

Szakmai beszámoló

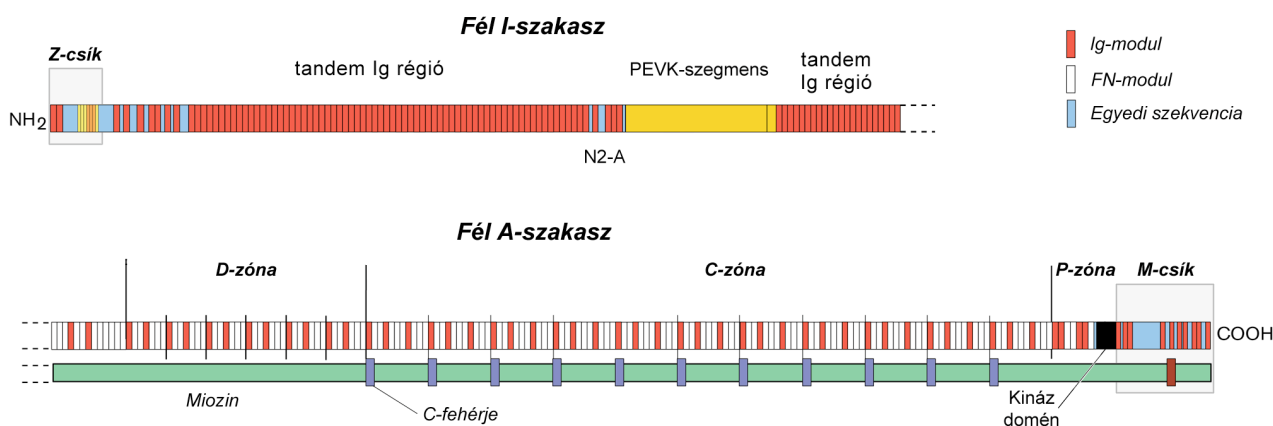
az F49514 számú,

Lokális mechanikai stabilitás és rugalmasság a titin izomfehérjében
című ifjúsági OTKA pályázathoz

Pályázatom célja volt megvizsgálni és leírni a titin óriás izomfehérje egyes szakaszainak mechanikai tulajdonságait. A titinmolekulák az izomrost hossz tengelyével párhuzamosan helyezkednek el, és legfőbb szerepük az izom passzív rugalmasságának biztosítása. Rugószerű működésük szolgáltatja azt az erőt, amely az izom megnyújtását követően visszaállítja annak eredeti hosszát. Ennek megfelelően a titinmolekula mechanikai tulajdonságainak ismerete nélkülözhetetlen a molekula funkciójának megértése szempontjából.

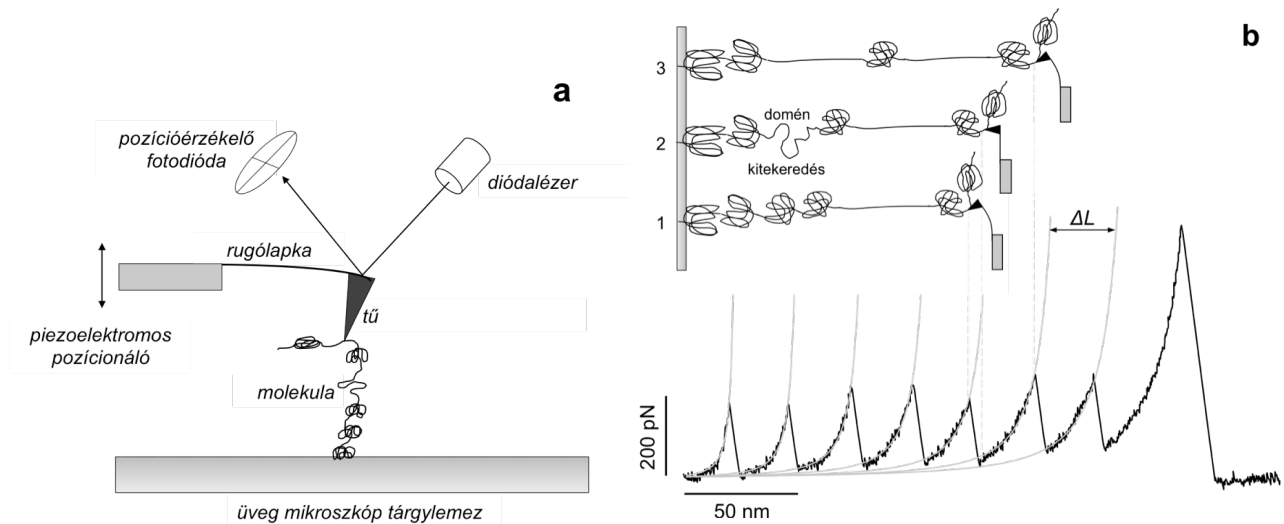
Differenciálisan expresszáldó immunglobulin domének vizsgálata

A titinmolekula tömegének mintegy 90%-át globuláris szerkezetű domének lineáris sorozata teszi ki. A domének az immunglobulin (Ig) illetve a fibronectin III típusú domének szupercsaládjába sorolhatók (**1. ábra**).



1. ábra. A titin moduláris felépítése.

