

A titin óriásfehérje nanomechanikája

Doktori értekezés

Mártonfalvi Zsolt

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanár, D.Sc.

Hivatalos bírálók: Dr. Geiszt Miklós egyetemi docens, D.Sc.
Dr. Kovács Mihály tudományos főmunkatárs, D.Sc.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Röhlich Pál professor emeritus, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vonderviszt Ferenc egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Benyó Zoltán egyetemi tanár, D.Sc.

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	4
2.1. Titin a szarkomer rugalmas filamentuma	4
2.2. A titin szerkezete	5
2.3. A titin funkciója.....	8
2.3.1. Az izom passzív rugalmasságának kialakítása	8
2.3.2. A titin mint az izom mechanoszenzora.....	9
2.4. Egymolekula-erőspektroszkópia	9
2.4.1. Molekuláris rugalmasság	10
2.4.2. Molekuláris erőmérő lézercsipesz	11
2.4.3. Molekulák mechanikai denaturálása.....	13
3. Célkitűzések	15
4. Módszerek	16
4.1. Natív titinmolekulák izolálása	16
4.2. Mikrogyöngyök funkcionalizálása	17
4.2.1. T12 antitest - titin borítású mikrogyöngyök	18
4.2.2. 9D10 anti-PEVK antitest borítású mikrogyöngyök.....	19
4.2.3. Fotoreaktív keresztkötő borítású mikrogyöngyök	19
4.3. Egyedi titinmolekulák vizsgálata lézercsipeszrel.....	20
4.3.1. Titin nyújtása állandó sebességgel.....	20
4.3.2. Titin nyújtása állandó erővel (erővisszacsatolt lézercsipesz)	21
4.4. Adatanalízis	21
4.4.1. Molekulahossz korrekció.....	21
4.4.2. Erőgörbék analízise	22
4.5. A titinmolekula megnyúlásának modellezése és szimulációja.....	23
4.6. Titin nyújtása visszahúzódó folyadékmeniskusszal	24
4.7. Atomerő mikroszkópia és képanalízis.....	26
5. Eredmények	27
5.1. Titin izolálása	27
5.2. Titin nyújtása lézercsipeszrel élettani erőtartományban	28
5.2.1. Alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulások jellemzése.....	30
5.2.2. Alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulások eredete	35

5.2.3. Alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulások élettani szerepe	38
5.3. Titin nyújtása visszahúzódó folyadékmeniszkusszal	42
5.3.1. Túlnyújtott titinmolekulák szerkezeti jellemzése	43
6. Megbeszélés	47
6.1. Egyedi titin molekulák izolálása.....	47
6.2. Titin nyújtása lézercsipessel élettani erőtartományban	47
6.2.1. A titin alacsony erőknél jelentkező diszkrét szerkezeti átmenetei	49
6.2.2. Az alacsony erőknél jelentkező szerkezetváltozások élettani szerepe	52
6.3. Titin nyújtása visszahúzódó folyadékmeniszkusszal	56
7. Következtetések.....	61
7.1. A titin alacsony erőknél jelentkező nyújtási átmenetei	61
7.2. Túlnyújtott titinmolekulák szerkezetének topográfiai vizsgálata.....	62
7.3. Tudományos tézisek	62
8. Összefoglalás	64
9. Summary.....	66
10. Irodalomjegyzék	68
11. Saját publikációk jegyzéke	79
11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények	79
11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények	79
12. Köszönetnyilvánítás	81

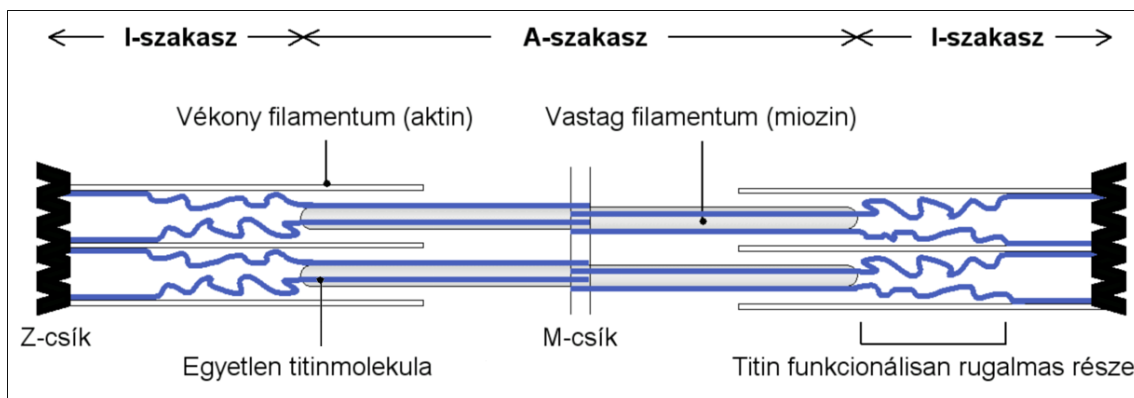
1. Rövidítések jegyzéke

BSA	Marha szérum albumin (Bovine serum albumin)
DMP	Dimetil-pimelimidát
DTT	Ditio-treitol
E-64	trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (cisztein proteáz inhibitor)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
MyBP-C	Miozin kötő C-fehérje (Myosin Binding Protein C)
NHS-észter	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide-észter
PID	Proporcionális (Arányos), Integráló, Differenciáló szabályzás
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
SDS-PAGE	Nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézis
Sulpho-SANPAH	Sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate
WLC	Wormlike Chain (Féregszerű Lánc)
PBS	foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PKA	Protein kináz A
PKC	Protein kináz C
PKG	Protein kináz G
RPM	percenkénti fordulatszám (revolution per minute)
Ig	Immunoglobulin
Fn	Fibronectin

2. Bevezetés

2.1. Titin a szarkomer rugalmas filamentuma

Relaxált harántcsíkolt izomban megnyújtáskor passzív erő ébred, melynek kialakításáért a szarkomereket áthidaló rugalmas titinmolekulák felelősek [1-3]. A titin a vastag és vékony filamentumok mellett egy harmadik filamentáris rendszert alkot a harántcsíkolt és szívizom szarkomerben [1, 3-5]. A titin nyugalmi, kinyújtott hossza hozzávetőleg $1\ \mu\text{m}$ és molekulatömege izoformától függően 3-3,7 MDa [6].



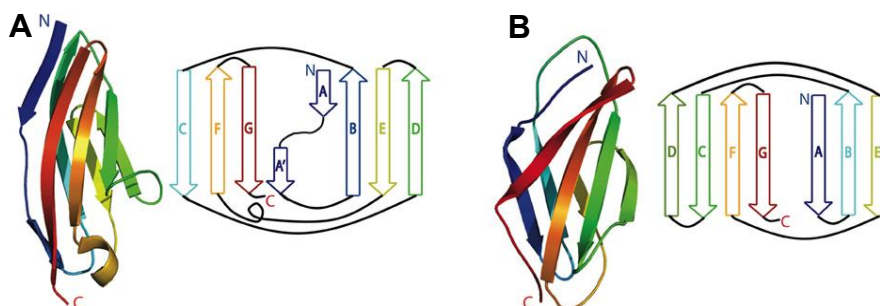
1. ábra Titin elhelyezkedése a szarkomerben. A szarkomer sematikus ábráján a Z-csíktól az M-csíkgig húzódó titinmolekulák kék színnel ábrázolva.

Egyetlen titinmolekula a fél szarkomert áthidalja a Z-csíktól az M-vonalig húzódva, N-terminálisa a Z-lemez része, C-terminálisa az M-vonal integráns komponense [7] (**1. ábra**). Fehérje össztömeg alapján a miozin és az aktin után a harmadik legnagyobb mennyiségben előforduló izomfehérje. A titin N-terminálisának 80 kDa-nyi része izoformától függően a teljes Z-csíkon áthúzódik, a szomszédos szarkomerek titin filamentumai ezért a Z-lemezen belül átlapolnak [8]. A Z-lemezen belül a szomszédos titinek átlapoló Z1 és Z2 doménjei a teletoninon keresztül rögzülnek a Z-lemezben [5]. Adott izoformától függően a titin 800 kDa – 1,5 MDa-os része az I-szakaszban található, ahol a vékony filamentumok Z-csík felőli vége és a vastag filamentumok csúcsai között húzódik. A titin 2 MDa-nyi szakasza az A-szakaszban helyezkedik el, ahol minden vastag filamentum felszínén hat titinmolekula fut végig [9]. A miozinhoz és a C-fehérjéhez (MyBP-C) történő szoros kapcsolódása miatt ezt a régiót élettani körülmények között nyújthatatlannak tartják [5]. A titin C-terminálisának körülbelül 200 kDa-os része az M-vonalban lokalizálódik, ahol a Z-csíkhöz hasonlóan az ellentétes

oldali szarkomerfelekből érkező titinfilamentumok ugyancsak átfednek [5, 10]. A miofibrillumokon belül tehát összefüggő filamentumrendszer található, melynek háttérében a Z- és az M-csík ellentétes polaritású, átlapoló titin molekulái állnak.

2.2. A titin szerkezete

A titin óriási mérete ellenére (3,7 MDa) szerkezete viszonylag monoton, felépítése moduláris. Harmadlagos szerkezetét tekintve 100 aminosav hosszú, fibronectin III-típusú (Fn III) szupercsaládba tartozó és 90-95 aminosavas, immunoglobulin C2-típusú (Ig C2) szupercsaládba sorolt domének ismétlődéseiből [11, 12], illetve az ezek között helyenként elhelyezkedő stabil harmadlagos szerkezettel nem rendelkező szekvenciákból áll. Háromdimenziós szerkezetvizsgálatok kimutatták, hogy az ismétlődő szekvenciák globuláris doméneket képeznek, melyek mind az Ig, mind az FN III domének esetén hét antiparallel lefutású β -lemezből álló hordószerű szerkezettel rendelkeznek [13, 14] (2. ábra).



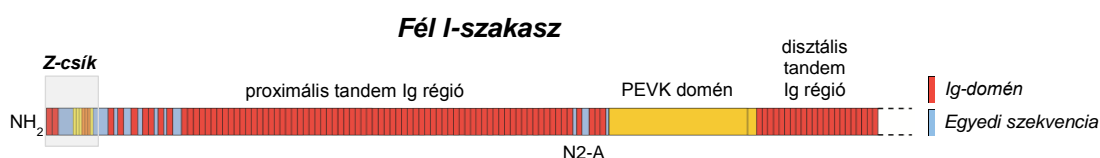
2. ábra Globuláris titin domének szerkezete. **A:** Immunoglobulin típusú domén szalagmodellje (bal) és sematikus ábrája (jobb) **B:** Fibronectin típusú domén szalagmodellje (bal) és sematikus ábrája (jobb) [14].

Ezek a nagyfokú szerkezeti homológiát mutató globuláris domének teszik ki a ki a titin mintegy 90%-át (kb. 300 globuláris domén). A molekula fennmaradó mintegy 10%-át olyan egyedi szekvenciák teszik ki, melyek semmilyen más ismert fehérjeszekvenciával nem mutatnak homológiát. Egyedül a titin C-terminális végén található kináz domén szekvenciája homológ a miozin könnyűlanc-kinázzal [8].

A Z-csiktól, vagyis a titin N-terminálisától, az M-csík, vagyis a titin C-terminálisára felé haladva az alábbiak szerint jellemezzük a molekula szerkezetét. A titin N-terminálisára a Z-lemez integráns részét képezi, ezen a szakaszon a titint

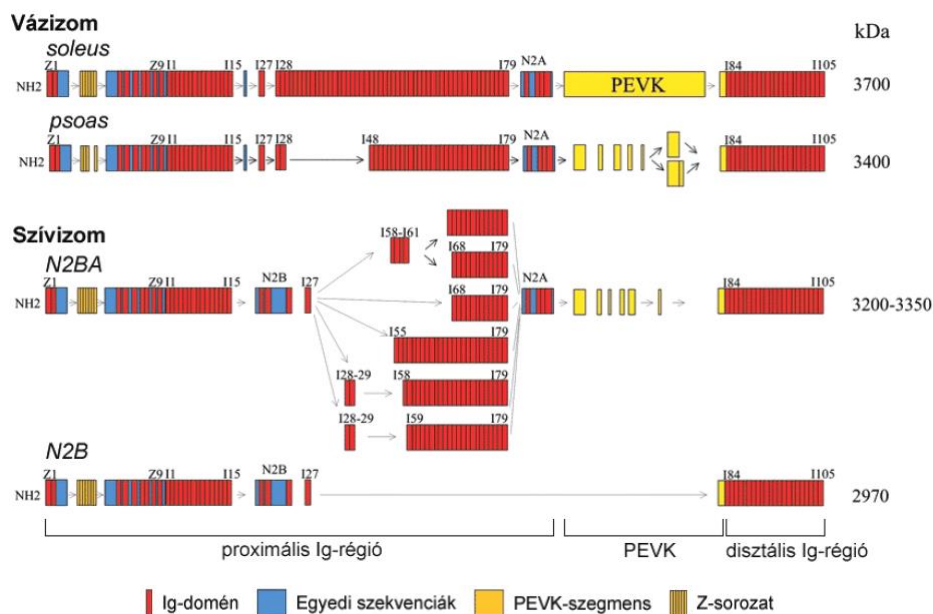
45 aminosavból álló domén ismétlődések (Z-repeat) alkotják. A Z1 és Z2 domének teletoninnal alkotott erős kölcsönhatása fontos szerepet játszik a titin Z-lemezhez rögzítésében, továbbá a Z-lemez szerkezeti integritásában és mechanikai stabilitásában [8].

A titin I-szakaszbeli része alternatív splicing révén igen különböző izoformákban található az egyes izomtípusokban. Alapvetően három részre oszthatjuk fel ezt a molekulaszakaszt: (i) a Z-csíkhöz közelebbi proximális tandem Ig-régióra, (ii) egy egyedi szekvenciából felépülő PEVK régióra és (iii) az I szakasz M-csík felőli végéhez közelebbi disztális tandem Ig-régióra (**3. ábra**). Az egyedi szekvencia régióban ezek mellett még megkülönböztetünk egy N2 régiót, amit Ig-domének és egyedi szekvenciák váltakozva alkotnak. A vázizom titin izoformára általában az N2A régió a jellemző, a szívizomban viszont vagy egyedül az N2B, vagy az N2A és N2B régió együttesen található meg (N2BA izoforma) [15].



3. ábra A titinmolekula fél I-szakaszt áthidaló része. A Z-csíktól indulva: (i) proximális tandem Ig-régió, (ii) N2/PEVK régió, (iii) disztális tandem Ig-régió [5].

Az egyes izomszövetekben, feltehetően a különböző mechanikai követelmények miatt igen eltérő hosszúságú izoformák fejeződnek ki [6]. A titinmolekulát egyetlen gén kódolja, ami extrém sok, 363 exont tartalmaz [16]. A szövetspecifikus splicing révén a nagyszámú exonból sokféle izoforma expresszálódik (**4. ábra**). Az alternatív splicingban leginkább a proximális Ig-régió és a PEVK domén érintett [17]. A disztális Ig-régió viszont konstitutívan expresszált az összes izoformában. A leghosszabb, *m. soleus* izoformában 53 Ig doménnel több van a proximális Ig-régióban, mint a szívizom titinben. Emellett a *m. soleus* izoforma 2174 aminosav hosszúságú PEVK doménnel rendelkezik, ellentétben a szívizom izoforma 163 aminosavas PEVK doménjével.



4. ábra Néhány példa az I-szakasz titin izoformáinak sokféleségéből. Két vázizom (*m. soleus* és *m. psoas*) és két szívizom (*N2BA* és *N2B*) izoforma. Jobboldalon az egyes izoformák molekulatömege olvasható [17].

A legfontosabb egyedi szekvencia a titin izoformák esetében a PEVK domén, mely nevét a prolin (P), glutamát (E), valin (V) és lizin (K) aminosavak gyakori előfordulásáról kapta. A PEVK domének többsége minden titin izoformában tartalmaz bázikus (izoelektromos pont: 9-10), 27-28 aminosavas ismétlődéseket, ún. PPAK- vagy PEVK motívumokat, melyek prolinban és lizinben gazdagok. Ezeken felül a vázizom PEVK és a szívizom *N2BA* izoformáiban erősen savas (izoelektromos pont: 4,0), glutamátban gazdag (~55%) ismétlődések, ún. polyE motívumok találhatóak, melyeket PPAK motívumok határolnak [6, 18].

A PEVK domén másodlagos és harmadlagos szerkezete csak kevésbé ismert és a doménre gyakran úgy tekintünk mint a rendezetlen fehérjék archetípusára [19, 20]. Egyes munkák beszámolnak dinamikus, tranziens szerkezetek kialakulásáról [21], míg mások a szekvenciából adódó poliprolin II hélixeket és béta kanyarokat mutattak ki a szerkezetben NMR és CD spektroszkópiával [22]. Mindmáig tisztázásra vár még, hogy a PEVK domén esetleges szerkezetei milyen hatással vannak annak rugalmasságára és szerepet játszanak-e a titin és ezen keresztül a harántcsíkolt izom passzív mechanikájában.

Az titinmolekula A-szakaszbeli aminosav szekvenciája erősen konzervált az egyes izoformák között. Az A-szakaszbeli titin szegmens 65%-át Fn III, 30%-át pedig

Ig-domének alkotják, melyek szuper-repeatekbe rendeződnek [19]. A viszonylag monoton, repetitív szerkezetet a régió M-csíkhoz közeli végén a titin kináz domén töri meg [8].

2.3. A titin funkciója

A titin elsődleges funkciója az izomrost passzív rugalmasságának biztosítása, melyet a molekula eltérő izoformái alakítanak az egyes izomrosttípusok élettani igényéhez. A titin a vastag filamentumokat a szarkomer közepére rögzíti és hatékony elasztikus rugóként működik az izomkontrakció alatt [4, 23-27]. Mint a miogenezisben igen korán megjelenő filamentáris struktúra, a titin mintegy „molekuláris templákként” irányítja a miofibrillumok rendezett szerkezetének kialakulását, valamint a C-terminális régió szerin/treonin kináz doménjének révén szerepe lehet a mechanikai információ jelátviteli útvonalakhoz csatolásában is [28, 29].

2.3.1. Az izom passzív rugalmasságának kialakítása

A titin nyújtás hatására fellépő passzív erőválaszáért a molekula I-szakaszbeli szegmense felelős, ez a titin funkcionálisan nyújtható része. Ezzel szemben a molekula A-szakaszba eső része a vastag filamentumokhoz asszociált, így funkcionálisan nyújthatatlan. A vázizomban a nyújtható régiót a proximális és disztális tandem Ig szegmensek és a közöttük elhelyezkedő PEVK és N2 domének alkotják [19].

Humán *m. soleus* izomrostokon végzett immun-elektronmikroszkópos tanulmányok feltárták, hogy a szarkomer nyugalmi helyzetében a tandem Ig domének és a PEVK „kontrahált” állapotban vannak [20, 30]. A titin *in situ* megnyúlásának jelenleg elfogadott modellje szerint a molekula egyes szakaszai eltérő rugalmasságuk miatt erő hatására hierarchikus sorrendben nyúlnak meg. Alacsony erőknél előbb a tandem Ig-régiók nyúlnak meg a domének közötti linker szekvenciák kiegyenesedése révén [11, 20, 25, 30]. Ezt a PEVK domén random szerkezeteinek folyamatos megnyúlása követi [20, 30-32], végül a szívizomban az N2B régió nyúlik meg [33-35]. Bár a kinetikai modellek alapján elvárható, hogy a passzív erő növekedtével egyes globuláris domének kitekeredjenek [36], ezt mindeztáig *in situ* nem sikerült minden kétséget kizáróan kimutatni. Ezek alapján feltételezik, hogy a globuláris domének mechanikai kitekerése csak pathofiziológiás esetekben (pl. túlnyújtás) léphet fel [37]. Ennek némileg ellentmond azonban az a megfigyelés, miszerint az élettani szarkomerhossz

tartományban megnyújtott relaxált szarkomerekben felépülő passzív erő jelentős lecsengést mutat (stressz relaxáció) [37, 38], amely mechanikailag indukált markáns belső szerkezetváltozások felléptére utal.

A titin által meghatározott passzív rugalmasság nem egy konzervált tulajdonság, hanem adaptív módon finoman változtatható a molekula foszforilációján keresztül. Míg az N2B régió PKA és PKG-n keresztüli foszforilációja csökkenti a passzív izomerőt, addig a PEVK domén PKC általi foszforilációja növeli azt [39, 40].

2.3.2. A titin mint az izom mechanoszenzora

A titin szarkomerikus elhelyezkedése felveti annak lehetőségét, hogy az izomrostok erő és megnyúlás érzékelőjeként egy mechanoszenzor funkciót lásson el. Az izomrostok mechanikai állapotának titinen keresztüli érzékelése megköveteli, hogy a molekula valamilyen módon tükrözze a szarkomert ért tér- és időbeli mechanikai behatásokat. Korábbi egyedi molekulákon végzett repetitív nyújtási kísérletekben a titin egy fáradási jelenséget mutatott az ismételt mechanikai ciklusokban [41, 42]. Bár a folyamat molekuláris részletei és a szarkomer mechanikában betöltött funkciói még nem ismertek, a jelenség felveti annak lehetőségét, hogy a titin a rugalmas tulajdonságainak dinamikus megváltozásában tükrözi a szarkomer mechanikai történetét. Ezek mellett egyedi molekula erőspektroszkópai kísérletek rámutattak, hogy a titin kináz domén ATP kötő zsebe erő hatására felnyílik, így fontos szerepet játszhat a mechanikai szignálok jelátviteli utakra csatolásában [43].

2.4. Egymolekula-erőspektroszkópia

Molekulasokaság vizsgálatakor az egyes molekulák viselkedése kiátlagolódik, nincs közvetlen információnk a molekulák egyedi viselkedéséről és így a vizsgált paraméter vagy tulajdonság eloszlásáról. Egyedi molekulákon végzett kísérletek rámutattak arra, hogy az egyes molekulák viselkedése jelentősen eltérhet az átlagtól egy adott folyamat során, így olyan új állapotok figyelhetők meg, amelyek a molekulasokaságban rejtve maradnak (pl. konformációs állapotok). Az egymolekula manipulációs technikák lehetőséget adnak az adott molekuláris folyamatban fellelhető különböző tér- és időbeli állapotok azonosítására és jellemzésére, továbbá kizárólagos eszközt jelentenek bizonyos jelenségek, mint például a molekuláris rugalmasság

vizsgálatában. A leggyakrabban alkalmazott egymolekula manipulációs technikák a molekuláris erőmérő atomerő-mikroszkóp és a lézercsipesz.

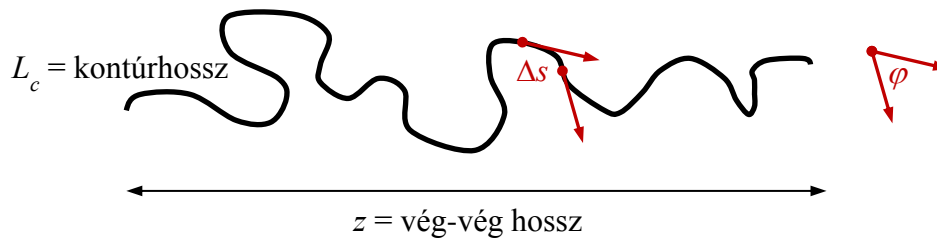
Az egymolekula erőspektroszkópia molekulák rugalmasságát és külső erő hatására bekövetkező szerkezetváltozásait vizsgálja. Egy biopolimer molekula nyújtásakor fellépő erő illetve erőváltozás szoros összefüggésben áll a lánc szerkezeti felépítésével, ezért a biopolimerek rugalmasságának vizsgálata alkalmas lehet a szerkezeti vizsgálatra. Egy biopolimer erő-megnyúlás görbéjéből következtethetünk láncon belüli kölcsönhatásokra illetve, a lánc szerkezetére.

2.4.1. Molekuláris rugalmasság

A fehérjemolekulák lineáris biopolimerek, vagyis monomer egységekből felépülő molekulaláncok. Ezek a lineáris polimerek nem merev rúdként viselkednek, hanem a láncban elhajlások jöhetnek létre így adva lehetőséget kompakt, megrövidült konformációk létrejöttére. Egy szabadon diffundáló polimerláncban a hajlító mozgásokat a környezet termikus gerjesztése okozza. A termikus kölcsönhatások következtében a lánc képes meghajlani, a végpontjai közötti távolság csökken. Minél nagyobb a lánc flexibilitása, annál jobban összetekeredik, összegombolyodik, a két végpont közötti átlagos távolság csökken. Az így megrövidült lánc külső erő hatására nyújtható meg és egyenesíthető ki. Mivel a lánc kinyújtott állapota rendezettebb, a nyújtás hatására a lánc szerkezeti entrópiája csökken. Flexibilisebb láncok megnyújtásakor a szerkezeti entrópiában nagyobb változás következik be, ezért megnyújtásukhoz nagyobb erő szükséges, vagyis a rugalmasság a szerkezetből, pontosabban annak rendezetlenségéből ered. Az ilyen típusú polimereket entrópiikus polimerláncoknak nevezik. Az entrópiikus polimerlánc modellben a lánc különböző pontjai közötti kölcsönhatások elhanyagolhatóak.

Egy a biopolimerek entrópiikus rugalmasságát leíró modell a „féregszerű lánc” (WLC) polimer modell. A féregszerű lánc egy hipotetikus, hosszához képest elhanyagolható vastagságú lineáris makromolekula, folyamatos görbületekkel. A görbületek iránya minden pontban véletlen. Ez a modell a biopolimer lánc flexibilitását kötési torzulások összegeként írja le, a polimert egy meghajlítható rúdnak tekinti. A meghajlás mértéke a rúd hajlítómerevségétől függ, a lánc alakját termikusan gerjesztett hajlító mozgások szabják meg [42, 44]. A WLC modell a polimer rugalmasságának leírására három paramétert használ: a perzisztenciahosszt (L_p) és a kontúrhosszt (L_c) és a

vég-vég hosszt (z). A kontúrhossz a teljesen kinyújtott lánc hosszának felel meg, a vég-vég hossz az adott konformációjú lánc két végpontja között mérhető távolság. A perzisztenciahossz a lánc hajlító merevségét jellemző paraméter, az a távolság, melyen belül a lánc termikusan gerjesztett meghajlásai, alakváltozásai korrelálnak.



5. ábra Egy entrópikus biopolimer hajlékonyságát jellemző paraméterek és meghatározásuk. A lánc két tetszőleges pontjára érintőt illesztve ábrázolhatók az irányvektorok. Δs a lánc két tetszőleges pontja közötti távolság a kontúr mentén, φ az irányvektorok által bezárt szög.

