dr. Somogyi Béla Professzor Úrnak, hogy PTE ÁOK Biofizikai Intézetében dolgozhatok, köszönöm őszinte és kiváló kritikáit.

Köszönöm Intézetünk minden dolgozójának önzetlen segítségét és értékes észrevételeit.

Köszönöm Kutatócsoportunk minden tagjának a remek, családi légkört és a barátságot. Köszönöm Hoffmanné Simon Évának a mindennapi kiváló segítséget.

Köszönöm Édesanyámnak és Édesapámnak.

Köszönöm Clara Anderson Schollnak.

Köszönöm barátaimnak, Dr. Kovács Mihálynak és Mártonfalvi Zsoltnak.

Tartalomjegyzék

| | |
|--|----|
| 1. Bevezetés és irodalmi áttekintés..... | 7 |
| 1.1. A titinkutatás története..... | 7 |
| 1.2. A titin a szarkomerben..... | 9 |
| 1.3. A titin szerkezete | 10 |
| 1.4. A titin génjének szerkezete..... | 16 |
| 1.5. A titin szerepe..... | 18 |
| 1.6. A titin kölcsönhatása szarkomerikus fehérjékkel | 21 |
| 1.7. A titin rugalmassága | 23 |
| 2. Célkitűzések | 27 |
| 3. Alkalmazott anyagok, módszerek, elméleti számítások..... | 28 |
| 3.1. A humán vázizom PEVK-darabok klónozása, expressziója és tisztítása..... | 28 |
| 3.2. Fehérjepreparálás..... | 29 |
| 3.3. In vitro motilitási próba | 29 |
| 3.4. Szilárd felszínhez való kötődési próba (solid-state surface binding assay) és aktin-kereszt-kötési próba..... | 30 |
| 3.5. Aktin-PEVK koszedimentáció vizsgálat | 30 |
| 3.6. A miofibrillumok előállítása, jelölése és vizualizálása | 30 |
| 3.7. Steady-state aktin-aktivált ATP-áz mérés | 31 |
| 3.8. Kémiaailag módosított üvegfelszín kialakítása egyedi molekula manipulációhoz.... | 31 |
| 3.9. Atomerő-mikroszkópia..... | 31 |
| 3.10. Az erő - megnyúlás görbék kiértékelése..... | 32 |
| 3.1.1 Immun-elektronmikroszkópia | 33 |
| 3.12. A PEVK domén, mint polielektrolit lánc | 33 |
| 4. Eredmények..... | 35 |
| 4.1. A PEVK szakasz klónozása és expressziója | 35 |
| 4.2. A PEVK kölcsönhatása aktinnal | 36 |
| 4.2.1. A PEVK szegmensek kölcsönhatása aktinnal | 36 |
| 4.2.2. A PEVK fragmentumok kölcsönhatása aktinnal | 40 |
| 4.3. A PEVK szegmensek egyedi molekula mechanikája..... | 44 |

| | |
|--|----|
| 5. Megbeszélés | 52 |
| 5.1. A titin PEVK domén aktinkötése | 52 |
| 5.2. A titin PEVK domén elasztikus tulajdonságai | 57 |
| 6. Kísérleteink alapján levonható legfontosabb következtetések | 62 |
| 7. Összefoglalás | 63 |
| 8. Rövidítések jegyzéke | 66 |
| 9. Hivatkozott irodalom | 67 |
| 10. Az értekezés témakörébe tartozó közlemények | 76 |
| 10. Az értekezés témakörébe tartozó közlemények | 76 |
| 10.1. Az értekezés témakörébe tartozó saját, eredeti közlemények | 76 |
| 10.1.1. Eredeti közlemények | 76 |
| 10.1.2. Referált folyóiratban megjelent absztraktok | 76 |
| 10.1.3. Egyéb absztraktok | 77 |
| 10.2. Értekezéshez nem kapcsolódó egyéb közlemények | 79 |
| 10.2.1. Eredeti közlemények | 79 |
| 10.2.2. Referált folyóiratban megjelent absztraktok | 80 |
| 10.2.3. Egyéb absztraktok | 80 |

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az izomkutatás nem ok nélkül nagy népszerűségnek és tudományos érdeklődésnek örvendő terület. Izomkutatás alatt azonban legtöbbször az aktin és miozin kölcsönhatásának részletes vizsgálatát értik. Ha azonban csak egy fél lépéssel messzebből vesszük szemügyre a harántcsíkolt izmot, és igyekszünk megérteni annak működését, rá kell csodálkoznunk a szövettípus hihetetlen rugalmasságára. Az izmot, annak tönkretétele nélkül több mint kétszeresére nyújthatjuk.

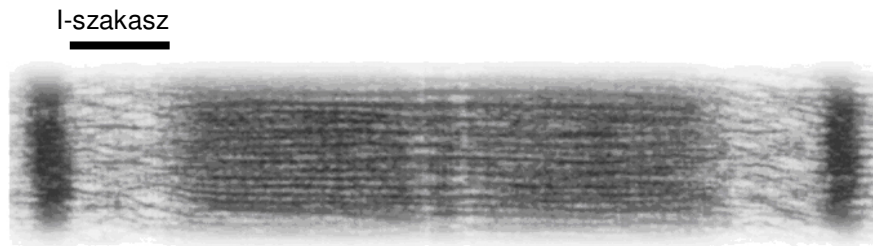
Ez a dolgozat a harántcsíkolt izom rugalmas tulajdonságát biztosító legfontosabb fehérje, a titin működését mutatja be.

1.1. A titinkutatás története.

A harántcsíkolt izom működési egységének, a szarkomer szerkezetének vizsgálata immár több mint fél évszázados múltra tekint vissza. Az első, két filamentum rendszerből építkező szarkomer modellt Huxley és Hanson, valamint Huxley és Niedergerke alkotta meg [1-3]. E modell jól magyarázta az izom számos, aktív összehúzódás, kontrakció során mutatott viselkedését, ám az is hamar kiderült, hogy nem magyarázza az izom passzív rugalmas tulajdonságait. Az izomrostok eredeti hosszuk mintegy kétszeresére nyújthatók anélkül, hogy a szarkomerben fennálló szerkezeti rend megbomlana. A megnyúlás közel egyenletes az izomrost mentén, és az egyes szarkomerek relatív hosszváltozása közel azonos. A megnyúlás során az izomban ellenállás, ún. passzív izomerő fejlődik, amely a nyújtó hatás megszűnte után helyreállítja az izom nyugalmi hosszát. Az is egyértelmű volt, hogy húzás közben fejlődő passzív izomerő nem a vastag és vékony filamentumok kölcsönhatása révén jön létre, mivel a nagymértékben túlnyújtott rostokba ezek már nem fednek át.

Az 1950 - 1960-as években végzett elektronmikroszkópos munkák [4-6] alapján levonható következtetés az volt, hogy a szarkomerben léteznie kell egy harmadik

filamentumrendszernek is [7-9]. Túlnyújtott izomrostokról készült felvételen az volt látható, hogy a vastag filamentumok végéből vékony, alig látható szálak indulnak ki a vékony filamentumok irányába (1. ábra). Ezeket a fehérjéket „gap” vagy „rés” filamentumoknak nevezték el.



1. ábra. Vázizom szarkomer az aktin filamentumok szelektív eltávolítása után. A vastag filamentumok végét a szarkomert lezáró Z-vonallal összekötő rugalmas filamentumok az aktin-mentes I-szakaszban figyelhetők meg [10].

A harántcsíkolt izom elasztikus tulajdonságainak vizsgálata során Maruyama és munkatársai különböző extraháló oldatokkal sorban vonták ki a rostból a fehérjéket. Végül egy olyan frakciót nyertek, amely nagyon ellenálló volt az extraháló oldatokkal szemben, és oldhatatlan, fehérje alapú gélt alkotott [11]. A gélből kivonható legnagyobb fehérje a *connectin* nevet kapta [12].

Ugyenezen az úton haladva a Szent-Györgyi laborban dolgozó Guba Ferenc írta le elsőként a fibrillin nevű fehérjét, amely ugyanaz a fehérje volt, mint Maruyama és munkacsoportja által izolált *connectin* [13, 14].

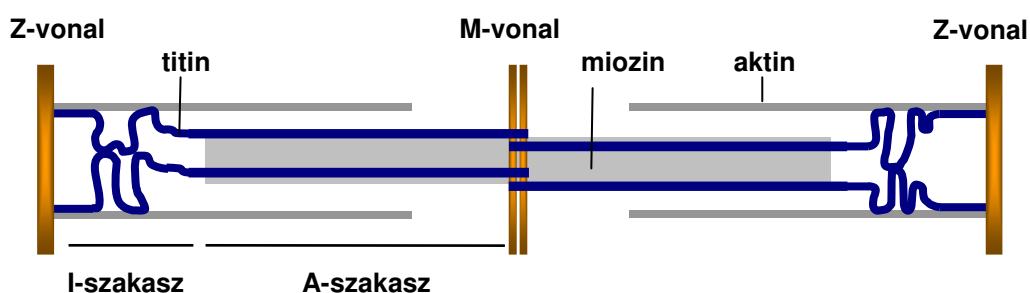
Wang és munkatársai ugyanebben az időben filamin-szerű fehérjék után kutattak gerinces harántcsíkolt izomrostban. Filamint nem sikerült találniuk, de a legnagyobb, megadaltos mérettartományba eső fehérjét *titin*nek nevezték el [15]. Ma már tudjuk, hogy Maruyama és Wang egymástól függetlenül, közel egy időben ugyanarra a fehérjére találtak. A titinkutatás első tíz esztendejének egyik legfontosabb eredménye az volt, hogy sikerült igazolni az óriásmolekula létét, valamint pontosan meghatározni elhelyezkedését a szarkomeren belül. A titin élettani szerepének vizsgálata terén is fontos tényekre derült fény: bizonyított és elfogadott lett, hogy az izom passzív rugalmasságáért elsősorban a titin felelős.

A titin az izom szerkezeti és működési egységében, a szarkomerben található.

1.2. A titin a szarkomerben

A titin a vékony és vastag filamentumok között, azokkal párhuzamosan helyezkedik el. A molekula N-terminálisa a Z-vonalhoz, míg C-terminálisa az M-csíkhöz rögzül, így a titin a szarkomer felét, mintegy 1 μm -nyi távolságot hidal át [16] (2. ábra).

A titin N-terminális vége a Z-csíkhöz erősen rögzül. A titin molekula 60 - 80 kDa tömegű szakasza a Z-vonalban pányvázódik ki. Két, szomszédos szarkomerben található titin ezen a szakaszon átfed. Ilyen módon a titin molekulák egy, a szarkomerek során, az egész filamentum hosszában végigfutó molekulaláncolatot alkotnak.



2. ábra. A titin elhelyezkedése a szarkomerben.

A Z-vonalban a titin kapcsolatot létesít a telethonin (másik nevén titin-sapka, vagy T-cap), valamint az alfa-aktinin fehérjékkel. Irodalmi adatok szerint ezek a fehérjék végzik a titinmolekula N-terminálisának Z-vonalhoz való kipányvázását és a titin molekulák hosszirányú kereszttekötését [17].

A C-terminálisok kapcsolata nagy hasonlóságot mutat az N-terminálisokéval. A titin ezen végei az M-vonalak területén fednek át [17].

Az A-szakaszban a titin mintegy 2 MDa nagyságú része található. Ebben a szakaszban a titin és a vastag filamentum kölcsönhatása igen erős. Minden egyes vastag filamentumhoz,

helyesebben a vastag filamentum M-vonaltól Z-vonal felé mutató feléhez hat titinmolekula kapcsolódik [18, 19].

Az I-szakaszban (szövetípustól, illetve titin izoformától függően) a titinnek egy kb. 0,8 - 1,5 MDa közötti tömegű része található. Ebben a szakaszban a titin kölcsönhatása a vékony filamentummal jóval „rugalmasabb” és „érdekesebb”, mint az A-szakaszban a vastag filamentummal. Ez a szakasz létesít rugalmas kapcsolatot vastag filamentumok végei és a Z-vonalak között.

A titin I – szakaszbeli szegmense a molekula talán legizgalmasabb, így legintenzívebben kutatott részlete. A titin szerkezetét tekintve ezen a szakaszon igen változatos [20]. A molekula I-szakaszbeli része három szegmensre osztható. A vastag filamentumok végétől számított 0,1 μm hosszú szakaszon a titin molekulák hosszuk mentén több molekulából felépülő kötegekké („end filament”) kapcsolódnak össze [21]. A Z-vonal közepétől számított 0,1 μm -es szakaszon a titin molekulák a vékony filamentumokhoz kapcsolódnak [22, 23]. A két szakasz között a kötegek különálló molekulákká válnak szét [24].

A titin mechanikai sajátosságait, szarkomerben betöltött szerepét úgy érthetjük meg, ha részletesen megvizsgáljuk a molekula szerkezetét.

1.3. A titin szerkezete

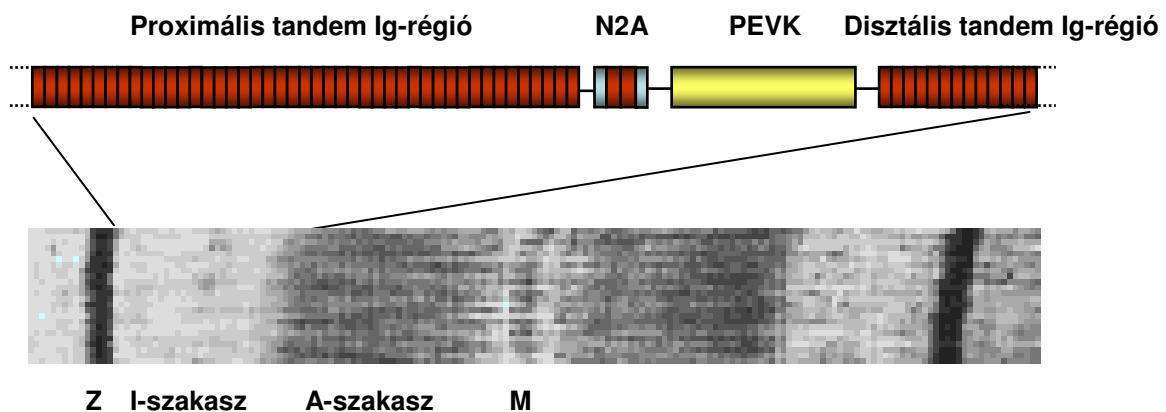
A titin „szélsőségesen” moduláris felépítésű fehérje. A 3.0 - 3.5 MDa tömegű fehérjének mintegy kilencven százaléka klasszikusnak nevezhető építőelemekből, immunglobulin- és fibronektin típusú egységekből épül föl. Az egységek elrendeződése nagy szabályszerűséget mutat.

Induljunk el a titin N-terminálisa felől, és vizsgáljuk meg e hatalmas molekulát! A Z-vonalban a titin 45 aminosav hosszúságú egységekből (Z-repeat) áll, amelyek hét másolatban

találhatóak meg a molekula ezen szakaszán. A Z-repeat egységei nagy (45 %) szekvencia homológiát mutatnak [25]. A titin Z-vonalban található részének a szerepe a molekula N-terminálisának biztos, erős rögzítése a szarkomert határoló vonalhoz.

A C-terminális felé haladva a titin következő szakasza a szarkomer I-szakaszára esik (3. ábra). Talán ez a molekula legizgalmasabb szakasza, de annyit mindenképp elmondhatunk, hogy a titin megnyújthatóságának szerkezeti alapelemei ebben a szakaszban találhatóak.

A titin I-szakaszbeli része izomtípustól függően igen különböző méretű lehet. E funkcionálisan elasztikus szakaszt három részre oszthatjuk (3. ábra). A Z-vonaltól távolabb eső (disztális) tandem Ig szegmensre, a Z-vonalhoz közelebbi (proximális) Ig-régióra, és az e kettő által közrefogott, egyedi szekvenciákból felépülő szakaszra (3. ábra). Ez utóbbi tovább osztható az Ig-domének és egyedi szekvenciák váltakozó sorozatából felépülő N2 régióra, valamint PEVK szegmensre.



3. ábra. A titin I-szakaszbeli részének felépítése és elhelyezkedése a szarkomerben.

Tekintsük át az Ig-régiót, az N2 és a PEVK-szakaszok felépítését részletesen! A proximális és a disztális Ig-régiót a fehérjék világában egyik leggyakrabban előforduló „strukturális modul”, az Ig-domén ismétlődései alkotják. Labeit és munkatársai a titin cDNS szekvenciájának elemzése alapján megállapították, hogy az I-szakaszt zömmel 90-100 aminosav hosszúságú egységek építik fel [26]. A szekvencia-homológia alapján előbb a C2- [27], később az I-típusú [28] immunglobulin (Ig) doménként azonosították az egységeket. Az

immunglobulin egységek térszerkezetének vizsgálata azt mutatta, hogy ezek mindegyike stabil globuláris domént alkot, amelyet hét antiparallel béta-lemez épít fel (4. ábra) [29, 30].



4. ábra. A titin egyik immunglobulin (I27) doménjének szerkezete

A titin I-szakaszában található N2 régió Ig-doménekből és stabil másodlagos szerkezettel nem rendelkező szekvencia részletekből áll. A legismertebb és funkcionális szempontból is legfontosabbnak tartott egyedi szekvencia a titin I-szakaszbeli részében található PEVK szegmens, amely nevét a több mint 70%-át kitevő prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavakról kapta. Labeit és Kolmerer modellje szerint [31], a PEVK szegmensben található nagyszámú, fizioiógias pH-n töltött aminosav oldallánc megakadályozza stabil másodlagos szerkezet kialakulását. A viszonylag rövid szakaszon elhelyezkedő, nagy számú töltött aminosav-oldallánc egymásra gyakorolt vonzó és taszító hatása következtében a PEVK-szegmens a feltételezések szerint nem rendelkezik stabil másodlagos szerkezettel [31]. NMR és CD-spektroszkópiás mérésekkel a PEVK doménben a random szerkezet mellett sikerült kimutatni rövid életidejű, egymásba könnyen átalakuló másodlagos szerkezeti elemeket, poliprolin hélixet, β -redőt [32], azonban a PEVK szakasz másodlagos szerkezetét illetően még sok a nyitott kérdés.

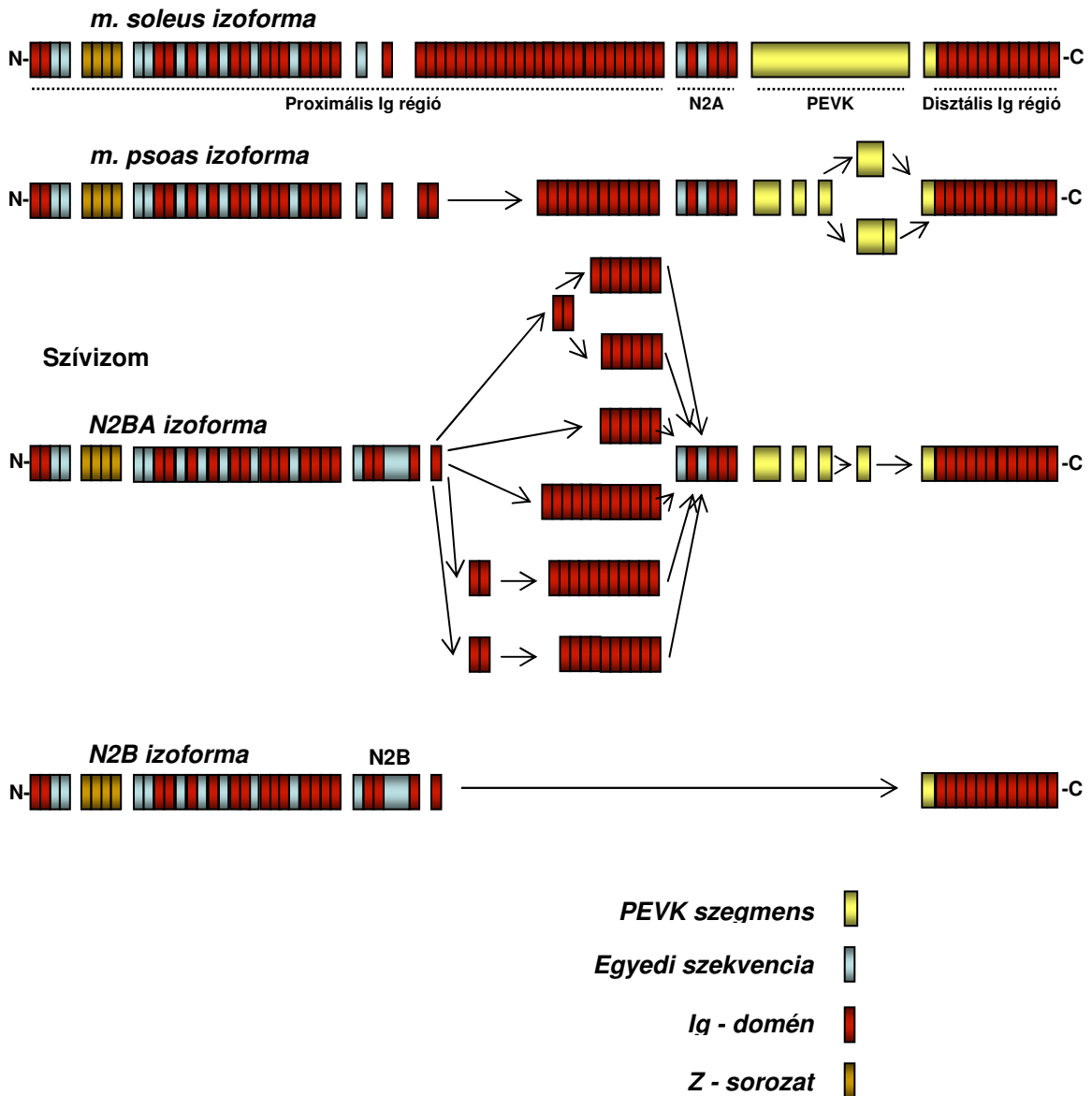
A titin I-szakaszbeli része izomtípustól függően igen különböző lehet. Érdekes tény, hogy a titint egyetlen gén kódolja. A génben található exonok száma hatalmas: 363 [33]. A génről alternatív splicing révén, szövettípustól függően különböző méretű tömegű és szerkezetű titin izoformák fejeződnek ki.