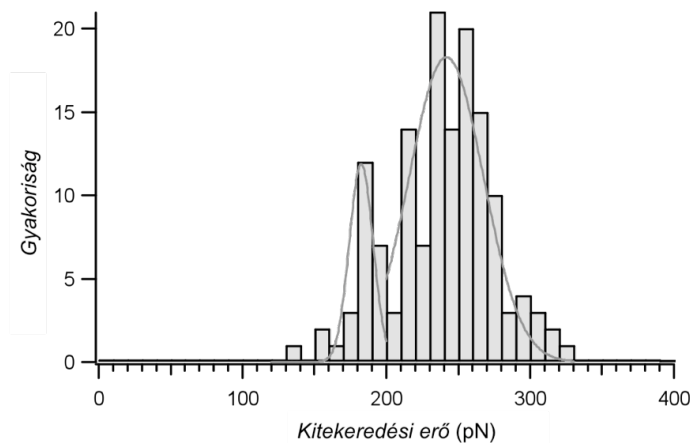
Munkánk során a titin megnyújtható, I-szakaszából, és azon belül a csak vázizomban kifejeződő, ún. differenciálisan expresszáldó régióból kiválasztott szakaszt állítottunk elő és vizsgáltunk meg. A nyolc, sorba kapcsolt, immunglobulin típusú doménből álló molekulaszakaszt (I55-62) bakteriális fehérjeexpressziós rendszerben termeltettük meg, majd egy egyedi molekulák mechanikai manipulációjára alkalmas atomerőmikroszkóp segítségével megnyújtottuk, hogy jellemezzük annak mechanikai tulajdonságait. A mérésekhez használt üveg fedőlemezek felszínét vákuum-gőzölés segítségével vékony arany réteggel vontuk be, hogy elősegítsük a molekulaszakasz egyik, két szomszédos ciszteint tartalmazó végének nagy erősségű kötődését a felszínhez (**2a. ábra**).



2. ábra. Titin domén oktamer mechanikai manipulációja atomerőmikroszkóppal. **a)** Kísérleti elrendezés. **b)** Az I55-62 domén oktamerre jellemző erő-megnyúlás görbe és a görbe egyes pontjaihoz tartozó állapotok.

A kitekeredési görbéken megfigyelt fűrészfog-szerű csúcsok megfelelnek az egyes domének kitekeredésének (**2b. ábra**). A vizsgált szakaszt alkotó domének mechanikai stabilitását azon erő segítségével jellemeztük, amelynél az egyes domének kitekerednek. A csúcsok felszálló ágait a féregszerű lánc (wormlike chain, WLC) polimermodelllel leíró egyenlettel illesztettük, amely alapján kiszámoltuk a domének kitekeredéséhez tartozó kontúrhossz növekményt. A kapott érték ($29,8 \pm 3,5$ nm) igazolja, hogy valóban az adott doméneket nyújtottuk meg.

Az I55-62 szakasz esetén, 500 nm/s húzási sebesség mellett mért kitekeredési erők átlaga 237 pN volt, az erők azonban viszonylag széles tartományban változtak (**3. ábra**). Az oktameren belül tehát valószínűleg egymástól eltérő stabilitású domének találhatók.



3. ábra. Az I55-62 domén oktamer kitekeredési erőinek eloszlása.

Korábban felvetették, hogy a titin differenciálisan expresszáldó doménjei mechanikailag kevésbé stabilak, így megnyújtás hatására előbb tekerednek ki, és ezáltal megóvják a konstitutívan expresszáldó doméneket a kitekeredéstől. Eredményeink azonban azt mutatják, hogy a titin differenciálisan expresszáldó szakaszát alkotó domének stabilitása széles tartományban változhat, és nem szisztematikusan alacsonyabb, mint a konstitutívan expresszáldó doméneké.

A fenti eredmények alapján egy nemzetközi folyóiratban publikált közlemény [1] és két konferencia-absztrakt jelent meg, amelyek közül az egyiket a szervezők előadásra jelölték ki.

A PEVK szakasz vizsgálata

A titin felépítésében részt vevő egyedi szekvenciák közül a legismertebb és funkcionális szempontból is legfontosabb a titin I-szakaszbeli részében található PEVK szegmens, amely nevét a több mint 70%-át kitevő prolin (P), glutaminsav (E), valin (V) és lizin (K) aminosavakról kapta. A szarkomer megfeszítése során a tandem Ig szegmensek megnyúlása mellett a PEVK megnyúlása járul hozzá legjelentősebb mértékben a passzív izomerő kialakításához [2].

Korábbi munkák alapján feltételezhető volt, hogy a PEVK régió ideális polimerláncként viselkedik, amely nem vagy alig rendelkezik másodlagos szerkezettel, rugalmassága pedig leírható a féregszerű lánc (wormlike chain, WLC) modellel [3,4]. PEVK peptideken végzett vizsgálatok azt is kimutatták, hogy azok rendelkeznek a rendezetlen fehérjék legtöbb jellemzőjével [5]. További eredmények ugyanakkor arra utaltak, hogy másodlagos szerkezeti elemek (II típusú poliprolin hélixek) jelen lehetnek a PEVK-n belül [6,7].