A perzisztenciahossz meghatározásához vegyünk fel két pontot a polimer mentén egymástól Δs távolságra (**5. ábra**). Ábrázoljuk a két pontban a lánc irányvektorait és mérjük meg az általuk bezárt φ szöget. Számos mérést elvégezve, a perzisztenciahosszt (L_p) az alábbi képletből számíthatjuk [45]:

$$\langle \cos \varphi \rangle = e^{-\frac{\Delta s}{L_p}}, \quad (1)$$

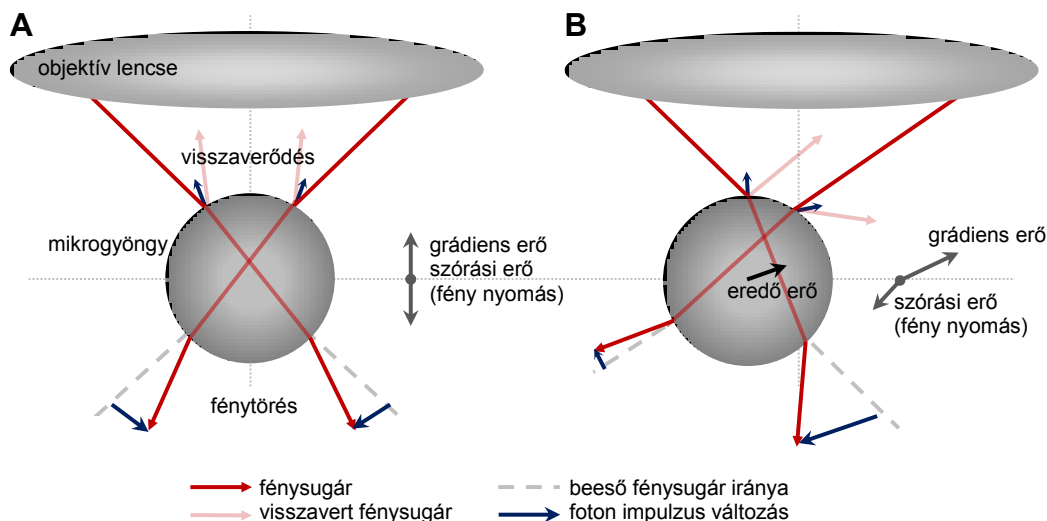
ahol $\langle \cos \varphi \rangle$ a $\cos \varphi$ várható értéke adott Δs esetén. Az **1. egyenlet** alapján, ha $\Delta s \ll L_p$, akkor $\langle \cos \varphi \rangle \approx 1$ azaz az φ átlagos értéke 0° körül fluktuál, vagyis a lánc Δs szakaszon tartja az irányát, egyenesnek tekinthető. Amennyiben $\Delta s \gg L_p$, akkor $\langle \cos \varphi \rangle \approx 0$ azaz az φ szög átlagos értéke $+90^\circ$ vagy -90° körül fluktuál, vagyis az egyes φ szögek 0° és $\pm 180^\circ$ között tetszőleges értéket vesznek fel, tehát a Δs szakaszon a lánc alakja nem mutat korrelációt. Minél hosszabb a perzisztenciahossz, annál merevebb a lánc, és megfordítva, minél rövidebb a perzisztenciahossz, annál hajlékonyabb.

2.4.2. Molekuláris erőmérő lézercsipesz

A lézercsipesz alapjául szolgáló jelenséget, miszerint optikai erők segítségével lehetséges mikroméretű dielektromos részecskéket lebegtetni és elmozdítani, 1970-ben írta le Arthur Ashkin [46]. Nem sokkal ezután kifejlesztésre kerültek az első

lézercsipeszek, melyek stabilan képesek voltak részecskék csapdázására és háromdimenziós mozgására [47-49].

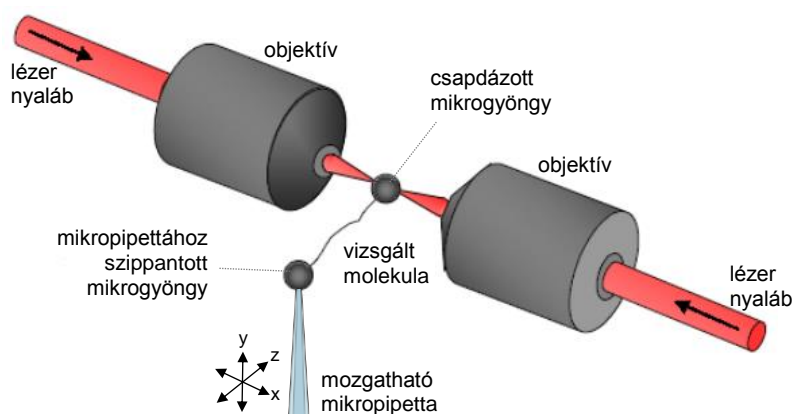
A lézercsipeszben egy nagy numerikus apertúrájú objektívvel fókuszálunk egy lézernyalábot az optikai csapda kialakításához. Egy fénytörő részecskére a fókuszpont közelében mindig olyan erő hat (a részecskével kölcsönható fotonok impulzusátadása miatt), amely a részecskét a fókuszpont felé mozdítja (**6. ábra**).



6. ábra A lézercsipesz működési elve. A fókuszált csapdázó lézernyaláb legszélső sugarai pirossal ábrázolva. **A:** Egyensúlyi helyzetben nincs nettó foton impulzus változás. A visszaverődésből eredő szórási erő és a fénytörésből eredő gradiens erők eredője zérus. **B:** Az egyensúlyából kitérített mikrogönggyöt a szórási és gradiens erők eredője téríti vissza az egyensúlyi helyzetbe [48].

A lézercsipeszben a mikrogönggyre ható erőt hagyományosan két komponensre bontjuk. Az első, a beeső fénysugarak visszaverődéséből eredő szórási erő a fény terjedési irányában hat, mintegy tolja a gyöngyöt (fény nyomás). A második a fénytörő mikrogönggyön áthaladó és megtört fénysugarak foton impulzus változásából eredő gradiens erő. A gradiens erő nagysága és iránya függ a lézercsapda intenzitás gradiensétől. Ahhoz, hogy a gradiens erő elegendően nagy értéket vehessen fel a szórási erő kompenzálására, nagy numerikus apertúrájú objektívvel (NA : 1.2) fókuszáljuk a lézernyalábot egy fókuszba. Így a két erő eredője egyensúlyi helyzetben zérus és a gyönggy stabilan lebeg a lézerfókusz közelében [50]. Amennyiben külső erőhatásra kitérítjük a gyönggyöt az egyensúlyi helyzetéből, a szórási és gradiens erők eredője egy visszatérítő erő lesz, amely visszahúzza a gyönggyöt az egyensúlyi helyzetébe (**6. ábra**). Ez a visszatérítő erő a csapdát leíró potenciálvölgy alakja által megszabott határokon

belül lineárisan függ a gyöngy kitérésétől. Ezért a lézercsipesz felfogható egy virtuális rugóként, és felhasználható erőmérésre a pikonewtonos erőtartományban. A vizsgálni kívánt biopolimer egyik terminálisát a lézercsipeszben csapdázott, míg a másikat egy mozgatható mikrogöngy felszínéhez konjugáljuk. A mikrogöngy mozgása legegyszerűbben egy mikropipetta segítségével oldható meg, amihez a gyöngyöt odaszippantjuk. Az így kialakított kísérleti elrendezésben a mikropipetta mozgásával nyújtjuk a molekulát, miközben a csapdázott gyöngy kitéréséből mérjük az erőváltozást (7. ábra).

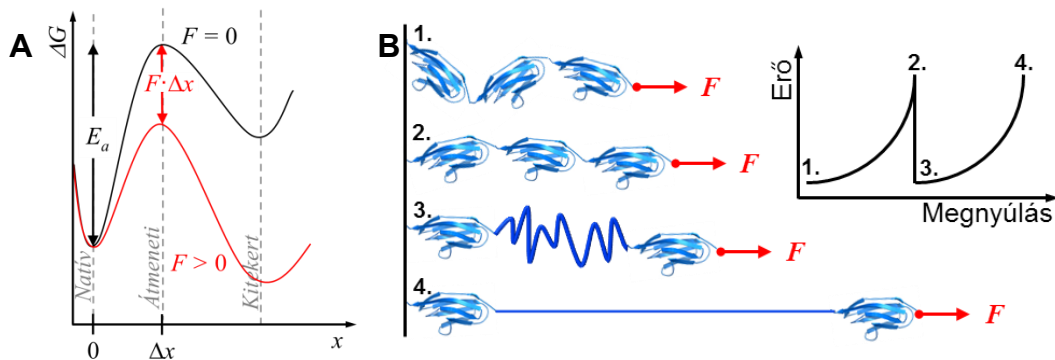


7. ábra Kétsugaras molekuláris erőmérő lézercsipesz. A két csapdázó lézernyaláb egymással szembe irányítva alakítja ki az optikai csapdát. A csapdán áthaladt nyaláb a szemben lévő objektíven áthaladva kollimálva lép ki annak hátsó apertúráján. A pipetta mozgásával megnyújtott molekulára erő hat, ami kitéríti a csapdázott gyöngyöt az egyensúlyi helyzetéből. A gyöngy kitérése az áthaladó lézernyaláb eltérülését okozza. Az erő a csapdán áthaladt nyaláb intenzitásváltozással korrigált eltérüléséből számolható [50].

2.4.3. Molekulák mechanikai denaturálása

Az egyedi molekula erőspektroszkópia révén több molekuláris rendszer esetében is kiderült (riboszóma, motorfehérjék, fehérje tekeredés), hogy az erő egy fontos mechanikai paraméter lehet a biokémiai reakciókban. A molekulákra ható erők szerkezetváltozásokat indukálnak, kötések szakadhatnak fel, felnyílhatnak kriptikus helyek, kitekeredhetnek domének. Vagyis egy molekula denaturációja nem csak kémiai, de mechanikai úton is lehetséges. Egy egyszerű kétállapotú rendszerrel modellezve egy molekula a natív állapotából egy E_a aktivációs energiával jellemezhető energiagáton keresztül juthat el a denaturált állapotba. Amikor a molekulát megnyújtjuk, az erő úgy torzítja az energiaprofil, hogy $F \cdot \Delta x$ mechanikai munkával csökkenti a két állapot közötti energiagátat (8. ábra). A Δx a natív és az átmeneti állapot közötti megnyúlás

értéket fejezi ki [51, 52]. Moduláris szerkezetű biomolekulák, mint a titin nyújtásakor, az egyedi mechanikai denaturációs lépések kimutathatóak az erőspektrumban (**8. ábra**). Ha nyújtás során az erő elér egy adott karakterisztikus értéket, bekövetkezik az első globuláris domén kitekeredése. Ekkor a kitekeredett modul hossza hozzá adódik a kontúrhosszhoz (kontúrhossznövekmény) és az erő hirtelen lecsökken. Végül a görbe utolsó csúcsa a teljesen megnyújtott molekula feszülését mutatja. Ideális esetben a görbén annyi köztes fűrészfog-szerű csúcs látható, ahány doménből áll a megnyújtott molekula.



8. ábra Biomolekulák mechanikai denaturálása. **A:** Kétállapotú rendszer energiaprofilja külső erő nélkül (fekete) és külső erő esetén (piros). [53] **B:** Globuláris doménekből felépülő fehérjelánc mechanikai denaturálása. Az ábra az egyes szerkezeteknek megfelelő pontokat mutatja az erő-megnyúlás görbén.

Az erő, aminél egy domén kitekeredik, jellemzi annak mechanikai stabilitását. A titinmolekula közel 300 globuláris doménje közül csak néhánynak ismert az erőspektruma, így nem tudjuk, hogy a fent bemutatott mechanikai denaturáció *in situ* végmegy-e élettani körülmények között a titinmolekulában. Az eddig megismert és jellemzett globuláris domének zöme csak igen nagy (100-200 pN) erőknél tekeredik ki. Gyengébb, alacsony erőknél kitekeredő doméneket a titin funkcionálisan nyújtható, I-szakasz beli részéből eddig nem sikerült minden kétséget kizáróan kimutatni.

3. Célkitűzések

Munkánk során a titinmolekula erőhatásra bekövetkező szerkezeti változásait kívántuk vizsgálni, különös tekintettel arra, hogy az élettanilag releváns erőknél a molekula mely szerkezeti elemeiben történik változás. Legfőbb kérdéseink a következők voltak: (i) Létrejönnek-e szerkezeti változások a titinmolekulában élettanilag releváns erőhatásokra? (ii) Ha igen, a molekula mely szerkezeti elemei felelősek ezekért? (iii) Hogyan befolyásolják a szarkomerikus mechanikai paraméterek a titinben külső erőhatásra létrejövő szerkezetváltozásokat? (iv) Kimutathatóak-e a nyújtási szerkezetváltozások a molekulában?

Ezek alapján célul tűztük ki:

1. Egyedi natív titinmolekulák izolálását nyúl *m. longissimus dorsi* vázizom mintából és szívizomból, majd a minta minőségének ellenőrzését.
2. Egyedi natív titinmolekulák nyújtását lézercsipesszel, különös tekintettel az alacsony, élettanilag releváns erőtartományra.
3. Az élettani erőtartományban jelentkező nyújtási átmenetek jellemzését.
4. Az átmenetek háttérében álló titin szerkezetek feltérképezését.
5. Az erőhatásra bekövetkező szerkezetváltozások dinamikai vizsgálatát.
6. Egyedi natív titinmolekulák megnyújtását és felületre fésülését visszahúzó folyadékmeniszkusz technikával.
7. Felületre fésült, megnyújtott titinmolekulák topográfiai analízisét.

4. Módszerek

4.1. Natív titinmolekulák izolálása

Natív titinmolekulák izolálása a munkacsoportunk által korábban kidolgozott protokoll szerint történt. [42, 54]. A kísérleteinkben használt titin fehérjét nyúlból (*Oryctolagus cuniculus*, *New Zealand White*) izoláltuk. A kísérleti állatok tartása és leölése az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács XIV-I-001/29-7/2012 számú engedélye alapján és az abban meghatározott feltételek szerint történt.

A titin vázizom izoformát *m. longissimus dorsi* hátizomból, szívizom izoformát pedig kamraizomzatból izoláltuk. A kioperált izmot azonnal jégen hűtöttük, majd rövid időn belül ledaráltuk. A ledarált vázizom esetében 60 g illetve a szívizom esetében a teljes felaprított kamraizomzat volt a kiindulási szövetmennyiség. A darált vagy aprított szövetet kétszeres izomtérfogatnyi (izomtömeg (g) = izomtérfogat (ml)) homogenizáló oldatban (50 mM KCl, 5 mM EGTA, 1 mM NaHCO₃, pH:7.0, 0.01% NaN₃, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 20 µg/ml Tripszin inhibitor, 40 µg/ml Leupeptin, 20 µM E-64) forgóképes rendszerben homogenizáltuk. Az így nyert miofibrillum készítményt egymás után háromszor mostuk, ami során először centrifugáltuk (2000 g, 10 perc, 4°C) majd friss homogenizáló oldatban újra szuszpendáltuk az üledéket. A mosás után újabb centrifugálás következett, majd az üledéket egyszerez izomtérfogatnyi magas kálium koncentrációjú extrakciós oldatban (10 mM imidazole-HCl, pH: 7.0, 0.9 M KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.01% NaN₃, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 40 µg/ml Tripszin inhibitor, 40 µg/ml Leupeptin, 30 µM E-64) vettük fel. Ebben az oldatban 5 percig keverés mellett extraháltuk a mintát. A magas kálium koncentráció mellett a szarkomerikus vastag filamentáris rendszer dezintegrálódik, így oldatba vihetjük a titin és miozin molekulákat. Ezután centrifugálással (20000 g, 30 perc, 4°C) leüleptítettük a nem beoldott komponenseket és a miofibrillumokat. Az így nyert tiszta felülúszó elsősorban miozin és titin molekulákban gazdag. Ezután a felülúszót lassan, precipitációs oldattal (0.1 mM NaHCO₃, 0.3 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 2 µg/ml Leupeptin, 1 µM E-64) addig hígítottuk, míg az ionkoncentrációt 200 mM-ra csökkentettük. A hígítás végére az oldott miozin kicsapódik, míg a titin oldatban marad. A kicsapást az oldat opálössz válása jelzi. Ezt követően az oldatot 1 órán át inkubáltuk

jégen. Ezalatt az oldatból kivált miozin molekulák vastag filamentumokká asszociálnak. A kivált miozint centrifugálással (20000 g, 30 perc, 4°C) leülepítettük, majd a miozin mentes, titint tartalmazó felülúszót tovább hígítottuk precipitációs oldattal míg az ionerő 50 mM-ra csökkent. A titin kicsapódását az oldat enyhe opálosodása is jelezte. Ezután 40 percig inkubáltuk az oldatot jégen, majd centrifugálással (10000 g, 30 perc, 4°C) szedimentáltuk az oldatból kivált titin komplexeket. Ilyenkor a centrifugálás után az egyedi titin molekulák, titin oligomerek és néhány a titinhez kötő, feltehetően M-csík, Z-csík és A-szakasz asszociált fehérjék a centrifugacső falához tapadnak. A felülúszót leöntöttük, majd a centrifugacsövek faláról kevés (~2 ml) magas ionerősségű oldattal (30 mM K-foszfát, pH: 7.0, 0.6 M KCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 µg/ml Leupeptin, 10 µM E-64, 0.01% NaN₃, 0.05% Tween-20) leoldottuk a titin komplexeket. Ezután a nem visszaoldódott aggregátumokat centrifugáltuk, majd a tiszta felülúszóból 1 ml-t vittünk fel gélszűrő oszlopra (Sepharose CL-2B (SIGMA), oszlopátmérő: 1.1 cm, oszlopmagasság: 100 cm, oszloptérfogat ~100 ml). A gélkromatográfiás puffer (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% NaN₃, 0.05% Tween-20) áramlási sebessége 0.2 ml/perc volt. A mintafelvitelt követő első 20 ml (holt térfogat) átfolyása után 5 percenként egyenként 1 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk. Az elúciós frakciókat 280 nm-en fotometrálna felvettük az elúciós profilt. A kísérletekhez felhasznált frakciók minőségét atomerőmikroszkóppal és grádiens SDS PAGE elektroforézis segítségével ellenőriztük.

4.2. Mikrogyöngyök funkcionálizálása

Az egyedi molekulamanipulációs kísérletek esetében kritikus a vizsgált molekula végeinek specifikus megragadása (cf. **7. ábra**). Az erőmérő lézercsipeszes mérések esetében ez a két mikrogyöngy felületi funkcionálizálása révén valósul meg. Kísérleteinkben az egyedi, natív titin molekulákat a Z-csík felőli végükön egy a proximális I-szakasz szekvenciára specifikus IgG típusú antitesttel (T12 antitest, [7]) ragadtuk meg, míg a molekula másik végét aspecifikusan, a Sulpho-SANPAH (Thermo Scientific) fotoreaktív keresztkötő, vagy egyes esetekben PEVK domén specifikus ellenanyag (9D10 antitest, [55]) segítségével kapcsoltuk a gyöngyöz.

4.2.1. T12 antitest - titin borítású mikrogyöngyök

A T12 antitest jelölést 3 μm átmérőjű karboxilált felületű polisztirol mikrogyöngyökön végeztük (Kisker Biotech). Első lépésként a gyöngyök felületére protein-A molekulákat kötöttünk karbodiimid keresztkötési reakcióban. 100 μl 5%-os mikrogyöngy szuszpenzióhoz 10 μl , 5 mg/ml koncentrációjú protein-A oldatot adtunk, majd 1 ml keresztkötő oldatban (0.1 M NaH_2PO_4 , pH: 5.0, 10 mg/ml EDC) szuszpendáltuk és állandó lassú keverés mellett 2 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezalatt a karbodiimid kovalens kötéseket létesít a gyöngyök felszíni karboxil és a fehérje primer amin csoportjai között. Az így nyert protein-A borítású gyöngyöket háromszor mostuk (850 g, 5 perc) 0.1 M Na-borát (pH: 8.2) oldatban, hogy eltávolítsuk a keresztkötőt az oldatból. Ezután a T12 antitest tartalmú szérum oldatból 35 μl -t adtunk a gyöngy szuszpenzióhoz és 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten állandó lassú keverés mellett. A protein-A fehérje az IgG típusú antitestek nehéz láncának F_c régióját szelektíven köti, így a gyöngy felületéhez az antitestek olyan orientációban kötődnek, hogy az epitóp felismerő régió kifelé néz, vagyis biztosítja a későbbi titin felismerést. Ezután a gyöngy szuszpenzióból a nem kötött antitesteket mosással eltávolítottuk, majd a szuszpenziót 0.2 M trietanolaminban (pH: 8.2) mostuk háromszor. Ezt követően a protein-A fehérjéket és a hozzájuk kötött antitesteket 45 perces inkubációban keresztkötöttük imidoészter oldatban (0.2 M trietanolamin, pH: 8.2, 50 mM DMP). Az imidoészter kovalens kötéseket létesít amin csoportok között, így rögzíti az antitesteket a gyöngy felületéhez kötött protein-A réteghez. Ezután a gyöngy szuszpenziót először 50 mM Etanolaminban, pH: 8.2, majd 0.1 M Na-borátban, pH: 8.2 mossuk, végül AB pufferben (25 mM Imidazol-HCl, pH: 7.4, 0.2 M KCl, 4 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 1 mM DTT) vesszük fel, a végső gyöngy koncentráció $\sim 0.5\%$.

A T12 antitesttel borított gyöngyöket a titin felkötés előtt 5 percig keverés mellett inkubáltuk blokkoló oldatban (1% BSA, 0.2% Tween-20) azért, hogy elfedjük a gyöngy felszínén az aspecifikus kötőhelyeket. Ezzel a lépéssel jelentősen csökkenthetjük a titin aspecifikus kötődését a mikrogyöngy felszínéhez [41]. A gyöngyöket mostuk és AB pufferben vettük fel.

Végezetül 1 ml $\sim 0.05\%$ -os blokkolt T12 gyöngy szuszpenzióhoz a gélszűrő oszlopról eluált titin csúcs leszálló ágát alkotó frakciókból adtunk 1 μl -t majd szobahőmérsékleten lassú keverés mellett 30 percig inkubáltuk. A T12 antitest nagy

affinitással és specificitással köt a titin N-terminálisához közeli proximális tandem Ig-régióban található I12 doménhez [7]. Ezután centrifugálással ülepítettük az immár titin molekulákkal borított gyöngyöket majd a felülúszót óvatosan eltávolítva, friss AB pufferben újraszuszpendáltuk őket.

4.2.2. 9D10 anti-PEVK antitest borítású mikrogyöngyök

Az IgM típusú 9D10 anti-PEVK antitestet 2.5 µm átmérőjű karboxilált felületű polisztrén mikrogyöngyökre kötöttük karbodiimid keresztkötési reakcióban. 100 µl 5%-os mikrogyöngy szuszpenzióhoz 100 µl 9D10 antitest tartalmú szérum oldatot adtunk, majd 1 ml keresztkötő oldatban (0.1 M NaH₂PO₄, pH: 5.0, 10 mg/ml EDC) szuszpendáltuk és állandó lassú keverés mellett 2 órát szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezalatt a karbodiimid kovalens kötéseket létesít a gyöngyök felszíni karboxil és a fehérje primer amin csoportjai között. Az így nyert 9D10 borítású gyöngyöket először 0.1 M Na-borát (pH: 8.2), majd háromszor AB puffer oldatban mostuk (850 g, 5 perc), hogy eltávolítsuk a keresztkötőt az oldatból. Végül a T12 borítású gyöngyökkel megegyező protokoll szerint blokkoltuk a gyöngyök felszíni aspecifikus kötőhelyeit.

4.2.3. Fotoreaktív keresztkötő borítású mikrogyöngyök

A felszíni funkcionálizálást fotoreaktív keresztkötővel 2.5 µm átmérőjű amino funkcionizált felületű polisztrén mikrogyöngyökön végeztük (Kisker Biotech). 100 µl 5%-os amino funkcionizált gyöngyszuszpenziót 900 µl 0.1 M Na₂CO₃, pH: 9.0 oldatban vettünk fel, majd ~10 µg Sulpho-SANPAH keresztkötőt oldottunk fel a szuszpenzióban. A Sulpho-SANPAH egy 18.2 Å hosszú keresztkötő molekula aminek egyik végén egy amino reaktív NHS-észter, másikon pedig egy fotoreaktív nitrofenilazid csoport található. A szuszpenziót fénytől védve inkubáltuk keverés mellett 30 percig, hogy az NHS-észter kovalens kötést alakíthasson ki a gyöngyfelszíni NH₂ csoportokkal. Ezután a gyöngyöket mostuk, AB pufferben vettük fel, fénytől védve tároltuk. A végső gyöngy koncentráció ~0.5% volt. Az így nyert fotoreaktív gyöngyök felszíne alacsony foton energiájú UV sugárzással (300-460 nm) aktiválható, ami nukleofil reakcióban elsősorban NH₂ csoporthoz köt.

4.3. Egyedi titinmolekulák vizsgálata lézercsipessel

Kísérleteinket saját építésű, két sugárnyalábos erőmérő lézercsipessel végeztük. A precíz mozgatót biztosító piezo állványra saját készítésű áramlási folyadékcellát erősítettünk, amit a folyadék áramoltató rendszer segítségével, AB pufferrel töltöttünk fel (25 mM Imidazol-HCl, pH: 7.4, 0.2 M KCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.01% NaN₃). A folyadékcellába építettünk egy mikropipettát, ami a fotoreaktív gyöngy rögzítésére szolgál. A folyadékcellát (és ezen keresztül a mikropipettát) az XYZ irányokban szabályozható piezo állvánnyal (Nano-PDQ375, Mad City Labs) mozgattuk.

A kísérletek során a 3 µm átmérőjű T12 anti-titin borítású mikrogyöngyöt a lézercsipessel fogtuk meg, míg a 2.5 µm átmérőjű fotoreaktív borítású mikrogyöngyöt a folyadékcellába épített mikropipettához szippantottuk. A kísérlet kezdeteként először a mikropipettához szippantott gyöngyöt hozzáérintjük a csapdázott, titin borítású gyöngyöz. Ilyenkor a fotoreaktív mikrogyöngyök felszínéhez kötött sulfo-SANPAH keresztkötő nitrofenil-azid csoportja fotoaktiválódik. Bár a nitrofenil-azid abszorpciója a 300-460 nm-es tartományba esik, a lézercsipesz fókusza közelében a nagy foton sűrűség miatt megnő a kétfoton abszorpció valószínűsége [56]. A csapdázó lézerek hullámhossza 845 nm így a sulfo-SANPAH kétfoton abszorpció révén aktiválódik. Az aktivált keresztkötő kovalens kötést létesít a másik gyöngyöz kötött titin molekulák amino csoportjaival, így nem specifikus módon fogjuk meg a molekula M-csík felőli végét. Az így megragadott molekulát a pipetta gyöngy mozgásával különböző mechanikai kísérletekben manipuláltuk. A kísérletek során a folyadék áramoltató rendszer lehetőséget ad arra, hogy cseréljük a puffert a megragadott molekula körül, így közvetlen vizsgálható például az ionerősség változtatásának vagy kémiai ágensek koncentrációtól függő hatása ugyanazon molekula mechanikai viselkedésére.

