

PhD értekezés tézisei

A titin óriás izomfehérje globális szerkezetének és rugalmasságának vizsgálata

Grama László

Program: Biokémia és molekuláris biológia
Programvezető: Dr. Sümegi Balázs
Alprogram: Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata
biofizikai módszerekkel
Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla
Témavezetők: Dr. Kellermayer Miklós S. Z.,
Dr. Somogyi Béla

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet
Pécs
2004

Bevezetés

A nyolcvanas években a harántcsíkolt izom szerkezetéről alkotott képben az aktin és miozin mellett helyet kapott egy harmadik filamentum-rendszer, amelyet a titin (más néven connectin) nevű óriásfehérje alkot. A fehérjét először 1977-ben izolálta és írta le Koscak Maruyama, majd tőle függetlenül 1979-ben Kuan Wang, aki óriási (titáni) mérete miatt nevezte el titinnak.

Az izom alapegységében, a szarkomerben a titinmolekulák az aktin és miozin filamentum-rendszerekkel párhuzamosan, azok közé ékelődve helyezkednek el. A molekula N-terminális vége a Z-csíkhhoz, C-terminális vége pedig az M-csíkhhoz rögzített, így egyetlen titinmolekula áthidalja a szarkomer hosszának felét, egy átlagosan 1 μm -nyi távolságot. A titint egyetlen gén kódolja, amely 363 exont tartalmaz, és összesen 38 138 aminosavat kódol. Ezen 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.

A titin szerkezetének megfejtésében a legnagyobb lépést a titin aminosav szekvenciájának meghatározása hozta (Labeit és Kolmerer, 1995). Ez alapján a láncszerű titinmolekula tömegének 90%-át sorba kapcsolt immunglobulin (C2) és fibronectin (FN III) típusú globuláris domének (kb. 300) sorozata alkotja, amelyek hét antiparallel béta-lemezből álló β -hordó szerkezettel rendelkeznek. A titin tömegének a doméneken kívül fennmaradó, mintegy 8-10%-át egyedi szekvenciák teszik ki. A legismertebb és funkcionális szempontból is legfontosabbnak tartott ilyen szekvencia a prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavakban gazdag PEVK szegmens. Több megfigyelés is arra utal, hogy a PEVK szakasz denaturált polipeptidként viselkedik, újabb vizsgálatok azonban valószínűsítik, hogy II típusú poliprolin hélixek kialakulhatnak a PEVK szakaszon belül. A molekuláris szerkezettel összhangban, elektronmikroszkópos felvételeken a kinyújtott titinmolekula fonalszerű képet mutat, amelynek hossza 1 μm körüli, átmérője kb. 4 nm, hossza mentén pedig kb. 4 nm-es periodicitású gyöngyfüzér-szerű szerkezet figyelhető meg.

A titin A-szakaszban található része fiziológiai körülmények között nyújthatatlan, mert összekapcsolódik a vastag filamentummal. A titin ezen részét felépítő immunglobulin és fibronectin típusú domének sorozatában szabályos ismétlődések figyelhetők meg, amelyek által ez a szakasz valószínűleg periodikusan elhelyezkedő kötőhelyeket biztosít a miozin és

más A-szakaszbeli fehérjék (pl. C-protein) számára. Ily módon az A-szakaszban a titin egyfajta molekuláris sablonként segíti a vastag filamentum szabályos szerkezetének kialakulását.

Szarkomerben való elhelyezkedése alapján a titint A-szakaszbeli és I-szakaszbeli részre osztják fel. A két szakasz nemcsak szerkezetét, hanem szerepét tekintve is különbözik egymástól.

A titin I-szakaszban található része fiziológiai körülmények között is megnyújtható: ez a szakasz felelős a passzív izomerő kialakulásáért, megakadályozza az A-szakasz aszimmetrikus elmozdulását a szarkomeren belül, valamint elősegíti, hogy az izom összehúzódását követően a szarkomer visszanyerje eredeti hosszát. A titin I-szakaszbeli része három régióra osztható: a Z-csíktól távolabb eső (disztális) tandem Ig szegmensre, a Z-csíkhöz közelebbi (proximális) tandem Ig szegmensre, és az e kettő által közrefogott, egyedi szekvenciákból (pl. a már említett PEVK szegmensből) felépülő szakaszra. 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. A titin I-szakaszának hossza és nyújthatósága összefüggésben van az adott izom passzív rugalmasságával. Kimutatták ugyanis, hogy a rövidebb izoformát expresszáló izomsejtek passzív rugalmassága kisebb, mint a hosszabb titint expresszáló sejteké.