Hogy megvizsgáljuk, a PEVK szakasz valóban ideális polimerláncként viselkedik-e, a PEVK szakaszból kiválasztott két peptidet – egy 11 aminosav hosszúságú (WEEAYQEREVC, PEVK11) és egy 21 aminosav hosszúságú (WEEAYQEREVIQVQKEVYECC, and PEVK21) peptidet – állítottunk elő szilárdfázisú szintézis segítségével. A peptidek N-terminálisára egy triptofán aminosavat, C-terminálisára pedig egy IAEDANS fluorofórt kapcsoltunk, és fluoreszcencia spektroszkópia segítségével követtük a triptofán mint donor és az IAEDANS mint akceptor között lejátszódó fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfert (FRET). Meghatároztuk az energiáttranszfer hatásfokát (E), amelynek felhasználásával kiszámítottuk a donor és akceptor fluorofórok közötti távolságot:

$$R = \sqrt[6]{\frac{R_0^6}{E} - R_0^6},$$

ahol R_0 a Förster-féle kritikus távolság, amely mellett a transzfer hatásfoka 50% (a triptofán-IAEDANS pár esetén 2,2 nm).

Az ideális polimerek konformációját leíró féregszerű lánc (WLC) modell összefüggést teremt a polimer kontúrhossza (a kontúr mentén mért hossz, L), vég-vég távolsága (R) és perzisztenciahossza között (a hajlítási merevségét leíró mennyiség, amely felfogható, mint azon legrövidebb szakasz hossza, amely még merevnek tekinthető, P):

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

A vizsgált peptidek kontúrhosszát az aminosavak száma alapján számoltuk (L = aminosavak száma \times aminosavak távolsága (0,38 nm) + az IAEDANS molekula mérete (0,87 nm)). A vég-vég távolságot a FRET mérések alapján határoztuk meg, a látszólagos perzisztenciahosszakat pedig a fentebb megadott WLC egyenlet alapján.

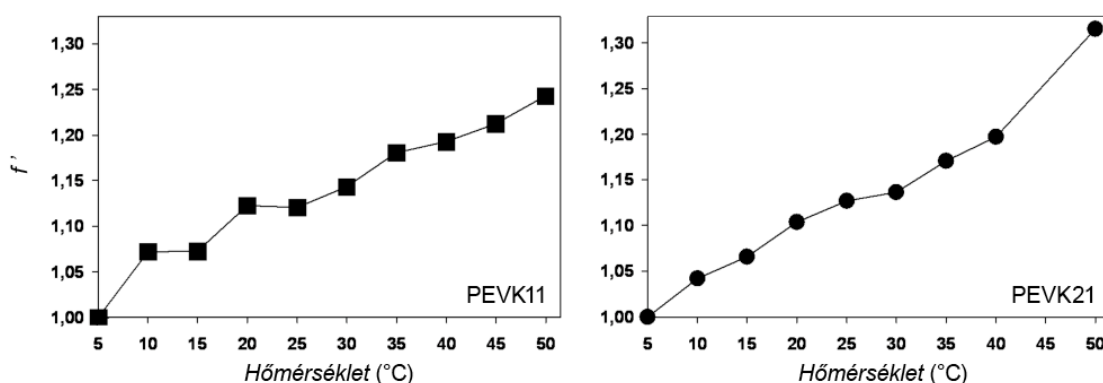
Natív körülmények között (20 °C és 0,2 M ionerő) az így meghatározott vég-vég távolság értékei 1,86 és 2,12 nm voltak a PEVK11 illetve PEVK21 peptidek esetén (számolt kontúrhosszaik 4,18 és 7,98 nm). Az ezen értékek alapján számolt látszólagos perzisztenciahosszak 0,41 illetve 0,28 nm-nek adódtak. Az általunk kapott értékek a korábbi, a PEVK szakaszon végzett vizsgálatokban kapott értékek tartományának alsó régiójában találhatóak (0,1-2,5 nm, [8,9,10]) és hasonlóak a teljesen kitekeredett polipeptidek esetén mért értékekhez (0,4-0,44 nm, [11,12,13]). A PEVK21 peptid esetén

kapott alacsonyabb érték arra utal, hogy adott hatások a látszólagos perzisztenciahossz csökkenését eredményezik. A két peptid esetén kapott, jelentősen különböző értékek azt jelzik, hogy alakjuk nem írható le a WLC modellel, tehát nem tekinthetők ideális polimerláncnak. A jelenség hátterében a perzisztenciahosszban a peptidek szekvenciája mentén megfigyelhető inhomogenitások, valamint a lánc egyes elemei között fennálló kölcsönhatások állhatnak, amelyeket az ideális polimermodell kizár.

