

A dezmin nanomechanikai vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Kiss Balázs

Semmelweis Egyetem

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kellermayer Miklós egyetemi tanár, az orvostudományok doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Róbert tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Prohászka Zoltán tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA tagja
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Buday László egyetemi tanár, Ph.D.
Dr. Kovács Mihály tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2012

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	7
1.1. A citoszkeleton	7
1.2. Az intermedier filamentumok osztályozása	7
1.3. Az intermedier filamentumok biokémiája	9
1.3.1. Oldhatóság	9
1.3.2. Monomer alegységek szerkezete	9
1.3.3. Az IF-ek polimerizációja	10
1.4. A biopolimerek molekuláris mechanikája	13
1.5. Biopolimerek vizsgálata atomerőmikroszkóppal	16
1.6. A dezmin molekuláris mechanikája.....	21
1.7. A dezminnel kapcsolatos betegségek	21
2. Célkitűzések	23
3. Anyagok és módszerek	25
3.1. Dezmin izolálása.....	25
3.2. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE).....	26
3.3. Immunoblot.....	26
3.4. Dezmin polimerizálása	26
3.5. Dezmin polimerizációs kinetikájának vizsgálata.....	27
3.6. Dezmin pásztázása és nyújtása AFM / MFP-vel	28
3.7. <i>In situ</i> AFM.....	28
3.8. Dezmin filamentumok szétbontása kémiai úton	29
3.9. Elektronmikroszkópia	30
3.10. Képanalízis	30
4. Eredmények	33
4.1. Dezmin izolálása.....	33
4.2. Immunoblot.....	34
4.3. A dezmin polimerizációja	35
4.4. Dezmin filamentumok morfológiája AFM-mel.....	36

4.5.	A dezmin rugalmas erőválaszának mérése	37
4.5.1.	Csúcsok a nyújtás kezdetén	39
4.5.2.	Erőplatók analízise	40
4.5.3.	A platókra szuperponálódó csúcsok elemzése.....	41
4.5.4.	Nemlineáris rugalmasság a nyújtás során.....	42
4.6.	<i>In situ</i> AFM egyedi filamentumokon.....	44
4.7.	Perzisztenciahossz a geometriai orientáció-eloszlás alapján	45
4.8.	Dezmin filamentumok kémiai szétszerelése.....	46
4.8.1.	EGTA-kezelésre megjelenő fibrilláris struktúrák morfológiája.....	47
4.8.2.	Fibrillumok rugalmassága a geometriai orientáció-eloszlás alapján.....	49
4.9.	Elektronmikroszkópia a filamentumokon és fibrillumokon	50
5.	Megbeszélés	51
5.1.	Dezmin izolálása és polimerizációja.....	51
5.2.	Dezmin morfológiája atomerőmikroszkóppal vizsgálva	51
5.3.	Dezmin filamentumok nanomechanikája	53
5.3.1.	Csúcsok a dezmin nyújtásának kezdetén.....	53
5.3.2.	Erőplatók és a platókra szuperponálódó csúcsok	53
5.3.3.	Fűrészfog, illetve nemlineáris rugalmasság	54
5.3.4.	Foszfátkezelés hatása a dezmin rugalmasságára	56
5.3.5.	<i>In situ</i> AFM	56
5.4.	Perzisztenciahossz a geometriai orientáció alapján	56
5.5.	Dezmin filamentumok kémiai szétbontása	57
5.5.1.	EGTA-kezelésre megjelenő fibrilláris struktúrák morfológiája.....	58
5.5.2.	Protofibrillumok rugalmassága az orientáció-eloszlás alapján	59
6.	Következtetések	61
6.1.	A dezmin rugalmas erőválaszai	61
6.2.	A dezmin disszociációja protofibrillumokra.....	62
6.3.	Új tudományos eredmények	64
7.	Összefoglalás	65
8.	Irodalomjegyzék	66
9.	Saját publikációk jegyzéke	74
10.	Köszönetnyilvánítás.....	75

11. Mellékletek	76
A dezmin izolálása során felhasznált oldatok	76
Az SDS-PAGE során felhasznált oldatok	76
A dezmin polimerizációjához és hígításához felhasznált oldatok.....	77

Rövidítések jegyzéke

AFM	Atomic Force Microscope = Atomerő Mikroszkóp
APS	Ammóniumperszulfát
APTES	3-amino-propil-trietoxi-szilán
ATP	Adenozin trifoszfát
BSA	Bovine Serum Albumin = borjú szérum albumin
cdc2	Ciklin Dependens Kináz 2
DAB	Diaminobenzidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EGTA	Etilén glikol bisz (2-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraecetsav
FJC	Freely Jointed Chain = szabadon, súrlódásmentes pántokkal összekapcsolt lánc
FWHM	Full Width at Half Maximum = félértékszélesség, egy szimmetrikus keresztmetszetű objektum félmaximális magasságánál mérhető szélessége
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein = glia-savas fehérje
GTP	Guanozin trifoszfát
IF	Intermedier Filamentum
IFAP	Intermediate Filament-Associated Protein = Intermedier Filamentum Asszociált Fehérje
Da	Dalton = atomi tömegegység, $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
MF	Mikrofilamentum
MFP	Molecular Force Probe = Molekuláris Erő Szonda
MT	Mikrotubulus
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis = poliakrilamid gélelektroforézis
SD	Standard Deviáció = szórás az adott mintán belül
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = nátrium-dodecil-szulfát
SEM	Scanning Electron Microscope = Pásztázó Elektronmikroszkóp
STM	Scanning Tunneling Microscope = Pásztázó Alagútmikroszkóp
TBS	Tris-Buffered Saline = Trisz-acetáttal puffereelt sóoldat
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletiléndiamin

Tris	trisz-hidroximetil aminometán
ULF	Unit-Length Filament = 60 nm egységnyi hosszúságú, 10 nm átmérőjű dezmin polimerizációs intermedier
WLC	Wormlike Chain = féregszerű lánc

1. Bevezetés

1.1. A citoskeleton

A dezmin az eukariota sejtek sejtvázában, a citoskeletonnak az izomszövetben előforduló egyik fontos struktúrfehérjéje. Az állati eredetű sejtek a növényi sejtekkel ellentétben sejtfallal nem rendelkeznek, de ezekben a sejtekben is biztosítani kell a biológiai mozgásformákhoz nélkülözhetetlen mechanikai stabilitást. Az önálló, autonóm mozgáshoz mindenképp szükséges a szöveti integráció és a mechanikai behatásokkal, stresszel szembeni ellenállás biztosítása. A szöveti integráció a különböző sejt-sejt kapcsolatok szintjén valósulhat meg, ezek: *dezmoszómák*, *adherens kapcsolatok*, *részerű kapcsolatok* (gap junctions), illetve *szoros kapcsolatok* (tight junctions). Ezek a kapcsolóelemeken keresztül garantálható a szövetek nagyfokú ellenállása, illetve ezzel egyidejűleg nagyfokú rugalmassága, mely a különálló sejteket dinamikus és funkcionális élő egységbe szervezi. Az eukariota sejtek dinamikus vázrendszere, a citoskeleton képezi a sejten belüli összekötő hálózatot a fent említett kapcsolóelemek között, jelentékenyen hozzájárulva ezzel a sejtek mechanikai csatolásához, a sejtek közötti és sejten belüli jelátvitelhez (Pollock és mtsai, 1985; Schultheiss és mtsai, 1991; Sjuve és mtsai, 1998; Szeberényi, 1999; Sam és mtsai, 2000). Az eukariota citoskeletont a három fő filamentális rendszer alkotja, ezek: 1) *vékony (aktin) filamentumok* (mikrofilamentumok, $d \sim 7$ nm), 2) *intermedier filamentumok* (IF, $d \sim 10$ nm), 3) *mikrotubulusok* ($d \sim 25$ nm) (Lazarides, 1980). A három rendszer közül a vékony filamentumok a kontraktilitásban, a mikrotubulusok a különböző vezikuláris transzportfolyamatokban játszanak jelentős szerepet, az IF-ek pedig vélhetően a sejtek mechanikai stabilizálásában, valamint bizonyos jelátviteli folyamatokban vállalnak szerepet.

