

PhD értekezés

**A titin óriás izomfehérje globális szerkezetének  
és rugalmasságának vizsgálata**

Gramma László

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Biofizikai Intézet

Pécs

2003

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

# Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki e munka elkészítését segítette. Elsősorban témavezetőimnek, ifj. Dr. Kellermayer Miklósnak támogatásáért, bátorításáért és a kiváló szakmai irányításért, Prof. Somogyi Bélának értékes tanácsaiért, az építő kritikákért és intézetvezetőként nyújtott támogatásáért, továbbá Nagy Attilának a titin fragmentumok létrehozásáért, a laborasszisztenseknek és kollégáknak a laborban és a laboron kívül nyújtott segítségükért, valamint kedvesemnek, Fekete Zsuzsannának türelméért és unszolásáért.

# Tartalomjegyzék

<b>Rövidítések és szimbólumok jegyzéke.....</b>	<b>6</b>
<b>1. Bevezetés és irodalmi áttekintés .....</b>	<b>8</b>
1.1. A titin-kutatás főbb állomásai .....	8
1.2. A titin elhelyezkedése a szarkomerben .....	10
1.3. A titinmolekula szerkezete .....	11
1.4. A titin funkciói .....	15
1.5. A titin rugalmasságának molekuláris alapjai .....	18
1.6. A titin rugalmasságának egyedi-molekuláris szintű vizsgálata .....	22
<b>2. Célkitűzések.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>26</b>
3.1. Fehérjetisztítás .....	26
3.2. Rekombináns titin fragmentumok előállítása .....	26
3.3. Fluoreszcens jelölés .....	27
3.4. Konfokális mikroszkópia .....	27
3.5. Kémiai denaturációs kinetika mérése egyedi molekulákon .....	28
3.6. Titinmolekulák megnyújtása .....	29
3.7. Spektrofotometria.....	30
3.8. Fluoreszcencia spektroszkópia.....	31
3.9. Egyensúlyi kémiai denaturáció .....	31
3.10. Molekulák megnyújtása erőmérő atomerő-mikroszkóppal.....	32
<b>4. Elméleti modellek és számítások .....</b>	<b>34</b>
4.1. Polimerszerkezeti számítások .....	34
4.2. Az optikai felbontóképesség hatása .....	37
4.3. Részecskék szubsztrátfelületre történő kitapadásának kinetikája.....	37
4.4. Termodinamikai stabilitási paraméterek meghatározása egyensúlyi denaturációs mérések alapján.....	38
4.5. Mechanikai stabilitási paraméterek meghatározása molekulák atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtása alapján.....	40
<b>5. Eredmények és következtetések .....</b>	<b>44</b>
5.1. Felszín-adszorbeált titinmolekulák mérete és alakja.....	44
5.2. A titin felszín-adszorpciójának kinetikája.....	46

5.3. Megnyújtott, felszín-adszorbeált titinmolekulák vizsgálata .....	48
5.4. Időben feloldott titin-nyújtás.....	53
5.5. Egyedi titinmolekulák kémiai denaturációja.....	55
5.6. Önkioltás a fluoescensen jelölt titinben .....	58
5.7. Titin globális konformációjának jellemzése rodamin dimerek segítségével .....	61
5.8. Stabilizálhatják-e a rodamin dimerek a titin szerkezetét?.....	70
5.9. Titin denaturációjának vizsgálata triptofán fluoescencia mérésekkel .....	72
5.10. Titin fragmentumok termodinamikai stabilitásának vizsgálata .....	74
5.11. Titin fragmentumok mechanikai stabilitásának vizsgálata .....	77
<b>6. Az eredmények tételes felsorolása .....</b>	<b>81</b>
<b>7. Összefoglalás és perspektívák.....</b>	<b>82</b>
<b>8. Az értekezés témakörébe tartozó saját közlemények .....</b>	<b>84</b>
8.1. Eredeti közlemények.....	84
8.2. Referált folyóiratban megjelent absztraktok .....	84
8.3. Egyéb absztraktok .....	85
<b>9. Az értekezéshez nem kapcsolódó saját közlemények .....</b>	<b>86</b>
9.1. Eredeti közlemények.....	86
9.2. Referált folyóiratban megjelent absztraktok .....	86
9.3. Egyéb absztraktok .....	86
<b>10. Hivatkozott irodalom.....</b>	<b>89</b>

# Rövidítések és szimbólumok jegyzéke

cDNS	komplementer DNS: az adott fehérje aminosav-sorrendjét kódoló mRNS-ről készített DNS másolat,
GuHCl	guanidin-hidroklorid,
Fn	fibronektin III típusú titin domén,
HCl	sósav,
I55-62	nyolc immunglobulin domén hosszúságú szakasz a titin I-szakaszának differenciálisan kifejeződő (expresszálódó) régiójából (számozás Freiburg és <i>mtsai</i> , 2000 alapján),
I91-98	nyolc immunglobulin domén hosszúságú szakasz a titin I-szakaszának konstitutívan kifejeződő régiójából,
Ig	immunglobulin típusú titin domén,
PEVK szegmens	a titin prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavakban gazdag, I-szakaszban található régiója,
SD	szórás (standard deviáció),
SEM	az átlag szórása (standard error of the mean),
TRITC	tetrametil-rodamin izotiocianát,
TMRIA	tetrametil-rodamin jóacetamid,
WLC	„féregszerű lánc” (wormlike chain),
$d_{min}$	feloldóképesség: az optikai eszköz (mikroszkóp) által felbontható tárgyponatok közötti legkisebb távolság,
$D$	diffúziós állandó,
$F$	erő,
$\Delta G$	denaturációhoz tartozó szabadentalpia változás,
$\Delta G_{H_2O}$	zérus denaturáns koncentrációhoz tartozó denaturációs szabadentalpia változás,
$\eta$	az adott közeg viszkozitása,
$k_d$	kitekeredési sebességi állandó,
$k_0$	zérus erőhöz tartozó kitekeredési sebességi állandó,
$k$	Boltzmann-állandó ( $k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K),
$\kappa$	rugóállandó,
$L$	kontúrhossz: a teljesen kinyújtott polimer hossza,
$\lambda$	hullámhossz,

$\lambda_{ex}$	gerjesztési hullámhossz,
$\lambda_{em}$	emissziós hullámhossz,
$\lambda_{max}$	maximális intenzitáshoz tartozó hullámhossz,
$N_A$	az Avogadro-féle szám ( $N_A = 6,023 \cdot 10^{23}$ ),
$n_F(t)$	egységnyi felületre ( $1 \text{ cm}^2$ ) kitapadt részecskék száma,
$n_0$	az oldat koncentrációja a $t = 0$ időpillanatban,
$OD_\lambda$	$\lambda$ hullámhosszhoz tartozó abszorbancia (optikai sűrűség vagy optikai denzitás),
$P$	perzisztenciahossz: egy polimer hajlítómerevségét jellemző hosszúság,
$r$	korrelációs együttható: két valószínűségi változó közötti kapcsolat szorosságát kifejező paraméter,
$R$	univerzális gázállandó ( $1,9872 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$ ),
$R_v$	egy polimerlánc végpontjai közötti távolság,
$\langle R_v^2 \rangle$	a végpontok közötti távolság négyzetének átlaga,
$R_G$	girációs sugár: egy polimerlánc pontjainak a tömegközépponttól mért átlagos távolsága,
$\langle R_G^2 \rangle$	a girációs sugár négyzetének átlaga,
$T$	abszolút hőmérséklet,
$\Delta x$	a mechanikai denaturáció kétállapotú modelljében az átmeneti állapot és a natív állapot közötti távolság az $x$ reakciókoordinátán.

# 1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

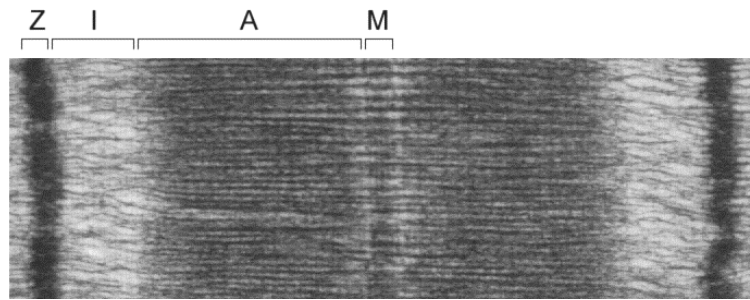
A harántcsíkolt izommal kapcsolatos kutatások jelentős része az aktív összehúzódás mechanizmusát kutatja. Az aktív kontrakció képességén túl azonban a harántcsíkolt izom igen fontos tulajdonsága, hogy rugalmas. Az izomrostok eredeti hosszuk több mint kétszeresére nyújthatók anélkül, hogy a szarkomerben 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 izom passzív rugalmasságáért nem a vékony (aktin) vagy a vastag (miozin) filamentum, hanem egy harmadik filamentumrendszer felelős, amelyet a titin (más néven connectin) nevű fehérje alkot.

## 1.1. A titin-kutatás főbb állomásai

A harmadik filamentális rendszer (**1. ábra**) létét már Huxley is feltételezte az izom-összehúzódás csúszó-filamentum elméletét leíró munkájában (Huxley és Hanson, 1954), hogy megmagyarázza a miozin-mentes miofibrillumok folytonosságát. Létezésére számos megfigyelés utalt (áttekintő leírás Maruyama, 1986 munkájában). Íme két példa: (1) Sjöstrand túlnyújtott szarkomerekről készült elektronmikroszkópos felvételeken igen vékony filamentumokat figyelt meg a miozin és aktin filamentumok közötti résben („gap filaments”, Sjöstrand, 1962), illetve (2) magyar eredményként Guba Ferenc és *mtsai* írták le a miozin, tropomiozin és aktin eltávolítását követően visszamaradó filamentumokat, amelyek alkotófehérjéjét fibrillinnek nevezték el (Guba és *mtsai*, 1968). Egy harmadik filamentumrendszert egyes rovarok repülőizmában is megfigyeltek (összekötő filamentumok („connecting filaments”), Trombitás és Tigyi-Sebes, 1974). Amint később kiderült, az összekötő filamentumok fő alkotója nem a titin, hanem a projectin nevű fehérje (Saide, 1981).





**1. ábra.** Nyúl vázizom szarkomerről az aktin filamentumok szelektív eltávolítása után készült elektronmikroszkópos felvétel. A miozin filamentumok (A-szakasz), a Z-csík (Z) és az M-csík (M) ép maradt. Az aktin-mentes I-szakaszban (I) megfigyelhetők a rugalmas filamentumok (Funatsu és *mtsai*, 1993).

A connectin fehérjét először 1977-ben izolálta és írta le Koscak Maruyama (Maruyama és *mtsai*, 1977). Tőle függetlenül Kuan Wang is felfedezett egy nagyméretű izomfehérjét a harántcsíkolt izmot alkotó fehérjék elektroforézises analízise során (Wang és *mtsai*, 1979), amelyet óriási (titáni) mérete miatt titinnek nevezett el. Maruyama hamarosan kimutatta, hogy a Wang által felfedezett titin azonos a connectinnel (Maruyama és *mtsai*, 1981). Egy ideig még a fehérje mindkét neve használatban maradt, ma már azonban szinte kizárólag a titin megnevezést használják (Maruyama, 2002). Figyelembe véve, hogy a titin az izomban az aktin és a miozin után a harmadik legnagyobb tömegarányú fehérje (az izom teljes fehérjemennyiségének mintegy 10%-a), meglepő, hogy ilyen későn fedezték fel. Ennek fő oka az volt, hogy hatalmas mérete miatt a titin a hagyományos, 6-15% akrilamidot tartalmazó gélekbe szinte egyáltalán nem lép be, kimutatásához speciális, kb. 2%-os gélek szükségesek.

Izolált titinmolekulákról készült elektronmikroszkópos képeken a titin fonalszerű képet mutatott (Trinick és *mtsai*, 1984; Nave és *mtsai*, 1989). Szarkomerbeli lokalizációját 1988-ban térképezték fel immunelektron-mikroszkópia segítségével (Fürst és *mtsai*, 1988), Horowitz és *mtsai* pedig igazolták, hogy a titin fontos szerepet játszik a passzív izomerő kialakításában és az A-szakasz centrálásában (Horowitz és *mtsai*, 1986). Funatsu és *mtsai* később a korábbiaknál részletesebb elektronmikroszkópos képek alapján elemezték a rugalmas filamentumok szerkezetét (Funatsu és *mtsai*, 1993), valamint titin-ellenes antitestekkel történő jelölés segítségével igazolták, hogy azokat főleg titin alkotja.

A titinnel kapcsolatos kutatásokban mérföldkőnek számít Siegfried Labeit és Bernhard Kolmerer munkája, amelyben meghatározták a titin cDNS szekvenciáját és

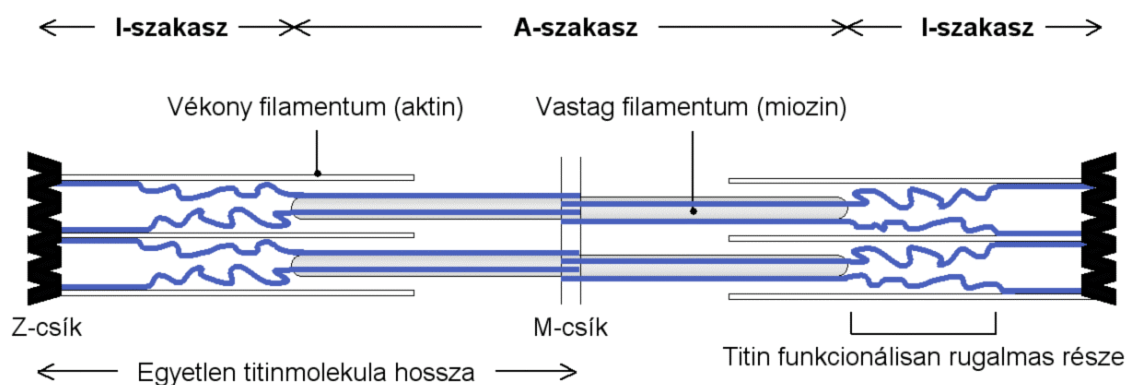
ezen keresztül a fehérje aminosav-sorrendjét (Labeit és Kolmerer, 1995). A szekvencia alapján már korábban megjósolható volt, hogy a molekula mintegy 90%-a immunglobulin és fibronektin-szerű modulok (domének) sorozatából áll (Labeit és *mtsai*, 1990), amelyek közül egyesek térszerkezetét utóbb meghatározták (Improta és *mtsai*, 1996; Muhle-Goll és *mtsai*, 1998). Később egy átfogó munkában leírták, hogyan expresszálódhat különböző izmokban számos, különböző hosszal, felépítéssel és rugalmas tulajdonsággal rendelkező titin izoforma egyetlen titin gén segítségével (Freiburg és *mtsai*, 2000).

Egyazon évben, gyakorlatilag két napon belül látott napvilágot három úttörő jelentőségű munka, amelyekben a titin rugalmasságát modern technikák (lézercsipesz és atomerő-mikroszkóp) segítségével egyedi-molekuláris szinten vizsgálták (Tskhovrebova és *mtsai*, 1997; Rief és *mtsai*, 1997; Kellermayer és *mtsai*, 1997). Ezek számos további, a rugalmasság molekuláris hátterét vizsgáló munka alapjául szolgáltak.

A jelenlegi kép alapján a titin egy multifunkcionális, valószínűleg szabályozható rugó, amely a passzív rugalmasság biztosítása mellett számos további funkcióval is rendelkezik (ld. 1.4. szakasz) (Granzier és Labeit, 2002).

## 1.2. A titin elhelyezkedése a szarkomerben

Egy tíz, különböző monoklonális titin-ellenes ellenanyaggal történő immun-elektronmikroszkópos vizsgálat során kimutatták, hogy a titin áthidalja a szarkomer hosszának felét, a Z-csíktól egészen az M-csíkgig (2. ábra, Füst és *mtsai*, 1988).



2. ábra. A titinmolekula (kék) elhelyezkedése a szarkomerben.

A titin N-terminális végének egy kb. 80 kDa tömegű szakasza (vagy az izoformától függően annál kisebb) a Z-csíkból található, végighúzódnak a teljes Z-csík mentén, így a

szomszédos szarkomerekbe benyúló titinmolekulák ezen szakaszai a Z-csík mentén teljesen átfednek. Ezen szakaszban a titin kölcsönhat a telethonin (másik nevén titin-sapka, vagy T-cap), valamint az  $\alpha$ -aktinin fehérjékkel. A kölcsönhatások pontos szerepe még nem tisztázott, de valószínű, hogy a titin N-terminális részének Z-csíkban történő rögzítésével illetve keresztkötésével kapcsolatos (Gregorio és *mtsai*, 1999).

Ugyancsak átfednek a szomszédos fél-szarkomerekbe benyúló titinmolekulák C-terminális szakaszai az M-csíkban (Gregorio és *mtsai*, 1999).

Az A-szakaszban található a titin C-terminális részéből egy kb. 2 MDa nagyságú rész. Ezen szakaszban a titin a vastag filamentum részét képezi: becslések szerint minden egyes vastag filamentum-félhez hat titinmolekula kapcsolódik (Liversage és *mtsai*, 2001; Cazorla és *mtsai*, 2000).

Az I-szakaszban, az adott izoformától függően, a titinnek egy kb. 800 kDa és 1,5 MDa közötti tömegű része található, amely rugalmas kapcsolatot létesít a vastag filamentum vége és a Z-csík között. A titin elrendeződése ebben a szakaszban összetett (Tskhovrebova és Trinick, 2000). Három zóna különböztető meg: (1) a vastag filamentum végétől számítva, egy kb. 0,1  $\mu\text{m}$  hosszú szakaszon a titinmolekulák hosszuk mentén több molekulából felépülő kötegekké („end filament”) kapcsolódnak össze (Trinick, 1981), (2) a Z-csík közepétől számított, kb. 0,1  $\mu\text{m}$ -es szakaszon a titinmolekulák a vékony filamentumokhoz kapcsolódnak (Trombitás és *mtsai*, 1997; Linke és *mtsai*, 1997), (3) a két szakasz között pedig a kötegek különálló molekulákká, vagy vékonyabb asszociátumokra válnak szét (Funatsu és *mtsai*, 1993).

### 1.3. A titinmolekula szerkezete

#### *Elsődleges szerkezet*

A titin a ma ismert legnagyobb polipeptid: vázizomban kifejeződő (expresszáldó) legnagyobb molekulatömegű változata 3 700 kDa molekulatömegű, és közel 27 000 aminosav hosszúságú.

#### *Másodlagos szerkezet*

Labeit és *mtsai* a titint kódoló cDNS vizsgálata során kimutatták, hogy a szekvenciában két különböző típusú, 90-100 aminosav hosszúságú mintázat többszöri ismétlődése figyelhető meg (Labeit és *mtsai*, 1990). A szekvencia-homológia alapján az első típust előbb a C2- (Labeit és Kolmerer, 1995), később az I-típusú (Kenny és *mtsai*, 1999) immunglobulin (Ig), a második típust pedig a fibronectin III típusú (Fn) domének

szupercsaládjába sorolták (Labeit és Kolmerer, 1995). A vázizom titin 132 fibronektin és 166 immunglobulin sorozatot tartalmaz, amelyek együtt a titin tömegének több mint 90%-át teszik ki.

A titin I-szakaszbeli, A-szakaszbeli és M-csíkbeli részéből kiválasztott Ig és Fn szakaszok térszerkezetének vizsgálata alapján kiderült, hogy ezek mindegyike stabil globuláris doméneket alkot, amelyek hét antiparallel béta-lemezből állnak (**3. ábra**) (Muhle-Goll és *mtsai*, 1998; Improta és *mtsai*, 1996 és további referenciák ezeken belül).



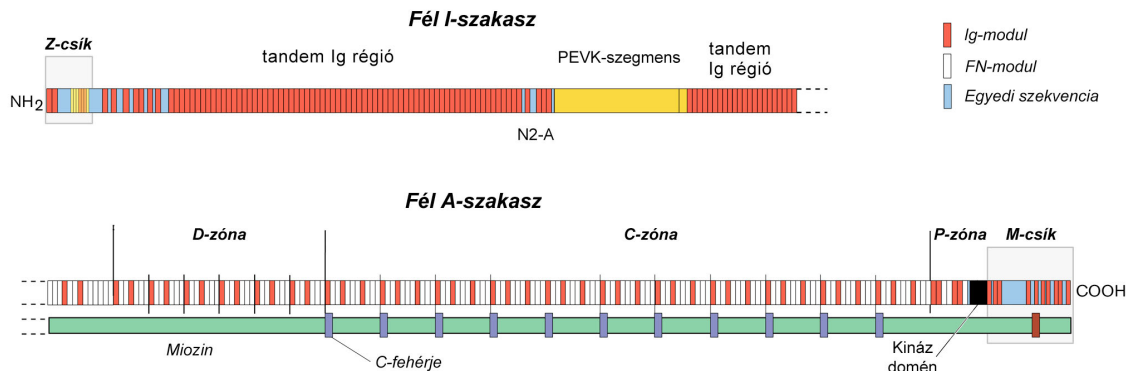
**3. ábra.** A titin egy-egy jellemző immunglobulin (I27, kék) és fibronektin típusú doménjének (A71, narancssárga) szalagmodellje (Improta és *mtsai*, 1996; Muhle-Goll és *mtsai*, 1998) (Forrás: Protein Data Bank, 1TIT és 1BPV kódszámú struktúra).

Az immunglobulin és fibronektin típusú domének esetén a C- és N-terminálisok a globuláris szerkezet ellentétes végein találhatóak, elősegítve ezáltal az egymástól függetlenül „feltekeredő” domének sorbakapcsolódását.

A titin tömegének a doméneken kívül fennmaradó, mintegy 8-10%-át egyedi szekvenciák teszik ki. 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 feltételezték (Labeit és Kolmerer, 1995), hogy a PEVK szegmens nagyfokú töltött-aminosav tartalma megakadályozza stabil háromdimenziós szerkezet kialakulását, így a PEVK szakasz úgy viselkedhet, mint egy laza rugó. Az, hogy a PEVK szakasz rugalmassága jól leírható volt az entrópikus polimerlánc modellel (ld. 4.1. szakasz) ugyancsak arra utal, hogy a PEVK szakasz denaturált polipeptidként viselkedik (Trombitás és *mtsai*, 1998b). Újabb vizsgálatok arra utalnak, hogy II típusú poliprolin hélixek kialakulhatnak a PEVK szakaszon belül (Gutierrez-Cruz és *mtsai*, 2001; Ma és *mtsai*, 2001).

### Harmadlagos szerkezet

Harmadlagos szerkezet alatt esetünkben a titin domének és az egyedi szekvenciák sorozatát, sorrendjét értjük, amelyet vázizom titin esetén a **4. ábra** mutat. A vázizom titint ezek alapján mintegy 300 globuláris domén lineáris sorozataként képzelhetjük el, amelyeket helyenként egyedi szekvenciák szakítanak meg.

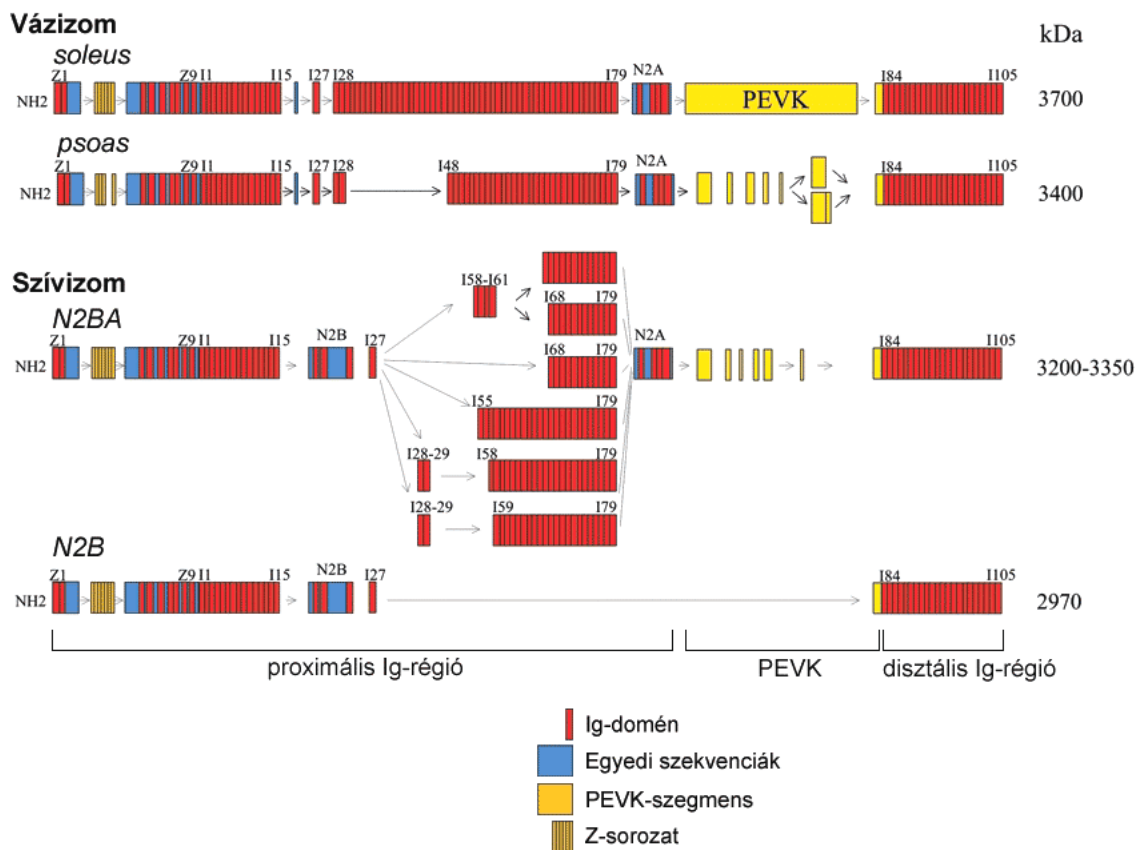


**4. ábra.** A vázizom titin filamentum molekuláris szerkezete (Gregorio és *mtsai*, 1999 alapján).

A titint egyetlen gén kódolja, amely 363 exont tartalmaz, és összesen 38 138 aminosavat kódol (Bang és *mtsai*, 2001). Ugyanazon gén segítségével, alternatív mRNS kivágás-összeillesztés (splicing) révén különböző típusú harántcsíkolt izmokban különböző nagyságú és szerkezetű titin izoformák fejeződnek ki, amelyek molekulatömege 3,0 és 3,7 MDa között változik (Freiburg és *mtsai*, 2000). Az egyes izoformák kifejezésének molekuláris alapját jelentő alternatív splicing során a sejt csak a kifejezni kívánt izoformát kódoló exonokat fűzi egybe, mintegy „átugorva” a fölösleges exonokat.

A titin A-szakaszbeli része minden izoformában azonos, és rendkívül szabályos felépítésű. Az A-szakasz végéhez közel található D (disztális) zóna egy 7 domén hosszúságú mintázat (Ig-Fn-Fn-Ig-Fn-Fn-Fn) hatszori ismétlődéséből áll. Az ezt követő C (C-fehérjét kötő) zónát egy tizenegyszer ismétlődő, 11 domén hosszúságú sorozat (Ig-Fn-Fn-Ig-Fn-Fn-Fn-Ig-Fn-Fn-Fn super-sorozat (super-repeat)) alkotja. A kevésbé szabályos P (proximális) zóna kapcsolja a titint az M-csíkhöz, valamint ezen a részen található a titin kináz doménje (**4. ábra**). A titin A-szakaszának rendezett szerkezete vetette fel azt a lehetőséget, hogy ez a szakasz molekuláris sablonként segíti a vastag filamentum felépülését.

A titin I-szakaszbeli része izomtípustól függően igen különböző lehet. Ez a rész három régióra osztható: a Z-csíktól távolabb eső (disztális) tandem Ig szegmensre, a Z-csíkhöz közelebbi (proximális) Ig-régióra, és az e kettő által közrefogott, egyedi szekvenciákból felépülő szakaszra (**4. ábra**). Ez utóbbi tovább osztható az Ig-domének és egyedi szekvenciák váltakozó sorozatából felépülő N2 régióra, valamint a már említett PEVK szegmensre. Míg a disztális tandem Ig régió konstitutívan fejeződik ki, azaz az egyes izoformákon belül azonos, a differenciálisan kifejeződő proximális Ig-régió és a PEVK szakasz hossza izoformánként változó (**5. ábra**) (Freiburg és *mtsai*, 2000; Labeit és Kolmerer, 1995). Az **5. ábra** néhány, alternatív splicing révén kifejeződő titin izoforma I-szakaszbeli régiójának moduláris szerkezetét mutatja.

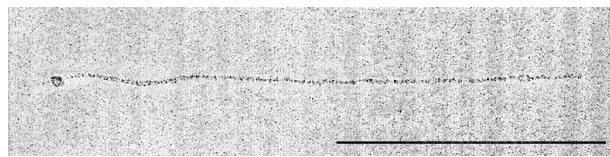


**5. ábra.** A titin I-szakaszbeli régiójának sokfélesége különböző harántcsíktolt izmokban: vázizomban és szívizomban kifejeződő izoformák domén-szerkezetét bemutató példák. Jobb oldalon az egyes titin izoformák molekulatömegei szerepelnek (Granzier és Labeit, 2002 nyomán).

A különbségek jelentősek lehetnek: vázizomban például 53 Ig doménnel több alkotja a proximális Ig-régiót, mint szívizomban, a PEVK szekvencia pedig 2174 aminosav hosszúságú, szemben a szívizomban található 163 aminosav hosszúságú szakasszal

(**5. ábra**). 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. A különbségek összhangban vannak az egyes izom-típusok szerkezeti és rugalmas tulajdonságaival, hangsúlyozva a fehérje szerkezeti és rugalmas szerepét (Freiburg és *mtsai*, 2000).

A feltérképezett molekuláris szerkezettel összhangban, elektronmikroszkópos felvételeken a kinyújtott titinmolekula fonalszerű képet mutat (Nave és *mtsai*, 1989), amelynek hossza 1  $\mu\text{m}$  körüli, átmérője kb. 4 nm (**6. ábra**). A molekula egyik végén egy globuláris fej látható, amely *in situ* az M-csíkban foglal helyet.



**6. ábra.** Folyadékáramlással megnyújtott titinmolekuláról készült elektronmikroszkópos felvétel (Trinick, 1994). A skálaszakasz hossza 0,5  $\mu\text{m}$ .

A szekvencia alapján jóslott multidomén felépítés összhangban áll az elektronmikroszkópos felvételeken megfigyelt, kb. 4 nm-es periodicitású gyöngyfűzér-szerű szerkezettel (Trinick és *mtsai*, 1984), mivel az egyes domének hosszúsága közel 4 nm.

A titinmolekula láncszerű volta, és a domének közötti flexibilis csatolás miatt a titin egy rugalmas polimerláncként fogható fel. A titinmolekula globális alakja, azaz a lánc háromdimenziós szerkezete a molekula rugalmassága és a rá ható erők függvénye. Ezen alak vizsgálata jelen értekezés egyik célja.

#### 1.4. A titin funkciói

A szarkomerben való elhelyezkedés alapján a titint A-szakaszbeli és I-szakaszbeli részre osztottuk fel. Ez a két rész nemcsak szerkezetét, hanem szerepét tekintve is különbözik egymástól.

A titin egyik fő szerepe az izom passzív rugalmasságának biztosítása. Ennek egyik első bizonyítékeként kimutatták, hogy a titin ionizáló sugárzással történő degradációja nyomán az izomrostokban fellépő passzív feszültség jelentősen csökkent (Horowitz és *mtsai*, 1986). Ugyanakkor a titin biztosítja az A-szakasz centrális helyzetét az izomösszehúzódás során, valamint a szomszédos szarkomerek egyenletes megnyúlását vagy összehúzódását (Horowitz és Podolsky, 1987).

A titin rugalmas viselkedéséért a molekula I-szakaszbeli része a felelős. Mivel a Z-csíkhöz közel egy kb. 0,1  $\mu\text{m}$ -es szakaszon a titinmolekulák a vékony filamentumokhoz kapcsolódnak (Trombitás és *mtsai*, 1997; Linke és *mtsai*, 1997), valójában csak a titin I-szakaszbeli részének fennmaradó része megnyújtható (**2. ábra**). Ez a szakasz a különböző izoformák esetén különböző hosszúságú és különböző elemekből áll (**5. ábra**), így elvileg lehetőséget adhat a rugalmasság modulálására (Labeit és Kolmerer, 1995; Freiburg és *mtsai*, 2000).