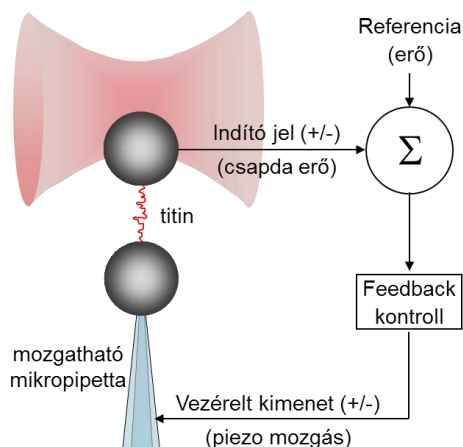
4.3.1. Titin nyújtása állandó sebességgel

Egyedi titin molekulák mechanikai manipulációjának egyik módja az, hogy a pipetta mozgásával növeljük a két gyöngy közötti távolságot. Ilyenkor, a gyöngyök közé horgonyzott molekulát nyújtjuk, vagyis a pipetta elmozdulásával növekvő erő ébred a megnyújtott fehérjében. A két gyöngy közelítésével az erőt fokozatosan kioltjuk, vagyis a megnyújtott molekula relaxál. Az ilyen nyújtás-visszaengedési ciklusokban a piezo sebességét állandó értéken (tipikusan: 250 nm/s) tartva

erő-elmozdulás görbéket regisztráltunk. A mechanikai ciklusokat tetszőleges paraméterekkel (nyújtási sebesség, elmozdulás), tetszőleges számban végezhetjük el, így ugyanazon a molekulán akár több nyújtás-visszaengedési görbe is regisztrálható.

4.3.2. Titin nyújtása állandó erővel (erővisszacsatolt lézercsipesz)

Az erővisszacsatolt mérési módban a molekulára ható erőt folyamatosan egy általunk meghatározott referencia értéken tartjuk a mikropipettát mozgó piezo gyors szabályozásával. A szabályozás PID vezérlő algoritmussal történik, amely a molekulára ható erőt a két gyöngy közötti távolság gyors dinamikus szabályozásával tartja a referencia értéken. A mérés során az erő és piezo elmozdulás értékeket regisztráljuk az idő függvényében (9. ábra).



9. ábra Erővisszacsatolt üzemű lézercsipesz működési sémája. Az erőt (és így a csapdázott gyöngy kitérését) a PID vezérelt visszacsatoló rendszer a pipetta pozíció gyors változtatásával tartja a megadott referencia értéken.

4.4. Adatanalízis

4.4.1. Molekulahossz korrekció

A mérések során gyűjtött piezo elmozdulás adatokból kiszámítható a molekula vég-vég hossza, abban az esetben, ha ismerjük a lézercsipesz virtuális rugóállandóját és a 0 vég-vég távolsághoz tartozó piezo pozíciót. A lézercsipesz virtuális rugóállandója kifejezi, hogy adott erőnél mekkora a csapdázott gyöngy kitérése az egyensúlyi helyzetből. Ez egyszerűen meghatározható a Hook-féle rugalmassági törvény alapján. Amennyiben a mozgatható gyöngyöt a csapdázott gyöngyhez nyomjuk, így kitérítjük azt egyensúlyi helyzetéből, annyiban a kitéréssel arányos visszatérítő erő hat a

gyöngyre. A gyöngy kitérése (Δx_{gy}) és a mért erő (F) közötti arányossági tényező a virtuális rugóállandó (k):

$$k = \frac{F}{\Delta x_{gy}} \quad (2)$$

Méréseink során a lézercsipesz virtuális rugóállandója tipikusan 0.2 pN/nm-nek adódott. A virtuális rugóállandóval korrigált piezo pozíció (x) és a 0 vég-vég távolsághoz tartozó piezo pozíció (x_0) különbségéből megkapjuk a molekula F erőhöz tartozó vég-vég hosszát (z):

$$z = \left(x - \frac{F}{k} \right) - x_0. \quad (3)$$

Az így korrigált érték függvényében ábrázolva az erőt, kapjuk az erő-megnyúlás görbét, míg az idő függvényében ábrázolva kapjuk a vég-vég hossz-változás görbét.

4.4.2. Erőgörbék analízise

Kísérleteinkben az adatgyűjtést LabView (v.7.1) míg az adatsorok analízisét IgroPro (v.6.2.2.2.) szoftverrel végeztük. Az erő-megnyúlás görbék egyes szakaszaira a féregszerű-lánc (worm like chain, WLC) polimer modell által leírt hiperbolát illesztettük:

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

ahol L_p a molekula perzisztenciahossza, L_c a kontúrhossza, z a vég-vég hossza, F a molekulára kifejtett nyújtó erő, k_B a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet [44]. A nemlineáris Marquardt-Levenberg illesztésekből megkaptuk a molekula adott erőhöz tartozó kontúrhosszát és a rugalmasságát leíró perzisztenciahosszát.

Az erővisszacsatolt mérésekben meghatározott kinetikai sebességi állandókat a módosított Bell modell egyenletével illesztettük:

$$k_F = k_0 e^{\frac{F\Delta x}{k_B T}}, \quad (5)$$

ahol k_F a kitekeredési reakció sebességi állandója F erőhatás esetén, k_0 a nulla erőhöz tartozó, spontán kitekeredés sebességi állandója, Δx a kitekeredéshez szükséges tranzíciós távolság a reakció koordinátán (cf. **8. ábra**), k_B a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet [51, 52].

4.5. A titinmolekula megnyúlásának modellezése és szimulációja

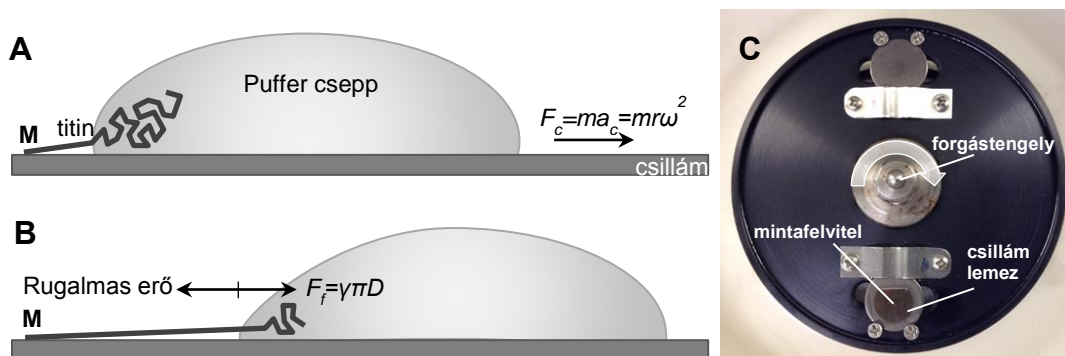
A titin globuláris domének külső erő hatására bekövetkező ki- és feltekeredését illetve a PEVK doménen belüli kötések felszakadását és visszaalakulását modelleztük Monte-Carlo szimulációval, a munkacsoportunk által korábban kidolgozott algoritmus segítségével [42, 57]. A szimulációban használt modell molekula 50 globuláris domént és egy 700 nm hosszú PEVK domént tartalmazott. A PEVK domén intradomén kölcsönhatásainak modellezésére az ismert, 28 aminosavból álló ismétlődési motívumait vettük alapul [18]. Ebben a modellünkben a relaxált PEVK domén kontúrhossza a láncon belüli elektrosztatikus kölcsönhatások révén megrövidült. Az állandó sebességű nyújtási szimulációban az erőt a WLC egyenlet (**4. egyenlet**) alapján számoltuk [44]. A pillanatnyi erő értéknél mind a globuláris domének, mind a PEVK motívumok esetében ki- és feltekert egységek számát megkaptuk a:

$$dN = N\omega_0 dt e^{-\frac{E_a - (F\Delta x)}{k_B T}} \quad (6)$$

egyenlet szerint [51, 52], ahol dN a ki- vagy feltekeredett egységek száma dt időintervallum alatt, N a PEVK motívumok vagy globuláris domének száma, ω_0 a spontán átalakulás sebességi állandója, E_a az átalakulási energia gát, F az erő, Δx az átalakuláshoz szükséges tranzíciós hossz, k_B a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet. Amennyiben dN nem egész értéket vett fel, úgy véletlenszám-generálás alapján döntöttük el, hogy le- vagy felkerekítjük az értéket. E_a és Δx értékeinek a globuláris domén kitekeredésre 1.08×10^{-19} J és 0.3 nm, a feltekeredésre 8×10^{-20} J és 8 nm-t vettünk molekulánként. E_a értékeinek a PEVK domén motívumok kötéseinek felszakítására 1.05×10^{-19} J a visszaalakulásra 8×10^{-20} J-t alkalmaztunk molekulánként. A PEVK Δx értékeit kötésfelszakítás esetén 0.3 és 0.5 nm között véletlenszerűen változtattuk, míg a kötés visszaalakulás esetén 11 nm-el számoltunk molekulánként.

4.6. Titin nyújtása visszahúzódó folyadékmeniszkusszal

Egyedi titinmolekulák nyújtási szerkezetváltozásainak vizsgálatára a korábban kifejlesztett visszahúzódó meniszkusz módszert [58] használtuk, melynek eredményeképpen túlnyújtott molekulák adszorbeálhatók egy szubsztrát felületre és így AFM-el vizsgálhatók. A módszer lényege, hogy egy titint tartalmazó folyadékcseppet cseppentünk egy csillám felületre, majd azonnal nagy sebességgel centrifugáljuk. A centrifugálást saját készítésű rotorral végeztük, a csillámfelszínt a rotor széli részére rögzítettük a forgási középponttól 5 cm-re. Ahogy a folyadékcsepp a centrifugálás hatására lefut a felületről, a visszahúzódó folyadék-gáz határfelületi meniszkusz az oldatból részlegesen letapadt molekulákat megnyújtja és egyben kifésüli a felszínre (10. ábra).



10. ábra Titin nyújtása visszahúzódó folyadék meniszkusszal. **A kép:** A titinmolekula egyik végével (tipikusan M-csík vég) letapad a csillám felszínre és a centrifugális erő (F_c) hatására visszahúzódó folyadékcsepp határréteg megnyújtja. **B kép:** A csepp mozgása közben a felületi feszültséggel és a molekula kerületével arányos erő (F_f) nyújtja a molekulát mielőtt az a felületre kitapadna. A felületi erővel ellentétes irányú rugalmas erő ébred a fehérjeláncban. **C kép:** A módszerben használt saját építésű rotor fényképe. A mintát a forgástengelytől 5 cm-re elhelyezett csillám lemezre vittük fel.

A főként titin monomereket tartalmazó elúciós frakcióból vett mintát glicerines PBS oldattal hígítottuk (50 % glicerin, 10 mM K-foszfát pH 7.4, 140 mM NaCl, 1M Urea, 0.02 % NaN_3) hozzávetőleg 20 $\mu\text{g/ml}$ végső fehérje koncentrációra. Az 1M urea alkalmazása a fehérje aggregáció csökkentését szolgálta. Ennél a koncentrációnál az urea még nem befolyásolja a globuláris domének kitekeredését [59]. 20 μl mintát vittünk fel frissen hasított csillámfelületre és azonnal 13000 min^{-1} fordulatszámon 10 másodpercig pörgettük egy erre a célra épített rotorral ($r_{\text{rotor}} = 5 \text{ cm}$). Ezután a csillámfelszínt bőségesen mostuk desztillált vízzel majd N_2 gázzal szárítottuk.

A molekulára ható erőt (F) három független módszerrel is becsültük. Elsőként *a priori* a titinfilamentummal érintkező folyadék-határfelület kerületén (πd) ható felületi feszültség alapján:

$$F = \gamma \pi d, \quad (7)$$

ahol d egy titin domén átmérője (2 nm [58, 60]) és γ a pufferoldat felületi feszültsége. Másodikként *a posteriori* számoltuk ki az erőt a megnyújtott domének relatív megnyúlásából $\left(\frac{z}{L_c}\right)$, amit a mért vég-vég hosszak (z) és a szekvencia adatok alapján számolt kontúrhossz ($L_c = 32.1$ nm) arányából kapjuk meg. A kitekert domének kontúrhosszát a szekvenciából (UniProt Q8WZ42) számolt átlagos domén aminosav szám (91.8 aminosav/domén) és az egy peptid kötésre vonatkoztatott 3.5 Å kötéshossz szorzataként számoltuk. Az erő és a relatív megnyúlás közötti összefüggést a féregszerű-lánc (WLC) polimer modell egyenlete írja le (**4. egyenlet**). Harmadik módszerként az egy molekulán megszámlált kitekeredett domének száma alapján számoltuk az erőt [36, 51]:

$$N_{ki} = N_{össz} \Delta t k_0 e^{\frac{F \Delta x}{k_B T}}, \quad (8)$$

ahol N_{ki} a kitekert domének száma, $N_{össz}$ az összes globuláris domén (300 domén/titin [6, 16, 19]), Δt az időintervallum ami alatt a meniszkusz végigvonul a molekula kontúrján, k_0 a spontán domén kitekeredés sebességi állandója ($3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [36]), F az erő és k_B a Boltzman állandó, T az abszolút hőmérséklet és Δx a tranzíciós hossz (3 Å [36]). Δt -re hozzávetőleg 5×10^{-6} s-ot kaptunk a

$$\Delta t = \sqrt{\frac{s}{0.011 \text{ RPM}^2 r}} \quad (9)$$

képlet alapján, ahol r a rotor sugara (5 cm), RPM a percenkénti fordulatszám (13000 min^{-1}) és s a túlnyújtott titinmolekulák átlagos kontúrhossza ($\sim 2 \mu\text{m}$).

4.7. Atomerő mikroszkópia és képanalízis

A csillámfelszínre adszorbeált titinmolekulákról nagyfelbontású atomerő mikroszkóppal (Cypher, Asylum Research, Santa Barbara, CA) készítettünk felvételeket. A szárított mintákat „tapogató” (tapping) üzemmódban pásztáztuk Olympus AC 160 (tű görbületi sugara: 9 nm) illetve AC55TS (tű görbületi sugara: 7 nm) rugólapkákkal. A pásztázási sorfrekvencia 3-6 Hz között, a pixelfelbontás 0.5-2 nm között változott. A felvételeken mért topográfiai távolságokat korrigáltuk a rugólapka tű és a minta konvolúciójára [61]. Ez alapján a titinmolekula szélességét (w) az alábbi képlettel számoltuk:

$$w = w_m - 2\sqrt{2hr - h^2}, \quad (10)$$

ahol w_m a molekulák mért szélessége, h a filamentum tengelyén mért topográfiai magasság és r a tű sugara. A molekula kontúrján láthatók hézagok szélességét (g) **(31. ábra)** a

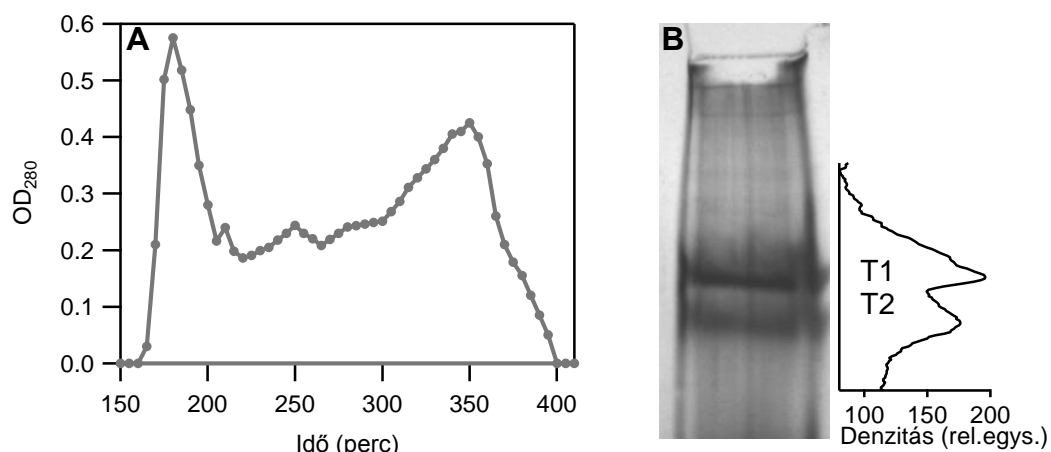
$$g = g_m + 2\sqrt{2hr - h^2} \quad (11)$$

képlet alapján számoltuk, ahol g_m a mért hézagszélesség.

5. Eredmények

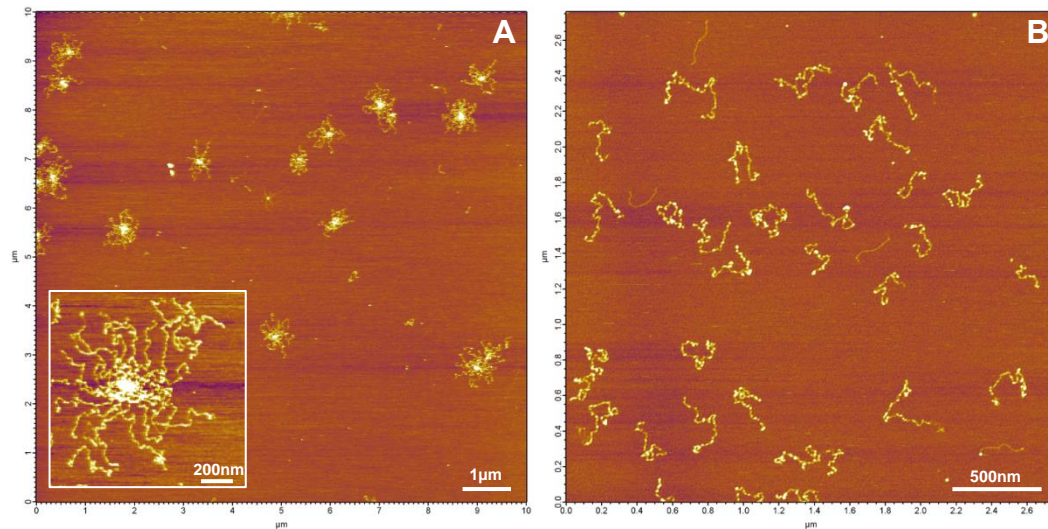
5.1. Titin izolálása

Kísérleteinkben vizsgált titin molekulákat nyúl hát- és szívizomszövetből izoláltuk a 4.1-es pontban leírtak szerint. Az izolálás utolsó lépéseként méretkizárásos gélkromatográfiát (gélszűrést) végeztünk. A gélszűrés során az oszlopra felvitt mintában található egyes molekulák méretükkel fordítottan arányos retenciós idővel jelennek meg az elúciós frakciókban. Egy tipikus elúciós profilt mutat az **11.A ábra**, melyen az első megjelenő csúcsot, a legnagyobb méretű molekulákat tartalmazó titin frakciók alkotják.



11. ábra Vázizom titin izolálása nyúl hátizomból. **A ábra:** Izomszövetből izolált vázizom titin tisztítása: méretkizárásos gél kromatográfia utáni elúciós profil. Az egyes pontok az egyes elúciós frakciókat jelzik. **B ábra:** Vázizom titin gradiens SDS poliakrilamid-gél elektroforetogramja. Az ezüstözés után két csík látható a gélen. A denzitogramon T1 a teljes hosszúságú titin, T2 degradációs termék.

A csúcsot alkotó egyes frakciók között is tapasztalható méretbeli elkülönülés. A csúcs felszálló ágát inkább több titin molekulából álló, feltehetően M-csík fehérjéken keresztül asszociált oligomerek alkotják. A leszálló ágat alkotó, hosszabb retenciós idejű frakciókban fokozatosan csökken az oligomerek koncentrációja és egyre több az egyedi titin molekula. Gyakran egy kisebb váll is található a leszálló ág alján, ami AFM-es mérések alapján főként egyedi molekulákat tartalmaz (**12. ábra**). A legnagyobb optikai denzitású csúcsfrakciót ezután gradiens SDS poliakrilamid gélelektroforézissel vizsgáltuk [62] (**11.B ábra**).

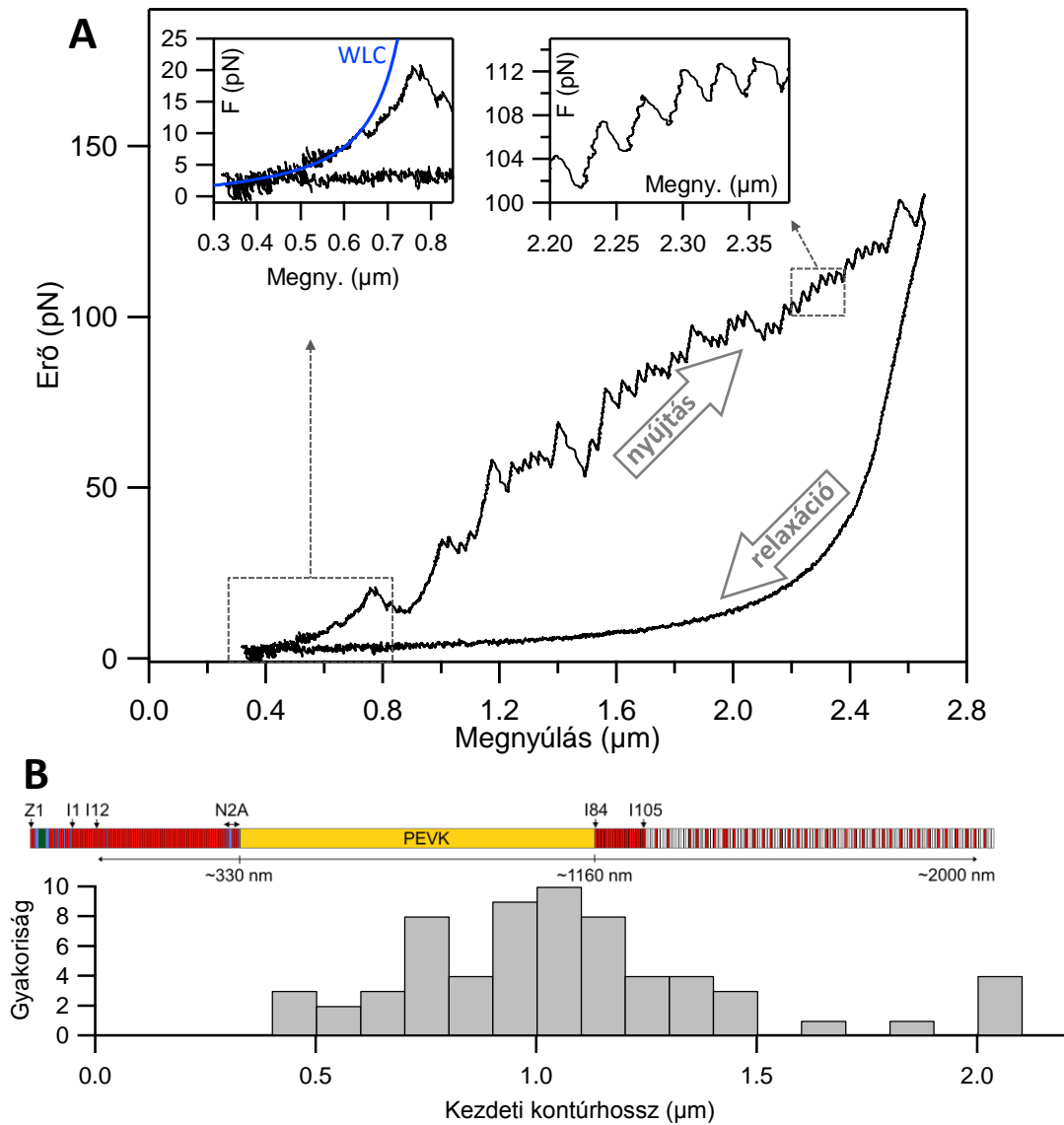


12. ábra Izolált titin molekulák AFM felvétele. A csillámfelületre adszorbeált molekulák a gélsűrűs elúciós frakcióiból származnak. **A kép:** Titin oligomerek a csúcsfrakcióból. **Betétábra:** Egy titin oligomer nagyított képe. **B kép:** egyedi titin molekulák az elúciós csúcs leszálló ágának alsó frakciójából.

5.2. Titin nyújtása lézercsippel élettani erőtartományban

Kísérleteinkben nyúl hát- és szívizomból izolált egyedi titin molekulákat manipuláltunk lézercsippel, annak érdekében, hogy vizsgáljuk a molekula külső erőhatásra bekövetkező szerkezeti változásait élettanilag releváns idő és erőskálán. A vizsgált egyedi titin molekulákat N-terminális végükön T12 antitesttel, míg a C-terminális felőli végén aspecifikus módon, sulpho-SANPAH fotoreaktív keresztkötővel rögzítettük a mikrogöngyökhöz. A molekulát állandó sebességgel nyújtva az erő nem-lineáris módon növekszik, mindaddig, míg az első szerkezeti átalakulás végbe nem megy a molekulában. Ilyenkor az erő hatására egy domént vagy egyéb harmadlagos szerkezeti elemet stabilizáló kötések felbomlanak, így a molekula kontúrhossza hirtelen megnő. Az ilyen szerkezeti átmenetek fűrészfogra emlékeztető mintázatot eredményeznek az erő-megnyúlás görbe nyújtási szakaszán. A fűrészfog feljutó szára a megnyújtott molekulára ható egyre növekvő erőt mutatja, vagyis tükrözi annak rugalmasságát. A leszálló szár meredekségét a lézercsipesz rugóállandója szabja meg (**13. ábra**). Az átmenet csúcsa megadja az adott húzási sebesség esetén kontúrhossz-növekményt okozó szerkezeti átalakulás kiváltásához szükséges pillanatnyi erő értéket [52, 63, 64] (**8. ábra**). A nyújtási görbék kezdeti felszálló szakaszait még az első szerkezeti átmenet előtt illesztettük a WLC modell függvényével (**13. ábra**). Az

illesztéséből kapott kontúrhossz a molekula kezdeti kontúrhossza, ami alapján meghatározható, hogy mekkora titin szakaszt ragadtunk meg a kísérlet során.