A disztális tandem Ig régió konstitutívan fejeződik ki, azaz az egyes izoformákon belül mindig ugyanolyan. A differenciálisan kifejeződő proximális Ig-régió és a PEVK szakasz hossza izoformánként változó (5. ábra) [34, 35]. Az 5. ábra a titin alternatív splicing révén kifejeződő I-szakaszbeli régiójának moduláris szerkezetét mutatja.

Az egyes izoformák közötti különbségek az egyes izoformák között igen nagyok. A vázizomban 53 Ig doménnel több alkotja a proximális Ig-régiót, mint szívizomban. Az eltérés az egyes izoformák között talán a PEVK szakasz tekintetében a legszembetűnőbb. A *m. soleus* izoformában található PEVK szakasz 2174 aminosav hosszúságú, míg a szívizomban mindössze 163 aminosav alkotja e rendkívül érdekes molekula - részletet (5. ábra). Az egész titinre jellemző modularitás még a stabil másodlagos szerkezettel nem rendelkező PEVK szakasz esetén is megmutatkozik. Két fő szekvencia motívumot különböztetünk meg a PEVK szakaszban: a PPAK és a polyE motívumokat. Az átlagosan 28 aminosav hosszúságú PPAK motívumokban a bázikus oldalláncú aminosavak dominálnak, míg a polyE szekvenciában savas oldalláncú glutamátok [36].

Az N2A és N2B egyedi szekvenciák közül vázizomban általában az N2A forma található meg, míg a szívizom titin izoformák tartalmazhatják az N2B, vagy együttesen az N2A és N2B változatokat. Az titin szövetről szövetre eltérő méretben, és eltérő domén összetétellel expresszálódik. Az egyes izoformák más és más fizikai paraméterekkel (nyújthatóság, hajlítómerevség) rendelkeznek, így a titin nagy mértékben képes befolyásolni az egyes harántcsíktolt izomtípusok merevségét, nyújtással szemben mutatott ellenálló képességét.

Vázizom



5. ábra. A titin I-szakaszbeli régiója különböző harántcsíkolt (vázizom és szívizom) izmokban [37].

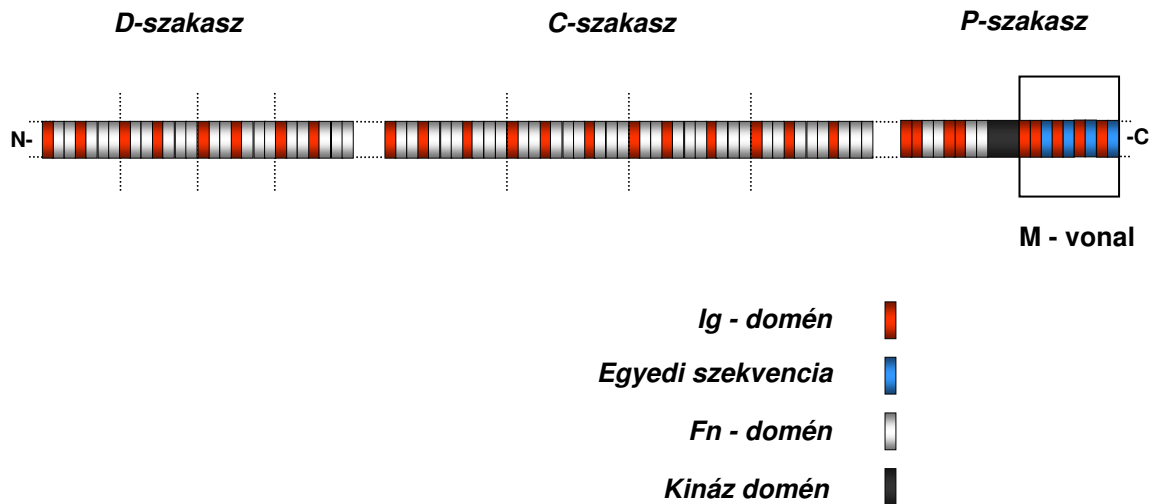
Továbbhaladva a titin mentén a C-terminális irányába a következő szakasz a szarkomer A-szakaszába eső molekula darab. A titin A-szakaszbeli része konstitutívan expresszálódik, azaz minden szövettípusban ugyan olyan. A titinnek ezen szakasza szabályos, moduláris felépítésű. A titin A-szakasza a már korábban bemutatott immunglobulin doménekből,

valamint fibronectin (FnIII) típusú doménekből áll. Az FnIII domének szerkezete nagy hasonlóságot mutat az immunglobulinok felépítésével (6. ábra). Erre a doménra is jellemző a béta-lemezekből álló struktúra és a nagyfokú szekvencia homológia. Csakúgy, mint az immunglobulin domének, a fibronectin típusú szerkezeti elemek is igen gyakoriak a fehérjékben. Az átlagosan 100 aminosavból felépülő béta-hordó szerkezetű domének együttes száma egy titin molekulában eléri a körülbelül háromszázat [27].



6. ábra. A titin egyik fibronectin (A1) doménjének szerkezete

Az A-szakasz N-terminális végéhez közel található D (disztális) - szakasz egy 7 domén hosszúságú mintázat (Ig-Fn-Fn-Ig-Fn-Fn-Fn) hatszori ismétlődéséből áll (7. ábra). Az ezt követő C-zónát egy tizenegyszer ismétlődő, 11 domén hosszúságú sorozat (Ig-Fn-Fn-Ig-Fn-Fn-Fn-Ig-Fn-Fn-Fn szuper-sorozat (super-repeat)) alkotja. A P (proximális) zóna kapcsolja a titint az M-csíkhhoz, valamint ezen a részen található a titin kináz domén (7. ábra).



7. ábra. A titin A-szakaszbeli régiója [17].

A titin A-szakaszának rendezett szerkezete vetette fel azt a lehetőséget, hogy ez a szakasz molekuláris sablonként segíti a vastag filamentum felépülését.

1.4. A titin génjének szerkezete

A titint egyetlen gén kódolja. A titin génje nagyon konzervatív: az összes gerinces genetikai állományában megtalálható, és igen kicsi variációt mutat. Ember esetében a titin génje a 2. kromoszóma hosszú karján, a 2q31 régiójában található [26, 38, 39]. Már a humán genom szekvenciájának meghatározását célzó kutatások kezdeti szakaszában ismert volt, hogy a titin génjét legalább 174 exont tartalmaz, köztük az addig ismert legnagyobb, 17 kb-os emberi exon. A későbbiek során felnőtt humán szív- és vázizomban [27], valamint főtális [32] harántcsíkolt izmok cDNS-ének vizsgálata során újabb 100 exonra bukkantak, amelyek mindegyike PEVK szakaszt kódolt. A PEVK sajátos kodonhasználata és rendkívül kicsi mérete (70-100 bp) miatt a Humán Genom Project kezdeti szakaszában rejtve maradtak a kutatók elől. Mai tudásunk szerint a titin génje (AJ277892.2) egy hatalmas, 280 kb hosszú szakaszon helyezkedik el, mely 363 exont tartalmaz.

Pár szóban tekintsük át az egyes titin izoformákra jellemző exon shuffling útvonalakat és exon összetételt. A Z-vonalban található titin részletet (8.-14. exonok), amely kölcsönhatásban áll az alfa-aktininnel és vélhetőleg az aktinnal [40, 41] hét darab (Z-repeat), egyenként 45 aminosavat kódoló exon kódolja. Mind a hét Z-egység kizárólag ez emlősök szívében expresszáldó titin izoforma esetén található meg, míg más szövettípusokban lévő titinek esetén ezekből 1 - 3 egység hiányzik [42]. Régóta ismert tény, hogy a Z-vonal szélessége izomtípustól függően változik, és nagyon kecsegtető az a hipotézis, hogy a Z-vonal szélességét épp a Z-ismétlődések (Z-repeatek) száma határozná meg [25].

Az I-szakasz (49. - 224. exonok) lehetséges splicing útvonalait korábban már említettük. A 49. exon a szívizom N2B elemét kódolja, az 50. – 101. exonok a tandem Ig- régió exonjai. A 102. – 108. exonok az N2A szakasz exonjait, melyeket a PEVK szakasz exonjai (109. – 224.) követnek [33]. A PEVK exonok többsége PPAK motívumokat kódol és csak 10 exon tartalmazza a polyE szakaszok aminosav sorrendjét. Az egyes titin izoformák szövetspecifikus kialakulása során ez a régió (49. – 224. exonok) játsszák a legfontosabb szerepet, tulajdonképpen ezen exonok shufflingja során alakulnak ki a különböző titin molekulák.

A szarkomer A-szakaszában, valamint az M-vonalban lévő titin régió nagyon konzervatív, minden titin izoforma esetén ugyan olyan. Egy exon, a 362. mégis említésre méltó, mivel ez az exon kódolja azt a molekulaszakaszt, amely calpain (calpain 3, vagy p94) köt. Ez az exon minden szív-specifikus titin izoformában megtalálható, míg a vázizmok esetében hiányozhat [43]. A calpainnak fontos szerepet tulajdonítanak a szignál- transzdukcióban, amely a befolyásolhatja a szövetekben expresszáldó titin izoformák összetételét, így az izom mechanikai, passzív rugalmas tulajdonságainak finomhangolásában játszhat fontos szerepet.

A titin szerkezetének bemutatása után vizsgáljuk meg, mi is a titin szerepe a szarkomerben.

1.5. A titin szerepe

Az elhelyezkedés alapján a titint két részre, egy funkcionálisan rugalmatlan, valószínűleg vastag filamentumot szervező szerepet betöltő A-szakaszbeli és egy rugalmas I-szakaszbeli részre osztottuk fel. A titin biztosítja az izom passzív, nem a vastag és vékony filamentum, vagy azok kölcsönhatása révén kialakuló rugalmasságát. E tény már a régóta ismert. Bizonyítása igen elegáns: a titin ionizáló sugárzással történő degradációja nyomán az izomrostokban fellépő passzív feszültség jelentősen csökkent [44].

A titin másik igen fontos funkciója lehet az A-szakasz illetve az M-vonal centrálása az izomösszehúzódnás során. Ez azért nagyon fontos, hogy az összehúzódnás illetve a megnyúlás során az egyes szarkomereket egyforma terhelés érje [45].

Ismét haladjunk a molekula mentén az N-terminális felől a C-terminális irányába! A titin Z-vonalbeli szakaszának szerepe lehet a Z-vonal szerkezetének kialakításában [40, 46]. A titin ezen részében 45 aminosav hosszúságú motívumok (Z-sorozat, Z-repeat) ismétlődnek, amelyek kötődnek az alfa-aktininhez. A Z-repeatek száma változik, valamint változó számuk korrelációt mutat a Z-vonal szélességével. A Z-vonal szélessége változó: jellemző módon gyors izmokban keskeny, lassú izmokban pedig széles, feltehetően a nagyobb szilárdság biztosítása érdekében.

A titin rugalmasságának titka a molekula I-szakaszbeli részében rejtezik. A Z-vonal közelében a titinmolekulák a vékony filamentumokhoz kapcsolódnak [22, 23], így csak a fennmaradó rész megnyújtható. Az különböző szövettípusokban, az exon shuffling mechanizmusok következtében ezen szakasz hossza igen változatos. Labeit és Kolmerer szerint épp e szakasz „variálhatósága” biztosítja a különböző izom típusok eltérő rugalmas sajátosságait [27, 34]. Ismert tény, hogy az izom passzív rugalmassága összefüggésben van a titin I-szakaszának hosszával, domén összetételével és nyújthatóságával [47]. Például bizonyos fajok szívizmában két titin izoforma expresszálódik: az N2B szekvenciát tartalmazó N2B titin és az N2A és N2B szekvenciákat egyaránt tartalmazó N2BA titin [27]. A két izoforma az egyes szarkomerekben együtt, keverve van jelen, arányuk azonban eltérő. A

túlnyomórészt N2B izoformát (rövidebb egyedi, másodlagos szerkezettel nem rendelkező, így igen elasztikus szakasz) expresszázó izomsejtek passzív rugalmassága kisebb, mint a túlnyomórészt N2BA (hosszabb elasztikus szakasz) titint expresszázó sejteké [47]. A szívizomban expresszázó titin izoformák aránya betegség hatására megváltozhat, ám eddig nem sikerült egyértelmű összefüggést találni egyes kórképek és a titin expressziójának megváltozása között [48] [49, 50].

A titin A-szakaszban található része fiziológiai körülmények között nyújthatatlan. E nyújthatatlanság oka valószínűleg az, hogy a titin szoros kölcsönhatásban áll a vastag filamentumokkal [51]. A már említett mintázatosság (repeats) szerepe abban állhat, hogy ez a szakasz periodikusan, szabályos ismétlődésekben elhelyezkedő kötőhelyeket biztosít a miozin és más A-szakaszbeli fehérjék számára [52]. Érdekes tény, bár nem döntő bizonyíték, hogy az A-szakaszbeli titin 11 domén hosszúságú mintázata 43 nm-enként ismétlődik, és a vastag filamentumon belül a miozin fejek egy olyan helikális struktúrát alkotnak, amelynek menetemelkedése szintén 43 nm. talán nem túlzó az a feltételezés, hogy az A-szakaszban a titin egyfajta állványként szolgál a vastag filamentum szabályos szerkezetének és pontos hosszának kialakulásakor.

Miben állhat a titin szarkomer szerkezetét meghatározó szerepe? Elsősorban tekintsük át, mit tudunk a titinről e tekintetben. Tudjuk, hogy a szarkomer kialakulásakor a titin az első fehérje, amely beépül a miofibrillumba. Tudjuk, hogy kölcsönhat nagyon nagy számú szarkomerikus fehérjével. Tudjuk, hogy szövettípustól függően a titin szerkezete, mérete és rugalmas tulajdonságai mások és mások [53]. Figyelembe véve a fenti tényeket nagy biztonsággal kijelenthetjük, hogy a titinnek igen fontos szerep jut a szarkomer szinte kristályos szabályosságának kialakításában, valamint az izom rugalmasságának finomhangolásában.

A titin kolokalizálódik a kromoszómákkal [54], ám e kölcsönhatás szerepe egyelőre nem tisztázott. Figyelembe véve a titin izomban betöltött szerepét, talán a kromoszómák mechanikai stabilitását biztosítja [55-57]. Granzier és Labeit kutatási eredményei azt mutatják, hogy a titin szívizomban befolyásolja az aktomiozin kölcsönhatást, valamint

egyelőre nem ismert mechanizmusok által szabályozza a szarkolemmában található ioncsatornák permeabilitását, valamint köze lehet a génexpresszió szabályozásához [37]. A titinnek fontos szerep jut a szarkomer integritásának fenntartásában. Horowitz és munkatársai eredményei azt mutatják, hogy a titinnek fontos szerep jut a szarkomer szimmetriájának fenntartásában az izomösszehúzódás során, illetve e munkacsoport bizonyította először, hogy az izom passzív rugalmasságát a titin biztosítja [44, 45, 58].

A titin A-szakaszában található egy kináz domént. Ismert tény, hogy ezen kináz szubsztrátja a Z-vonalban található telethonin [59]. Enzim és szubsztrátja között ily módon hatalmas, relaxált izom esetén is mintegy 1 μm -nyi távolság van. Nem ismerjük a választ arra a kérdésre, hogy mi lehet a szerepe a kináznak, illetve a telethonin foszforilációjának. Kináz és szubsztrátja kizárólag fejlődő miocitákban találkozhat, ahol a miofibrillumok kialakulásának korai szakaszában a titin C-terminális része és a T-cap kolokalizációját figyelték meg. Feltételezések szerint a telethonin foszforilációja elengedhetetlen a szarkomer szerkezetének kialakulásához [17].

Titin nem csak a harántcsíkolt izmokban található. Az óriásmolekula megtalálható a simaizmokban is [60, 61]. A simaizmokban a vastag filamentumok szerkezete gyökeresen eltér a harántcsíkolt izomban található vastag filamentumokétól, így a titin és a vastag filamentum kölcsönhatása is más, jóval dinamikusabb jellegű, mint a harántcsíkolt izomszövetekben [62].

A titin tehát nagyon sokféle fehérjével létesít kapcsolatot. Tekintsük át, hogy melyek ezek a fehérjék, és hogy mi lehet a kölcsönhatás szerepe.

1.6. A titin kölcsönhatása szarkomerikus fehérjékkel

Bár a titin szerkezete már jól ismert, igen keveset tudunk a titin más fehérjékkel való kölcsönhatásairól. Elsősorban tekintsük át, milyen ismeretekkel bírunk a titin vastag és vékony filamentumokkal való kölcsönhatásával kapcsolatban.

Immun-elektronmikroszkópos módszerekkel és monoklonális antitestek használatával sikerült igazolni, hogy a szarkomer A-szakaszában a titin a vastag filamentum szerves részét alkotja. Még nem tudjuk pontosan, hogy a titin a vastag filamentum felszínén fut vagy teljesen megbújik a miozin molekulák között, ám az antitestekkel végzett kísérletek eredményei arra engednek következtetni, hogy az első lehetőség a valószínűbb. Az arányokat illetően scanning transzmissziós elektronmikroszkópos [18] és gélelektroforézis [19] analízissel végzett kutatások azt mutatják, hogy a hat titin molekula fut egyetlen fél-vastag filamentumban, tehát hat molekula titin húzódik egy vastag filamentumon belül az M és a Z-vonal között.

A titin a szarkomer I-szakaszában kötődik az aktinhoz [63-65]. A Z-vonal közelében mintegy 100 nm hosszan a titin N-terminális része igen erős kölcsönhatást alakít ki a vékony filamentummal [66]. A titin a szarkomer A-szakaszban lévő részében található bizonyos fibronektin- és immunglobulin doménekről is kimutatták, hogy kötődnek az aktinhoz, azonban a jelenség fiziológiai szerepe nem tisztázott [67].

A titin szarkomerben betöltött szerepének alapos megismeréséhez elengedhetetlen a titinnel kölcsönható fehérjék pontos ismerete. Dot blot assay-k segítségével sikerült bizonyítani, hogy a titin kölcsönhatásba lép a miozinnal és a MyBP-C-vel [68, 69]. Élesztő két-hibrid rendszer alkalmazásával több, a titinnel kölcsönhatást mutató fehérje is „horogra akadt”. Ilyenek a fehérjék szarkomerben való kicserélődésében szerepet játszó P94/calpain-3, a kálium csatornák működését befolyásoló T-cap/telethonin és a MinK, a szarkoplazmatikus retikulum helyzetét meghatározó sANK-1 és obscurin, a metabolikus enzimek kompartmentalizációjáért felelős DRAL/FLH-2, a génexpresszió szabályozásában résztvevő

izom LIM fehérje (MLP), vagy a szívspecifikus ankyrin repeat protein (CARP) és az ankyrin-repeat domain-2 (Ankrd2).

Ezen fehérjék a titinnel való kölcsönhatásnak a helye nem random a molekula hosszában, hanem találhatunk bizonyos forró pontokat, ahová több molekula is kapcsolódhat. Ilyen forró pont a Z-vonalban található titin részlet, vagy az I-szakaszbeli titin. Ezekben a forró pontokban bizonyos funkciókat együttesen, mintegy komplexben betöltő fehérjék kötőhelyeit találhatjuk. A forró pontok „kommunikálnak” egymással. Például, a T-cap a Z-vonal közelében és az M-vonalban is kötődik a titinhez, így hírvivő szerepet tölthet be [70]. Ehhez hasonlóan, a calpain-3 képes kötődni az M-vonalban található titin régióhoz és az I-szakaszbeli titinhez is. Az izom hosszú ideig tartó megfeszítettsége az Ankrd2 [71] és a CARP [72] expressziós szintje megemelkedik. Ezen fehérjék a szarkomerben lévő más fehérék expresszióját szabályozzák. Azt még nem tudjuk pontosan, hogy mi a feszültséget érzékelő szenzor. Ha figyelembe vesszük azonban, hogy mindkét fehérje kötődik a titinhez, amely egyértelműen együtt nyúlik a szarkomerrel, joggal feltételezhetjük, hogy a titin lehet ez az egyelőre ismeretlen és fontos érzékelő fehérje.

A titin funkciójában nagyon fontos szerepe lehet a PEVK – aktin asszociációnak. A szívizomban található titin izoforma PEVK szakasza kötődik az F-aktinhoz [73, 74]. Ezt a kölcsönhatást a Ca^{2+} /S100 fehérje szabályozza [75]. A vázizom PEVK C-terminálisa kötődik ugyan az aktinhoz, de jóval kisebb látszólagos affinitással, mint az említett, szívizomban található PEVK [74]. Megjegyzendő, hogy a vázizomban található titin izoforma PEVK domén C-terminálisának utolsó 163 aminosava megegyezik a szívizom-titin PEVK szekvenciájával. A PEVK szegmens aktinkötésének pontos mechanizmusa és kötés fiziológiai szerepe még nem ismert. Nem tudjuk, hogy ennek a kölcsönhatásnak szabályozó vagy miofibrillum mechanikai sajátságát meghatározó (esetleg mindkettő) szerepe van-e. A PEVK domén és az aktin közötti kölcsönhatás pontos megismerése ezért nagyon fontos a titin illetve a PEVK domén szarkomerben betöltött szerepének megértése érdekében.