Valóban kimutatták, hogy az adott izom passzív rugalmassága összefüggésben van a titin I-szakaszának hosszával és nyújthatóságával (Trombitás és *mtsai*, 2000). Szívizomban két titin izoforma expresszálódik: az N2B szekvenciát tartalmazó N2B titin és az N2A és N2B szekvenciákat egyaránt tartalmazó N2BA titin (**5. ábra**) (Labeit és Kolmerer, 1995). A két izoforma az egyes szarkomerekben együtt van jelen, arányuk azonban különbözhet. A túlnyomórészt N2B izoformát expresszáló izomsejtek passzív rugalmassága kisebb, mint a túlnyomórészt N2BA titint expresszáló sejteké (Trombitás és *mtsai*, 2000). A kisebb passzív rugalmasság (a megnyújtással szembeni nagyobb ellenállás) oka valószínűleg az, hogy az N2B titin esetén az I-szakaszbeli rész rövidebb, így ennek relatív megnyúlása (a végpontok közötti távolság és a szakasz kontúrhosszáinak aránya) nagyobb, mint N2BA titin esetén. A két izoforma aránya különbözik az egyes emlős fajok esetén, különböző lehet a szívizom különböző területein, de újabb adatok szerint az expresszált titin izoformák aránya időben is megváltozhat. Különböző emlős fajok esetén a két izoforma aránya az N2B izoforma túlsúlya (kisrágcsálók) és az N2BA izoforma túlsúlya (szarvasmarha pitvar) között változik (Cazorla és *mtsai*, 2000), összhangban azzal, hogy a kisrágcsálók szívizmában ugyanolyan szarkomerhossz mellett nagyobb passzív izomerő fejlődik (Cazorla és *mtsai*, 2000). Patológiai körülmények között kimutatták a szívizomban expresszált titin izoformák arányának időbeni változását, bár a változás irányát illetően látszólag ellentmondó eredmények születtek (Hein és *mtsai*, 2002; Wu és *mtsai*, 2002; Neagoe és *mtsai*, 2002).

A titin A-szakaszban található része fiziológiai körülmények között nyújthatatlan, mert összekapcsolódik a vastag filamentummal (Whiting és *mtsai*, 1989). A titin ezen részét felépítő immunglobulin és fibronektin típusú domének sorozatában szabályos ismétlődések figyelhetők meg, amelyek által ez a szakasz valószínűleg periodikusan elhelyezkedő kötőhelyeket biztosít a miozin és más A-szakaszbeli fehérjék számára (Trinick, 1994; Gregorio és *mtsai*, 1999). Az itt megfigyelhető 11 domén hosszúságú



mintázat 43 nm-enként ismétlődik, a vastag filamentumon belül pedig az egymástól 14,3 nm-re elhelyezkedő miozinféjek egy olyan helikális struktúrát alkotnak, amelynek egy „menete” szintén 43 nm hosszú. Ezen felül, az A-szakaszban ugyancsak 43 nm periodicitással elhelyezkedő fehérjéket figyeltek meg (pl. C-fehérje). Mindez arra utal, hogy az A-szakaszban a titin egyfajta sablonként szolgálhat a vastag filamentum szabályos szerkezetének kialakulásához.

Valószínű, hogy a titin Z-csíkbeli szakaszának szerepe van a Z-csík szerkezetének kialakításában (Trinick és Tskhovrebova, 1999; Gregorio és *mtsai*, 1999). A titin ezen részében 45 aminosav hosszúságú motívumok (Z-sorozat) ismétlődnek, amelyek kötődnek az  $\alpha$ -aktininhez, és titin izoformánként változó számuk közelítőleg összhangban van a Z-csík vastagságával. A Z-csík vastagsága ugyanis izom-típusonként változik: gyors izmokban jellemzően keskeny, lassú izmokban pedig széles Z-csíkok jelennek meg, feltehetően a nagyobb szilárdság biztosítása érdekében.

Feltételezték, hogy a miofibrillum kialakulásakor léteznie kell a szarkomer egy tervrajzának, egy molekuláris sablonnak, amely meghatározza az egyes fehérjék pontos helyzetét a miofibrillumban. A titin filamentum a legesélyesebb jelölt erre a szerepre, több okból kifolyólag: (1) a titin egyike a fejlődő szarkomerbe beépülő első fehérjéknek, (2) kölcsönhat számos vastag és vékony filamentumban található fehérjével, (3) számos különféle izoforma alakjában expresszálódhat, különböző Z- és M-csíkbeli illetve I-szakaszbeli régiókkal, így különböző ultrastruktúrájú és rugalmas tulajdonságokkal rendelkező szarkomerek kialakulásának alapjául szolgálhat (Gregorio és Antin, 2000; Gregorio és *mtsai*, 1999). Az egyik ezzel kapcsolatos rejtély az, hogy hogyan maradhat a rugalmas titinmolekula kinyújtott állapotban, hogy elláthassa sablon szerepét.

A titin rugó és sablon funkcióján túl, az utóbbi időben újabb, néha meglepő jellegzetességeire is fény derült. A titin tartalmaz egy kináz domént, amely hasonló ugyan a miozin könnyű lánc kinázhoz, célfehérjéje azonban a telethonin (T-cap) (Mayans és *mtsai*, 1998). Meglepő módon, a T-cap a Z-csíkban található, közel 1  $\mu\text{m}$ -re az M-csík mellett található titin kináz doméntól, ami felveti a kérdést, hogyan találkozik az enzim a szubsztrátjával? A valószínű válasz az, hogy a két fehérje csak fejlődő miocitákban találkozik, ahol a miofibrillumok kialakulásának korai szakaszában a titin C-terminális része és a T-cap kolokalizációját figyelték meg. A két fehérje kölcsönhatása szükséges a szarkomer kialakulásához (Gregorio és *mtsai*, 1999).

A szívizomban a titin valószínűleg képes az aktomiozin kölcsönhatás szabályozására, a miozinefejek és az aktin filamentum közötti távolság megváltoztatásán keresztül (Granzier és Labeit, 2002). Továbbá, a titin újabb ligandjainak azonosítása arra utal, hogy a titin membrán ioncsatornákkal, fehérje kicserélődéssel és génexpresszió szabályozással is kapcsolatban van (Granzier és Labeit, 2002). Váratlan felfedezés volt a titin kromoszómákban való jelenlétének kimutatása (Machado és *mtsai*, 1998). Feltételezések szerint funkciója itt, az izomhoz hasonlóan, a kromoszómák szerkezetének meghatározása és rugalmasságuk biztosítása.

### 1.5. A titin rugalmasságának molekuláris alapjai

A titin egy különlegesen fontos tulajdonsága, hogy képes molekuláris rugóként működni, rugalmasságot biztosítva a szarkomer számára. Bár a titinmolekulák áthidalják a Z- és M-csík közötti távolságot, azaz a szarkomer hosszának felét, a titinnek csak az I-szakaszban húzódó része rugalmas. Ez a szakasz, amint azt Labeit és Kolmerer kimutatták (Labeit és Kolmerer, 1995), három fő struktúrális részből épül fel: egy egyedi szekvenciák alkotta részből, amelyek közül a legjelentősebb a nevét alkotó aminosavakban gazdag, ún. PEVK szekvencia, és az ezt két oldalról szegélyező, proximális és disztális tandem Ig régióból. Az egyedi szekvenciák és a proximális tandem Ig régió izom-specifikus változatok formájában expresszálódik (**5. ábra**).

Labeit és Kolmerer szerint a tandem Ig szakaszok merev komponensek, mivel az Ig modulok termodinamikailag stabil doméneket alkotnak (Politou és *mtsai*, 1995), a PEVK szakasz viszont egy lazább rugóként működhet, mivel a szekvencia alapján feltehetően nem rendelkezik stabil háromdimenziós szerkezettel. A PEVK szakasz felfedezése előtt ezzel szemben azt feltételezték, hogy a titin rugalmasságának alapja az Ig-domének reverzibilis kitekeredése (Erickson, 1994).

Trombitás és *mtsai* (Trombitás és *mtsai*, 1995) valamint Granzier és *mtsai* (Granzier és *mtsai*, 1996) megfigyelései szerint a nyugalmi állapotban található szívizom szarkomerekben a titin rugalmas szakasza nem kinyújtott, hanem összetekeredett állapotban van. Épp ezért feltételezték, hogy a titin rugalmassága entrópiikus eredetű (ld. később), és a titin I-szakaszának „kiegyenesedése” révén alakul ki.

Miután a teljes titin szekvencia hozzáférhetővé vált, Gautel és Goulding (Gautel és Goulding, 1996) valamint Linke és *mtsai* (Linke és *mtsai*, 1996) szekvencia-specifikus ellenanyagok segítségével vizsgálták a titin relatív nyújthatóságát. Eredményeik alapján

a szarkomer kisebb mértékű megnyúlása esetén leginkább a PEVK szakasz N-terminális felőli oldalán található Ig szegmens nyúlt meg, nem pedig a PEVK szakasz, amint azt Labeit és Kolmerer feltételezték (Labeit és Kolmerer, 1995). Ezek szerint a tandem Ig szakaszok volnának a viszonylag lazább rugalmasságú elemek, amelyek kisebb erők esetén, még a PEVK szakasz megnyúlása előtt kiegyenesednek, a domének kitekeredése pedig extrém nyújtás esetén, nagyobb erőknél játszik szerepet.

Néhány éve a vizsgálatok technikai repertoárja egyedi-molekula manipulációs módszerekkel bővült: 1997-ben három olyan munka is született, amelyben lézercsipesz vagy atomerő-mikroszkóp segítségével egyedi titinmolekulák rugalmasságát vizsgálták (Kellermayer és *mtsai*, 1997; Rief és *mtsai*, 1997; Tskhovrebova és *mtsai*, 1997). A munkák alapján levont fő következtetés az volt, hogy a titin rugalmassága (erő-megnyúlás függvénye) nemlineáris, és a titin entrópikus polimerlánc viselkedésével magyarázható. Egy entrópikus polimerlánc termikus eredetű hajlító hatások eredményeként csökkenteni igyekszik a végpontjai közötti távolságot, azaz ha hajlítómerevsége elegendően kicsi, mintegy összegombolyodik. Egy ilyen lánc kinyújtása csökkenti a lánc szerkezeti rendezetlenségét (entrópiáját), tehát munkát igényel. Az egyedi molekulák esetén mért erő-megnyúlás görbék az entrópikus elaszticitást leíró, ún. „féregszerű lánc” (ld. 4.1. szakasz) modellel jól illeszthetőek voltak. A „féregszerű lánc” (wormlike chain, WLC) modell a láncot egy deformálható rúdnak tekinti, amelynek 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.

Az egyedi-molekula kísérletek eredményei ugyanakkor arra is utaltak, hogy a titin tartalmaz egy eleve kitekeredett szegmenst, amely, figyelembe véve, hogy a PEVK szakasz egy denaturált polipeptid tulajdonságaival rendelkezik (Labeit és Kolmerer, 1995), valószínűleg a PEVK szegmenssel azonos (Kellermayer és *mtsai*, 1997). Ez a következtetés egybehangzik azzal, hogy felületi feszültségi erővel megnyújtott titinmolekulák elektronmikroszkópos képén a láncot adott helyen egy, a láncnál sokkal vékonyabb, egyes esetekben nehezen észrevehető fonál szakítja meg (Tskhovrebova és Trinick, 1997).

A mérések kimutatták, hogy az Ig domének képesek a kitekeredésre, amennyiben az alkalmazott erők meghaladják a 20-40 pN küszöbértéket. A kitekeredési erő a nyújtási sebességgel nő. A küszöbérték feletti erők alkalmazásakor a natív, ~ 4 nm hosszú

domének (**4. ábra**) 20-25 nm-es hosszúságúra bomlanak ki. További fontos tapasztalat, hogy a visszaeresztés során a kitekeredett domének nem tekerednek vissza azonnal, hanem csak akkor, ha az erő egy megfelelően alacsony értékre csökkent. A nyújtási és visszaeresztési görbe nem fedi egymást (a görbében hiszterézis jelentkezik), tehát a ciklus irreverzibilis. A hiszterézis jellemző egyedi vázizom rostok passzív erő-megnyúlás görbéire is (Granzier és Wang, 1993b), sőt, az egyedi titinmolekulára kapott, arányosan megnövelt erőgörbe ezzel a görbével igen jó egyezést mutat (Kellermayer és *mtsai*, 1997). Ez azt is alátámasztja, hogy a titin a passzív izomerő fő meghatározója.

Új, független kísérletek ezek után az entrópikus polimer modell felhasználásával próbálták modellezni a titin *in situ* rugalmasságát. Ezen kísérletek során immun-elektronmikroszkópia segítségével a tandem Ig szakaszok és a PEVK nyújthatóságát vizsgálták *in situ* humán soleus (Trombitás és *mtsai*, 1998b) és patkány psoas izomban (Linke és *mtsai*, 1998b; Linke és *mtsai*, 1998a). A vizsgálatok azt mutatták, hogy a natív (nem kitekeredett) Ig-domének alkotta lánc entrópikus rugóként viselkedik. Mindazonáltal, a tandem Ig szakasz önmagában nem magyarázza meg a megfigyelt rugalmasságot, mivel nagyobb erők és a szarkomer nagyobb relatív megnyúlása esetén a PEVK szakasz megnyúlása a jelentős.

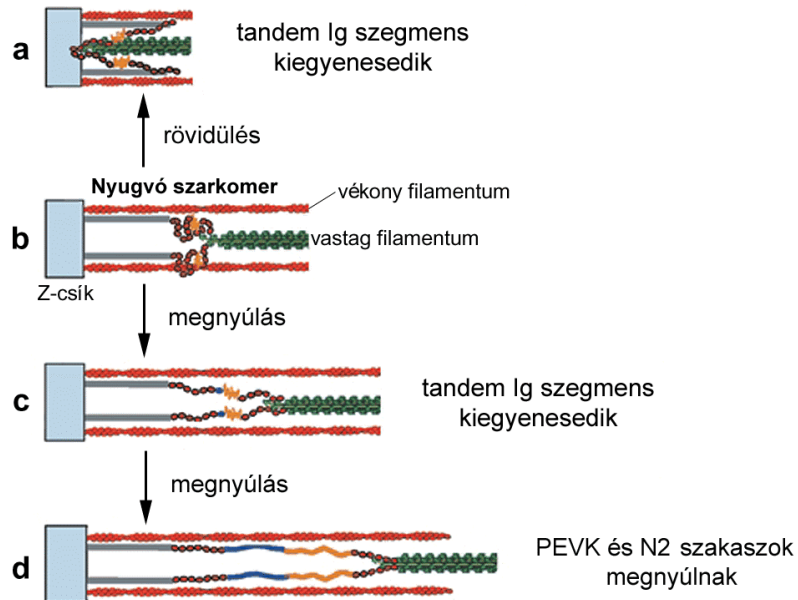
A PEVK szakasz rugalmasságának természete még nem egészen ismert. Trombitás és *mtsai* (Trombitás és *mtsai*, 1998b) szerint a PEVK *in situ* megfigyelt rugalmasságáért tisztán entrópikus mechanizmus felelős, mivel a humán soleus izomban mért PEVK-megnyúlási görbék jól illeszthetők a standard WLC-moddal. A szerzők következtetése az, hogy a PEVK egy kitekeredett polipeptid tulajdonságaival rendelkezik, amely egy viszonylag merev rugóként viselkedik. Linke és *mtsai* (Linke és *mtsai*, 1998a) ezzel szemben azt találták, hogy az entrópikus elaszticitási modell csak kis és közepes szarkomer megnyúlás esetén működik jól, nagyobb mértékű megnyúlás esetén entalpiikus tényezőket is figyelembe kell venni. Entalpiikus rugalmasság-komponensek a PEVK szakaszon belüli elektrosztatikus vagy hidrofób kölcsönhatások eredményeképpen jelenhetnek meg, amit alátámaszt például az, hogy az izomrostok titin-alapú rugalmassága az ionerősség függvénye (Linke és *mtsai*, 1998a).

Az eddigi kutatások alapján bizonyosnak tűnik, hogy a vázizom fiziológiás működési tartományán belül az Ig-domének nem tekerednek ki. Így, az Ig-domének kitekeredése itt nem jelentheti a titin rugalmasságának alapját. Mindazonáltal, a kitekeredés releváns lehet pathofiziológiás állapotokban (a vázizom túlnyúlása) és a szívizomban (Granzier

és *mtsai*, 1997), amely a vázizomhoz képest sokkal rövidebb titin I-szakaszt tartalmaz (Labeit és Kolmerer, 1995).

Összefoglalva:

(1) A laza, nem megnyújtott szarkomerben a tandem Ig szakaszok összetekeredett állapotban vannak jelen (**7b. ábra**).



**7. ábra.** A nyugalmi hosszhoz képest megrövidült szívizom szarkomer esetén (**a**) a titin rugalmas szakaszai ellenkező irányban nyúlnak meg, mint a szarkomer megnyújtása esetén. A nyugvó szarkomerben (**b**) a megnyújtható régiók összehúzódtott állapotban vannak. A szarkomer megnyúlása során előbb a tandem Ig szakaszok (vörös) (**c**), majd további nyújtás esetén a PEVK (sárga) és (szívizom esetén) az N2 egyedi szekvenciák (kék) megnyúlása dominál (**d**). A szürke szakasz a titin vékony filamentumhoz kötött, nyújthatatlan részét jelöli (Granzier és Labeit, 2002 nyomán).

(2) Kisebb mértékű szarkomer megnyúlás esetén a passzív izomerő kialakításáért ezen szakaszok entrópiás rugóként való viselkedése felelős (**7c. ábra**).

(3) A PEVK szakasz egy viszonylag merev rugóként fogható fel, amely főleg a nagyobb mértékű fiziológiás megnyúlások esetén felelős a vázizom nyújthatóságáért. Ebben a tartományban szívizom esetén a PEVK szakasz mellett az N2A és N2B egyedi szekvenciák megnyúlása is hozzájárul a rugalmasság kialakításához (**7d. ábra**). Különböző rugalmas tulajdonságaik miatt a PEVK és az N2A/N2B szakaszok által alkotott régió egy két-komponensű rugónak tekinthető, amelynek két része különböző mértékben járul hozzá a titin nyújthatóságához (Linke és *mtsai*, 1999; Trombitas és *mtsai*, 1999).

(4) A titin ugyanakkor az izomösszehúzódást követően is hozzájárul a szarkomer nyugalmi hosszának helyreállításához (**7a. ábra**).

A titinben az izom megnyúlása során tehát elsősorban a magasabbrendű szerkezet, azaz a láncszerű molekula térbeli, globális struktúrája szenved változást.

## 1.6. A titin rugalmasságának egyedi-molekuláris szintű vizsgálata

Az egyedi molekulák manipulációjára alkalmas módszerek megjelenésével lehetővé vált a molekulák mechanikai tulajdonságainak egy egészen más megközelítéssel történő vizsgálata. A titin ideális alanyak bizonyult ezen vizsgálatok számára, mivel az izomban mechanikai funkciót lát el, valamint nagy molekulatömege és kb. 1  $\mu\text{m}$  hosszú láncszerű szerkezete miatt könnyebben manipulálható mint a kisebb molekulák (Wang és *mtsai*, 2001). Az egyedi molekulákon végzett mérések előnye, hogy olyan információkat szolgáltathatnak a molekulák szerkezetéről és működéséről, amelyek hagyományos módszerekkel nem hozzáférhetőek, mivel azok általában egy molekulásokaságra vett átlagot eredményeznek.

1997-ben három, egyedi titinmolekulák megnyújtását leíró munka jelent meg: a titin manipulációjára két esetben optikai csipeszt (lézercsipeszt) (Kellermayer és *mtsai*, 1997; Tskhovrebova és *mtsai*, 1997), egy esetben pedig atomerő-mikroszkópot használtak (Rief és *mtsai*, 1997). A két manipulációs technika mindmáig az egyedi molekulák manipulációjára használt két legelterjedtebb módszer maradt.

Az optikai csipesz egy fókuszát lézernyaláb, amely optikai erők révén a fókusz közelében mikroszkopikus méretű, átlátszó, fénytörő gyöngyöket képes fogva tartani. A molekulanyújtási kísérletekben a titin egyik végét egy, a lézercsipeszben fogva tartott mikrogyöngyöz kapcsolják, a másik végét pedig egy tárgylemezhez (Tskhovrebova és *mtsai*, 1997) vagy egy másik gyöngyöz (Kellermayer és *mtsai*, 1997) rögzítve eltávolították. A molekulában fejlődő erő az előbbi gyöngy egyensúlyi helyzetből mért kimozdulásából számolható. Kellermayer és *mtsai* eredményei alapján a titinmolekula nemlineáris rugalmassággal rendelkező entrópiikus rugóként viselkedik (Kellermayer és *mtsai*, 1997). A molekula 5-40%-a (valószínűleg főleg a PEVK szegmens) már a nyújtás előtt kitekeredett állapotban található, míg nagyobb erőknél (20-30 pN felett) a molekula fennmaradó részének kitekeredése is megfigyelhető. Az alkalmazott nyújtási sebesség mellett a folyamat irreverzibilis, mivel a visszaeresztés során a visszatekeredés alacsony erőknél ( $\sim 2,5$  pN) volt megfigyelhető. A megnyújtási görbe alacsony

erőtartományú és a visszaeresztési görbe magas erőtartományú szakasza jól illeszhető volt a „fűrészerű lánc” (WLC) modellel (a modell alapján számolt perzisztenciahossz értéke kb. 2 nm).

Tskhovrebova és *mtsai* (Tskhovrebova és *mtsai*, 1997) is megfigyelték a titin nemlineáris rugalmasságát. Az általuk kapott erőgörbék egy két-komponensű „fűrészerű lánc” modellel voltak jól illeszthetők, amelynek két komponense a szerzők szerint a PEVK szegmensnek és a tandem Ig régióknak felelt meg (kb. 0,2 nm és kb. 5 nm-es becsült perzisztenciahosszak). Hirtelen megnyújtást követően a molekula kb. 20 nm-es lépésekben relaxálódott, amely lépések valószínűleg az egyes Ig domének kitekeredésének feleltek meg.

Ugyancsak egyedi domén-kitekeredési eseményekkel azonosították Rief és *mtsai* a titin atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtása során (Rief és *mtsai*, 1997) megfigyelt fűrészfog-szerű erő-megnyúlás görbéket (vö. 4.5. szakasz). Az egyes domének – a nyújtási sebességtől függően – 150 és 300 pN közötti erők hatására tekeredtek ki, az egyes kitekeredési eseményekhez tartozó hossz-növekedés pedig kb. 28 nm volt, ami közel azonos egy domén teljes kitekeredéséhez tartozó kontúrhossz növekedéssel. A fűrészfogak felszálló ágai jól illeszthetők voltak a „fűrészerű lánc” modellel (az ez alapján meghatározott perzisztenciahossz 0,4 nm volt). Visszaeresztést követően a domének visszatekeredése volt megfigyelhető.

A munkák folytatásaként Kellermayer és *mtsai* kimutatták, hogy nagy erők (~400 pN) mellett a titinmolekula teljes kitekeredése, és az erő-hiszterézis eltűnése figyelhető meg (Kellermayer és *mtsai*, 1998). Rief és *mtsai* atomerő-mikroszkópos mérései alapján a titin A-szakaszából származó Fn doméneket tartalmazó, rekombináns domén-sorozatok mechanikai stabilitása kisebb (kb. 20%-al kisebb kitekeredési erők) mint az I-szakaszából származó, Ig doméneket tartalmazó sorozatoké (Rief és *mtsai*, 1998b). Hasonló stabilitásbeli különbségeket az I-szakaszon belül is kimutattak, a titin differenciálisan és konstitutívan expresszálandó tandem Ig régióiból származó domén-sorozatok esetén (Watanabe és *mtsai*, 2002).

Carrion-Vazquez és *mtsai* munkája alapján (Carrion-Vazquez és *mtsai*, 1999) egyedi molekulák mechanikai denaturációja és a „hagyományos” kémiai denaturáció ugyanazt a folyamatot tükrözi, így elvileg lehetséges releváns termodinamikai paraméterek meghatározása egyedi-molekuláris mérések alapján (Guthold és *mtsai*, 2001). Mindazonáltal, ezt a következtetést megkérdőjelezi (Fowler és *mtsai*, 2002) az a megfigyelés, hogy a titin legszélesebb körben vizsgált, I27 (az újabb számozás szerint

I91 (Freiburg és *mtsai*, 2000)) számú Ig doménje nem egy lépésben, hanem egy intermedier állapoton keresztül tekeredik ki (Marszalek és *mtsai*, 1999), amely intermedier a kémiai denaturációs mérésekben nem volt megfigyelhető (Fowler és Clarke, 2001). Újabb adatok alapján az I27 domén kb. 100 pN erők mellett történő, atomerő-mikroszkóppal is vizsgálható kitekeredését az intermedier forma stabilitása határozza meg, míg alacsonyabb – fiziológiailag is releváns – erők és terhelési sebességek esetén az I27 domén stabilitása a vártnál nagyobb (Williams és *mtsai*, 2003).

Bár a lézercsipesszel és atomerő-mikroszkóppal végzett egyedi-molekuláris vizsgálatok során nyert adatok minőségileg és mennyiségileg különbözhetnek, közös tapasztalat, hogy – az Ig domének kitekeredésének hiányában – a titin rugalmassága jól modellezhető az entrópikus polimerlánc, illetve azon belül a „féregszerű lánc” (WLC) modellel. A fenti módszerek ezen felül alkalmasak szerkezeti átmenetek (pl. domén-kitekeredés) azonosítására, az ezeket előidéző erők, valamint – esetenként molekuláris dinamikai szimulációkkal kombinálva – a szerkezeti átmenetek természetének vizsgálatára.



## 2. Célkitűzések

Vizsgálataink során elsősorban a titin fehérje globális szerkezetét kívántuk jellemezni, valamint a kitekeredéskor bekövetkező szerkezeti változásokat. Globális szerkezet alatt a domének, vagy kitekeredett titin esetén az aminosavak alkotta lánc térbeli elhelyezkedését értjük.

Célunk volt:

(1) egyedi, fluoreszcensen megjelölt titinmolekulák vizualizálása és a molekula alakjának jellemzése a mikroszkópos kép alapján,

(2) egyedi, fluoreszcensen jelölt, megnyújtott titinmolekulák vizualizálása és a megnyújtás hatására bekövetkezett szerkezeti változások vizsgálata,

(3) titinmolekulák oldatban történő diffúziójának vizsgálata, a molekula diffúziós állandójának és ennek felhasználásával hidrodinamikai tulajdonságainak jellemzése,

(4) a titin oldatban felvett globális szerkezetének jellemzése a jelölt titinmolekulán kialakuló rodamin dimerek segítségével,

(5) a titinben kémiai és savas denaturáció hatására bekövetkező szerkezeti változások vizsgálata rodamin dimerek segítségével,

(6) a titin denaturáció kinetikájának és a létrejövő szerkezeti változások vizsgálata triptofán fluoreszcencia mérésekkel,

(7) a jelölés szerkezetmódosító hatásának vizsgálata egyedi titinmolekulák atomerő-mikroszkópos megnyújtása segítségével,

(8) a titin konstitutívan illetve differenciálisan kifejeződő I-szakaszbeli régiójából származó domén-nyolcasok (oktamerek) kémiai stabilitásának összehasonlítása egyensúlyi kémiai denaturációs mérések alapján,

(9) a konstitutívan illetve differenciálisan kifejeződő tandem Ig régióból származó oktamerek mechanikai stabilitásának összehasonlítása atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtás alapján.

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1. Fehérjetisztítás

A titint nyúl hátizomból preparáltuk korábban kidolgozott, és általunk módosított módszerek alkalmazásával (Kellermayer és Granzier, 1996; Soteriou és *mtsai*, 1993b). A preparálás során használt pufferekben megnöveltük az enzim inhibitorok koncentrációját, hogy megakadályozzuk a titin lebomlását. A preparátumot gélkromatográfiás oszlopon (0,8×90 cm Sepharose CL-2B) tisztítottuk, amelyet előzőleg kromatográfiás pufferrel (30 mM K-foszfát, pH 7,0, 0,6 M KCl, 0,1 mM EGTA, 0,3 mM DTT, 2 µg/ml Leupeptin, 1 µM E-64, 0,01% NaN<sub>3</sub>, 0,05% Tween-20) alaposan átmostunk. Az így nyert mintát jelöltük fluoreszcensen majd használtuk a mérések során.

A minták teljes titinmolekulákat (T1) és a T2 proteolitikus fragmentumot tartalmazták, amelyben a molekula N-terminális végéről egy 1200 kDa molekulatömegű darab hiányzik.

### 3.2. Rekombináns titin fragmentumok előállítása

A humán vázizom cDNS könyvtár Dr. Siegfried Labeit ajándéka. Vizsgálatainkhoz a titin differenciálisan és konstitutívan expresszálandó tandem Ig szegmenséből (ld. 1.3. szakasz) kívántunk előállítani két, nyolc domén hosszúságú szakaszt (oktamert). Az oktamerek nukleotid szekvencia-határait a GenBank X90569.1 bejegyzési számú szekvenciája alapján határoztuk meg. Az előzőleg specifikus oligonukleotidok felhasználásával, polimeráz láncreakcióval felerősített két DNS szekvenciát külön-külön egy pET-28a típusú vektor (Novagen) NheI és XhoI hasítási helyei közé illesztettük be. A fehérjék vízdékony formáját *Escherichia coli* baktériumban (BL21(DE3)pLysS törzs) expresszáltattuk, majd két tisztító lépésen keresztül izoláltuk: a His<sub>6</sub>-tag-ben végződő fehérjét először egy Ni<sup>2+</sup>-NTA oszlopon, natív körülmények között, a gyártó (Qiagen) utasításai szerint, majd egy Sephadex G-25 gélkromatográfiás oszlopon tisztítottuk. A minták tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk, a fehérjekoncentrációkat pedig a Bradford Assay (Sigma) segítségével határoztuk meg.

### 3.3. Fluoreszcens jelölés

A preparálást követően a titint fluoreszcensen megjelöltük a cisztein aminosavakhoz kötődő tetrametil-rodamin-jódacetamid (TMRIA) szulfhidril (SH)-reagenssel illetve más esetben a lizin aminosavakhoz kötődő tetrametil-rodamin-izotiocianát (TRITC) amino-reagenssel. A jelölést kb. 1650 értékű festék/titin moláris arány mellett, egy éjszakán át végeztük, AB pufferben (25 mM imidazol-HCl, pH 8,0, 0,2 M KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 0,01% NaN<sub>3</sub>, 1 mM DTT, 0,2% Tween-20, 40 µg/ml leupeptin és 20 µM E-64). A nem kötődött festéket és az aggregátumokat gélkromatográfiás tisztítással (0,8×90 cm Sepharose CL-2B oszlop, AB oldat) távolítottuk el.

A jelölési arányt a festék és a titin koncentrációjának hányadosaként határoztunk meg. A fehérjekoncentrációt a 280 nm-en mért abszorbancia alapján számoltuk, az  $\epsilon_{280} = 1,43 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$  extinkciós együttható érték felhasználásával (Kellermayer és Granzier, 1996), vagy a Bio-Rad Bradford Protein Microassay segítségével (Bradford, 1976) határoztuk meg, borjú szérum albumint (BSA) használva standardként. A TMRIA-koncentrációt a rodamin-jelölt titin 555-nm-en mért abszorbanciája segítségével számoltuk. Hogy a mintában jelenlévő rodamin dimerek (ld. később) mennyiségét a lehető legjobban csökkentjük, ezt a mérést 6 M-os koncentrációjú guanidin-hidroklorid (GdnHCl) jelenlétében végeztük. A TMRIA extinkciós együtthatóját TMRIA-oldaton végzett mérések alapján határoztuk meg ( $\epsilon_{555} = 59\,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).

A kapott mintákat a felhasználásig jégen tároltuk, mivel korábbi, gélelektroforézissel végzett vizsgálatok alapján a jégen tárolt minta heteken át stabil marad (Granzier és Wang, 1993a).