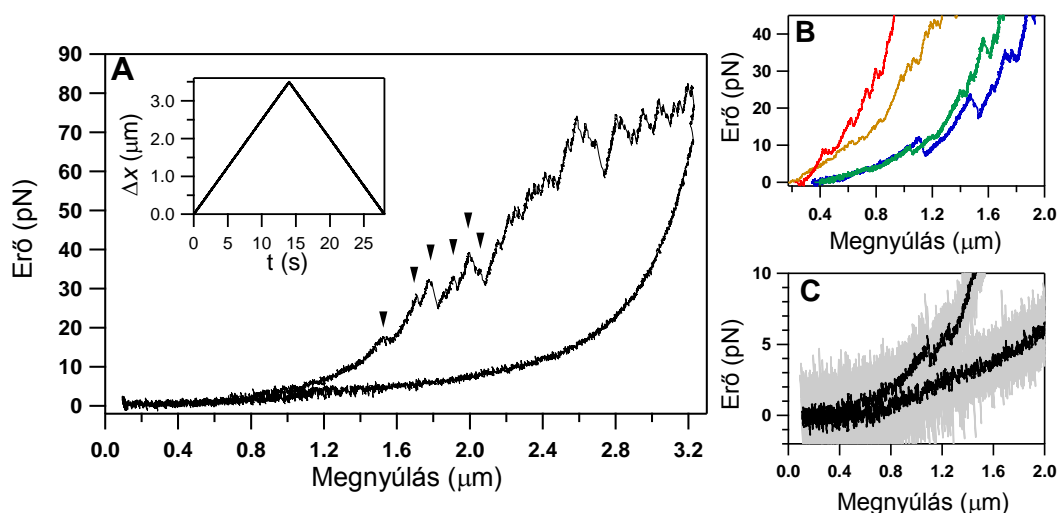
13. ábra Titin nyújtása lézercsipesszel. **A ábra:** Egyedi titin molekula erő-megnyúlás diagramja. A nyilak jelzik a mechanikai ciklus irányát. Nyújtási sebesség: 250 nm/s. Baloldali nagyítás: WLC (4. egyenlet) illesztése a nyújtási görbe kezdeti, még erőátmenet-mentes szakaszára. Jobboldali nagyítás: diszkrét, globuláris domén kitekeredési eseményekből eredő fűrészfogra hasonló átmenetek. Az átmenetek közötti kontúrhossznövekmény jellemzi a kitekert szegmens hosszát (~30 nm). **B ábra:** A kísérleteinkben vizsgált titinmolekulák kezdeti kontúrhosszeloszlása. A hisztogram felett a *m. soleus* izoforma doménszerkezeti sémája látható [6, 16].

Nagyobb (~100 pN) erőknél elsősorban olyan diszkrét átmenetek jelentkeznek a nyújtási görbén, melyekben az egyes kontúrhossz növekmények (fűrészfogak csúcs-csúcs távolsága) közel egyformán, ~30 nm-el növelik a molekula kontúrhosszát. Ezt az egyes ~90-100 aminosav átlagos hosszúságú globuláris domének sorozatos kitekeredése

eredményezi. Kitekeredéskor a domént stabilizáló H-hidak az erő hatására felszakadnak és a felnyílt modul kontúrhossza hozzáadódik a molekula kontúrhosszához, ami az erő gyors kioltásához vezet [65, 66]. A visszaengedési görbe mentes a diszkrét átmenetektől, azt főként a molekula entrópiikus rugalmassága vezérli. Mivel a molekula rövidülése során más mechanikai útvonalat jár be, mint a nyújtás során, ezért nagyméretű hiszterézis tapasztalható a titin erő–megnyúlás-görbéin.

5.2.1. Alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulások jellemzése

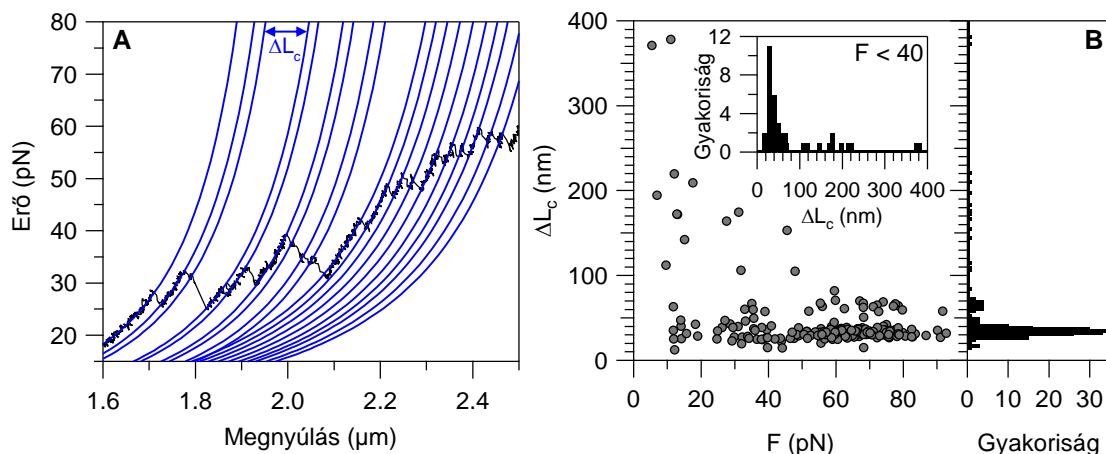
A fiziológiai körülmények között egyetlen titinmolekulára ható erő értékére pontos mérések nem, csak extrapolációk állnak rendelkezésre. Mivel az irodalmi becslések az *in situ* egyetlen titinre ható erőtartomány felső határát mintegy 5-20 pN-ra becsülik [32, 67-71], kísérleteinkben elsősorban a titin nyújtási görbéjén az alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulásokat kívántuk vizsgálni. Ezek az alacsony erőknél jelentkező erő–megnyúlás-átmenetek hasonlóak a már korábban ismert globuláris domén–kitekeredési eseményekhez [65], vagyis fűrészfogszerű átmenetként jelentkeznek az erő–megnyúlás-görbe felfutó szakaszán (**14. ábra**).



14. ábra Harántcsíkolt izomból izolált egyedi titinmolekulák alacsony erőknél mért szerkezeti átmenetei. **A ábra:** Egy teljes mechanikai ciklus során felvett erő–megnyúlás-diagram. A nyilak az alacsony erőknél jelentkező túlnyúlási átmeneteket mutatják. A betétábra mutatja a kísérletben alkalmazott mechanikai protokollt (Δx : piezo elmozdulás). **B ábra:** Négy különböző titinmolekula nyújtási erőgörbéje az $F < 40$ pN erőtartományban. **C ábra:** 5 pN erőnél jelentkező nyújtási átmenet. (szürke: nyers adat, fekete: ugyanazon adatsor 10 pontos átlagolás után).

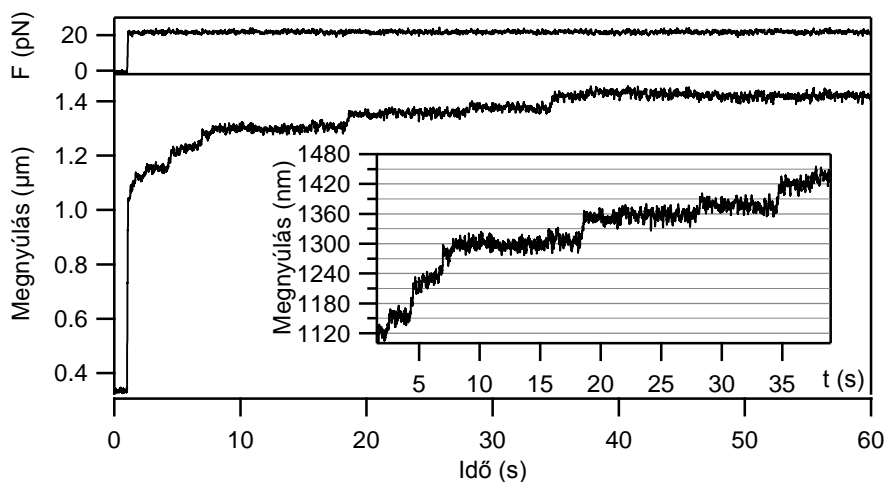
Ilyen átmenetek már tipikusan 10 pN erőnél észlelhetők és az erő növekedésével folyamatosan követik egymást a nyújtási görbén. A visszaengedési görbe ezzel

szemben, alacsony erőtartományban is, mindig diszkrét átmenetektől mentes. A kontúrhossznövekmények méréséhez a WLC polimer modell egyenletét (4. egyenlet) illesztettük a fűrészfogak felszálló szakaszára (15.A ábra). A szomszédos erőátmenetek illesztéséből kapott kontúrhossz értékek különbsége az egyes szerkezeti átmenethez tartozó kontúrhossznövekményeket adja. A fűrészfog csúcsához tartozó erő érték mutatja az adott túlnyúlási átmenethez tartozó tranzíciós erőt. A kontúrhossznövekmények a hozzájuk tartozó tranzíciós erők függvényében két nagy csoportra oszthatók (15.B ábra). Az inkább élettanilag releváns alacsony ($F \leq 40$ pN) és az inkább erő-spektroszkópiailag releváns magas ($F > 40$ pN) erőtartomány. A 40 pN alatt jelentkező átmenetek esetén a kontúrhossz-növekmények változatosak, akár több száz nanométerrel is növelhetik a titin hosszát. A 40 pN feletti átmenetek viszont egyenletes, ~ 30 nm-es lépésekben növelik a molekulahosszt. A 40 pN-nál nagyobb erőknél mért kontúrhossz-növekmény eloszlása egy ~ 30 nm-es (31.7 ± 5.3 nm S.D.) és egy ~ 60 nm-es várható érték körül csoportosul. Ezzel szemben a 40 pN-nál kisebb erőknél az eloszlás jóval szélesebb. Habár az eloszlás itt is ~ 30 nm körüli maximumot vesz fel, a széleken a tíztől egészen a több száz nanométerig is található értékek. Az illesztésekből kapott perzisztenciahossz értékek az alacsony erőtartományban 0.9-1.9 nm-nek, míg nagyobb erőknél 0.75-0.85 nm-nek adódtak. A kapott perzisztenciahosszak jó egyezést mutatnak korábbi titinyújtási munkákban kapott értékekkel [42, 72, 73].



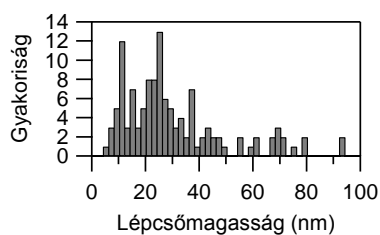
15. ábra Nyújtási kontúrhossznövekmények vizsgálata vázizom titin izoformán. **A ábra:** A WLC polimer modell illesztése az egyes átmenetekre (kék). **B ábra:** Vázizom titin nyújtási kontúrhossznövekményei a tranzíciós erők függvényében. A jobb oldali ábrarész a kontúrhossznövekmény-hisztogramot mutatja a teljes vizsgált erőtartományban. A betétábra a 40 pN alatti erőknél mért kontúrhossznövekmény-hisztogramot mutatja.

Ahhoz, hogy az alacsony erőtartományban lezajló szerkezeti átmenetek kinetikáját vizsgáljuk, szükséges a két változó mechanikai paraméter (erő és megnyúlás) közül az egyiket rögzíteni. Ehhez erővisszacsatolt üzemmódban végeztünk méréseket, amelyben az erőt állandó értéken tartva csak a molekula megnyúlása változik. Ilyen mérésekben meghatározható az adott erőknél végbemenő szerkezeti változások sebességi állandója. A molekula már alacsony erőknél is diszkrét lépésekben nyúlik (**16. ábra**).



16. ábra Titin nyújtása erővisszacsatolt üzemmódu lézercsipesszel. Az ábra felső részén a molekulára ható erő értéke látható, míg az alsó részen annak megnyúlása. A betétábrán a 20 pN erő mellett jelentkező diszkrét megnyúlási lépcsők figyelhetők meg.

A megnyúlás globálisan exponenciális kinetikát mutat, ami annak köszönhető, hogy bár az egyes megnyúlási lépcsőkben a kontúrhossznövekmény közel állandó marad, az egyes lépcsők közötti idő exponenciálisan nő. A 40 pN alatti erőknél mért

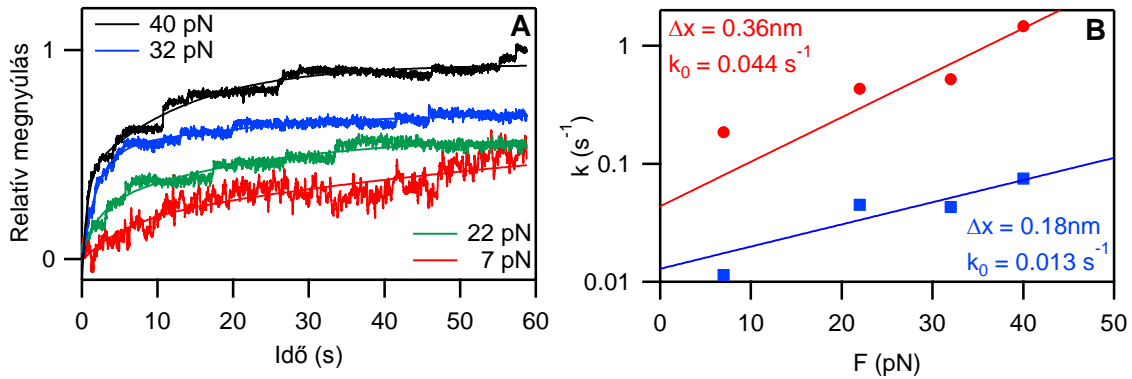


17. ábra 40 pN alatti erőknél mért megnyúlási lépések hisztogramja.

lépcsőmagasságok eloszlása (**17. ábra**) multimodális, 10, 25 és 39 nm-es csúcsokkal. Ezek mellett nagyobb lépcsőmagasságok is mérhetőek, amelyek akár több tíz (~40-90) nm-el is növelik a molekula kontúrhosszát. Ahhoz, hogy meghatározhassuk ezen szerkezeti átmenetek sebességi állandóját, különböző

erőknél végeztünk erővisszacsatolt módban nyújtási kísérleteket (**18.A ábra**). A titin már 7 pN erővel feszítve is folyamatosan nyúlik, bár diszkrét nyújtási lépcsők még nem figyelhetők meg a másodperces időskálán, azok csak 10 pN feletti erőknél jelentkeznek. Az így kapott vég-vég-hosszváltozás görbéket kettős exponenciális függvénnyel illesztettük és az illesztésből kapott sebességi állandókat a nyújtási erő függvényében

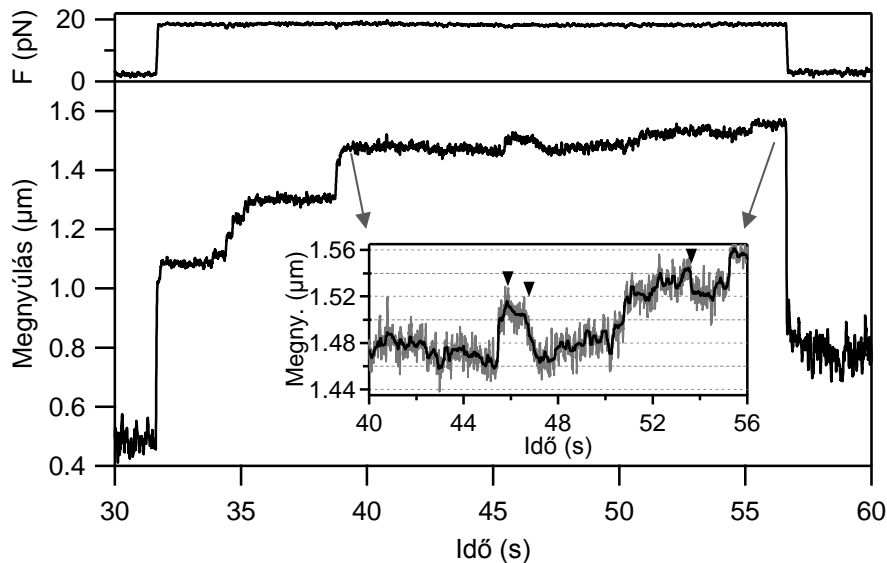
ábrázoltuk (**18.B ábra**). A kettős exponenciális illesztésből egy lassú (mechanikailag stabilabb) és egy gyors (mechanikailag kevésbé stabil) komponensre jellemző időállandót (k) kaptunk minden vizsgált nyújtási erőnél. A sebességi állandók erőtől való függése leírható a módosított Bell-modell (**5. egyenlet**) alapján.



18. ábra Titin nyújtása erővisszacsatolt lézercsippessel. **A ábra:** Különböző erőkkel nyújtott titin molekulák megnyúlása és az arra illesztett kettős exponenciális függvények. **B ábra:** Az illesztésekből kapott sebességi állandók a nyújtási erő függvényében és az illesztett Bell-modell (5. egyenlet). Piros: gyors komponens, kék: lassú komponens.

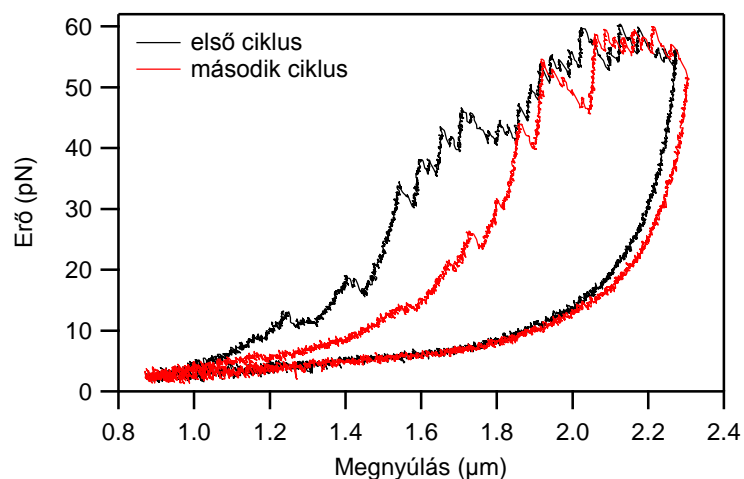
Az egyenlet illesztésével megkapjuk az adott szerkezeti átalakulás 0 erőre extrapolált, vagyis spontán sebességi állandóját (k_0) illetve a szerkezeti átalakuláshoz szükséges tranzíciós hosszt (Δx). Méréseinkben az $F \leq 40$ pN erőtartományban a gyors komponensre $k_0 = 0.044 \text{ s}^{-1}$, $\Delta x = 0.36 \text{ nm}$, míg a lassú komponensre $k_0 = 0.013 \text{ s}^{-1}$, $\Delta x = 0.18 \text{ nm}$ értékeket számoltunk.

Az állandó erőknél mért megnyúlás görbéken gyakran rövidülési lépések is megfigyelhetők, különösen a 20 pN alatti erőtartományban (**18.A ábra**). Egy ilyen megnyúlás görbét mutat a **19. ábra** is, ahol több visszalépési esemény is látható, vagyis a molekula az erőhatás ellenében rövidül. Ezek a rövidülési lépések a megnyúlási lépésekhez viszonyítva nem olyan hirtelen lefutásúak, lassabbak. Ez arra utal, hogy a titin rövidülése intermedier szerkezeti állapoton keresztül zajlik. Összességében elmondható, hogy az $F < 40$ pN erőtartományban jelentkező szerkezeti átalakulások a másodperces időskálán változtatják a molekula vég–vég hosszát.



19. ábra Titin nyújtása erővisszacsatolt lézercsipesz segítségével 18 pN erővel. Az ábra felső része az erőváltozást, míg az alsó rész a molekula megnyúlását ábrázolja. A nagyításban az erőhatás mellett jelentkező kontrakciós lépések láthatók (fekete nyilak).

Az alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulások időbeli dinamikájának vizsgálatára állandó sebességű, ciklusos nyújtási kísérleteket végeztünk (**20. ábra**). Az első ciklust szünet nélkül követő második nyújtás–visszaengedési ciklusban az erő hiszterézis nem áll helyre teljes mértékben, így a görbe megnyúlás szakasza a hosszabb



20. ábra Titin nyújtása egymást követő ciklusokban. A két ciklus szünet nélkül követte egymást, nyújtási sebesség: 250 nm/s. A nyújtás kezdetén a két gyöngy távolsága ≈ 900 nm, így az esetleges aspecifikus gyöngyfelszíni kölcsönhatások kiiktathatóak. Az egyes ciklusok hiszterézis területeinek különbsége a titin mechanikai fáradását jellemzi.

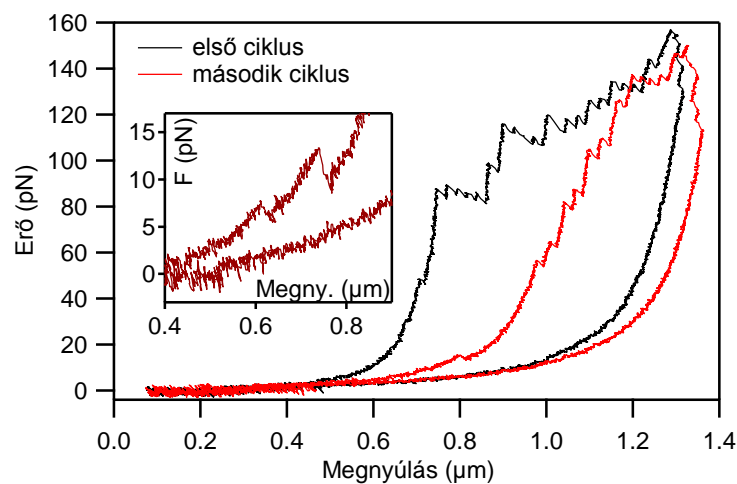
megnyúlás értékek felé tolódott. Bár a második ciklusban is tapasztalhatók 40 pN alatti erőátmenetek, azok száma kevesebb és a hozzájuk köthető kontúrhossz-növekmények

rövidebbek. Vagyis elmondható, hogy a titin mechanikai fáradásának [41] oka az alacsony erőtartományban jelentkező diszkrét szerkezeti átmenetek elmaradása.

5.2.2. Alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulások eredete

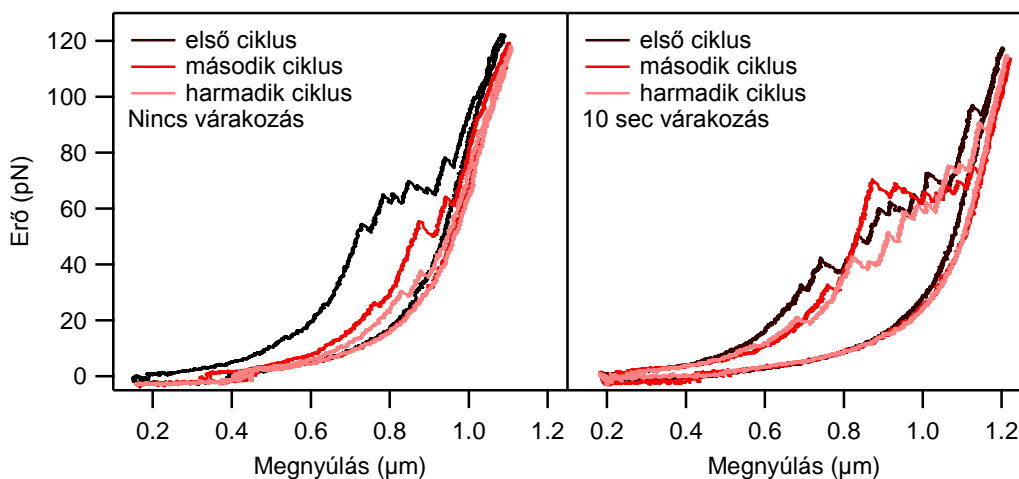
A titin molekulában lezajló erőhatásra bekövetkező szerkezeti átalakulások elsősorban a 100 pN feletti erőtartományban kitekeredő globuláris domének jellemzése révén ismert [31, 65, 66]. A kísérleteinkben tapasztalt 40 pN alatti, alacsony erőtartományban is jelenlevő szerkezeti átalakulások eredete azonban még nem tisztázott. Ennek feltérképezésére olyan kísérleteket terveztünk, melyekben vizsgálni kívántuk, hogy a kontúrhossznövekmények globuláris domén kitekeredés eredetűek, avagy egyéb harmadlagos szerkezeti elemek (pl. PEVK doménon belüli hurkok) felnyílásából erednek. Kísérleteinkben vizsgáltuk az ionerő csökkentésének hatását, specifikus anti-PEVK antitesttel kezeltük a molekulákat illetve összehasonlító nyújtási kísérleteket végeztünk szívizom titinen, melyben a PEVK szakasz hossza mindössze tizede a vázizom izoformáénak.

Korábbi mérésekből ismert, hogy az ionerő változtatásával a PEVK domén rugalmassága változtatható [32, 74]. Csökkentett ionerősségű (100 mM KCl AB-puffer) oldatban végezve a nyújtási kísérleteket (**21. ábra**) azt tapasztaltuk, hogy az alacsony erőtartományban a rövid kontúrhossznövekménnyel járó erőátmenetek száma csökken, míg a hosszabb (~100 nm) kontúrhossz-növekménnyel járó erőátmenetek megmaradtak. Emellett az ismételt ciklusok közötti mechanikai fáradás (hiszterézis csökkenés) szintén megmarad.



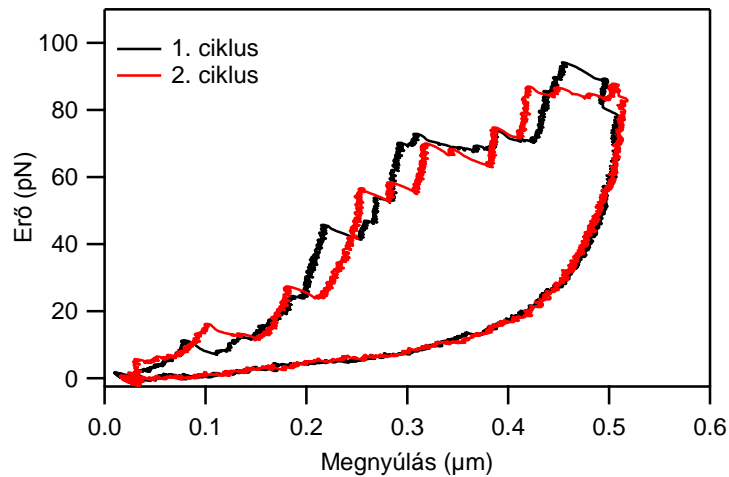
21. ábra Ionerősség hatásának vizsgálata a titin mechanikai viselkedésére. Ismételt nyújtás-visszaengedési ciklusok 100 mM KCl-t tartalmazó AB pufferben. A két ciklus várakozás nélkül követte egymást. Nagyítás: A kis erőknél jelentkező erőátmenetek 100mM KCl mellett.

A szerkezeti átmenetek eredetének további vizsgálatára olyan kísérleteket végtünk, melyekben specifikus ellenanyaggal passzíváltuk a teljes PEVK domént. A kísérleteinkben használt 9D10 anti-PEVK ellenanyag immunhisztokémia szerint a teljes PEVK szakaszt jelöli, vagyis a domén teljes szekvenciájához köt [55]. Az ilyen immunjelölt titin molekulákban az antitest a PEVK szakaszt lefedi, így feltételezhetően az mechanikai értelemben inaktivált, vagyis a doménon belüli kölcsönhatások gátoltak. Ilyen molekulán végzett állandó sebességű nyújtás-visszaengedési kísérletsorozat mutat a **22. ábra**. Azonnali egymás után ismételt mechanikai ciklusokban a molekula kifáradt, míg ha az egyes ciklusok közé 10 másodperces szünetet iktattunk be, a hiszterézis mértéke érdemben nem változott az egyes ciklusok között. Ugyancsak szembetűnő a nagyobb kontúrhossznövekménnyel járó erőátmenetek hiánya a nyújtás során. Ahhoz, hogy a PEVK domén szerepét teljesen kiiktassuk, T12 és 9D10 antitesttel borított mikrogöngyökkel ragadtuk meg és manipuláltuk a titinmolekulát.