1.2. Az intermedier filamentumok osztályozása

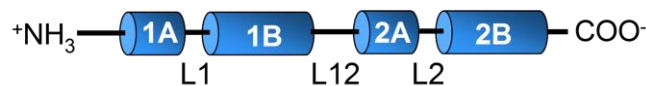
Emberben az IF-eket legalább 65 különböző gén kódolja, melyek nagyrészt szövetspecifikusan expresszálódnak. A nagyszámú fehérje génjében csak mérsékelt

hasonlóság mutatható ki, ez nagy különbség a másik két filamentális rendszer alkotóival szemben. Ennek megfelelően pl. az aktin és tubulin fehérjék alegységében bekövetkező mutációk jóval kevésbé tolerálhatóak az élő szervezet számára, mint valamelyik IF fehérjében megjelenő mutáció. Valamennyi fő fehérjecsoportot külön gén kódol, az egyes csoportok között 23-25 %-os az aminosav-szekvencia homológia (Bershadsky és Vasiliev 1988). Az intermedier filamentumokat kódoló gének szekvencia hasonlósága alapján 5 különböző, úgynevezett szekvencia-homológia osztály (sequence homology class, SHC) különíthető el: 1) *savas keratinok*, 2) *bázikus keratinok*, 3) *vimentin-szerű fehérjék* (vimentin, **dezmin**, glia-savas fehérje = glial fibrillary acidic protein, GFAP), 4) *neurofilamentumok*, 5) *laminok* (Fuchs és mtsai, 1994). A laminok a sejtmaghártya (azon belül a maghártya belső oldalán a lamina nuclearis) felépítésében játszanak jelentős szerepet, az intermedier filamentumok közül csak ezek rendelkeznek ún. sejtmag-lokalizációs szignálszekvenciával (nuclear localisation signal = NLS), ezzel biztosítva a sejtmagba jutásukat. A többi IF a citoplazmáris citoszkeleton felépítésében szövetspecifikusan vesz részt. A **dezmin** a harántcsíkolt izomban a Z-lemezek körül alkot komplexet, míg simaizomban a kompakt szerkezetű, ún. „dense body”-val képez asszociátumot, s ezen keresztül a kontraktilis elemeket csatolja a sejthártyához. A citoplazmatikus IF-ok kiemelkedően fontosak a sejt alakjának stabilizálásában, amelyet Goldman és mtsai 1996-ban a vimentin filamentum-hálózat peptidekkel történő degradálásával is bizonyított. A *keratinok* egy része szaruképződményeket (haj, köröm) alkot, a *citokeratinok* az epiteliális sejtek citoszkeletonjának alkotói. A *vimentin* a kötőszöveti és simaizomsejtek, a *GFAP* az asztroglia sejtek intermedier filamentuma a központi idegrendszerben. A *neurofilamentumok* alcsoportjába három eltérő molekulásúlyú fehérje tartozik, ezek a neuronokban vannak jelen (Szeberényi, 1999). Az 53 kDa molekulásúlyú **dezmin** a legtöbb izomféleségben megtalálható, kivéve bizonyos nagyerek simaizomfalát, ahol a vimentin a fő intermedier filamentum. Kiemelendő, hogy az IF-ok szöveti kifejeződése meglehetősen összetett szabályozás alatt áll, és az embryogenezis, illetve szöveti differenciáció során párhuzamosan többféle filamentum is jelen lehet egyazon szövetféleségben. Megfigyelhető időfüggő expressziós mintázat is, pl. az izomsejtek prekursorai kezdetben vimentint expresszálnak, a dezmin kifejeződése csak az embrionális fejlődés későbbi szakaszában jelenik meg (Yu-Shien Ko és mtsai, 2001).

1.3. Az intermedier filamentumok biokémiája

1.3.1. Oldhatóság

Az IF-ekre jellemző egyik legfőbb sajátosság a fiziológias ionerősségek és pH melletti oldhatatlanság. Szerkezetük meglehetősen ellenálló nagy ionerősségű extrakciós puffereknek, illetve nemionons detergensnek. Oldatba vitelükhöz drasztikus denaturáló körülményekre van szükség (pl. 8 M urea, vagy 3 M guanidin-hidroklorid) (Geisler és mtsai, 1980). A keratinok szerkezetének stabilizálásában diszulfidhidak is szerepet játszanak (Fudge és mtsai, 2004). A fehérjék ellenben oldatba



1. ábra: Egy IF monomer sémásan.

vihetők alacsony ionerősségek (10 mM Tris vagy imidazol) és magas pH ($\text{pH} > 8,5$) mellett.

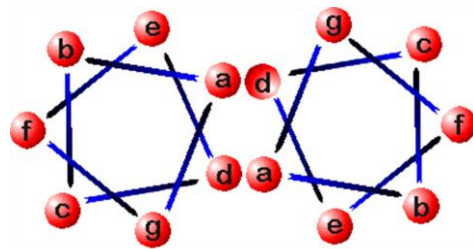
1.3.2. Monomer alegységek szerkezete

A monomer fehérje valamennyi IF alcsoportnál pálcika alakú, melynek központi részét négy darab α -helikális domén alkotja, ezek jelölése: 1A, 1B, 2A, 2B (1. ábra). Az α -helikális doméneket nem helikális szekvenciák kapcsolják össze (ezek jelölése: L1, L12, L2). A 2B helikális doménen belül található egy 3 aminosavból álló, a szekvenciát, és ezzel az alfa-helikális szerkezetet megtörő elem („stutter”), mely elengedhetetlen valamennyi intermedier filamentum normál szöveti funkciójához. A központi domének szekvenciája jóval nagyobb fokú homológiát mutat, mint az N- és C-terminálisok. A molekula központi része nagyjából 310 aminosavból áll, ennek jelentős része (vimentinnél 116) töltéssel rendelkező aminosav, a központi lánc nettó töltése negatív (savas karakterű oldalláncok vannak túlsúlyban). A központi lánc α -helikális doménjeinél sajátos szekvencia ismétlődés figyelhető meg: 7 aminosav alkot egy szerkezeti egységet, azaz az α -helikális doménen a következőképp írhatók le:

(abcdefg)_n. A jellegzetes ismétlődés (heptád-ismétlődés = heptade repeat) *a* és *d* pozíciójában rendszerint apoláris aminosav található (Leu, Ile, Met, Val). Ez az ismétlődés a filamentum „csavart csavar”, más néven „coiled-coil” dimer szerkezetének kialakításában alapvető fontosságú. A filamentum csoportspecifikus N terminális doménjei fontos szerepet játszanak a polimerizációs intermedierek további összekapcsolódásában, a C terminális pedig a különböző fehérje-fehérje interakciókban alapvető fontosságú. A laminokban az 1B szegment 42 aminosavval hosszabb (6 heptád), illetve a C terminálison elhelyezkedő immunglobulin-szerű doménjével specifikus sejtmag-fehérjékkel léphet kölcsönhatásba.

1.3.3. Az IF-ek polimerizációja

Az IF-ekre spontán, ATP-t, GTP-t nem igénylő polimerizáció jellemző, amely már alacsony ionerősségű (Na⁺, illetve Mg²⁺ koncentráció < 0,01 M) közegben is létrejön. Az IF polimerizáció tehát közvetlenül nem kofaktorfüggő, viszont *in vivo* újdonszülődésükhöz és mechanikai behatást felfogó hatásuk kifejtéséhez számos szabályozófehérje megfelelő hatása szükséges.



2. ábra: A coiled-coil szerkezet keresztmetszeti képe.