### 3.4. Konfokális mikroszkópia

0,2-0,4 µg/ml koncentrációjú fluoreszcensen jelölt titin oldatot gyárilag tisztított üveg mikroszkóp fedőlemezre (VWR Scientific, Media, PA) cseppentettünk, majd a mintát 1 percig inkubáltuk. Az 1 perc elteltével a fedőlemezt AB pufferrel mostuk. A mérés során a fedőlemezt és az arra kitapadt titinmolekulákat 100 µl puffer fedte.

Az üvegfelületre kitapadt fluoreszcens titinmolekulák leképezéséhez lézerpásztázó konfokális mikroszkópot használtunk (Bio-Rad MRC-1024ES, Nikon Eclipse TE300 inverz mikroszkóp, Nikon PlanApo 100×/1,4NA olajimmerziós objektív). A mintát

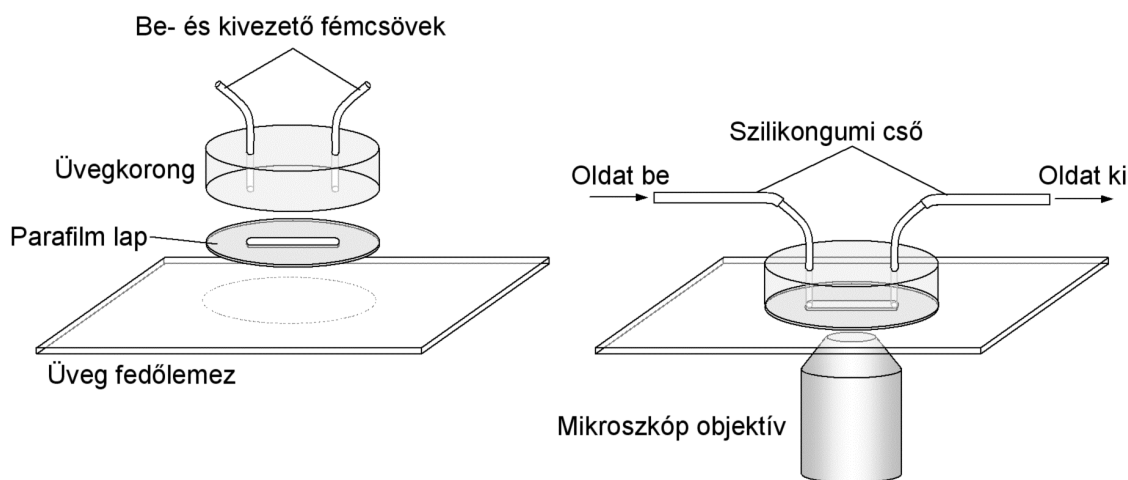
Ar-ion lézerrel (514 nm) gerjesztettük, a nyaláb intenzitását pedig 0,3-1%-ra csökkentettük (effektív intenzitás 0,120 mW), hogy csökkentsük a minta kifakulását. A fluoreszcenciát egy 550 nm-es felüláteresztő szűrőn át detektáltuk. A kifakulás további csökkentése céljából a mintapuffer 140 mM  $\beta$ -merkaptoetanolt tartalmazott.

Az üvegfelületre történő kitapadás kinetikájának vizsgálatához 10  $\mu$ l mintát kb. 20 ng/ml koncentrációra hígítva egy üveg fedőlemezre cseppentettünk, majd különböző ideig inkubáltuk. A megfelelő idő elteltével a fedőlemezt pufferoldattal lemostuk.

A digitális képeket az NIH Image (v1.61, Wayne Rasband, NIH) képanalizáló szoftver segítségével elemeztük, saját készítésű Pascal algoritmusok segítségével.

### 3.5. Kémiai denaturációs kinetika mérése egyedi molekulákon

A denaturációs kinetika vizsgálatához egy speciális folyadék-átáramlásos cellát készítettünk, amely lehetővé tette a felszín-adszorbeált molekulákon a puffer-oldat gyors cseréjét (**8. ábra**).



**8. ábra.** Egyedi molekulák kémiai denaturációs kinetikájának vizsgálatához készített folyadékáramlásos cella.

A cella alját egy üveg mikroszkóp fedőlemez, tetejét pedig egy üvegkorong képezte, amelybe két furaton keresztül egy-egy rozsdamentes fémből készült cső illeszkedett, a puffer be- és kivezetéséhez. A cellát egy korong alakú parafilm lap segítségével illesztettük össze (**8. ábra**), amelyből egy hosszúságú „folyósót” vágunk ki (kb. 2×10 mm). A be- és kifolyást szolgáló csövek végei a „folyósó” két végén illeszkedtek a kialakított cellához. Hogy biztosítsuk a cella integritását, a cellát összeállítása után

fokozatos felfűtés mellett a parafilm réteg megolvadásáig melegítettük, így a megolvadt, majd megszilárdult parafilm összeragasztotta a fedőlemezt és az üvegkorongot. Hogy biztosítsuk a parafilm jobb tapadását, gyárilag tisztított fedőlemezt használtunk, az üvegkorong parafilmmel érintkező felületét pedig kálium-hidroxiddal, majd alkohollal alaposan megtisztítottuk.

Denaturáns oldatként AB pufferben oldott, adott koncentrációjú guanidin-hidrokloridot (GdnHCl) használtunk. Az oldatokat (puffer illetve denaturáns oldatok) a be- és kivezető fémcsővekhez illeszkedő szilikongumi csöveken keresztül, 1 ml-es fecskendők segítségével juttattuk a cellába. A cellát a mikroszkóp tárgyasztalhoz rögzítettük, a leképezést a 3.4. szakaszban leírt módon végeztük. A kísérlet kezdetén a cellát pufferoldattal átmostuk, titint tartalmazó oldatot fecskendeztünk a cellába, majd kb. 1 perces inkubációs idő elteltével a nem kötődött molekulákat kimostuk a cellából. A cella alját képező fedőlemeze kitapadt molekulák megfigyeléseink szerint irreverzibilisen kötődtek a felszínhez, mivel a folyadékáramlás nem mosta le őket.

A nagyobb időfelbontás érdekében az egyedi molekulákon végzett denaturációs kinetika mérésnél a mikroszkóp vonal-pásztázás (line scan) üzemmódját használtuk, amelynek során a készülék az  $512 \times 512$  pixel nagyságú területnek csupán egy 512 pixel szélességű vonalát pásztázza le újra és újra. Az így elérhető időfelbontás 2-8  $\mu$ s. A pásztázandó szakaszt úgy választottuk meg, hogy az áthaladjon egy részecske középpontján, így e módszerrel a molekulán áthaladó tengely mentén követtük a fluoreszcencia intenzitást.

### **3.6. Titinmolekulák megnyújtása**

A titinmolekulák megnyújtása érdekében egy üveg mikroszkóp fedőlemezhöz titinmolekulákon keresztül kötődött mikrogöngyöket toltunk el egy pipettahegy segítségével, „végigkarcolva” a felszínt a hegygel.

A kísérletekben 3,18  $\mu$ m átmérőjű karboxilált latex mikrogöngyöket használtunk (SpheroTech, Libertyville, IL, USA), a göngyök felszínét pedig T12 titin-ellenes antitesttel vontuk be, amely a titin Z-csík felőli végét képes megkötni. Az így előkészített mikrogöngyöket fluoreszcensen jelölt titint tartalmazó oldatban inkubáltuk.

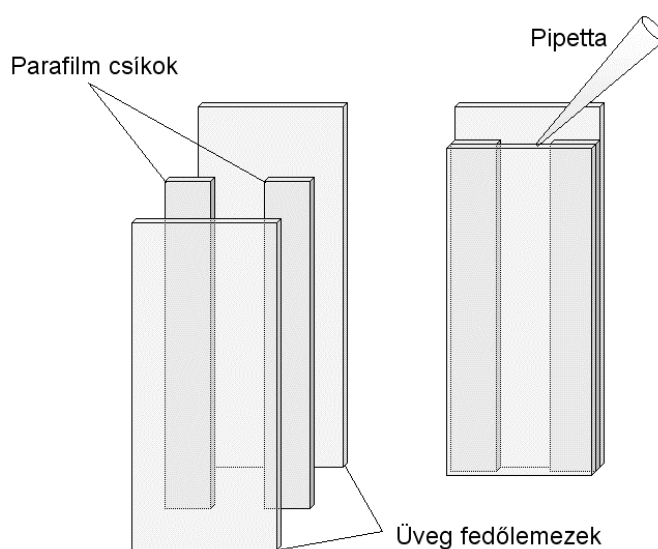
A felületi feszültségi erővel történő megnyújtás során 100  $\mu\text{l}$  50% glicerint tartalmazó jelölt titin oldatot cseppentettünk egy 5000 percenkénti fordulatszámmal pörgő mikroszkóp fedőlemezre. A felülethez tapadt, megnyújtott titinmolekulákat kb. 100  $\mu\text{l}$  pufferrel fedtük le.

A megnyújtás folyamatának követéseként egy mikromanipulátor ( $xyz$  piezoelektromos transzlátor (Burleigh)) segítségével egy mikropipettát nekinyomtunk egy fedőlemezen nyugvó, titinnel borított mikrogyöngynek, majd a mikropipettát visszahúzza, megnyújtottuk a hozzá kötődött, a pipettahegy és a gyöngy között húzódó molekulát.

### 3.7. Spektrofotometria

A minták abszorpciós spektrumát Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométerrel vettük fel. A méréseket 1 cm optikai úthosszú küvetákkal végeztük. A spektrumok felvételekor referenciaként minden esetben a vizsgált anyagot (fehérjét, fluorofórt) nem tartalmazó puffert használtuk.

A tömény TMRIA oldat abszorpciójának mérésekor, a minta magas koncentrációja miatt nagyon kis úthosszú küvetára (cellára) volt szükségünk. A magunk készített cellát két összeillesztett mikroszkóp fedőlemez alkotta, amelyek közé távtartóként két parafilm csíkot helyeztünk (**9. ábra**).



**9. ábra.** Rövid úthosszú fotometriás cellák készítésének vázlata.

Az igen rövid úthossz megvalósítása érdekében a gyári kiserelésben 0,127 mm vastagságú parafilm réteget kb. 4-szeres felületűre nyújtottuk, így az ebből kialakított

távtartó csíkok vastagsága hozzávetőlegesen 30  $\mu\text{m}$  volt. A **9. ábra** szerint összeállított cellát felhasználás előtt a parafilm réteg megolvasztásával ragasztottuk össze. A cella feltöltése során a pipettával a lemezek közé adagolt rodamin oldatot a felületi feszültségi erő beszippantotta és megtartotta.

Mivel az így elkészített cellák úthossza nem volt pontosan azonos, a cellák segítségével felvett spektrumokat az 555 nm-en mért abszorbancia értékre normáltuk.

### 3.8. Fluoreszcencia spektroszkópia

A steady-state fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatokat Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluoriméterrel végeztük. A rodamin-jelölt titin oldatának fluoreszcencia gerjesztési és emissziós spektrumait 580 nm-es emissziós, illetve 550 nm-es gerjesztési hullámhosszak, és 10-10 nm-es rések mellett vettük fel.

A triptofán fluoreszcencia emissziós spektrumát 280 nm-es gerjesztési hullámhossz, a triptofán fluoreszcencia intenzitását ugyanezen gerjesztés, és 340 nm-es emissziós hullámhossz mellett mértük. A gerjesztési és emissziós rések minden esetben 10-10 nm szélesek voltak.

A triptofán fluoreszcencia kinetikájának mérésekor az intenzitást 0,1 másodperces időfelbontással követtük. A denaturánst pipettával adtuk a mintához, majd a keveréket pipettával felfuszpendálva (~1 s) homogenizáltuk, hogy elérjük a küvetében az egyenletes denaturáns koncentrációt.

### 3.9. Egyensúlyi kémiai denaturáció

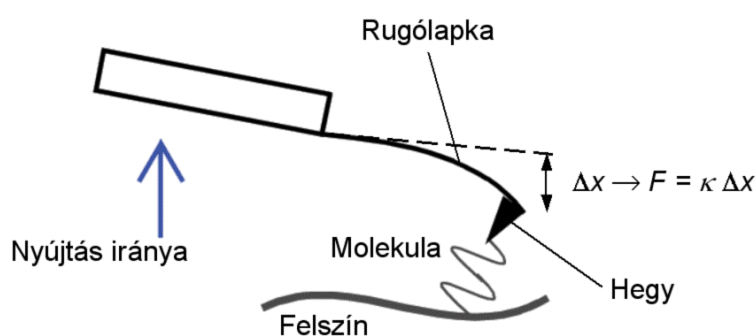
Növekvő koncentrációjú denaturáns oldatsorozatot készítettünk PBS-ben (8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,9 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). A denaturáns (GuHCl) koncentrációja 0 és 6 M között változott, az oldatok 1 mM DTT-t tartalmaztak. 1 ml denaturáns oldathoz 100  $\mu\text{l}$  fehérjeoldatot adtunk, és egy éjszakán át inkubáltuk (fehérje végkoncentráció ~ 0,01 mg/ml), hogy biztosítsuk az egyensúly beálltát.

A titin fragmentumok kémiai denaturációját a triptofán fluoreszcencia mérésén keresztül követtük, ábrázolva a fluoreszcencia intenzitás változását a denaturáns koncentráció függvényében. Az adatok elemzését és a görbeillesztést az Igor Pro 4.01 (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) program segítségével végeztük.

### 3.10. Molekulák megnyújtása erőmérő atomerő-mikroszkóppal

A mechanikai manipulációs kísérletekhez Molecular Force Probe típusú (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) erőmérő atomerő-mikroszkópot használtunk. A méréseket vizes közegben végeztük: titin esetén AB pufferben, titin oktamerek esetén PBS-ben. A fehérjeoldatot egy gyárilag tisztított üveg mikroszkóp tárgylemezre cseppentettük, és 10 percig inkubáltuk. A nem kötődött molekulákat többszöri, pufferrel történő mosással eltávolítottuk. Mérés közben a mintát kb. 200  $\mu\text{l}$  puffer fedte.

A mérési elrendezést a **10. ábra** mutatja.



**10. ábra.** Molekulák atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtásának kísérleti vázlatja. A molekulát megnyújtó erő a rugólapka elhajlásából számolható.

A rugólapka alapjának függőleges elmozdulását egy lineáris feszültségű differenciális transzformátor (linear voltage differential transformer, LVDT) (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) segítségével mértük. A rugólapka elhajlását a rendszer egy a rugólapkára vetített, és onnan visszaverődő lézernyaláb pozíciójának változása alapján méri. Az egyes molekulákat megnyújtó erőket a rugólapkák elhajlásából, a rugólapkák rugóállandójának ( $\kappa$ ) ismeretében számoltuk ki ( $F = \kappa \cdot \Delta x$ ).

A rugólapkák rugóállandóit minden egyes rugólapka esetén külön, termikus kalibráció segítségével határoztuk meg (Hutter és Bechhoefer, 1993). A rugóállandók ily módon meghatározott értékei a 0,04-0,06 N/m (40-60 pN/nm) tartományba estek.

A termikus kalibráció során a rugólapkát egy a környezetével termikus egyensúlyban lévő, egyetlen szabadsági fokkal rendelkező harmonikus oszcillátornak tekintjük. Ez esetben az oszcillátor helyzete a termikus gerjesztések hatására fluktuál. A rendszer össz-energiája  $kT$ , amely energia átlagban 1:1 arányban oszlik meg a mozgási és potenciális energia között. Ennek értelmében az átlagos potenciális energia



$$\left\langle \frac{1}{2} \kappa \Delta x^2 \right\rangle = \frac{1}{2} kT, \quad (1)$$

ahol  $\kappa$  a rugóállandó,  $\Delta x$  pedig a kitérés. A rugóállandó ekkor a

$$\kappa = \frac{kT}{\langle \Delta x^2 \rangle} \quad (2)$$

képlettel számolható. Kellően nagy (a rezonanciafrekvenciát jóval meghaladó) mintavételi gyakorisággal követve a rugólapka kitérésének időfüggését (két szomszédos maximális kitérés között számos kitérés értéket detektálva), és áttérve az időtartománybeli ábrázolásról a frekvencia-tartománybeli ábrázolásra, az eloszlás egy, a rezonancia-frekvenciára centrált Lorentz-függvényt ad. A  $\langle \Delta x^2 \rangle$  értéke ekkor a frekvencia-tartománybeli ábrázolás során kapott görbe alatti területtel egyenlő. Adott rugólapka esetén  $\kappa$  értéke a kísérletesen meghatározott  $\langle \Delta x^2 \rangle$ -frekvencia függvényre illesztett görbe alapján számolható.

## 4. Elméleti modellek és számítások

### 4.1. Polimerszerkezeti számítások

A polimerek meghatározás szerint elemi egyégekből (monomerek) felépülő láncok. Számos biomolekula polimer: a legfontosabb példák a DNS vagy a fehérjék, amelyek alapegységei a nukleotidok illetve az aminosavak. A polimer „alakja” vagy „konformációja” kifejezés alatt ennek a láncnak a térbeli vagy adott esetben síkban történő elhelyezkedését értjük. Természetesen figyelembe kell venni, hogy a lánc konformációja időben változik, fluktuál, illetve hogy egy molekulapopuláció esetén számos különböző konformáció fordul elő, ezért az alak jellemzése az esetek többségében statisztikus leírást, azaz adott paraméterek időbeli vagy térbeli átlagértékének megadását jelenti.

A polimerek konformációjának leírására számos modell létezik, a térrácson történő véletlen sétától (random walk) a „valós”, atomi szintű leírásig, amelyet szimulációs programcsomagokban használnak. Munkánkban a „féregszerű lánc” (wormlike chain, WLC) modellt használtuk, amelyet sikeresen alkalmaztak biomolekulák (DNS, (Bustamante és *mtsai*, 1994), titin (Kellermayer és *mtsai*, 1997)) konformációjának és rugalmasságának leírására. A „féregszerű lánc” egy hipotetikus, hosszához képest elhanyagolható vastagságú lineáris makromolekula, amelynek göbülete folytonos, a görbület iránya pedig minden pontban véletlenszerű (**11. ábra**). A „féregszerű láncot” az elmélet megalkotójáról Kratky-Porod láncnak is nevezik (Kratky és Porod, 1949).

A „féregszerű lánc” modell a polimert egy meghajlítható rúdnak tekinti. A termikus mozgás révén a rúd egyes pontjaiba beleütköző oldószer-molekulák hatására a rúd meghajlik. A meghajlás mértéke a rúd hajlítómerevségétől függ: nagyobb, ha a rúd hajlítómerevsége kisebb, azaz flexibilitása nagyobb.

A rúd hajlítómerevségét a perzisztenciahossz ( $P$ ) jellemzi (Rivetti és *mtsai*, 1996):

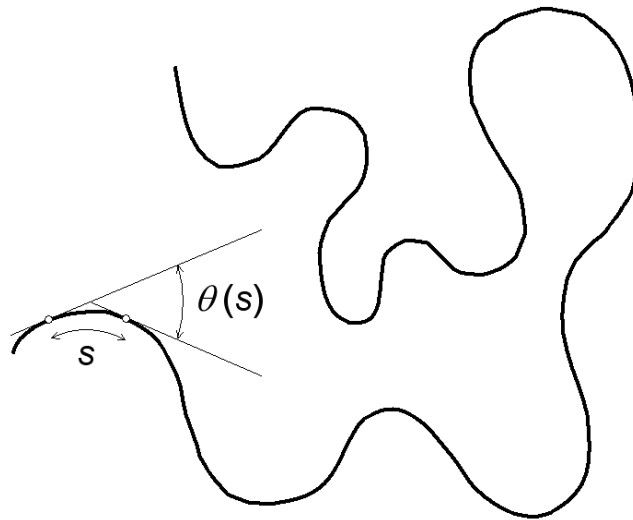
$$P = \frac{EI}{kT}, \quad (3)$$

ahol  $E$  a Young-féle modulus,  $I$  a felületi tehetetlenségi nyomaték ( $I = \int y^2 dA$ , ahol  $y$  a keresztmetszet  $dA$  felületelemének a keresztmetszet súlypontján átmenő vízszintes tengelytől mért távolsága),  $k$  a Boltzmann-állandó,  $T$  pedig az abszolút hőmérséklet. A perzisztenciahossz fizikai jelentését talán jobban megvilágítja az alábbi meghatározás:  $P$

az a hossz, amely mentén a lánc megtartja irányát, illetve a lánc hajló mozgásai korreláltak. A pontos meghatározást a következő képlet adja (Doi és Edwards, 1986):

$$\langle \cos \theta(s) \rangle = e^{-\frac{s}{P}}, \quad (4)$$

ahol  $\theta(s)$  a lánc két, egymástól  $s$  távolságra található pontjában húzott érintővektora közötti szög (**11. ábra**), a  $\langle \rangle$  jel pedig átlagértéket jelöl. A képlet alapján látható, hogy a perzisztenciahossznál sokkal kisebb  $s$  távolság ( $s \ll P$ ) esetén  $\langle \cos \theta(s) \rangle \approx 1$ , a  $\theta(s)$  szög zérus érték körül fluktuál, tehát a szakasz megtartja irányát, közel egyenes. Az ellenkező,  $s \gg P$  esetben  $\langle \cos \theta(s) \rangle \approx 0$ , vagyis a  $\theta(s)$  szög egyenlő valószínűséggel vehet fel bármilyen értéket  $0^\circ$  és  $360^\circ$  között.



**11. ábra.** „Féregszerű lánc”.

A lánc konformációját a fentiek alapján két paraméter, a lánc kontúrhossza ( $L$ ), illetve perzisztenciahossza ( $P$ ) határozzák meg. Összevetve a perzisztenciahosszt a lánc kontúrhosszával ( $L$ ), a polimereket három csoportba sorolhatjuk: (1) merev polimerek, amelyek esetén  $P$  sokkal nagyobb mint  $L$  ( $P \gg L$ , pl. mikrotubulusok), (2) félig-rugalmas (szemiflexibilis) polimerek, ha  $P$  összemérhető  $L$ -el ( $P \sim L$ , pl. aktin filamentum) és (3) rugalmas polimerláncok, ahol  $P$  sokkal kisebb mint  $L$  ( $P \ll L$ , pl. egyszálú DNS).

A „féregszerű lánc” esetén a rugalmasság a szerkezetből illetve annak rendezetlenségéből ered. A környezettel történő termikus kölcsönhatások (ütközések) következtében a lánc meghajlik, és csökkenteni igyekszik a végpontjai közötti távolságot. Minél nagyobb a lánc flexibilitása, annál jobban összetekeredik,

összegombolyodik. Az összetekeredett lánc csak külső erő alkalmazásával nyújtható ki. Flexibilisebb (kisebb hajlítómerevségű) lánc kinyújtásához nagyobb entrópiaváltozás, tehát nagyobb szabadentalpia-változás tartozik, ezért egy ilyen lánc kinyújtásához nagyobb munkavégzés szükséges. Mivel a kinyújtott állapot rendezettebb, mint az összetekeredett állapot, úgy is fogalmazhatunk, hogy a nyújtás során a lánc szerkezeti entrópiája csökken. Az ilyen típusú láncokat ezért entrópiikus polimerláncoknak is nevezik.

A lánc globális konformációjának leírására felhasználható az ún. girációs sugár ( $R_G$ ), amely a lánc pontjainak a tömegközépponttól vett átlagos távolsága. A girációs sugár közvetlen kapcsolatban van a lánc végpontjai közötti távolsággal ( $R_v$ ). Mivel mindkettő statisztikus paraméter, azaz idő függvényében illetve egy adott időpontban molekuláról molekulára értékük egy átlag körül ingadozik, a leírások során ezek átlagértékét, pontosabban négyzeteik átlagát ( $\langle R_G^2 \rangle, \langle R_v^2 \rangle$ ) használják. A kettő közötti kapcsolat a következő (Cantor és Schimmel, 1980):

$$\langle R_G^2 \rangle = \frac{\langle R_v^2 \rangle}{6} \quad (5)$$

Háromdimenziós alakot feltételezve, a végpontok közötti átlagos négyzetes távolság a következő képlet alapján függ  $L$ -től és  $P$ -től (Flory, 1989; Rivetti és *mtsai*, 1996):

$$\langle R_v^2 \rangle = 2PL \left( 1 - \frac{P}{L} \left( 1 - e^{-\frac{L}{P}} \right) \right). \quad (6)$$

A két határeset a következő:

(1) ha  $P \ll L$  ( $P/L \ll 1$ ), akkor  $\langle R_v^2 \rangle = 2PL$  (az eredmény az  $e^{-\frac{L}{P}}$  tag

$e^x = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots$  képlettel történő sorbafejtésével kapható meg),

(2) ha  $P \gg L$  ( $P/L \gg 1$ , a merev rúd esete), akkor  $\langle R_v^2 \rangle = L^2$ .

Minél rugalmasabb egy polimer, annál kisebb területre húzódik össze felületre való kitapadáskor, és annál kisebb lesz a lánc végpontjai közötti távolság. Ez esetben a polimer alakja kétdimenziós lesz, és az egyensúlyi állapotban a polimer végpontjai közötti átlagos négyzetes távolság (Rivetti és *mtsai*, 1996)

$$\langle R_v^2 \rangle_{2D} = 4PL \left( 1 - \frac{2P}{L} \left( 1 - e^{-\frac{L}{2P}} \right) \right). \quad (7)$$

A  $P \ll L$  ( $P/L \ll 1$ ) határesetben a fenti kifejezés az  $\langle R_v^2 \rangle_{2D} = 4PL$  értékhez tart.

## 4.2. Az optikai felbontóképesség hatása

Fluoreszcensen jelölt molekulák vizsgálatokor figyelembe kell vennünk, hogy a fehérjelánc-szegmensek csak akkor különíthetők el a mikroszkópos képen, ha a közöttük lévő távolság nagyobb, mint a mikroszkóp felbontási határa. Pontszerű fényforrásokra a legkisebb felbontható távolság:

$$d_{\min} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}, \quad (8)$$

ahol  $\lambda$  a fény hullámhossza,  $NA$  pedig a használt objektívlencse numerikus apertúrája.

## 4.3. Részecskék szubsztrátfelületre történő kitapadásának kinetikája

Az alábbiakban megadjuk az összefüggéseket, amelyek alapján részecskék oldatból szubsztrátfelületre történő kitapadási kinetikája alapján meghatározható azok diffúziós állandója. Targyalásunk Lang és Coates, valamint Rivetti és *mtsai* (Lang és Coates, 1968; Rivetti és *mtsai*, 1996) cikkein alapul.

Tekintsünk egy homogén oldatot, amely egy sík szubsztrátfelülettel érintkezik. Az  $x$  koordináta kezdőpontja a felszínen található, és értéke a felszíntől merőleges irányban távolodva nő. Az oldat koncentrációjának ( $n$ ) időbeli és térbeli változását Fick második törvényének egydimenziós alakja írja le:

$$\frac{\partial^2 n}{\partial x^2} - \frac{1}{D} \frac{\partial n}{\partial t} = 0 \quad (x > 0, t > 0), \quad (9)$$

ahol  $D$  a részecskék diffúziós állandója. A  $t = 0$  időpillanatban ( $x > 0$ ) az oldat koncentrációja  $n(x, t) = n_0$ . Amennyiben más erők, pl. áramlás, vagy ülepedés kizárhatóak vagy elhanyagolhatóak, a részecskék mozgását kizárólag a hőmozgás hajtja, és diffúzió útján juthatnak el a felszínhez. Feltételezzük, hogy az oldatban található részecskék irreverzibilisen kötődnek és rögzítve maradnak a felszínen, ezért a felszínen az oldott állaptú molekulák száma mindvégig:  $n(x, t) = 0$  ( $x = 0, t > 0$ ).

Az egységnyi felületre ( $1 \text{ cm}^2$ ) kitapadt részecskék teljes számát ( $n_f(t)$ ) a következő összefüggés adja:

$$\frac{n_F(t)}{n_0} = \int_0^{\infty} \left[ 1 - \frac{n(x,t)}{n_0} \right] \partial x \quad (10)$$

Megoldva a (9) egyenletet és behelyettesítve az eredményt a (10) egyenletbe:

$$\frac{n_F(t)}{n_0} = \sqrt{\frac{4D}{\pi}} \sqrt{t} \quad (11)$$

Ezek alapján a felszínre kitapadt részecskék számának időfüggését és a kezdeti koncentrációt, meghatározható a részecskék diffúziós állandója. A (11) egyenletben megadott eredmény a következő feltételekkel érvényes (Lang és Coates, 1968):

(1) A részecskék felszínre történő eljutásához nem járul hozzá áramlás (pl. hőmérsékletkülönbségből eredő hőáram). Amennyiben ez az eset állna fenn, az  $n_F(t)$  nem az idő  $1/2$ -edik, hanem ennél nagyobb vagy kisebb hatványával lesz arányos, az áramlás irányától függően.

(2) A részecskék irreverzibilisen kötődnek a felszínhez. Ha a kitapadt részecskék adott valószínűséggel leválhatnak a felszínről, az  $n_F(t)$  várhatóan  $t$ -nek  $1/2$ -től különböző hatványával lesz arányos.

(3) Az ülepedés nem járul hozzá a részecskék felszínre történő eljutásához.

(4) A részecskék oldata elegendően híg. Ellenkező esetben a diffúziós állandó koncentrációfüggése miatt a (9) egyenlet nem érvényes. Az alacsony koncentráció biztosítja azt is, hogy a felszín ne telítődjön részecskékkel.

Egy entrópiikus polimerlánc esetén a diffúziós állandó kapcsolatba hozható a lánc kontúrhosszával ( $L$ ) és perzisztenciahosszával ( $P$ ) (Higuchi és *mtsai*, 1993):

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta L} \left( 1 + 1,84 \left( \frac{L}{2P} \right)^{1/2} \right) \quad (12)$$

ahol  $k$  a Boltzmann-állandó,  $T$  az abszolút hőmérséklet,  $\eta$  pedig az oldószer viszkozitása.

#### 4.4. Termodinamikai stabilitási paraméterek meghatározása egyensúlyi denaturációs mérések alapján

A fehérjestabilitás vizsgálatának egyik elfogadott módszere valamely spektroszkópai paraméternek a kémiai denaturáns (leggyakrabban guanidin-hidroklorid vagy urea) koncentráció függvényében történő mérése. Ehhez egy olyan

spektroszkópiai jel szükséges, amelynek értéke különböző a fehérje natív és denaturált állapotában (Eftink, 1994).

A fehérjén belüli triptofán aminosavak fluoreszcenciájának intenzitása eleget tesz ennek a követelménynek, mivel igen érzékeny a triptofán aminosav környezetében bekövetkezett változásokra, valamint azzal az előnnyel is bír, hogy belső (intrinsic) fluoreszcens jel lévén, nem szükséges a vizsgálandó fehérjét fluoreszcensen megjelölni.

A termodinamikai elemző módszerek közül az egyik legelterjedtebb a lineáris extrapolációs módszer (linear extrapolation method, LEM). A módszer alapja az, hogy a kitekeredéshez tartozó szabadentalpia változás ( $\Delta G$ ) a denaturáns koncentráció lineáris függvénye (Greene és Pace, 1974). A fehérje stabilitását jellemző mennyiség a zérus denaturáns koncentráció mellett a kitekeredéshez tartozó szabadentalpia változás ( $\Delta G_{H_2O}$ ), amely a denaturáns koncentráció függvényében ábrázolt  $\Delta G$  görbéből lineáris extrapoláció során kapott tengelymetszet.

A fehérjedenaturáció legegyszerűbb modellje az ún. kétállapotú rendszer, amelyben a denaturáció a natív (N) és denaturált (D) állapot közötti reverzibilis átmenetként fogható fel:  $N \leftrightarrow D$ . Kémiai denaturáció esetén a reakció egyensúlya növekvő denaturáns koncentráció mellett a denaturált állapot felé tolódik el.

A reakció egyensúlyi állandója:

$$K = \frac{[N]}{[D]} = \frac{F_N - F}{F - F_D}, \quad (13)$$

ahol  $[N]$  és  $[D]$  a natív és denaturált állapotban lévő molekulák koncentrációja,  $F_N$ ,  $F_D$  és  $F$  pedig a natív és denaturált állapothoz tartozó, illetve a mért fluoreszcencia intenzitás.