A titin számos fehérjével lép kölcsönhatásban, ám elsősorban és alapvetően rugófehérje. Tekintsük át a titin rugalmasságának molekuláris alapjait.

1.7. A titin rugalmassága

A titin molekuláris rugó, amely kifeszülve a Z- és M-vonalak között, rugalmasan sorbakapcsolja a szarkomereket. Mint láttuk, a titin fiziológias körülmények között csak a szarkomer I-szakaszában nyúlik meg. A titin rugalmas sajátságainak tárgyalása szempontjából a leghelyesebb, ha három szakaszra bontjuk ezt a szakaszt: egy egyedi szekvenciák alkotta részből, amelyek közül a legjelentősebb a nevét alkotó aminosavakban gazdag, ún. PEVK szekvencia. Ezen szakaszokra jellemző, hogy nem rendelkeznek stabil másodlagos szerkezettel. A random szakaszt két oldalról a proximális és disztális tandem Ig régió szegélyezi.

Labeit és Kolmerer szerint a tandem Ig szakaszok merev rudaknak tekinthetők, mivel az Ig domének igen stabil háromdimenziós szerkezettel rendelkeznek [27]. Ezzel szemben a PEVK szakasz és az egyéb egyedi szekvenciák lazább rugóként működhetnek. A PEVK szakasz különleges szerkezetének és viselkedésének felfedezése előtt azt feltételezték, hogy a titin rugalmasságának alapja az Ig-domének reverzibilis kitekeredése [76]. Granzier és munkatársai kísérleti eredményai azonban azt mutatták, hogy a titin izoforma hossza megszabja a az izom passzív rugalmas tulajdonságait [77].

Nyugalmi állapotban a szarkomerben a titin I-szakaszbeli rész felgombolyodott állapotban van [66, 78]. Granzier és Trombitás modellje szerint a titin ezért egy entropikus rugóként működhet, melyben nyújtás hatására csökken a konformációs entrópia [79].

Gautel és Goulding [80] valamint Linke és társai [81] monoklonális ellenanyagok alkalmazásával vizsgálták az egyes titin szakaszok relatív nyújthatóságát. Megfigyelték, hogy a szarkomer megnyújtásának kezdeti szakaszában először a PEVK szakaszt szegélyező tandem Ig-régiók egyenesednek ki. Figyelembe véve, hogy ezen szakasz jóval rugalmatlanabb, merevebb mint a laza szerkezetű PEVK szakasz, ez az eredmény első látásra meglepő is lehet.

1997-ben három, úttörő jellegű munka született, amely addig elképzelhetetlen pontossággal, egyedi molekula szinten tette mérhetővé a titin rugalmasságát [82-84]. Az egyedi-molekula manipulációs technikákkal (atomerő mikroszkóppal és lézercsipesszel) végzett mérések alapján azt a következtetést lehetett levonni, hogy a titin rugalmassága (erő-megnyúlás függvénye) nemlineáris, és a titin entrópikus polimerlánc viselkedésével magyarázható. Egy entrópikus polimerlánc termikus eredetű hajlító hatások eredményeként csökkenti a végpontjai közötti távolságot. Ebből kifolyólag, ha adott polimerlánc hajlítómerevsége elegendően kicsi, kompakt formát vesz föl, összegombolyodik. Egy ilyen lánc kinyújtása csökkenti a lánc szerkezeti rendezetlenségét (entrópiáját), vagyis a kiegyenesítéshez munkát kell befektetni. Az egyedi molekulák esetén mért erő-megnyúlás görbék az entrópikus rugalmasságát leíró, ún. „féregszerű lánc” (wormlike chain, WLC) modellel jól illeszthetőek voltak.

A „féregszerű lánc” modell a láncot egy deformálható kontínuumként kezeli, amelynek alakját annak hajlítómerevsége, illetve az ezt jellemző perzisztenciahossz határozza meg. A merev polimerek szerkezeti entrópiája alacsony, így megnyújtásuk pedig kis erőt igényel, míg ennek ellenkezője igaz a flexibilis, kis hajlítómerevségű polimerekre. Figyelembe véve ezeket az eredményeket, Gautel és Goulding valamint Linke antitestekkel végzett, a titin relatív megnyúlását vizsgáló kutatásainak eredményei könnyen magyarázhatók.

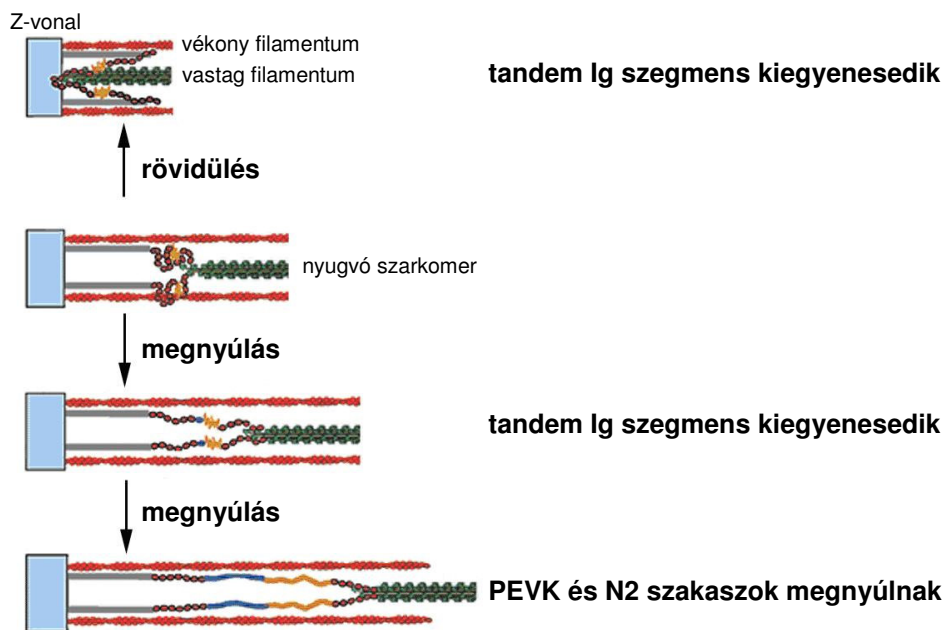
A titin I-szakaszbeli régiójában található PEVK szegmenst felfoghatjuk egy eleve kitekeredett szerkezeti elemként. Az egyedi-molekula kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a titinen belül valóban van egy ilyen szakasz [27], amelyet később a PEVK szakasszal azonosítottak [85]. A PEVK rendezetlen, kitekeredett voltát az a tény is alátámasztja, hogy elektronmikroszkópos felvételeken ez a szakasz sosem látható, valószínűleg azért, mert vastagsága alatta marad a mikroszkópok és a technika felbontóképességének [86].

Az új eredmények figyelembevételével, és azok alátámasztására in situ vizsgálták a tandem Ig-régiók és a PEVK nyújthatóságát immunoelektronmikroszkópos technikák segítségével humán *soleus* [87, 88] és patkány *m. psoas* [89] izmokon. Az eredmények szerint a nem kitekeredett Ig-domének alkotta lánc is entrópikus rugóként viselkedik. A tandem Ig

szakasz viselkedése önmagában nem magyarázta a megfigyelt rugalmasságot, mivel nagyobb erők és a szarkomer nagyobb relatív megnyúlása esetén a PEVK szakasz megnyúlása vált dominánssá.

A PEVK szakasz rugalmasságának háttérben megbúvó mechanizmusok még nem ismertek pontosan. Bizonyos eredmények arra mutatnak, hogy ez a rugalmasság tisztán entropikus eredetű [88]. Más eredmények szerint ez a modell csak akkor a szarkomer kismértékű megnyújtottsága esetén működik jól [90], és nagyobb mértékű megnyújtottság esetén entalpikus tényezőket is figyelembe kell venni a titin rugalmasságának leírásakor. Ezek a tényezők a PEVK szakaszon belüli elektrosztatikus vagy hidrofób kölcsönhatások eredményeképpen jelenhetnek meg. A mai tudásunk szerint a vázizomban, fiziológiás körülmények között az Ig-domének nem tekerednek ki, vagyis Ig-domének kitekeredése nem lehet a titin rugalmasságának alapja.

Tekintsük át, milyen szerepe van a PEVK szakasznak, illetve a tandem Ig-régióknak a passzív izomerő kialakításában. A szarkomerben, nyugalmi állapotban a tandem Ig szakaszok összegombolyodott állapotban vannak jelen (6. ábra). Kismértékű szarkomer megnyúlás esetén a passzív izomerő felépüléséért ezen szakaszok entrópikus rugóként való viselkedése felelős.



6. ábra. A titin I-szakaszbeli részének viselkedése a szarkomer megnyújtása során.

Nagyobb megnyúlás esetén a merev rugónak tekinthető PEVK szakasz megnyúlása befolyásolja döntő mértékben passzív izomerőt. A PEVK szakasz mellett, ahhoz hasonlóan működnek az N2A és N2B egyedi szekvenciák. Különböző rugalmas tulajdonságaik miatt a PEVK és az N2A/N2B szakaszok által alkotott régió többkomponensű rugónak tekinthető, amelynek részei különböző mértékben járulnak hozzá a titin nyújthatóságához [91, 92] A titin az izomösszehúzódást követően visszaállítja a szarkomer nyugalmi hosszát.

A PEVK elaszticitása igen aktívan kutatott terület. A legjobban ismert és jellemzett PEVK domén a szívben expresszáldó mindössze 163 aminosav hosszúságú N2B izoforma PEVK domén [93, 94]. Az N2B izoforma PEVK domén szekvenciája teljes egészében megegyzik a *m. soleus*-ban található hatalmas, 2174 aminosav hosszúságú PEVK C-terminálisának utolsó 163 aminosavával. A *m. soleus* PEVK domén rugalmassága kevésbé kutatott terület. E domén sokkal nagyobb, mint bármely egyéb titin izoformában található PEVK domén, és elasztikus tulajdonságainak felderítése, mechanikai jellemzése közelebb vihet bennünket a PEVK domén funkciójának megértéséhez.

2. Célkitűzések

Munkánk során az *m. soleus*ban lévő titin izoforma PEVK doménjének aktinkötő képességét kívántuk vizsgálni. Szintén célul tűztük ki ezen domén mechanikai tulajdonságainak vizsgálatát egyedi molekula módszerekkel. Legfőbb kérdéseink azok voltak, hogy hogyan változik a PEVK domén aktinkötő képessége a domén mentén, illetve van-e eltérés a PEVK domént alkotó szekvencia motívumok (polyE, PPAK) aktinkötő képességében. Ehhez hasonlóan meg kívántuk határozni, hogy a PEVK domén mechanikai sajátságait tekintve homogén, vagy esetleg a szekvencia motívum-összetételtől függően mutat-e eltéréseket.

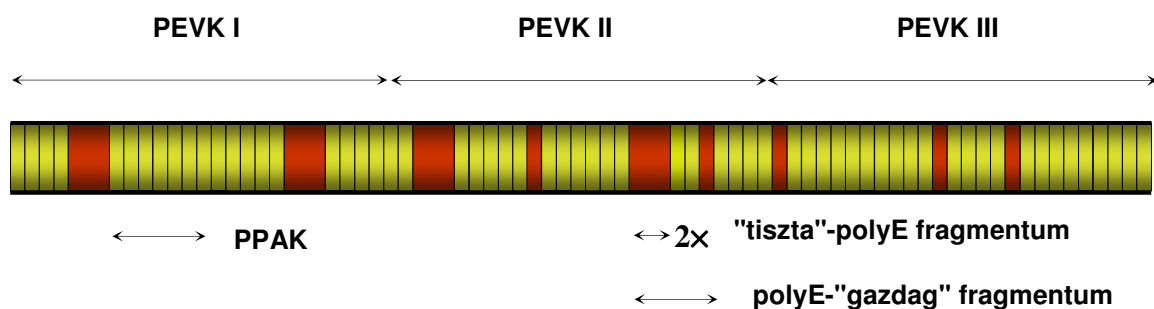
Céljaink a következők voltak:

- különböző PEVK szakaszok klónozása, expressziója, tisztítása és fluoreszcens jelölése;
- a PEVK domén - F-aktin kölcsönhatás vizsgálata többféle (*in vitro* motilitási próba, szilárd felszínhez való kötődési próba (solid-state surface binding assay) és aktin-kereszt-kötési próba, aktin-PEVK koszedimentáció vizsgálat, steady-state aktin-aktivált ATP-áz mérés) módszerrel;
- az egyedi molekula mechanikai vizsgálatokhoz a PEVK darabok végeinek specifikus megragadásához szükséges molekuláris fogantyúk kialakítása, illetve a specifikus megragadást lehetővé tevő felszín kialakítása;
- a PEVK darabok mechanikai jellemzése egyedi-molekula atomerőmikroszkópiával.

3. Alkalmazott anyagok, módszerek, elméleti számítások

3.1. A humán vázizom PEVK-darabok klónozása, expressziója és tisztítása

A humán vázizom cDNS könyvtár Dr. Siegfried Labeit ajándéka volt. A *m. soleus* titin izoforma PEVK domén három, megközelítőleg egyforma hosszúságú darabban (a továbbiakban szegmensek) (PEVK I: 16852-19074, II: 19075-21192 és III: 21193-23373, (GenBank hivatkozása szám: X90569 (X90569.1 verzió) expresszáltuk. A PEVK domént felépítő polyE-"gazdag" (20305-20757) és PPAK (17413-18015) fragmentumokat, illetve egy csak polyE-szekvenciából ("tisztá"-polyE) álló rekombináns fehérjét (a továbbiakban fragmentumok) is expresszáltunk, mely utóbbi a X90569 GenBank hivatkozási számú PEVK cDNS 20305-20520 közé eső szakaszának megkettőzése. Az expresszált rekombináns fragmentumok doménon belüli elhelyezkedése az 7. ábrán látható.



7. ábra. Az expresszált rekombináns *m. soleus* PEVK darabok. A sárga négyzetek a PPAK, a pirosak a polyE szekvenciákat jelölik.

Az expresszálni kívánt fragmentumokat kódoló DNS-darabokat megfelelő restriktációs endonukleázzal végzett emésztés után pET-28a (Novagen) vektorba ligáltuk, majd BL21(DE3)pLysS *E. coli* (Promega) sejtekbe transzformáltuk, majd e sejtvonalban

expresszáltuk. Mindegyik rekombináns fragmentum N-terminálisán His-tag, C-terminálisán két szomszédos cisztein aminosav található. A rekombináns fehérjéket Ni^{2+} -affinitás kromatográfiával tisztítottuk NTA-oszlopon (Novagen). Az esetlegesen szükséges további tisztítást Sephadex G25-ös vagy G75-ös (Sigma) gélszűrő vagy DE52 ioncserélő (Sigma) oszloppal végeztük. A fragmentumok koncentrációját Bradford reagenssel (Sigma) határoztuk meg.

3.2. Fehérjepreparálás

Az aktint [95], a miozint [96] valamint a HMM-et [97] korábban ismertetett eljárások alapján preparáltuk. Az F-aktint fluoreszcens jelölését tetramethylrhodamine-isothiocyanatephalloidinnal (TRITC-phalloidin, Molecular Probes) végeztük. A natív vékony filamentumokat glicerinezett nyúl szemölcsizomból állítottuk elő korábban ismertetett eljárás alapján [98].

3.3. *In vitro* motilitási próba

Az *in vitro* motilitási próbát korábban ismertetett eljárások alapján hajtottuk végre [64, 85, 98, 99] A mérés során használt folyadékcella ~ 10 μl térfogatú volt. 40 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú HMM oldatot áramoltattunk át a folyadékcellán, majd mosás után különböző HMM/PEVK arányok mellett videora rögzítettük a fluoreszcensen jelölt F-aktin filamentumok mozgását. A videofelvételt digitalizáltuk, és egy házilag fejlesztett Pascal-program segítségével határoztuk meg az aktin filamentumok sebességét.

3.4. Szilárd felszínhez való kötődési próba (solid-state surface binding assay) és aktin-keresztkötési próba

A kötődési próbát korábban ismertetett eljárások alapján hajtottuk végre [64]. A mérés során a felszínhez abszorbeált PEVK fragmentumokhoz kötődő, fluorszcensen jelölt aktin-filamentumok hosszát határoztuk meg. A kölcsönhatás ionerőtől és Ca-koncentrációtól való függését megfelelő KCl és Ca^{2+} koncentrációjú pufferekkel való mosás segítségével határoztuk meg. Az aktin-keresztkötési próba során a fluoreszcensen jelölt aktin filamentumokat és PEVK fragmentumokat tartalmazó oldatokat összekevertük, és a kialakuló kötegekről készítettünk felvételeket. A felvételeket epifluoreszcencia (Zeiss) teljes belső visszaverődés fluoreszcencia mikroszkópokkal (TIRFM, Olympus) készítettük.

3.5. Aktin-PEVK koszedimentáció vizsgálat

A phalloidinnal stabilizált F-aktint 140 mM KCl-ot tartalmazó pufferben különböző PEVK fragmentumokkal kevertük össze, majd 60 perc inkubálás után 100 000 g-vel centrifugáltuk. A felülúszót és a csapadékot 12%-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk meg és Coomassie Brilliant Blue R-250-vel festettük. A denzitogrammot Syngene MultiGenius BioImaging rendszer GeneSnap és GeneTools szoftvereivel készítettük ill. értékeltük ki.

3.6. A miofibrillumok előállítása, jelölése és vizualizálása

A PEVK II-es fragmentumot a C-terminálisán lévő cisztein aminosav oldalláncán jelöltük meg iodoacetamido-fluoresceinnel (IAF, Molecular Probes) a gyártó által javasolt módszer szerint. Az izolált miofibrillumokat [100] negyed órán át inkubáltuk a fluoreszcensen jelölt PEVK fragmentummal. Az üvegfelszínre kitapadt fluoreszcens titinmolekulák leképezéséhez lézerpasztázó konfokális mikroszkópot használtunk (Bio-Rad MRC-1024ES, Nikon Eclipse

TE300 inverz mikroszkóp, Nikon Plan Fluor 40/0,75NA olajimmerziós objektív). A mintát Ar-ion lézerrel (488 nm) gerjesztettük.

3.7. Steady-state aktin-aktivált ATP-áz mérés

A HMM steady-state ATP-áz aktivitását NADH-csatolt reakció (Coupled Assay) segítségével határoztuk meg. A mérést Jasco V-550 UV-VIS spektrofotométerrel végeztük.

3.8. Kémiaailag módosított üvegfelszín kialakítása egyedi molekula manipulációhoz

A PEVK szegmensek N-terminálisának specifikus megragadásához a tárgylemezt alapos tisztítás, majd szilán alapú funkcionálizálás (3-glycidiloxypopyl-trimethoxysilane, Glymo, Sigma-Aldrich) után N-(5-amino 1-carboxypentyl)-iminodiacetsavval (NTA; Dojindo, Tokyo, Japan) vontuk be. Az így bevont felszínhez Ni^{2+} hozzáadását követően a N-terminálisán His-tagot hordozó PEVK szegmensek specifikusan kitapadtak.

3.9. Atomerő-mikroszkópia

A mechanikai manipulációs kísérletekhez Asylum Research Molecular Force Probe típusú erőmérő atomerő-mikroszkópot használtunk (MFP1D, Asylum Research, Santa Barbara, CA). A méréseket vizes közegben, AB-pufferben (25-300 mM KCl, 25 mM NaH_2PO_4 , 4 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 0,3% NaN_3) végeztük. A specifikus rugólapka – PEVK kölcsönhatás kialakulásának érdekében arannyal borított rugólapkákat használtunk (Bio-Lever, Olympus, Tokyo, Japán). Az aggregáció csökkentése érdekében a pufferhez 0,2% Tween-20-at adtunk. A rugólapka tujét a 10-100 $\mu\text{g/ml}$ fehérjekoncentrációjú AB-pufferrel tíz percig inkubáltuk.

Az inkubálás után a rugólapkát alaposan mostuk az aspecifikusan felkötődött fehérjék eltávolítása érdekében. A mérés során a rugólapkát lassan a Ni-NTA-val borított üvegfelszín felé közelítettük. Miután sikerült megérintenünk a felszín, a rugólapkát konstans, 500 nm/s sebességgel emeltük fel, illetve engedték vissza, hogy a végein specifikusan megragadott molekulákat meghúzzuk. Annak érdekében, hogy csak a végein megragadott molekulák meghúzásából származó adatokat értékeljük ki, a következő stratégiát alkalmaztuk: csak azokat az adásokat értékeltük ki, ahol az illesztésből származó kontúrhossz megfelelt az elméletileg számolt értéknek. Az erőt a rugólapkák elhajlásából, a rugólapka rugóállandójának ismeretében számoltuk ki. A rugólapka rugóállandóját termikus kalibrációval határoztuk meg. A rugóállandók termikus kalibráció során meghatározott értéke ~ 6 -30 pN/nm volt.

3.10. Az erő - megnyúlás görbék kiértékelése

Az erő - megnyúlás görbékre a féregszerű lánc (Wormlike Chain, WLC) modellt illesztettük [82, 101]:

$$\frac{FL_p}{k_B T} = \frac{z}{L_C} + \frac{1}{4(1 - z/L_C)^2} - \frac{1}{4}, \quad (1)$$

ahol A - perzisztenciahossz, k_B - Boltzmann állandó, L - kontúrhossz, T - abszolút hőmérséklet, F – erő, z – vég-vég távolság..

A nem specifikusan megfogott és meghúzott molekulák adatait nem értékeltük ki. Az illesztést 0–50 pN tartományban végeztük.