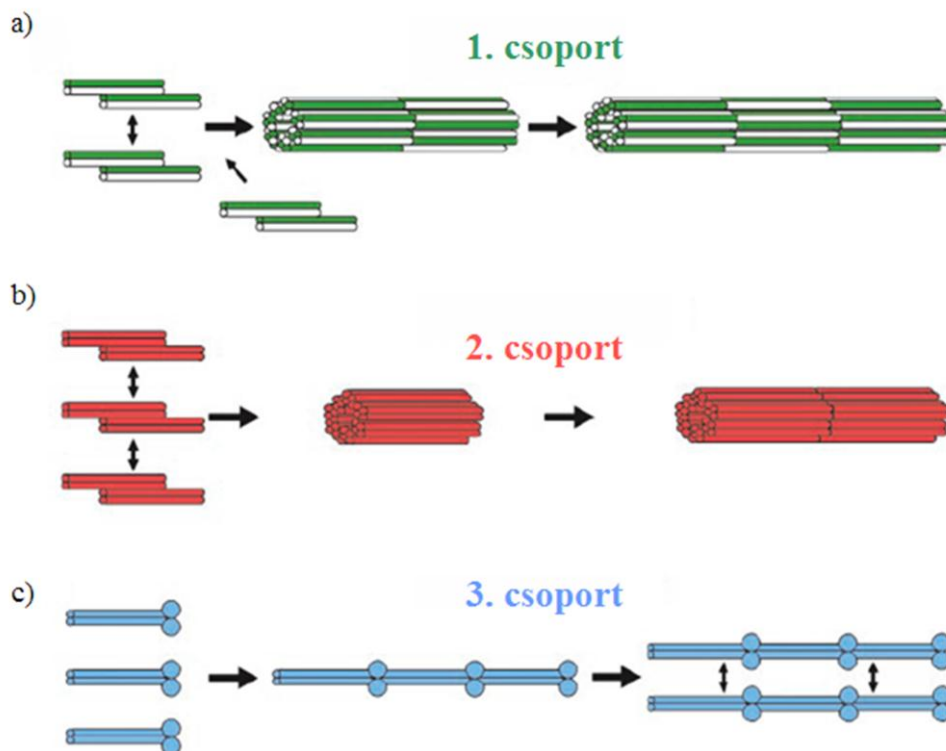
<http://cis.poly.edu/~jps/coilcoil.html>

Az IF-ek három különböző polimerizációs csoportot alkotnak, azonban a kezdeti folyamat valamennyi csoportban azonos: a polimerizáció első lépéseként két parallel monomer alakít ki egymással oldalirányú másodlagos hidrofób kötést, melynek létrejöttében a négy központi α -helikális domén (1A, 1B, 2A, 2B, 1. ábra) játszik szerepet a heptád-motívumok apoláris oldalláncaival (**2. ábra:** egymás felé néző „a” és „d” helyek).

A már korábban említett apoláris aminosavak oldallánca a fehérje térszerkezetéből adódóan a peptidlánc ugyanazon oldalára esik, így lehetővé teszi, hogy két egymás mellett levő, parallel molekula egymás körül elcsavarodjon, s így alakul ki az apoláris kötésekkel stabilizált 48 nm hosszú „csavart csavar”, más néven „coiled-coil” dimer (Bershadsky és Vasiliev, 1988). A heptád szerkezet kialakításában részt vevő poláris aminosavak (2. ábra: e és g helyek) oldalláncai a további polimer szerkezetek

kialakítását segítik elektrosztatikus kölcsönhatásokkal. A további polimerizációs lépések az egyes polimerizációs csoportokban eltérően zajlanak (**3. ábra**).

1. csoport: keratinok: A keratinok esetében a polimerizáció első lépéseként kialakuló dimer minden esetben heterodimer, azaz egy savas (SHC I) és bázikus (SHC II) karakterű keratin alkotja (3. ábra a; a zöld és fehér színek a savas és bázikus keratinokra utalnak). 2 antiparallel dimer átlapolódva (15 nm eltolódással) tetramert formál. A tetramerek ionos kölcsönhatásokkal oldalirányban, valamint hosszanti



3. ábra: IF polimerizációs csoportok.

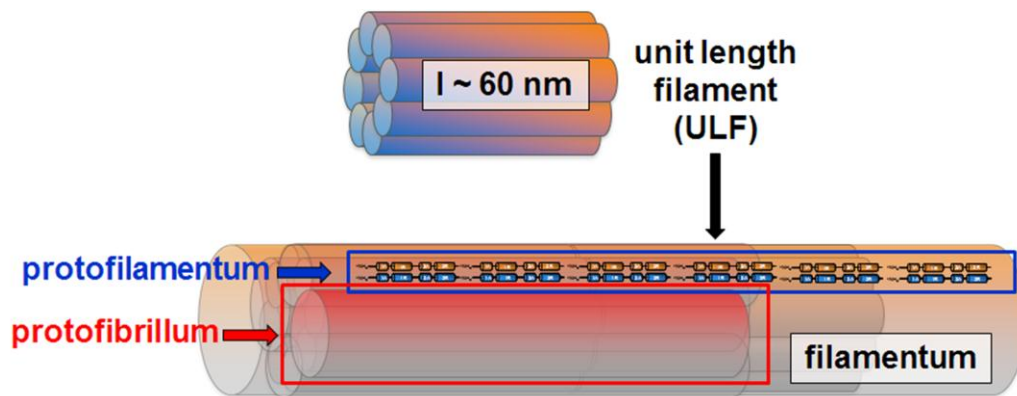
irányban gyorsan egymáshoz kapcsolódnak. A laterális asszociáció és longitudinális elongáció nagyjából egy időskálán zajlik.

2. csoport: dezmin-szerű fehérjék: A keratinokhoz hasonlóan 2 átlapolódó dimer alkotja itt is a tetramert, azonban a dimer felépítésében azonos típusú monomerek vesznek részt (3. ábra b). 8 tetramer laterális összeállásával gyorsan (másodperces időskálán) ~60 nm hosszú egység-filamentum (unit length filament, ULF) alakul ki (Bär és mtsai, 2005). Az egység-filamentumok hosszanti kapcsolódásával jön létre a több mikron hosszú, nagyjából 16 nm átmérőjű filamentum, mely belső szerkezeti

átrendeződésen esik át, ennek eredménye egy sugárirányú „tömörülés”, az átmérő végül kb. 10-11 nm-re csökken (Hermann és mtsai, 1999).

3. csoport: laminok: Fiziológias ionerősség és pH mellett a lamin monomer egységek átlapolás nélküli parallel dimert, majd fej-a-véghez kapcsolattal protofilamentumot hoznak létre (3. ábra c; a kék körök az N-terminális feji domént jelölik). Ezek laterális kapcsolódásával jön létre a filamentum.

A dezmin polimerizációjakor az ULF létejtötte után ultrastrukturális vizsgálómódszerekkel további szubfilamentális egységeket különíthetünk el (4. ábra). A tetramerek hosszanti összekapcsolódásával létrejött lánc a protofilamentum, míg nagyjából két protofilamentum oldalirányú kapcsolódása protofibrillumot eredményez. Ezek a struktúrák polimerizációs intermedierekként nem voltak megfigyelhetők, csak a filamentumok elektronmikroszkópos vizsgálata tárta fel létezésüket (Aebi és mtsai



4. ábra: A dezmin finomszerkezetének modellje

1983). A polimerizáció tehát alapjaiban máshogy zajlik az intermediér filamentumoknál, mint az aktin vagy a tubulin esetében, itt ugyanis nem képződnek nukleációs magvak, melyhez további monomerek, vagy dimerek adódnak, hanem – a laminok kivételével – az ULF-ek építik fel a láncot. A dimerek antiparallel kapcsolódása miatt itt nem tapasztalunk polarizált filamentum-végeket, mint a másik két citoszkeletális rendszer esetében. Az N-terminális szekvencia fontos szerepét a dimer feletti polimerizációs intermedierek létrejöttében szelektív proteolitikus kísérletek támasztották alá: az első 20 aminosav eltávolításával még létrejöttek a filamentumok, 24 aminosav deléciójával már csak tetramerek voltak észlelhetők, 42-nél több aminosav eltávolítása már csak dimerizálódást tett lehetővé (Strelkov és mtsai, 2002). A tetramer

szerkezet kialakításában vélhetően az egyik dimer-fej a szomszédos dimer L2 összekötő régiójával alakíthat ki sóhidat. A tetramert intramolekuláris keresztkötések is stabilizálják. Az N-terminális „feji” domén számos szerin oldallánca fehérjekinázok célpontja, az intermedier filamentumok foszforilációja (véltetően a felületi töltésviszonyok megváltoztatásával) a filamentális szerkezet felbomlásához, dezintegrálódásához vezet (Inagaki és mtsai, 1988). Ilyen kinázok például a proteinkináz-A, proteinkináz-C, valamint a cdc2 (ciklin dependens kináz 2) (Kitamura és mtsai, 1989; Kusubata és mtsai, 1993). Egy másik poszttranszlációs módosulás, az ADP-riboziláció a feji doménben szintén a filamentális szerkezet ellen hat (Huang és mtsai, 1993). A sejten belül számos fehérje kapcsolódik az intermedier filamentumokhoz, közülük az ún. IFAP-k (Intermediate Filament-Associated Proteins) valószínűleg a filamentumháló stabilitását növelik. Izomsejtekben két ilyen fehérje asszociálódik a dezminhez, a synemin (230 kDa) és paranemin (280 kDa) (Bershadsky és Vasiliev, 1988).