A denaturációhoz tartozó szabadentalpia változás a denaturáns koncentráció lineáris függvénye:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta G_{H_2O} - m \cdot [\text{denat}]. \quad (14)$$

A (13) és (14) egyenletek alapján  $K = 1$  érték mellett (a fehérje 50%-a denaturálódott)  $\Delta G = 0$ , így

$$\Delta G_{H_2O} = m \cdot [\text{denat}]_{50\%}, \quad (15)$$

ahol  $[\text{denat}]_{50\%}$  az a denaturáns koncentráció amely mellett a fehérjemennyiség fele denaturálódik (Pace, 1986).

Feltételezve, hogy a natív és denaturált állapotokhoz tartozó fluoreszcencia intenzitások lineáris függvény szerint maguk is függnek a denaturáns koncentrációjától, azaz

$$F_N = F_N^0 + s_N[\text{denat}] \text{ és } F_D = F_D^0 + s_D[\text{denat}], \quad (16)$$

a (12)-(15) egyenletek felhasználásával levezethető a fluoreszcencia intenzitás denaturáns koncentrációtól való függése (Clarke és Fersht, 1993):

$$F = \frac{(F_N^0 + s_N[\text{denat}]) + (F_D^0 + s_D[\text{denat}]) \cdot \exp\left(\frac{m([\text{denat}] - [\text{denat}]_{50\%})}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{m([\text{denat}] - [\text{denat}]_{50\%})}{RT}\right)}, \quad (17)$$

ahol  $R$  az egyetemes gázállandó (1,9872 cal/mol·K),  $T$  pedig az abszolút hőmérséklet.

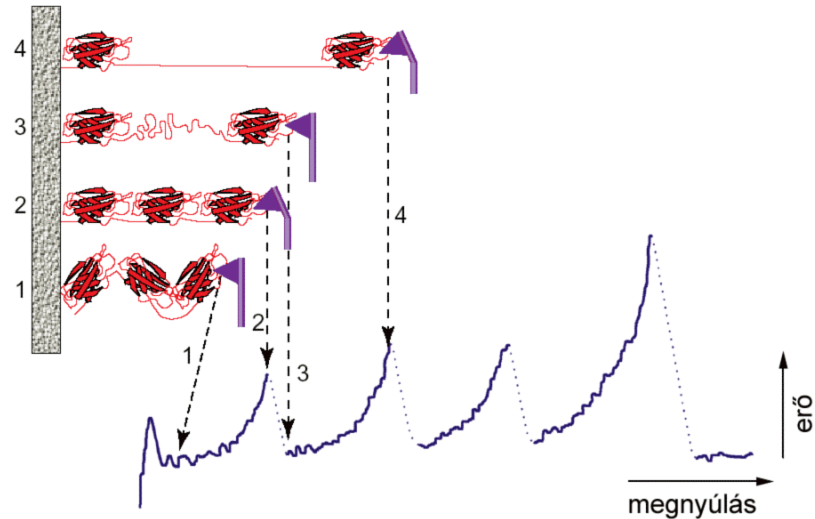
Az egyensúlyi denaturációs mérések során meg kell mérnünk a fluoreszcencia intenzitást különböző denaturáns koncentrációk mellett, majd a kapott pontokra a (17) egyenlet által meghatározott görbét illesztve megkapjuk az  $F_N^0$ ,  $s_N$ ,  $F_D^0$ ,  $s_D$ ,  $m$ ,  $[\text{denat}]_{50\%}$  értékeket. A fehérje stabilitását jellemző zérus denaturáns koncentrációhoz tartozó kitekeredési szabadentalpia változás ( $\Delta G_{H_2O}$ ) ezen paraméterek ismeretében a (15) képlettel számolható.

#### 4.5. Mechanikai stabilitási paraméterek meghatározása molekulák atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtása alapján

Molekulák atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtása során egy kicsiny rugóállandójú rugólapkára rögzített nagyon hegyes tűt hozzáérintenek az adott fehérjével bevont felszínhez, majd ennek visszahúzásakor megnyújtják a tűt és a felszín között kifeszülő molekulát.

A molekulát feszítő erőt a végpontok közötti (tű-felszín) távolság függvényében ábrázolják. Moduláris szerkezetű fehérjék (pl. titin) esetén, ha a nyújtás során a feszítőerő eléri egy adott értéket (**12. ábra**, 2. pont), a modulok egyike kitekeredik (**12. ábra**, 3. pont). Ekkor a kitekeredett modul hossza hozzáadódik a megnyújtott fehérje hosszához, az erő pedig hirtelen lecsökken. A nyújtást tovább folytatva, a fehérje fennmaradó részének teljes kinyúlását (**12. ábra**, 4. pont) követően egy újabb modul tekeredik ki, az erő újra lecsökken. Mindez az utolsó modul kitekeredéséig illetve a fehérje tűről vagy felszínről történő leszakadásáig folytatódik.

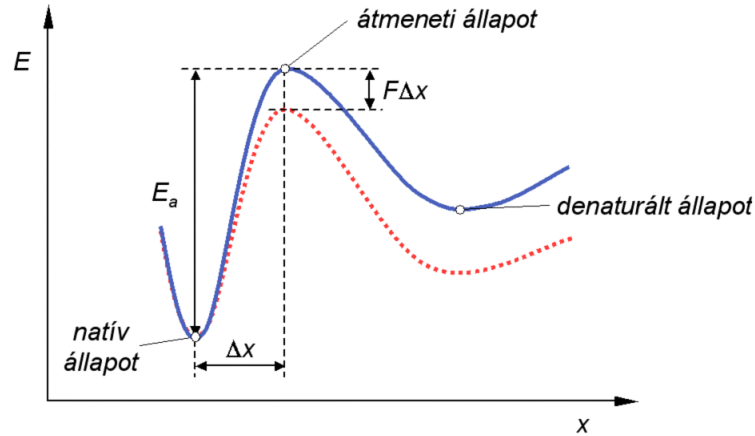




**12. ábra.** Moduláris fehérjék megnyújtásakor megfigyelt fűrészfog-szerű erő-megnyúlás görbe csúcsai az egyes modulok sorozatos kitekeredésének felelnek meg (Fisher és *mtsai*, 1999 alapján).

Az az erő, amelynél az egyes domének kitekerednek, jellemzi az illető domén mechanikai stabilitását. Fontos azonban, hogy a kitekeredési erő nagysága függ a terhelési sebességtől (az erő növekedésének sebességétől). A jelenség oka az, hogy a megnyújtás nem-egyensúlyi folyamat, amelynek során az erő gyorsabban nő, mint ahogyan azt a molekula kitekeredése követni tudná. Minél nagyobb a terhelési sebesség, annál távolabb van a rendszer az egyensúlyi folyamattól. Az elméleti számítások szerint a kitekeredési erő lineárisan függ a terhelési sebesség logaritmusától (Evans és Ritchie, 1997), amely összefüggést a kísérletek is igazolták (Rief és *mtsai*, 1997).

A kémiai denaturációhoz hasonlóan, a mechanikai denaturáció legegyszerűbb modellje a kétállapotú rendszer. Egy ilyen rendszerben a mechanikai denaturáció során a molekula natív állapotból egy (erő hiányában)  $E_a$  energiagáttal (aktiválási energiával) jellemzett átmeneti állapon keresztül jut el a denaturált állapotba (**13. ábra**). A vízszintes tengelyen mért reakciókoordináta ez esetben a megnyújtás távolsága.



**13. ábra.** Kétállapotú rendszer mechanikai denaturációjának energiaprofilja külső erő hiányában (kék) és jelenlétében (piros).

A kitekeredési sebességi állandó az energiagát magasságával van kapcsolatban. Külső erő hiányában:

$$k_0 = \omega_0 e^{-\frac{E_a}{kT}}, \quad (18)$$

ahol  $\omega_0$  egy pre-exponenciális állandó,  $k$  a Boltzmann-állandó,  $T$  pedig az abszolút hőmérséklet.

A ható mechanikai erő ( $F$ ) az energiaprofilát oly módon torzítja, hogy hatására az energiagát magassága  $F\Delta x$  értékkel csökken, ahol  $\Delta x$  az átmeneti állapot natív állapottól mért távolsága. Kisebb  $\Delta x$  azt jelenti, hogy az átmeneti állapot inkább a natív állapothoz hasonló, nagyobb  $\Delta x$  pedig hogy inkább a denaturált állapottal mutat hasonlóságot. A kitekeredés sebességi állandója ( $k_d$ ) ez esetben (Bell, 1978; Evans és Ritchie, 1997):

$$k_d = \omega_0 e^{-\frac{E_a - F\Delta x}{kT}} \quad (19)$$

A mechanikai denaturációnak alávettét molekulát kétállapotú rendszerként tekintve, a kitekeredési erő terhelési sebességtől való függése ismeretében információt kaphatunk a denaturációhoz tartozó energiaprofilról. A kitekeredési erő és a terhelési sebesség között felírható explicit összefüggés (Strunz és mtsai, 2000; Guthold és mtsai, 2001) alapján az adott fehérje mechanikai denaturációs szabadentalpia profiljának paraméterei ( $k_0$  és  $\Delta x$ ) analitikailag is meghatározhatók. A kísérletekben azonban csak a nyújtási sebesség (a tű felszíntől való távolodásának sebessége) mérése megoldott, ezért a fenti paraméterek meghatározására numerikus Monte-Carlo szimulációkat használnak, amelyekben a kezdőértékként megadott paraméter-értékeket addig változtatják, amíg a

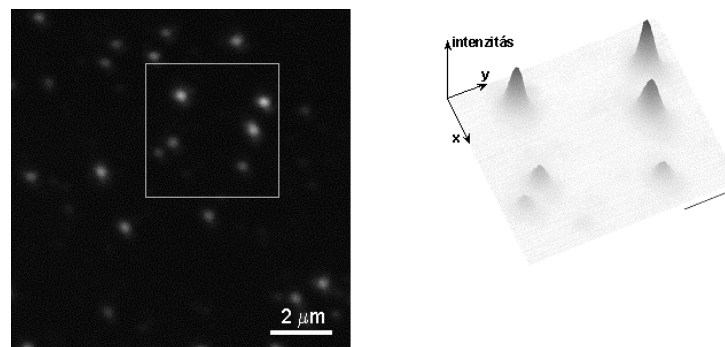
szimulált görbe a lehető legjobban megközelíti a mérési adatokat (a szimuláció részleteit ld. Rief és *mtsai*, 1997). A  $k_0$  a kitekeredési erő - log(terhelési sebesség) egyenes tengelymetszetét, a  $\Delta x$  pedig az egyenes iránytényezőjét határozza meg. Nagyobb  $\Delta x$  érték esetén a kitekeredési erő nagysága nagyobb mértékben függ a terhelési sebesség változásától.

## 5. Eredmények és következtetések

### 5.1. Felszín-adszorbeált titinmolekulák mérete és alakja

Fluoreszcensen jelölt, egyedi, üvegfelületre kitapadt titinmolekulákat vizualizáltunk konfokális mikroszkóp segítségével (Grama és mtsai, 2001b). A fluoreszcensen megjelölt titinmolekulák leképezése lehetővé teszi a molekula alakjának és méretének vizsgálatát, mivel a lánc mentén elhelyezkedő fluororfórok elvileg „kirajzolják” a lánc alakját.

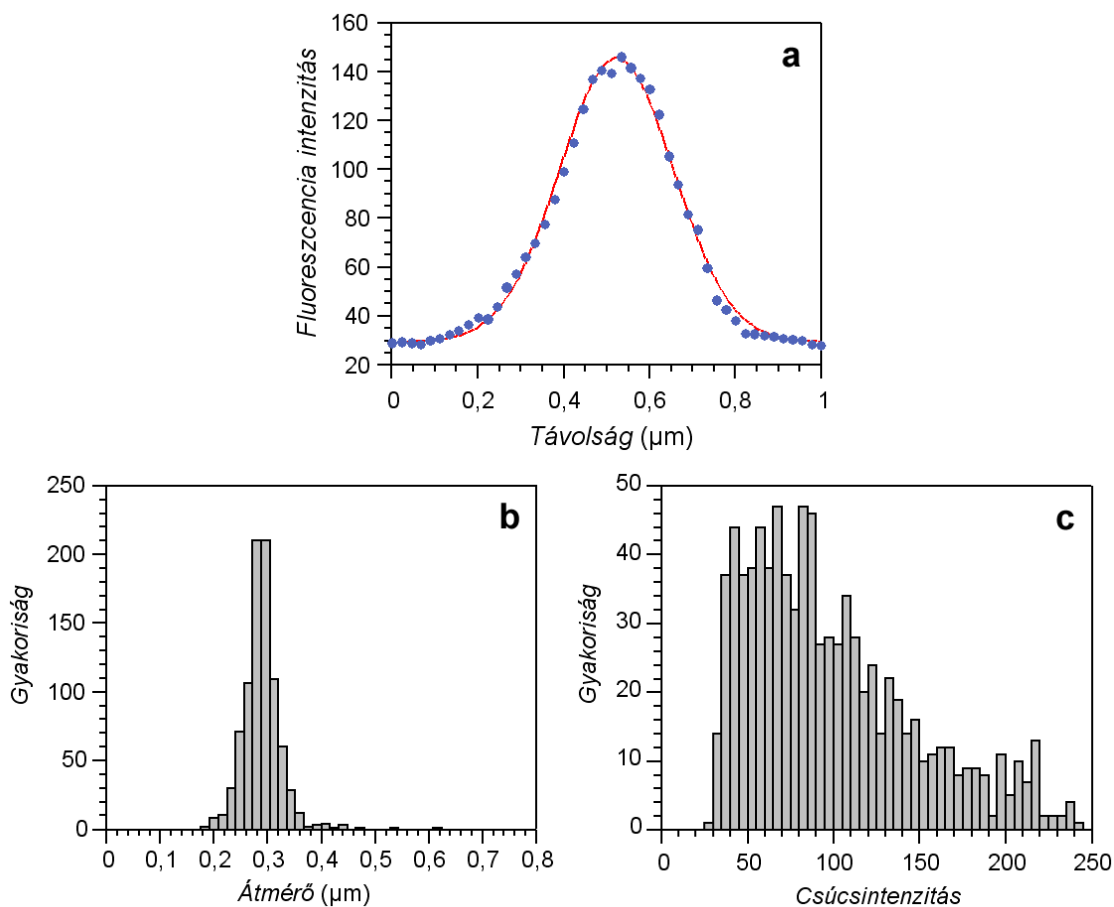
A konfokális mikroszkóppal készített képeken az üvegfelületre kitapadt fluoreszcens titinmolekulák különálló, fényes foltokként jelentek meg (**14. ábra**).



**14. ábra.** Üvegfelületre kitapadt fluoreszcensen jelölt titinmolekulák konfokális mikroszkópos képe. Bal oldalon a kijelölt terület intenzitásprofilja látható.

Képanalízis során a foltokra ellipsziseket illesztettünk, és meghatároztuk az ellipszisek kis és nagytengelyét. A tengelyek aránya az egyes foltok esetén közel 1 volt, tehát a foltok jó közelítéssel kör alakúak. Mindazonáltal, a tengelyhosszak nagyobb értékei esetén ( $0,6 \mu\text{m}$  fölött) a kis- és nagytengely aránya egytől eltérő volt, ami arra utal, hogy ezek a foltok két, vagy több szorosan egymás mellett elhelyezkedő, és így nem felbontható molekula képei.

Ahogy a **14. ábra** is sugallja, az egyes részecskék képei mentén megfigyelt intenzitáseloszlás hasonló egy pontszerű fényforrás leképezése esetén tapasztalt diffrakciós képhez, az elhajlási koronghoz. Alátámasztja ezt a megfigyelést az, hogy a részecskék képeinek átmérője mentén mért szürkeintenzitás profil jól illeszthető egy Gauss-függvénnyel (**15a. ábra**).



**15. ábra.** Egy folt mentén mért intenzitáseloszlás és az arra illesztett Gauss-függvény (a). A foltok átmérőinek (b) és csúcsintenzitásának (c) eloszlásai.

A foltok átmérőjét a részecskék esetén meghatározott Gauss-profil félértékszélességként határoztuk meg. Az ily módon számított átmérők hisztogramja (15b. ábra) az átmérő értékek igen keskeny eloszlását mutatja a  $0,29 \mu\text{m}$  átlagérték körül ( $SD = 0,04 \mu\text{m}$ ,  $n = 873$ ). Összehasonlításként, korábban  $0,3\text{-}0,5 \mu\text{m}$ -es átlagos átmérőt írtak le Cy3 festékkel jelölt titinmolekulák esetén (Tskhovrebova és Trinick, 2000). A részecskék képének átlagos átmérője ( $0,29 \mu\text{m}$ ) ezek szerint összemérhető az általunk használt mikroszkóp rendszer felbontóképességével ( $d_{min} = 0,25 \mu\text{m}$ ). Az átmérő értékekkel szemben az egyes foltok csúcsintenzitása viszonylag széles határok között változik (15c. ábra).

Az, hogy a csúcsintenzitásuktól függetlenül, a részecskék képének átmérője közel azonos, és összemérhető a használt mikroszkóp felbontóképességével, arra enged következtetni, hogy a titinmolekulák által a felületen elfoglalt terület átmérője kisebb mint a mikroszkóp felbontóképessége.

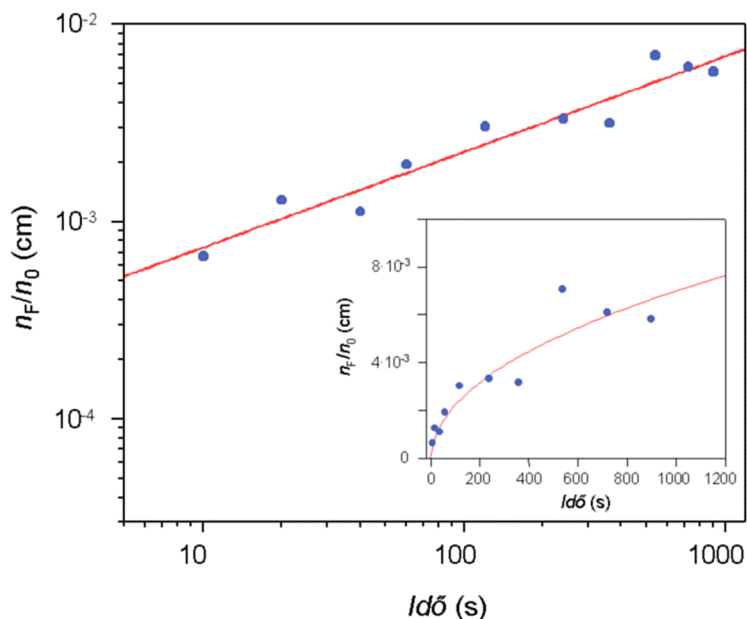
Az, hogy a foltok átlagos átmérője valamelyest meghaladja a felbontóképességet ( $0,29 > 0,25$ ), részben megmagyarázható a részecskék képeinek elemzését megelőző digitális szűrési lépéssel (simítás), amely az effektív feloldóképességet csökkenti. A megfigyelt, viszonylag széles csúcsintenzitás intervallum a következő hatásokkal magyarázható: (1) multimolekuláris aggregátumok jelenléte, (2) a titin mind T1, mind T2 formájának jelenléte a mintában (teljes titin és proteolitikus fragmentum), amelyek molekulatömege, így lánc-hosszúsága is eltérő, (3) eltérő jelölési arány különböző molekulák esetén, (4) a nem-fluoreszkáló rodamin dimerek különböző aránya az egyes molekulák esetén (ld. 5.6. szakasz).

A fentiek értelmében az üvegfelületre kitapadt fluoreszcens titinmolekulák mérete nem oldható fel az általunk használt rendszerben, megadható viszont méretüknek egy felső korlátja. A titinmolekula girációs sugara ( $R_G$ ) ezek alapján szükségképp kisebb kell hogy legyen, mint a legkisebb feloldható részecske sugara ( $d_{min}/2 = 0,125 \mu\text{m}$ ). Az (5) egyenlet alapján számolt, átlagos végpontok közötti távolság ( $\sqrt{\langle R_v^2 \rangle}$ ) ez esetben nem haladhatja meg a  $0,3 \mu\text{m}$ -t. A „féregszerű lánc” modell alapján, és a titinmolekula irodalomban közölt paramétereivel felhasználásával (kontúrhossz:  $L = 1 \mu\text{m}$  (Nave és *mtsai*, 1989), perzisztenciahossz:  $P = 15 \text{ nm}$  (Higuchi és *mtsai*, 1993), a (7) képlet segítségével számított várható átlagos végpontok közötti távolság  $0,24 \mu\text{m}$ . Ez összhangban van az általunk az átlagos végpontok közötti távolságra meghatározott felső korláttal ( $0,3 \mu\text{m}$ ).

## 5.2. A titin felszín-adszorpciójának kinetikája

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a fluoreszcensen jelölt titinmolekulák diffúziós állandóját, és megvizsgáljuk az oldatból a felületre történő kitapadást vezérlő folyamatot, megmértük a felszínre történő kitapadás kinetikáját (Grama és *mtsai*, 2001b).

A mérés során meghatároztuk a molekulák számát, amelyek egy titin-oldat cseppből egy üveg fedőlemezre kitapadnak, különböző inkubációs idők alatt.



**16. ábra.** Egységnyi felületre kitapadt titinmolekulák számának a kezdeti molekulakonzentrációval normált értéke az idő függvényében (logaritmikus és lineáris ábrázolás).

A **16. ábra** logaritmikus skálán ábrázolja az  $n_F / n_0$  arányt az inkubációs idő ( $t$ ) függvényében, ahol  $n_F$  az egységnyi felületre ( $1 \text{ cm}^2$ ) adszorbeálódott molekulák száma,  $n_0$  pedig a kezdeti molekulakonzentráció (molekulák száma/ $\text{cm}^3$ ,  $t = 0$  időpillanatban). A kisebb ábra ugyanazt az adatsort ábrázolja lineáris skálán.

A mérési pontok jól illeszthetők az  $n_F / n_0 = a \cdot t^b$  függvénnyel ( $r = 0,93$ ). Az illesztés alapján az időváltozó kitevőjére kapott 0,48-as érték közel megegyezik a diffúzió által hajtott folyamatra elvárt 0,5-ös értékkel, ami arra utal, hogy a molekulák felszínre történő transzportja kizárólag diffúzióvezérelt folyamat, és hogy a molekulák irreverzibilisen kötődtek a felszínhez (ld. 4.3. szakasz, (11) egyenlet).

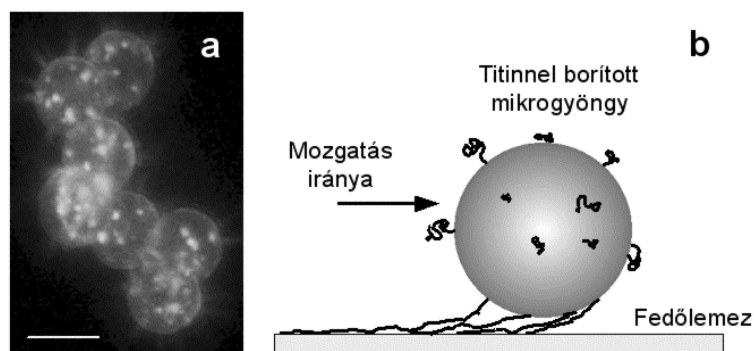
A (11) egyenletnek megfelelően az illesztés alapján meghatározható a titin diffúziós állandója ( $D$ ), amelyre a  $4,8 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$  értéket kaptuk. Ez az érték összemérhető, de alacsonyabb mint a titin korábban más módszerrel meghatározott diffúziós állandójának hőmérséklet-korrigált értéke ( $6,0 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ , (Higuchi és *mtsai*, 1993)). Az eltérés lehetséges oka, hogy (1) az általunk használt mintában magasabb volt a T1 titin forma (a nagyobb méretű, teljes titin) aránya, és (2) a tisztító centrifugálási lépés ellenére kis mennyiségben aggregátumok voltak jelen a mintában. Mindkét ok a látszólagos diffúziós állandó növekedését eredményezi.

A (12) egyenlet alapján, a diffúziós állandó ismeretében megbecsülhető a natív titinmolekula perzisztenciahossza ( $P$ ), amelynek értéke az általunk kapott diffúziós állandó felhasználásával, és  $1\ \mu\text{m}$  kontúrhosszat feltételezve (Nave és *mtsai*, 1989)  $26\ \text{nm}$ . Ez az érték meghaladja a natív  $\beta$ -connectinre (T2 titinre) az irodalomban közölt értéket ( $15\ \text{nm}$ , (Higuchi és *mtsai*, 1993)), de nem áll ellentmondásban a titin felszínen elfoglalt méretének általunk meghatározott felső korlátjával (ld. 5.1. szakasz).

A perzisztenciahossz fentebb meghatározott értékét, a diffúziós állandó értékéhez hasonlóan mindazonáltal érdemes körültekintéssel kezelni. A titin aggregáció hatékony csökkentése, illetve a titin koncentráció pontosabb meghatározása lehetővé teszi, hogy a molekulák felszínre jutási kinetikájának mérésével pontosabb becsléseket kapjunk a titinmolekula fizikai paramétereire.

### 5.3. Megnyújtott, felszín-adszorbeált titinmolekulák vizsgálata

Annak érdekében, hogy megnyújtott, fluoreszcensen jelölt titinmolekulák mikroszkópos képét vizsgáljuk, a titinmolekulákat két különböző módszerrel nyújtottuk meg (Kellermayer és Grama, 2003).



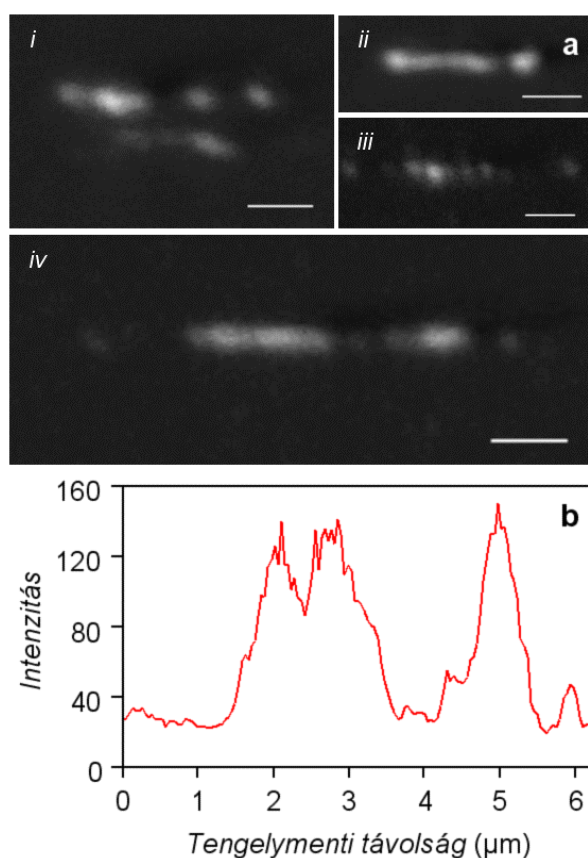
**17. ábra.** Titin megnyújtása titinnel bevont mikrogöngyök elmozgatásával.

**a.** Fluoreszcensen jelölt titinnel borított latex mikrogöngyöket ábrázoló konfokális mikroszkóppal készült felvétel. A skálaszakasz  $3\ \mu\text{m}$  hosszú. **b.** A kísérlet vázlatát: a fluoreszcens titint hordozó mikrogöngyöt a felszínre helyezést követően oldalirányban elmozgattuk, egy pipettahegyet húzva végig a felszínen.

Elsőként egy üvegfelületre elhelyezett, titinnel borított mikroszkópos latex gyöngyöt toltunk végig a felszín mentén, megnyújtva ezáltal azokat a titinmolekulákat, amelyek egyik része a felszínhez tapadt, másik vége pedig a gyöngyöz rögzítve maradt. A használt latex mikrogöngyök egy csoportjáról készült konfokális mikroszkópos képet a **17a. ábra**, a kísérlet vázlatát pedig a **17b. ábra** mutatja.



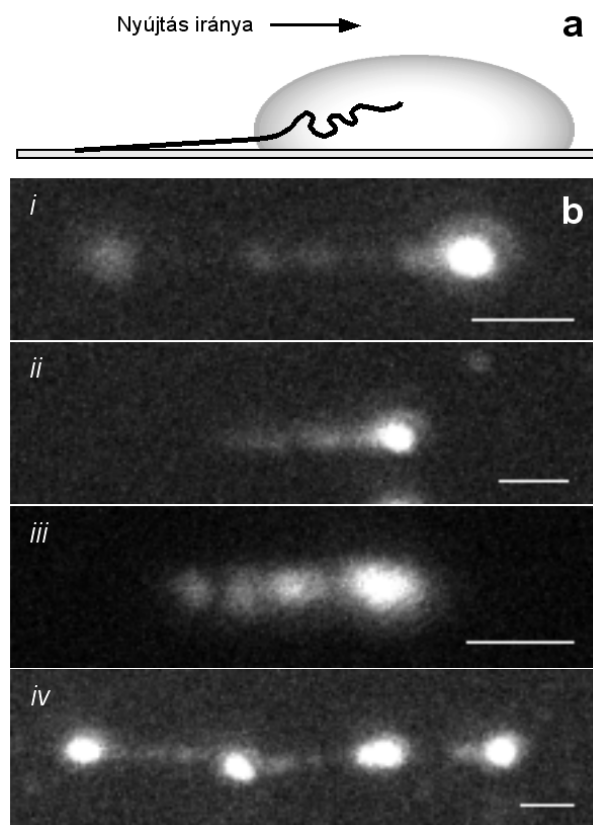
A mikrogyöngyökről történő leszakadást megelőzően a megnyújtott titinmolekulák hosszuk mentén az üvegfelszínhez tapadtak, és ily módon a felszínhez való kötődés mintegy rögzítette a megnyújtott konfigurációt. Az így megnyújtott és a felületre adszorbeált titinmolekulák a konfokális mikroszkóppal készült felvételeken gyöngyfűzérhez hasonló képet mutattak (**18. ábra**), amelyeken a fényes foltok sorozata látható, valamint az ezeket összekötő halványabb fluoreszcenciájú szakaszok. A tengelymenti fluoreszcencia intenzitáseloszlást ábrázoló hisztogramon (**18. ábra**) a csúcsok és völgyek megfelelnek a magas illetve alacsony intenzitású részeknek. A megnyújtott titin szakaszok átlagos hossza  $2,1 \mu\text{m}$  ( $\pm 0,9 \text{ SD}$ ,  $n = 53$ ) volt.



**18. ábra. a.** Megnyújtott, felszín-adszorbeált TMRIA-titin molekulák konfokális mikroszkópos képei. A skálaszakasz  $1 \mu\text{m}$  hosszú. **b.** Az a.iv. ábrán látható molekula tengelye mentén mért intenzitásprofil.

Egy másik módszert alkalmazva, fluoreszcensen jelölt és felszínre tapadt titinmolekulákat nyújtottunk meg felületi feszültségi erő segítségével (**19a. ábra**). Egy folyadéksepp visszahúzódó meniszkusza által a molekulára ható erő az  $F = \gamma\pi d$  képlettel számolható, ahol  $\gamma$  a folyadék felületi feszültsége,  $d$  pedig a molekula-filamentum átmérője. Ilyen körülmények között a titin szakaszokra ható erő elérheti a

több száz pikonewton (Tskhovrebova és Trinick, 1997), bár az erő hatásideje igen rövid, mivel a meniszkusz a molekula hossza mentén a másodperc tötrésze alatt végigvonul (Tskhovrebova és Trinick, 1997). A fenti módon megnyújtott titinmolekulákról készült fluoreszcens képek (19b. ábra) a 18. ábrához hasonlóan gyöngyfűzér-szerű alakzatokat mutatnak.



**19. ábra.** Titinmolekulák megnyújtása felületi feszültségi erő segítségével. **a.** A kísérlet vázlatja. **b.** Megnyújtott molekulákról készült felvételek. A skálaszakaszok hossza 1  $\mu\text{m}$ .