A titin globális szerkezete összetett, mivel a globuláris domének lokális szerkezetén felül (az immunglobulin és fibronektin típusú domének β -hordó szerkezete), a domének alkotta lánc térbeli alakja is meghatározza. Részben ez az oka annak, hogy a lokális szerkezet viszonylag részletes ismerete ellenére a titin rugalmasságának molekuláris alapjai még nem pontosan ismertek. A titin relatív nyújthatóságának szekvencia-specifikus ellenanyagokkal történő vizsgálata arra utal, hogy a nyújtás során a titin szerkezetében lezajló változások összetettek. Valószínű, hogy a tandem Ig szakaszok viszonylag lazább rugalmasságú elemek, amelyek kisebb erők esetén kiegyenesednek, a PEVK szakasz nagyobb erők mellett nyúlik meg, a domének kitekeredése pedig extrém megnyújtás esetén játszhat szerepet.

Az egyedi molekulák manipulációjára alkalmas módszerek megjelenésével lehetővé vált a molekulák mechanikai tulajdonságainak egy egészen más megközelítéssel történő vizsgálata. 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. Lézersipesszel és atomerő-mikroszkóppal végzett mérések segítségével kimutatták, hogy a

titin rugalmassága (erő-megnyúlás függvénye) nemlineáris, és a molekula 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. Az egyedi titinmolekulák esetén mért, és arányosan megnövelt erő-megnyúlás görbék igen jó egyezést mutattak egyedi vázizom rostok passzív erő-megnyúlás görbéivel. Az egyedi-molekula erőgörbék jól illeszthetők voltak az entrópikus elaszticitást leíró, ún. „féregszerű lánc” (wormlike chain, WLC) modellel, amelynek segítségével a titin *in situ* rugalmassága is modellezhető volt. A titinmolekulát ennek során egymástól eltérő rugalmas tulajdonságokkal rendelkező entrópikus rugók sorbakapcsolt sorozatának tekintik. Ezen rugók mindegyike megfelel az I-szakaszbeli titin egy-egy szegmensének, és mindegyik más-más erő-tartományban járul hozzá jelentősebben a titin megnyúlásához illetve a passzív erő generálásához.

Rief és *mtsai* a titin atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtása során egyedi domén-kitekeredési eseményeket figyeltek meg az erő-megnyúlás görbében megjelenő fűrészfogszerű szakaszok formájában. Az egyes domének 150 és 300 pN közötti erők hatására tekeredtek ki, visszaeresztést követően pedig a domének visszatekeredése volt megfigyelhető. A módszer segítségével lehetővé vált fehérjékben bekövetkező szerkezeti átmenetek azonosítása, valamint fehérjemodulok mechanikai stabilitásának vizsgálata.

Célkitűzések

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

Céljaink voltak:

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

Anyagok és módszerek

Fehérjetisztítás

A titint nyúl hátizomból preparáltuk korábban kidolgozott, és általunk módosított módszerek alkalmazásával.

Rekombináns titin fragmentumok előállítása

Vizsgálatainkhoz a titin differenciálisan és konstitutívan expresszálódó tandem Ig szegmenséből állítottunk elő két, nyolc domén hosszúságú szakaszt (oktamert). A felerősített DNS szekvenciákat egy-egy pET-28a típusú vektor *NheI* és *XhoI* hasítási helyei közé illesztettük be. A fehérjék vízdékony formáját *Escherichia coli* baktériumban (BL21(DE3)pLysS törzs) expresszáltattuk.

Fluoreszcens jelölés

A preparálást követően a titint fluoreszcensen megjelöltük a cisztein aminosavakhoz kötődő tetrametil-rodamin-jódacetamid (TMRIA) szulfhidril (SH)-reagenssel illetve a lizin aminosavakhoz kötődő tetrametil-rodamin-izotiocianát (TRITC) amino-reagenssel.