3.1.1 Immun-elektronmikroszkópia

A kísérletek korábban publikált lépések szerint történtek [66, 87, 88, 102]. Röviden, a *soleus* izomrostokat adott hosszúságra nyújtását követően 20 perc inkubálás után fixálás történt 3% para-formaldehidet tartalmazó PBS pufferrel. Mosás és BSA-val történő blokkolás után 24 órás ellenanyag kezelés történt. A kísérlet során a következő antitestek kerültek felhasználásra (19. ábra): anti-I2/I3 (T12), anti-I80/81 (N2A), anti-PEVK C-terminális antitest (514), anti-I111/I112 (Ti-102). Mosás, másodlagos antitesttel történő kezelés, OsO₄ festés és beágyazás után a minta metszése történt. Az elektronmikroszkópos felvételek JEOL 1200 elektronmikroszkóppal (JEOL, Tokyo, Japán) készültek.

3.12. A PEVK domén, mint polielektrolit lánc

A PEVK domén számos töltött oldalláncot tartalmaz, ezért polielektrolit láncként viselkedik. A PEVK domén perzisztenciahosszát [103] a töltések közötti vonzó, illetve taszító kölcsönhatások nagy mértékben befolyásolhatják. A Odijk-Skolnick-Fixman (OSF) elmélet [104] értelmében az azonos töltések kimerevítik a polielektrolit láncot, így annak perzisztenciahossza megnő. Egy adott polielektrolit lánc perzisztenciahossza [105] az elasztikus (L_0) és az elektrosztatikus (L_e) komponensek összegeként írható le:

$$L_p = L_0 + L_e. \quad [105]$$

Az elektrosztatikus komponens (L_e) kifejezhető, mint:

$$L_e = l_B \kappa^{-2} \tau^2 / 4, \quad (3)$$

ahol a l_B a Bjerrum hossz (az a távolság, amelyen belül a töltések interakciós energiája egyenlő a termikus energiával $k_B T$). $l_B = 0,7$ nm vízben, szobahőmérsékleten), τ a töltések sűrűsége (a töltések közötti távolságok átlagának inverze), és κ^{-1} a Debye távolság:

$$\kappa^{-1} = (4\pi l_B I)^{-1/2}, \quad (4)$$

ahol, I az oldat ionereje. Az L_0 és a τ paraméterek meghatározása érdekében, a κ^{-1} függvényében ábrázolt L_p adatokat a (4) egyenlettel illesztettük. A τ paramétert a PEVK

doménon belüli átlagos glutaminsav – glutaminsav, illetve lizin – lizin távolságok (d_r) alapján is meghatároztuk:

$$d_r = N_r s_r, \quad (5)$$

ahol N_r az adott glutaminsavhoz legközelebb eső glutaminsav, illetve az adott lizinhez legközelebb eső lizin átlagos távolsága, S_r egy aminosav átlagos hossza (0,38 nm).

Az egyes PEVK harmadok, illetve a tandem Ig-régió részleges megnyúlását a WLC egyenletből levezethető, sorbakapcsolt rendszerek erőkvivalencia elve alapján számítottuk ki:

$$\frac{Ext_p}{A_p} + \frac{1}{4A_p(1-Ext_p)^2} + \frac{1}{4A_p} = \frac{Ext_{Ig}}{A_{Ig}} + \frac{1}{4A_{Ig}(1-Ext_{Ig})^2} + \frac{1}{4A_{Ig}}, \quad (6)$$

ahol az Ext_p és az Ext_{Ig} az adott PEVK harmad és a tandem Ig-régió relatív megnyúlása, A_p és A_{Ig} pedig az adott PEVK harmad és a tandem Ig-régió perzisztenciahossza (15 nm). A számítás során a relaxált szarkomer hosszát (SL) a különböző titin régiók relatív vég – vég távolságaiból számítottuk ki:

$$SL = 2T12 + 2Ext_{Ig}L_{Ig} + 2Ext_{pI}L_{pI} + 2Ext_{pII}L_{pII} + 2Ext_{pIII}L_{pIII} + A, \quad (7)$$

ahol $T12$ a megnyújthatatlan Z-vonal – T12 epitóp távolság (0,1 μm), A az A-szakasz szélessége (1,6 μm), Ext és L adott titin szakaszok relatív megnyúlása és kontúr hossza (Ig – tandem Ig-régió, PI – PEVK I, PII – PEVK II, PIII – PEVK III). A tandem Ig-régiók (a proximális és disztális tandem Ig-régiók együtt) hossza 0,465 nm (93 darab Ig domén, egyenként 5 nm-es hosszal számolva). A PEVK harmadok kontúr hosszát a szekvencia alapján számoltuk ki (PEVKI=0.281 μm , PEVKII=0.268 μm , PEVKIII=0.276 μm).

4. Eredmények

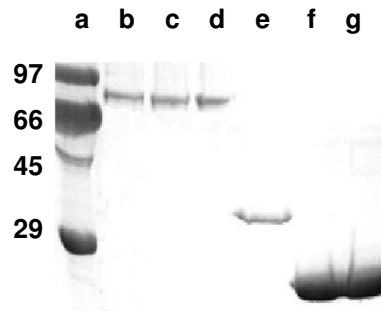
Vizsgálatainkat humán *m. soleus*-ból származó titin izoforma PEVK doménjén végeztük. Az titin izoformák közül ez a típus tartalmazza a legnagyobb PEVK szakaszt. E szakaszt 106 exon kódolja, hossza 2174 aminosav.

4.1. A PEVK szakasz klónozása és expressziója

A titin PEVK szakaszának expressziójakor prokarióta rendszerrel dolgoztunk. Ez az expressziós rendszer számos előnnyel bír (gyors, egyszerű, gazdaságos), ám a nagyméretű (nagyobb, mint 100 kDa) fehérjék esetében nem működik megbízhatóan. A titin PEVK szakaszának klónozásakor ezért azt a stratégiát választottuk, hogy a szakaszt nem egyben, hanem három darabban fogjuk megtermeltetni. A rekombináns fehérjék N-terminálisát His-taggal láttuk el. A His-tag segítségével a PEVK harmadok tisztítását végeztük el, valamint a mechanikai mérések során a His-tagon keresztül ragadtuk meg specifikusan a fehérjék N-terminális végét. A harmadok C-terminálisára két cisztein aminosavat illesztettünk. A PEVK szakasz nem tartalmaz cisztein aminosavat. A cisztein oldallánca viszonylag reaktív, specifikus kémiai módosításokra alkalmas, így ezen két oldallánc segítségével az expresszált fehérjéket fluoreszcens festékekkel jelölhettük, illetve, az atomerő mikroszkópos mérések során e két aminosav oldalláncon keresztül rögzítettük specifikusan és erősen a PEVK harmadok C-terminálisát.

A titin PEVK domén vizsgálatakor klónoztuk, expresszáltuk és tisztítottuk annak „alapköveit” is, a PPAK motívumot és a polyE szekvenciát is (Részleteket lásd az Anyagok, módszerek fejezetben, illetve 7. ábra).

A 8. ábrán a tisztított PEVK harmadok, valamint a PPAK és polyE szekvenciák elektroforetoqrammjai láthatóak.



8. ábra. Az expresszált PEVK harmadok, PPAK és polyE szekvenciák. (a) mólusúly standard, (b) PEVK I, (c) PEVK II, (d) PEVK III, (e) PPAK, (f) polyE-„gazdag” fragmentum, (g) „tisza”-polyE fragmentum.

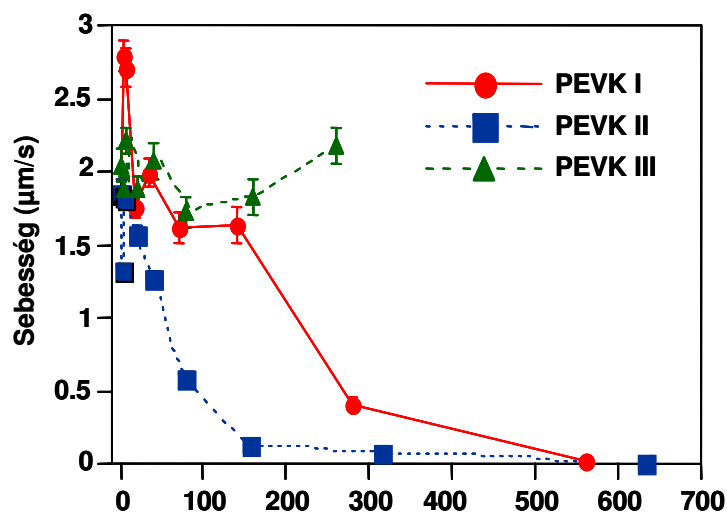
Kísérleteink során az expresszált, tisztított PEVK harmadok és a kisebb fragmentumok aktinkötő képességét vizsgáltuk.

4.2. A PEVK kölcsönhatása aktinnal

Kísérleteink során első lépésben a PEVK harmadok (a továbbiakban: szegmensek) aktinnal való kölcsönhatását vizsgáltuk.

4.2.1. A PEVK szegmensek kölcsönhatása aktinnal

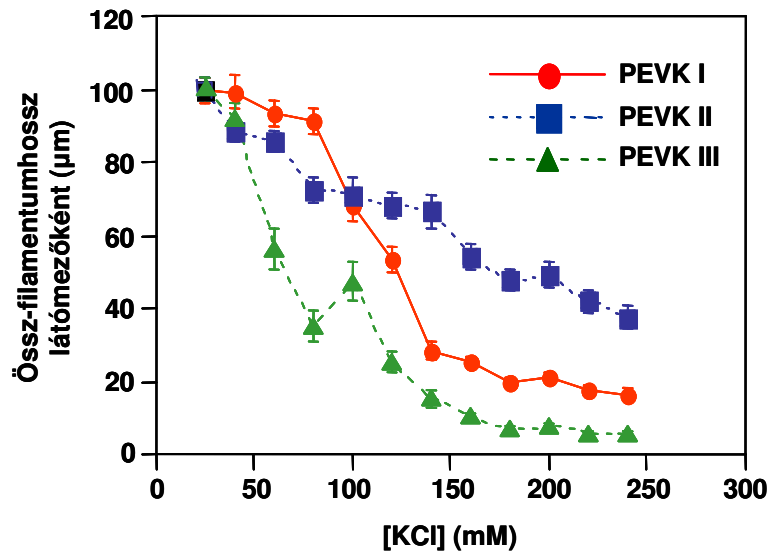
A klónozott, expresszált és tisztított PEVK harmadok (szegmensek) aktin filamentum mozgására gyakorolt hatását *in vitro* motilitási próbával vizsgáltuk. Az egyes harmadok különböző mértékben "lassították" le az F-aktint. A legerősebb gátlást a második harmad (PEVK II) mutatta, az első harmad (PEVK I) valamivel gyengébb gátlást mutatott, míg a harmadik harmadnak (PEVK III) alig volt kimutatható hatása az aktin filamentum mozgására HMM-mel végrehajtott *in vitro* motilitási próbában (9. ábra).



9. ábra. A PEVK harmadok hatása az aktin filamentum sebességére *in vitro* motilitási próbában.

Az *in vitro* motilitási próba során az aktin filamentumok mozgása akadozó jellegű volt: olykor felgyorsultak, máskor pedig (különösen nagy PEVK szegmens koncentráció esetén) megálltak. Kapcsolt reakcióban (coupled assay) a PEVK szegmensek nem befolyásolták a HMM aktin-aktivált ATP-áz aktivitását, így az egyes PEVK harmadok nem a HMM enzimaktivitásának gátlása révén lassították a motilitást.

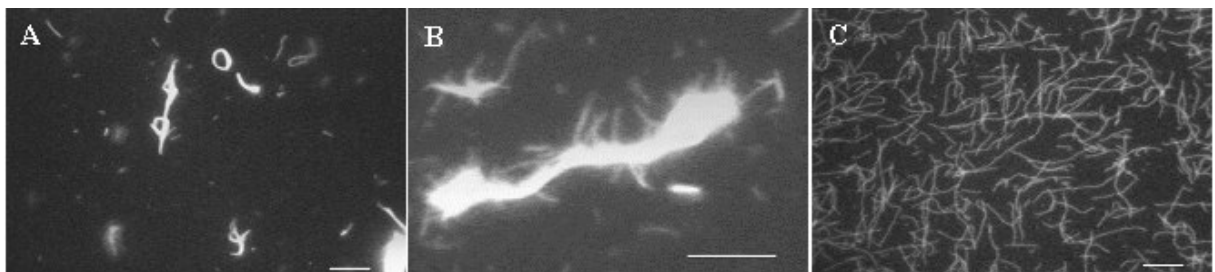
A PEVK szegmensek és az F-aktin kölcsönhatását szilárd felszínhez való kötődési próbával (solid-state surface binding assay) is vizsgáltuk. A vizsgálat során a nitrocellulózzal borított felszíneket PEVK szegmensekkel kezeltünk. A PEVK szegmensekkel borított felszín egy mikroszkópos kamra egyik felszínét képezte. A kamrán fluoreszcensen jelölt F-aktint (és a nem-specifikus kötés gátlásának érdekében BSA-t) tartalmazó oldatot áramoltattunk át. A mérés során a teljes aktin filamentumhossz változását vizsgáltuk növekvő ionerő mellett (10. ábra).



10. ábra. A teljes aktin filamentumhossz KCl koncentráció függvényében.

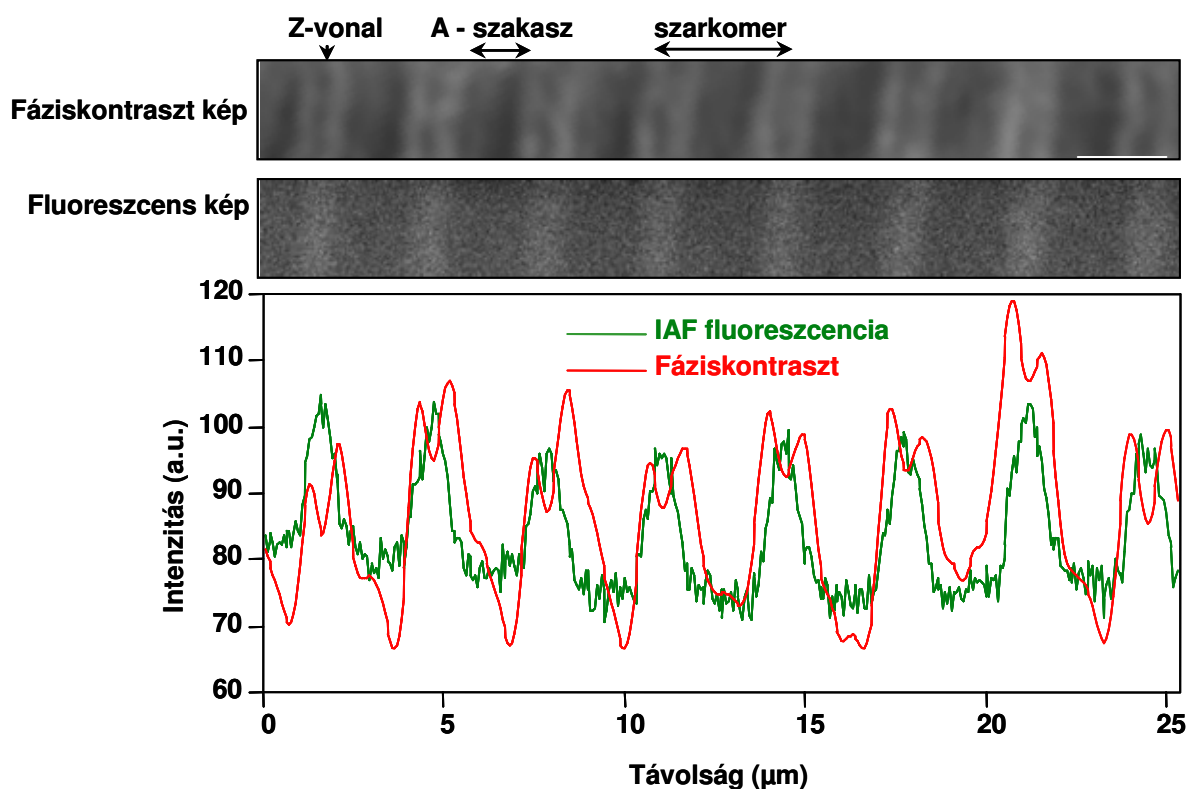
Az *in vitro* motilitási próba eredményével egybecsengően a legnagyobb mértékben a PEVK II-es szegmens kötötte az F-aktint, utána következett a első harmad, majd a harmadik harmad.

Az *in vitro* keresztkötési próba során a fluoreszcensen jelölt aktin filamentumokat összekevertük PEVK szegmensekkel. Az előző eredményekkel egyezésben a PEVK I és II esetében 20-30 µm hosszú és 5 µm átmérőjű aktinkötegek illetve F-aktin gyűrűk (11. ábra) alakultak ki, míg a PEVK III esetében nem, vagy csak igen ritkán figyeltünk meg F-aktin kötegeket.



11. ábra. F-aktin kötegek PEVK I (A), II (B) és III (C) jelenlétében. A képek jobb alsó sarkában lévő fehér szakaszok hossza 20 µm.

A legerősebben kötődő PEVK II szegmens F-aktinhoz, illetve natív vékony filamentumhoz való asszociációját *in situ* is vizsgáltuk. Nyúl *m. psoas*-ból izolált miofibrillumot C-terminálisán iodacetamido-fluoresceinnel (IAF) jelölt PEVK II-es szegmenssel inkubáltuk. A miofibrillumról lézerpasztázó konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételt. A miofibrillum fáziskontraszt és az annak megfelelő fluoreszcens képe a 12. ábrán látható.



12. ábra. Fluoreszcensen (IAF) jelölt PEVK II szegmens kötődése *in situ* miofibrillumhoz. Felső panel: konfokális mikroszkópos felvétel. A felső, fáziskontraszt képnek az alatta lévő PEVK II fluoreszcencia kép felel meg. Alsó panel: a fáziskontraszt és a fluoreszcencia jel eloszlása ill. nagysága.

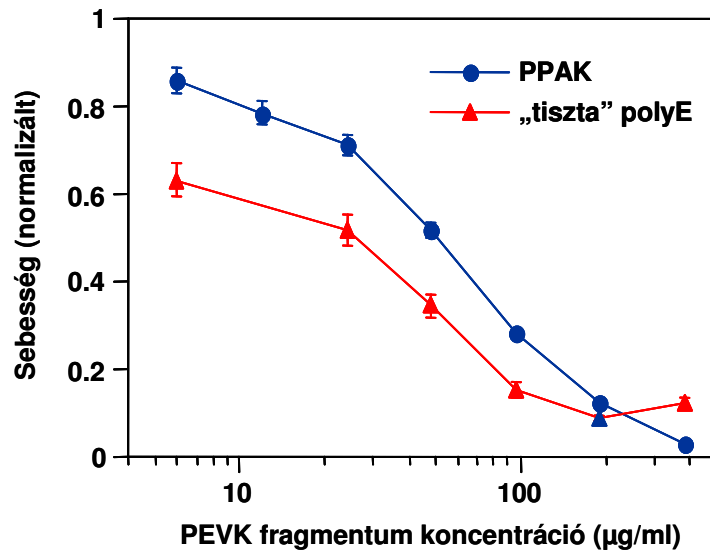
Az intenzív fluoreszcenciát mutató régiók a szarkomer I-csíkjának felelnek meg, ami arra utal, hogy a fluoreszcensen jelölt PEVK II szegmens kötődött a vékony filamentumokhoz. Az 12. ábra B.) panelén az is megfigyelhető, hogy a fluoreszcens sáv szélessége kisebb a fáziskontraszt képen látható I-csík szélességénél, ami arra utal, hogy a PEVK II nem képes az I-csíkhoz kötődni annak teljes hosszában. Ennek hátterében valószínűleg az állhat, hogy a

szarkomerben lévő titinmolekulák PEVK doménjei foglalják el az adott helyeket a vékony filamentumon.

A PEVK szegmensek aktinkötési mechanizmusának jobb megértése érdekében a PEVK domént felépítő elemi egységek, a PPAK és polyE szekvenciák (a továbbiakban: fragmentumok) aktinkötését is megvizsgáltuk.

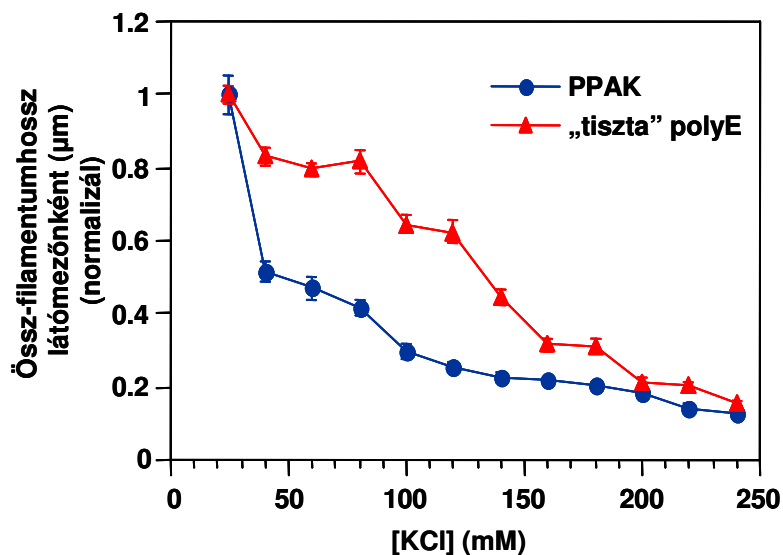
4.2.2. A PEVK fragmentumok kölcsönhatása aktinnal

A *m. soleus* PEVK doménjét PPAK és polyE szekvencia-motívumok építik fel. A PEVK I, II és III szegmensek eltérnek a fenti fragmentumok összetételét illetően. A legtöbb polyE fragmentumot a PEVK II tartalmazza, a legkevesebbet pedig a PEVK III. A kötési vizsgálatok, illetve a PEVK domén felépítésének ismeretében arra a következtetésre jutottunk, hogy az F-aktin kötés erőssége arányban áll a PEVK szegmens polyE-tartalmával. Annak érdekében, hogy ezt pontosabban is tisztázni tudjuk, klónoztunk és expresszáltunk egy tisztán PPAK szekvenciából, tisztán polyE szekvenciából, és egy keverten PPAK és polyE-szekvenciából álló fragmentumot (lásd Alkalmazott módszerek). A PEVK szegmensek vizsgálatához hasonlóan a PEVK fragmentumokkal *in vitro* motilitási próbát végeztünk (13. ábra).