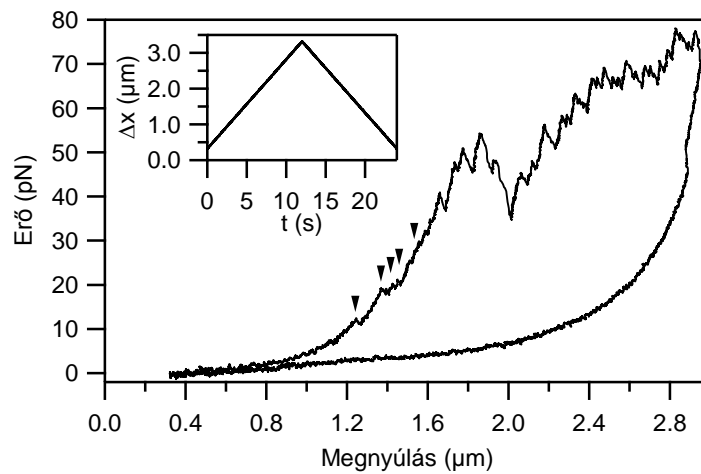
22. ábra A PEVK domén passzíválása 9D10 ellenanyaggal. Három egymást követő nyújtás-visszaengedési ciklus. **Bal ábra:** Az egyes ciklusok szünet nélkül követik egymást. **Jobb ábra:** Az egyes ciklusok 10 másodperc várakozás idő után követik egymást.

Így, ezekben a kísérletekben csak a két antitest által felismert építő régiók (I12 és PEVK domén) közötti proximális tandem Ig és N2A molekulaszakaszt vizsgáltuk. A vizsgált szakasz kezdeti kontúrhossza mindössze ~120 nm és a nyújtáskor jelentkező átmenetek átlagosan 30 nm-el növelték a molekula kontúrhosszát (**23. ábra**). Ez alapján az erőátmenetek kizárólag Ig-domén kitekeredés következményei. Megfigyelhető, hogy három domén az egymást követő ciklusokban konzisztensen 40 pN erő alatt tekeredett ki. A ciklusok közé iktatott tíz másodperc várakozás hatására az erő hiszterézis teljesen visszaépült.



23. ábra Titin nyújtása T12 és 9D10 antitest borítású mikrogyöngyökön keresztül. A két egymást követő nyújtás-visszaengedési ciklus között 10 másodperc a várakozási idő.

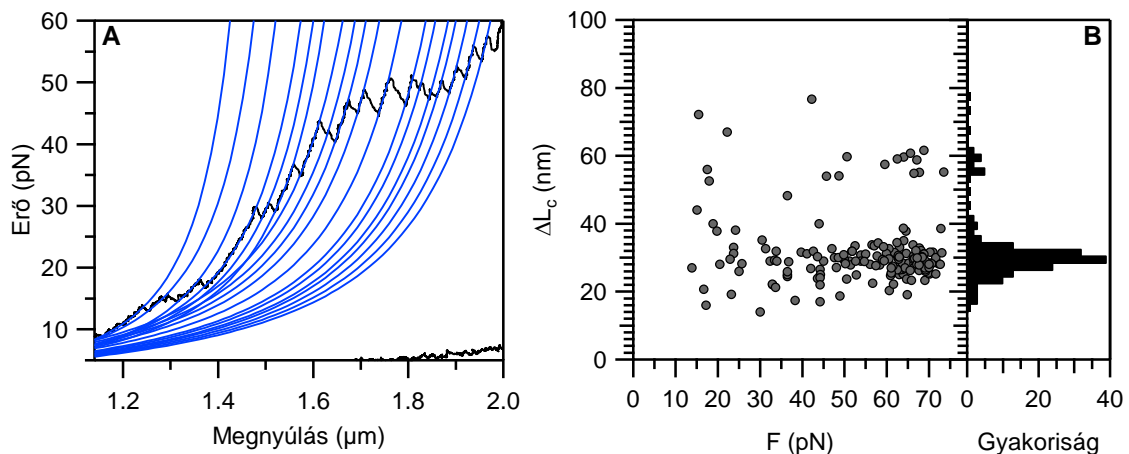
Annak érdekében, hogy a PEVK domén méretének hatását vizsgáljuk az alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulásokra, szívizom titin izoformán végeztünk nyújtási kísérleteket (**24. ábra**). A vázizom izoformához hasonlóan itt is jelentkeznek fűrészfog szerű erőátmenetek a 40 pN-nál alacsonyabb erőknél. A fűrészfogak felszálló



24. ábra Szívizomból izolált egyedi titinmolekula alacsony erőknél mért szerkezeti átmenetei (fekete nyilak). Egy nyújtás-visszaengedési ciklus során felvett erő-megnyúlás diagram. Nyújtási sebesség: 250 nm/s. A betétábra mutatja a kísérletben alkalmazott mechanikai protokollt (Δx : piezo elmozdulás).

szárára a WLC polimer modell illesztésével kontúrhossznövekmény analízist végeztünk (**25. ábra**). Az illesztésekből kapott perzisztenciahosszak alacsony erőtartományban 1.2-1.8 nm-nek illetve nagy erőknél 0.7-1.0 nm-nek adódtak. A kontúrhossznövekmény hisztogram 30 nm körül (28.6 ± 4.5 nm S.D.) egy nagyobb és 60 nm körül egy kisebb

csúcst tartalmaz. A 40 pN alatti erőtartományban a kontúrhossznövekmény eloszlás inkább folytonos, viszont jóval keskenyebb tartományban vesz fel értékeket a vázizom izoformához képest. 80 nm-nél hosszabb kontúrhossznövekményt szívizom izoforma esetében nem mértünk, ellentétben a vázizom izoformán mért több száz nanométeres növekményekkel (cf. **15.B ábra**).

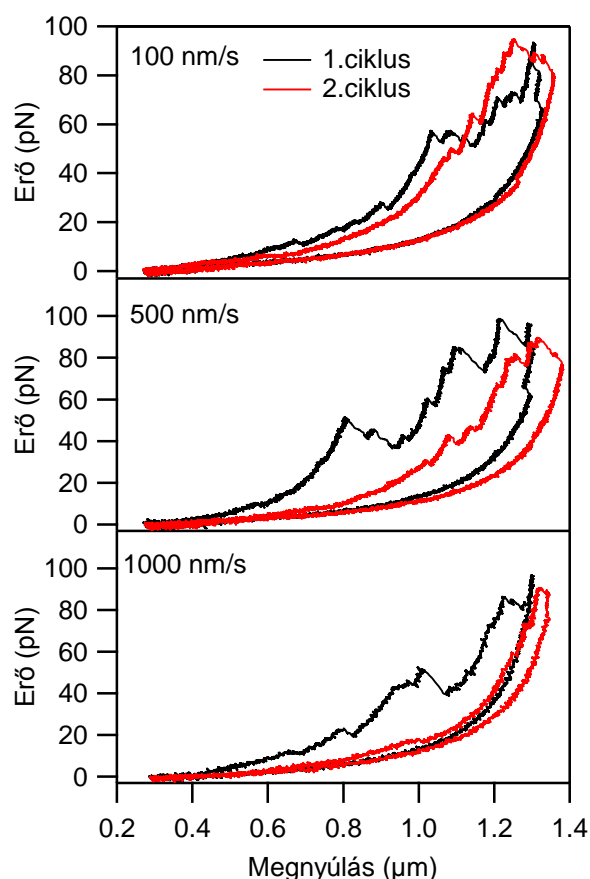


25. ábra Nyújtási kontúrhossznövekmények vizsgálata szívizom titin izoformán. **A ábra:** A WLC polimer modell illesztése az egyes átmenetekre (kék). **B ábra:** Szívizom titin nyújtási kontúrhossznövekményei a tranzíciós erők függvényében. A jobb oldali ábrarész a kontúrhossznövekmény-hisztogramot mutatja.

5.2.3. Alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átalakulások élettani szerepe

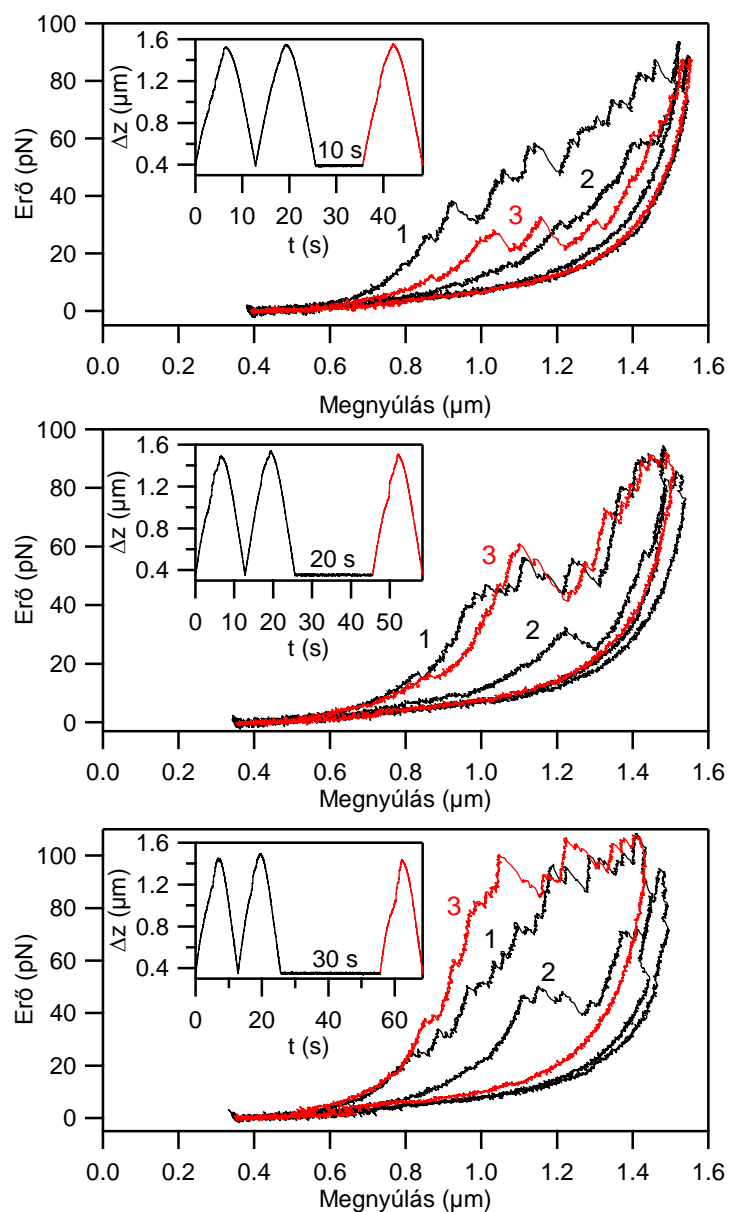
A titinmolekula 40 pN erő alatt jelentkező szerkezeti átalakulásairól feltételezhető, hogy *in vivo* körülmények között is lezajlanak. Ahhoz, hogy a potenciális élettani jelentőségét vizsgáljuk ezeknek az átmeneteknek, komplex nyújtás-visszaengedési kísérleteket végeztünk. Ezekből a kísérletekből azt akartuk megtudni, hogy az egy nyújtási ciklusban lezajlott szerkezeti átalakulások hogyan befolyásolják a titin mechanikai viselkedését egy következő nyújtás során.

Elsőnek eltérő nyújtási sebességgel végeztünk két egymás utáni ciklusban nyújtási kísérleteket (**26. ábra**). A második nyújtási ciklusban a hiszterézis visszaépülésének mértéke a nyújtási sebesség növelésével csökkent. 1000 nm/s nyújtási sebességnél a második ciklusban már nem tapasztalható az első ciklushoz viszonyított hiszterézis visszaépülés.



26. ábra Nyújtási sebesség hatása a titin mechanikai fáradására. Szünet nélkül ismételt két nyújtás-visszaengedési ciklus eltérő nyújtási sebességek esetén. A pipettát mozgató piezo manipulátor sebessége a grafikonok bal felső sarkában olvasható.

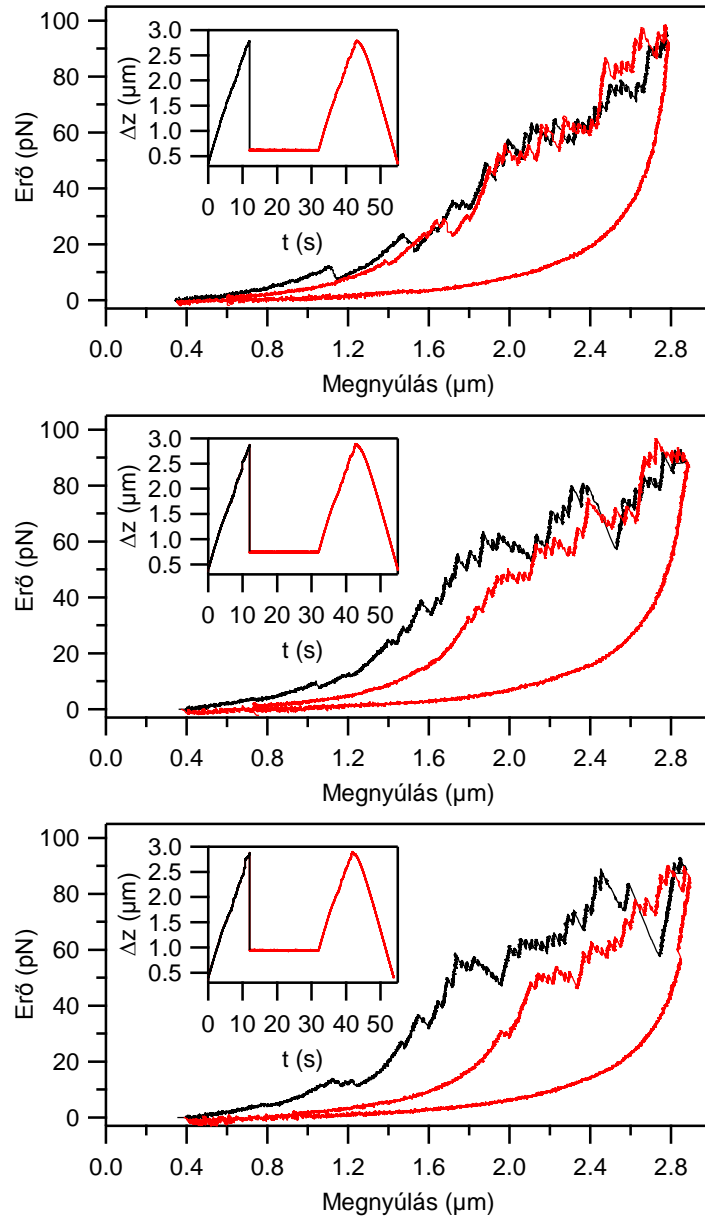
A hiszterézis visszaépülését tovább vizsgálva, olyan kísérleteket végeztünk, melyekben két, egymást szünet nélkül követő nyújtási ciklus után adott várakozás elteltével egy harmadik próbanyújtást is végeztünk (**27. ábra**). Az hiszterézis már 10 másodperc várakozás után részlegesen visszaépült, 20 és 30 másodperc várakozás után pedig teljes visszaépülést tapasztaltunk. Tehát a hiszterézis visszaépülésének mértéke annál nagyobb, minél több időt tölt a molekula a megrövidült állapotban. A visszaépülésben egyfajta tendencia is kibontakozik: rövid várakozási idő után előbb az alacsony erőnél jelentkező átmenetek jelennek meg próbanyújtáskor, míg a nagyobb erőknél jelentkező átmenetek csak hosszabb várakozás után detektálhatók. Vagyis elmondható, hogy a megrövidült állapotban eltöltött idő meghatározza a következő ciklus nyújtási átmeneteinek mintázatát.



27. ábra A relaxált konformációban töltött várakozási idő hatása a titin mechanikai fáradásra. A betétábrákon a molekula vég-vég hosszának (Δz) változása látható a kísérlet ideje alatt. Fekete: Azonnali egymás utáni két nyújtás-visszaengedési ciklus, majd várakozás a kezdeti megnyúlás értéken. Piros: A várakozást követő próba nyújtás-visszaengedési ciklus. A számok az egyes mechanikai ciklusok sorrendjét mutatják. A kísérletekben a relaxált konformációban töltött várakozási idő: 10 sec (fent), 20 sec (középen) és 30 sec (lent).

Annak vizsgálatára, hogy megrövidülés mértéke milyen módon befolyásolja a titin mechanikai fáradását, a megnyújtott molekulákat csak részlegesen engedjük rövidülni. Az egyedi vázizom titin molekulákat először állandó, 250 nm/s nyújtási sebességgel 2.8 μm -ig nyújtottuk, majd hirtelen, pillanatszerű ugrással 941, 743 és 614 nm vég-vég hosszakra visszaengedtük 20 másodpercig (**28. ábra**). A relaxáció során a molekulára

ható erő a három esetben hasonló, szinte elhanyagolható mértékű volt (1.02 ± 0.40 S.D., 0.81 ± 0.46 S.D. és 0.27 ± 0.52 S.D. pN). Ezután ismételt próbanyújtást végeztünk, hogy vizsgáljuk a hiszterézis visszaépülés mértékét. Ahogy egyre hosszabb megnyújtásnál relaxáljuk a molekulát, a hiszterézis visszaépülés mértéke egyre csökken és a második nyújtási görbe egyre inkább a hosszabb megnyúlás értékek felé tolódik. A nagyobb ($F > 40$ pN) erőtartományba eső fűrészfog mintázat összességében nem

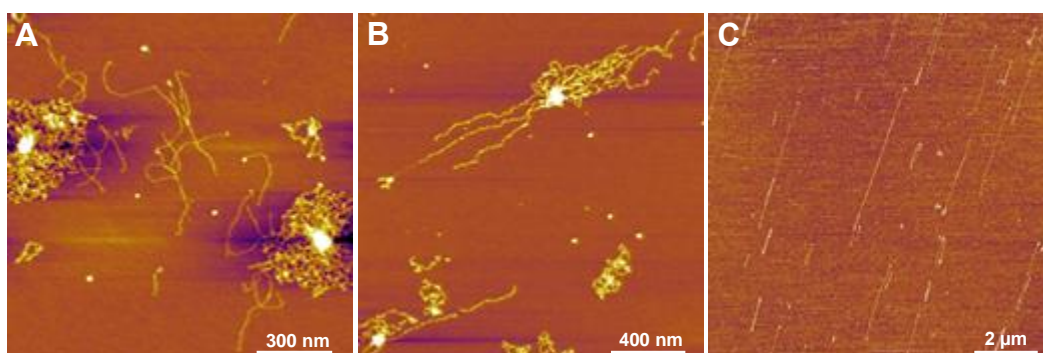


28. ábra A megrövidülés mértékének hatása a titin mechanikai fáradására. Fekete: első nyújtás, piros: második nyújtás; az egyes kísérletekben a két nyújtás között 20 másodpercig eltérő vég-vég hossz értéken relaxál a molekula: 614 nm (fent), 743 nm (középen) és 941 nm (lent). A betétábrákon a molekula vég-vég hosszának (Δz) változása látható a kísérlet ideje alatt.

mutat eltérést a nyújtási ciklusok között, vagyis az első nyújtás során kitekert domének a 20 másodperces várakozás alatt visszatekeredtek. A második nyújtási görbe jobbra (nagyobb megnyúlás értékek felé) tolódása az alacsony ($F < 40$ pN) erőtartományba eső szerkezeti átmenetek számának csökkenése miatt következett be. Vagyis az ezek háttérében álló intramolekuláris kölcsönhatások nem alakultak vissza a relaxáció során. Megállapítható, hogy az alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átmenetek csak akkor képesek regenerálódni, ha a titint elegendően rövid vég-vég hossz értékre engedjük vissza.

5.3. Titin nyújtása visszahúzódnó folyadékmeniszkusszal

Kísérleteinkben nyúl *m. longissimus dorsi* hátizomból izolált titinmolekulákat fésültünk ki csillámfelületre, visszahúzódnó meniszkusz módszerrel. A kifésült és egyben megnyúlt molekulák topográfiájáról atomerő-mikroszkóppal alkottunk képet (29. ábra). A mintafelvitel közepén a csillámfelületen főleg olyan titin molekulák és

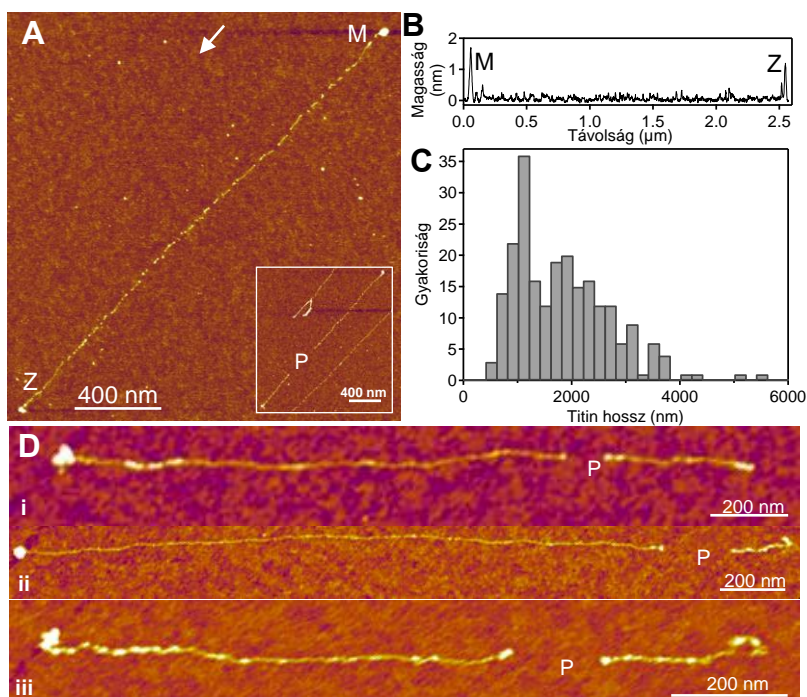


29. ábra Titinmolekulák a csillámfelület különböző pontjain. **A. kép:** A mintafelviteli terület közepe. **B. kép:** A mintafelvitel terület széli része **C. kép:** A csillámfelület centrifugális irányú széli része.

oligomerek titin komplexek láthatók, melyek inkább relaxált, kevésbé megnyújtott állapotban tapadtak ki a felszínre (29.A ábra). A mintafelvitel széli régiójában már megnyújtott oligomereket és egyedi molekulákat találtunk (29.B ábra), míg a felvitel helyétől távol, a csillámlemez szélén, centrifugális irányban kiegyenesedett, túlnyújtott titin molekulák láthatók (29.C ábra). Ezek a túlnyújtott molekulák képezték vizsgálatunk tárgyát, ugyanis arra kerestünk választ, hogy a titin molekula mentén hol mutathatók ki esetleges túlnyújtási szerkezetváltozások.

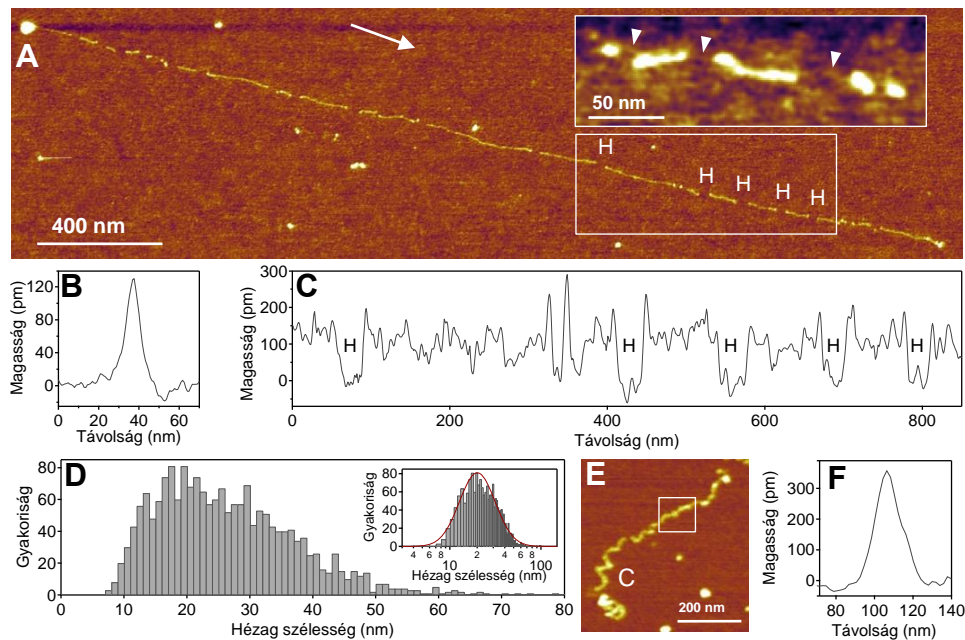
5.3.1. Túlnyújtott titinmolekulák szerkezeti jellemzése

Egy molekuláris fésüléssel túlnyújtott egyedi titin molekulát mutat a **30.A ábra**. A molekula teljesen kiegyenesedett és az egyik terminálisán egy kisebb, míg a másikon egy nagyobb globuláris régió látható (**30.B ábra**). A nagyobb globuláris „fej” minden felületre kitapadt titinmolekulán megfigyelhető, míg a kisebb „fej” gyakran hiányzik. A két fej közötti távolság adatokból megkaptuk a túlnyújtott molekulák vég-vég hossz eloszlását. A hisztogramon (**30.C ábra**) egy nagy csúcs található ~1000 nm-nél, majd a hosszabb értékek felé haladva a gyakoriság csökken. Az átlagos vég-vég hossz 1836 nm (n=227) de 5000 nm-t meghaladó hosszakat is mértünk. A túlnyújtott molekulák kontúrában olykor több száz nm hosszan kontúrhiányt láttunk (**30.A betétábra**). Ezeket a hiányokat a PEVK domén kinyújtott szakaszaként azonosítottuk. Az ilyen hosszú kontúrhiányok gyakrabban fordultak elő, ha a puffer NaCl helyett KCl-t tartalmazott (**30.D ábra**).