Hogy bepillantást nyerjünk a PEVK szerkezeti dinamikájába, megvizsgáltuk a környezeti paraméterek hatását a peptidek konfigurációjára. A szerkezeti dinamika jellemzése érdekében kiszámoltuk az f' paramétert (a donor fluoreszcencia intenzitásával normált transzferhatásfok):

$$f' = \frac{E}{F_{DA}}$$

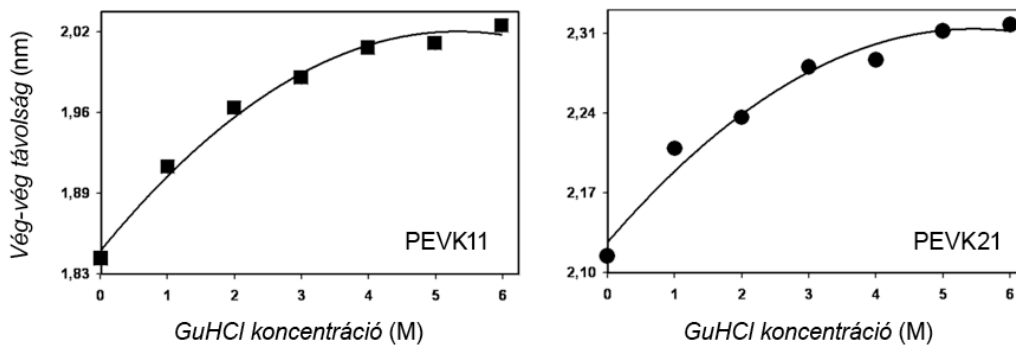
Az f' érték a donor és akceptor fluorofórok közötti fehérjematrix flexibilitását jellemzi [14]. A hőmérséklet 5-50 °C tartományban történő növelése mellett az f' paraméter mindkét peptid esetén monoton növekedést mutatott.



4. ábra. Hőmérséklet hatása a PEVK peptidek konformációs dinamikájára.

A növekedés valószínűleg a termikus fluktuációk amplitúdójának növekedésével magyarázható, ami a transzferhatásfokot, annak R^6 -tól való függése miatt abban az esetben is megváltoztatja, ha az átlagos donor-akceptor távolság változatlan marad [14]. Az f' növekedésének meredeksége a két peptid esetén azonos volt, ami arra utal, hogy a termikus fluktuációk is azonos mértékben növekedtek. A monoton változás azt jelzi, hogy konformációs átmenetek nem történtek, vagy csak nagyon kis mértékűek voltak.

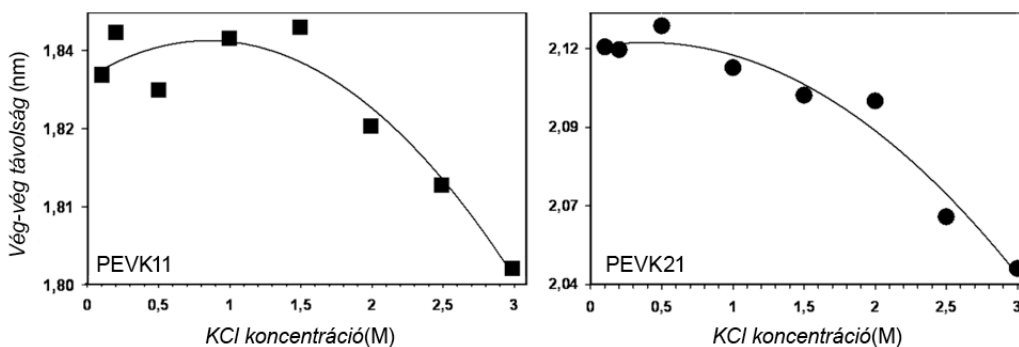
Hogy megvizsgáljuk, léteznek-e a peptideken belül olyan kölcsönhatások, amelyek kémiai denaturánsok segítségével befolyásolhatók, guanidin-hidroklorid növekvő koncentrációja mellett meghatároztuk a vég-vég távolságokat. A 0-6 M denaturáns koncentráció tartományban a vég-vég távolságok kis mértékben és fokozatosan megnöttek (1,86 nm-ről 2,02 nm-re a PEVK11 és 2,12 nm-ről 2,32 nm-re a PEVK21 peptid esetén).



5. ábra. Kémiai denaturáns hatása a PEVK peptidek vég-vég távolságára.

A mérést urea alkalmazásával megismételve, a fentiekhez hasonló eredményt kaptunk. A megfigyelések lehetséges magyarázata az, hogy a peptideken belül létezhetnek olyan kölcsönhatások, amelyek a vég-vég távolság csökkenését okozzák, és amelyek kémiai denaturánsok segítségével fokozatosan megszüntethetők.

Hasonló mérések segítségével az ionerősség hatását is megvizsgáltuk növekvő koncentrációjú KCl oldat alkalmazásával. Eredményeink alapján a növekvő ionerősség hatására a vég-vég távolság és a látszólagos perzisztenciahossz lecsökkent. A változások alacsonyabb ionerősség mellett kisebb, moláros nagyságrendű KCl koncentrációk esetén azonban nagyobb mértékűek voltak.



6. ábra. Ionerősség hatása a PEVK peptidek vég-vég távolságára.

A jelenség hátterében olyan, a peptid szegmensek között fennálló elektrosztatikus kölcsönhatások állhatnak, amelyek a peptidlánc kimerevedését okozhatják. A közeg ionerősségének növelésével az ionok leárnyékolhatják ezeket a kölcsönhatásokat, ami a vég-vég távolság csökkenéséhez vezethet. Ezek a megfigyelések összhangban vannak korábbi mérésekkel, amelyekben csökkenő ionerősség hatására miofibrillumok titin-alapú merevségének csökkenését [15], illetve humán fetális titin PEVK szakasz perzisztenciahosszának csökkenését mutatták ki [16].