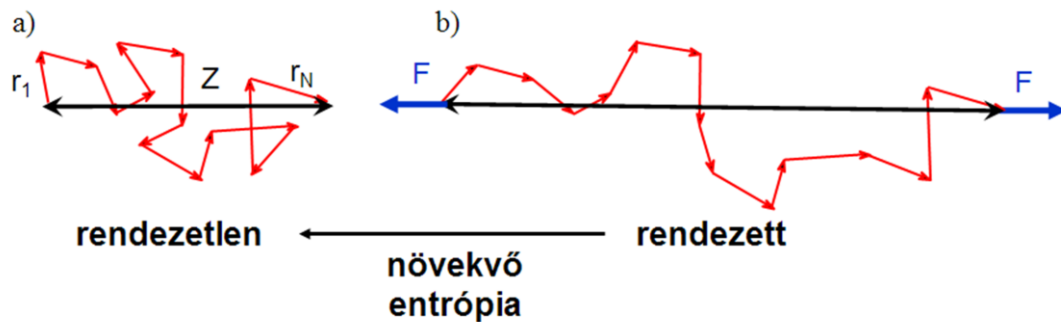
1.4. A biopolimerek molekuláris mechanikája

Az élő rendszerekkel kapcsolatos biológiai, kémiai, fizikai ismereteink nagy része bonyolult makromolekulák, biológiai szerkezetek együttesének elemzéséből származik. Az utóbbi évek nanobiológiai, illetve nanomechanikai kutatásai szerint azonban a biopolimereket felépítő alegységek élettani vagy mechanikai viselkedése jelentősen eltérhet a polimer viselkedésétől. Az egyedimolekula-manipulációs módszerek újfajta betekintést nyújthatnak a molekuláris rendszerek működésébe. Az egyedi vizsgálatoknak számos előnye van: alkalmazásukkal kivédhető a térbeli és időbeli átlagolás; az idő függvényében vizsgált jelenségek esetén nincs szükség arra, hogy nagyszámú molekula azonos időben azonos átalakulást mutasson; olyan új jelenségeket, szerkezeti átalakulásokat vehetünk észre, amelyek a korábbi módszerekkel észrevétlenek maradtak; továbbá iránytól függő mechanikai tulajdonságok is vizsgálhatók.

Az intermedier filamentumok feltételezett szerepe a mechanikai stabilitás biztosítása a sejt számára (Price, 1984). Éppen ezért a filamentumok mechanikai tulajdonságai alapvetően befolyásolhatják a sejt szerkezetének, integritásának

fennmaradását a külső erőhatásokkal szemben. Például izomműködésnél az izomrostoknak a hosszirányú feszüléssel szemben ellenállónak kell lenniük, viszont ezzel párhuzamosan oldalirányú erőbehatásra rugalmasan kell viselkedniük.

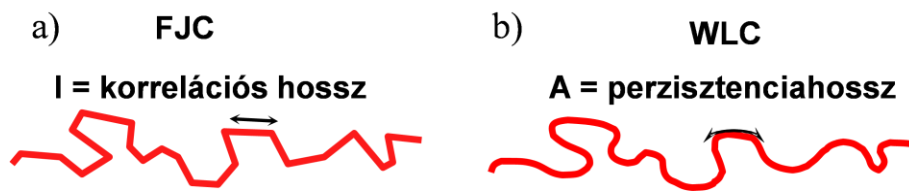
Mint már említettem, az egyedi molekulák rugalmas viselkedése a molekula megnyújtása során fellépő rugalmas erők ismeretében megszerkesztett erő-megnyúlás



5. ábra: A Freely Jointed Chain (FJC) polimermodell

görbe alapján vizsgálható. Az erő-megnyúlás görbék értékelésére, leírására több modell alkalmas. Az egyik a „*Freely Jointed Chain*” (FJC) modell (5. ábra a). Ez a modell úgy tekint a molekulára, mintha az merev szegmensekből (ún. Kuhn szegmensekből) épülne fel. A szegmensek kapcsolódási pontjaik mentén szabadon elfordulhatnak (a kapcsolódási pontok súrlódásmentesek), így az egymást követő szegmensek az előzőek irányától függetlenül helyezkednek el (Grosberg és Khokhlov, 1997; Kellermayer, 2001). Az egyes szegmenseket többnyire nem egy, hanem 4-5 monomer alkotja, hosszúságuk eltérő lehet, de az átlagos szegmenshossz, az ún. korrelációs hossz (l) jellemző az adott polimerre. A szegmensek számának (N) és a korrelációs hosszaknak a szorzata megadja a molekula kontúrja mentén mérhető hosszát, a kontúrhosszat (L). A polimer egy adott állapotában a molekula végei közti távolság, azaz a vég-vég hossz (Z) a szegmensek egymás körüli véletlenszerű elfordulásainak függvénye. A szegmensek közötti véletlenszerű rotáció tulajdonképpen úgy is felfogható, mint egyetlen polimeren belüli Brown-mozgás, vagy bolyongás: a molekula hogyan hidalja át a Z távolságot N lépésből, ha az elemi lépéshossz l és a lépések véletlenszerűen következnek egymás után. Statisztikus termodinamikai szempontból pedig úgy tekinthetjük a rendszert, hogy Z a rendszer egy makroállapota, míg ezt a vég-vég távolságot eredményező lehetséges bolyongó mozgások összessége a rendszer mikroállapotai. A természetben spontán

végbementő folyamatok az entrópia, a rendezetlenség növekedésével járnak, a biopolimerek esetén a magas entrópiájú állapotot jelenti a rövid Z , azaz a szegmentumok véletlenszerű összekapcsolódása, melyet a Boltzmann-eloszlás határoz meg. A polimer mechanikai erővel (F) történő nyújtásakor a molekula két vége közti távolságot növeljük, ez által pedig növekszik a láncot felépítő szegmentumok rendezettsége, azaz az entrópia csökken (5. ábra b). A polimerre ható húzóerő megszűntekor a molekula visszakerül a számára energetikailag kedvezőbb, magasabb entrópiájú állapotba. Az



6. ábra: Ugyanaz a polimer FJC és WLC modellekkel.

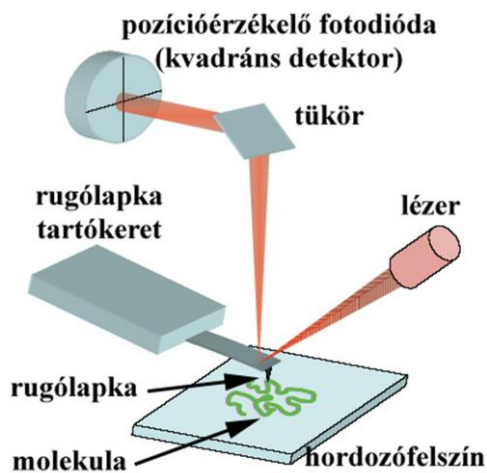
FJC modell segítségével számos biopolimer, például a kettősszálú DNS rugalmassága és rugóállandója kis ($<0,1$ pN) erőtartományban viszonylag jól meghatározható (Bustamante és mtsai, 2000). A biopolimerek közepes és nagyobb erők esetén megfigyelhető rugalmas viselkedésének leírására az FJC modell továbbfejlesztett változatai alkalmasak. Az általunk alkalmazott modell a *Wormlike Chain (WLC)*, ami úgy tekint a molekulára, mintha az egy hajlékony, homogén rúd volna (6. ábra). A modell megengedi a polimeren belüli kötések torzulását, így lehetővé teszi a molekulára jellemző rugalmassági mechanizmusok pontosabb modellezését (Bustamante és mtsai, 1994). A modellt leíró egyenlet segítségével meghatározható a molekula hajlítómerevségét jellemző ún. perzisztenciahossz (A), ami megmutatja, hogy a molekula milyen rövid szakasza tekinthető még merev rúdnak. A perzisztenciahossz egy monomer hosszánál rövidebb is lehet, szemben az FJC modellnél leírtakkal. Minél rövidebb a perzisztenciahossz, annál flexibilisebb a molekula. A perzisztenciahossz az alábbi hiperbolikus egyenlet szerint függ Z -től és L -től:

$$\frac{FA}{k_B T} = \frac{Z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{Z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \quad (1)$$

Ahol F a manipuláció során a molekulára kifejtett nyújtóerő; k_B a Boltzmann állandó, és T az abszolút hőmérséklet. A vég-vég távolság a hőmérséklet növelésével csökken, azaz

a termikus gerjesztés hatására nő a polipeptidlánc konformációs rendezetlensége, entrópiája. Ezt a rendezetlenséget ellensúlyozzuk a polimer mechanikai nyújtásakor: a vég-vég hossz növelésével csökken a konformációs entrópia.