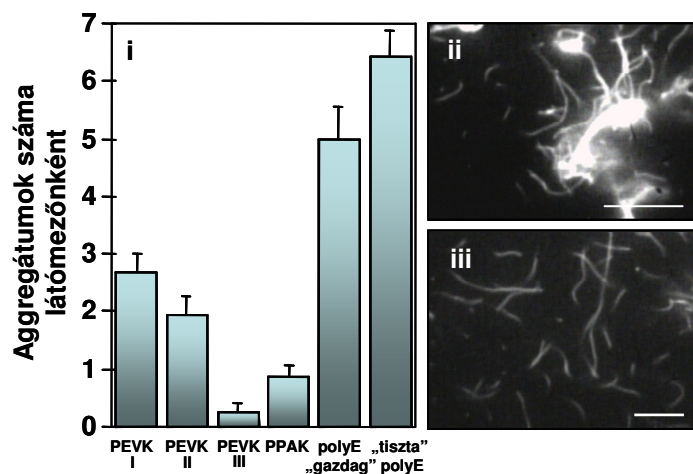
13. ábra. PEVK fragmentumok kölcsönhatása F-aktinnal. In vitro acto-HMM sebesség PPAK és "tiszta"-polyE függvényében

Hasonlóan a PEVK szegmensekhez, a PEVK fragmentumokkal is szilárd felszínhez való kötődési próbát végeztünk (14. ábra.).



14. ábra. PEVK fragmentumok kölcsönhatása F-aktinnal. In vitro aktin-HMM sebesség PPAK és "tiszta"-polyE függvényében F-aktin szilárd felszínhez való kötődési próba. A látómezőben lévő össz-filamentumhossz az KCl-koncentráció függvényében PPAK és "tiszta"-polyE esetében.

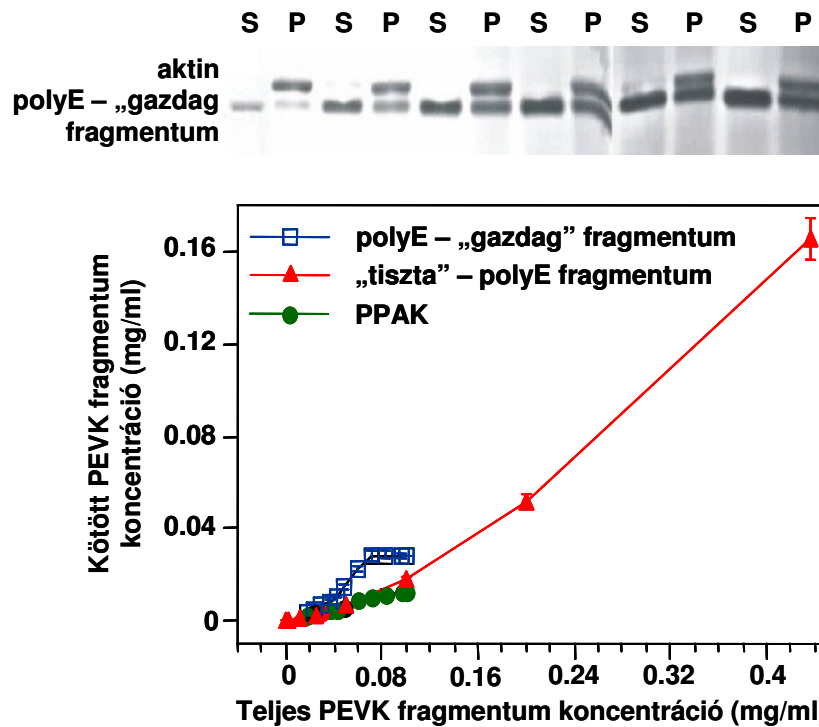
Azt is vizsgátuk, hogy a PEVK fragmentumok keresztkötik-e az aktin filamentumokat. Az eredmények a 15. ábrán láthatók.



15. ábra. PEVK fragmentumok kölcsönhatása F-aktinnal. F-aktin keresztkötési próba PEVK fragmentumok jelenlétében: (i) A megfigyelések összegzése.. (ii) PPAK (iii) "tiszta"-polyE. A fehér szakasz hossza 20 μ m.

Az ábrákból látható, hogy *in vitro* motilitási próbában a polyE erősebben gátolta a fluoreszcensen jelölt F-aktin mozgását, mint a PPAK fragmentum (13. ábra). Ezzel összhangban a szilárd felszínhez való kötődési próba eredménye azt mutatta, hogy a polyE fragmentum nagyobb látszólagos affinitással köti az F-aktint, mint a PPAK fragmentum (14. ábra). A keresztkötési próba esetében mindhárom fragmentum vizsgálata során megfigyeltünk aktin kötegeket, de legnagyobb és legmarkánsabb kötegeket a polyE-vel kevert F-aktin alkotott (15. ábra).

A koszedimentációs (16. ábra) vizsgálat azt mutatta, hogy a "tiszta"-polyE fragmentummal nem tudtuk telíteni az F-aktint, és a polyE-"gazdag" régió is nagyobb affinitással kötődik az F-aktinhoz mint a PPAK fragmentum.



16. ábra. PEVK fragmentum–F-aktin koszedimentációs vizsgálat.

Felső panel: F-aktin - polyE"gazdag" fragmentum koszedimentációs vizsgálatának SDS-PAGE képe.

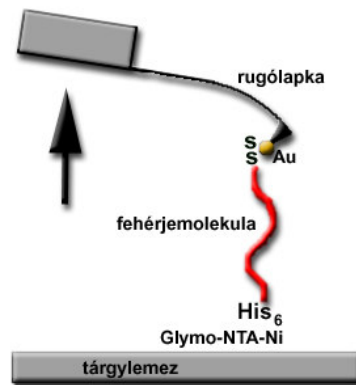
S: felülúszó; P: csapadék. Alsó panel: a kötött PEVK fragmentum koncentráció a teljes PEVK fragmentum koncentráció függvényében.

A *m. soleus*ban található titin PEVK doménjének aktin filamentummal való kölcsönhatásának vizsgálata során arra a következtetésre jutottunk, hogy a PEVK domén aktinkötő képessége változik domén mentén. A látszólagos affinitás sorrendje: PEVKII - PEVKI - PEVKIII. Az egyes harmadok között mutatkozó eltérések kiderítésének érdekében megvizsgáltuk a PEVK domént felépítő PPAK és polyE szekvencia motívumok aktinkötő képességét. Úgy találtuk, hogy a polyE szekvencia látszólagos aktinkötő képessége nagyobb, mint a PPAK motívumé. Eredményeink, megfigyeléseink alapján úgy gondoljuk, hogy a titin molekula PEVK doménje a vékony filamentumhoz kötődve egyfajta molekuláris "ütközőzónát" alakít ki, amely lassítja a vastag filamentum mozgását a szarkomer maximális megrövidülésekor, az izom teljes összehúzódása esetén.

A PEVK aktinkötésének vizsgálatával párhuzamosan e domén mechanikai jellemzését is elvégeztük.

4.3. A PEVK szegmensek egyedi molekula mechanikája

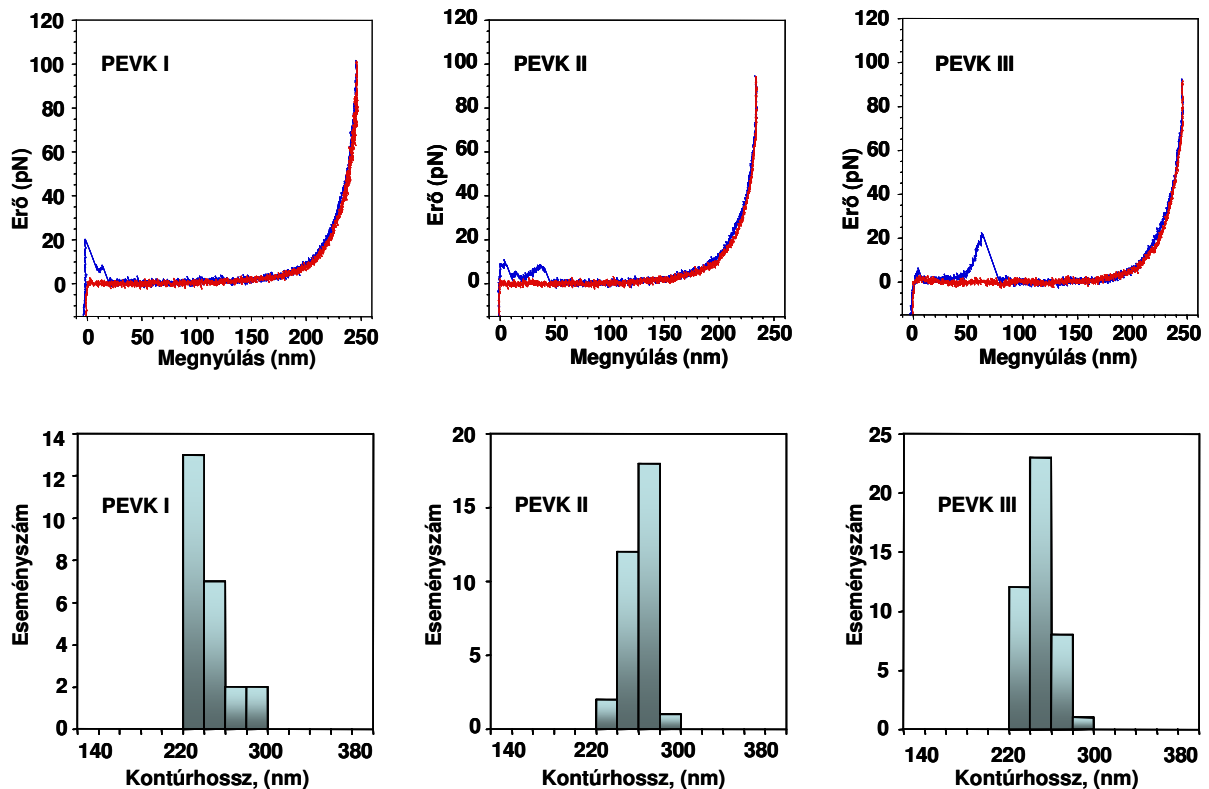
A titin molekuláris rugó szerepét tölti be az izomban. A szarkomer megnyúlásakor a PEVK szegmens is kifeszül, így rugó funkciót tölt be. Ezt a rugófunkciót, illetve a PEVK domén mechanikai viselkedését kívántuk közelebbről megvizsgálni: arra voltunk kíváncsiak, hogy a doménen belül vannak-e eltérések az adott régiók elaszticitásának tekintetében. Az egyedi molekula mechanika vizsgálatára az egyik legalkalmasabb műszer az erőmérő atomerő mikroszkóp. A PEVK szegmens mechanikai viselkedését a már meglévő PEVK harmadok vizsgálatával kívántuk elvégezni. A mérések végrehajtásakor elengedhetetlenül fontos, hogy a vizsgált molekulaszakaszt pontosan a végeinél ragadjuk meg. A szegmensek N-terminálisán elhelyezkedő His-tag módot adott arra, hogy olyan üvegfelülethez rögzítsük az AFM-mel mechanikailag manipulálni kívánt PEVK szegmenst, amihez Ni^{2+} atomokat immobilizáltunk. A PEVK harmadok C-terminálisán egy vicinális cisztein pár helyezkedett el, amely kovalens erősségű kötést képes kialakítani arannyal borított felszínnel, így pl., az atomerő mikroszkóp rugólapkájának tujével is. Kísérleti elrendezésünk a 17. ábrán látható.



17. ábra. Az egyedi molekula mechanikai mérés kísérleti elrendezése.

Kísérleteink során átlagosan 500 nm/s sebességgel húztuk meg, illetve eresztettük vissza a PEVK szegmenseket. Megfigyeltük, hogy erő-megnyúlás görbéken a húzási (kék) és a visszaengedési (piros) erőgörbék fedik egymást (18. ábra). Az erőhiszterézis hiánya arra utal, hogy a PEVK domén ideális elasztikus rugó, valamint arra is enged következtetni, hogy a PEVK domén nem rendelkezik másodlagos szerkezettel, illetve adott másodlagos szerkezet

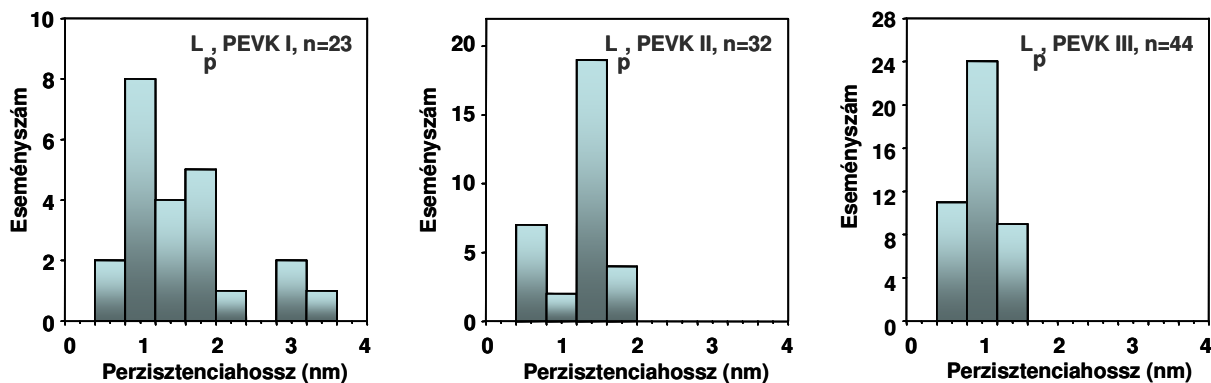
letekeredését kísérő események olyan kicsi erőtartományba esnek, amelyek AFM-mel nem mutathatók ki.



18. ábra. A PEVK I, II és III erő-megnyúlás görbéi (felső panel, példák). A húzási adatok kékkkel vannak jelölve, a visszaengedési adatok pirossal. Az alsó paneleken a kontúrhosszak eloszlása látható (167 mM KCl esetén: PEVK I: 262,66 nm ($\pm 3,97$ átlag \pm SE), PEVK II 280,99 nm ($\pm 2,46$ átlag \pm SE), PEVK III: 269,48 nm ($\pm 1,91$ átlag \pm SE)).

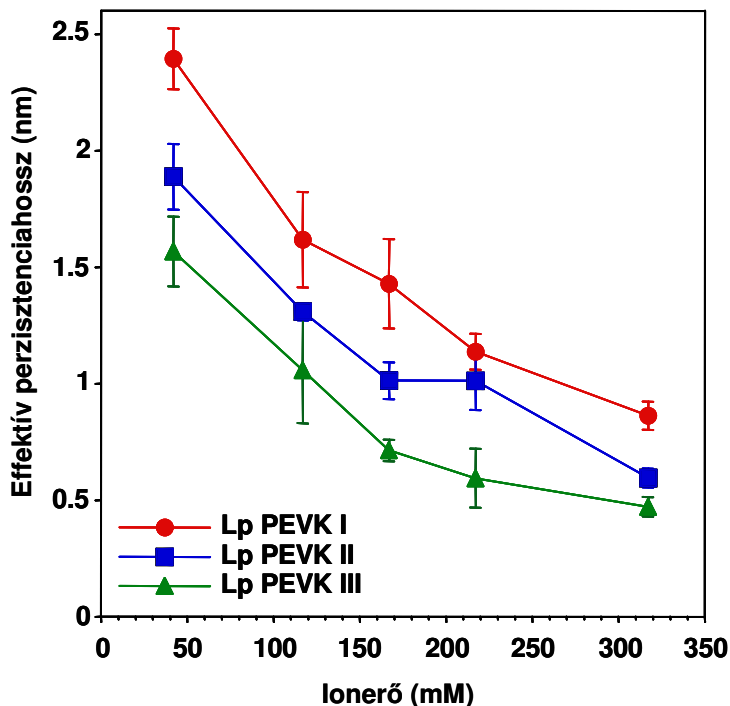
Az nem-lineáris erő - megnyúlás görbékre a féregszerű lánc (WLC) modellt illesztettük, amely alapján kiszámolhattuk a meghúzott szegmens kontúrhosszát (L_c , a molekula hossza), illetve perzisztenciahosszát (L_p , a meghúzott molekulaszakasz hajlítómerevsége). A WLC-modell illesztéséből kapott kontúrhosszakból (effektív molekulahossz, eloszlásuk a 16. ábrán látható) arra következtettünk, hogy sikerült specifikusan megragadnunk a molekulák N- és C-terminálisát, mivel a szakaszokat alkotó aminosavak száma alapján számolt molekulahossz (~270 nm) megfelel a kapott eredményeknek.

A perzisztenciahosszak eloszlásából (19. ábra) arra következtethetünk, hogy a PEVK harmadok hajlítómerevsége eltérő (PEVK I: $1.43 \pm 0,19$ nm, PEVK II: $1.01 \pm 0,08$ nm, PEVK III: $0.71 \pm 0,05$ nm)



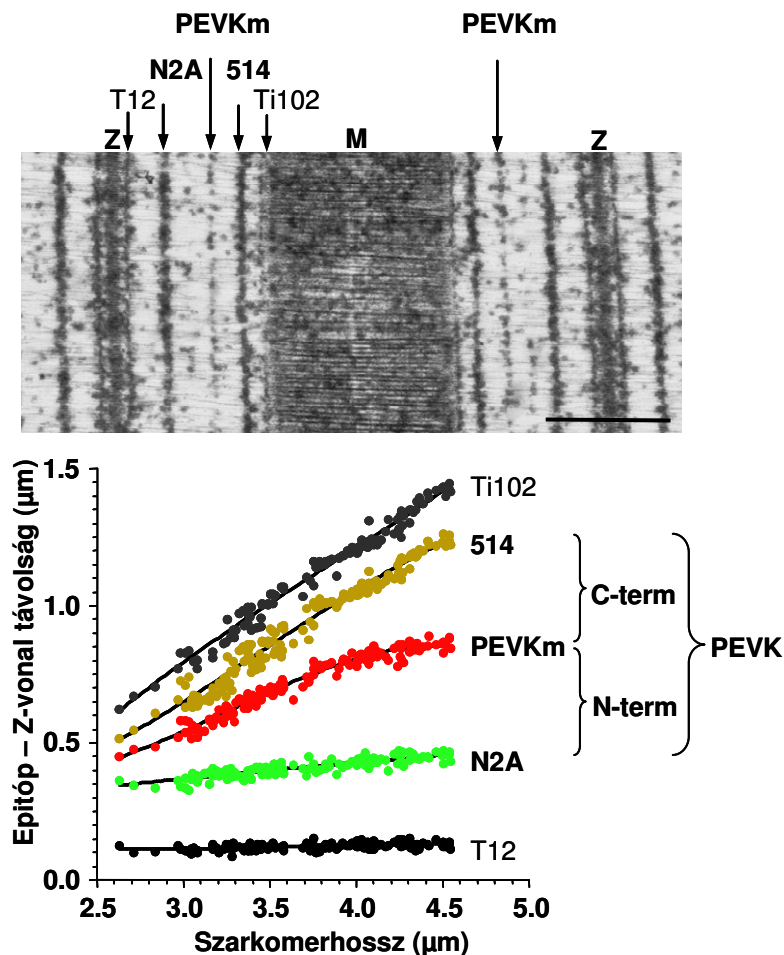
19. ábra. A PEVK szegmensek effektív perzisztenciahossz eloszlása.

Ennek a jelenségnek a tisztázására különböző ionerők mellett végeztünk AFM méréseket a PEVK szegmenseken. Az eredmények összefoglalása a 20. ábrán látható.



20. ábra. Az egyes PEVK szegmensek effektív perzisztenciahossza KCl koncentráció függvényében.

Megfigyelhető, hogy az ionerő növekedésével a perzisztenciahossz csökken. A perzisztenciahossz értékeinek változása nagy mértékű, például a PEVK I esetében a 42 mM ionkoncentráció mellett mért 2,39 nm-es érték 317 mM ionkoncentráció mellett már csak 0,86 nm. A nem-lineáris görbék lefutása hasonló, sehol nem keresztezik egymást. Az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a PEVK domén egyes szakaszai eltérnek elasztikus tulajdonságaikban: az N-terminális szegmens (PEVK I) a legmerevebb a három harmad közül, míg a C-terminális a leghajlékonyabb. Ebben az esetben ha megfeszítjük a PEVK domént, elsőként annak N-terminálisa (PEVK I) fog kifeszülni, majd ezt követi a második harmad (PEVK II), végül a C-terminális harmad (PEVK II). Utóbbi elmélet igazolását immunoelektronmikroszkópos módszerrel végeztük el (21. ábra).



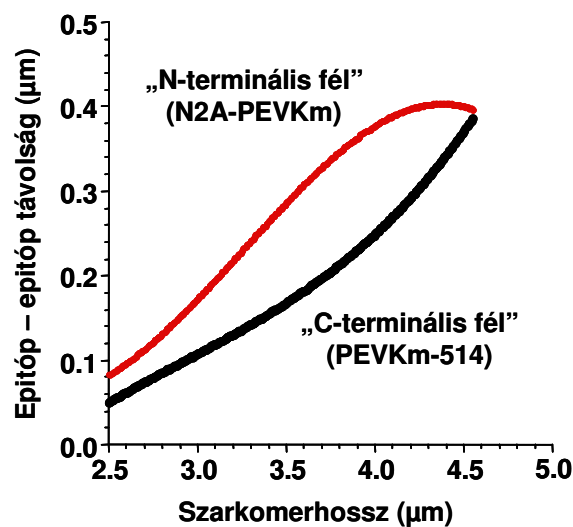
21. ábra. A *m. soleus* immunoelektronmikroszkópos képe különböző antitestekkel jelölve.