Összefoglalva, eredményeink azt mutatják, hogy a titin PEVK szakasza valószínűleg nem tekinthető szerkezet nélküli, ideális polimerláncnak. A különböző hosszúságú peptidek perzisztenciahosszában megfigyelt különbség átmeneti másodlagos szerkezeti elemek illetve láncszegmensek közötti kölcsönhatások jelenlétét veti fel. Ezen kölcsönhatások valószínűleg elektrosztatikus természetűek, és – ahogy korábban azt már felvetették [15] – egy entalpiikus járulékot jelenthetnek a PEVK szakasznak a WLC modellen alapuló, kizárólag entropikus eredetű rugalmasságán felül. Míg megfigyeléseinket rövid peptideken tettük, a korábbi munkák szinte

kizárólag hosszabb PEVK szegmensek vagy miofibrillumokon történtek. Bár rövid peptideken az ionerő-függő változások kis mértékűek voltak, a teljes (vázizomban akár több mint 2000 aminosav hosszúságú) PEVK szakasz esetén ezen hatások elég jelentősek lehetnek ahhoz, hogy egy mechanizmust szolgáltatassanak a lokális rugalmasság finomhangolására az izomban.

A PEVK peptidekhez kapcsolódó eredményeket három konferencián poszter formájában mutattuk be, valamint folyamatban van egy kézirat elkészítése.

A titin kináz domén vizsgálata

A titinnel kapcsolatos kutatásokban az utóbbi évek fordulatot hoztak, mivel a titin rugalmasságát meghatározó I-szakaszbeli elemek vizsgálata helyett a titin egyedi szekvenciáinak vizsgálata került előtérbe. Ezek az elemek a rugalmasság meghatározásában, valamint a mechanikai erő érzékelésében tölthetnek be fontos szerepet [17,18,19]. Két speciális elem, amelyeknek jelentőséget tulajdonítottak ebből a szempontból, a titin C-terminálisához közel található kináz domén, valamint a titin N-terminálisán található, annak Z-lemezhez történő horgonyzásában fontos Z1 és Z2 domének.

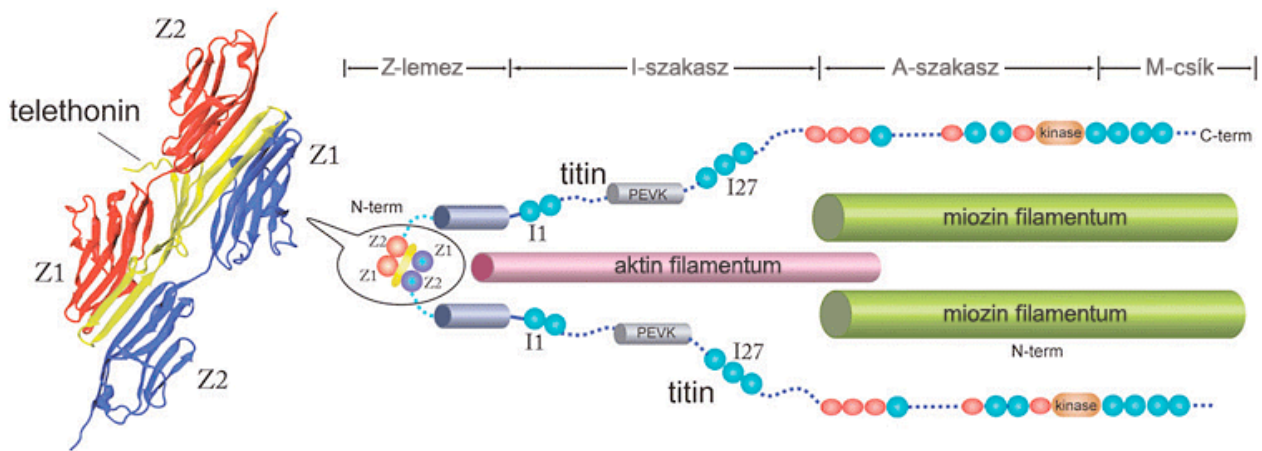
További vizsgálataink tárgyául a fenti titin szakaszokat választottuk (**1. ábra**). Célul tűztük ki a titin kináz doménjének expresszióját, mechanikai tulajdonságainak vizsgálatát, valamint az ATP kötődés és hidrolízis követését a kináz domén mechanikai manipulációja során. A 2006-os évben csoportunk sikerrel fejlesztett ki egy módszert, amely segítségével megvalósítható biomolekulák egyidejű mechanikai és fluoreszcens vizsgálata [20]. A módszer alapja egy atomerőmikroszkóp és egy evaneszcens mező mikroszkóp ötvözése, amelyen belül a két vizsgálati technika térbeli és időbeli szinkronizációja is megoldott. Célunk volt az evaneszcens mező mikroszkóp használata fluoreszcens ATP analóg kötődésének és disszociációjának detektálására, miközben a kináz domént az atomerőmikroszkóp segítségével ellenőrzött mechanikai feszültségnek tesszük ki.