1.5. Biopolimerek vizsgálata atomerőmikroszkóppal

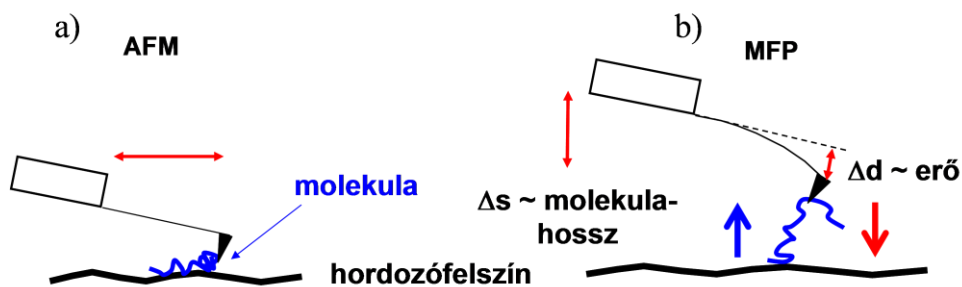


7. ábra: Az AFM felépítése

1986-ban Gerd Binnig és Heinrich Rohrer kapta meg a fizikai Nobel díjat a pásztázó alagútáram mikroszkópia kifejlesztéséért (Binnig és mtsai, 1982). A pásztázó alagútmikroszkóp (Scanning Tunneling Microscope, STM) működésének elve a következő: egy igen hegyes tű végigpásztázza az elektromosan vezető tulajdonságú vizsgálandó felszín attól néhány tized nanométernyi távolságban, miközben a tű és a minta között az alagút effektus miatt elektromos

áram folyik, amely igen érzékeny a felszín és a tű közötti távolságra. Az alagútáramot a tű függőleges irányú elmozdításával állandó értéken tartva számítógép segítségével rekonstruálható a felület atomi felbontású topográfiája. A felbontást a tű háromdimenziós mozgatásához használt piezoelektromos átalakítók elemi lépéstávolsága szabja meg, amely akár atomi felbontású is lehet. Mivel a legtöbb biológiai minta elektromosan szigetelő tulajdonságú, célszerű volt egy olyan vizsgálóeljárást kifejleszteni, mely nem az alagútáram mérésén, hanem a tű és a felület között ébredő lokális kölcsönhatás változásán alapul. Az atomerőmikroszkóp (Atomic Force Microscope, AFM) egy nagyfelbontású pásztázó tűszondás berendezés (7. ábra), amelyben egy rugólapka hegyének végén levő tűvel pásztázzuk végig a felszín (Binnig és mtsai, 1986). A tű felületén és a hordozófelszínen levő atomok között vonzó és taszító kölcsönhatások működnek, melyek a rugólapka elhajlását okozzák. A rugólapka parányi elmozdulásait a rugólapka felszínére irányított, s onnan visszavert, majd detektált lézersugárral mutatjuk ki. Ezzel a módszerrel a felszín topográfiai képét akár

század nanométernyi pontossággal rekonstruálhatjuk. Az AFM egy módosított változata az ún. Molekuláris Erő Szonda (Molecular Force Probe, MFP), amelyben pásztázás helyett a rugólapkát függőleges irányban mozdtjuk el, így alkalmassá téve arra, hogy molekulákat nyújtsunk meg vele, s ezek húzásra adott erőválaszát regisztráljuk (8. ábra b). A lapka pozíciójának pontos regisztrálásával lehetőségünk van egyedi molekulák nagyfelbontású erő-megnyúlás görbéinek meghatározására, ezáltal egyedi molekulák rugalmasságának jellemzésére. A rugólapka elhajlása (Δd) a rugalmas erővel arányos:

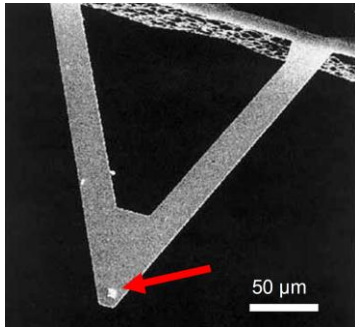


8. ábra: Az AFM (a) és az MFP (b) működése

$F=K \cdot \Delta d$, ahol K a rugóállandó; a rugólapka elhajlás nélküli függőleges elmozdulásából (Δs) a vizsgált molekulaszakasz hosszát kaphatjuk meg. A felszínhez közelítve a rugólapka felfelé hajlik, míg a felszíntől távolodva, s közben rugalmas molekulát nyújtva lefelé (8. ábra b). A tú mechanikai tulajdonságai nagyban befolyásolják a mikroszkóp felbontóképességét. A rugólapkáknak két feltételt kell kielégíteniük: 1) a nagy érzékenység eléréséhez a rugóállandó legyen kicsi (a mérési eljárásoktól függően 0,001 N/m-től akár 35 N/m-ig változhat a mérésnél használatos rugólapkák rugóállandója), 2) a környezetből érkező zavaró, általában viszonylag kis frekvenciájú rezgések és a visszacsatolási elektronika miatt fontos, hogy nagy legyen a rugó rezonancia-frekvenciája. A kereskedelemben kapható rugók rezonancia-frekvenciája 15 - 500 kHz-ig terjed (Rozlosnik és mtsai, 2003). Folyadékkozegeben a rezonanciafrekvencia jelentősen alacsonyabb, mint szárazon történő pásztázáskor, ez gyakran rosszabb képminőséggel jár együtt. Ha figyelembe vesszük, hogy a rugólapka-tű rendszer f_0 rezonancia-frekvenciájára és K rugóállandójára fennáll az

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{m}} \quad (2)$$

összefüggés, akkor látható, hogy a két feltétel akkor teljesül egyszerre, ha az m effektív rugólapka-tömeg kicsi. Manapság a szilícium, szilícium-oxid (SiO), szilícium-nitrid



9. ábra: Az AFM-hez használatos rugólapka SEM felvétele. A piros nyíl a rugólapka tűjére mutat.

(Si₃N₄) alapanyagú rugólapkák terjedtek el, felületük azonban a kísérletek céljainak megfelelően funkcionálizálható. Tipikus hosszúságuk 100-200 μm, vastagságuk 0,3-2 μm, felülnézetben „ugródeszka” vagy V-alakúak, az integrált áramköröknél alkalmazott gyártástechnológiához hasonlóan fotolitográfias technikával készülnek. A gyártás során a tú negatív lenyomatát tartalmazó szilícium hordozórétegre viszik fel a Si₃N₄ fedőréteget,

majd a szilíciumot elektrokémiai maratással távolítják el. A tú hegyének görbületi sugara jellemzően néhány nm, azaz csupán pár atom alkotja (**9. ábra**). Az AFM és az MFP tulajdonképpen precíziós erőmérő készülékek, amelyek képesek akár pikonewton nagyságú erőket is detektálni (összehasonlításképp: nanonewtonos erővel bizonyos kovalens kötések már felszakíthatók). Annak érdekében, hogy közvetlenül az erőt mérhessük, vagy a rugólapka rugóállandóját kell ismernünk, vagy közvetlenül ismert nagyságú erő mérésével kell kalibrálnunk a készüléket. Mi a gyakorlatban a rugólapka (harmonikus oszcillátor) termikus rezgéseit használtuk erre a célra. Adott x kitérés mellett a rugólapkában tárolt energia $E_r = 1/2 \cdot K \cdot x^2$. Termikus egyensúlyban az egy szabadsági fokra jutó átlagos termikus energia $E_r = 1/2 \cdot k_B \cdot T$ (ekvipartíció tétel). Mivel a rugólapka a tartókeret stabilizáló hatása miatt csak függőleges elmozdulásra képes, rezgőmozgását egyetlen szabadsági fokkal vehetjük figyelembe, így E_r várható értéke $1/2 \cdot k_B \cdot T$ -vel egyenlő:

$$\left\langle \frac{1}{2} K x^2 \right\rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad (3)$$

azaz,

$$\frac{1}{2} K \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad (4)$$

ezért a rugólapka rugóállandója a következő egyenlettel írható fel:

$$K = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle}, \quad (5)$$

ahol $\langle x^2 \rangle$ a rugólapka átlagos négyzetes elmozdulása. Így, ha regisztráljuk a rugólapka átlagos négyzetes elmozdulását, s ismerjük a hőmérsékletet, megkaphatjuk a rugólapka rugóállandóját. A termikus gerjesztésre bekövetkező rugólapka elmozdulást a lapka nagyfrekvenciás rezgései során regisztráljuk, ebből a számítógép Fourier-analízis segítségével egy rezgési frekvencia – rezgési amplitúdó függvényt szerkeszt, mely görbe csúcsainak helye a rugólapka sajátrezgéseinek frekvenciáját adja meg. A görbe segítségével kiszámítható minden egyes felhasznált rugólapkára a rugóállandó, ennek ismeretében pedig a mért elmozdulásból a molekulában ébredő erő pontosan mérhető.