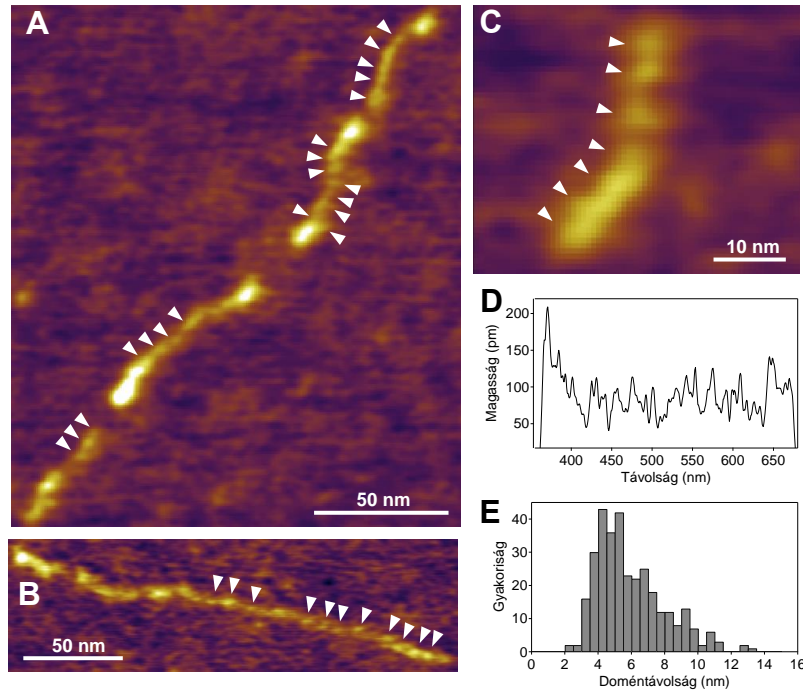
30. ábra A teljesen kiegyenesedett és megnyújtott titin molekulák hossz analízise. **A:** Egy túlnyújtott titin molekula képe. A nyíl a menizkus haladási irányát mutatja. Jól láthatók a molekula terminális feji struktúrái (M és Z). **betétábra:** A hosszú kontúrhiány a megnyújtott molekulában, feltehetően a PEVK domén (P). **B:** A túlnyújtott molekula mentén felvett magasságprofil. Jól megfigyelhetők a magasabb terminális fejek. **C:** Túlnyújtott titin molekulák hossz eloszlás hisztogramja. **D:** 600mM KCl jelenlétében kifésült titinmolekulák, P-vel a PEVK doménre utaló hosszabb kontúrhiányok jelöltek

A megnyújtott molekulák topográfiáját magasságkontraszt képeken vizsgáltuk. (**31. ábra**). Mind a megnyújtott, mind a relaxált konformációban kikapadt molekulák ellapultak a mért magasság-szélesség arány alapján (**31.B és F ábrák**). A túlnyújtott molekulák kontúrján hézagok figyelhetők meg (**31.C ábra**), melyekben olykor filamentáris szerkezetű képletek is felismerhetők (**31.A betétábra**). A kontúrhézagok nagyjából egyenletesen oszlanak el a molekula tengelye mentén, átlagos szélességük 27.7 ± 23.8 nm S.D. ($n=1879$). A hézagszélességek eloszlása log-normális, az értékek zöme 6 és 60 nm közé esik, ~ 20 nm-nél eloszlásmaximummal. (**31.D ábra**).



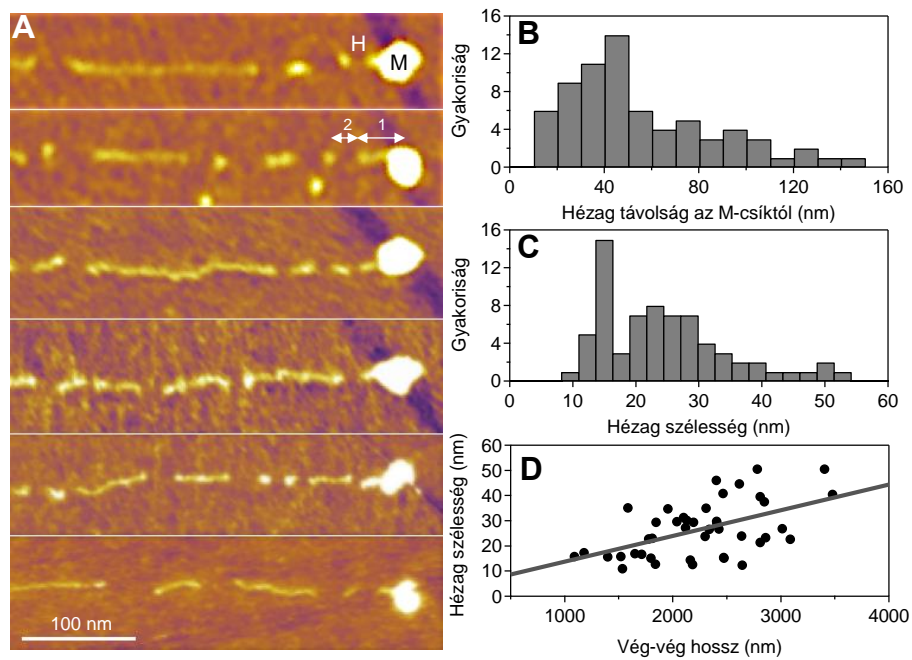
31. ábra Túlnyújtott titin molekulák topográfiai analízise. **A:** Hézagok a túlnyújtott molekulában (H). A nyíl a meniszkusz haladási irányát mutatja. **Betétábra:** A kontúrhézagok finomszerkezete. A nyilak finom filamentáris struktúrára mutatnak a hézagokban. **B:** Egy megnyújtott molekula keresztmetszeti magasságprofilja. Az átlagos csúcsmagasság 1.4 \AA , az átlagos mért félértékszélesség 12.1 nm , a 10. egyenlettel korrigált átlagos félértékszélesség 9.3 nm ($n=183$). **C:** A molekula tengely menti magasságprofilja az A ábrán bekeretezett régióból. H jelöli a kontúrhézagokat a topográfiai profilon. **D:** A 11. egyenlettel korrigált hézag szélességek eloszlás histogramja (átlag: $27.7 \pm 23.8 \text{ nm}$ S.D., $n=1879$). **Betétábra:** a histogram lin-log ábrázolása és log-normális eloszlás függvényének illesztése. **E:** Egy relaxált konformációban kikapadt titinmolekula. A molekulában csavart (C: coiled) régiók is felismerhetők. **F:** A relaxált molekula keresztmetszeti magasságprofilja az E ábrán bekeretezett régióból. Az átlagos csúcsmagasság 3.5 \AA , az átlagos mért félértékszélesség 13.9 nm , a 10. egyenlettel korrigált átlagos félértékszélesség 9.6 nm ($n=51$).

Nagyfelbontású AFM felvételeken periodikusan ismétlődő globuláris egységek láthatók a titin kontúrja mentén (**32. ábra**). A tengelymentén felvett magasságkontúrón a szomszédos magasságmaximumok távolságeloszlását mutatja a **32.E ábra**. A mért távolságok 2 és 13 nm között változtak, az átlagos érték 5.9 ± 2.1 nm S.D. (n=325).



32. ábra Vázizom titin globuláris domén szerkezete. **A-C kép:** Nagy felbontású AFM képek elliptikus, globuláris szerkezeti egységekről a titin kontúrja mentén. **D ábra:** A molekula tengelye mentén felvett magasságkontúr. **E ábra:** A szomszédos magasságmaximumok közötti távolságok eloszlása.

A túlnyújtott titinmolekulákon további szerkezeti analízist végeztünk a molekula forgásközpont felé néző nagy globuláris feji régiója közelében (**33. ábra**). A globuláris feji régió mellett szisztematikusan kimutatható egy kontúrhézag a nyújtás irányában. A hézag szélességét illetve a hézag kezdete és a globuláris feji régió központjának távolságát több molekula esetében is lemértük (**33.A ábra**). A hézag és a feji régió távolságainak eloszlási maximuma 50 nm-nél található, az egyes értékek 10 és 150 nm között változnak (**33.B ábra**). A hézagszélesség histogram egy keskeny csúcsot adott 15 nm-nél és egy szélesebbet 25 nm-nél (**33.C ábra**). A hézagszélességeket ábrázolva a teljes titinmolekula vég-vég hosszának függvényében egy tendencia kirajzolódik, ami szignifikáns ($p=0.007$), de gyenge korrelációt ($r = 0.52$) mutat (**33.D ábra**).



33. ábra Domén kitekeredések analízise az titin M-csík végének közelében. **A:** Titinmolekulák M-csík végi régiói. M: a titin C-terminális, M-csík feji régiója, H: a globuláris fejhez legközelebbi kontúr hézag. 1: az első kontúrhézag kezdetének távolsága az M-csík fej középpontjától, 2: az első hézag szélessége. **B:** A feji vég közepétől az első kontúrhézagok kezdetéig mért távolságok (1-es távolság) eloszlása. **C:** A kontúrhézagok szélességének (2-es távolság) eloszlása. **D:** Az első hézag szélessége a molekula teljes vég-vég hosszának függvényében. Szürke: lineáris regresszió egyenese ($r = 0.52$).

6. Megbeszélés

6.1. Egyedi titin molekulák izolálása

A titin a harántcsíktizom szarkomert felépítő filamentáris rendszer integráns részét képezi. Egyedi titin molekulák izomszövetből történő izolálása során ezt a filamentáris rendszert kell lebontanunk, majd a titint elválasztanunk. Ehhez a vastag filamentum ionerősségtől függő depolimerizációját, a titinmolekula ionerősségtől függő oldhatóságát illetve az elválasztáshoz extrém molekulaméretét használjuk ki. Azok a molekuláris asszociátumok amelyek az ionerősség változtatására nem válnak szét, mindvégig a titinmolekulákhoz kötött állapotban maradnak az izolálás során. Ezek elsősorban M- és Z-csík asszociált fehérjék (myomesin, M-protein, telethonin, Z1Z2), melyek a titin N- és C-terminálisaival szoros asszociátumot képeznek. Feltehetően ezen M- és Z-csík asszociátumok alkotják az egyedi titinmolekulákról alkotott AFM-felvételeken látható terminális globuláris „fejeket” [75] (**30. ábra**). Az M-csík molekula asszociátumai, melyben a szomszédos szarkomerek titin molekuláinak C-terminálisai átlapolnak, igen stabil szerkezettel rendelkeznek. Emiatt az izolált titin molekulák nagyobb része ilyen M-csík komplexen asszociált szerkezetben, oligomerek formában marad. Az oligomerek jellegzetes „hidrafejre” emlékeztető képletekként jelennek meg az AFM-es felvételeken, egy középső magból sugarasan több hajlékony filamentum ágazik szét (**12.A betétábra, 29.A ábra**). Ezek a titin oligomerek a gélkromatográfia első elúciós csúcsának felszálló ágát és csúcsát adó frakciókban találhatók jellemzően. Az elúciós csúcs leszálló ágában viszont inkább monomerek dominálnak, bár ezekre is mindig jellemző a terminális globuláris fej jelenléte, vagyis feltehetően az N-terminálison Z-csík, a C-terminálison M-csík asszociált fehérjéket kötnek (**12.B ábra, 30.A ábra**). A lézercsipeszes kísérletekhez a monomerek titinmolekulákat tartalmazó frakciókkal végeztük a mikroyöngy jelölést.

6.2. Titin nyújtása lézercsípessel élettani erőtartományban

Kísérleteinkben nyúl *m. longissimus dorsi* és szívizomból izolált egyedi titin molekulákon végeztünk komplex erő-spektroszkópiai kísérleteket nagy erőfelbontású lézercsípessel. A molekuláris erő-spektroszkópia mint új egyedi molekula manipulációs technika számos, korábban csak biokémiaiilag jellemzett folyamat

molekuláris részleteibe engedett betekintést [76-78]. A molekuláris erőmérő lézercsipesz számos előnnyel rendelkezik a molekuláris erő-spektroszkópiában rendkívül gyakran alkalmazott atomerő-mikroszkóppal szemben. Különösen olyan tipikusan hosszú, filamentáris biopolimer molekulák, mint a titin esetében [42, 57, 72, 79, 80]: (i) több, egymást követő mechanikai ciklusban manipulálható ugyanazon molekula; (ii) összetett nanomechanikai protokollokban vizsgálható ugyanazon molekula (**28. ábra**); (iii) oldószer hatás vizsgálható ugyanazon molekulán (**21. ábra**); (iv) aspecifikus felületi kölcsönhatások kevésbé zavarják (**20. ábra**) és könnyebben kiküszöbölhetők, pl. felületi blokkolással (ld. 4.2.1); (v) a lézercsipesz kisebb rugóállandója (a mi esetünkben: 0.2 pN/nm) nagyobb erőfelbontást és finomabb manipulációt tesz lehetővé; (vi) a lézercsipeszrel nagy felbontásban vizsgálható az alacsonyabb (élettanilag releváns) 0.5-50 pN erőtartomány; (vii) a kísérleti megnyújtási tartomány tipikusan több mikrométer, ellentétben a AFM-nél tipikusan mikrométer alatti megnyújtásokkal. Összességében elmondható, hogy a lézercsipeszrel végzett molekuláris erő-spektroszkópia alkalmas módszer az óriási titinmolekula külső erő hatására bekövetkező szerkezeti átalakulásainak vizsgálatára.

A lézercsipeszrel vizsgált titinmolekulák N-terminális végét T12 antitest borítású mikrogyönggyel ragadtuk meg, ami nagy affinitással köt az I12 doménhez [7, 42]. A molekula C-terminális végét aspecifikus módon, sulpho-SANPAH keresztkötő borítású mikrogyönggyel ragadtuk meg. Mivel ez a keresztkötő nem rendelkezik szekvencia specificitással, a kísérletben vizsgált molekulaszegmens hossza nem határozható meg *a priori*. Ennek meghatározására a mért erő-megnyúlás görbék kezdeti szakaszát *a posteriori* illesztettük a „főregyszerű lánc” polimer modell egyenletével (**4. egyenlet**) (**13.A ábra**). Az illesztésekből kapott kontúr hosszak eloszlását a rendelkezésre álló *m. soleus* titin izoforma domén szerkezeti sémájára vetítettük (**13.B ábra**) [6, 16]. Az egyes szegmensek kontúr hosszának számításánál a jelenleg elfogadott modell alapján feltételeztük, hogy a nyújtás kezdeti szakaszán a globuláris domének még feltekeredett állapotban, a PEVK domén pedig már kinyújtott állapotban van [20, 34]. Ehhez 5 nm kontúrt használtunk globuláris doménként (4 nm domén hossz és 1 nm linker) illetve a teljesen kiegyenesedett PEVK domén kontúrjának 830 nm vettünk. Tekintettel arra, hogy az A- és I-szakasz határát az I105-ös domén jelöli [6, 16], kísérleteink mintegy 80 %-ában a titin élettanilag nyújtható I-szakaszba eső szegmensét

manipuláltuk. Mindazonáltal számításunkkal valószínűleg némileg alábecsüljük a vizsgált szegmensek hosszát. Ennek egyik oka, hogy a számolásnál csak a humán *m. soleus* izoforma domén struktúrája állt rendelkezésre, ami hosszabb, mint a nyúl *m. longissimus dorsi* izoforma. Másrésztől feltételezhetően intradomén kölcsönhatások révén a PEVK doménben létrejönnek olyan tranzienst szerkezetek, amelyek miatt annak effektív kontúrhossza rövidül. Mindezek alapján nagy bizonyossággal állíthatjuk, hogy a kísérleti adataink zöme a titin I-szakasz-beli szegmenséből származik.

6.2.1. A titin alacsony erőknél jelentkező diszkrét szerkezeti átmenetei

Állandó 250 nm/s sebességgel történt nyújtás-visszaengedési kísérletekben a titin erő-megnyúlás görbéjén fűrészfog szerű átmenetek jelentkeznek, amik diszkrét lépésekben növelik a molekula kontúrhosszát (**13. és 14. ábra**). A diszkrét átmenetekhez tartozó kontúrhossznövekmények eloszlása függ a tranzíciós erőtől (**15.B ábra**). Az eloszlás ~40 pN alatt szélesebb, míg afölött jóval szűkebb tartományon vesz fel értékeket.

A 40 pN feletti erőknél az átmenetek átlagosan 30 nm-el növelik a kontúrhosszat mind a vázizom, mind a szívizom izoforma esetében, így ezeket egyedi globuláris domén kitekeredési eseményekként azonosítottuk [65, 80]. A 60 nm-es csúcs a kontúrhossznövekmény hisztogramon (**15.B és 25.B ábra**) valószínűleg két domén gyors, a műszer időfelbontásán (~1 ms) belül lezajló kitekeredéséből adódik. A mindezidáig vizsgált rekombináns globuláris titin domének esetében, 250-500 nm/s nyújtási sebességeknél, a kitekeredési erők jóval 100 pN felettiék [31, 81]. Ebből arra következtetünk, hogy a natív titin molekulában léteznek mechanikailag gyenge domének is, melyek már alacsony erőknél ($F < 100$ pN) is kitekerednek 250 nm/s húzási sebességnél. Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy egyes fibronektin (FN) típusú domének a titin A-szakaszbeli szegmenséből kisebb erőknél tekerednek ki mint az immunoglobulin (Ig) típusú domének [82]. Habár az általunk vizsgált hosszabb molekulaszakaszok tartalmazhattak A-szakaszbeli titinszegmenseket is, a nagyszámú 100 pN alatti erőknél tapasztalt szerkezeti átalakulás nem magyarázható pusztán a gyengébb FN domének jelenlétével. Inkább valószínűsíthető a mechanikailag gyengébb domének jelenléte a titin tandem-Ig szegmensében. Azon kísérleteinkben, ahol csak a molekula tandem-Ig szegmensét manipuláltuk (**23. ábra**), kimutattunk néhány (2-3 db) 40 pN alatti szerkezeti átmenetet, melyek kontúrhossznövekménye domén kitekeredésre utal.

Ezen mechanikailag kevésbé stabil domének pontos pozícióinak feltérképezése azonban további kísérleteket igényel.

A titin nyújtási erőgörbéin a 40 pN alatti erőtartományban szintén nagy számban láthatók fűrészfogszerű túlnyújtási átmenetek (**14. ábra**). Néhány átmenet már egészen alacsony, 5 pN erőnél jelentkezik. A 40 pN alatti átmenetek esetében mért kontúrhossznövekmények eloszlása széles, tíztől egészen több száz nanométerig mértünk értékeket (**15.B betétábra**.) Ez arra enged következtetni, hogy az alacsony erőtartományban nem kizárólagosan globuláris domén kitekeredés okozza a titin nyújtási kontúrhossznövekményeit, hanem más szerkezetváltozások is szerepet játszanak ezekben az átmenetekben. Ezek olyan harmadlagos szerkezeti elemek, melyeket a titin lánc távoli régiói közötti kölcsönhatások stabilizálnak. Az ilyen szerkezetek erővel történő felszakítása szintén fűrészfogszerű erőátmenetekhez vezet a nyújtási görbén. Korábbi egyedi titin manipulációs munkákban már felvetődött annak a lehetősége, hogy a titin mechanikai fáradásáért a PEVK doménben felszakadó másodlagos kötések felelnek, bár az alacsony erő- és időfelbontás miatt korábban diszkrét szerkezeti átmeneteket nem, csak hiszterézis csökkenést mutattak ki [41]. Feltehetően ezek a kötések a PEVK doménen belül alakulnak ki, mivel az itt található nagyszámú töltött aminosav felveti az intramolekuláris hurkok elektrosztatikus kölcsönhatáson keresztüli stabilizálásának lehetőségét. Nyújtáskor ezek a másodlagos kötések felszakadnak, így növelik a molekula kontúrhosszát, majd visszaengedéskor nem alakulnak vissza azonnal. Így ha várakozás nélkül újra megnyújtjuk a molekulát, az erő-megnyúlás görbe progresszíven a nagyobb megnyúlás értékek felé tolódik (**20. ábra**). Mindezek alapján feltételezzük, hogy a 40 pN alatti erőtartományban jelentkező szerkezeti átalakulások hátterében az alacsony mechanikai stabilitású globuláris domének kitekeredése mellett a PEVK domén tranziens szerkezeteit [21, 22] stabilizáló kötések felszakítása egyaránt szerepet játszik. Annak érdekében, hogy vizsgáljuk a PEVK domén szerepét az alacsony erőknél jelentkező átmenetekben, a következő kísérleteket végeztük: (i) ionerősség hatásának vizsgálata a KCl koncentráció csökkentésével, (ii) PEVK domén passziválás 9D10 ellenanyaggal és (iii) összehasonlító erő-spektroszkópia szívizom titinen, mivel a PEVK domén hossza ennél az izoformánál mintegy tizede a vázizoméhoz képest [19].

A KCl koncentráció 200 mM-ról 100 mM-ra csökkentésével az alacsony erőknél jelentkező átmenetek száma csökkent, de a mechanikai fáradás továbbra is megmaradt (**21. ábra**). Fiziológias pH tartományon a PEVK domén nagyszámú töltött aminosav oldalláncot tartalmaz, minek eredményeképpen egy polielektrolit láncként jellemezhető. A PEVK szekvenciára jellemző gyakori glutaminsav illetve lizin ismétlődések miatt a szomszédos, azonos töltésű oldalláncok elektrosztatikusan taszítják egymást, így a molekula ezen szakasza megmerevedik. Ez az elektrosztatikus hatás árnyékolható az oldat ionerejének függvényében. Az ionerősség csökkentésével a polielektrolit lánc egyre merevebb lesz, azaz perzisztenciahossza nő [83]. Az ionerősség csökkentésével elektrosztatikusan megmerevedik a PEVK domén [74], így a doménon belüli rövidtávú kölcsönhatások kialakulása egyre inkább gátolt. Ez okozhatta az alacsony erőtartományban jelentkező átmenetek számának csökkenését.

A PEVK domén passziválásához használt 9D10 ellenanyag a domént teljes hosszában befedi [55], így feltételeztük, hogy gátolja a doménon belüli tranziens szerkezetek kialakulását. Az így passzivált molekula nyújtási görbéjén csak kis számú, rövid kontúrhossznövekménnyel járó átmenet látható az alacsony erőtartományban, de a fáradási jelenség továbbra is megfigyelhető (**22. ábra**).

A szívizom titin izoforma nyújtásakor ugyancsak nagy számban észleltünk diszkrét nyújtási átmeneteket, amelyek már ~10 pN-től folyamatosan jelen voltak az erőgörbében (**24. ábra**). Az átmenetekhez tartozó kontúrhossznövekmények eloszlása szűkebb értékhatárokkal jellemezhető, mint a vázizom izoforma esetében. Itt is jellemzőek, főleg a 40 pN feletti erőtartományban, a ~30 nm-es kontúrhossznövekmények, amelyek globuláris domén kitekeredésre utalnak. A 40 pN alatti erőtartományban viszont jóval keskenyebb az eloszlás, nem mértünk 80 nm-nél hosszabb kontúrhossznövekményt (**25. ábra**), ellentétben a vázizom izoformánál mért több száz nm-es növekményekkel. A szívizom titin izoforma esetében a legrövidebb a PEVK domén, mindössze 163 aminosavból áll, míg a vázizom izoformában a PEVK domén legalább tízszer hosszabb (2200 aminosav a leghosszabb *m. soleus* izoforma esetében). Ebből adódóan a rövid PEVK doménben nem alakulnak ki olyan harmadlagos szerkezetek, amelyeket távoli szekvencia részletek közötti kölcsönhatások stabilizálnak.

Korábbi munkák már beszámoltak diszkrét átmenetek jelenlétéről a vázizom titin PEVK domén nyújtási görbéjén [72]. A munkánkban bemutatott kontúrhossznövekmény eloszlás nagy hasonlóságot mutat az általunk végzett $F < 40$ pN erőknél mért megnyúlás eloszlással (**17. ábra**). Ez alapján valószínűsítjük, hogy a 11, 25 és 39 nm-es lépések egységes hossz-változások, amik a PEVK domén nyújtási konformáció változásaihoz, vagy kötés felszakadási eseményekhez tartoznak. Feltételezzük, hogy kétféle szerkezeti változás mehet végbe a PEVK doménben nyújtás hatására: (i) alacsony energiájú konformációk kitekerése (poliprolin hélixek, β -kanyarok) [21, 22] a domén 28 aminosavból álló ismétlődő motívumaiban [18]; (ii) elektrosztatikus kölcsönhatások felszakítása a lánc távolabbi, ellentétesen töltött részei között. Míg az előbbi gátolható az ionerősség csökkentésével az elektrosztatikus merevedés miatt, addig az utóbbi alacsony ionerő esetén is kialakul (**21. ábra**).

Az állandó erővel történő nyújtás során a titin diszkrét lépésekben nyúlik az $F < 40$ pN erőtartományban (**18.A ábra**). A molekula megnyúlása időben exponenciális kinetikát mutat. A vég-vég hossz változás görbéket legjobban kettős exponenciális függvénnyel tudtuk illeszteni. Ez is arra utal, hogy a megnyúlási lépésekért két folyamat együttes jelenléte felelős. A kettős exponenciális gyors komponense feltehetően a PEVK szerkezetváltozásait, míg a lassú komponens a mechanikailag kevésbé stabil globuláris domének kitekeredési kinetikáját jellemzi. Az illesztésekből kapott egyensúlyi állandók értéke (k_0) (**18.B ábra**), hozzávetőleg egy nagyságrenddel nagyobb, mint amit az I27 Ig domén esetében korábban mértek [84]. Ez szintén alátámasztja az állításunkat, miszerint az alacsony erőknél kitekeredő domének mechanikailag kevésbé stabilak. Összességében megállapítható, hogy a titin molekula mechanikáját az alacsony erőtartományban a mechanikailag gyengébb globuláris domének kitekeredése és a PEVK domén diszkrét megnyúlási lépései egyaránt meghatározzák. Vagyis az alacsony erőknél mért szerkezeti átmenetek háttérben a két folyamat együttesen szerepel.

6.2.2. Az alacsony erőknél jelentkező szerkezetváltozások élettani szerepe

A kísérleteinkben tapasztalt nyújtási átmenetek igen széles erőtartományban (5-120 pN) jelentkeztek a nyújtási görbéken. Ahhoz, hogy megállapítsuk ezek élettani relevanciáját, meg kell vizsgálnunk az *in situ* egyetlen titinre ható szarkomerikus erő tartományt. Ezt csak izomrostokon és miofibrillumokon mért passzív erők

extrapolálásával becsülhetjük. Ezt megkapjuk, ha az élettani szarkomerhossz maximumánál mért egységnyi keresztmetszetre ható passzív erőt normalizáljuk az egységnyi keresztmetszetre eső titinmolekulák számával. Korábbi munkák az egy titinre ható erő maximális élettani határát 5 és 20 pN közé teszik [32, 67-71]. Még ha a legalacsonyabb értékeket is vesszük figyelembe, akkor is relevánsak az általunk leírt nyújtási szerkezetváltozások. Továbbá fontos megjegyezni néhány szempontot amely az extrapoláció pontatlanságára utal. Az izomkészítményeken (miofibrillum, izomrost) a mért erők átlagos, egyensúlyi erők, vagyis ezek már feltehetően a túlnyújtott, szerkezeti átalakuláson átesett molekulákra vonatkoznak. Emellett a szarkomerikus inhomogenitások mind a szarkomerhossz, és a titinmolekulák számának tekintetében illetve a titinmolekula nagyfokú érzékenysége a degradációra egyaránt növeli az extrapoláció bizonytalanságát.

Az erővisszacsatolt mérésekben, mikor a molekulát állandó erővel nyújtjuk, olykor visszalépéseket mértünk a megnyúlásban, vagyis a titin a nyújtási erő ellenében rövidült. Ilyen rövidülési átmeneteket csak $F < 20$ pN erőknél tapasztaltunk. Ezek a kontrakciós lépések arra utalnak, hogy a rövidülési és megnyúlási lépések egyensúlya dinamikusan képes finoman változtatni a molekula kontúrhosszát fiziológias erő- és időskálán. A néhány nagyfelbontású adatsorból, ami ilyen kontrakciós lépéseket tartalmaz az tűnik ki, hogy ezek a visszalépések több kisebb lépésből állnak (**19. betétábra**), vagyis nem pusztán a megnyúlási lépések ellentétes folyamatai.