Konfokális mikroszkópia

Az üvegfelületre kitapadt fluoreszcens titinmolekulákat lézerpasztázó konfokális mikroszkóp segítségével vizualizáltuk (Bio-Rad MRC-1024ES, Nikon Eclipse TE300 inverz mikroszkóp, Nikon PlanApo 100×/1,4NA olajimmerziós objektív, gerjesztés: 514 nm Ar-ion lézer, emisszió: 550 nm-es felüláteresztő szűrő). A digitális képeket az NIH Image (v1.61, Wayne Rasband, NIH) képanalizáló szoftver segítségével elemeztük.

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. Denaturánsként guanidin-hidrokloridot (GdnHCl) használtunk.

Titinmolekulák megnyújtása

A titinmolekulák megnyújtása során egy üveg mikroszkóp fedőlemezhez titinmolekulákon keresztül kötődött mikrogyöngyöket toltunk el egy pipettahegy segítségével.

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

A megnyújtás folyamatának követésekor egy mikromanipulátor segítségével egy mikropipettát nekinyomtunk egy fedőlemezen nyugvó, titinnel borított mikrogyöngynek, majd a mikropipettát visszahúзва, megnyújtottuk a hozzá kötődött, a pipettahegy és a gyöngy között húzódo molekulát.

Spektrofotometria

A minták abszorpciós spektrumát Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométerrel vettük fel, 1 cm optikai úthosszú küvettákban. A tömény TMRIA oldat abszorpciós spektrumának felvételéhez két összeillesztett mikroszkóp fedőlemezéből készítettünk cellát, amelynek optikai úthossza kb. 30 μ m volt.

Fluoreszcencia spektroszkópia

A steady-state fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatokat Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluoriméterrel végeztük, rodamin-jelölt titin esetén 580 nm-es emissziós, illetve 550 nm-es gerjesztési hullámhosszak mellett, triptofán fluoreszcencia vizsgálata esetén pedig 280 nm-es gerjesztési és 340 nm-es emissziós hullámhossz mellett. A gerjesztési és emissziós rések minden esetben 10-10 nm szélesek voltak.

Egyensúlyi kémiai denaturáció

A titin fragmentumok kémiai denaturációját a triptofán fluoreszcencia mérésén keresztül követtük, ábrázolva a fluoreszcencia intenzitás változását a denaturáns koncentráció függvényében.

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. A rugólapkák rugóállandóit minden egyes rugólapka esetén külön, termikus kalibráció segítségével határoztuk meg.

Polimerszerkezeti számítások

Munkánkban a „féregszerű lánc” (wormlike chain, WLC) modellt használtuk, ezen belül pedig a következő összefüggéseket:

$$\langle R_G^2 \rangle = \frac{\langle R_v^2 \rangle}{6},$$

ahol R_G a girációs sugár, R_v pedig a lánc végpontjai közötti távolság.

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

ahol L és P a lánc kontúrhossza illetve perzisztenciahossza.

Részecskék szubsztrátfelületre történő kitapadásának kinetikája

A részecskék diffúziós állandóját (D) a felületre kitapadt részecskék számának időfüggése alapján határoztuk meg, az alábbi összefüggés segítségével:

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

ahol $n_F(t)$ az egységnyi felületre kitapadt részecskék száma, n_0 az oldat koncentrációja a $t = 0$ időpillanatban, t pedig az eltelt idő.

Egy entrópikus polimerlánc esetén a diffúziós állandó kapcsolatba hozható a lánc kontúrhosszával (L) és perzisztenciahosszával (P):

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

ahol k a Boltzmann-állandó, T az abszolút hőmérséklet, η pedig az oldószer viszkozitása.

Termodinamikai stabilitási paraméterek meghatározása egyensúlyi denaturációs mérések alapján

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

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

levezethető a fluoreszcencia intenzitás denaturáns koncentrációtól való függése:

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

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

A fehérje stabilitását jellemző, zérus denaturáns koncentrációhoz tartozó kitekeredési szabadentalpia változás:

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

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

Mechanikai stabilitási paraméterek meghatározása molekulák atomerő-mikroszkóppal történő megnyújtása alapján

A zérus erőhöz tartozó kitekeredési sebességi állandót (k_0) valamint az átmeneti állapot natív állapottól mért távolságát (Δx) numerikus Monte-Carlo szimuláció segítségével határoztuk meg (a szimuláció részleteit ld. Rief és mtsai, 1997).