A megnyújtott titinmolekulák fluoreszcens képe tehát a két különböző módszerrel történő megnyújtást követően alapvetően hasonlóan adódott. Milyen szerkezeti elemeknek felelhetnek meg az intenzív illetve a halvány fluoreszcenciájú részek? A halvány, alacsony fluoreszcenciájú szakaszok valószínűleg a PEVK szakasz, valamint kitekeredett globuláris domén-sorozatok képei. Ezt támasztja alá, hogy a képen látható filamentumok hosszabbak mint a natív titinmolekula hossza ( $\sim 1 \mu\text{m}$ , (Nave és mtsai, 1989)). Egy ilyen túlnyúlás csak a PEVK szakasz megnyúlásával vagy domének sorozatának kitekeredésével magyarázható. A PEVK szakasz teljes megnyúlása kb.  $0,8 \mu\text{m}$ -el járul hozzá a titin megnövekedett hosszához (Labeit és Kolmerer, 1995), ezért a megfigyelt  $2,1 \mu\text{m}$ -es átlagos hosszak kialakulásában a domén-kitekeredés is szerepet

kell hogy játsszon. Az alacsony fluoreszcenciájú régiók jelenlétének lehetséges magyarázatai a fluorofór-kötőhelyek hiánya, vagy a fluorofórok „kihígulása” ezeken a szakaszokon. Mivel a PEVK-szakasz egyáltalán nem tartalmaz SH-csoportokat (cisztein aminosavakat) (Labeit és Kolmerer, 1995), ezért elvileg nem jelölődhet fluoreszcensen TMRIA-val, és a mikroszkópos képeken várhatóan egy, a fluoreszkáló titin szakaszokat megszakító sötét részként jelenik meg. A képeken mindazonáltal nem egy, hanem több halványabb szakasz jelenik meg. Ezen további szakaszok jelenlétére a kitekeredett és megnyúlt globuláris domének adhatnak magyarázatot, amelyek mentén a kisebb helyi fluorofór koncentráció miatt halványabb a fluoreszcencia.

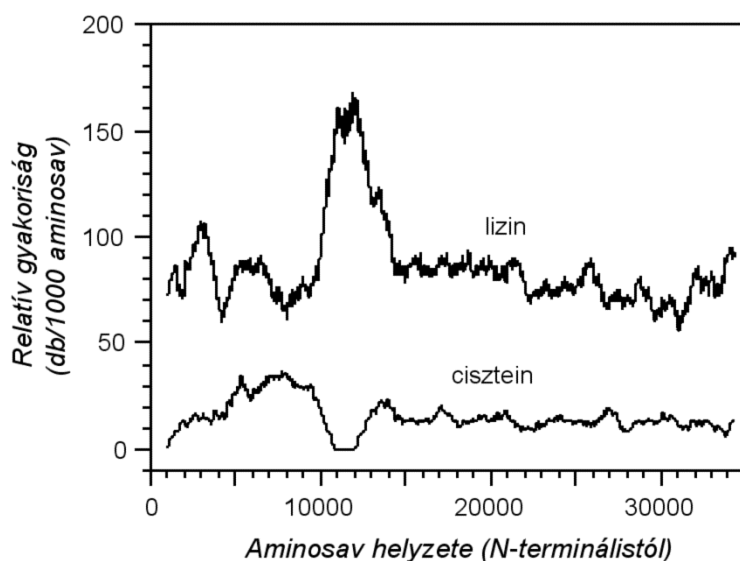
A váltakozó fényes és halvány szakaszok magyarázatára más mechanizmusok is kínálóznak: (1) a fényes foltok elvileg lehetnek különálló titinmolekulák képei, amelyek a gyöngyről válnak le amint az tovacúszik az üvegfelszín mentén, (2) a filamentumok egynél több molekulát tartalmaznak, (3) a halvány szakaszok nem kitekeredett részek, ahol a helyi jelölési arány igen alacsony vagy zérus.

Az első esetben a filamentum-szerű kép nem jelentene mást, mint a gyöngy útját a felszínen, nem pedig egy titinmolekulát. Ez a mechanizmus mindazonáltal nem valószínű, mivel a felületi feszültségi erő segítségével megnyújtott és felszínre kitapadt titinmolekulák esetén ehhez nagyon hasonló eredményeket kaptunk.

Mivel a titinmolekulák valóban képesek oligomereket kialakítani, kialakulhatnak egynél több titinmolekulából álló csoportok. Dimerek és trimerek kialakulását írták le Tskhovrebova és *mtsai* (Tskhovrebova és Trinick, 1997) felületi feszültségi erővel megnyújtott titinmolekulák esetén. A 19b.iv. ábrán látható filamentum például a hossza alapján valószínű, hogy titin oligomernek felel meg. A fluoreszcenciás képalkotás segítségével azonban nehéz különbséget tenni az egyedi titinmolekulák és az oligomerek között. A titin oligomerek pontszimmetriája miatt azonban (a titin bi- vagy multimolekuláris komplexeiben a molekulák egy ponton, nagy valószínűséggel az M-csík felőli végükön kapcsolódnak össze (Kellermayer és *mtsai*, 2003)), a sorbakapcsolt titinmolekulák száma valószínűleg nem több kettőnél. Így, a leképezett titin filamentumok esetén sem valószínű, hogy a filamentum mentén kettőnél több titinmolekula helyezkedjen el.

A harmadik lehetőség szerint a változó molekula-menti jelölési arány miatt alakul ki a heterogén intenzitáseloszlás a molekula hossza mentén. A fluoreszcens jelölés során használt TMRIA és TRITC fluorofórok cisztein ill. lizin aminosavakhoz kötődnek. A

cisztein és lizin aminosavak relatív frekvenciáját a titin szekvenciája mentén a **20. ábra** mutatja.



**20. ábra.** A cisztein és lizin aminosavak relatív frekvenciája a titin szekvenciája mentén.

A titin szekvenciája mentén átlagosan  $15 (\pm 7, \text{SD})$  cisztein aminosav jut 1000 aminosavra, kivéve a PEVK régiót, amely nem tartalmaz ciszteineket. A lizin átlagos frekvenciája  $86 (\pm 21, \text{SD}) / 1000$  aminosav, kivéve a PEVK régiót, amelyben a lizin aránya jóval magasabb. Figyelembe véve, hogy a cisztein és lizin aminosavak aránya a titin szekvenciája mentén közel állandó (leszámítva a PEVK szegmenst), és feltételezve, hogy azok azonos mértékben hozzáférhetőek a jelölők számára, feltételeztük, hogy a titinmolekulákat a lánc mentén egyenletesen jelöltük meg. Az elért jelölési arányok esetén minden második-harmadik doménre jutott egy fluorofór. Mivel a kétféle rodamin-származékkal jelölt titin esetén alapvetően hasonló eredményeket kaptunk, a dolgozatban kizárólag a TMRIA-titin felhasználásával végzett méréseket tárgyaljuk. Az elért jelölési arány ezen minta esetén 80-140 TMRIA molekula/titin között változott. A jelölési arányt elvileg a fluorofór kötőhelyek (TMRIA esetén SH-csoportok) helyi koncentrációja határozza meg. Bár a cisztein eloszlás a szekvencia mentén közel egyenletes (kivéve a PEVK szegmenst), előfordulhat, hogy egyes kötőhelyek nem hozzáférhetőek a jelölő számára. Ebben az esetben annak a feltétele, hogy egy ilyen nem jelölődött szegmens feloldható legyen, az, hogy a hossza nagyobb kell hogy legyen mint a mikroszkóp felbontási határa ( $\sim 0,25 \mu\text{m}$ ). Ha egy domén hosszát a linker régióval együtt 5 nm-nek tekintjük (Trombitás és *mtsai*, 1998a; Trombitás és *mtsai*, 1998b), egy  $0,3 \mu\text{m}$  hosszúságú natív domén-sorozat kb. 60 domént tartalmaz. Ha a

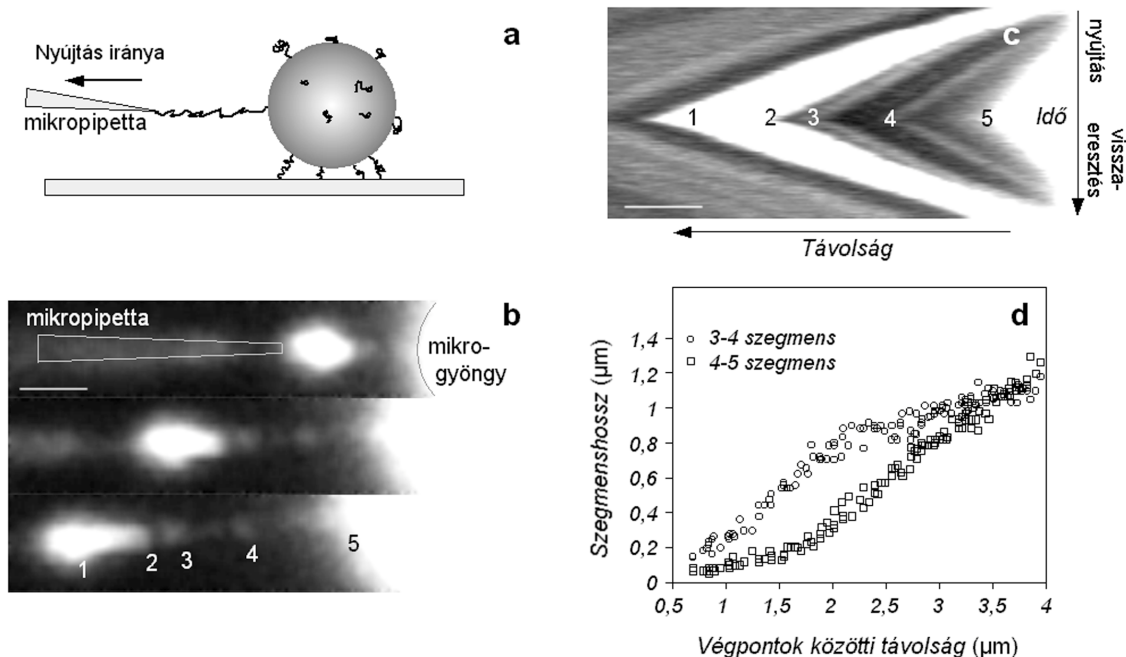
halvány fluoreszcenciájú részek valóban nem jelölődött szakaszoknak felelnek meg, akkor legalább 60 doménból álló szakaszoknak kell létezniük a titin lánc mentén, amelyek nem hozzáférhetőek a fluorofór számára. Figyelembe véve, hogy az általunk elért jelölési arányok mellett (~80-140 TMRIA molekula/titin) minden második vagy harmadik doménre jut egy fluorofór, illetve hogy a globuláris doménekből álló régiók mentén a titin szerkezete nagyon hasonló, valószínűtlen hogy egy ilyen helyzet kialakuljon.

Összefoglalva, a fluoreszcensen jelölt megnyújtott titinmolekulák mikroszkópos képe fényes szakaszok közé ékelődött halvány részeket mutat, ami a megnyújtott molekula struktúrális heterogenitására utal. A halvány szakaszok valószínűleg a nem jelölődött PEVK szegmens és/vagy kitekeredett domén-sorozatok képei.

#### 5.4. Időben feloldott titin-nyújtás

Titinmolekulák megnyújtásának folyamatát időben követtük oly módon, hogy konfokális mikroszkóppal képsorozatokat készítettünk egy mikropipetta és egy latex mikrogyöngy között kifeszülő titinmolekula megnyújtása során (Kellermayer és Grama, 2003). A mikropipettát nekinyomtuk egy titinnel borított mikrogyöngy oldalának, majd a hozzá kötődött titin szakaszt a mikropipettát eltávolítva megnyújtottuk (**21a. ábra**).

Az előzőekhez hasonlóan a titin lánc mentén fényes foltok voltak láthatók, amelyeket halvány, alacsony fluoreszcenciájú részek választottak el (**21b. ábra**). A megnyújtás során készült, a fluoreszcencia időbeli változását ábrázoló felvételen (**21c. ábra**) látható, hogy miközben a megnyújtott szakasz teljes hossza folyamatosan nőtt, a fényes régiók dimenziója közel azonos maradt, a halvány részek hosszúsága pedig gyakran különböző mértékben és sebességgel változott. A fluoreszcencia heterogenitása, ami a struktúrális heterogenitásra utal, fennmaradt számos megnyújtás-visszaeresztés ciklus során. Megfigyelhető ugyanakkor, hogy a latex mikrogyöngy, amely titinmolekulákon keresztül rugalmasan kötődött az üvegfelszínhez a megnyújtás során elmozdult, jelezve, hogy a megnyújtott molekulában erő fejlődött (5-ös számmal jelzett pont a 21b. és 21c. ábrán). Így, bár a fényes pontokat összekötő halvány szakaszokat gyakran nehéz volt észrevenni a képen, ez az erő jelezte a folytonos soros kapcsolatot.



**21. ábra.** Titinmolekulák megnyújtásának időbeni követése. **a.** A kísérlet vázlatja. **b.** A megnyújtás különböző fázisaiban készített felvételek. **c.** A molekula tengelymenti intenzitáseloszlásának időbeni változása. A számokkal jelölt pontok a b. ábrán jelölt pontoknak felelnek meg. **d.** A 3-4 és 4-5 szegmens hossza a megnyújtott szakasz teljes hosszának függvényében.

A sorba kapcsolt halvány régiók megnyúlása gyakran különböző volt (**21d. ábra**). Mivel a sorba kapcsolt szakaszokra ható erő a soros kapcsolás miatt ugyanakkora, a nyújthatóságukban megfigyelt különbségek rugalmas tulajdonságaikban mutatkozó különbségeket jeleznek. A megnyúlási görbében jelentkező plató azt jelzi, hogy az illető szakasz hossza közel elérte kontúrhosszát (Trombitás és *mtsai*, 1998b), egyúttal nyújthatóságának határát. Egy esetleges szerkezeti átmenetet egy törés jelez a görbében vagy pontsorozatban, egy meredekebb görbeszakasz pedig nagyobb rugalmasságot jelez. Ennek megfelelően a 21d. ábrán látható 4-5 szegmens a kb. 1,8  $\mu\text{m}$ -es végpontok közötti távolságnál feltehetően szerkezeti átmenetet szenved, amelynek során rugalmassága megnő. Ez az átmenet valószínűleg domének kiteredését jelenti, mivel ismert, hogy a kitekeredett titin lánc flexibilisebb, mint a natív (Kellermayer és *mtsai*, 1997; Rief és *mtsai*, 1997; Tskhovrebova és Trinick, 1997). Várható, hogy ezen átmenet során a jelölő (TMRIA) helyi koncentrációja lecsökken, ami a 4-5 szakasz intenzitáscsökkenése formájában valóban megfigyelhető a 21c. ábrán. A 3-4 szegmenshez tartozó görbe eleve meredekebb szakasszal, azaz nagyobb flexibilitású állapotból indul, így valószínű, hogy ez egy eleve kiteredett rész. Ugyancsak ezt

támasztja alá, hogy a 3-4 szegmens mereedsége (rugalmassága) a kezdeti szakaszon hasonló a 4-5 szakasz átmenet utáni rugalmasságához. Az 1  $\mu\text{m}$ -es hosszt elérve a 3-4 szakasz látszólag nem nyúlik jelentősen tovább, valószínűleg mivel hossza megközelítette a kontúrhosszt.

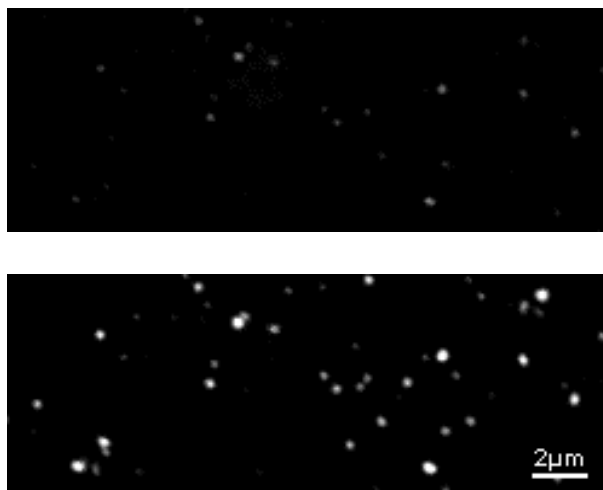
A folyamatában regisztrált és fluoreszcencia segítségével követett titin-megnyújtás alapján elmondhatjuk, hogy a titin rugalmas tulajdonságai heterogenitást mutatnak a titin lánc mentén, azaz a titin különböző rugalmasságú szakaszok sorbakapcsolt sorozata. Az, hogy az egyes szakaszok a titin mentén pontosan mely régióknak felelnek meg, ezen kísérlet alapján nem azonosítható. Ehhez a jövőben úgy juthatunk közelebb, ha a titint adott pontokon fluoreszcens antitestekkel jelöljük meg, és ezután megnyújtjuk.

## 5.5. Egyedi titinmolekulák kémiai denaturációja

A denaturáció titinmolekulákra kifejtett hatásának vizsgálata céljából jelölt titinmolekulák fluoreszcenciáját követtük kémiai denaturáció során (Grama és *mtsai*, 2001a). Denaturánsként a leggyakrabban használt kémiai denaturálószer, a guanidin-hidrokloridot (GuHCl) használtuk.

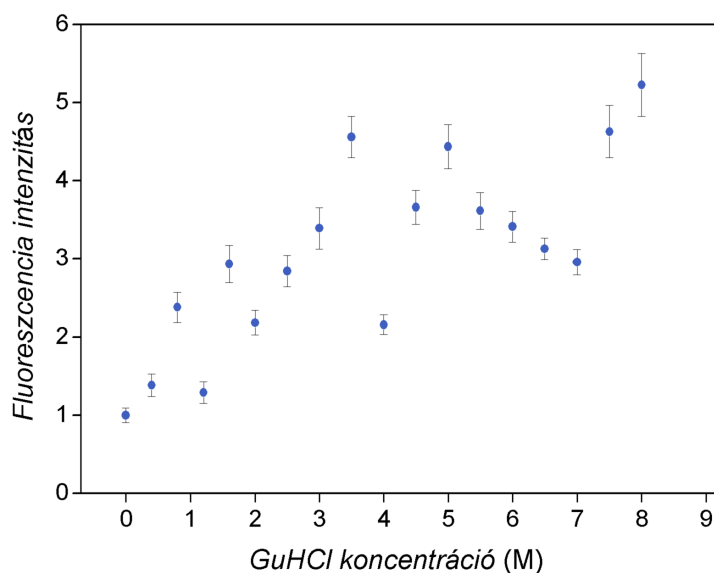
A mérések során felszín-adszorbeált, TMRIA-val jelölt titinmolekulák konfokális mikroszkóppal történő leképezését követően a fluoreszcencia intenzitásokat a digitális képek analízise segítségével jellemeztük. A fluoreszcencia mennyiségi jellemzésére a következő paramétereket használtuk: (1) a részecskék képeinek átlagos intenzitását (a 0-255 szürkeárnyalatú skálán), illetve (2) az integrált fluoreszcencia intenzitást, azaz a képet alkotó képpontok fluoreszcencia intenzitásainak összegét. Az így kapott értékeket ezután normáltuk a kezdeti, denaturáns nem tartalmazó minta fluoreszcencia intenzitásával.

GuHCl (5,5 M) hozzáadását követően a molekulák fluoreszcencia intenzitása viszonylag gyorsan és jelentősen megnőtt, ugyanakkor megnőtt a képen látható részecskék száma is (**22. ábra**). A denaturáns eltávolítását követően a foltok fényessége és száma visszatért az eredeti értékekre.



**22. ábra.** Egyedi, fluoreszcensen titinmolekulák konfokális mikroszkópos képe guanidin-hidrokloriddal (GuHCl) történő kémiai denaturáció előtt és után.

A hatás mennyiségi jellemzése érdekében több mikroszkópos látómező összesített elemzése során meghatároztuk nagyszámú részecske (ld. **23. ábra**) integrált fluoreszcencia intenzitásának átlagát, különböző koncentrációjú GuHCl jelenlétében. A GuHCl koncentráció növelésével párhuzamosan a fluoreszcencia intenzitásértékek növekedése volt megfigyelhető (**23. ábra**).

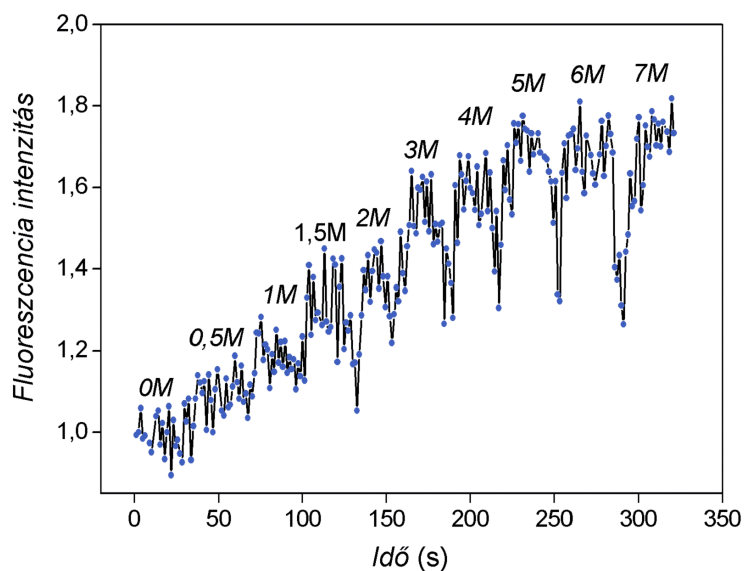


**23. ábra.** Felszín-adszorbeált, jelölt titinmolekulák fluoreszcencia átlagintenzitása a denaturáns koncentráció függvényében. A pontok átlagban 261 molekula átlag  $\pm$  SEM értékeit mutatják.

8 M-os GuHCl koncentráció esetén a fluoreszcencia intenzitás hozzávetőlegesen 5-szörösére nőtt a denaturáns távollétében mért értékhez képest.

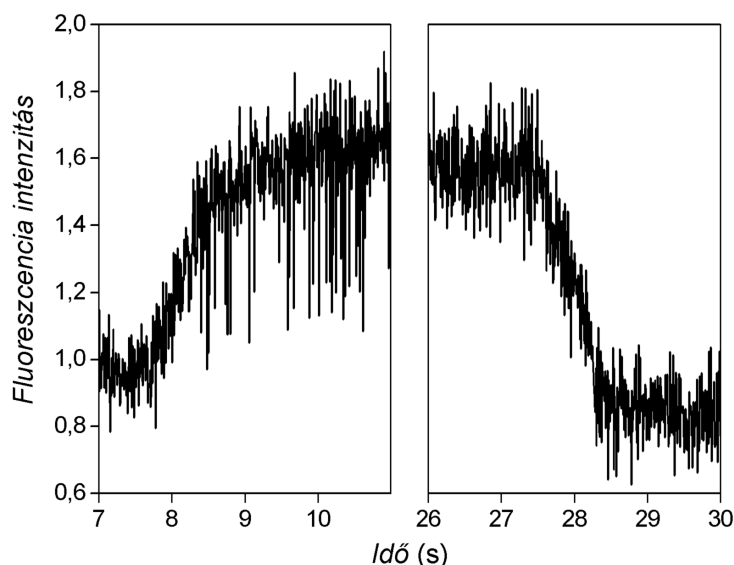


Megvizsgáltuk ugyanazon molekula átlagos fluoreszcencia intenzitásának változását, miközben a mérőcellába egymást követően lépcsőzetesen emelkedő koncentrációjú GuHCl oldatot fecskendeztünk be. A titinmolekula fluoreszcenciája ennek hatására szintén lépcsőzetes módon megnőtt (**24. ábra**).



**24. ábra.** A denaturáns koncentráció lépcsőzetes emelésének hatása egyetlen molekula fluoreszcencia intenzitására.

A fluoreszcencia változás kinetikáját a konfokális mikroszkóp sokkal jobb időfelbontással rendelkező vonal-pásztázás (line scan) üzemmódja segítségével vizsgáltuk, oly módon, hogy egy, a részecske középpontján átmenő tengely mentén követtük a fluoreszcencia intenzitást. Az egyetlen molekula esetén 5,5 M-os GuHCl oldat hozzáadását illetve eltávolítását kísérő átlagos fluoreszcencia intenzitás változásokat a **25. ábra** mutatja.



**25. ábra.** Egyetlen titinmolekula fluoreszcencia intenzitásának kinetikája 5,5 M GuHCl hozzáadása (bal oldal) és eltávolítása (jobb oldal) nyomán. Az intenzitásértékeket a denaturáns hozzáadása előtti értékre normalizáltuk. A kifakulás (photobleaching) miatt a végső intenzitás valamivel alacsonyabb, mint a kezdeti intenzitás.

A görbékre illesztett exponenciális függvény alapján a denaturáció átlagos időállandójára a 0,5 s ( $\pm 0,1$  s SE,  $n = 13$ ) értéket, a renaturáció átlagos időállandójára pedig 0,7 s ( $\pm 0,1$  s SE,  $n = 13$ ) értéket kaptuk. Összehasonlításként, ezek az értékek egy nagyságrenddel nagyobbak, mint a Zhuang és *mtsai* által (Zhuang és *mtsai*, 2000) Oregon Green 488 fluorofórral jelölt titinmolekulák denaturációjára kapott értékek.

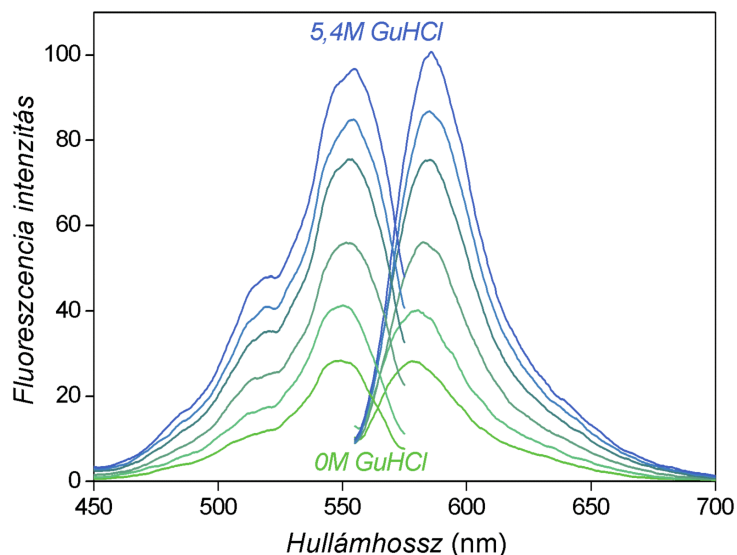
Összefoglalva, natív titinmolekulákon a lánchoz kapcsolt rodamin molekulák fluoreszcenciája lecsökken, valószínűleg a festékmolekulák közelsége okozta kioltás miatt. Ez az önkkioltásnak nevezett hatás (Zhuang és *mtsai*, 2000) azután kémiai denaturáció hatására megszűnik, ami a fluoreszcencia intenzitás növekedéséhez vezet.

## 5.6. Önkkioltás a fluoreszcensen jelölt titinben

Az önkkioltás molekuláris mechanizmusainak valamint az önkkioltás kémiai denaturáció során megfigyelt csökkenésének részletesebb tanulmányozása céljából TMRIA-jelölt titin oldatot spektroszkópiai módszerekkel, fluoreszcencia és abszorpciós spektroszkópia segítségével vizsgáltunk (Grama és *mtsai*, 2001a).

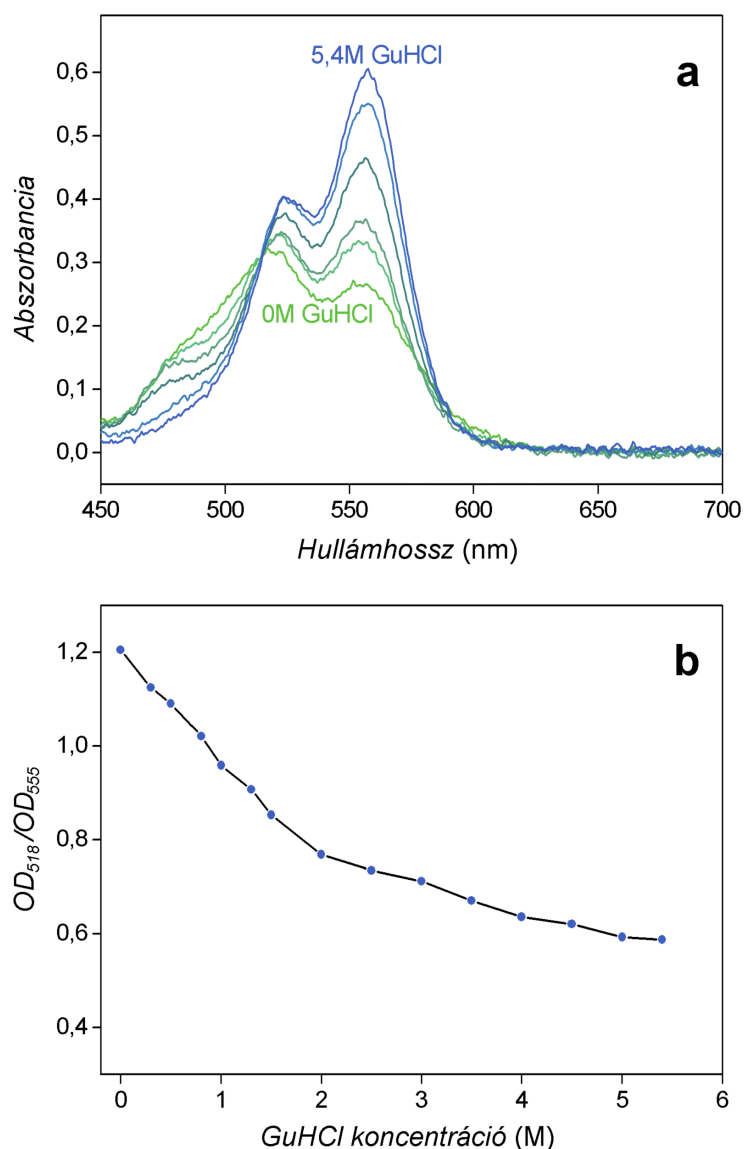
A korábban konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatok eredményét a fluoreszcencia spektroszkópia is alátámasztotta: kémiai denaturáns hozzáadásának

hatására a TMRIA-jelölt titin oldat gerjesztési és emissziós intenzitásai jelentősen megnöttek (**26. ábra**). 5,4 M-os GuHCl koncentráció mellett az 580 nm-en mért emissziós intenzitás 4-szeresére nőtt.



**26. ábra.** TMRIA-jelölt titin fluoreszcencia gerjesztési és emissziós spektrumai a növekvő GuHCl koncentráció függvényében ( $\lambda_{\text{ex}} = 550 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ ).

Az abszorpciós spektrumban az 555 nm-es csúcs mellett egy másik abszorpciós csúcs is megjelent 518 nm-nél, amely a gerjesztési spektrumban nem volt megfigyelhető (**27a. ábra**, 0 M GuHCl-hez tartozó görbe). Amíg az 555 nm-es csúcs a rodamin monomer abszorpciós csúcsa, az 518 nm-es, második csúcs a rodamin dimerek jelenlétét jelzi (Levshin és Bocharov, 1961; Rohatgi és Singhal, 1963; Selwyn és Steinfeld, 1972; Plant, 1986). GuHCl növekvő koncentrációban történő hozzáadására megfigyelhető a dimer és monomer csúcsok arányának változása (**27a. ábra**).



**27. ábra. a.** Rodamin-jelölt titin denaturáns távollétében (0 M GuHCl) és növekvő koncentrációjú denaturáns jelenlétében (5,4 M koncentrációig) felvett abszorpciós spektrumai. **b.** A spektrumok alapján számolt, 518 és 555 nm-en mért abszorbancia arányának függése a denaturáns koncentrációjától.