Az erő mérése kétféleképpen történhet (Rozlosnik és mtsai, 2003):

1) Nem modulált vagy DC eljárás

Ez az eljárás az erőt a rugólapka elhajlásának detektálásával méri. A rugólapka függőleges kitérése arányos a rá ható erővel: $F = K \cdot x$, ahol a K arányossági tényező a rugóállandó.

2) Modulált vagy AC eljárás

Egy piezoelektromos kristály segítségével a rugólapkát a rezonancia-frekvenciája környékén rezgésbe hozzuk, és a türe ható erő változására fellépő rezonancia-frekvencia eltolódást detektáljuk. A tü és a minta közötti vonzó erő csökkenti, a taszító erő növeli a rezonancia-frekvencia értékét.

A mérési metodikák a tü és a minta egymáshoz viszonyított helyzete szerint is csoportosíthatók:

1) „Contact” mérési eljárás

A tü és a minta állandó kontaktusban vannak. A K rugóállandót az érzékenység növelése érdekében kicsire célszerű venni, azaz lágy rugólapkát kell használni.

- Állandó erővel történő mérés

A visszacsatoló rendszer a DC eljárásnál leírtak szerint működve az erőt állandó értéken tartja, így a rugólapka „követi” a felszín hullámzását.

- Változó erővel történő mérés

A rugólapkának a változó erő miatt bekövetkező deformációját, elhajlását detektáljuk folyamatosan.

- Lokális erő spektroszkópia vagy *in situ* AFM

A felület egy kiválasztott pontján felvesszük az erő-elmozdulás függvényét (AFM és MFP kombinációja).

2) „Noncontact” mérési eljárás

Az erő mérése az AC eljárásnál leírtaknak megfelelően történik. Ezzel nem érhető el akkora felbontás, mint a „contact” eljárással, viszont a mintát kevésbé rongálja.

- Nagy amplitúdójú rezonancia

A merev laprugó (rugóállandó nagy) a rezonancia-frekvenciáján rezeg (50-500 kHz), nagy amplitúdóval (10-100 nm), a vizsgálandó felületet azonban nem érinti. Nagyon lágy minták esetében használható.

- Kis amplitúdójú rezonancia

Nagy rugóállandóval, de kis amplitúdóval (0,2-1 nm) működő technika. Érzékeny a felületet borító szennyeződésre (pl. több 10 nm magas, meredek sókristályok).

3) „Tapping” eljárás

A nagy amplitúdójú rezonancia eljáráshoz hasonlóan itt is 50-100 nm amplitúdójú rezgéseket végez a rugólapka, de visszacsatolást alkalmazunk, melynek értékét, ezzel az amplitúdó nagyságát mi határozhatjuk meg (beállítási pont vagy set-point a pozícióérzékelő fotodióda jele alapján). Érzékeny, könnyen deformálódó minták vizsgálatát alacsony set-point mellett célszerű végezni. A visszacsatolás úgy van beállítva, hogy a tű minden rezgésnél érintse a felületet. Ez az eljárás azért előnyös, mert a felületen ható erők nem károsítják a felszínt (nincs vízszintes irányú komponensük), ugyanakkor a felbontás megközelíti a „contact” eljárással elérhető felbontást.

Speciális rugólapka alkalmazásával lehetőség van folyadékkozegekben történő mérésre is, így a fehérjék, sejtek fiziológiás, puffertelt környezetben vizsgálhatók szemben a hagyományos, csillámfelületre felvitt, majd beszárított mintákkal.

1.6. A dezmin molekuláris mechanikája

Egyedi dezmin molekulák mechanikai vizsgálata végezhető reológiai mérésekkel, AFM-es kép alapján, valamint közvetlen AFM-vezérelt mechanikai manipulációval horizontális, illetve vertikális síkban. A hajlítómerevséget jellemző IF perzisztenciahossz értékei reológiai módszerrel, egyensúlyi rendszerben mérve nagyjából 1 μm -nek adódtak (Hohenadl és mtsai, 1999; Mücke és mtsai, 2004). Egyedi dezmin filamentumok, illetve protofilamentumok eredeti hosszukhoz képest 3,5-szeres nyújtást is elviselnek (Kreplak és mtsai, 2005). Bizonyos keratinok rugalmassági modulusa (egységnyi felületre ható erő a deformáció függvényében) MPa, illetve GPa tartományban mozog, részben a diszulfidhidak stabilizáló hatásának köszönhetően (Park és mtsai, 1972), valamint eredeti hosszukhoz képest 180%-ig nyújthatóak. Sajátos, az IF-ekre jellemző mechanikai viselkedés az ún. feszítés hatására bekövetkező kimerevedés („strain-hardening”), azaz rugalmassági modulusuk nemlineárisan, meredeken emelkedik túlnyújtás hatására (Storm és mtsai, 2005). A fent említett különleges mechanikai viselkedés szolgáltathat alapot annak a feltételezésnek, hogy az IF-ek egyfajta „mechanotranszducerként” viselkedhetnek az élő sejtben. A szívizomsejtek mechanikai nyújtása számos azonnali, illetve korai gén kifejeződését megindítja, ami végül növekedési választ indít el a sejtben (Sadoshima és mtsai, 1993). Az IF-ek a sejt jelátviteli hálózatában betöltött fontos szerepére a foszforilációs kaszkádokban való részvétel utal.

1.7. A dezminnel kapcsolatos betegségek

A mechanikai stresszel szembeni fokozott ellenállás modellje szolgálhat alapul számos, dezminnel kapcsolatos betegség tünettanának megértésében. A dezmin monomer mutációi izomdisztrófiákhoz (izomsorvadás), és kardiomiopátiákhoz (szívizom-elfajulás) vezetnek. Érdekes megfigyelés, hogy bizonyos lamin-A mutációk is manifesztálódhatnak izomdisztrófia formájában (Bonne és mtsai, 1999). A betegségekre jellemző, hogy születéskor még szegényes a tünettan, többnyire a második-harmadik évtizedben válik észlelhetővé. A *miofibrilláris miopátia* (MFM) szövettanilag a Z-lemezek szétesésével, valamint szarkolemma alatti és sejtplazmán

belüli dezmin- és α B-krisztallin (hősokk-fehérje), plectin (citoszkeletális kapcsolófehérje), titin tartalmú aggregátumok megjelenésével jellemezhető (Clark és mtsai, 2002). Érintheti a harántcsíkolt- és simaizomzatot, mindkettőben lassú, progresszív sorvadással jár. A szívizom érintettsége esetén dilatatív, hipertrófiás, vagy restriktív kardiomiopátia léphet fel. A halál legfőbb oka a veszélyes szívritmuszavarok megjelenése. A betegség kiváltó oka a dezmin monomeren belüli mutáció, az α -helikális doménen belüli pontmutáció különböző polimerizációs defektusokhoz vezethet: vagy megáll a polimerizáció valamely köztes lépésnél, vagy a részlegesen kialakult szerkezet egy szabálytalan szerkezetű prekuzorra bomlik. A normálisnak tűnő filamentumok fehérje-fehérje kölcsönhatásaiban is lehet zavar a pontmutációk eredményeképp. Tovább árnyalhatja a képet a heterozigóta állapot, ilyenkor egyszerre van jelen a normál, és hibás szerkezetű prekuzor. A hibás prekuzor gyakran aggregátumot képez és szekvesztrálódik, ez azonban a sejtben maradva mitokondriális funkciózavarhoz, illetve apoptózishoz vezethet (Milner és mtsai, 2000). A dezmin izomsejtekben betöltött stabilizáló szerepét az is mutatja, hogy az izom szerkezeti károsodásának mértéke számszerűsítve a dezmin-immunoreaktivitás eltűnésével arányos (Lieber és mtsai, 1996). A dezmin eltűnése a Z-lemezek körül együtt járt a titin elhelyezkedésének megváltozásával. Ez alapot adhat egy új modell bevezetésének: egy extraszarkomerikus citoszkeleton (dezmin, α -aktinin, plectin) stabilizálja az intraszarkomerikus citoszkeleton (titin, nebulin) (Herrmann és mtsai, 2007).