A titin kináz domént az előtte és utána található két-két immunglobulin doménnel együtt (hogy azok fogantyúkként megkönnyítsék a kináz két végének megragadását) a rendelkezésre álló humán soleus izom cDNS könyvtárból klónoztuk és beillesztettük egy bakteriális expressziós vektorba (pET28a). Bár a baktériumokban kimutatható volt az expresszált fehérje, annak kinyerése és tisztítása több különböző stratégia alkalmazásával sem sikerült megfelelő mértékben. A továbbiakban elkezdtek a fehérje expressziójának előkészítését egy baculovírus expressziós rendszerben. Időközben, 2008 nyarán Mathias Gautel munkacsoportja publikálta az általuk a titin kinázon végzett méréseket, amelyek során kimutatták, hogy a molekula mechanikai megfeszítése még a kináz domén kitekeredése előtt aktiválja az ATP kötést, így a kináz mechanikai erőszenzorként működhet [21]. A titin kinázhoz kapcsolódó kísérleteket ezt követően felfüggesztettük.

A Z1Z2-telethonin komplex vizsgálata

A titin Z-lemezhez való horgonyzásáért a titin N-terminálisán található két Ig-domén (Z1 és Z2), valamint a Z-lemezben található telethonin fehérje által alkotott komplex a felelős, amelyben a telethonin a Z1Z2 doméneken keresztül keresztköt két titinmolekulát (**7. ábra**). A Z1Z2-telethonin komplexben a komponensek egy palindrom-szerű elrendeződésben 2:1 arányú antiparallel szendvicset képeznek [22]. Horgony-funkciója miatt a komplexnek feltehetően nagy mechanikai stabilitással kell rendelkeznie. Bár molekuláris dinamikai szimulációkban a komplex

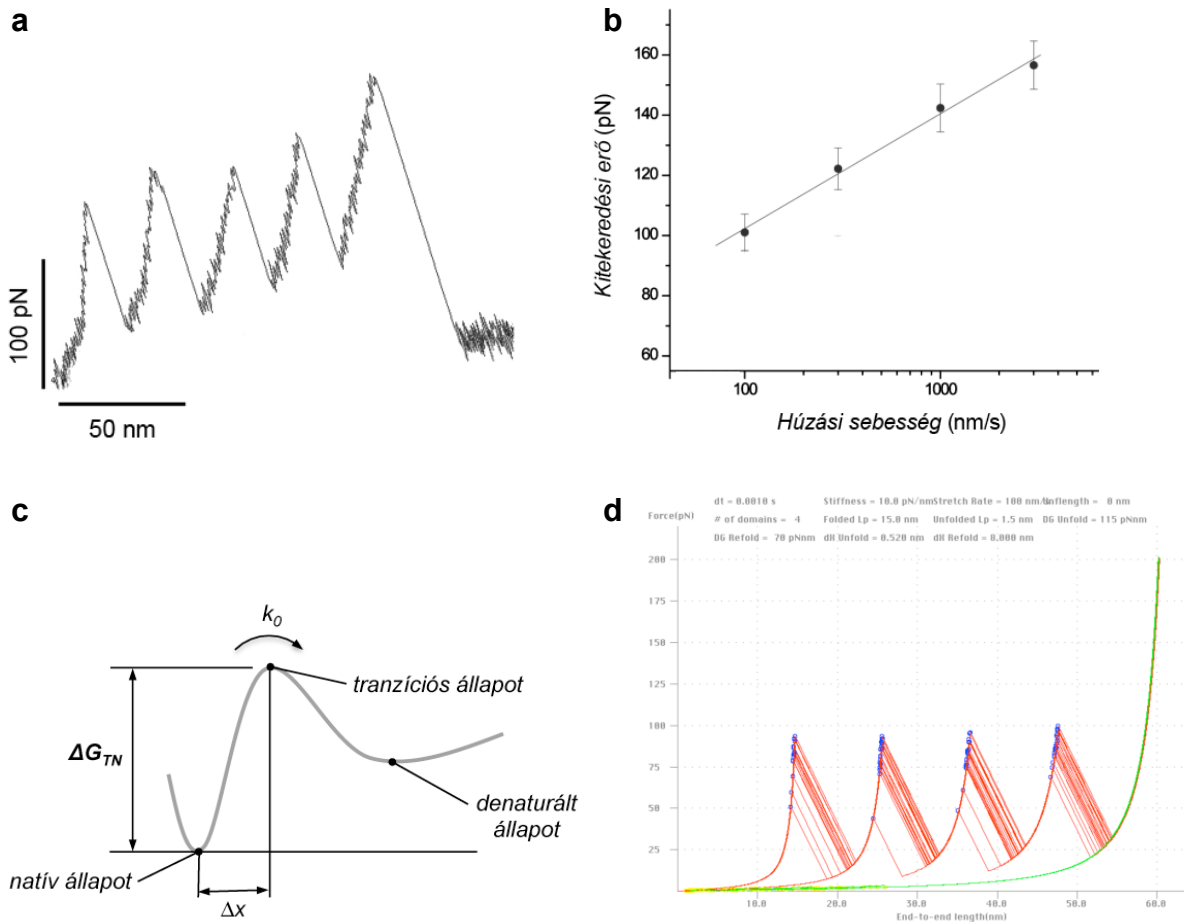
disszociációjához szükséges erők igen jelentősnek adódtak (>1000 pN), az erők nagyságáról kísérletes adatok nem álltak rendelkezésre. A szimuláció során kapott szokatlanul nagy erők ezen felül az atomerőmikroszkóp esetén alkalmazottnál több nagyságrenddel nagyobb húzási sebességek esetére vonatkoztak.