A 21. ábra felső panelén egy 3,8 nm hosszúságúra (fekete szakasz) megnyújtott szarkomer látható. A miofibrillumot T12, N2A, 514 és Ti102 antitestekkel jelöltük. A PEVKm jelű

helyen az 514-es antitest gyenge kötődést mutat. Az alsó panelen a Z-vonal - epitóp távolság látható a szarkomerhossz függvényében.

A vizsgálat során a 514 jelű antitest (amelynek egyik (gyengébb) epitópja a PEVK domén közepén foglal helyet) és a PEVK, illetve a szarkomer egyéb elemeire specifikus antitestek [87] közötti távolságot határoztuk meg különböző mértékben megnyújtott szarkomerek estén. Az antitestek kötődési helyei a szarkomerben a 21. ábrán láthatók.

Az immun-elektronmikroszkópos felvételek alátámasztották azon elméletünket, hogy a PEVK domén megnyújtásakor annak N-terminálisa előbb feszül ki, mint a C-terminális fele. A PEVK szegmens N-terminális (N2A - PEVKm) és C-terminális (PEVKm - 514) felének hosszváltozása a szarkomer hosszának függvényében a 22. ábrán látható.

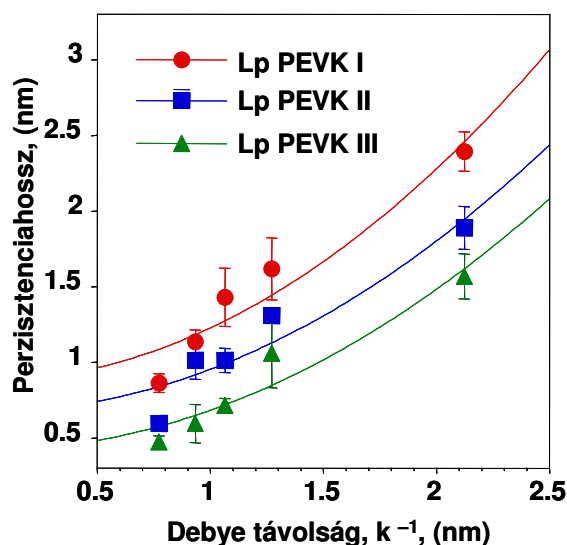


22. ábra. A PEVK domén N- és C-terminális felének hossza a szarkomer hosszának függvényében.

A *m. soleus*ban lévő titin izoforma PEVK szegmensének mechanikai vizsgálata során azt találtuk, hogy a PEVK szakasz elaszticitása nem homogén. A domén N-terminálisa merevebb, mint az C-terminálisa. Erre a következtetésre az egyes PEVK szegmensek ionerőfüggő perzisztenciahossz változásából, illetve a PEVK domén egyes szakaszaira specifikus antitestekkel jelölt miofibrillum elektronmikroszkópos felvételeinek kiértékeléséből következtettünk. A nem homogén elaszticitás a doménon belül azt eredményezi, hogy a

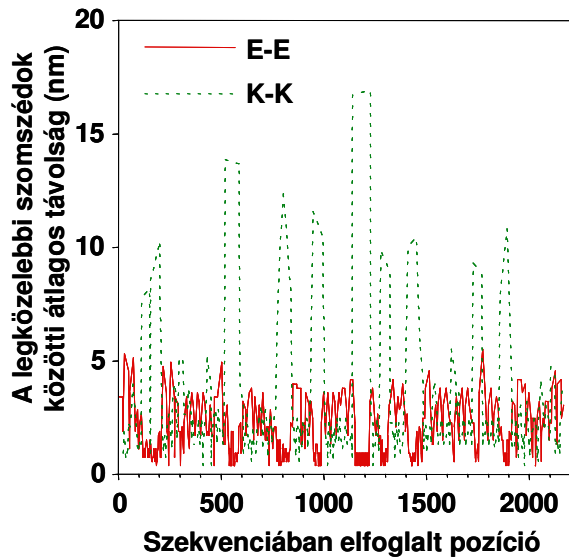
szarkomer megnyújtásakor elsőként a PEVK domén N-terminálisa, majd a további megnyújtás során annak C-terminálisa feszül ki.

Az atomerő-mikroszkópos mérések alapján tehát a PEVK harmadok perzisztenciahossza eltérő. A perzisztenciahosszbeli különbsége okának jobb megértése érdekében az adatokat összevetettük az Odijk-Skolnick-Fixman (OSF) elmélet [104] alapján számolható perzisztenciahossz értékekkel. A 23.ábrán az egyes PEVK harmadok mérések alapján kapott és az elméletileg számolt perzisztenciahosszának összevetése látható az elektrosztatikus, Debye-féle távolsággal.



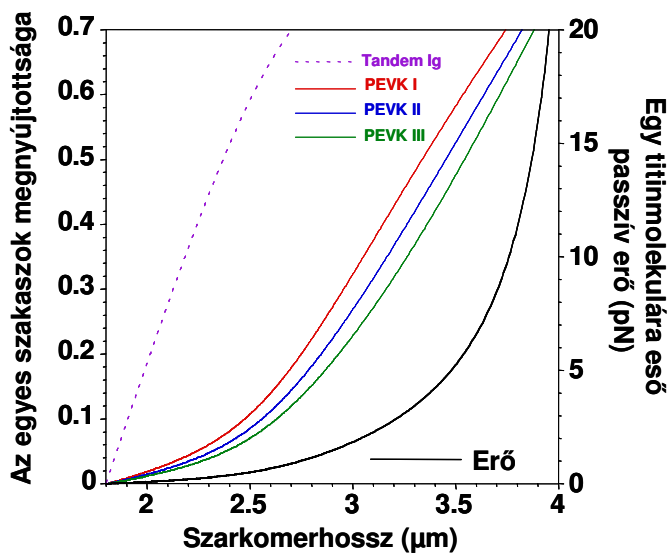
23. ábra. A PEVK harmadok OSF elmélet alapján számolt és kísérletesen meghatározott hosszának összehasonlítása.

Az elméletileg számolt görbe jól illeszkedik a gyakorlati mérések alapján kapott értékekre mindhárom PEVK szegmens esetében (PEVK I: $R = 0,96$, PEVK II: $R = 0,94$, PEVK III: $R = 0,96$). Az OSF elmélet alapján számolható töltéssűrűség (adott glutaminsavhoz legközelebb eső glutaminsavak, illetve az adott lizinhez legközelebb eső lizinek átlagos távolságának inverze) az egyes PEVK szegmensek esetében a következő volt: PEVK I: $1,42 \text{ nm}^{-1}$ ($\pm 0,12 \text{ SEM}$); PEVK II: $1,27 \text{ nm}^{-1}$ ($\pm 0,13 \text{ SEM}$); PEVK III: $1,23 \text{ nm}^{-1}$ ($\pm 0,1 \text{ SEM}$) (24. ábra).



24. ábra. A lizin – lizin (K - K) és a glutaminsav – glutaminsav (E - E) oldalláncok átlagos távolsága a PEVK domén mentén.

A tisztán elasztikus perzisztenciahossz komponens értéke a PEVK I estében 0,88 nm ($\pm 0,14$ SEM), a PEVK II estében 0,67 nm ($\pm 0,13$ SEM) a PEVK I estében 0,42 nm ($\pm 0,1$ SEM) (25. ábra).



25. ábra. A PEVK szegmens relatív megnyúlása és az egy titin molekulára eső erő a szarkomerhossz (SL) függvényében (ionerő: 167 mM).

Az eredmények bemutatása után vegyük sorra a kísérletek alapján levonható következtetéseket.

5. Megbeszélés

5.1. A titin PEVK domén aktinkötése

Munkánk első felében a *m. soleus*ban található titin izoforma PEVK domén aktinkötését vizsgáltuk. Irodalmi adatok alapján ismert tény volt, hogy a PEVK domén kötődik az F-aktinhoz [22, 106, 107]. A szívben expresszáldó N2B titin izoforma PEVK domén, amely megegyezik a *m. soleus*ban található PEVK domén C-terminális végével, szintén kötődik az F-aktinhoz [74]. Mivel az aktin – PEVK kölcsönhatásnak szabályozó szerepe lehet az izom összehúzódása során, e kapcsolat tüzetes vizsgálatát igen fontosnak tartottuk. Vizsgálataink során a *m. soleus*ban expresszáldó titin izoforma PEVK doménján szisztematikusan végighaladva vizsgáltuk annak aktinkötő képességét. A domént három darabban fejeztük ki, és vizsgálataink azt mutatták, hogy a harmadok aktinkötő képessége eltérő. A PEVK aktinkötő képességét több kísérlettel is bizonyítottuk. *In vitro* motilitási próba során a PEVK szegmensek lassították az F-aktin filamentumok mozgását. A jelenség hátterében az állhat, hogy a PEVK harmadok a felszínhez pányvázták az F-aktin filamentumokat, mivel a PEVK nem befolyásolta a kísérlet során használt HMM ATP-áz aktivitását. A szilárd felszínhez való kötődési próba során a PEVK ugyancsak erős aktinkötő képességet mutatott. Azt is megfigyeltük, hogy a PEVK harmadok képesek voltak nyalábokba kötni az F-aktin filamentumokat. Fluoreszcensen jelölt PEVK szegmens segítségével bizonyítottuk, hogy a második harmad kötődik a vázizom szarkomer I-szakaszához. Az aktinkötés mechanizmusának mind teljesebb megismerése érdekében a PEVK domént felépítő PPAK és polyE fragmentumok aktinkötő képességét is vizsgáltuk.

Az *in vitro* motilitási próbák eredményei azt mutatták, hogy a PEVK szegmensek és fragmentumok csökkentik az F-aktin filamentumok mozgási sebességét. A hatás a szegmensek esetén a középső PEVK harmad esetében volt a legkifejezettebb. A harmadik harmad csak igen kis mértékben volt képes az F-aktin filamentumok mozgását befolyásolni. Az eredményekből azt a következtetést vontuk le, hogy a PEVK domén nem homogén módon, minden szakaszában egyforma erővel képes kötődni az F-aktinhoz. Az aktin

filamentumok lassulása mechanikai okokra vezethető vissza, mivel sem a PEVK szegmensek, sem pedig a PEVK fragmentumok nem befolyásolták a HMM ATP-áz aktivitását. Úgy gondoljuk, hogy a különböző PEVK harmadok eltérő erővel képesek kipányvázni az aktin filamentumokat az *in vitro* motilitási próba során. Ez az erő vagy a kötések számától, vagy ezen kötések eltérő disszociációs konstansától, esetleg mindkét faktortól együttesen függ. A látszólagos kötési erősség sorrendje a PEVK szegmensek esetében PEVK II > PEVK I > PEVK III. Ugyanezt a sorrendet kapjuk akkor, ha megvizsgáljuk, hogy a harmadok milyen gazdagok polyE szekvenciákban.

Az *in vitro* motilitási kísérletet elvégeztük PPAK és polyE fragmentumokkal is. Azt kaptuk, hogy a polyE szekvencia jóval erősebben gátolta az aktin filamentumok mozgását, mint a PPAK. Mindebből arra következtetünk, hogy adott PEVK szakasz aktinkötésének erőssége attól függ, hogy mennyi polyE szekvenciát tartalmaz.

Azt is vizsgáltuk, hogy a különböző PEVK szegmensek és fragmentumok milyen erősen képesek a felszínhez rögzíteni az F-aktin filamentumokat. A mérés során folyamatosan emeltük a puffer ionerejét. Más kutatócsoportok [73, 107] és a saját eredményeink arra mutatnak, hogy a PEVK – aktin kölcsönhatás elektrosztatikus jellegű.

A PEVK domént felépítő PPAK és polyE szekvenciák izoelektromos pontja igen eltérő. A PPAK-é a nagyszámú lizin oldallánc miatt erősen bázikus tartományba esik (~11), míg a polyE szekvenciáé (a rengeteg glutaminsav oldallánc következtében) erősen savas (~3). Fiziológias pH tartományban a PEVK domén úgy is felfogható, mint pozitívan és negatívan töltött gócpontok füzére. Ez a váltakozó töltésmintázat alkalmassá teheti a PEVK domént más fehérjékkel, vagy akár önmagával való asszociációra.

A PEVK domén nem tartalmaz az irodalomban leírt [108] „klasszikus” aktinkötő szekvencia motívumokat. Figyelembe véve azt a tényt is, hogy a PEVK domén nem rendelkezik stabil másodlagos szerkezettel [109], vagy ha létezik is másodlagos szerkezet, akkor az igen könnyen alakítható, változtatható [32], akkor arra a következtetésre juthatunk,

hogy a PEVK és az F-aktin kötődése egy nem-specifikus, elektrosztatikus kölcsönhatás eredménye.

Nem ismert, hogy a PEVK hol kötődik az F-aktinhoz. Kötési kísérletekkel bemutattuk, hogy sem a tropomiozin, sem pedig a miozin nem befolyásolja az F-aktin – PEVK kölcsönhatást. Jelölt PEVK II harmad miofibrillumhoz való asszociációjának vizsgálatával azt is bizonyítottuk, hogy a PEVK kötési helye eltér a nebulin kötési helyétől. Ezen tényeket alapul véve arra gondolunk, hogy mivel a PEVK kötése és a fentebb felsorolt fontos szarkomerikus fehérjék kötési helye térben elkülönül, a titin vékony PEVK doménon keresztüli vékony filamentumhoz való asszociációjának fontos élettani szerepe lehet.

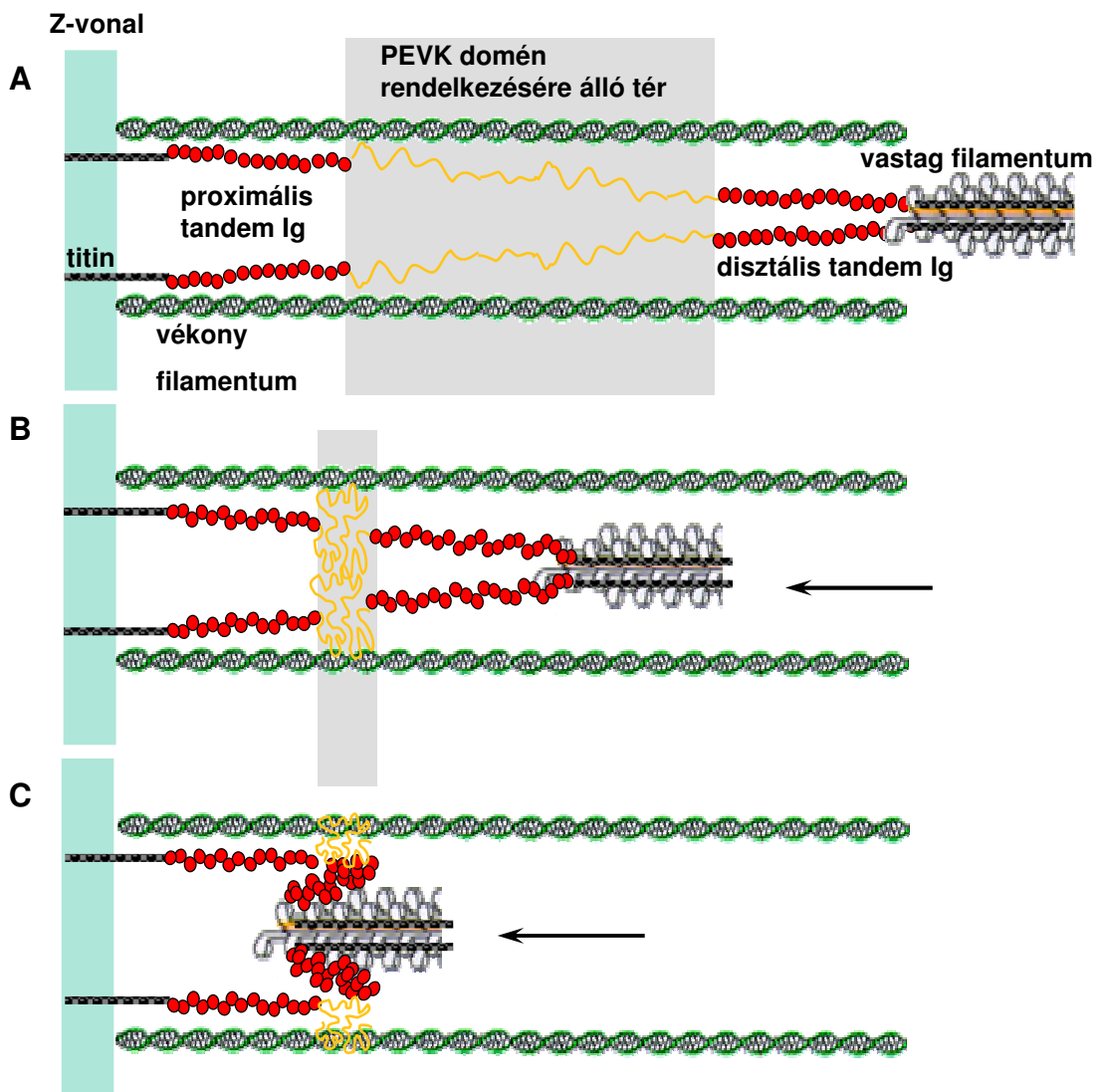
A PEVK domén összetételének [110] vizsgálata alapján arra juthatunk, hogy adott PEVK szakasz aktinkötő képessége a benne található polyE szekvenciák méretétől és számától függ. A kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a PEVK és az F-aktin kölcsönhatása elsősorban elektrosztatikus, de a valódi kötési mechanizmust, illetve a kötés pontos helyét még nem ismerjük. Úgy gondoljuk, hogy a PEVK domén mentén többféle, eltérő erősségű aktin kötőhely található, és ezen helyek hozzáférhetősége nagy mértékben függ a PEVK domén szerkezetétől, orientációjától, és ezen keresztül szarkomer hosszától.

Mi lehet a szerepe a PEVK – aktin kölcsönhatásnak az izomműködés során? Jól ismert tény, hogy izom összehúzódás során, terheletlen állapotban, a szarkomer rövidülésének sebességét viszkózus és viszkoelasztikus erők befolyásolják [111-113]. Több kutatócsoport is arra utaló eredményekre jutott, hogy titin nagy mértékben befolyásolja a szarkomer rövidülési sebességét [73, 114].

Kísérleti eredményeink alapján a következő modellt javasoljuk (26. ábra): ahogy a szarkomer rövidül, a PEVK domén mentén található aktin kötőhelyek lokális koncentrációja meredeken nő. A koncentrációval párhuzamosan nő a PEVK – vékony filamentum kölcsönhatásának valószínűsége is. A legnagyobb látszólagos aktin kötőhely koncentráció akkor alakul ki, amikor a PEVK domén teljesen „összenyomott állapotban van, vagyis amikor a szarkomer hossza körülbelül 2 μM [109]. Több kísérlet is azt mutatta, hogy mielőtt a

szarkomer elérné a 2 μM -es hosszat, a terheletlen rövidülés sebessége csökkenni kezd [111-113].

Úgy gondoljuk, hogy ha a rövidülés sebessége elegendően nagy, akkor a vastag filamentum vége áthatol azon a régió, ahol a PEVK domén és a vékony filamentum kölcsönhatásban állnak egymással (26. ábra, C) panel). Modellünk szerint a PEVK domén és a vékony filamentum kölcsönhatása által kialakuló dinamikus térhálós szerkezet ugyan azon a módon lassítja a szarkomer további rövidülésének sebességét, ahogy az *in vitro* motilitási próbák során pányvázta ki az F-aktin filamentumokat a felszínhez. Ezen viszkózus visszatartó erőnek a mértéke a PEVK – F-aktin kölcsönhatásnak az időtartamától függ. A szilárd felszínhez való kötődési kísérletek eredményei alapján ez az időtartam akár többször tíz másodperc is lehet. A viszkózus erőhatás a kötések állandó elszakadása és újraalakulása következtében folyamatosan csökken, valamint az is tény, hogy ezen kötések látszólagos erősségét a rájuk ható húzóerő nagy mértékben lecsökkentheti [115, 116]. Így, a PEVK domén és a vékony filamentum hatása a szarkomer rövidülésére tranziens, időben folyamatosan változó hatás, amely egyféle viszkózus ütközőzónát képez. Az ütközőzóna szerepe esetleg abban állhat, hogy maximális szarkomer összehúzódás esetén lelassítja a vastag filamentumot mielőtt az beleütközne a Z-vonalba.



26. ábra. A PEVK – vékony filamentum kölcsönhatás modellje. A) szélsősegesen megnyújtott szarkomer. B) rövidülő szarkomer, melyben a proximális és a disztális tandem Ig-régió még megnyújtott állapotban van. C) összehúzódtott szarkomer, melyben a vastag filamentum vége megközelíti a Z-vonalat. Az ábrán látható szürke négyzet a PEVK domén rendelkezésére álló térrészt jelöli. Az egyre csökkenő térrészben az aktin koncentráció állandónak tekinthető, míg a PEVK koncentráció, és vele az aktin kötőhelyek száma egyre nő a szarkomer rövidülése során. A nyilak a vastag filamentum mozgását jelölik.