A titin mint mechanoszenzor

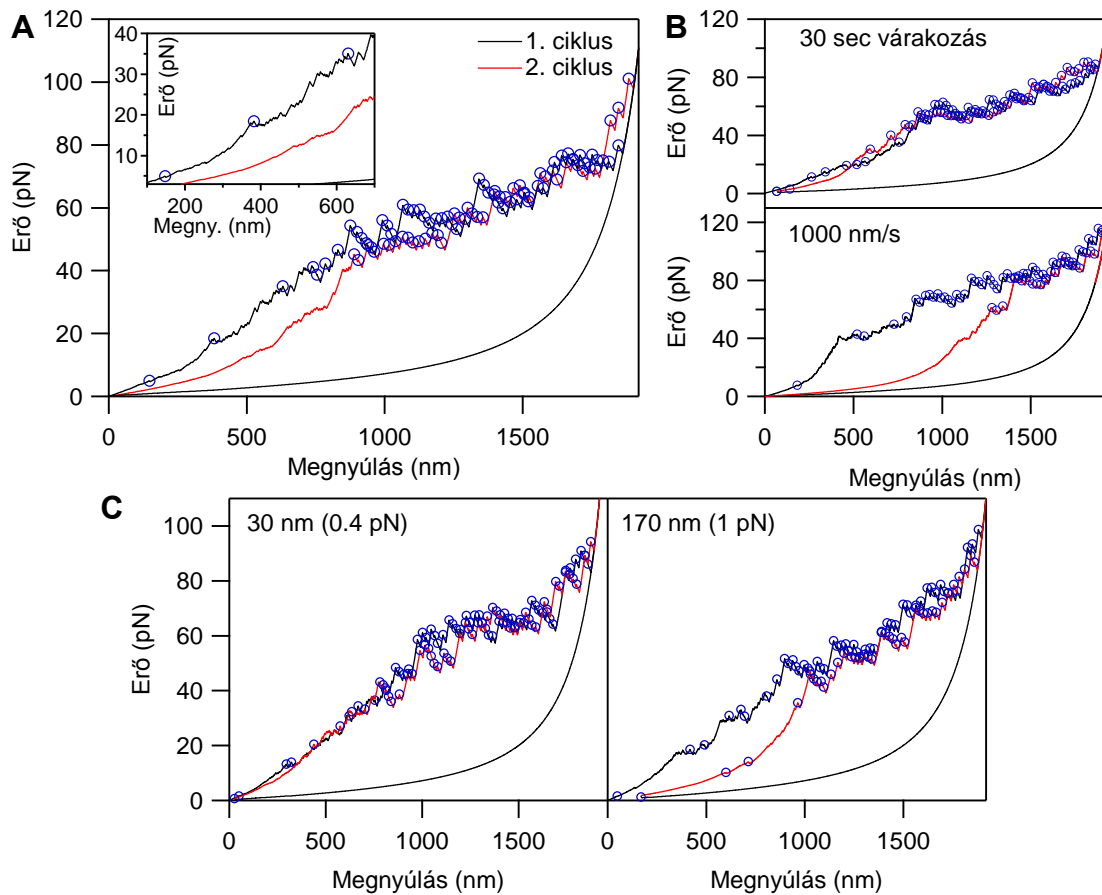
A ciklusos nyújtási kísérleteink alapján azt tapasztaltuk, hogy a titin nyújtás-visszaengedési görbéje tükrözi a molekula mechanikai történetét. A szerkezeti átmenetek száma, mintázata illetve az erőgörbe hiszterézisének mértéke (mechanikai fáradás), attól függ, hogy a molekula mekkora erőknek volt kitéve, és hogy az adott kontrakciós állapotban mennyi időt töltött. Az a mechanizmus, miszerint a molekulát ért mechanikai behatásra, abban olyan szerkezetváltozások jönnek létre, amelyek adaptív módon megváltoztatják a molekula erőválaszát, egyfajta mechanoszenzor mechanizmusként szolgálhat. A titin erőválaszát meghatározó mechanikai paraméterek az erő, a megnyúlás, a nyújtási sebesség illetve a ciklusok között eltelt idő. Következésképpen a titin erő-megnyúlás görbéje érzékeny a korábbi mechanikai

terhelésre (**20. ábra**) és terhelési-sebességre (**26. ábra**), a molekula nyugalmi vég-vég hosszára (**28. ábra**) és a relaxált konformációban eltöltött időre (**27. ábra**). Az egymás utáni mechanikai ciklusok megnyúlás görbéinek eltolódása vagy visszatérése tükrözi a molekulát ért mechanikai előzményeket. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy kettős molekuláris mechanizmus felel a mechanoszenzitív funkcióért: a PEVK domén szerkezetváltozásai és néhány mechanikailag kevésbé stabil globuláris domén kitekeredése a proximális tandem Ig régióban. Nyújtás során a PEVK domén tranzienst szerkezetei és elektrosztatikus kölcsönhatásai véletlenszerű felszakadása lépésekben növeli a domén kontúr hosszát, így fűrészfogszerű átmenetek jelennek meg az erő spektrumban. Visszaengedéskor a doménon belüli kölcsönhatások visszaalakulnak feltehetően egyfajta öncipzározó mechanizmussal, ami során előbb a szomszédos, majd az egyre távolabbi láncrészek kerülnek közelségbe és alakítanak ki kötéseket egymással. A visszaalakulási folyamatot a molekula megnyúlása (**28. ábra**) és a relaxált konformációban eltöltött idő (**27. ábra**) egyaránt befolyásolja. Emellett néhány gyenge globuláris domén kitekeredése is szerepet játszik a folyamatban a proximális tandem Ig régióból (**23. ábra**), bár ezek pontos helye a titin szekvenciában mindeddig nem ismert.

A felvázolt mechanizmus alapján Monte Carlo szimulációt végeztünk, melyben a fentiekben leírt egyszerű kétkomponensű modell segítségével rekonstruáltuk a kísérleti eredményeinket (**34.A ábra**). A szimulált erő spektrumokban a globuláris domén kitekeredések és a PEVK doménon belüli kötések felszakadása keveredve jelentkezik az $F < 40$ pN erőtartományban, vagyis a modell szerint a globuláris domén kitekeredés még a PEVK doménon belüli szerkezetek felszakítása előtt is végbemehet. A modell emellett sikeresen rekonstruálta a kísérleteknél tapasztalt mechanikai előzményfüggő erőspektrumokat (**34.B és C ábrák**).

A titinmolekula itt bemutatott mechanikai előzményfüggő szerkezet változásai akkor tölthetnek be valós mechanoszenzor funkciót, amennyiben az információ a titinről jelátviteli útvonalakhoz csatolt [85-89]. Elképzelhető, hogy az alacsony erőknél végbemenő szerkezeti átalakulások megváltoztatják a molekula foszforilációs és ligandkötő helyeinek kitétségét. Az ilyen mechanizmus kulcsfontosságú lehet a szarkomert ért mechanikai szignálok jelátviteli utakhoz kapcsolásában. Az erő hatására felnyíló szerkezeti elemek révén felszabaduló kriptikus kötőhelyek fontos mechanoszenzor funkciót látnak el sejtekben [90]. Az ilyen mechanoszenzor funkciót

ellátó fehérjék az esetek többségében multimoduláris felépítésűek és rendelkeznek valamilyen motívum szerkezettel [91]. A titin moduláris szerkezetének ismeretében és kísérletei eredményeink tükrében felvetődik a titin hasonló szarkomerikus mechanoszenzor funkciója.



34. ábra A titin nyújtási szerkezetváltozásainak Monte Carlo szimulációja. A szimulációkban két nyújtás-visszaengedési ciklus követi egymást. Fekete: első ciklus, piros: második ciklus, a kék körök a globuláris domén kitekeredéshez tartozó fűrészfogakat jelölik. **A ábra:** A titin mechanikai fáradásának szimulálása. Nyújtási sebesség: 250 nm/s, a ciklusok között nincs várakozás. A betétábrán megfigyelhető, hogy egyes globuláris domének a PEVK szerkezetek felszakadása előtt kitekerednek. **B ábra:** Fent: A két ciklus között 30 másodperc várakozási idő hatására a második ciklus hiszterézise teljesen visszaépült. Lent: 1000 nm/s nyújtási sebesség hatására kifejezett fáradás jelentkezik a molekulában. A ciklusok között nincs várakozás. **C ábra:** A két ciklus közötti megrövidülés mértékének hatása a mechanikai fáradásra. A ciklusok között 20 másodpercig, adott vég-vég hossz értéken relaxál a molekula. Jobb: 30 nm vég-vég hosszánál tartva (0.4 pN) a molekulát teljes a hiszterézis visszaépülése. Bal: 170 nm vég-vég hosszánál tartva (1 pN) a molekulát fáradás jelentkezik a második ciklusban.

6.3. Titin nyújtása visszahúzódó folyadékmeniszkusszal

Egyedi titinmolekulákat nyújtottunk és fésültünk ki csillámfelületre visszahúzódó folyadékmeniszkusz technikával [58, 75, 92-94] annak érdekében, hogy atomerő mikroszkópos felvételeken vizsgáljuk a molekulák nyújtási szerkezetváltozásait. A kitapadt fehérjeláncok konformációi a felület mentén fokozatos átmenetet mutatnak a relaxálttól a túlnyújtottig. A mintafelvitel helyén inkább relaxált konformációjú molekulák és molekula komplexek láthatók, míg a csillámfelszín szélén inkább kiegyenesedett, túlnyújtott molekulák dominálnak (**29. ábra**). Ezt feltehetően az szabályozza, hogy a molekula még a meniszkusz végig vonulása előtt letapad-e a felszínre. Vagyis a mintafelvitel helyén elegendő idő áll a molekulák rendelkezésére, hogy a csillám felszínhez diffundáljanak és egyensúlyi konformációban kitapadjanak. Ezzel ellentétben a csillám széli részén a molekulák akkor tapadnak ki, amikor a meniszkusz már visszahúzódik és nyújtó erőt fejt ki rájuk.

A túlnyújtott titinmolekulák hossza jóval meghaladta a natív szerkezetre jellemző $\sim 1 \mu\text{m}$ -t [58, 75]. A molekulák egyik végén szisztematikusan megfigyelhető egy nagyobb globuláris fej (kb. 10-szer magasabb mint a filametum), amit már korábbi tanulmányok is említenek [58, 75, 92]. Ezek alapján ezt a véget a molekula C-terminális, azaz M-csík felőli végéként azonosítottuk. Ez az M-csík globuláris fej konzisztensen befelé, a forgási középpont felé látható a titinmolekulákon, vagyis feltehetően ez a molekula kezdeti kitapadási pontja a felszínre, és a meniszkusz ezt követően fejt ki a molekula nyújtását. Ez a megfigyelésünk alátámasztja a korábbi számításokat, amelyek a titin M-csík végét pozitív töltésűnek írják le élettani pH értéken [58], ami miatt ez a molekularész képezi a legvalószínűbb tapadási pontot a negatív csillámfelülethez. Ezek mellett az M-csík fej konzisztens jelenléte a túlnyújtott molekulákon azt is jelzi, hogy ez a struktúra mechanikailag stabil, azaz képes jelentős nyújtási erőknek ellenállni. A megnyújtott molekulák másik végén is gyakran látható egy kisebb globuláris fej, ami feltehetően a molekula N-terminális, Z-csík végét jelzi. Mivel feltételezzük, hogy azon filamentumok melyek mindkét végén globuláris feji régió látható teljes hosszúságú titinmolekulák, így a további hossz analízist kizárólag ennek a kritériumnak megfelelő molekulákon végeztük (**30. ábra**).

A hosszeloszlás hisztogramon 1000 nm-nél egy csúcs látható, ami egyezik a natív titin kontúrhosszával. Ez feltehetően a kiegyenesedett de nem túlnyújtott molekulákból

adódik. Az ennél hosszabb értékeket viszont a meniszkusz erő hatására túlnyújtott molekulákon mértük. A kísérlet során a csillámfelszín széli részére kitapadt molekulákra és így a globuláris titin doménekre közel ugyanakkora erő, közel ugyanakkora ideig hat. Így a hosszabb értékek felé mért csökkenő gyakoriság a globuláris titin domének exponenciális kitekeredési kinetikájával magyarázható. Hosszabb, PEVK doménre utaló kontúrhiányokat csak ritkán tapasztaltunk a túlnyújtott molekulákon. A kiértékelt molekulák csak mintegy 2%-nál észleltünk olyan több száz nanométeres kontúrmegszakítást, amely a teljesen kinyújtott PEVK doménnek feleltethető meg (**30.A betétábra**). Ennek egy valószínű magyarázata, hogy a kísérletben alkalmazott ionerősség (~150 mM NaCl) mellett a pozitív töltésű motívumokat tartalmazó PEVK domén még kompakt konformációban, elektrosztatikusan csapdázódik a negatív csillám felületre. Megemelt ionerősség és a nátrium ionok káliumra cserélése esetében (600 mM KCl) a széles kontúrmegszakításokat mutató molekulák gyakorisága megnőtt (**30.D ábra**). Korábbi munkákból ismert, hogy a káliumionok kompetitíven gátolják a lizin oldalláncok ϵ -amino csoportjainak csillámhoz kötését [95]. Vagyis a káliumionok lassítják a PEVK domén számos lizin oldalláncának csillámhoz kötődését, így az nagyobb valószínűséggel nyúlik meg még a kitapadás előtt.

A globuláris domén kitekeredés szerkezeti jellemzőit topográfiai analízissel vizsgáltuk nagy felbontású AFM (0.5-2 nm pixelfelbontás) felvételeken. Az AFM nagy előnye a korábbi molekula kifésülési munkákban alkalmazott elektronmikroszkóppal szemben, hogy a mintáról kezelés nélkül, közvetlenül lehet képet alkotni. Ezzel szemben az elektronmikroszkópiában a fém árnyékolás során a mintára ~4 nm szemcseméretű elektrondenz réteget párologtatnak [58, 92]. Az AFM-es felvételeken elkülönülő hézagok láthatók a túlnyújtott titinmolekulák tengelyirányú kontúrja mentén (**31.A ábra**). A hézagokat olyan megszakításként definiáltuk a molekula tengely menti magasságprofilján, aminek a topográfiai magassága a felszínnel egy szintben van (**31.C ábra**). A titin globuláris doménjeinek hét antiparalell lefutású β -lánc által kialakított kompakt szerkezet miatt [11, 15, 96], a feltekert domének topográfiai magassága jóval meghaladja a kitekert és megnyújtott peptidláncét. Az átlagos 27.7 ± 0.5 nm (S.E.) hézagszélesség jó egyezést mutat a kitekert globuláris domének kontúrhosszával [97]. Vagyis a leírt elkülönülő kontúrhézagok az erőhatásra

kitekeredett Ig és Fn domének morfológiai megfelelői, ami alapján megállapítható, hogy az egyes domének erőhatásra egymástól függetlenül tekerednek ki. Esetenként a globuláris domén struktúrából kitekert peptidlánc is megfigyelhető mint a hézagokon keresztül futó finom filamentum (**31.A betétábra**). A hézagszélességek eloszlása meglehetősen széles, a mért adatok zöme 6 és 60 nm közé esik (**31.D ábra**). A rövid hézagszélességek feltehetően részleges domén kitekeredés eredményei [98], míg a hosszú értékek több szomszédos domén kitekeredéséből adódhatnak. Olykor dugóhúzószerűen csavart szakaszokat is észleltünk a relaxált molekulákon, ami arra utal, hogy a kitapadáskor torziós feszültség maradt a molekulában [92] (**31.E ábra**).

Az átlagos topográfiai filamentum magasság és szélesség aránya alapján mind a megnyújtott, mind a relaxált konformációban kitapadt molekulák jelentősen ellapultak (**31.B és F ábrák**). Az ellapulást okozhatja a molekula és a csillámfelület kölcsönhatása, a dehidráció és a pásztázó AFM tű által kifejtett nyomás [99]. A filamentum hosszak viszont jó egyezést mutatnak a korábbi elektronmikroszkópos tanulmányokkal [58, 75, 92], vagyis bár a felületi kölcsönhatások laterálisan jelentősen ellapítják a molekulákat, a tengely irányú torzítás minimális.

A titinmolekulákat megnyújtó erő meghatározását három különböző módszerrel végeztük el. A meniszkusz erőt kiszámítottuk *a priori* a **7. egyenlet** alapján. Amennyiben az 50%-os glicerindat – levegő határfelületre vonatkozó felületi feszültséget 64 pNm^{-1} -nek [58] és az átlagos globuláris domén átmérőt 2 nm-nek [100] vesszük, akkor 400 pN nyújtási erőt kapunk eredményként. Egy másik megközelítésben az erő *a posteriori* kiszámolható a WLC egyenlet alapján (**4. egyenlet**). Az átlagos kitekert domén vég-vég hosszának 27.7 nm-t, a szekvenciából számolt átlagos kitekert globuláris domén kontúrhosszának 32.1 nm-t (**Módszerek 4.5**) és a kitekert titinlánc perzisztenciahosszának 0.4 nm-t véve [65], 144 pN nyújtási erőt kapunk eredményül. Végezetül kiszámítható az erő a **8. egyenlet** szerint, ha ismerjük azon domének számát, amelyek az alatt tekeredtek ki amíg a visszahúzódó meniszkusz végigvonult a molekulán (Δt) [36, 42]. Az egy molekulára eső kitekert domének száma egyrészt a kontúr hézagok átlagos számából (22 domén kitekeredés/molekula), másrészt a nyújtás során az 1 μm natív hossz feletti kontúrhossznövekmény átlagos kitekert domén kontúrhosszra normalizálásából (29 domén kitekeredés / molekula) számoltuk. Az erőhatás idejére (Δt) $5 \times 10^{-6} \text{ s}$ -t (**9. egyenlet**), spontán domén kitekeredési állandónak (k_0) $3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ -t [36]

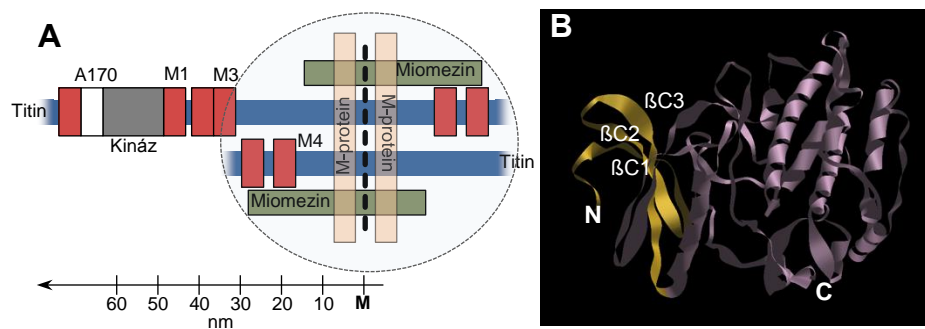
és tranzíciós hosszának (Δx) 0.3 nm-t véve [36, 42] a nyújtási erőre 276 pN és 280 pN-t kaptuk a két esetben. Összegezve a három módszert, a meniszkusz visszahúzóadásakor a túlnyújtott molekulákra 144–400 pN erő hat, ami összehasonlítható nagyságrendű a dinamikus erőspektroszkópiában vizsgálható tartománnyal. Ezek alapján megállapítható, hogy a visszahúzóó folyadékmeniszkusszal végzet molekula megnyújtás alkalmas nanomechanikai vizsgálati módszer az egyedi molekula erőspektroszkópia morfológiai kiegészítésére.

A túlnyújtott titinmolekulák nem kitekeredett szakaszainak topográfiáját vizsgálva, globuláris egységek rajzolódnak ki (**32.A-C ábrák**). A molekula magasságprofilján szintén megfigyelhető egy topográfiai periodicitás, melynek átlagos csúcs-csúcs távolsága 5.9 nm, jól egyezik a globuláris titin domén távolságok irodalmi adataival [100, 101] (**32.D és E ábrák**). Mivel ismert, hogy egy globuláris domén hossza ~ 4 nm [60], az átlagos 5.9 nm-es távolság alapján hozzávetőleg 2 nm hosszú linker található az egyes domének között, ami további rugalmasságot kölcsönöz a titin tandem globuláris régiójának.

A titin mint mechanoszenzor

Mivel az eddig bemutatott topográfiai analízis segítségével azonosíthatók a titin erőhatásra kitekert régiói, így azonosítottuk az M-csíkhöz legközelebb eső kitekert régiót a molekulában (**33.A ábra**). Az itt látható terminális kitekert régió távolsága az M-csík végi fej közepétől leggyakrabban ~ 50 nm-nek adódott (**33.B ábra**). Ez jó egyezést mutat a titin kináz domén M-csiktól mért távolságával [102] (**35.A ábra**). Bár szekvencia specifikus monoklonális antitest jelenleg nem áll rendelkezésünkre az azonosításhoz, a távolságmérések alapját feltételezzük, hogy az M-csík fejhez eső legközelebbi kontúrhézag a titin kináz domén N-terminális kitekert régiója. A hézag szélesség eloszlás 15 és 25 nm-es csúcsai összevethetők a kináz doménon végzett erőspektroszkópiai eredményekkel [43] (**33.C ábra**). Ezeket a szerkezeti átmeneteket a kináz nyújtási erőgörbén a domén N-terminális β -láncainak (**35.B ábra**) felnyílásaként azonosították, melynek eredményeképpen a kináz domén ATP kötő zsebe felnyílik. Az N-terminális kontúrhézagot a vizsgált molekulák többségén észleltük, vagyis a feltehetően a kináz N-terminálisa szisztematikusan kitekeredik a meniszkusz erő hatására. Mivel átlagosan molekulánként 22 domén kitekeredést számoltunk,

viszont a kináz szisztematikusan ezek között volt, feltehetően a mechanikailag gyengébb domének közé tartozik, ami alacsony erőtartományban tekeredik ki. A megnyújtott molekulahossz és a kinázhoz tartozó hézagszélesség között erős korrelációt nem, de szignifikáns tendenciát tudtunk mutatni (**33.D ábra**). Feltehetően a kísérletekben alkalmazott nyújtási erőknél a kináz domén már teljesen kitekert állapotban van. Mindazonáltal ez felveti annak a lehetőségét, miszerint a kináz domén erőhatásra történő részleges kitekeredése felszabadítja annak ATP kötő zsebét, így fontos szerepe lehet a szarkomerikus jelátvitel mechano-kémiai csatolásban.



35. ábra Az M-csík és a titin kináz szerkezete. **A:** Az M-csík sematikus szerkezete. Alul az M-csíktól mért távolság látható nm-ben (cf. [102]). **B:** A titin kináz (1 TKI) molekuláris modellje. A három N-terminális β -szál ($\beta C1$, $\beta C2$, $\beta C3$) sárgával jelölve.

7. Következtetések

7.1. A titin alacsony erőknél jelentkező nyújtási átmenetei

A titinmolekula nyújtási erőgörbéjén erőátmenetek azonosíthatók már egészen kicsiny, 5 pN-os erőktől kezdődően. Az alacsony erőtartományban ($F < 40$ pN) jelentkező átmenetek lépésekben növelik a molekula kontúrhosszát, melyek háttérben a molekula erőhatásra bekövetkező szerkezetváltozásai szerepelnek. Az átmenetekhez tartozó kontúrhossznövekmények eloszlásából arra következtetünk, hogy közelítőleg 30 nm-es kontúrhossznövekményeket okozó globuláris domén kitekeredés mellett egy másik szerkezetváltozási folyamat is lejátszódik, mely során jóval nagyobb mértékben nő a molekula kontúrhossza (50-400 nm).

Az ionerősség csökkentésének hatására csökken ezen hosszabb kontúrhossznövekménnyel járó átmenetek elfordulása, amit a polielektrolit tulajdonságú PEVK domén elektrosztatikus merevedése okozhat. A PEVK domén antitesttel való passziválása meggátolta a doménon belüli szerkezetek kialakulását, bár az így passzivált molekulában globuláris domének még kitekeredtek az alacsony erőtartományban. Összehasonlító erőspektroszkópiai vizsgálatainkban szívizom izoforma esetében is kimutattuk a 40 pN alatti diszkrét erőátmeneteket, bár ez esetben a hosszú kontúrhossznövekmények nem mutatkoztak, mivel a szívizom titin PEVK domén hossza mintegy tizede a vázizom izoformáénak.

Az 5-40 pN-os erőtartományban végzett erővisszacsatolt mérésekben a molekula diszkrét lépésekben nyúlik. A lépésnagyság eloszlás alapján a globuláris domének mellett más, szerkezeti elemek felnyílása is meghatározó a folyamatban. Az állandó erőknél mért megnyúlási görbék alapján egy gyors és egy lassú kinetikai komponenst azonosítottunk a kitekeredési folyamatban. A gyors komponens feltehetően mechanikailag kevésbé stabil szerkezetek erőhatásra történő felszakadásának, míg a lassú komponens, a stabilabb globuláris domének kitekeredésének eredménye.

Mindezek alapján arra következtetünk, hogy az alacsony erőknél bekövetkező szerkezeti átmeneteket mechanikailag gyenge globuláris domének kitekeredése és a PEVK doménon belüli tranziens szerkezetek illetve elektrosztatikus kölcsönhatások felszakítása együttesen okozza.

Repetitív nyújtási kísérleteinkből kitűnik, hogy az alacsony erőtartományban jelentkező szerkezeti átmenetek felelősek a titin mechanikai fáradásáért. Az ismételt mechanikai ciklusok között az alacsony erőtartomány átmeneteinek visszaalakulása függ a ciklusok között eltelt időtől, a molekula megnyúlásától és a nyújtási sebességtől. Következésképpen a titin erő-megnyúlás görbéje érzékeny a korábbi mechanikai terhelésre. Eredményeinket egy új modellben összegeztük melyben a titin megnyúlásában a PEVK domén szerkezetváltozásai és néhány a proximális tandem Ig-régióból származó mechanikailag kevésbé stabil globuláris domén kitekeredése együttesen jelentkezik az alacsony erőtartományban. A titinmolekula mechanikai előzménytől függő szerkezetváltozásainak fontos szerepe lehet a szarkomert ért mechanikai szignálok jelátviteli utakhoz kapcsolásában.

7.2. Túlnyújtott titinmolekulák szerkezetének topográfiai vizsgálata

A visszahúzódó folyadékmeniszkusszal túlnyújtott és csillámfelületre kifésült titinmolekulák topográfiai kontúrján átlagosan 27.7 nm- hosszú hézagok figyelhetők meg, amelyek az erőhatásra kitekeredett globuláris domének topográfiai megfelelői. Emellett hosszabb, több száz nanométeres kontúr hézagok is megfigyelhetők, amelyek a megnyújtott PEVK domén megfelelői. A molekula hézagmentes szakaszain nagyfelbontású AFM képeken globuláris régiók mutathatók ki, a régiók átlagos távolsága 5.9 nm ami egy globuláris domén és az azt szegélyező linker szekvencia hosszából adódik. Az AFM-es felvételeken a titin C-terminális, M-csík felőli végén látható jellegzetes kontúrhézag helyzetéből és szélességének eloszlásából arra következtetünk, hogy az erőhatásra megnyúlt titin kináz domén részleges kitekeredése révén jött létre. A kináz domén N-terminális β -láncainak kitekeredése szabaddá teszi a domén ATP-kötő zsebét, így fontos szerepet tölthet be a mechanikai érzékelési folyamatokban.