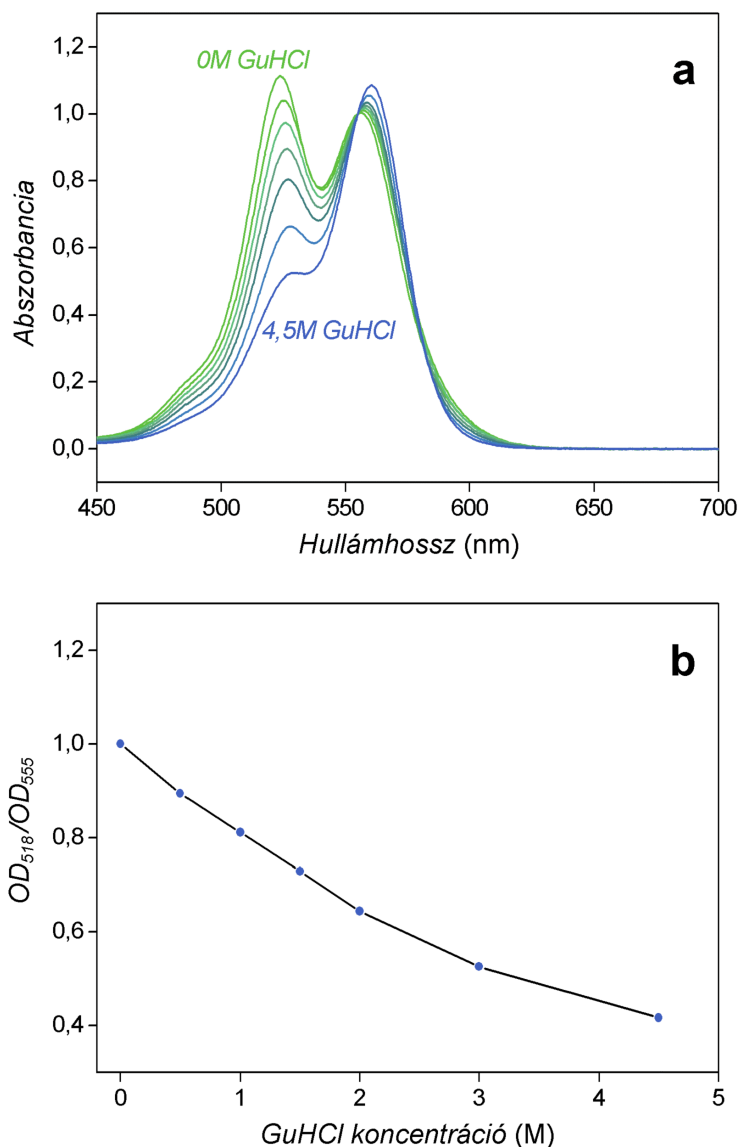
A rodamin-jelölt natív titinmolekulákban megjelenő önkioltás és a lecsökkent fluoreszcencia oka tehát a rodamin dimerek kialakulása. Növekvő koncentrációjú GuHCl jelenlétében a nem fluoreszkáló dimer populáció egyre nagyobb arányban alakul át monomer formává, ami a fluoreszcencia intenzitás növekedéséhez vezet. A rodamin dimer és monomer formák közötti átalakulást jelzi a dimer és monomer abszorpciós csúcsok arányának ( $OD_{518}/OD_{555}$ ) fokozatos csökkenése a GuHCl koncentráció növelésével (27b. ábra).

Az  $OD_{518}/OD_{555}$  arány a dimer-monomer aránynak felel meg. TMRIA esetén az irodalomban leírt  $OD_{518}/OD_{555}$  értékek a 0,4-1,3 intervallumban változnak, ahol 0,4 és 1,3 a tiszta monomer illetve tiszta dimer formához tartozó arány értékei. Figyelembe véve, hogy esetünkben a TMRIA-jelölt natív titin mintában mért arány értéke 1,2 volt, a lánchoz kötött rodamin többsége dimer formában található. Az 5,4 M-os GuHCl oldattal történő denaturációt követően mért 0,6-os arány azt jelzi, hogy a dimer populáció egy része fennmaradt, azaz a denaturáns az adott koncentráció mellett erre a populációra nem fejtette ki hatását.

Mivel a dimerek kialakulásának valószínűsége a rodamin koncentráció növekedésével nő (Levshin és Bocharov, 1961; Plant, 1986; Baranova, 1965), a jelölt titinen megfigyelt magas dimer koncentráció azzal magyarázható, hogy a titin egy viszonylag kicsiny térfogatba koncentrált a hozzá kötődött rodamin molekulákat, megnövelve ezzel a jelölő helyi koncentrációját. Ennek következtében a festékmolekulák megfelelő közelségbe kerülnek egymáshoz ahhoz, hogy a dimerek kialakulása lehetővé váljon.

## **5.7. Titin globális konformációjának jellemzése rodamin dimerek segítségével**

Hogy meghatározzuk, vajon a denaturáció során megfigyelt fluoreszcencia intenzitás növekedés a denaturáció során lezajló konformációs változások hatására, avagy a denaturánsnak a dimerekre kifejtett közvetlen hatásának következtében jön létre, megvizsgáltuk a kémiai denaturáns rodamin oldatra kifejtett hatását (Grama és *mtsai*, 2001a). A méréshez 5 mM-os koncentrációjú rodamin B oldatot használtunk, amelyben a rodamin dimer populáció van túlsúlyban, és felvettük az oldat abszorpciós spektrumát házilag készített, kb. 30  $\mu\text{m}$  optikai úthosszú küvettákban (**28a. ábra**).



**28. ábra. a.** 5 mM koncentrációjú rodamin B oldat abszorpciós spektrumai a GuHCl koncentráció függvényében. A spektrumokat az 555 nm-en mért abszorbancia értékre normáltuk. **b.** A spektrumok alapján számolt 518 és 555 nm-hez tartozó abszorbancia arányának függése a denaturáns koncentrációjától.

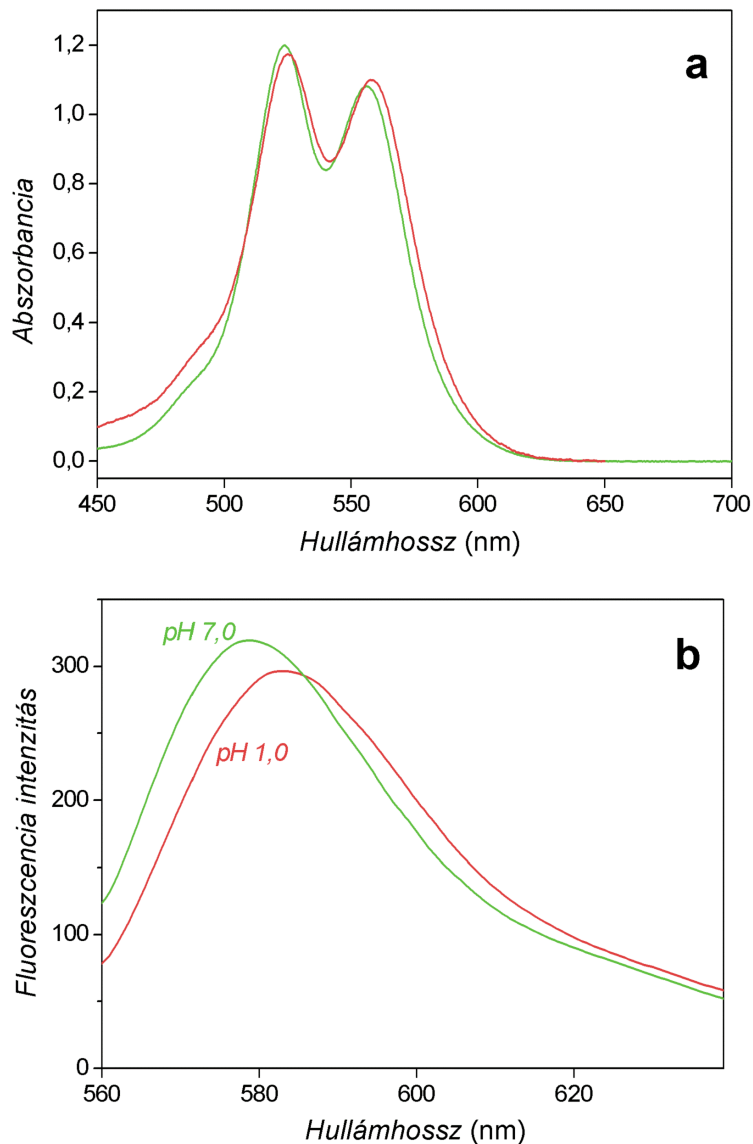
Növelve az oldatban a GdnHCl mennyiségét, azt tapasztaltuk, hogy a dimer populáció aránya fokozatosan csökken, míg 4,5 M GuHCl koncentráció esetén majd a teljes rodamin populáció monomer formában volt megtalálható (**28b. ábra**). Azt találtuk, hogy más kémiai denaturálószer (urea, nátrium-dodecil-szulfát (SDS)) a GuHCl-hoz hasonló hatást fejtenek ki. Rodamin dimerek urea hatására történő disszociációját korábban is megfigyelték (Rohatgi és Singhal, 1963). Ez alapján általános következtetésként vonhatjuk le azt, hogy a kémiai denaturánsok megszüntetik a rodamin dimert összetartó kölcsönhatásokat. Mivel a dimerek apoláros oldószerben,

azaz hidrofób környezetben nem alakulnak ki, a denaturálószeres valószínűleg a dimert összetartó hidrofób kölcsönhatás megszűnését okozzák.

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy a rodamin-jelölt titin esetén kémiai denaturáns hozzáadására bekövetkező fluoreszcencia intenzitásnövekedés kizárólag, vagy domináns módon a denaturánsnak a dimerekre kifejtett közvetlen hatását tükrözte, nem pedig a fehérje szerkezetében lezajló változásokat.

A dimerek GuHCl hatására létrejövő disszociációjával párhuzamosan azonban bizonyos, hogy a fehérje denaturációja is lezajlik. Ezt részben az általunk elvégzett, GuHCl hozzáadást követő triptofán fluoreszcencia vizsgálatok (ld. 5.9. szakasz), részben pedig korábbi kísérletek támasztják alá, amelyekben egyedi, mechanikailag manipulált titinmolekulák 4 M GuHCl oldatban 5 percen belül teljesen kitekeredtek (Kellermayer és *mtsai*, 2001).

Annak érdekében, hogy a kizárólag fehérje konformációváltozáshoz tartozó rodamin fluoreszcencia változást megvizsgáljuk, olyan denaturáló módszert kerestünk, amely a dimereket közvetlenül nem befolyásolja. Erre a célra a savas denaturációt találtuk alkalmasnak, mivel a pH csökkentése során az oldatban található rodamin dimerek mennyisége (**29a. ábra**), sem a rodamin spektrális tulajdonságai nem változtak szignifikánsan (**29. ábra**).

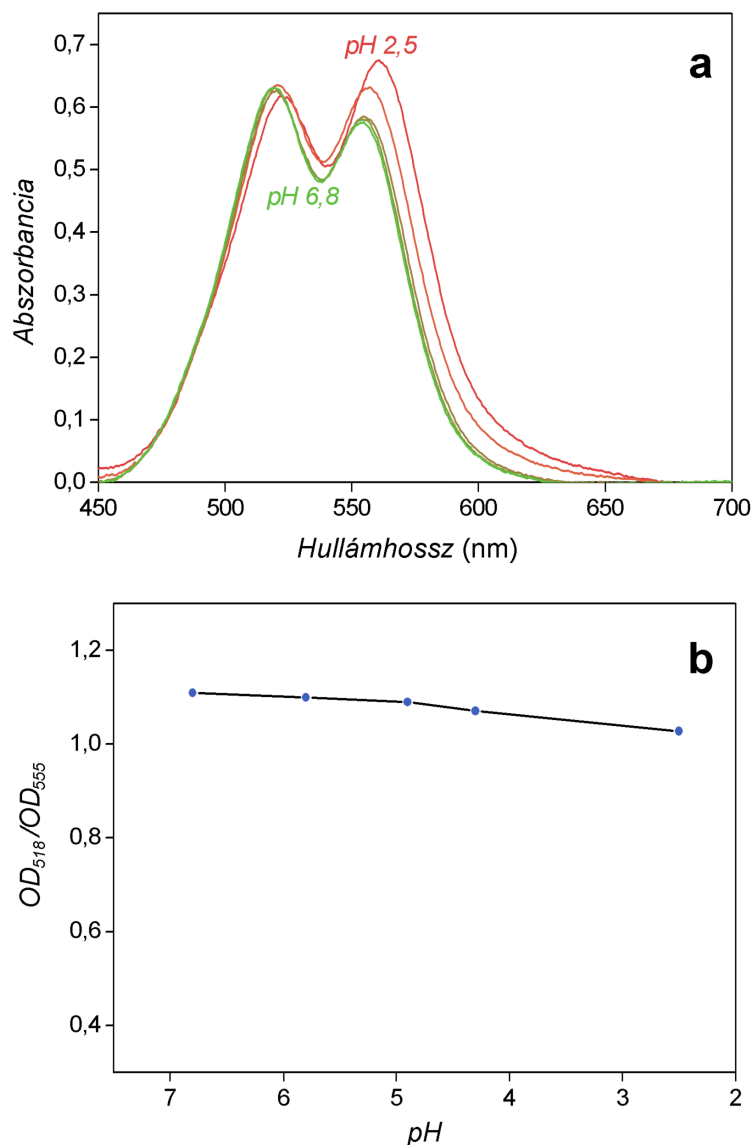


**29. ábra.** A pH csökkentésének hatása rodamin oldat abszorpciós spektrumára (a) és fluoreszcencia emissziós spektrumára (b).

A pH 1,9 értékre való csökkentése nyomán a titin minta triptofán fluoreszcencia intenzitása 16%-al csökkent, ami azt mutatja, hogy a savas közegben a denaturáció végbement.

A fentiek figyelembevételével a jelölt titin mintát savas közegben denaturáltuk. A mérés során a dimer-monomer arányt vizsgáltuk, miközben sósav (HCl) több lépésben történő hozzáadásával a minta pH-ját fokozatosan csökkentettük. Az egyensúlyi állapot beállta után minden esetben felvettük a minta abszorpciós spektrumát (30. ábra).

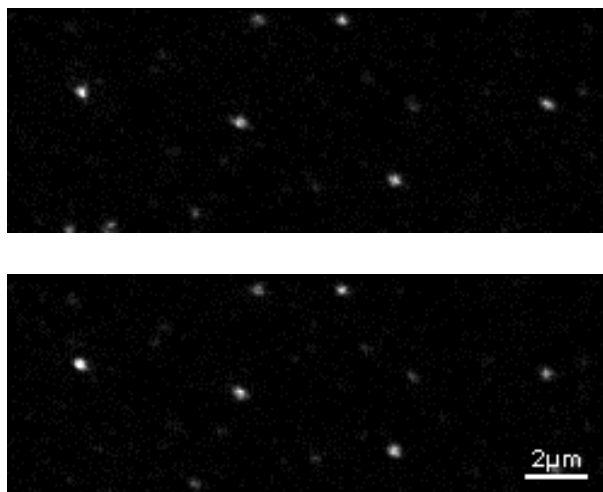




**30. ábra.** pH csökkentés hatása a rodamin-jelölt titin minta abszorpciós spektrumára (a) és a dimer-monomer arányra (b).

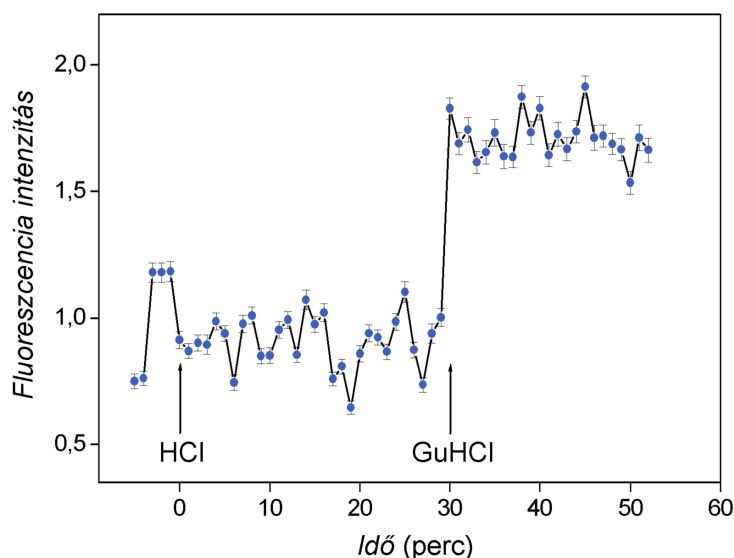
A pH 6,8-ról 2,5-ös értékre történő csökkentése során az OD<sub>518</sub>/OD<sub>555</sub> arány csupán enyhe csökkenést mutatott (1,10 értékről 1,02 értékre csökkent) azt mutatva, hogy a rodamin dimer populáció aránya közel változatlan maradt.

A savas denaturációt kísérő fluoreszcencia intenzitás változást egyedi molekulák szintjén is követtük, felszín adszorbeált fluoreszcens titinmolekulák konfokális mikroszkóppal történő vizsgálatával. A pH 7,7-ről (31. ábra, felső kép) 2,0-ra (alsó kép) történő csökkentése nem okozott változást a molekulák fluoreszcencia intenzitásában.



**31. ábra.** Rodamin-jelölt, felszín-adszorbeált titinmolekulákról készült konfokális mikroszkópos felvételek semleges (pH 7,7, felső kép) és savas (pH 2,0, alsó kép) pufferben.

Hogy kizárjuk a hosszabb idő alatt bekövetkező változást, a molekulák fluoreszcencia intenzitását hosszabb időn át követtük. Az intenzitásértékeket ismét képanalízis segítségével határoztuk meg.



**32. ábra.** Felszín-adszorbeált, jelölt titinmolekulák átlagos fluoreszcencia intenzitása az idő függvényében savas denaturációt (HCl jel, pH 2,0), majd GuHCl hozzáadását (GuHCl jel) követően. A GuHCl oldat pH-ja 7,7 volt. Az egyes pontok az  $\text{átlag} \pm \text{SEM}$  értékeket mutatják, átlagosan 187 molekula esetén. Az intenzitásértékeket a kontrollt jelentő első öt pont átlagértékével normáltuk.

Az eredmény azt mutatta, hogy a puffer alacsony pH-jú oldatra történő cseréjét követően a molekulák átlagos fluoreszcencia intenzitása 30 perces időtartam alatt sem

változott meg, szinte azonnal megnövekedett azonban, amint a savas oldatot 5,5 M koncentrációjú GuHCl oldatra cseréltük le (**32. ábra**).

Ily módon, míg a GuHCl által indukált fluoreszcencia intenzitás növekedés háttérében a denaturáns dimerekre kifejtett közvetlen hatása áll, a jelölt titin savas denaturációját nem kíséri fluoreszcencia intenzitás változás. A savas denaturáció során mért állandó fluoreszcencia intenzitás egybevághat a spektroszkópiás mérések során tett megfigyeléssel, hogy savas denaturáció hatására alig változott meg a dimer-monomer arány. Az önkkioltás miatt nem fluoreszkáló dimer populáció monomer formába való átalakulása ugyanis a fluoreszcencia intenzitás növekedéséhez kellene hogy vezessen. Tekintve, hogy a dimerképződés mértéke koncentrációfüggő, mindez azt jelenti, hogy a helyi rodamin koncentráció, azaz a TMRIA molekulák közötti átlagos távolság nem változott meg jelentősen a savas denaturáció során.

Az eddigi mérések alapján, és néhány alapvető feltételezéssel élve, következtetéseket vonhatunk le a titin globális szerkezetéről. Figyelembe véve, hogy a megjelölt cisztein aminosavak eloszlása a titin szekvenciája mentén közel egyenletes, és feltételezve, hogy azok egyformán hozzáférhetőek a jelölő számára, feltételezhetjük, hogy a titin lánc mentén egyenletesen jelöltük meg. A lánchoz kapcsolt rodamin molekulák megfigyeléseink alapján dimereket alkotnak. A dimereket létrehozhatják azonos doménon elhelyezkedő molekulapárok, illetve szomszédos, vagy egymástól a szekvenciában távolabb elhelyezkedő doménekhez kapcsolt molekulák, amelyek a titin lánc flexibilitásának köszönhetően a lánc fluktuációja révén kerülhetnek közel egymáshoz.

Ha feltételezzük, hogy a lánchoz kötött rodamin molekulák (a lánccal együtt) szabadon diffundálhatnak és kölcsönhathatnak egymással, hasonlóan az oldatban található található rodamin esetéhez, akkor a titin által kitöltött térfogatrészben a dimer-monomer arányt a rodamin átlagos lokális koncentrációja határozza meg. A helyi

átlagos fluorofór koncentráció ismeretében ekkor a  $V = \frac{n}{c \cdot N_A}$  képlet alapján

megbecsülhető a titin által kitöltött térfogat, ahol  $n$  az egy titinmolekulához kötött rodamin molekulák átlagos száma,  $c$  a rodamin helyi moláris koncentrációja (mol/liter),  $N_A$  pedig az Avogadro-féle szám. A rodaminra felvett kalibrációs görbe alapján (saját adatok, és Burghardt és Ajtai, 1996) a mért dimer-monomer aránynak megfelelően, a jelölt titin által kitöltött térfogatban az átlagos helyi rodamin koncentráció millimoláros nagyságrendű. Így, titinmolekulánként 136 TMRIA molekula esetén, 1 mM-os helyi

rodamin koncentrációval számolva, egyetlen titinmolekula által kitöltött térfogat értéke  $0,23 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^3$ . Ez gömb alakot feltételezve megfelel egy  $0,054 \mu\text{m}$  sugarú gömbnek. Fontos megemlítenünk, hogy a molekula által kitöltött térfogat alatt itt nem azt a térfogatot értjük, amelyet a titin lánc tölt ki (és amely elvileg a lánc vastagságának és kontúrhosszának szorzataként számolható), hanem egy olyan, pl. gömb alakú térfogatrészt, amellyel a rugalmas, összetekeredett molekula mintegy burkolható.

Ha, amint fentebb megállapítottuk, a rodamin átlagos helyi koncentrációja savas denaturáció mellett nem, vagy csak kis mértékben változott meg, akkor a titinmolekula által kitöltött térfogat is közel azonos kellett hogy maradjon, így a fentebb számolt érték denaturált titin esetére is érvényes. Összehasonlításképpen kiszámolhatók a denaturált titin lánc egyensúlyi állapotának megfelelő, elméletileg várt méretek. A (6) egyenlet alapján, a kontúrhossz és a perzisztenciahossz ismeretében kiszámítható az átlagos négyzetes végpontok közötti távolság ( $\langle R_v^2 \rangle$ ) (Rivetti és *mtsai*, 1996). A teljesen kitekeredett titin  $10 \mu\text{m}$ -es kontúrhossza (Labeit és Kolmerer, 1995) és  $1,6 \text{ nm}$ -es perzisztenciahossza (Kellermayer és *mtsai*, 2000) alapján kapott átlagos négyzetes végpontok közötti távolság  $\approx 3 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}^2$ , amely megfelel egy  $0,07 \mu\text{m}$ -es girációs sugárnak ( $R_G$ , (5) egyenlet).

A két módszerrel kapott érték közelítőleg megegyezik. Azonban, mind a mérések alapján becsült, mind az elméletileg számolt érték hibával terhelt, amely eltéréshez vezet. Az eltérések okai a következők lehetnek: (1) a jelölési arány alulbecsült értéke, (2) a jelölési arány tengelymenti inhomogenitása, (3) a helyi rodamin koncentráció becslésének bizonytalansága, (4) a savas közegben denaturált titinmolekuláknak az elméletileg vártnál kompaktabb konfigurációja. A továbbiakban részletesebben is tárgyaljuk a fenti tényezőket.

A jelölési arányt a rodamin-jelölt titin minta  $555 \text{ nm}$ -en mért abszorbancia értéke alapján számoltuk ki. Annak érdekében, hogy lehetőleg a teljes rodamin populáció monomer formában legyen jelen,  $6 \text{ M}$ -os  $\text{GuHCl}$  oldatban denaturáltuk a mintát. Mindazonáltal, ahogyan azt az  $\text{OD}_{518}/\text{OD}_{555}$  arány is mutatta, a dimer populáció egy kis része a denaturáns ilyen koncentrációja mellett is fennmaradt, ami a jelölési arány alulbecsléséhez vezet.

Lehetséges, bár nem tűnik valószínűnek, hogy a rodamin molekulák a titin szekvenciája mentén nem egyenletesen oszlanak el, hanem sűrűn és alig jelölt régiók

keletkeznek. Egy ilyen esetben a tényleges átlagos helyi rodamin koncentráció a becsülnél alacsonyabb, a valódi molekula térfogat pedig a becsülnél magasabb.

A helyi rodamin koncentrációt azáltal kaptuk, hogy a jelölt titin minta esetén mért  $OD_{518}/OD_{555}$  arányt összevetettük különböző koncentrációjú rodamin B és TMRIA oldatok esetén mért értékekkel. A rodamin koncentráción kívül azonban az  $OD_{518}/OD_{555}$  arányt az oldószer természete és a helyi környezet hidrofóbicitása is befolyásolja, valamint az 5- és 6-TMRIA izoformák aránya, amelyek dimerizációs tulajdonságai különbözőek (Burghardt és Ajtai, 1996). A helyi rodamin koncentráció túlbecsült értéke alulbecsült molekula térfogatot eredményez.

Végül, a savas közegben denaturált titin elméletileg becsült méreteinek kiszámításához a mechanikai módszerrel (lézercsipesz) kitekert titinmolekula perzisztenciahosszát (1,6 nm, (Kellermayer és *mtsai*, 2000)) használtuk. Nem kizárt, hogy a savas denaturáció során kitekeredett molekula perzisztenciahossza ennél kisebb, lehetővé téve, hogy a molekula egy kompakt, kis térfogatot kitöltő globális szerkezetet vegyen fel.

Hatással lehet-e a dimerek disszociációja a titin térbeli szerkezetére? Atomerő-mikroszkóppal végzett kísérletek alapján arra következtettünk, hogy a rodamin dimerek nem járulnak hozzá a titin háromdimenziós szerkezetének stabilizálásához (bővebben ld. 5.8. szakasz).

Szintén valószínűtlen, hogy a rodamin dimerek szabad rodamin molekulák titinhez kötött rodamin molekulákhoz való kapcsolódása révén jönnek létre. Ez esetben ugyanis a hozzáadott denaturáns lemosná a szabad rodamin molekulákat, és a fluoreszcencia intenzitás nem térne vissza az eredeti értékre a denaturáns eltávolítását követően.

A polimerszerkezeti számítások valamint a rodamin-jelölt titinen végzett mérések tehát azt mutatták, hogy a natív és a denaturált titinmolekula által kitöltött térfogat közel azonos. Ezt fényszórási mérések is alátámasztják, mivel a titin 400 nm-en mért fényszórási jele nem nőtt meg a denaturáció hatására.

A denaturált és natív titinmolekulák esetén mért hasonló rodamin dimer koncentráció arra utal, hogy ezekben az állapotokban hasonló a rodamin molekulák térbeli közelsége. A natív állapotban ezt a térbeli közelséget a fehérjemátrix háromdimenziós szerkezete tartja fenn. Ezzel szemben a denaturált állapotban a háromdimenziós struktúrát összetartó erők már nincsenek jelen. Ezért ez esetben a 10  $\mu\text{m}$  hosszúságú kitekeredett titin lánc (Labeit és Kolmerer, 1995) összehúzódása egy, a natív állapothoz hasonlóan kompakt alakká, a szerkezetet stabilizáló intermolekuláris erők hiányában csak

entrópiikus rugalmasság hatására képzelhető el. A kitekeredett molekula a natív állapothoz képest így jelentősen megnövekedett flexibilitással (csökkent hajlítómerevséggel) kell hogy rendelkezzen. Más megfogalmazásban, a kitekeredett titin perzisztenciahossza kisebb kell hogy legyen mint a natív molekuláé. Korábbi, dinamikus fényszórási (Higuchi és *mtsai*, 1993) és egyedi-molekula mechanikai kísérletek (Kellermayer és *mtsai*, 1997; Tskhovrebova és Trinick, 1997; Rief és *mtsai*, 1997) ugyancsak azt mutatják, hogy a kitekeredett titin perzisztenciahossza legfeljebb tizedrésze a natív molekulára jellemző értéknek.

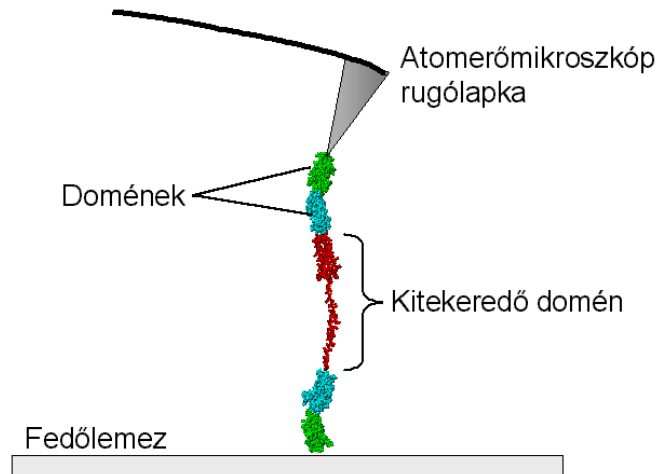
Az, hogy a kitekeredett és natív állapotú molekula által kitöltött térfogat hasonló, azt jelenti, hogy a girációs sugarak, és a köztük lévő kapcsolat miatt ((5) képlet) az átlagos négyzetes végpontok közötti távolság is közelítőleg azonos. Mivel ez utóbbira érvényes, hogy  $\langle R_v^2 \rangle = 2PL$  ( $P \ll L$  esetén), ha a kitekeredés során a molekula hossza a natív, 1  $\mu\text{m}$ -es (Nave és *mtsai*, 1989) hosszról a kitekeredett, 10  $\mu\text{m}$ -es hosszra (Labeit és Kolmerer, 1995) nő, miközben  $\langle R_v^2 \rangle$  közel állandó, a kitekeredett molekula perzisztenciahossza várhatóan kb. tizedrésze kell hogy legyen a natív molekula perzisztenciahosszának.

### 5.8. Stabilizálhatják-e a rodamin dimerek a titin szerkezetét?

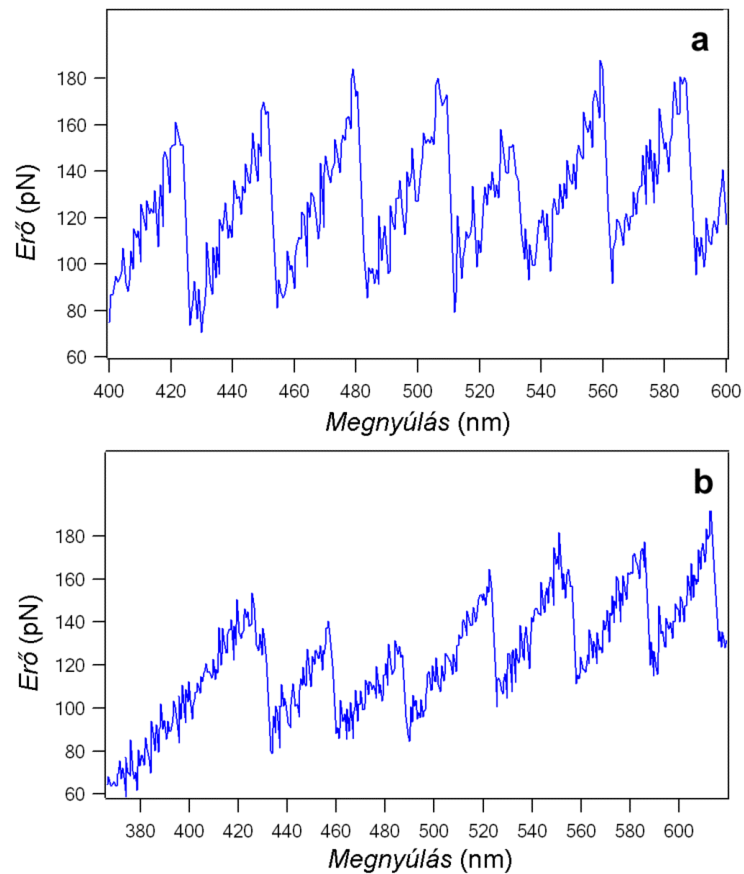
A rodamin dimereket összetartó kölcsönhatásoknak elvileg szerepük lehet a titin szerkezetének stabilizálásában: összekapcsolhatnak egymástól a szekvenciában távol eső lánc-szakaszokat, és ezen keresztül hozzájárulhatnak a titin viszonylag kicsiny térfogatba való „összetekeredéséhez”.

Hogy ezt a lehetőséget megvizsgáljuk, atomerő-mikroszkóppal végzett kísérletek során jelöletlen és rodamin-jelölt titinmolekulákat nyújtottunk meg (**33. ábra**) (Kellermayer és Grama, 2003).