7. ábra. A Z1Z2-telethonin komplex elhelyezkedése az izom szarkomerben.

Célunk ezért a Z1Z2-telethonin komplex létrehozása, valamint mechanikai stabilitásának vizsgálata volt. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy milyen nagyságú erők mellett tekerednek ki önmagukban a Z1 és Z2 domének, amelyeket nem stabilizál a telethonin. A Z1Z2 szekvenciáját humán soleus cDNS könyvtárból erősítettük ki, majd pET28a expressziós vektorba illesztettük be. A telethonin pETM11 vektorban állt rendelkezésünkre. BL21 *E. coli* sejtekben mindkét fehérjét sikerrel expresszáltuk és tisztítottuk. A klónozás során mindkét fehérje N-terminálisára egy hexahisztidin tag-et, a Z1Z2 C-terminálisára pedig két vicinális cisztein aminosavat illesztettünk. Az így kapott végek a fehérjék tisztításában kaptak szerepet, valamint alkalmasak specifikus kötések létrehozására a mechanikai manipulációs vizsgálatok során. Mivel a telethonin önmagában nem rendelkezik stabil szerkezettel, és aggregátumokat képez, a komplexet a denaturált komponensek lassú renaturációjával hoztuk létre. A komplex kialakulását kromatográfiával kombinált proteázhasítással illetve atomerőmikroszkópos topográfiai képalkotás segítségével igazoltuk.

A Z1Z2 szakasz mechanikai stabilitásának vizsgálata során, mivel a két domén hosszúságú szakasz viszonylag rövid, és aránylag kevés sikeres, specifikusan az N- és C-terminális végeknél fogva történő megnyújtást tesz lehetővé, a C-terminális cisztein aminosavak felhasználásával négy domén hosszúságú Z1Z2 dimert képeztünk, redukáló környezetet használva a ciszteinek közötti diszulfid hidak létrehozására. A konstrukció atomerőmikroszkóppal történő mechanikai denaturációja során rögzített görbéken megfigyelhetők voltak a domének kitekeredésére jellemző fűrészfog-szerű csúcsok (8a. ábra), amelyek alapján meghatároztuk a kitekeredési eseményekhez tartozó erőt és kontúrhossz-növekményt. Utóbbi ($29,3 \pm 2,4$ nm) közelítőleg azonos volt a domének aminosav sorrendjéből adódó, elméletileg várt értékekkel (32-34 nm), amit felhasználhattunk annak igazolására, hogy valóban a Z1Z2 doméneket nyújtottuk meg. Az 500 nm/s húzási sebesség mellett megfigyelt kitekeredési erő 122 ± 7 pN értékű volt.



8. ábra. **a)** A Z1Z2 dimerek esetén atomerőmikroszkóppal mért erő-megnyúlás görbék. **b)** A Z1Z2 domének kitekeredési erőinek húzási sebességtől való függése. **c)** A kitekeredést kétállapotú modellben leíró energiaprofil. **d)** Példa Monte-Carlo szimuláció során kapott erő-megnyúlás görbékre.

A kitekeredés energiaprofil jellemzése érdekében dinamikus erőspektroszkópiát végeztünk, azaz erő-megnyúlás görbéket gyűjtöttünk különböző húzási sebességek esetén, a 100-3000 nm/s tartományban. A görbék alapján meghatározott kitekeredési erők a húzási sebesség logaritmusában ábrázolva egy egyenessel voltak illeszthetők (**8b. ábra**). A függés arra utal, hogy a Z1Z2 domének kitekeredése leírható egy kétállapotú rendszerrel, amelynek energiaprofilját a **8c. ábra** szemlélteti. Ebben az esetben a kitekeredési erő terhelési sebességtől (r) való függését az

$$F = \frac{kT}{\Delta x} \ln \left(\frac{r \Delta x}{kT \cdot k_0} \right)$$

képlet írja le, ahol k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet, Δx a natív állapot távolsága a tranzíciós állapottól, vagyis az a távolság, amellyel megnövelve az adott domén vég-vég távolságát, az átbillen az átmeneti állapoton és kitekeredik. k_0 a nulla erő mellett mért kitekeredési sebesség, amely közvetlen összefüggésben van a natív és tranzíciós állapot közötti szabadenergia különbséggel (ΔG_{TN}). A terhelési sebességet (időegységre eső erőnövekedés) a kitekeredési görbéknek a csúcspontban mért meredekségeként határoztuk meg. A fenti képlet alapján ezután illesztéssel meghatároztuk a kitekeredési energiaprofil paramétereit. Δx ily módon meghatározott értéke 0,52 nm, k_0 értéke pedig 0,0008 1/s volt.

Az így kapott paraméterekkel kétállapotú rendszert feltételezve, Monte-Carlo szimulációkat végeztünk (**8d. ábra**) [23]. A szimulációk során a különböző húzási sebességek esetén kapott kitekeredési erők a hibahatáron belül jól visszaadták a mérés során (**8b. ábra**) kapott eredményeket.