Kísérleteink azt mutatták, hogy a PEVK domén különböző részei különböző mértékben és erősséggel képesek kötni F-aktin filamentumokat. Minél nagyobb adott szakasz polyE szekvencia tartalma, annál nagyobb a látszólagos aktin-kötési erő. A különböző szövetekben kifejeződő titin izoformákban eltérő a PEVK domének hossza illetve összetétele is [34, 35]. A szívizomra a rövid PEVK domén jellemző, míg a vázizmok nagyobb PEVK doménnel

rendelkeznek. A PEVK domén méretének és polyE - tartalmának változtatásával az egész PEVK domén aktinkötő képessége változik, amelyen keresztül adott izomszövet rövidülési sebességének kinetikája szabályozható.

5.2. A titin PEVK domén elasztikus tulajdonságai

A PEVK szegmensek elaszticitásának vizsgálata során a *m. soleus* titin izoforma PEVK doménjét három, megközelítőleg egyforma darabban fejeztük ki prokarióta rendszerben. A fehérje fragmentumok végeit úgy módosítottuk, hogy azokat specifikusan meg tudjuk ragadni. A harmadok N-terminálisán His-taggal láttuk el, ami a kémiaiailag módosított (Ni-keláttal bevont) felszínen specifikusan tapadt, másrészt kihasználva az arany atomok és a vicinális ciszteinek között kialakuló erős kölcsönhatást, a PEVK harmadok C-terminálisára vicinális cisztein aminosavakat helyeztünk el. Az irodalomban nem található adat a *m. soleus*-ból származó egész PEVK domén elasztikus viselkedését illetően, valamint, mivel a teljes domént három darabban vizsgáltuk, módunk nyílt a doménon belüli különbségek vizsgálatára. Az atomerő-mikroszkópos mérések során rögzített erő - megnyúlás görbék nem-lineáris elaszticitást mutattak.(18. ábra). A görbékre a WLC modell igen jól illeszthető volt. A WLC) (wormlike chain), vagy „féregszerű lánc”, modell a polimert hajlítható rúdnak tekinti. A polimer alakját annak hajlítómerevsége, illetve az ezt jellemző perzisztenciahossz határozza meg. A merev (viszonylag nagy perzisztenciahosszal rendelkező) polimerek szerkezeti entrópiája alacsony, megnyújtásuk pedig kis erőt igényel, míg ennek ellenkezője igaz a flexibilis, kis hajlítómerevségű polimerekre, vagyis utóbbiak szerkezeti entrópiája magas, és kiegyenesítésükhöz sok energiát kell befektetni.

Az erő – megnyúlás görbékre illesztett WLC modell alapján számolt kontúrhosszak megegyeztek az a harmadok elméletileg számolt kontúrhosszával (21. ábra), ami arra utal, hogy terveinknek megfelelően sikerült specifikusan megragadnunk a mechanikai kísérletek során a molekulák végeit. A görbék nem mutatnak hiszterézist, ami arra utal, hogy a PEVK domén nem rendelkezik stabil másodlagos szerkezettel, illetve hogy ezen szerkezetet kialakító erők alatta maradnak az atomerő – mikroszkóp felbontóképességének. Labeit és

kutatócsoportja ugyanerre a következtetésre jutottak a szívből származó PEVK domén vizsgálata során [117].

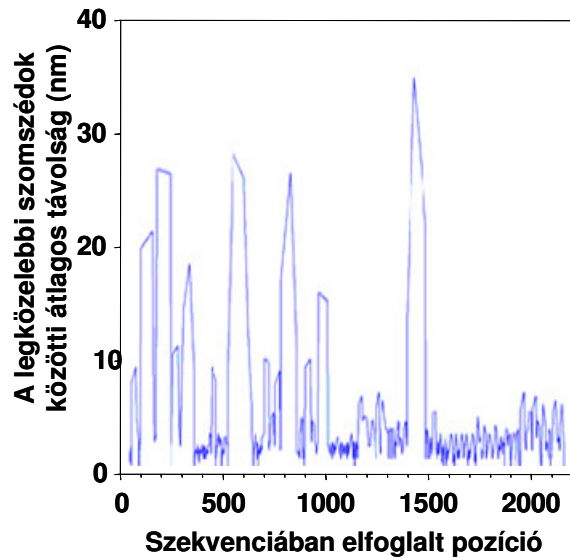
A PEVK domén elaszticitása nem homogén annak hossza mentén. Az egyes harmadok perzisztenciahosszának vizsgálata azt mutatta, hogy a PEVK domén N-terminális szakasza merevebb, és C-terminális irányába haladva egyre elasztikusabb. Ha egy ilyen polipeptidet megnyújtunk, előbb annak N-terminálisa egyenesedik ki, majd, ahogy nő az erő, úgy feszül meg és egyenesedik ki a C-terminálisa. Ezen elmélet *in situ* vizsgálatának érdekében immun-elektronmikroszkópos felvételeken a különböző hosszúságúra nyújtott szakomerek estében vizsgáltuk a PEVK domén viselkedését (21. és 22. ábrák). A kapott eredmények alátámasztották a mechanikai mérések alapján felállított elméletünket.

A PEVK harmadok hajlítómerevségének a környezet ionerejétől való függése jó egyezést mutatott az OSF modellel. Az OSF elmélet [104] értelmében a polielektrolit láncon elhelyezkedő hasonló töltések taszítása „kimerevíti” a polimert. A környezet ionerejének növelésével az a taszító, „kimerevítő” hatás gyöngül, mivel a töltések leárnýékolódnak. Ennek következményeképpen a lánc az környezet ionkoncentrációjának növelésével egyre elasztikusabb lesz. A PEVK polielektrolit láncként való viselkedését Linke és munkatársai már korábban lehetőségként vetették fel [90]. Emellett, Labeit és munkatársai megfigyelték, hogy a bizonyos PEVK darabok perzisztenciahossza a Ca^{2+} - koncentráció növelésével csökkent [117]. Kísérleteink egyértelműen azt mutatják, hogy a PEVK domén egyfajta polielektrolit lánc, melynek perzisztenciahosszát az ionerősség nagy mértékben csökkenti. A kép nem ennyire egyszerű, mivel szemben a „klasszikus” polielektrolit láncokkal a PEVK doménban fiziológias pH-n pozitív és negatív töltések is megtalálhatóak. Ha azonban vetünk egy pillantást a PEVK doménon belül a lizin és glutaminsav oldalláncok elhelyezkedésére (24. ábra), úgy azt látjuk, hogy azok nem egyenletesen vannak elosztva a domén mentén, hanem nagyobb „szigetekbe”, „foltokba” csoportosulnak, így a PEVK domént egy olyan polielektrolit lánc lehet, melynek hosszában a különböző töltés-„foltok” alternálnak.

Leake és munkatársai a PEVK domén mechanikai viselkedésének lézercsipeszes vizsgálatakor arra a következtetésre jutottak, hogy a domén perzisztenciahossza az ionerő

növelésével párhuzamosan növekszik [118]. A PEVK doménon belül a távoli pozitív és negatív „foltok” kölcsönhatásba léphetnek egymással, ami csökkenti az effektív kontúrhosszat [119]. A mérés során ezek a kölcsönhatások felbomlanak, ám ezzel párhuzamosan a kontúrhossz folyamatosan növekszik. Ennek a folyamatnak az a következménye, hogy kísérleti eredmények kiértékelésekor a valóstól jóval kisebb perzisztenciahossz értékek adódnak [119, 120]. Ez lehet a magyarázata annak, hogy alacsony ionerő mellett, ahol a pozitív és negatív foltok kölcsönhatása erősebb, Leake és munkatársai alacsony perzisztenciahosszakat mértek. Erre utal az is, hogy Leake és munkatársai az erő – megnyúlás görbék felvételekor erőhiszterézist figyeltek meg, ami arra utal, hogy a húzás kezdetekor a PEVK doménon belüli kölcsönhatások nagy mértékben csökkentették annak effektív kontúrhosszát.

Töltéssűrűség tekintetében az egyes PEVK harmadok nem térnek el nagy mértékben, ami arra utal, hogy a perzisztenciahosszbéli különbségeket nem az elektrosztatikus komponens alakítja ki. Melyek lehetnek ezek a nem elektrosztatikus jellegű faktorok, és azok hogyan befolyásolhatják a PEVK domén elaszticitását? Az egyik lehetséges magyarázat a PEVK N- és C-terminálisának eltérő elasztikus tulajdonságaira az lehet, hogy a két fél nagy eltérést mutat a prolin-tartalom tekintetében (27. ábra). A PEVK domén második fele jóval gazdagabb prolin aminosavban, mint az első, így a molekula ezen szakaszán a poliprolin hélix kialakulásának valószínűsége is nagyobb. A poliprolin hélixek megrövidítik az effektív perzisztenciahosszat. A húzási kísérletek során, a húzási ciklus elején ezek a poliprolin hélixek letekerednek. A redukált effektív kontúrhossz, hasonlóan Leake és munkatársai kísérletei esetében azt eredményezi, hogy a perzisztenciahosszak is kisebbnek adódnak.



27. ábra. A prolin - prolin oldalláncok átlagos távolsága a PEVK domén mentén.

A titin molekula a szarkomer I-szakaszára eső részének viselkedése a miofibrillum megnyújtása során az egyes szakaszok perzisztenciahosszának ismeretében megjósolható (25. ábra). A PEVK szakasz megnyúlása a szarkomer 2,5 – 4,5 μm hossztartományában a legjelentősebb. Ebben a szakaszban mintegy 20 pN erő hat minden egyes titin molekulára. A PEVK domén N- és C-terminális felének hossza nagy eltérést mutat, miközben a szarkomer hossza 2,5 μm -ról 4 μm -re növekszik. A 20. ábra alapján látható, hogy 4 μm -es szarkomerhossz esetén az N-terminális fél hossza mintegy másfélszerese a C-terminális felnek.

Mi lehet a PEVK domén különleges, hierarchikus elasztikus felépítésnek fiziológiai szerepe? Egyrészt, a PEVK doménnek fontos szerep jut a szarkomer passzív elasztikus tulajdonságainak kialakításában. Másrészt viszont, nem tudjuk, hogy mely fehérje vagy fehérjék révén „érezkeli” az izom a megfeszítettség mértékét. Egyes kutatócsoportok szerint a titinek ebben igen fontos szerepe van [121]. A PEVK domén egyes szakaszai a szarkomer hosszának (vagyis megfeszítettségének) mértékében különböző mértékben vannak kiegyenesedve. Bizonyos egyszerűbb (Ca^{2+}) vagy összetettebb (fehérjék) kötődése és disszociációja (vagy asszociációja) a kiegyenesedés során könnyen elképzelhető folyamat, így a PEVK hierarchikus, teleszkóp-szerű viselkedése révén a megfeszítettség mértéke jól

monitorozható a különböző szarkomerhosszak esetén. APEVK domén „molekuláris teleszkóp” funkciójának tisztázása további kísérleteket igényel.

6. Kísérleteink alapján levonható legfontosabb következtetések

- A PEVK domén aktinkötése a molekulaszakasz mentén változó. A látszólagos kötődési erők sorrendje: PEVKII > PEVKI > PEVKIII.
- Minél nagyobb adott PEVK szakasz polyE - tartalma, annál nagyobb a látszólagos kötődési erő az aktin és a PEVK között.
- A PEVK – aktin kölcsönhatás létrejön *in situ*, a szarkomerben is.
- A PEVK aktin kötése egy viszkozus ütközőzónát képez a vastag filamentum hegye és a Z-vonal között a szarkomer rövidülése során
- Az egyedi molekula mechanikai mérések során tapasztalt erőhiszterézis hiánya arra utal, hogy a PEVK domén ideális elasztikus rúgóként viselkedik.
- Az egyes PEVK harmadok eltérő elasztikus tulajdonságokkal rendelkeznek. A lokális flexibilitás sorrendje: PEVK III > PEVK II > PEVK I.
- Immunoelektronmikroszkópos kísérletek alátámasztják a PEVK domén hierarchikus elasztikus tulajdonságát.
- A PEVK domén egy különleges, “elasztikus teleszkópként” működhet a szarkomerben.
- A PEVK harmadok perzisztenciahosszai az ionerő növelésével csökkennek, így a PEVK domén viselkedése megfelel az Odijk-Skolnick-Fixman modell alapján elvárhatónak.
- A PEVK harmadok a perzisztenciahossz ionerősségtől való függésének tekintetében nem mutatnak eltérést, így a szegmensek eltérő elaszticitásának hátterében nem elektrosztatikus mechanizmusok állnak.

7. Összefoglalás

A titin moduláris felépítésű, 3.0-3.6 MDa tömegű óriásfehérje, mely az izom szarkomer szélétől (Z-vonal) a közepéig (M-csík) húzódik. A titin az A-szakaszban a vastag filamentumokhoz szorosan asszociált, míg az I szakaszban molekuláris rugóként feszül ki a vastag filamentumok végei és a Z-vonal között. A titin mentén ~300 globuláris (immunglobulin és fibronektin típusú) domén és közöttük szórványosan elhelyezkedő egyedi szekvencia található. A legfontosabb egyedi szekvencia a PEVK domén, ami egy prolinban, glutaminsavban, valinban és lizinben gazdag molekulaszakasz. A PEVK domén mérete izomtípusonként változó. A legnagyobb, 2174 aminosavból álló izoforma a *m. soleusban* található. A legkisebb, 167 aminosavból álló szívizom PEVK doménről, illetve a vázizom PEVK egyes szakaszairól korábban aktin-kötő sajátosságokat mutattak ki. Az azonban, hogy a vázizom PEVK domén mentén az aktin kötés hogyan változik, nem ismert.

A vázizom titin PEVK domént három, szekvenciálisan egymást követő darabban fejeztük ki prokarióta (*E. coli*) expressziós rendszer segítségével. Az N-terminális (PEVKI), középső (PEVKII) és C-terminális (PEVKIII) szakaszok eltérően kötötték az F-aktint szilárd felszínhez való kötődési, keresztkötési és *in vitro* motilitási próbákban. A látszólagos aktin-affinitás sorrendje PEVKII > PEVKI > PEVKIII volt. Az aktin kötés további részleteinek megismerése érdekében a PEVK domént felépítő PPAK és polyE motívumokat klónoztuk, és a PEVK-harmadokhoz hasonlóan prokarióta expressziós rendszerben fejeztük ki. A polyE motívum aktinnal szemben mutatott látszólagos affinitása nagyobb, mint a PPAK motívumé. Összehasonlítva, a polyE motívumok relatív mennyisége a különböző PEVK harmadokban ugyancsak PEVKII > PEVKI > PEVKIII, azaz a lokális aktinkötő tulajdonságért a lokális polyE motívum koncentráció tűnik felelősnek. A titin PEVK domén aktinkötő tulajdonságának élettani szerepe nem pontosan ismert. Modellünkben a PEVK aktin kötése egy viszkózus ütköző szerepet játszhat, mely szabályozza a harántcsíktal izom terheletlen összehúzódási sebességét. A viszkózus ütköző hangolható a PPAK és polyE motívumok relatív mennyiségének izoformánként megfigyelhető, differenciált hasítással történő változtatásával.

E munka folytatásaként megkezdjük a PPAK és polyE motívumok F-aktinnal való asszociációjának gyors-kinetikai jellemzését. A mérés során millisecundumos időskálán vizsgáljuk a PPAK-, illetve polyE – aktin komplex kialakulásának kinetikáját stopped-flow berendezés segítségével. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy mindkét fragmentum esetében az aktinnal való asszociáció egy legalább kétlépéses folyamat. Az asszociáció gyors- és lassabb lépésének pontos jellemzése, azok mechanizmusának modellezése, illetve a fragmentumok és az aktin filamentumok asszociációjának/disszociációjának pontos kinetikai jellemzése által pontosabban megérthetjük a PEVK domén és a vékony filamentum kölcsönhatásának szerepét a szarkomerben.

A három, megközelítőleg egyforma hosszúságú (mintegy 700 aminosav) fehérje mechanikai sajátosságait egyedi molekula szinten erőmérő atomerő mikroszkóp (AFM) segítségével határoztuk meg. Mivel a három fragmentum teljes egészében lefedi a PEVK szakaszt, az eredmények összegzésével a vázizom titin PEVK szegmensének mechanikai sajátossága jól leírható. Az egyes szegmensek N-terminális végén His-tag, míg C-terminálisán szomszédos cisztein pár található, így Ni-NTA-val borított tárgylemez és arannyal fedett AFM rugólapka segítségével mód nyílt a fehérje-fragmentumok végeinek specifikus megragadására. Eredményeink szerint a PEVK szegmens mindhárom fragmentumának erő - megnyúlás görbéjére jól illeszthető a wormlike chain (WLC) modell. A WLC modell a polimerláncot hajlítható kontínuumként írja le. A lánc hajlító merevségét a perzisztencia hosszal jellemezzük, ami az a távolság, melyen belül a termikusan gerjesztett hajlító mozgások korreláltak. 500 nm/s-os húzási sebességnél egyik szegmens esetében sem tapasztaltunk hiszterézist, ami arra utal, hogy a PEVK ideális rúgóként jellemezhető. Az egyes harmadok mechanikai jellemzése során arra az eredményre jutottunk, hogy a látszólagos perzisztenciahosszak hierarchikus elrendeződést mutatnak. A PEVK domén N-terminális felé eső PEVK I szegmens bizonyult a legmerevebbnek, míg a C-terminális vég felőli PEVK III a leginkább flexibilisnek. Az immunoelektronmikroszkópos kísérletek is azt mutatták, hogy a PEVK domén hajlítómerevsége annak C-terminális felé haladva egyre csökken. A PEVK domén flexibilitásának, és a jelenség mögötti mechanizmus feltárásának érdekében az egyes PEVK szegmensek mechanikai viselkedését különböző ionerejű oldatokban is elvégeztük. Az effektív perzisztenciahosszak az ionerő növelésével csökkentek,

ami jó egyezést mutat a polielektrolit láncok viselkedését leíró Odijk-Skolnick-Fixman (OSF) modellel. Mind a mai napig homály fedti azt az igen fontos kérdést, hogy mely fehérje vagy fehérjék „érik” a szarkomer megfeszítettségének mértékét. A PEVK domén különleges, változó hajlítómerevsége alkalmassá teszi a titint erre az igen fontos feladatra.

További célunk a teljes *m. soleus* PEVK domén aktinkötésének és mechanikai jellemzésének elvégzése atomerő mikroszkóp és lézercsipessz segítségével. Ennek érdekében a 2174 aminosav hosszúságú szakaszt egy darabban, bakulovírus expressziós rendszerben fejezzük ki. Az expresszióhoz szükséges DNS konstrukció elkészült, jelen pillanatban az expressziós rendszer beállítása és a legoptimálisabb tisztítási eljárás kidolgozása zajlik.

8. Rövidítések jegyzéke

| | |
|-----------|---|
| cDNS | copy DNS: az mRNS-ről készített DNS másolat, |
| FnIII | fibronektin III típusú titin domén, |
| Ig | immunglobulin típusú titin domén, |
| PEVK | a titin prolinban (P), glutaminsavban (E), valinban (V) és lizinben (K) gazdag szakasza, |
| kb | kilobázis, 1000 bázispár hosszú DNS szakasz, |
| kDa | 1000 dalton, |
| HCl | sósav, |
| SD | szórás (standard deviáció), |
| SEM | az átlag szórása (standard error of the mean), |
| IAF | iodacetamido-fluoreszcein |
| WLC | „féregszerű lánc” (wormlike chain), |
| F | erő, |
| k | Boltzmann-állandó ($k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K), |
| κ | rugóállandó, |
| L | kontúrhossz: a teljesen kinyújtott polimer hossza, |
| λ | hullámhossz, |
| OD | optikai sűrűség vagy optikai denzitás, |
| P | perzisztenciahossz: egy polimer hajlítómerevségét jellemző hosszúság, |
| R | korrelációs együttható: két valószínűségi változó közötti kapcsolat szorosságát kifejező paraméter, |
| T | abszolút hőmérséklet, |

9. Hivatkozott irodalom

1. Huxley, H. and J. Hanson, Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 1954. 173(4412): p. 973-6.
2. Huxley, A.F. and R. Niedergerke, Measurement of muscle striations in stretch and contraction. *J Physiol*, 1954. 124(2): p. 46-7P.
3. Huxley, A.F. and R. Niedergerke, Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, 1954. 173(4412): p. 971-3.
4. Huxley, A.F. and L.D. Peachey, The maximum length for contraction in vertebrate striated muscle. *J Physiol*, 1961. 156: p. 150-65.
5. Locker, R.H. and N.G. Leet, Histology of highly-stretched beef muscle. II. Further evidence on the location and nature of gap filaments. *J Ultrastruct Res*, 1976. 55(2): p. 157-72.
6. Trombitas, K. and A. Tigy-Sebes, Continuity of thick and thin filaments. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung*, 1972. 7(2): p. 193-4.
7. Garamvolgyi, N., The structural basis of the elastic properties in the flight muscle of the bee. *J Ultrastruct Res*, 1969. 27(5): p. 462-71.
8. Sjostrand, F.S. and M. Jagendorf-Elfvín, Ultrastructure studies of the contraction-relaxation cycle of glycerinated rabbit psoas muscle. I. The ultrastructure of glycerinated fibers contracted by treatment with ATP. *J Ultrastruct Res*, 1967. 17(3): p. 348-78.
9. Sjostrand, F.S. and E. Andersson-Cedergren, The ultrastructure of the skeletal muscle myofilaments at various states of shortening. *J Ultrastruct Res*, 1957. 1(1): p. 74-108.
10. Funatsu, T., et al., Elastic filaments in situ in cardiac muscle: deep-etch replica analysis in combination with selective removal of actin and myosin filaments. *J Cell Biol*, 1993. 120(3): p. 711-24.
11. Maruyama, K., Connectin, an elastic protein from myofibrils. *J Biochem (Tokyo)*, 1976. 80(2): p. 405-7.
12. Maruyama, K., et al., Connectin, an elastic protein of muscle. Effects of proteolytic enzymes in situ. *J Biochem (Tokyo)*, 1981. 89(3): p. 711-5.
13. Guba, F., G. Harsanyi, and P. Kovacs, [Physico-Chemical Study Of Fibrillin In An Alkaline Urea Solution.]. *Kiserl Orvostud*, 1964. 16: p. 35-9.