Eredmények

(1) A fluoreszcensen jelölt, felszín-adszorbeált titinmolekulák képének átmérője a csúcsintenzitásoktól függetlenül közel azonos volt, és összemérhető volt a használt mikroszkóp felbontóképességével. Ez arra enged következtetni, hogy a titinmolekulák által a felületen elfoglalt terület átmérője kisebb, mint a mikroszkóp felbontóképessége.

A fluoreszcensen jelölt, felszín-adszorbeált titinmolekulák alakja és mérete tehát nem oldható fel mikroszkópos képalkotás során, megadható azonban méretük egy felső korlátja: az átlagos végpontok közötti távolság ($\sqrt{\langle R_v^2 \rangle}$) valószínűleg kisebb, mint 0,3 μm .

(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 ($P = 26 \text{ nm}$).

A mérési pontok jól illeszthetők voltak 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.

(3) A titinmolekulákat titinnel borított mikroyöngyök üvegfelszín mentén történő eltolása, valamint felületi feszültségi erő segítségével nyújtottuk meg.

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

(4) A titinmolekula megnyújtása során felvett, a fluoreszcencia időbeli változását ábrázoló felvételeken látható, hogy miközben a megnyújtott molekulaszakasz 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 strukturális heterogenitásra utal, fennmaradt számos megnyújtás-visszaeresztés ciklus során.

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

(5) Guanidin-hidroklorid hozzáadását követően a felszín-adszorbeált titinmolekulák fluoreszcencia intenzitása viszonylag gyorsan és jelentős mértékben megnőtt. A jelenség konfokális mikroszkóppal vizualizált egyedi molekulákon és fluoreszcencia spektroszkópia segítségével vizsgált molekulások esetén egyaránt kimutatható volt.

A jelenség oka, hogy rodamin-jelölt titinmolekulákon magas koncentrációban rodamin dimerek jelentek meg, valószínűleg a kis térfogatba összehúzódtott titinmolekula által létrehozott magas helyi rodamin koncentráció miatt. A dimerek kémiai denaturáns hatására disszociáltak. A disszociációt kísérő fluoreszcencia intenzitásnövekedés oka a dimerekben fellépő önkioltás megszűnése. A dimerek disszociációja ez esetben nem a fehérjeszerkezet megváltozása, hanem elsősorban a denaturáns közvetlen hatása miatt következik be.

(7) Savas denaturáció esetén, amely a dimer-monomer egyensúlyra közvetlen hatással nem volt, a dimerek aránya csak kis mértékben 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.

Az egyetlen titinmolekula által kitöltött térfogatnak a mért dimer-monomer arány alapján becsült értéke $0,23 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}^3$, amely gömb alakot feltételezve megfelel egy $0,054 \mu\text{m}$ sugarú gömbnek. Ha a kitekeredés során a molekula hossza a natív, $1 \mu\text{m}$ -es hosszról a kitekeredett, $10 \mu\text{m}$ -es hosszra nő, a kitekeredett molekula perzisztenciahossza várhatóan kb. tizedrésze kell hogy legyen a natív molekula perzisztenciahosszának.

(8) A rodamin-jelölés és a dimerek szerkezetmódosító hatása az atomerő-mikroszkópos mérések alapján nem volt kimutatható: a TMRIA-titin esetén mért erőspektrumokon a domén-kiteredési események mellett további, rodamin dimer disszociációra utaló erő-átmenetek nem voltak megfigyelhetők.

(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. A differenciálisan expresszáldó Ig domének jelenléte a titin adott izoformáiban, a domének szelektív kitekeredése révén egy mechanizmust szolgáltat a passzív izomerő csökkentésére, és a titin konstitutívan expresszáldó doménjei kitekeredésének megelőzésére.

Az értekezés témakörébe tartozó saját közlemények

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.

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.

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.