A Z1Z2 domének esetén mért kitekeredési erők alacsonyabbak, mint más, korábban vizsgált immunglobulin típusú domének esetén mért értékek, ami arra utal, hogy a Z1Z2-teletonin komplex stabilizálásában a Z1Z2 domének önmagukban nem jelentősek. A komplex stabilitásában valószínűleg a Z1Z2 teletoninnal alkotott kötési játszanak lényeges szerepet, amelyeken keresztül a fehérjék egymás stabilitását növelik.

A Z1Z2 domének vizsgálata során kapott eredményeinket egy kéziratban terveztük összefoglalni. Még dolgoztunk a kéziraton, amikor megjelent Matthias Rief munkacsoportjának egy publikációja [24] amelyben leírták a Z1Z2-teletonin komplex mechanikai stabilitásával kapcsolatos eredményeiket. Ennek keretében a Z1Z2 domének stabilitását teletonin hiányában is megvizsgálták, azok kitekeredési erőire $1 \mu\text{m/s}$ húzási sebesség mellett a $168 \pm 2 \text{ pN}$ értéket kapták. Ez az érték kis mértékben eltér, de összemérhető az általunk kapott, $142 \pm 8 \text{ pN}$ -os értékkel.

A Z1Z2 domének vizsgálatához kapcsolódó eredményeket két konferencián poszter formájában mutattuk be. Jelenleg, a Rief munkacsoport cikkének megjelenése miatt célunk mérési eredményeinket kibővíteni, hogy azokat közlemény formájában publikálhassuk.

Irodalomjegyzék

1. Grama L, Nagy A, Scholl C, Huber T, Kellermayer M (2005) Local Variability in the Mechanics of Titin's Tandem Ig Segments. *Croatia Chemical Acta* 78(3): 405-411.
2. Linke WA, Rudy DE, Centner T, Gautel M, Witt C, et al. (1999) I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *The Journal of Cell Biology*. pp. 631-644.
3. Labeit S, Kolmerer B, Linke WA (1997) The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circulation Research*. pp. 290-294.
4. Linke WA, Ivemeyer M, Mundel P, Stockmeier MR, Kolmerer B (1998) Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*. pp. 8052-8057.
5. Duan Y, DeKeyser JG, Damodaran S, Greaser ML (2006) Studies on titin PEVK peptides and their interaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. pp. 16-25.
6. Ma K, Kan L, Wang K (2001) Polyproline II helix is a key structural motif of the elastic PEVK segment of titin. *Biochemistry*. pp. 3427-3438.
7. Ma K, Wang K (2003) Malleable conformation of the elastic PEVK segment of titin: non-cooperative interconversion of polyproline II helix, beta-turn and unordered structures. *Biochem J*. pp. 687-695.
8. Li H, Oberhauser AF, Redick SD, Carrion-Vazquez M, Erickson HP, et al. (2001) Multiple conformations of PEVK proteins detected by single-molecule techniques. *Proc Natl Acad Sci USA*. pp. 10682-10686.
9. Nagy A (2005) Hierarchical Extensibility in the PEVK Domain of Skeletal-Muscle Titin. *Biophysical Journal*. pp. 329-336.
10. Watanabe K (2002) Molecular Mechanics of Cardiac Titin's PEVK and N2B Spring Elements. *Journal of Biological Chemistry*. pp. 11549-11558.

11. Buscaglia M, Lapidus LJ, Eaton WA, Hofrichter J (2006) Effects of denaturants on the dynamics of loop formation in polypeptides. *Biophys J* 91: 276-288.
12. Oberhauser AF, Marszalek PE, Erickson HP, Fernandez JM (1998) The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* 393: 181-185.
13. Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE (1997) Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276: 1109-1112.
14. Somogyi B, Matko J, Papp S, Hevessy J, Welch GR, et al. (1984) Forster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix. *Biochemistry* 23: 3403-3411.
15. 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.
16. Forbes JG, Jin AJ, Ma K, Gutierrez-Cruz G, Tsai WL, et al. (2005) Titin PEVK segment: charge-driven elasticity of the open and flexible polyampholyte. *J Muscle Res Cell Motil* 26: 291-301.
17. LeWinter MM, Wu Y, Labeit S, Granzier H (2007) Cardiac titin: structure, functions and role in disease. *Clin Chim Acta*. pp. 1-9.
18. Linke WA (2008) Sense and stretchability: the role of titin and titin-associated proteins in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction. *Cardiovascular Research*. pp. 637-648.
19. Miller M (2004) The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends in Cell Biology*. pp. 119-126.
20. Kellermayer MSZ, Karsai A, Kengyel A, Nagy A, Bianco P, et al. (2006) Spatially and temporally synchronized atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for imaging and manipulating cells and biomolecules. *Biophysical Journal*. pp. 2665-2677.
21. Puchner EM, Alexandrovich A, Kho AL, Hensen U, Schäfer LV, et al. (2008) Mechanoenzymatics of titin kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. pp. 13385-13390.
22. Zou P, Pinotsis N, Lange S, Song Y-H, Popov A, et al. (2006) Palindromic assembly of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature*. pp. 229-233.
23. Rief M, Fernandez J, Gaub H (1998) Elastically coupled two-level systems as a model for biopolymer extensibility. *Phys Rev Lett*. pp. 4764-4767.
24. Bertz M, Wilmanns M, Rief M (2009) The titin-telethonin complex is a directed, superstable molecular bond in the muscle Z-disk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13307-13310.