7.3. Tudományos tézisek

- I. A titinmolekula már alacsony erők ($5 \text{ pN} < F < 40 \text{ pN}$) hatására is diszkrét lépésekben nyúlik, melyek háttérben a molekula erőhatásra lezajló szerkezetváltozásai állnak.

- II. Az alacsony erőhatásokra is bekövetkező szerkezetváltozásokat a mechanikailag gyenge globuláris domének kitekeredése illetve a PEVK domén harmadlagos szerkezeteinek felszakadása együttesen okozzák.
- III. Az alacsony erőknél jelentkező szerkezeti átmenetek felelősek a titin mechanikai fáradásáért. Mintázatuk és regenerációjuk mértéke tükrözi a titinmolekulát ért korábbi mechanikai hatásokat.
- IV. Visszahúzódó folyadékmeniskusszal megnyújtott egyedi titinmolekulák topográfiai vizsgálatával kimutathatók az erőhatásra bekövetkező egyedi domén kitekeredések illetve a PEVK domén megnyúlása.
- V. A folyadékmeniskusszal felületre fésült és megnyújtott molekulákon észlelt M-csík vég felőli C-terminális kontúrhézag, mely feltehetően a részlegesen kitekert kináz domén, szélessége a nyújtási erővel arányos.

8. Összefoglalás

A titin a harántcsíkolt izom szarkomer felét áthidaló óriásfehérje amely a Z-csíktól az M-csíkgig húzódva egy harmadik filamentum rendszert alkot a vékony és vastag filamentumok mellett. A titin elsősorban a harántcsíkolt izom passzív rugalmasságáért felelős, azonban újabb megfigyelések szerint a szarkomer szerkezeti organizátoraként és erőszenzorként is működik. A jelenlegi elképzelések szerint csak a molekula I-szakaszbeli része nyúlik funkcionálisan, így ez felelős a fiziológias szarkomer rugalmasságért. Ez a szakasz szerkezetét tekintve sorba kapcsolt globuláris domének ismétlődéséből, továbbá egyedi szekvenciákból, a PEVK, N2A és N2B doménekből épül fel. A szarkomer nyújtása során ezen szakaszok rugalmas elemként megnyúlnak és kiegyenesednek, azonban vitatott, hogy a fiziológiásnak tekintett 0-40 pN/titin erőtartományban bármilyen szerkezeti átmenet vagy doménkitekeredés fellép-e vagy sem.

Munkánkban egyedi, nyúl *m. longissimus dorsi*-ból és szívizomból izolált titin izoformákat vizsgáltunk erőmérő lézercsipesszel. Vizsgálataink során kimutattunk diszkrét szerkezeti átmeneteket a titin molekulákon az élettanilag releváns erőtartományban, konstans sebességű és erővisszacsatolt molekulanyújtási kísérletekben. Állandó sebességű nyújtás során túlnyúlási átmenetek tapasztalhatók a 10-40 pN-os erőtartományban, melyek révén a molekula kontúrhossza növekszik. Vázizom titin esetében az átmenetek okozta kontúrhossznövekmények igen széles eloszlást mutatnak (20-200 nm), míg a mintegy tízszer rövidebb PEVK szakasszal rendelkező szívizom izoformát vizsgálva a kontúrhossz-növekmények nem térnek el a magasabb erőknél tapasztalt domén kitekeredésre jellemző eloszlástól (20-50 nm). Ionerősségtől függő, anti-PEVK passzivációs és izoforma összehasonlító (harántcsíkolt vs. szívizom) kísérleteink alapján az átmenetek feltehetően PEVK doménből és néhány az I-szakaszbeli, mechanikailag gyenge, globuláris doménből erednek.

Erővisszacsatolt lézercsipesszel végzett kísérletekben az állandó erővel nyújtott vázizom titin molekula diszkrét lépésekben nyúlik. A lépésnagyság eloszlás alapján a domén kitekeredés mellett nagyobb kontúrhosszal jellemezhető átmenetek is kimutathatók. A diszkrét átmenetek száma jelentősen csökken a titinmolekula ismételt

mechanikai ciklusa során, ami arra utal, hogy ezek az intramolekuláris kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a molekula mechanikai kifáradásában.

Eredményeink felvetik a lehetőségét az *in situ* élettani körülmények között végbemenő diszkrét szerkezeti átmeneteknek, melyekért elsősorban a PEVK doménon belüli metastabil szerkezetek felszakadása, kitekeredése felelős. A diszkrét szerkezeti átmenetek rövid idő- és térbeli skálán képesek gyors kontúrhossz-adaptációra. A perces időskálán a diszkrét átmenetek mintázata a szarkomer mechanikai történetének, azaz a megelőző kontrakciós ciklusok tér- és időbeli karakterisztikájának függvénye.

A titin nyújtási szerkezetváltozásainak további vizsgálatához egyedi molekulákat nyújtottunk meg visszahúzódó folyadékmeniszkusszal. A túlnyúlt molekulákról atomerő mikroszkóppal készítettünk nagy felbontású felvételeket, melyek alapján topográfiai analízist végeztünk. A túlnyújtott molekulákról felvett magasságprofilokban repetitív globuláris struktúrák és hézagok egyaránt azonosíthatók. A globuláris struktúrák a titin Ig és Fn típusú doménjei, míg a hézagok a globuláris domének erőhatásra kitekert megfelelői. Topográfiai analízissel kimutattuk a molekula N-terminálisa közelében található kitekert kináz domént. Ez a konzisztensen kimutatható megnyúlt molekulaszakasz alátámasztja a felvetést, miszerint a titin kináz az N-terminális β -láncainak erőhatásra történő kitekeredése fontos szerkezetváltozási folyamat a mechanoszenzoros folyamatokban.

9. Summary

Titin is a giant elastomeric muscle protein that spans the half sarcomere from the Z-disk to the M-line and forms an integrated third sarcomeric filamentous system besides the thick and thin filaments. Titin is the main determinant of passive muscle elasticity and has been implicated to function as a sarcomeric template and mechanosensor. Recent model of titin elasticity suggests that only the I-band region of the molecule is extensible under physiological circumstances. This region is composed of serially linked globular domain repeats interspersed by unique unstructured regions such as the PEVK, N2A and N2B domains. Upon stretching the sarcomere, the I-band region of titin extends continuously by elastic mechanisms. The presence of force-driven globular domain unfolding at the physiological 0-40 pN/titin force regime is still debated.

In the present work we manipulated titin molecules isolated from rabbit *m. longissimus dorsi*, with high-resolution optical tweezers in velocity- or force-clamp modes. Discrete, stepwise transitions, with a rate faster than that caused by canonical Ig-domain unfolding, occurred during stretch at physiologically relevant forces. In constant velocity stretch discrete transitions appear at 10-40 pN forces that increase the molecule's contour length in discrete steps. In case of skeletal muscle the step size distribution is wide (20-200 nm), while in case of the cardiac isoform, that contains a much shorter PEVK domain (167 residues) the contour length gain distribution did not significantly deviate from the values measured at high forces (20-50 nm). Based on our measurement carried out at different ionic strength, and by the passivation of the PEVK domain with specific antibody, we conclude that structural transitions of the PEVK domain and the unfolding of some weak globular domains of the I-band are likely to be involved in the low-force transitions.

The low-force transitions wear out in repetitive stretch experiments, thus they are involved in titin's mechanical fatigue. The pattern of these transitions is sensitive to the history of contractile events. Thus, under non-equilibrium conditions across the physiological force range, titin extends *via* a complex pattern of history-dependent discrete conformational transitions which, by dynamically exposing ligand-binding sites, may set the stage for the biochemical sensing of the sarcomeric mechanical status.

To further explore structural changes of titin upon stretch, we analyzed, by using high-resolution atomic force microscopy, the topography of titin molecules overstretched with receding meniscus. The axial contour of the molecules was interrupted by topographical gaps with a mean width of 27.7 nm that corresponds well to the length of an unfolded globular domain. The wide gap-width distribution suggests, however, that additional mechanisms such as partial domain unfolding and the unfolding of neighboring domain multimers may also be present. In the folded regions we resolved globules with an average spacing of 5.9 nm, which is consistent with a titin chain composed globular domains with extended interdomain linker regions. Topographical analysis allowed us to allocate the most distal unfolded titin region to the kinase domain, suggesting that this domain systematically unfolds when the molecule is exposed to overstretching forces. The observations support the prediction that upon the action of stretching forces the N-terminal β -sheet of the titin kinase unfolds, thus exposing the enzyme's ATP-binding site and hence contributing to the molecule's mechanosensory function.

10. Irodalomjegyzék

- [1] Maruyama K. (1997) Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB J*, 11:341-345.
- [2] Trinick J. (1996) Titin as a scaffold and spring. *Cytoskeleton. Curr Biol*, 6:258-260.
- [3] Wang K. (1996) Titin/connectin and nebulin: giant protein rulers of muscle structure and function. *Adv Biophys*, 33:123-134.
- [4] Funatsu T, Higuchi H, Ishiwata S. (1990) Elastic filaments in skeletal muscle revealed by selective removal of thin filaments with plasma gelsolin. *J Cell Biol*, 110:53-62.
- [5] Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. (1999) Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol*, 11:18-25.
- [6] 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. *Circ Res*, 86:1114-1121.
- [7] Furst 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*, 106:1563-1572.
- [8] Gregorio CC, Trombitas K, Centner T, Kolmerer B, Stier G, Kunke K, Suzuki K, Obermayr F, Herrmann B, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. (1998) The NH₂ terminus of titin spans the Z-disc: its interaction with a novel 19-kD ligand (T-cap) is required for sarcomeric integrity. *J Cell Biol*, 143:1013-1027.
- [9] AL-Khayat HA, Kensler RW, Squire JM, Marston SB, Morris EP. (2013) Atomic model of the human cardiac muscle myosin filament. *Proc Natl Acad Sci*, 110:318-323.

- [10] Zou P, Pinotsis N, Lange S, Song YH, Popov A, Mavridis I, Mayans OM, Gautel M, Wilmanns M. (2006) Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature*, 439:229-233.
- [11] Improta S, Politou AS, Pastore A. (1996) Immunoglobulin-like modules from titin I-band: extensible components of muscle elasticity. *Structure*, 4:323-337.
- [12] 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*, 345:273-276.
- [13] Muhle-Goll C, Nilges M, Pastore A. (1997) ¹H and ¹⁵N NMR resonance assignments and secondary structure of titin type I domains. *J Biomol NMR*, 9:2-10.
- [14] Wright NT, Meyer LC. (2013) Structure of giant muscle proteins. *Front Physiol*, 4.
- [15] Improta S, Krueger JK, Gautel M, Atkinson RA, Lefevre JF, Moulton S, Trehwella J, Pastore A. (1998) The assembly of immunoglobulin-like modules in titin: implications for muscle elasticity. *J Mol Biol*, 284:761-777.
- [16] 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*, 89:1065-1072.
- [17] Granzier H, Labeit S. (2002) Cardiac titin: an adjustable multi-functional spring. *J Physiol*, 541:335-342.
- [18] Greaser M. (2001) Identification of new repeating motifs in titin. *Proteins*, 43:145-149.
- [19] Labeit S, Kolmerer B. (1995) Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, 270:293-296.

- [20] Trombitas K, Greaser M, Labeit S, Jin JP, Kellermayer M, Helmes M, Granzier H. (1998) Titin extensibility in situ: entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J Cell Biol*, 140:853-859.
- [21] Huber T, Grama L, Hetenyi C, Schay G, Fulop L, Penke B, Kellermayer MS. (2012) Conformational dynamics of titin PEVK explored with FRET spectroscopy. *Biophys J*, 103:1480-1489.
- [22] Ma K, Wang K. (2003) Malleable conformation of the elastic PEVK segment of titin: non-co-operative interconversion of polyproline II helix, beta-turn and unordered structures. *Biochem J*, 374:687-695.
- [23] Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. (1986) A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, 323:160-164.
- [24] Granzier HL, Irving TC. (1995) Passive tension in cardiac muscle: contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J*, 68:1027-1044.
- [25] 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*, 261:62-71.
- [26] Erickson HP. (1997) Stretching single protein molecules: titin is a weird spring. *Science*, 276:1090-1092.
- [27] Linke WA, Granzier H. (1998) A spring tale: new facts on titin elasticity. *Biophys J*, 75:2613-2614.
- [28] 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*, 395:863-869.
- [29] Labeit S, Kolmerer B, Linke WA. (1997) The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ Res*, 80:290-294.

- [30] Linke WA, Stockmeier MR, Ivemeyer M, Hosser H, Mundel P. (1998) Characterizing titin's I-band Ig domain region as an entropic spring. *J Cell Sci*, 111 (Pt 11):1567-1574.
- [31] Li H, Linke WA, Oberhauser AF, Carrion-Vazquez M, Kerkvliet JG, Lu H, Marszalek PE, Fernandez JM. (2002) Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature*, 418:998-1002.
- [32] Linke WA, Ivemeyer M, Mundel P, Stockmeier MR, Kolmerer B. (1998) Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95:8052-8057.
- [33] 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*, 84:1339-1352.
- [34] 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*, 146:631-644.
- [35] Trombitas 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*, 79:3226-3234.
- [36] Rief M, Fernandez JM, Gaub HE. (1998) Elastically Coupled Two-Level Systems as a Model for Biopolymer Extensibility. *Phys Rev Lett*, 81:4764-4767.
- [37] Minajeva A, Kulke M, Fernandez JM, Linke WA. (2001) Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils. *Biophys J*, 80:1442-1451.
- [38] Trombitas K, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Kellermayer MS, Labeit S, Granzier H. (2003) Molecular basis of passive stress relaxation in human soleus fibers: assessment of the role of immunoglobulin-like domain unfolding. *Biophys J*, 85:3142-3153.

- [39] Hidalgo C, Granzier H. (2013) Tuning the molecular giant titin through phosphorylation: role in health and disease. *Trends Cardiovasc Med*, 23:165-171.
- [40] Kotter S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Muller AE, Helling S, Marcus K, Dos Remedios C, Linke WA, Kruger M. (2013) Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 99:648-656.
- [41] Kellermayer MS, Smith SB, Bustamante C, Granzier HL. (2001) Mechanical fatigue in repetitively stretched single molecules of titin. *Biophys J*, 80:852-863.
- [42] Kellermayer MS, Smith SB, Granzier HL, Bustamante C. (1997) Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, 276:1112-1116.
- [43] Puchner EM, Alexandrovich A, Kho AL, Hensen U, Schafer LV, Brandmeier B, Gräter F, Grubmüller H, Gaub HE, Gautel M. (2008) Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:13385-13390.
- [44] Bustamante C, Marko JF, Siggia ED, Smith S. (1994) Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science*, 265:1599-1600.
- [45] Ott A, Magnasco M, Simon A, Libchaber A. (1993) Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 48:R1642-R1645.
- [46] Ashkin A. (1970) Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Phys Rev Lett*, 24:156-159.
- [47] Ashkin A, Dziedzic M. (1971) Optical Levitation by Radiation Pressure *Appl Phys Lett*, 19.
- [48] Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE, Chu S. (1986) Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt Lett*, 11:288.

- [49] Ashkin A. (2000) History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* 6:841-856.
- [50] Neuman KC, Block SM. (2004) Optical trapping. *Rev Sci Instrum*, 75:2787-2809.
- [51] Bell GI. (1978) Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200:618-627.
- [52] Evans E, Ritchie K. (1997) Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J*, 72:1541-1555.
- [53] Alegre-Cebollada J, Perez-Jimenez R, Kosuri P, Fernandez JM. (2010) Single-molecule Force Spectroscopy Approach to Enzyme Catalysis. *J Biol Chem*, 285:18961-18966.
- [54] Soteriou A, Gamage M, Trinick J. (1993) A survey of interactions made by the giant protein titin. *J Cell Sci*, 104 (Pt 1):119-123.
- [55] Trombitas K, Greaser M, French G, Granzier H. (1998) PEVK extension of human soleus muscle titin revealed by immunolabeling with the anti-titin antibody 9D10. *J Struct Biol*, 122:188-196.
- [56] Konig K. (1998) Laser tweezers are sources of two-photon excitation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44:721-733.
- [57] Kellermayer MS, Smith S, Bustamante C, Granzier HL. (2000) Mechanical manipulation of single titin molecules with laser tweezers. *Adv Exp Med Biol*, 481:111-128.
- [58] Tskhovrebova L, Trinick J. (1997) Direct visualization of extensibility in isolated titin molecules. *J Mol Biol*, 265:100-106.
- [59] 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*, 69:2601-2610.

- [60] Politou AS, Gautel M, Pfuhl M, Labeit S, Pastore A. (1994) Immunoglobulin-type domains of titin: same fold, different stability? *Biochemistry*, 33:4730-4737.
- [61] Pires RH, Saraiva MJ, Damas AM, Kellermayer MS. (2011) Structure and assembly-disassembly properties of wild-type transthyretin amyloid protofibrils observed with atomic force microscopy. *J Mol Recognit*, 24:467-476.
- [62] Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF. (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, 10:2606-2617.
- [63] Evans E, Ritchie K. (1999) Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains. *Biophys J*, 76:2439-2447.
- [64] Evans E. (2001) Probing the relation between force--lifetime--and chemistry in single molecular bonds. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 30:105-128.
- [65] Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE. (1997) Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, 276:1109-1112.
- [66] Marszalek PE, Lu H, Li H, Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Schulten K, Fernandez JM. (1999) Mechanical unfolding intermediates in titin modules. *Nature*, 402:100-103.
- [67] Anderson BR, Granzier HL. (2012) Titin-based tension in the cardiac sarcomere: molecular origin and physiological adaptations. *Prog Biophys Mol Biol*, 110:204-217.
- [68] Herzog JA, Leonard TR, Jinha A, Herzog W. (2012) Are titin properties reflected in single myofibrils? *J Biomech*, 45:1893-1899.
- [69] Higuchi H, Nakauchi Y, Maruyama K, Fujime S. (1993) Characterization of beta-connectin (titin 2) from striated muscle by dynamic light scattering. *Biophys J*, 65:1906-1915.
- [70] Linke WA, Leake MC. (2004) Multiple sources of passive stress relaxation in muscle fibres. *Phys Med Biol*, 49:3613-3627.

- [71] Liversage AD, Holmes D, Knight PJ, Tskhovrebova L, Trinick J. (2001) Titin and the sarcomere symmetry paradox. *J Mol Biol*, 305:401-409.
- [72] Leake MC, Wilson D, Gautel M, Simmons RM. (2004) The elasticity of single titin molecules using a two-bead optical tweezers assay. *Biophys J*, 87:1112-1135.
- [73] Li H, Oberhauser AF, Redick SD, Carrion-Vazquez M, Erickson HP, Fernandez JM. (2001) Multiple conformations of PEVK proteins detected by single-molecule techniques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:10682-10686.
- [74] Nagy A, Grama L, Huber T, Bianco P, Trombitas K, Granzier HL, Kellermayer MS. (2005) Hierarchical extensibility in the PEVK domain of skeletal-muscle titin. *Biophys J*, 89:329-336.
- [75] 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*, 109:2177-2187.
- [76] Fisher TE, Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Li H, Marszalek PE, Fernandez JM. (2000) Single molecular force spectroscopy of modular proteins in the nervous system. *Neuron*, 27:435-446.
- [77] Neuman KC, Nagy A. (2008) Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods*, 5:491-505.
- [78] Rief M, Grubmuller H. (2002) Force spectroscopy of single biomolecules. *Chemphyschem*, 3:255-261.
- [79] Kellermayer MS, Smith SB, Bustamante C, Granzier HL. (1998) Complete unfolding of the titin molecule under external force. *J Struct Biol*, 122:197-205.
- [80] Tskhovrebova L, Trinick J, Sleep JA, Simmons RM. (1997) Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature*, 387:308-312.
- [81] Grama L, Nagy A, Scholl C, Huber T, Kellermayer MS. (2005) Local Variability in the Mechanics of Titin's Tandem Ig Segments. *Croat Chem Acta*, 78:405-411.

- [82] Rief M, Gautel M, Schemmel A, Gaub HE. (1998) The mechanical stability of immunoglobulin and fibronectin III domains in the muscle protein titin measured by atomic force microscopy. *Biophys J*, 75:3008-3014.
- [83] Hugel T, Grosholz M, Clausen-Schaumann H, Pfau A, Gaub H, Seitz M. (2001) Elasticity of Single Polyelectrolyte Chains and Their Desorption from Solid Supports Studied by AFM Based Single Molecule Force Spectroscopy. *Macromolecules*, 34:1039-1047.
- [84] Garcia-Manyses S, Brujic J, Badilla CL, Fernandez JM. (2007) Force-clamp spectroscopy of single-protein monomers reveals the individual unfolding and folding pathways of I27 and ubiquitin. *Biophys J*, 93:2436-2446.
- [85] Kruger M, Kotter S, Grutzner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA. (2009) Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res*, 104:87-94.
- [86] Linke WA. (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovasc Res*, 77:637-648.
- [87] Ottenheijm CA, van Hees HW, Heunks LM, Granzier H. (2011) Titin-based mechanosensing and signaling: role in diaphragm atrophy during unloading? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 300:L161-166.
- [88] Voelkel T, Linke WA. (2011) Conformation-regulated mechanosensory control via titin domains in cardiac muscle. *Pflugers Arch*, 462:143-154.
- [89] Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H. (2009) PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res*, 105:631-638, 617 p following 638.
- [90] Johnson CP, Tang HY, Carag C, Speicher DW, Discher DE. (2007) Forced unfolding of proteins within cells. *Science*, 317:663-666.

- [91] Vogel V. (2006) Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 35:459-488.
- [92] Tskhovrebova L, Trinick J. (2001) Flexibility and extensibility in the titin molecule: analysis of electron microscope data. *J Mol Biol*, 310:755-771.
- [93] Michalet X, Ekong R, Fougerousse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A. (1997) Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science*, 277:1518-1523.
- [94] Bensimon D, Simon AJ, Croquette VV, Bensimon A. (1995) Stretching DNA with a receding meniscus: Experiments and models. *Phys Rev Lett*, 74:4754-4757.
- [95] Karsai Á, Grama L, Murvai Ü, Soós K, Penke B, Kellermayer MSZ. (2007) Potassium-dependent oriented growth of amyloid β 25–35 fibrils on mica. *Nanotechnology*, 18:345102.
- [96] Goll CM, 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*, 6:1291-1302.
- [97] Lu H, Krammer A, Isralewitz B, Vogel V, Schulten K. (2000) Computer modeling of force-induced titin domain unfolding. *Adv Exp Med Biol*, 481:143-162.
- [98] Anderson BR, Bogomolovas J, Labeit S, Granzier H. (2013) Single molecule force spectroscopy on titin implicates immunoglobulin domain stability as a cardiac disease mechanism. *J Biol Chem*, 288:5303-5315.
- [99] Kiss B, Rohlich P, Kellermayer MS. (2011) Structure and elasticity of desmin protofibrils explored with scanning force microscopy. *J Mol Recognit*, 24:1095-1104.
- [100] Politou AS, Gautel M, Improta S, Vangelista L, Pastore A. (1996) The elastic I-band region of titin is assembled in a "modular" fashion by weakly interacting Ig-like domains. *J Mol Biol*, 255:604-616.

[101] von Castelmur E, Marino M, Svergun DI, Kreplak L, Ucurum-Fotiadis Z, Konarev PV, Urzhumtsev A, Labeit D, Labeit S, Mayans O. (2008) A regular pattern of Ig super-motifs defines segmental flexibility as the elastic mechanism of the titin chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105:1186-1191.

[102] Obermann WM, Gautel M, Steiner F, van der Ven PF, Weber K, Furst DO. (1996) The structure of the sarcomeric M band: localization of defined domains of myomesin, M-protein, and the 250-kD carboxy-terminal region of titin by immunoelectron microscopy. *J Cell Biol*, 134:1441-1453.

11. Saját publikációk jegyzéke

11.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Mártonfalvi Z, Bianco P, Linari M, Caremani M, Nagy A, Lombardi V, Kellermayer M. (2014) Low-force transitions in single titin molecules reflect a memory of contractile history. *J Cell Sci*, 127:858-870. IF: 5.877

Mártonfalvi Z, Kellermayer M. (2014) Individual Globular Domains and Domain Unfolding Visualized in Overstretched Titin Molecules with Atomic Force Microscopy. *PLoS One*, 9:e85847. IF: 3.733

11.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

Patko D, Mártonfalvi Z, Kovacs B, Vonderviszt F, Kellermayer M, Horvath R. (2014) Microfluidic channels laser-cut in thin double-sided tapes: Cost-effective biocompatible fluidics in minutes from design to final integration with optical biochips. *Sensors Actuators B: Chem*, 196:352-356. IF: 3.535

Somkuti J, Mártonfalvi Z, Kellermayer M, Smeller L. (2013) Different pressure-temperature behavior of the structured and unstructured regions of titin. *Biochim Biophys Acta*, 1834:112-118. IF: 3.733

Bianco P, Nagy A, Kengyel A, Szatmari D, Mártonfalvi Z, Huber T, Kellermayer M. (2007) Interaction forces between F-actin and titin PEVK domain measured with optical tweezers. *Biophys J*, 93:2102-2109. IF: 4.627

Karsai A, Mártonfalvi Z, Nagy A, Grama L, Penke B, Kellermayer M. (2006) Mechanical manipulation of Alzheimer's amyloid beta1-42 fibrils. *J Struct Biol*, 155:316-326. IF: 3.496

Karsai A, Nagy A, Kengyel A, Mártonfalvi Z, Grama L, Penke B, Kellermayer M.
(2005) Effect of lysine-28 side-chain acetylation on the nanomechanical behavior of
alzheimer amyloid beta25-35 fibrils. *J Chem Inf Model*, 45:1641-1646. IF: 2.923

12. Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kellermayer Miklósnak. Köszönöm támogatását, kiváló szakmai vezetését, irányomba tanúsított türelmét és barátságát.

Köszönöm Dr. Pasquale Bianco segítségét a lézercsipeszes kísérletekben és Dr. Bozó Tamás segítségét az atomerő mikroszkópos méréseknél. Köszönet illeti Iszlai Ágnes asszisztenst a sok áldozatos munkáért és a mindig készséges segítségért. Köszönöm Dr. Herényi Leventének és Dr. Osváth Szabolcsnak építő kritikáit és értékes tanácsait. Köszönöm Dr. Derka István áldozatos munkáját a lézercsipesz fejlesztésében és a meniszkusz rotor elkészítésében.

Köszönet illeti a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet dolgozóit, akik mindig türelemmel és segítőkészséggel voltak irányomban.

Köszönöm családomnak és feleségemnek, hogy mindig mindenben támogatott és ezzel sokban hozzájárult a disszertáció létrejöttéhez.