A molekulák mechanikai kitekerése során felvett erő-megnyúlás görbéken megfigyelhetők voltak az egyedi domének kitekeredésére jellemző fűrészfog-szerű erőválaszok, amelyekben egy-egy kitekeredési esemény alkalmával az erő hirtelen lecsökken (**34. ábra**). A titin domének stabilitását jellemző átlagos kitekeredési erő (140-180 pN), amely a görbékről a domének kitekeredését jelző fűrészfogak csúcsértékeként olvasható le, a hibahatáron belül azonos volt a jelöletlen és TMRIA-jelölt titinmolekulák esetén.



**33. ábra.** Titinmolekulák atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtásának kísérleti elrendezése.



**34. ábra.** Natív (a) és rodamin-jelölt titin (b) atomerő-mikroszkóppal felvett kitekeredési erőspektrumai.

Ugyanakkor, a TMRIA-titin esetén mért erőspektrumokon a domén-kiteredési események mellett további erő-átmenetek nem voltak megfigyelhetők, amelyek egyes rodamin dimerek disszociációjának feleltek volna meg. Bár dimer disszociációs

események nem voltak megfigyelhetők, nem kizárt, hogy a fluoreszcens jelölés hatással lehet a titin lánc rugalmasságára, mivel egy polipeptid lánc rugalmassága függ az őt alkotó aminosavak minőségétől, így az aminosav oldalláncoktól és azok esetleges módosításaitól. Elmondható azonban, hogy a dimer-kötés energiája sokkal kisebb mint a titin domének kitekeredéséhez tartozó szabadenergia változás ( $17-28 kT$ , (Soteriou és *mtsai*, 1993b; Rief és *mtsai*, 1998a).

Mivel a rodamin-jelölt molekulák kitekeredési erőspektrumai és az átlagos kiteredési erő alapvetően hasonlóak voltak a jelöletlen molekulákéhoz, valamint a jelölt titinmolekulák megnyújtása során rodamin dimer disszociációs események nem voltak megfigyelhetők, feltételeztük, hogy a dimer-kötések nem változtatják meg szignifikánsan a titin stabilitását és konformációját.

## 5.9. Titin denaturációjának vizsgálata triptofán fluoreszcencia mérésekkel

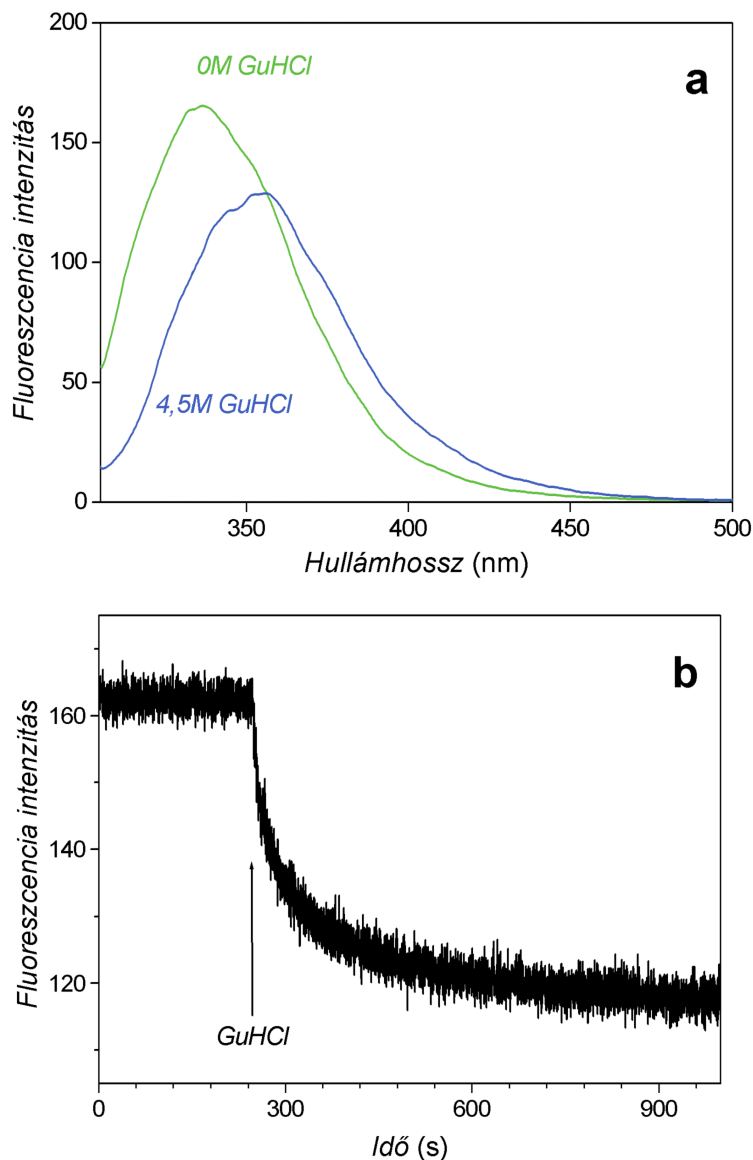
A triptofán aminosavak szinte minden fehérjében megtalálható belső (intrinsic) fluofórok. A triptofán igen érzékeny az oldószer polaritására, ezért a triptofán aminosavak emissziós spektruma tükrözi környezetének polaritását. A denaturáció során megváltozott környezeti tényezők hatására megváltozik a triptofán fluoreszcencia intenzitása és a maximális intenzitáshoz tartozó hullámhossz. Ily módon a triptofán fluoreszcencia kinetikája azonosnak tekinthető a denaturáció kinetikájával.

Méréseinkben követtük a triptofán fluoreszcencia időbeni változását a denaturáció során, hogy megvizsgáljuk, megegyezik-e a triptofán fluoreszcencia kinetikája a kémiai denaturáció során tapasztalt TMRIA fluoreszcencia növekedés kinetikájával (Grama és *mtsai*, 2001a). A méréseket jelöletlen titinen végeztük. 4,5 M GuHCl hatására a 340 nm-en mért emissziós intenzitás 25%-al csökkent, az emissziós spektrum maximuma pedig 16 nm-el a vörös felé tolódott (**35a. ábra**). Mindez arra utal, hogy a fehérjében található triptofán aminosavak fluoreszcenciája kioltás révén csökkent, valószínűleg mivel a denaturáció során megnőtt azok oldószerrel szembeni hozzáférhetősége (Lakowicz, 1999).

A kémiai denaturáció kinetikája viszonylag lassú volt (**35b. ábra**). A kinetikai görbe legjobban dupla exponenciális függvénnyel volt illeszthető, az így kapott időállandók, 26,9 s ( $\pm 0,7$  SEM) és 234 s ( $\pm 4$  SEM) mintegy két nagyságrenddel nagyobbak, mint a hasonló körülmények között egyedi molekulákon mért TMRIA intenzitásnövekedés



időálló. Ez ugyancsak arra utal, hogy a TMRIA fluoreszcencia gyors változásáért nem a fehérjelánc kitekeredése, hanem a rodamin dimerek szétesése a felelős (ld. 5.7. szakasz).



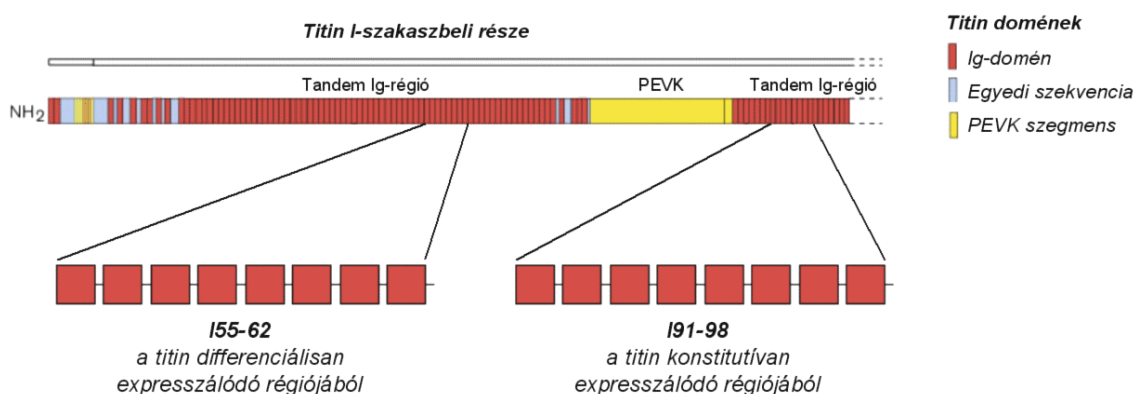
**35. ábra. a.** Jelöletlen titin minta triptofán fluoreszcencia emissziós spektruma denaturáció előtt (0 M GuHCl) és után (4,5 M GuHCl). **b.** A triptofán fluoreszcencia csökkenés kinetikája. A nyíl a denaturáns hozzáadásának időpontját jelzi.

A triptofán fluoreszcencia mérésén keresztül vizsgált savas denaturáció a guanidinhidrokloriddal történő denaturációhoz képest gyors volt, és a változások még a minta denaturáns oldattal történő összekeverése alatt (~1 s) lezajlottak, így a folyamat időállóságát nem tudtuk meghatározni. A 340 nm-en mért fluoreszcencia intenzitás a pH 1,0 értékig való csökkentése nyomán 16%-al csökkent, a maximális intenzitáshoz

tartozó hullámhossz pedig 7 nm-es vöröseltolódást mutatott. A lecsökkent intenzitás oka valószínűleg az oldószer általi fluoreszcencia kioltás növekedése, a triptofán aminosavak exponáltságának növekedése miatt. A paraméterek közötti különbségek azt mutatják, hogy a kémiai és savas módszerrel denaturált fehérje állapota különböző a triptofán aminosavak exponáltsági fokát és a triptofán környezetének polaritását illetően.

## 5.10. Titin fragmentumok termodinamikai stabilitásának vizsgálata

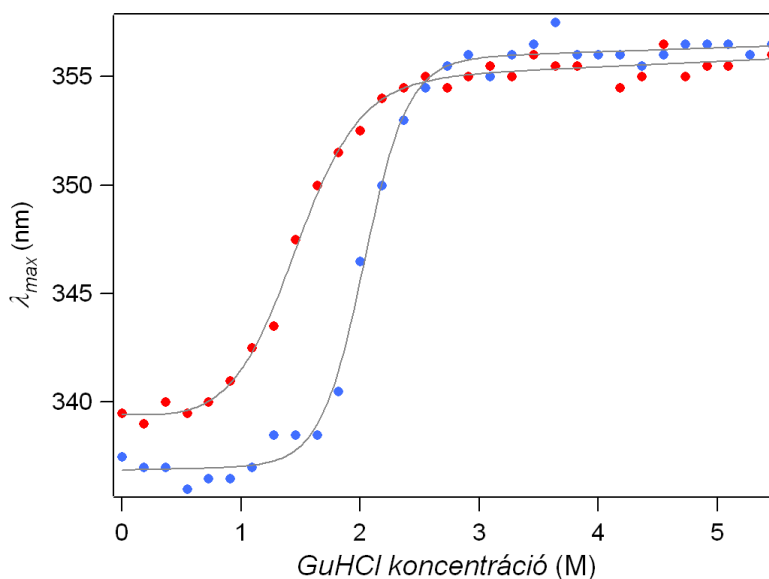
A titin I-szakaszának konstitutívan illetve differenciálisan expresszáldó részéből származó domén oktamerek (I91-98 és I55-62, **36. ábra**) kémiai denaturációval szembeni stabilitását egyensúlyi denaturációs mérésekkel vizsgáltuk.



**36. ábra.** A titin differenciálisan illetve konstitutívan expresszáldó részéből származó domén oktamerek (I55-62 és I91-98) elhelyezkedése a vázizom titin domén-struktúrája mentén.

Különböző denaturáns (GuHCl) koncentrációk mellett felvettük a minta fluoreszcencia emissziós spektrumát, és a triptofán fluoreszcencia emisszió csúcsának paramétereit elemeztük. A vizsgált oktamerekben a triptofán aminosavak száma 6 (I91-98) illetve 9 (I55-62).

A natív oktamerek esetén mért triptofán emissziós spektrumok maximumához tartozó hullámhossz ( $\lambda_{max}$ ) 337 nm (I91-98) illetve 340 nm (I55-62) volt a két oktamer esetén. Denaturáció hatására a  $\lambda_{max}$  értékek 19 illetve 16 nm-es vöröseltolódást mutatnak, 6 M denaturáns koncentráció mellett elérve a 356 nm-t (**37. ábra**), amely megegyezik a triptofán vízben mért  $\lambda_{max}$  értékével.

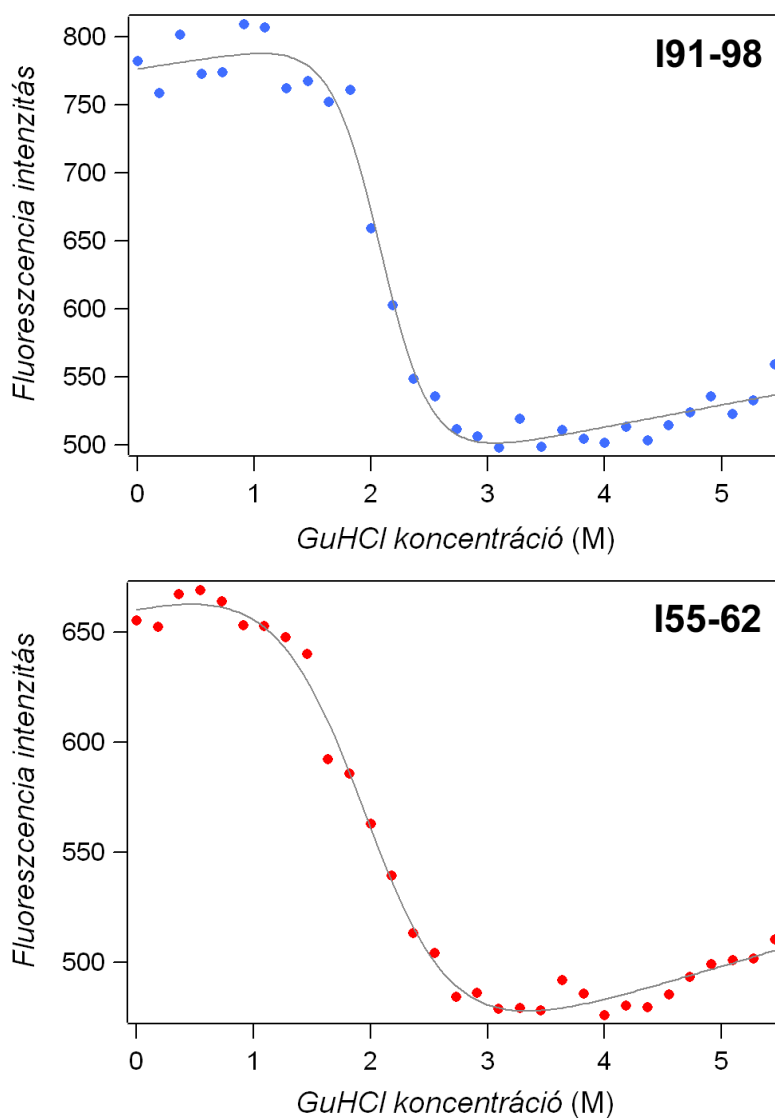


**37. ábra.** Az I91-98 (kék) és I55-62 (piros) titin oktamerok maximális triptofán fluoreszcencia intenzitásához tartozó hullámhossz változása a denaturáns (GuHCl) koncentráció függvényében.

Mivel a  $\lambda_{max}$  értéke érzékeny a helyi környezetre, illetve annak polaritására, és összefügg a kromofór oldószerrel szembeni hozzáférhetőségével, ez arra utal, hogy natív állapotban a triptofán aminosavak a fehérjemátrix belsejében, hidrofób fejrjekörnyezetben találhatóak (Lakowicz, 1999; Vivian és Callis, 2001). Az, hogy denaturációt követően  $\lambda_{max}$  értéke a triptofán vizes közegben mért értékével azonos, azt mutatja, hogy a kitekeredés során a triptofán aminosavak teljesen exponálttá váltak a vizes oldószerrel szemben.

A felvett spektrumokról leolvasott 340 nm-en mért intenzitásértékek a denaturáció során 34%-al (I91-98), illetve 25%-al (I55-62) csökkentek. A csökkenés oka valószínűleg az oldószerrel szembeni fokozott hozzáférhetőség során ugyancsak megnövekedett kioltás.

A **38. ábra** a 340 nm-en mért triptofán fluoreszcencia intenzitás-értékeket mutatja a denaturáns koncentráció függvényében a két oktamer esetén.



**38. ábra.** A triptofán fluoreszcencia intenzitás ( $\lambda_{em} = 340$  nm) denaturáns (GuHCl) koncentrációtól való függése az I91-98 (kék) és az I55-62 (piros) titin oktamer esetén. Szürkével ábrázoltuk a mérési pontokra illesztett görbéket (4.4. szakasz, (17) egyenlet).

Az analízis során feltételeztük, hogy egy-egy oktameren belül a domének stabilitása hasonló, amit alátámaszt a domének aminosav szekvenciájának nagyfokú hasonlósága, valamint azt, hogy a domének kitekeredése egymástól függetlenül zajlik. A mérési pontokra illesztett görbék alapján (4.4. szakasz, (17) egyenlet) meghatároztuk a denaturációhoz tartozó termodinamikai paramétereket. A két fehérjefragmentumon belül a domének stabilitását jellemző denaturációs szabadentalpia változás denaturáns távollétében ( $\Delta G_{H_2O}$ ) 5,7 ( $\pm 1,0$ ) kcal/mol illetve 2,5 ( $\pm 0,4$ ) kcal/mol volt az I91-98 illetve I55-62 oktamer esetén.

A titin I91 (régi számozás szerint I27) és I96 közötti szakaszában található, egyedi Ig domének stabilitásának vizsgálata 2,5 és 7,3 kcal/mol (Politou és *mtsai*, 1995) illetve 1,7 és 6,5 kcal/mol (Scott, Department of Chemistry, Cambridge University)  $\Delta G_{H_2O}$  értékeket mutatott. Az irodalomban teljes titinre közölt hasonló paraméterek  $\sim 10$  kcal/mol/domén (Soteriou és *mtsai*, 1993a) és 3,0-3,5 kcal/mol/domén (King, 1994). Az utóbbi két közlemény nemcsak a fenti értékek tekintetében különbözik: Soteriou és *mtsai* guanidin-hidrokloriddal történő denaturáció esetén két egymást követő átmenetet figyeltek meg 0,1 M és 1,3 M GuHCl koncentrációnál, míg King eredményei egyetlen átmenetet mutatnak a 2,5 M GuHCl koncentráció környezetében. Saját, jelen disszertációban nem bemutatott, teljes titinen végzett méréseink ez utóbbi eredményt támasztják alá.

A fenti eredmények alapján, bár a két oktamer kémiai denaturációjához tartozó  $[\text{denat}]_{50\%}$  érték (a denaturáns koncentráció, amely mellett a fehérjemennyiség 50%-a denaturálódik, ld. 4.4. szakasz) csak kis mértékben különbözik ( $2,08 \pm 0,04$  M az I91-98, és  $1,83 \pm 0,09$  M az I55-62 esetén), a jelentősen különböző denaturációs szabadenergia változás azt mutatja, hogy az I55-62 oktamer doménjeinek termodinamikai stabilitása lényegesen kisebb, mint az I91-98 oktamert alkotó doméneké. A 38. ábrán megfigyelhető, hogy az I55-62 oktamerhez tartozó átmenet kevésbé meredek, mint az I91-98 oktamerhez tartozó. Ez alapján nem kizárt, hogy az előbbit alkotó domének stabilitása különböző, így, bár a görbében lépések nem figyelhetők meg, lehetséges hogy az átmenet kiszélesedését a különböző denaturáns koncentrációknál kitekeredő domének átmeneteinek szuperpozíciója okozza.

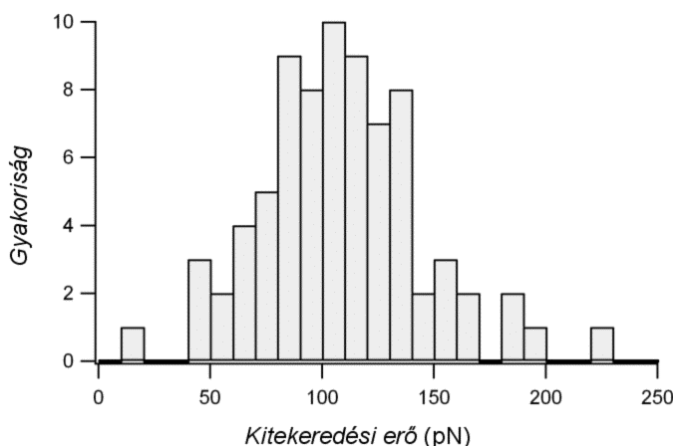
### 5.11. Titin fragmentumok mechanikai stabilitásának vizsgálata

Hogy információt kapjunk az Ig domének differenciális expressziójának funkcionális jelentőségéről, megvizsgáltuk a titin megnyújtható régiójából származó domén-nyolcas (oktamer) mechanikai tulajdonságait. A vizsgált oktamer (I55-62) a titin differenciálisan expresszálódó tandem Ig régiójának részét képezi. A mechanikai tulajdonságok vizsgálata érdekében az oktamert atomerő-mikroszkóp segítségével nyújtottuk meg.

A megnyújtás során kapott erő-megnyúlás görbéken megfigyelhető volt a moduláris fehérjék megnyújtására jellemző fűrészfog-szerű alak, ahol az egyes csúcsok az egyes domének kitekeredéséhez tartoznak. A mechanikai stabilitás vizsgálata során

meghatároztuk a doménekhez tartozó átlagos kitekeredési erőket, valamint a kitekeredési erők nyújtási sebességtől való függését, és ezt összevetettük a titin konstitutívan expresszáldó tandem Ig régiójából származó doménekre és domén-sorozatokra vonatkozó irodalmi adatokkal.

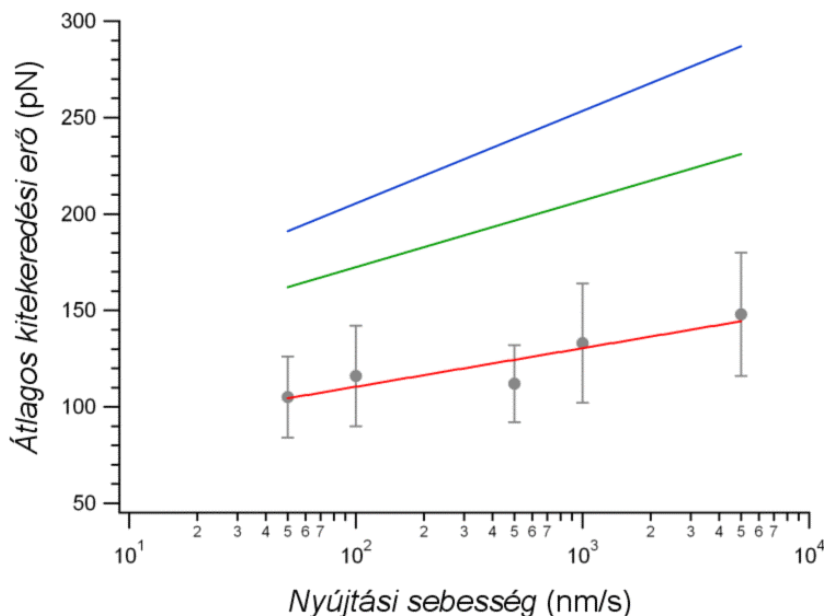
Az 500 nm/s nyújtási sebességhez tartozó kitekeredési erő-eloszlást az **39. ábra** mutatja.



**39. ábra.** Az I55-62 titin oktamer doménjeihez tartozó kitekeredési erők eloszlása 500 nm/s nyújtási sebesség mellett.

A tapasztalt 110 pN ( $\pm 20$  pN SD) nagyságú átlagos kitekeredési erő jelentősen alacsonyabb, mint az azonos nyújtási sebesség esetén (1) az I91-98 oktamerre (237 pN, (Rief és mtsai, 1998b),  $\sim 240$  pN (Watanabe és mtsai, 2002)), (2) az I65-70 hexamerre ( $\sim 200$  pN (Watanabe és mtsai, 2002)) vagy (3) az egyedi I91 és I92 doménekre (204 pN és 257 pN (Li és mtsai, 2000)) korábban kapott értékek. A különbség azt mutatja, hogy az adott nyújtási sebesség mellett az I55-62 oktamert alkotó domének mechanikai stabilitása jóval alacsonyabb, mint a fenti doméneké vagy domén-sorozatoké.

A továbbiakban megvizsgáltuk az átlagos kitekeredési erők nyújtási sebességtől való függését. A zérus külső erőhöz tartozó kitekeredési sebességi állandó ( $k_0$ ) és az átmeneti állapot reakciókoordinátán elfoglalt helyének meghatározása érdekében a kísérleti adatokat Monte-Carlo szimulációval modelleztük (a módszer leírását ld. Rief és mtsai, 1997, és 4.5. szakasz). A kapott eredményeket a **40. ábra** mutatja.



**40. ábra.** Az I55-62 titin oktamer doménjeihez tartozó átlagos kitekeredési erők nyújtási sebességtől való függése (szürke pontok, a hibahatárok a szórást (SD) jelzik), valamint az adatokat reprodukáló Monte-Carlo szimuláció során kapott görbe (piros). Összehasonlításképpen feltüntettük a titin konstitutívan expresszáldó I91-98 oktamerjéhez (kék) illetve differenciálisan expresszáldó I65-70 hexamerjéhez tartozó hasonló görbét (Watanabe és *mtsai*, 2002 nyomán).

A kísérleti adatokat legjobban reprodukáló szimuláció során kapott értékek:  $k_0 = 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , és  $\Delta x = 0,45 \text{ nm}$ . A 40. ábrán összehasonlításképpen feltüntettük a korábban, az I91-98 oktamerre és I65-70 hexamerre kapott függvényeket (Watanabe és *mtsai*, 2002). Az ezen domén-sorozatok kísérleti adatainak Monte-Carlo szimulációja során kapott megfelelő paraméterek:  $k_0 = 6,1 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , és  $\Delta x = 0,25 \text{ nm}$  (I91-98), valamint  $k_0 = 1,0 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , és  $\Delta x = 0,35 \text{ nm}$  (I65-70). Az általunk vizsgált oktamerre kapott  $k_0$  érték a fenti értékeknél nagyobb, tehát a zérus erőhöz tartozó denaturációs szabadentalpia változás kisebb (ld. 4.5. szakasz), ami arra utal, hogy az I55-62 mechanikai stabilitása is kisebb. A nagyobb  $\Delta x$  érték azt jelzi, hogy az I55-62 esetén a kitekeredési erők jobban függenek a nyújtási sebességtől, és arra utal, hogy a denaturációs szabadentalpia profilon (**13. ábra**) az átmeneti állapot az  $x$  reakciókoordináta mentén távolabb esik, azaz jobban különbözik a natív állapottól, mint az említett további domén-sorozatok esetén.

A jelen és az előző szakaszban leírt eredmények alapján a titin differenciálisan expresszáldó tandem Ig szakaszából származó domén oktamer (I55-62) mechanikai és

kémiai stabilitása egyaránt jelentősen alacsonyabb, mint a konstitutívan expresszáldó tandem Ig szegmensből származó domén oktameré (I91-98).

Mivel a konstitutívan expresszáldó tandem Ig szegmens mintegy meghosszabbítja a titin megnyújtható szakaszát a titin adott izoformáiban (ld. **5. ábra**), ezáltal csökkenti a molekula relatív megnyúlását (a végpontok közötti távolság és a szakasz kontúrhosszának aránya), és a passzív izomerőt. Viszonylag nagy passzív izomerő kialakulásakor a differenciálisan expresszáldó szakasz doménjei (pl. I55-62) nagyobb valószínűséggel tekerednek ki, mint a konstitutívan expresszáldó szakasz doménjei (pl. I91-98). Mivel a konstitutív régió doménjeinek kitekeredése nagyobb kontúrhossz növekedéssel jár, mint a konstitutív régió esetén (Watanabe és *mtsai*, 2002), előbbi esetben a passzív izomerő csökkenés is nagyobb. Így, további Ig domének beiktatása a titin adott izoformáiban, a domének szelektív kitekeredése révén egy mechanizmust szolgáltat a passzív izomerő csökkentésére, és a titin konstitutívan expresszáldó doménjei kitekeredésének megelőzésére.



## 6. Az eredmények tételes felsorolása

(1) Fluoreszcensen jelölt, felszín-adszorbeált titinmolekulák alakja és mérete nem oldható fel mikroszkópos képalkotás során, méretüknek csak egy felső korlátja adható meg.

(2) A felszín-adszorpció kinetikájának vizsgálata segítségével – egy új módszerrel – meghatároztuk a titin diffúziós állandóját ( $D = 4,8 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ ), valamint a molekula perzisztenciahosszát ( $P = 26 \text{ nm}$ ).

(3) A mikroszkópos kép alapján a fluoreszcensen jelölt megnyújtott titinmolekulák szerkezete heterogén: a fényes szakaszok közé ékelődött halvány részek valószínűleg a PEVK szegmens és/vagy kitekeredett domén-sorozatok képei.

(4) A megnyújtás időbeni vizuális követése alapján a titin különböző rugalmasságú szakaszok sorbakapcsolt sorozata, amelyekben adott erőknél szerkezeti átmenetek figyelhetők meg.

(5) Rodamin-jelölt titinmolekulákon magas koncentrációban rodamin dimerek jelennek meg, valószínűleg a kis térfogatba összehúzódott jelölt titinmolekula által létrehozott magas helyi rodamin koncentráció miatt.

(6) A dimerek kémiai denaturáns (GuHCl) hatására disszociáltak. A disszociációt kísérő fluoreszcencia intenzitásnövekedés oka a dimerekben fellépő önkiváltás megszűnése. A dimerek disszociációja ez esetben nem a fehérjeszerkezet megváltozása, hanem elsősorban a denaturáns közvetlen hatása miatt következik be.

(7) Savas denaturáció esetén a dimerek aránya csak kismértékben változott meg. Ez arra utal, hogy a denaturáció során a molekulában végbemenő szerkezeti változások ellenére a polipeptidlánc által kitöltött térfogat nem vagy csak alig változott meg, ami a kitekeredett fehérjelánc megnövekedett flexibilitásával magyarázható.

(8) A rodamin-jelölés és a dimerek szerkezetmódosító hatása az atomerő-mikroszkópos mérések alapján nem volt kimutatható.

(9) A titin differenciálisan expresszáldó szakaszából származó domén oktamer (I55-62) mind termodinamikai mind mechanikai szempontból kevésbé stabil, mint a konstitutív régióból származó domén oktamer (I91-98), ami arra utal, hogy a titin I-szakaszának hossza mentén nemcsak az entrópiikus rugalmasság, hanem a domén-stabilitás is heterogén eloszlású.

## 7. Összefoglalás és perspektívák

Munkánk során fluoreszcensen jelölt titinen végzett vizsgálatokkal jellemeztük a titin szerkezetét, illetve a kitekeredéskor bekövetkező szerkezeti változásokat. Az alkalmazott, elsősorban fluoreszcencián alapuló módszerekkel egyedi molekulákon (konfokális mikroszkóp, erőmérő atomerő-mikroszkóp), és molekulasokaságon végeztünk vizsgálatokat (spektrofotometria, fluoreszcencia spektroszkópia).

Eredményeink alapján a titin globális konfigurációja vizsgálható a fehérjéhez kötött rodamin dimerek fluoreszcenciáján keresztül molekulasokaság és egyedi molekulák szintjén egyaránt. A natív titinmolekulákon magas koncentrációban vannak jelen rodamin dimerek, feltehetően a viszonylag kis térfogatra összehúzódott molekula, és az így kialakult magas helyi rodaminkoncentráció miatt. Savas denaturáció során a viszonylag magas dimer-monomer arány megőrződött, ami arra utal, hogy a folyamatban a molekula által kitöltött térfogat közel azonos marad. Elméleti megfontolások alapján a denaturáció során kitekeredett fehérjelánc, és az így létrejött, számottevően megnövekedett kontúrhosszú polimer csak akkor foglalhat el közel változatlan térfogatot, ha a lánc flexibilitása a folyamat során ugyanilyen mértékben megnő, más szóval hajlítómerevsége, vagy perzisztenciahossza csökken.