2. Célkitűzések

Mivel az intermedier filamentumoknak a sejten belül erőátviteli szerepet, illetve mechanikai stabilizáló funkciót tulajdonítanak (Sam és mtsai, 2000), elsődleges célunk az izomszövetben előforduló intermedier filamentum, a dezmin rugalmasságának jellemzése volt. Azt terveztük, hogy a rugalmasság jellemzésére izolált, hordozófelszínhez adszorbeált egyedi dezmin molekulákon végezhető AFM-alapú erőspektroszkópiát alkalmazunk. A filamentum, illetve a filamentumot felépítő alegységek rugalmas tulajdonságainak ismeretében további célunk volt egy olyan modell kidolgozása, mely alátámaszthatja a feltételezett erőátviteli funkciót. Ennek megfelelően konkrét céljaink az alábbiak voltak:

- 1) Dezmin izolálása csirke zúzából
- 2) Az izolált dezmin specifikus kimutatása immunoblot eljárással
- 3) Dezmin polimerizálása NaCl, illetve $MgCl_2$ hozzáadásával
- 4) Polimerizáció kinetikájának időbeli követése
- 5) Polimerizált, filamentummá összeállt dezmin morfológiájának vizsgálata pásztázó atomerőmikroszkóppal
- 6) Dezmin filamentum rugalmas tulajdonságainak vizsgálata
- 7) *In situ* atomerőmikroszkópia egyedi dezmin filamentumokon

Az egyedi filamentumokon végzendő rugalmasságmérés mellett célunk volt a teljes filamentum keresztmetszetére kiterjedő rugalmassági paraméter meghatározása a hordozófelszínhez adszorbeálódott filamentumok geometriai-orientáció eloszlása alapján, mely a morfológiai információt szolgáltatató 3D-AFM módszer alkalmazásával elvégezhető. Így egy független, az előző mérésekkel összehasonlítható, második rugalmassági paraméterhez juthatunk, mely mindenképpen a teljes filamentumot jellemzi, szemben a korábban említett célkitűzéssel, melynél nem zárható ki, hogy a filamentumnál kisebb alegységeket ragadunk meg az AFM-rugólapkával.

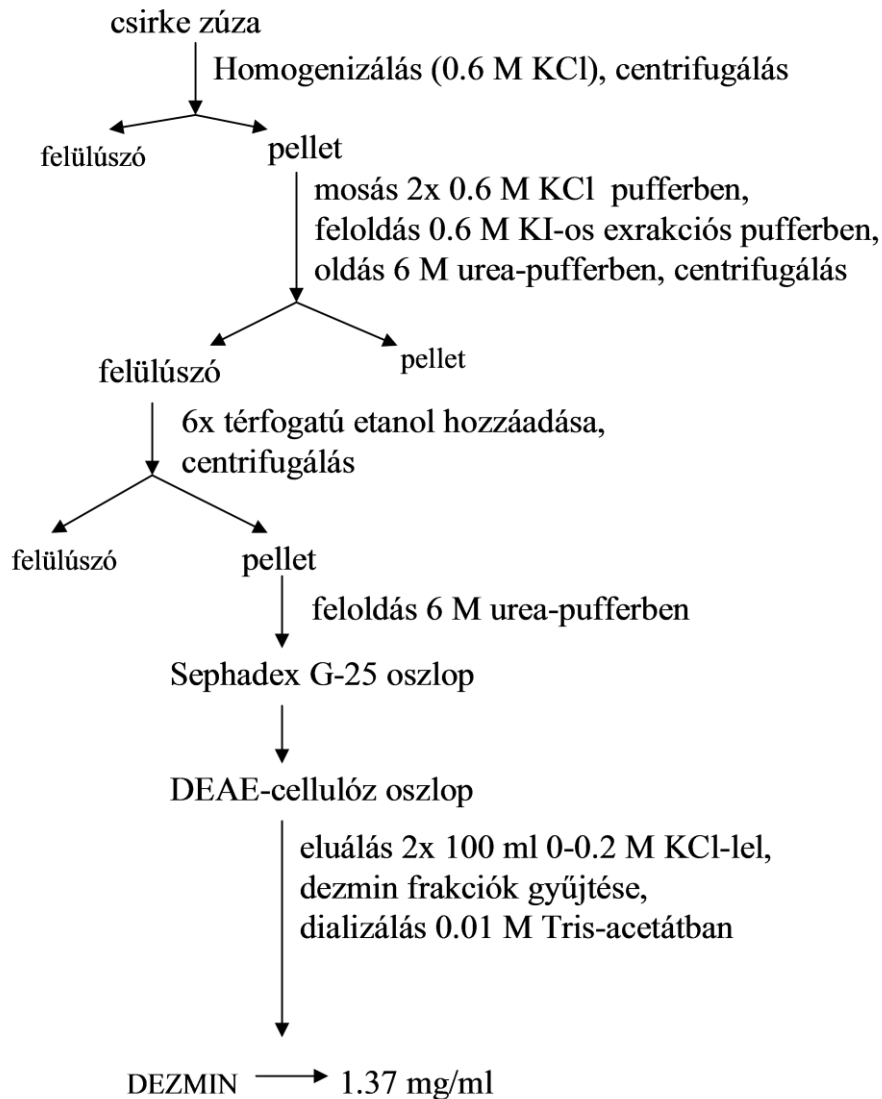
Végül a filamentumot felépítő építőkövek (protofilamentumok, protofibrillumok) rugalmassági paramétereinek meghatározását tűztük ki harmadik fő célunknak, melyhez már érett, összeszerelődött dezmin filamentumok felhasználását terveztük. A

filamentum szerkezetének stabilizálásban az ionos kötések jelentős szerepet játszanak, a filamentális szerkezetet ionos kötésekkel interferáló, kétértékű kationokra specifikus komplexképzőkkel (EGTA, illetve EDTA) terveztük felbontani.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Dezmin izolálása

Dezmin csirke zúzából izoláltunk Geisler és Weber protokollja szerint (10. ábra) (Geisler és Weber, 1980). Az izolálás során felhasznált oldatok összetétele a mellékletben került részletezésre. A fehérje abszorpciós spektrumának felvételét



10. ábra: A dezmin izolálásának lépései

Shimadzu UV-2100 típusú spektrofotométerrel (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japán) végeztük.

Az izolálást követően a dezmin mintát (6M urea pufferben) jégen tároltuk. A minta polimerizációs képességét heteken át megtartotta.

3.2. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE)

A dezmin fehérje jelenlétét, valamint a preparátum tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel mutattuk ki. A mintákat 95 °C-os vízfürdőben inkubáltuk 1 percig, 2 térfogategység mintához 1 térfogategység háromszoros töménységű DTT-Laemmli mintapuffert adva (40 mg DTT + 1 ml 3x Laemmli mintapuffer; Laemmli, 1970). A Bio-Rad cég Mini-ProteanII elektroforézis rendszerét használtuk (Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA), 10 %-os gélt öntöttünk Laemmli szerint. Az elektroforézis 120 V konstans feszültségen, és kb. 50 mA áramerősséggel történt. A géleket Coomassie Brilliant Blue festékkel festettük, s a Syngene cég MultiGenius géldokumentációs rendszerével analizáltuk (Syngene International Ltd. Bangalore, India), majd archiváltuk. A fehérjekoncentráció meghatározása Bradford assay segítségével történt. A gélelektroforézis során felhasznált oldatok, pufferek összetétele a mellékletben található.