14. Guba, F. and G. Harsanyi, [Isolation And Chemical Analysis Of Fibrillin, A New Myofibrillar Albumin.]. *Kiserl Orvostud*, 1964. 16: p. 28-34.
15. Wang, K., J. McClure, and A. Tu, Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(8): p. 3698-702.
16. Fürst, D.O., et al., The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol*, 1988. 106(5): p. 1563-72.
17. Gregorio, C.C., et al., Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol*, 1999. 11(1): p. 18-25.
18. Liversage, A.D., et al., Titin and the sarcomere symmetry paradox. *J Mol Biol*, 2001. 305(3): p. 401-9.
19. Cazorla, O., et al., Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res*, 2000. 86(1): p. 59-67.
20. Tskhovrebova, L. and J. Trinick, Extensibility in the titin molecule and its relation to muscle elasticity. *Adv Exp Med Biol*, 2000. 481: p. 163-73.
21. Trinick, J.A., End-filaments: a new structural element of vertebrate skeletal muscle thick filaments. *J Mol Biol*, 1981. 151(2): p. 309-14.
22. Linke, W.A., et al., Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophys J*, 1997. 73(2): p. 905-19.
23. Trombitás, K. and H. Granzier, Actin removal from cardiac myocytes shows that near Z line titin attaches to actin while under tension. *Am J Physiol*, 1997. 273(2 Pt 1): p. C662-70.
24. Funatsu, T., et al., Elastic filaments in situ in cardiac muscle: deep-etch replica analysis in combination with selective removal of actin and myosin filaments. *J Cell Biol*, 1993. 120(3): p. 711-24.
25. Gautel, M., et al., The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci*, 1996. 109(Pt 11): p. 2747-54.
26. Labeit, S., et al., A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature*, 1990. 345(6272): p. 273-6.
27. Labeit, S. and B. Kolmerer, Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 1995. 270(5234): p. 293-6.

28. Kenny, P.A., E.M. Liston, and D.G. Higgins, Molecular evolution of immunoglobulin and fibronectin domains in titin and related muscle proteins. *Gene*, 1999. 232(1): p. 11-23.
29. Muhle-Goll, C., M. Nilges, and A. Pastore, 1H and 15N NMR resonance assignments and secondary structure of titin type I domains. *J Biomol NMR*, 1997. 9(1): p. 2-10.
30. Improta, S., A.S. Politou, and A. Pastore, Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure*, 1996. 4(3): p. 323-37.
31. Labeit, S. and B. Kolmerer, Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 1995. 270(5234): p. 293-6.
32. Ma, K. and K. Wang, Malleable conformation of the elastic PEVK segment of titin: non-co-operative interconversion of polyproline II helix, beta-turn and unordered structures. *Biochem J*, 2003. 374(Pt 3): p. 687-95.
33. Bang, M.L., et al., The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res*, 2001. 89(11): p. 1065-72.
34. Freiburg, A., et al., Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res*, 2000. 86(11): p. 1114-21.
35. Labeit, S. and B. Kolmerer, Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity [see comments]. *Science*, 1995. 270(5234): p. 293-6.
36. Greaser, M., Identification of new repeating motifs in titin. *Proteins*, 2001. 43(2): p. 145-9.
37. Granzier, H. and S. Labeit, Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *J Physiol*, 2002. 541(Pt 2): p. 335-42.
38. Muller-Seitz, M., et al., Chromosomal localization of the mouse titin gene and its relation to "muscular dystrophy with myositis" and nebulin genes on chromosome 2. *Genomics*, 1993. 18(3): p. 559-61.
39. Rossi, E., et al., Order of six loci at 2q24-q31 and orientation of the HOXD locus. *Genomics*, 1994. 24(1): p. 34-40.
40. Gregorio, C.C., et al., The NH2 terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol*, 1998. 143(4): p. 1013-27.

41. Young, P. and M. Gautel, The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *Embo J*, 2000. 19(23): p. 6331-40.
42. Sorimachi, H., et al., Tissue-specific expression and alpha-actinin binding properties of the Z-disc titin: implications for the nature of vertebrate Z-discs. *J Mol Biol*, 1997. 270(5): p. 688-95.
43. Kolmerer, B., et al., Genomic organization of M line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J Mol Biol*, 1996. 256(3): p. 556-63.
44. Horowitz, R., et al., A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, 1986. 323(6084): p. 160-4.
45. Horowitz, R. and R.J. Podolsky, The positional stability of thick filaments in activated skeletal muscle depends on sarcomere length: evidence for the role of titin filaments. *J Cell Biol*, 1987. 105(5): p. 2217-23.
46. Trinick, J. and L. Tskhovrebova, Titin: a molecular control freak. *Trends Cell Biol*, 1999. 9(10): p. 377-80.
47. Trombitás, K., et al., Extensibility of isoforms of cardiac titin: variation in contour length of molecular subsegments provides a basis for cellular passive stiffness diversity. *Biophys J*, 2000. 79(6): p. 3226-34.
48. Hein, S., W.H. Gaasch, and J. Schaper, Giant molecule titin and myocardial stiffness. *Circulation*, 2002. 106(11): p. 1302-4.
49. Wu, Y., et al., Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation*, 2002. 106(11): p. 1384-9.
50. Neagoe, C., et al., Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*, 2002. 106(11): p. 1333-41.
51. Whiting, A., J. Wardale, and J. Trinick, Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *J Mol Biol*, 1989. 205(1): p. 263-8.
52. Trinick, J., Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends Biochem Sci*, 1994. 19(10): p. 405-9.
53. Gregorio, C.C. and P.B. Antin, To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol*, 2000. 10(9): p. 355-62.

54. Russell, M.W., et al., Identification, tissue expression and chromosomal localization of human Obscurin-MLCK, a member of the titin and Dbl families of myosin light chain kinases. *Gene*, 2002. 282(1-2): p. 237-46.
55. Machado, C. and D.J. Andrew, D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J Cell Biol*, 2000. 151(3): p. 639-52.
56. Machado, C. and D.J. Andrew, Titin as a chromosomal protein. *Adv Exp Med Biol*, 2000. 481: p. 221-32.
57. Machado, C., C.E. Sunkel, and D.J. Andrew, Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *J Cell Biol*, 1998. 141(2): p. 321-33.
58. Horowitz, R. and R.J. Podolsky, Thick filament movement and isometric tension in activated skeletal muscle. *Biophys J*, 1988. 54(1): p. 165-71.
59. Mayans, O., et al., Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*, 1998. 395(6705): p. 863-9.
60. Kim, K. and T.C. Keller, 3rd, Smitin, a novel smooth muscle titin-like protein, interacts with myosin filaments in vivo and in vitro. *J Cell Biol*, 2002. 156(1): p. 101-11.
61. Keller, T.C., 3rd, et al., Role of titin in nonmuscle and smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol*, 2000. 481: p. 265-77; discussion 278-81.
62. Keller, T.C., 3rd, et al., Role of titin in nonmuscle and smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol*, 2000. 481: p. 265-77.
63. Kellermayer, M.S. and H.L. Granzier, Elastic properties of single titin molecules made visible through fluorescent F-actin binding. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. 221(3): p. 491-7.
64. Kellermayer, M.S. and H.L. Granzier, Calcium-dependent inhibition of in vitro thin-filament motility by native titin. *FEBS Lett*, 1996. 380(3): p. 281-6.
65. Maruyama, K., et al., Binding of actin filaments to connectin. *J Biochem (Tokyo)*, 1987. 101(6): p. 1339-46.
66. Granzier, H., M. Helmes, and K. Trombitás, Nonuniform elasticity of titin in cardiac myocytes: a study using immunoelectron microscopy and cellular mechanics. *Biophys J*, 1996. 70(1): p. 430-42.
67. Jin, J.P., Cloned rat cardiac titin class I and class II motifs. Expression, purification, characterization, and interaction with F-actin. *J Biol Chem*, 1995. 270(12): p. 6908-16.

68. Houmeida, A., et al., Studies of the interaction between titin and myosin. *J Cell Biol*, 1995. 131(6 Pt 1): p. 1471-81.
69. Labeit, S., et al., Towards a molecular understanding of titin. *Embo J*, 1992. 11(5): p. 1711-6.
70. Mayans, O., et al., Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*, 1998. 395(6705): p. 863-9.
71. Kemp, T.J., et al., Identification of Ankrd2, a novel skeletal muscle gene coding for a stretch-responsive ankyrin-repeat protein. *Genomics*, 2000. 66(3): p. 229-41.
72. Miller, M.K., et al., The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J Mol Biol*, 2003. 333(5): p. 951-64.
73. Kulke, M., et al., Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils. *Circ Res*, 2001. 89(10): p. 874-81.
74. Linke, W.A., et al., PEVK domain of titin: an entropic spring with actin-binding properties. *J Struct Biol*, 2002. 137(1-2): p. 194-205.
75. Yamasaki, R., et al., Titin-actin interaction in mouse myocardium: passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1. *Biophys J*, 2001. 81(4): p. 2297-313.
76. Erickson, H.P., Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(21): p. 10114-8.
77. Granzier, H.L. and T.C. Irving, Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J*, 1995. 68(3): p. 1027-44.
78. Trombitás, K., J.P. Jin, and H. Granzier, The mechanically active domain of titin in cardiac muscle. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 856-61.
79. Granzier, H., et al., Titin elasticity and mechanism of passive force development in rat cardiac myocytes probed by thin-filament extraction. *Biophys J*, 1997. 73(4): p. 2043-53.
80. Gautel, M. and D. Goulding, A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Lett*, 1996. 385(1-2): p. 11-4.
81. Linke, W.A., et al., Limits of titin extension in single cardiac myofibrils. *J Muscle Res Cell Motil*, 1996. 17(4): p. 425-38.

82. Kellermayer, M.S., et al., Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, 1997. 276(5315): p. 1112-6.
83. Rief, M., et al., Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 1997. 276(5315): p. 1109-12.
84. Tskhovrebova, L., et al., Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature*, 1997. 387(6630): p. 308-12.
85. Kellermayer, M.S., Delayed dissociation of in vitro moving actin filaments from heavy meromyosin induced by low concentrations of Triton X-100. *Biophys Chem*, 1997. 67(1-3): p. 199-210.
86. Tskhovrebova, L. and J. Trinick, Direct visualization of extensibility in isolated titin molecules. *J Mol Biol*, 1997. 265(2): p. 100-6.
87. Trombitas, K., et al., PEVK extension of human soleus muscle titin revealed by immunolabeling with the anti-titin antibody 9D10. *J Struct Biol*, 1998. 122(1-2): p. 188-96.
88. Trombitas, K., et al., Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol*, 1998. 140(4): p. 853-9.
89. Linke, W.A., et al., Characterizing titin's I-band Ig domain region as an entropic spring. *J Cell Sci*, 1998. 111(Pt 11): p. 1567-74.
90. Linke, W.A., et al., Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(14): p. 8052-7.
91. Linke, W.A., et al., I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol*, 1999. 146(3): p. 631-44.
92. Trombitás, K., et al., Molecular dissection of N2B cardiac titin's extensibility. *Biophys J*, 1999. 77(6): p. 3189-96.
93. Linke, W.A., Titin elasticity in the context of the sarcomere: force and extensibility measurements on single myofibrils. *Adv Exp Med Biol*, 2000. 481: p. 179-202.
94. Watanabe, K., et al., Molecular mechanics of cardiac titin's PEVK and N2B spring elements. *J Biol Chem*, 2002. 277(13): p. 11549-58.
95. Pardee, J.D. and J.A. Spudich, Purification of muscle actin. *Methods Cell Biol*, 1982. 24: p. 271-89.
96. Margossian, S.S. and S. Lowey, Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol*, 1982. 85 Pt B: p. 55-71.

97. Kron, S.J., et al., Assays for actin sliding movement over myosin-coated surfaces. *Methods Enzymol*, 1991. 196: p. 399-416.
98. Knight, D.C., et al., Aspiration of the breast and nipple discharge cytology. *Surg Gynecol Obstet*, 1986. 163(5): p. 415-20.
99. Kellermayer, M.S., Jr., T.R. Hinds, and G.H. Pollack, Persisting in vitro actin motility at nanomolar adenosine triphosphate levels: comparison of skeletal and cardiac myosins. *Physiol Chem Phys Med NMR*, 1995. 27(3): p. 167-78.
100. Knight, P.J. and J.A. Trinick, Preparation of myofibrils. *Methods Enzymol*, 1982. 85 Pt B: p. 9-12.
101. Bustamante, C., et al., Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 1994. 265(5178): p. 1599-600.
102. Trombitás, K., et al., Nature and origin of gap filaments in striated muscle. *J Cell Sci*, 1991.
103. Gongora-Biachi, R.A., et al., Low prevalence of HTLV-II in Mayan Indians in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Arch Med Res*, 1997. 28(4): p. 555-8.
104. Hugel, T., M. Grosholz, H. Clausen-Schaumann, A. Pfau, H. E. Gaub and M. Seitz, Elasticity of single polyelectrolyte chains and their desorption from solid support studied by AFM based single molecule force spectroscopy. *Macromolecules*, 2001. 34: p. 1039-1047.
105. Collins, J.F., et al., The role of the cytoskeleton in left ventricular pressure overload hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*, 1996. 28(7): p. 1435-43.
106. Kulke, M., et al., Interaction between PEVK-titin and actin filaments: origin of a viscous force component in cardiac myofibrils. *Circ Res*, 2001. 89(10): p. 874-81.
107. Yamasaki, R., et al., Titin-actin interaction in mouse myocardium: passive tension modulation and its regulation by calcium/S100A1. *Biophys J*, 2001. 81(12902): p. 2297-313.
108. Van Troys, M., J. Vandekerckhove, and C. Ampe, Structural modules in actin-binding proteins: towards a new classification. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1448(3): p. 323-48.
109. Trombitás, K., et al., Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol*, 1998. 140(4): p. 853-9.

110. Greaser, M., Identification of new repeating motifs in titin. *Proteins*, 2001. 43(2): p. 145-9.
111. de Tombe, P.P. and H.E. ter Keurs, Force and velocity of sarcomere shortening in trabeculae from rat heart. Effects of temperature. *Circ Res*, 1990. 66(5): p. 1239-54.
112. de Tombe, P.P. and H.E. ter Keurs, Sarcomere dynamics in cat cardiac trabeculae. *Circ Res*, 1991. 68(2): p. 588-96.
113. de Tombe, P. and H. ter Keurs, An internal viscous element limits unloaded velocity of sarcomere shortening in rat myocardium. *J Physiol*, 1992. 454: p. 619-642.
114. Opitz, C.A., et al., Damped elastic recoil of the titin spring in myofibrils of human myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(22): p. 12688-93.
115. Bell, G.I., Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 1978. 200(4342): p. 618-27.
116. Evans, E. and K. Ritchie, Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 1997. 72(4): p. 1541-55.
117. Labeit, D., et al., Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(23): p. 13716-21.
118. Leake, M.C., et al., The elasticity of single titin molecules using a two-bead optical tweezers assay. *Biophys J*, 2004. 87(2): p. 1112-35.
119. Kellermayer, M.S., et al., Mechanical fatigue in repetitively stretched single molecules of titin. *Biophys J*, 2001. 80(2): p. 852-63.
120. Case, R.B., et al., The bacterial condensin MukBEF compacts DNA into a repetitive, stable structure. *Science*, 2004. 305(5681): p. 222-7.
121. Granzier, H.L. and S. Labeit, The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ Res*, 2004. 94(3): p. 284-95.

10. Az értekezés témakörébe tartozó közlemények

10.1. Az értekezés témakörébe tartozó saját, eredeti közlemények

10.1.1. Eredeti közlemények

1. Nagy, A, Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. 2004 *Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal muscle titin*. J Cell Sci. 117(Pt 24):5781-9. IF 7.25.

2. Nagy, A., Grama, L., Huber, T., Bianco, P, Trombitás, K, Granzier, H. L. and Kellermayer, M. S. Z. 2005. *Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin*. Biophys J. 89(1):329-36. IF 4.463.

3. Grama, L., Nagy, A., Scholl, C., Huber, T. and Kellermayer M.S.Z. 2005. *Local variability in the mechanics of tandem Ig segments*. Croat Chem Acta. 78: 405-411. IF 0.729.

10.1.2. Referált folyóiratban megjelent absztraktok

1. Grama, L., Nagy, A., Málnási-Csizmadia, A., Kellermayer, M.S.Z. Mechanical stability of an eight-domain segment in titin's differentially-spliced tandem-Ig region. Biophys J 84, 563a, 2003.

2. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A., Kellermayer, M.S.Z. Expression and molecular mechanics of skeletal-muscle titin's PEVK segment. Biophys J. 84, 563a, 2003.

3. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal-muscle titin Biophys J. 86, 567A, 2004.

4. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Elastic and actin-binding properties of full-length skeletal muscle titin's PEVK domain. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 263, 2004.

5. Nagy, A., Cacciafesta, P., Grama, L., Kengyel, A., Málnási-Csizmadia, A., and Kellermayer, M.S.Z. Elastic and actin-binding properties of full-length skeletal muscle titin's PEVK domain. *Biophys. J.* 88, 2005.

10.1.3. Egyéb absztraktok

1. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. *Titin óriás izomfehérje PEVK doménjének expressziója és molekuláris mechanikája.* XXXII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2002

2. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. *Expression and single-molecule mechanics of skeletal muscle titin's PEVK segment.* Biophysical Society 47th Annual Meeting, San Antonio, Texas, 2003

3. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. *Rekombináns titin fragmentumok molekuláris mechanikája.* XXXIII. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2003

4. Nagy, A., Grama, L., Cacciafesta P., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. *Differential actin binding along the PEVK domain of skeletal-muscle titin.* Biophysical Society 48th Annual Meeting, Baltimore, 2004

5. Nagy, A., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. *Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin.* EMBO-HHMI Conference, Budapest, 2005

6. Nagy, A., Bainco P., Grama, L., Málnási-Csizmadia, A. and Kellermayer, M S. Z. *Elastic and actin-binding properties of skeletal muscle titin's PEVK domain*. Biophysical Society 49th Annual Meeting, Los Angeles, 2005

7. Nagy, A., Grama, L., Huber, T., Bianco P., Trombitas, K., Granyier H. L. and Kellermayer, M S. Z. *Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin*. Alpbach Workshop, “Coiled-coils, Collagen and Co-Proteins.” September 17-22, 2005, Alpbach, Austria.

10.2. Értekezéshez nem kapcsolódó egyéb közlemények

10.2.1. Eredeti közlemények

3. Nagy, A., Malnasi-Csizmadia, A., Somogyi, B., Lőrinczy, D. 2004. *Thermal stability of chemically denatured green fluorescent protein (GFP)*. *Thermochimica Acta*, 410, 161-163. IF 1.161.

4. Szenthe, B., Gaspari, Z., Nagy, A., Perczel, A., Graf, L.. 2004. *Same fold with different mobility: backbone dynamics of small protease inhibitors from the desert locust, Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*. 43(12):3376-84. IF: 4.278.

5. Kellermayer, M. S. Z., Grama, L., Karsai, A., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z. L., Penke, B. 2005. *Reversible mechanical unzipping of amyloid beta-fibrils*. *J Biol Chem*. 280(9):8464-70. IF 6.482.

6. Horvath, I., Harmat, V., Perczel. A., Palfi, V., Nyitray, L., Nagy, A., Hlavanda, E., Naray-Szabo, G., Ovadi, J. 2005. *The structure of the complex of calmodulin with KAR-2: a novel mode of binding explains the unique pharmacology of the drug*. *J Biol Chem*. 280(9):8266-74. IF 6.482.

7. Karsai, Á., Nagy, A., Kengyel, A., Mártonfalvi, Zs., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. 2005. *Effect of lysine-28 side chain acetylation on the nanomechanical behavior of Alzheimer amyloid β 25-35 fibrils*. *J. Chemical Information and Modeling*. **45** (6), 1641-1646, 2005 IF 3.078.

9. Karsai, Á., Mártonfalvi, Zs., Nagy, A., Grama, L., Penke, B. and Kellermayer, M.S.Z. *Mechanical manipulation of Alzheimer's amyloid β 1-42 fibrils*. *J. Struct Biol*. In the press. IF 3.092.

10.2.2. Referált folyóiratban megjelent absztraktok

1. Kellermayer, M.S.Z., Datki, Z. and Penke, B. Force-driven reversible structural transitions in amyloid fibrils. *Biophys J.* 86, 179A-180A, 2004.

2. Kiss, B. and Kellermayer, M.S.Z. Nanomechanics of desmin intermediate filaments. *Biophys J.* 86, 569A-570A, 2004.

3. Kellermayer, M.S.Z., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z. and Penke, B. Reversible unzipping of amyloid β -fibrils. *Biophys. J.* 88, 198A-199A, 2005.

4. Kellermayer, M. S., Grama, L., Karsai, Á., Nagy, A., Kahn, A., Datki, Z., Penke, B. (2005) Structural dynamics of amyloid explored by manipulating individual fibrils *FEBS Journal* 272 (s1) F2-016P.

10.2.3. Egyéb absztraktok

1. Nagy A., Kovács M., Hegyi Gy. és Nyitray L. *Miozin fehérjék diverzitásának és molekuláris biológiai tulajdonságainak vizsgálata, a Physarum polycephalum nyálkagomba nem-konvencionális miozinjainak feltérképezése.* Magyar Biokémiai Társaság Országos Konferenciája, Eger, 2000.