A kitekeredett titin lánc tehát lényegesen (kb. 10×) nagyobb flexibilitással rendelkezik a natív titinhez képest. A kitekeredett titin domének vagy a kvázi kitekeredett szakaszok (PEVK) nagy flexibilitása fontos szerepet játszhat a harántcsíktolt izom passzív mechanikai tulajdonságainak meghatározásában. Egy rugalmasabb polimerlánc megnyújtásához nagyobb erők szükségesek mint egy merevebb polimerlánc megnyújtásához (ld. 4.1. szakasz). Bár még vita tárgyát képezi, hogy fiziológiai körülmények között létrejönnek-e domén-kitekeredési események (Trombitás és *mtsai*, 1998b; Helmes és *mtsai*, 1999), valószínű, hogy egyes domének kitekeredése bekövetkezik a vázizom szarkomer patológiás túlnyúlása, illetve a szívizom normális működése során. A denaturált domének megnövekedett flexibilitása a kontúrhossz-növekedéssel együtt egy biztonsági mechanizmust szolgáltat, amely megakadályozza a molekula további részeinek denaturációját, és segíti a domének visszatekeredését a viszonylag kis térfogatba történő összehúzódás révén, amikor a nyújtó hatás megszűntével a molekula elernyed, meglazul. Valószínű, hogy vázizomban

a titin differenciálisan expresszáldó szakasz doménjei (kisebb stabilitásuk miatt) előbb tekerednek ki, mint a konstitutív régió doménjei.

Munkánk a titin rugalmas tulajdonságainak és a mögöttük álló szerkezeti háttér feltérképezéséhez kívánt hozzájárulni. Egyedi titinmolekulák nagyfelbontású leképezését korábban is elvégezték elektronmikroszkópos vizsgálatok segítségével (Trinick és *mtsai*, 1984). Mindazonáltal, az általunk alkalmazott módszer, fluoreszcensen jelölt titin vizsgálata, azt az előnyt nyújtja a korábbi vizsgálatokkal szemben, hogy a molekulák vizes fázisban, a természetes környezetükhöz sokkal inkább hasonló közegben vizsgálhatók, valamint lehetőség nyílik egyedi molekulák és molekulásokaság szintjén végzett vizsgálatokra egyaránt. A fluoreszcens mikroszkópok felbontása sajnos nem teszi lehetővé az egyedi molekulák struktúrális részleteinek feltérképezését, azonban így is lehetőség nyílik alaki és hidrodinamikai paraméterek meghatározására, és megnyújtott molekulákban megjelenő szerkezeti heterogenitás vizsgálatára. Egyedi, fluoreszcensen jelölt molekulák vizsgálata és a digitális képanalízis alkalmazása lehetővé teszi a vizsgált populációk kísérletező által megszabott feltételek szerinti kiválasztását, pl. aggregátumok kiszűrését, vagy más, fluoreszcensen jelölt fehérjékkel történő kölcsönhatás vizsgálatát.

A rodamin dimerek arányának vizsgálata lehetőséget adott arra, hogy a fluoreszcencia intenzitás illetve a spektrális tulajdonságok felhasználásával a molekula globális szerkezetére illetve szerkezeti változásokra következtethessünk. A rodamin dimérek képződés jelensége nem ismeretlen, alkalmazására azonban viszonylag kevés a példa (pl. Hamman és *mtsai*, 1996). A módszer egy ígéretes, bár technikailag nagy kihívást jelentő alkalmazása lehet a nagyérzékenységű és nagyfelbontású fluoreszcens képalkotás molekulamanipulációs módszerekkel (pl. erőmérésre alkalmas lézercsipesz) történő kombinációja, amely lehetővé tenné fluoreszcencia intenzitás változások és molekuláris erők korrelációjának vizsgálatát. Egy ilyen rendszerben a TMRIA-jelölt titin megnyújtásának hatására a fluorofórok várható tengelymenti „kihígulása” miatt a fluoreszcencia átmeneti növekedése lenne megfigyelhető. Az egyidejű fluoreszcenciás és pásztázó atomerő-mikroszkóppal megvalósított nagyfelbontású felszín-topográfiai képalkotás révén a megfigyelt heterogén fluoreszcencia intenzitáseloszlást kapcsolatba hozhatnánk adott szerkezeti elemekkel. Továbbá, fluoreszcens, szekvencia-specifikus ellenanyagok alkalmazásával a mechanikailag generált intramolekuláris szerkezeti változások egyedi molekuláris szinten lokalizálhatóak lennének a titin szekvenciája mentén.

## 8. Az értekezés témakörébe tartozó saját közlemények

### 8.1. Eredeti közlemények

1. Grama L, Somogyi B, Kellermayer MSZ (2001). Global configuration of single titin molecules observed through chain-associated rhodamine dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(25):14362-14367. IF: 10,789.
2. Grama L, Somogyi B, Kellermayer MSZ (2001). Direct visualization of surface-adsorbed single fluorescently labeled titin molecules. *Single Molecules*. **2**(2):79-83.
3. Kellermayer MSZ, Grama L (2003). Stretching and visualizing titin molecules: combining structure, dynamics and mechanics. *J Muscle Res Cell Motil*. **23**:499-511. IF: 1,460.

### 8.2. Referált folyóiratban megjelent absztraktok

1. Kellermayer MSZ, Grama L, Somogyi B (2000). Direct visualization of the extensibility of fluorescently labeled titin molecules. *Biophysical Society 44th Annual Meeting*. New Orleans, USA. In *Biophysical Journal*. **78**:392a.
2. Grama L, Somogyi B, Kellermayer MSZ (2001). Denaturation of titin followed through rhodamine dimer formation and tryptophan fluorescence. *XXX. European Muscle Conference*. Pavia, Italy. In *J Muscle Res Cell Motil*. **22**:604.
3. Kellermayer MSZ, Grama L, Smith S, Bustamante C, Granzier HL, Somogyi B (2001). Elastic properties of titin explored with single-molecule imaging and mechanical manipulation. *XXX. European Muscle Conference*. Pavia, Italy. In *J Muscle Res Cell Motil*. **22**:603.
4. Grama L, Somogyi B, Kellermayer MSZ (2001). Global configuration and flexibility of fluorescently labeled titin molecules. *Biophysical Society 45th Annual Meeting*. Boston, USA. In *Biophysical Journal*. **80**:277a.
5. Nagy A, Grama L, Málnási-Csizmadia A, Kellermayer MSZ (2003). Expression and single molecule mechanics of skeletal muscle titin's PEVK segment. *Biophysical Society 47th Annual Meeting*. San Antonio, USA. In *Biophysical Journal*. **84**:563a.

6. Grama L, Nagy A, Málnási-Csizmadia A, Kellermayer MSZ (2003). Mechanical stability of an eight-domain segment in titin's differentially-spliced tandem Ig-region. *Biophysical Society 47th Annual Meeting*. San Antonio, USA. In *Biophysical Journal*. **84**:563a.

### 8.3. Egyéb absztraktok

1. Kellermayer MSZ, Grama L, Somogyi B (1999). Fluoreszcenciás mérések egyedi fehérjemolekulákon. *Országos Lumineszcencia Spektroszkópai Konferencia*. Pécs.
2. Grama L, Somogyi B, Kellermayer MSZ (2000). Fluoreszcensen jelölt titinmolekulák globális szerkezetének és flexibilitásának vizsgálata. *Országos Lumineszcencia Spektroszkópai Konferencia*. Pécs.
3. Kellermayer MSZ, Grama L, Granzier HL, Somogyi B (2001). Global configuration of single titin molecules observed through chain-associated rhodamine dimers. *Single Molecules in Biophysics and Drug Discovery*. Linz, Austria.
4. Grama L, Somogyi B, Kellermayer MSZ (2001). Direct visualization of surface-adsorbed single fluorescently labeled titin molecules. *III. Annual Linz Winter Workshop*. Linz, Austria.
5. Grama L, Nagy A, Málnási-Csizmadia A, Kellermayer MSZ (2003). A titin tandem Ig régiójából származó domén-oktamer mechanikai stabilitásának vizsgálata. *XXXIII. Membrántranszport Konferencia*. Sümeg.

## 9. Az értekezéshez nem kapcsolódó saját közlemények

### 9.1. Eredeti közlemények

1. Balázs M, Grama L, Balogh P (1999). Detection of phenotypic heterogeneity within the murine splenic vasculature using rat monoclonal antibodies IBL-7/1 and IBL-7/22. *Hybridoma*. **18**(2):177-182. IF: 0,587.
2. Visegrády A, Grama L, Somogyi B, Lustyik G (2000). Characterization of intracellular calcium oscillations induced by extracellular nucleotides in HEp-2 cells. *J Photochem Photobiol B*. **58**(2-3):80-86. IF: 1,529.
3. Lantos J, Grama L, Orosz T, Temes G, Róth E (2001). Leukocyte CD11a expression and granulocyte activation during experimental myocardial ischemia and long lasting reperfusion. *Experimental and Clinical Cardiology*. **6**(2):72-76.
4. Balázs M, Horváth G, Grama L, Balogh P (2001). Phenotypic Identification and Development of Distinct Microvascular Compartments in the Postnatal Mouse Spleen. *Cell Immunol*. **212**(2):126-137. IF: 2,206.
5. Gyöngyi Z, Grama L, Nádasi E, Sándor J, Németh A, Varga C, Kiss I, Ember I (2002). Flow cytometric analysis of DMBA-induced early in vivo ras expression. *In Vivo*. **16**(5):323-326. IF: 0,970.

### 9.2. Referált folyóiratban megjelent absztraktok

1. Grama L, Málnási-Csizmadia A, Bagshaw CR, Kellermayer MSZ (2002). Mechanical manipulation of single green fluorescent protein homopolymer molecules. *Biophysical Society 46th Annual Meeting*. San Francisco, USA. In *Biophysical Journal*. **82**:193a.

### 9.3. Egyéb absztraktok

1. Grama L, Lustyik G (1997). The effect of the oxygen derived free radicals on the cellular electrolyte homeostasis and intracellular pH. *18th National Meeting of the Hungarian Biophysical Society*. Pécs.

2. Grama L, Faust Z, Lustyik G (1997). A method for cell by cell autofluorescence correction. *V. FACS Users Meeting*. Pula, Croatia.
3. Grama L, Újhelyi E, Berki T, Kumánovics G, Lustyik G (1997). Evaluation of different permeabilizing techniques for the detection of intracellular antigens and surface receptors. *18th National Meeting of the Hungarian Biophysical Society*. Pécs.
4. Grama L, Róth E, Temes G, Somogyi B, Lustyik G (1998). The effect of the ischemia-reperfusion injury on the electrolyte homeostasis of heart muscle cells: an X-ray microanalytical study. *2nd International Symposium on Myocardial Cytoprotection*. Pécs.
5. Visegrády A, Grama L, Somogyi B (1998). Intracelluláris Ca<sup>2+</sup> oszcillációk vizsgálata számítógépes szimulációval. *XXVIII. Membrántranszport Konferencia*. Sümeg.
6. Grama L, Görömbey P, Gellért T, Lustyik G (1998). Flow cytometry data analysis using FCAP Basic, a high level programming language. *International Society for Analytical Cytology XIX International Congress*. Colorado Springs, USA.
7. Grama L, Lustyik G (1998). Az MTDQ-DA antioxidáns nem csökkenti a szívműködés elektrolit háztartás zavarait kutya infarktus modellben. *XXVIII. Membrántranszport Konferencia*. Sümeg.
8. Visegrády A, Grama L, Halasi S, Lustyik G, Somogyi B (1999). Az extracelluláris Ca<sup>2+</sup> koncentráció-változás és a rianodin hatása ATP-vel stimulált HEp-2 sejtek [Ca<sup>2+</sup>]-oszcillációjára. *Magyar Biofizikai Társaság XIX. Vándorgyűlése*. Kecskemét.
9. Grama L, Visegrády A, Lustyik G, Somogyi B (1999). Az intracelluláris pH meghatározása K562 és Hep G2 sejtekben: mérések áramlási citométerrel és konfokális mikroszkóppal. *Magyar Biofizikai Társaság XIX. Vándorgyűlése*. Kecskemét.
10. Visegrády A, Grama L, Halasi S, Lustyik G, Somogyi B (1999). Citoplazmatikus [Ca<sup>2+</sup>] oszcillációk ATP-vel stimulált HEp-2 sejtekben. *XXIX. Membrántranszport Konferencia*. Sümeg.
11. Grama L, Lustyik G, Somogyi B (1999). Intracelluláris ionkoncentrációk változásai szívműködésben in vivo iszkémia-reperfúziós károsodás során. *Magyar Biofizikai Társaság XIX. Vándorgyűlése*. Kecskemét.

12. Lantos J, Róth E, Grama L, Temes G (2000). Changes of differential leukocyte counts and expression of CD11a/CD18 during healing of experimental myocardial infarction. *8th Alpe Adria Cardiology Meeting*. Portoroz, Slovenia.
13. Pesti M, Gazdag Z, Fekete Z, Nyitrai M, Grama L, Somogyi B (2000). Effects of altered intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion production on chromate sensitivity and tolerance of fission yeast. *XXVIII. Vyrocná Konferencia O Kvasinkách*. Smolenice, Slovakia.
14. Gyöngyi Z, Grama L, Varga C, Ember I (2000). Áramlási citometria a prevencióban. *Magyar Higiénikusok Társasága Nemzeti Kongresszusa*. Debrecen.
15. Gyöngyi Z, Grama L, Ember I (2000). Investigation of p53 and Ha-ras gene expression changes as biomarkers of carcinogenic exposure. *Tumor Prevention and Genetics*. St. Gallen, Switzerland.
16. Lantos J, Róth E, Grama L, Temes G (2000). Leukocyte CD11a expression and granulocyte activation as markers of cellular interaction during experimental myocardial ischemia and reperfusion. *III. International Symposium on Myocardial Cytoprotection*. Pécs.
17. Visegrády A, Grama L, Lustyik G, Somogyi B (2000). Extracellular nucleotide-induced calcium oscillations and waves in HEp-2 human epithelial cells. *ISAC XX. International Congress*. Montpellier, France.
18. Grama L, Gecsei G, Tóth Z, Győrimolnár I, Papp L, Kellermayer MSZ (2002). Humán szívizom miozin mechanikai funkciójának vizsgálata molekuláris modellrendszerben. *Magyar Kardiológusok Társasága 2002. évi Tudományos Kongresszusa*. Balatonfüred.
19. Grama L, Málnási-Csizmadia A, Bagshaw CR, Kellermayer M (2002). Egyedi zöld fluoreszcens fehérje homopolimer molekulák mechanikai manipulációja. *XXXII. Membrántranszport Konferencia*. Sümeg.



## 10. Hivatkozott irodalom

1. Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S (2001). 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.* **89**(11):1065-1072.
2. Baranova EG (1965). On the concentration quenching of the luminescence of rhodamine 6G solutions. *Op Spectrosc.* **18**:230-234.
3. Bell GI (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science.* **200**(4342):618-627.
4. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-254.
5. Burghardt TP, Ajtai K (1996). The conformation of xanthene dyes in the myosin sulfhydryl one binding site. Part I. Methods and model systems. *Biophys Chem.* **60**(3):119-133.
6. Bustamante C, Marko JF, Siggia ED, Smith S (1994). Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science.* **265**(5178):1599-1600.
7. Cantor CR, Schimmel PR (1980). *Biophysical Chemistry. Part III. The behavior of biological macromolecules.* W.H. Freeman and Co., San Francisco.
8. Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Fowler SB, Marszalek PE, Broedel SE, Clarke J, Fernandez JM (1999). Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**(7):3694-3699.
9. Cazorla O, Freiburg A, Helmes M, Centner T, McNabb M, Wu Y, Trombitas K, Labeit S, Granzier H (2000). Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res.* **86**(1):59-67.
10. Clarke J, Fersht AR (1993). Engineered disulfide bonds as probes of the folding pathway of barnase: increasing the stability of proteins against the rate of denaturation. *Biochemistry.* **32**(16):4322-4329.
11. Doi M, Edwards SF (1986). *The Theory of Polymer Dynamics.* Clarendon Press, Oxford.

12. Eftink MR (1994). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys J.* **66**(2 Pt 1):482-501.
13. Erickson HP (1994). 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.* **91**(21):10114-10118.
14. Evans E, Ritchie K (1997). Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J.* **72**(4):1541-1555.
15. Fisher TE, Oberhauser AF, Carrion-Vazquez M, Marszalek PE, Fernandez JM (1999). The study of protein mechanics with the atomic force microscope. *Trends Biochem Sci.* **24**(10):379-384.
16. Flory PJ (1989). Statistical mechanics of chain molecules. Hanser Publishers, Munich, Vienna, New York.
17. Fowler SB, Best RB, Toca Herrera JL, Rutherford TJ, Steward A, Paci E, Karplus M, Clarke J (2002). Mechanical unfolding of a titin Ig domain: structure of unfolding intermediate revealed by combining AFM, molecular dynamics simulations, NMR and protein engineering. *J Mol Biol.* **322**(4):841-849.
18. Fowler SB, Clarke J (2001). Mapping the folding pathway of an immunoglobulin domain: structural detail from Phi value analysis and movement of the transition state. *Structure (Camb).* **9**(5):355-366.
19. Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougerousse F, Centner T, Kolmerer B, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S (2000). Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circulation Research.* **86**(11):1114-1121.
20. Funatsu T, Kono E, Higuchi H, Kimura S, Ishiwata S, Yoshioka T, Maruyama K, Tsukita S (1993). Elastic filaments in situ in cardiac muscle: deep-etch replica analysis in combination with selective removal of actin and myosin filaments. *J Cell Biol.* **120**(3):711-724.
21. Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K (1988). 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.* **106**(5):1563-1572.
22. Gautel M, Goulding D (1996). A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Lett.* **385**(1-2):11-14.

23. Grama L, Somogyi B, Kellermayer MS (2001a). Global configuration of single titin molecules observed through chain-associated rhodamine dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(25):14362-14367.
24. Grama L, Somogyi B, Kellermayer MSZ (2001b). Direct visualization of surface-adsorbed single fluorescently labeled titin molecules. *Single Molecules*. **2**(2):79-83.
25. Granzier H, Helmes M, Trombitás K (1996). Nonuniform elasticity of titin in cardiac myocytes: a study using immunoelectron microscopy and cellular mechanics. *Biophys J*. **70**(1):430-442.
26. Granzier H, Kellermayer M, Helmes M, Trombitás K (1997). Titin elasticity and mechanism of passive force development in rat cardiac myocytes probed by thin-filament extraction. *Biophys J*. **73**(4):2043-2053.
27. Granzier H, Labeit S (2002). Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *J Physiol*. **541**(Pt 2):335-342.
28. Granzier HL, Wang K (1993a). Gel electrophoresis of giant proteins: solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis*. **14**(1-2):56-64.
29. Granzier HLM, Wang K (1993b). Passive tension and stiffness of vertebrate skeletal and insect flight muscles: the contribution of weak cross-bridges and elastic filaments. *Biophys J*. **65**(5):2141-2159.
30. Greene RF, Jr., Pace CN (1974). Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin. *J Biol Chem*. **249**(17):5388-5393.
31. Gregorio CC, Antin PB (2000). To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol*. **10**(9):355-362.
32. Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S (1999). Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol*. **11**(1):18-25.
33. Guba F, Harsányi V, Vajda E (1968). The muscle protein fibrillin. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung*. **3**(4):353-363.
34. Guthold M, Superfine R, Taylor RM (2001). The rules are changing: Force measurements on single molecules and how they relate to bulk reaction kinetics and energies. *Biomedical Microdevices*. **3**(1):9-18.

35. Gutierrez-Cruz G, Van Heerden AH, Wang K (2001). Modular motif, structural folds and affinity profiles of the PEVK segment of human fetal skeletal muscle titin. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(10):7442-7449.
36. Hamman BD, Oleinikov AV, Jokhadze GG, Bochkariov DE, Traut RR, Jameson DM (1996). Tetramethylrhodamine dimer formation as a spectroscopic probe of the conformation of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12 dimers. *J Biol Chem*. **271**(13):7568-7573.
37. Hein S, Gaasch WH, Schaper J (2002). Giant molecule titin and myocardial stiffness. *Circulation*. **106**(11):1302-1304.
38. Helmes M, Trombitas K, Centner T, Kellermayer M, Labeit S, Linke WA, Granzier H (1999). Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin's unique N2B sequence: titin is an adjustable spring. *Circ Res*. **84**(11):1339-1352.
39. Higuchi H, Nakauchi Y, Maruyama K, Fujime S (1993). Characterization of beta-connectin (titin 2) from striated muscle by dynamic light scattering. *Biophys J*. **65**(5):1906-1915.
40. Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ (1986). A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*. **323**(6084):160-164.
41. Horowitz R, Podolsky RJ (1987). The positional stability of thick filaments in activated skeletal muscle depends on sarcomere length: evidence for the role of titin filaments. *J Cell Biol*. **105**(5):2217-2223.
42. Hutter JL, Bechhoefer J (1993). Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum*. **64**(7):1868-1873.
43. Huxley HE, Hanson J (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*. **173**:973-976.
44. Improta S, Politou AS, Pastore A (1996). Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure*. **4**(3):323-337.
45. Kellermayer MS, Bustamante C, Granzier HL (2003). Mechanics and structure of titin oligomers explored with atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta*. **1604**(2):105-114.
46. Kellermayer MS, Granzier HL (1996). Calcium-dependent inhibition of in vitro thin-filament motility by native titin. *FEBS Lett*. **380**(3):281-286.

47. Kellermayer MS, Smith S, Bustamante C, Granzier HL (2000). Mechanical manipulation of single titin molecules with laser tweezers. *Adv Exp Med Biol.* **481**:111-126.
48. Kellermayer MS, Smith SB, Bustamante C, Granzier HL (1998). Complete unfolding of the titin molecule under external force. *J Struct Biol.* **122**(1-2):197-205.
49. Kellermayer MS, Smith SB, Bustamante C, Granzier HL (2001). Mechanical fatigue in repetitively stretched single molecules of titin. *Biophys J.* **80**(2):852-863.
50. Kellermayer MS, Smith SB, Granzier HL, Bustamante C (1997). Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science.* **276**(5315):1112-1116.
51. Kellermayer MSZ, Grama L (2003). Stretching and visualizing titin molecules: combining structure, dynamics and mechanics. *J Muscle Res Cell Motil.* **23**(5):499-511.
52. Kenny PA, Liston EM, Higgins DG (1999). Molecular evolution of immunoglobulin and fibronectin domains in titin and related muscle proteins. *Gene.* **232**(1):11-23.
53. King L (1994). Effects of denaturant and pressure on the intrinsic fluorescence of titin. *Arch Biochem Biophys.* **311**(2):251-257.
54. Kratky O, Porod G (1949). Röntgenuntersuchung geloster fagenmoleküle. *Rec Trav Chim.* **68**:1106-1122.
55. Labeit S, Barlow DP, Gautel M, Gibson T, Holt J, Hsieh CL, Francke U, Leonard K, Wardale J, Whiting A, et al. (1990). A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin. *Nature.* **345**(6272):273-276.
56. Labeit S, Kolmerer B (1995). Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science.* **270**(5234):293-296.
57. Lakowicz JR (1999). Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
58. Lang D, Coates P (1968). Diffusion coefficient of DNA in solution at "zero" concentration as measured by electron microscopy. *J Mol Biol.* **36**(1):137-151.
59. Levshin LV, Bocharov VG (1961). Study of concentration effects in solutions of certain organic compounds. *Op Spectrosc.* **10**:330-333.

60. Li H, Oberhauser AF, Fowler SB, Clarke J, Fernandez JM (2000). Atomic force microscopy reveals the mechanical design of a modular protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(12):6527-6531.
61. Linke WA, Ivemeyer M, Labeit S, Hinssen H, Ruegg JC, Gautel M (1997). Actin-titin interaction in cardiac myofibrils: probing a physiological role. *Biophys J.* **73**(2):905-919.
62. Linke WA, Ivemeyer M, Mundel P, Stockmeier MR, Kolmerer B (1998a). Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**(14):8052-8057.
63. Linke WA, Ivemeyer M, Olivieri N, Kolmerer B, Ruegg JC, Labeit S (1996). Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol.* **261**(1):62-71.
64. Linke WA, Rudy DE, Centner T, Gautel M, Witt C, Labeit S, Gregorio CC (1999). I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J Cell Biol.* **146**(3):631-644.
65. Linke WA, Stockmeier MR, Ivemeyer M, Hossler H, Mundel P (1998b). Characterizing titin's I-band Ig domain region as an entropic spring. *J Cell Sci.* **111**(Pt 11):1567-1574.
66. Livsage AD, Holmes D, Knight PJ, Tskhovrebova L, Trinick J (2001). Titin and the sarcomere symmetry paradox. *J Mol Biol.* **305**(3):401-409.
67. Ma K, Kan L, Wang K (2001). Polyproline II helix is a key structural motif of the elastic PEVK segment of titin. *Biochemistry.* **40**(12):3427-3438.
68. Machado C, Sunkel CE, Andrew DJ (1998). Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *J Cell Biol.* **141**(2):321-333.
69. Marszalek PE, Lu H, Li H, Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Schulten K, Fernandez JM (1999). Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature.* **402**(6757):100-103.
70. Maruyama K (1986). Connectin, an elastic filamentous protein of striated muscle. *Int Rev Cytol.* **104**:81-114.
71. Maruyama K (2002). beta-Actinin, Cap Z, connectin and titin: what's in a name? *Trends Biochem Sci.* **27**(5):264-266.
72. Maruyama K, Kimura S, Ohashi K, Kuwano Y (1981). Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of "titin" with connectin. *J Biochem (Tokyo).* **89**(3):701-709.

73. Maruyama K, Matsubara S, Natori R, Nonomura Y, Kimura S (1977). Connectin, an elastic protein of muscle. Characterization and Function. *J Biochem (Tokyo)*. **82**(2):317-337.
74. Mayans O, van der Ven PF, Wilm M, Mues A, Young P, Furst DO, Wilmanns M, Gautel M (1998). Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*. **395**(6705):863-869.
75. Muhle-Goll C, Pastore A, Nilges M (1998). The three-dimensional structure of a type I module from titin: a prototype of intracellular fibronectin type III domains. *Structure*. **6**(10):1291-1302.
76. Nave R, Furst DO, Weber K (1989). Visualization of the polarity of isolated titin molecules: a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *J Cell Biol*. **109**(5):2177-2187.
77. Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA (2002). Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation*. **106**(11):1333-1341.
78. Pace CN (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol*. **131**:266-280.
79. Plant AL (1986). Mechanism of concentration quenching of a xanthene dye encapsulated in phospholipid vesicles. *Photochem Photobiol*. **44**(4):453-459.
80. Politou AS, Thomas DJ, Pastore A (1995). The folding and stability of titin immunoglobulin-like modules, with implications for the mechanism of elasticity. *Biophys J*. **69**(6):2601-2610.
81. Rief M, Fernandez JM, Gaub HE (1998a). Elastically coupled two-level systems as a model for biopolymer extensibility. *Phys Rev Lett*. **81**(21):4764-4767.
82. Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE (1997). Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*. **276**(5315):1109-1112.
83. Rief M, Gautel M, Schemmel A, Gaub HE (1998b). The mechanical stability of immunoglobulin and fibronectin III domains in the muscle protein titin measured by atomic force microscopy. *Biophys J*. **75**(6):3008-3014.
84. Rivetti C, Guthold M, Bustamante C (1996). Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J Mol Biol*. **264**(5):919-932.

85. Rohatgi KK, Singhal GS (1963). The influence of urea on the fluorescence of aqueous dye solutions. *J Phys Chem.* **67**:2844-2846.
86. Saide JD (1981). Identification of a connecting filament protein in insect fibrillar flight muscle. *J Mol Biol.* **153**(3):661-679.
87. Scott K (Department of Chemistry, Cambridge University). Investigation into the Design of an Elastic Muscle Protein. <http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/kscott/index.htm>.
88. Selwyn JE, Steinfeld JI (1972). Aggregation equilibria of xanthene dyes. *J Phys Chem.* **76**(5):762-774.
89. Sjöstrand FS (1962). The Connections between A- and I-Band Filaments in Striated Frog Muscle. *J Ultrastruct Res.* **7**:225-246.
90. Soteriou A, Clarke A, Martin S, Trinick J (1993a). Titin folding energy and elasticity. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **254**(1340):83-86.
91. Soteriou A, Gamage M, Trinick J (1993b). A survey of interactions made by the giant protein titin. *J Cell Sci.* **104**(Pt 1):119-123.
92. Strunz T, Oroszlan K, Schumakovitch I, Guntherodt H, Hegner M (2000). Model energy landscapes and the force-induced dissociation of ligand- receptor bonds. *Biophys J.* **79**(3):1206-1212.
93. Trinick J (1994). Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends Biochem Sci.* **19**(10):405-409.
94. Trinick J, Knight P, Whiting A (1984). Purification and properties of native titin. *J Mol Biol.* **180**(2):331-356.
95. Trinick J, Tskhovrebova L (1999). Titin: a molecular control freak. *Trends Cell Biol.* **9**(10):377-380.
96. Trinick JA (1981). End-filaments: a new structural element of vertebrate skeletal muscle thick filaments. *J Mol Biol.* **151**(2):309-314.
97. Trombitas K, Freiburg A, Centner T, Labeit S, Granzier H (1999). Molecular dissection of N2B cardiac titin's extensibility. *Biophys J.* **77**(6):3189-3196.
98. Trombitás K, Greaser M, French G, Granzier H (1998a). PEVK extension of human soleus muscle titin revealed by immunolabeling with the anti-titin antibody 9D10. *J Struct Biol.* **122**(1-2):188-196.
99. Trombitás K, Greaser M, Labeit S, Jin JP, Kellermayer M, Helmes M, Granzier H (1998b). Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol.* **140**(4):853-859.



100. Trombitás K, Greaser ML, Pollack GH (1997). Interaction between titin and thin filaments in intact cardiac muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* **18**(3):345-351.
101. Trombitás K, Jin J-P, Granzier HL (1995). The mechanically active domain of titin in cardiac muscle. *Circ Res.* **77**:856-861.
102. Trombitás K, Redkar A, Centner T, Wu Y, Labeit S, Granzier H (2000). Extensibility of isoforms of cardiac titin: variation in contour length of molecular subsegments provides a basis for cellular passive stiffness diversity. *Biophys J.* **79**(6):3226-3234.
103. Trombitás K, Tigyí-Sebes A (1974). Direct evidence for connecting C filaments in flight muscle of honey bee. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung.* **9**(3):243-253.
104. Tskhovrebova L, Trinick J (1997). Direct visualization of extensibility in isolated titin molecules. *J Mol Biol.* **265**(2):100-106.
105. Tskhovrebova L, Trinick J (2000). Extensibility in the titin molecule and its relation to muscle elasticity. *Adv Exp Med Biol.* **481**:163-173.
106. Tskhovrebova L, Trinick J, Sleep JA, Simmons RM (1997). Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature.* **387**(6630):308-312.
107. Vivian JT, Callis PR (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J.* **80**(5):2093-2109.
108. Wang K, Forbes JG, Jin AJ (2001). Single molecule measurements of titin elasticity. *Prog Biophys Mol Biol.* **77**(1):1-44.
109. Wang K, McClure J, Tu A (1979). Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **76**(8):3698-3702.
110. Watanabe K, Muhle-Goll C, Kellermayer MS, Labeit S, Granzier H (2002). Different molecular mechanics displayed by titin's constitutively and differentially expressed tandem Ig segments. *J Struct Biol.* **137**(1-2):248-258.
111. Whiting A, Wardale J, Trinick J (1989). Does titin regulate the length of muscle thick filaments? *J Mol Biol.* **205**(1):263-268.
112. Williams PM, Fowler SB, Best RB, Toca-Herrera JL, Scott KA, Steward A, Clarke J (2003). Hidden complexity in the mechanical properties of titin. *Nature.* **422**(6930):446-449.

113. Wu Y, Bell SP, Trombitas K, Witt CC, Labeit S, LeWinter MM, Granzier H (2002). Changes in titin isoform expression in pacing-induced cardiac failure give rise to increased passive muscle stiffness. *Circulation*. **106**(11):1384-1389.
114. Zhuang X, Ha T, Kim HD, Centner T, Labeit S, Chu S (2000). Fluorescence quenching: A tool for single-molecule protein-folding study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**(26):14241-14244.