3.3. Immunoblot

A dezmin specifikus kimutatására D33 klónból származó (Dako Denmark A/S, Dánia) IgG1 / kappa izotípusú monoklonális antitestekkel végeztünk Western-blot eljárást (**11. ábra**). A felhasznált pufferek a következők voltak:

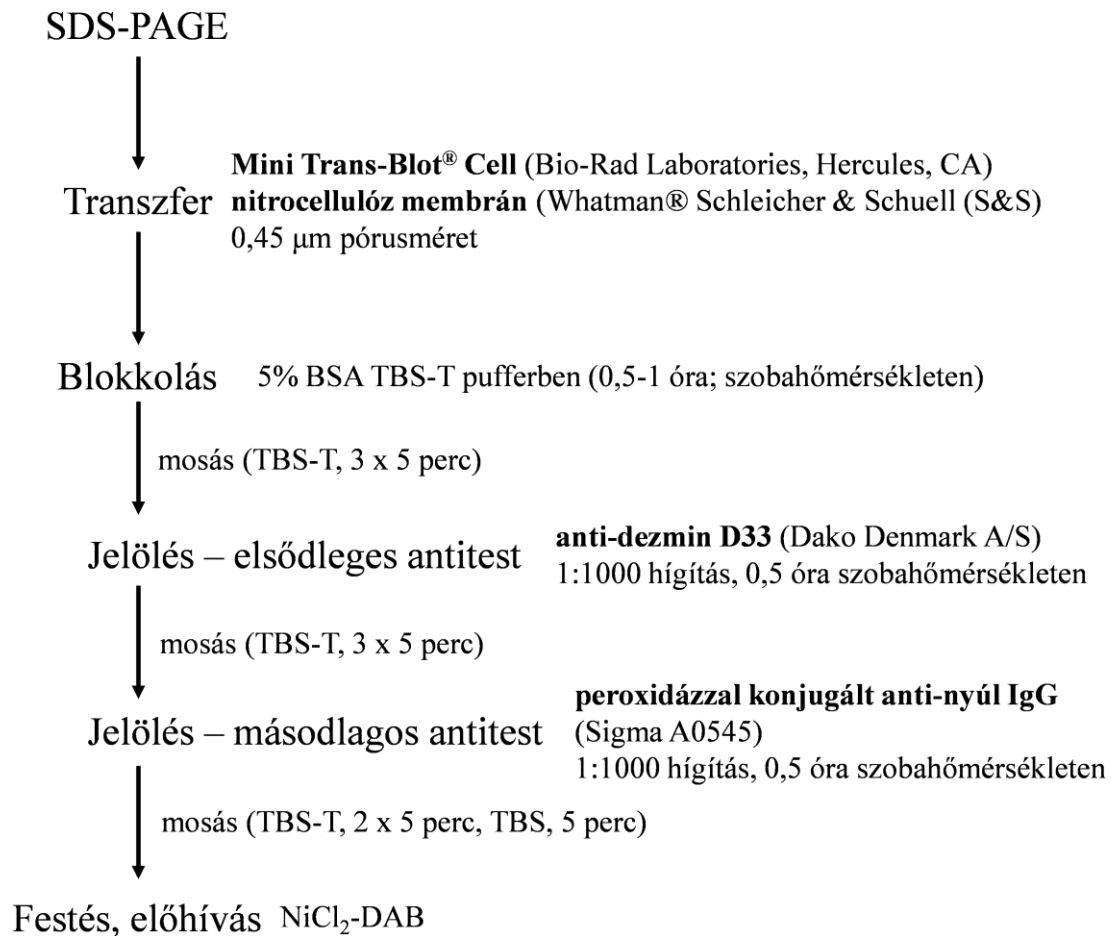
TBS: 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5,

TBS-T: 0,05% Tween 20 TBS pufferben feloldva,

BSA/TBS-T: 0,1% BSA TBS-T pufferben feloldva.

3.4. Dezmin polimerizálása

Az izolálás során nyert, ureás pufferben denaturált dezmint először háromszor két órán át Tris-HCl pufferrel (10 mM, pH 8) szemben, majd ezt követően szintén háromszor két órán át nátrium bikarbonát oldattal (1 mM, pH 8) szemben dializáltuk, majd Millipore Millex-GS 0,22 µm pórusátmérőjű membránszűrőn átszűrtük (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). A dializált dezmin polimerizációját NaCl-imidazol koktéllal,



11. ábra: Immunoblot a dezmin specifikus kimutatására.

illetve MgCl_2 -imidazol koktéllal indukáltuk. Az AFM-es mérésekhez a szükséges hígítást a polimerizáló koktélokhoz megfelelő kationt tartalmazó hígító oldatokkal végeztük. A NaCl végkoncentrációja 143 mM, míg a MgCl_2 végkoncentrációja 3,5 mM volt a hígítások során. Az oldatok pontos összetétele a mellékletben található.

3.5. Dezmin polimerizációs kinetikájának vizsgálata

A polimerizációt megelőző abszorpciós spektrumfelvétel után 200 µl dezminhez 40 µl imidazol-HCl (pH 7; 30 mM törzsoldat) + 4.8 µl MgCl_2 (0.1 M törzsoldat) polimerizáló koktélt adva 320 nm-es hullámhosszon, 25 °C-on két órán át mértük a dezmin fényelnyelés-változását. A méréshez az utolsó dialízishez használt Na-bikarbonát

oldat 200 μ l-ét használtuk vakként, melyhez 40 μ l imidazol-HCl (pH 7; 30 mM) + 4,8 μ l $MgCl_2$ (0,1 M) oldatot adtunk.

3.6. Dezmin pásztázása és nyújtása AFM / MFP-vel

Az egyedimolekula-manipulációs kísérleteket az Asylum Research MFP-1D (csak molekulák nyújtására alkalmas berendezés), illetve Asylum Research MFP-3D (pásztázó és vertikális üzemmódú) atomerő mikroszkópjával végeztük (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA). Kísérleteinkben a dezmint csillám, üveg (tárgylemez), valamint APTES-el (3-amino-propil-trietoxi-szilán) szilanizált tárgylemez-felületre cseppentettük, tíz percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A nem kötődött molekulákat desztillált vízzel mostuk le, majd nitrogéngázzal szárítottuk a csillámfelületet a szárazon történő pásztázáshoz. Folyadékkozegekben történt vizsgálatoknál a mosást a hígításhoz használt NaCl-imidazol, illetve $MgCl_2$ -imidazol oldatokkal végeztük, s ezeket használtuk közegként a pásztázás, illetve a mechanikai manipuláció során. A vizsgálatokat a következő üzemmódokban végeztük: mechanikai manipuláció során „contact” üzemmódot, míg pásztázáshoz „AC - Tapping” eljárást használtunk. Utóbbi esetben a pásztázást jellemzően magas set-point referenciaértékek mellett végeztük (0,8-1,2 V), hogy ezzel elkerüljük a rugólapka hegyének mintával történő szennyeződését, így biztosítva a megfelelően magas képi részletességet. Az általunk használt rugólapkák főbb mechanikai paraméterei:

- a) szárazon történő pásztázás esetén: AC160TS (Olympus), rezonanciafrekvencia \sim 300 kHz, tujének görbületi sugara \sim 10 nm, anyaga szilícium-nitrid (Si_3N_4),
- b) folyadékban történő pásztázás esetén: BioLever, lever „A” (Olympus), rezonanciafrekvencia \sim 35 kHz, tujének görbületi sugara \sim 30 nm, anyaga szilícium-nitrid (Si_3N_4).

Jellemzően 512x512-pixel vagy 1024x1024-pixel méretű képeket regisztráltunk, 0,7-1,4 Hz közötti sorfrekvenciával.

3.7. *In situ* AFM

A pásztázással készített topografikus kép alapján a felszín kiválasztott pontján mechanikai manipulációt végezhetünk az MFP (vertikális) üzemmóddal, így

lehetőségünk van az általunk vizsgálni kívánt biológiai minta egy adott részletéből mechanikai, rugalmas információt nyerni, azaz nagyban növelhető a mechanikai manipuláció szelektivitása. A módszernél kívánatos, hogy a mechanikai manipuláció folyadékfázisban történjen, puffert, ionösszetételében állandó közeget biztosítva a vizsgált biológiai mintának. Ennek megfelelően a rugólapkának a pásztázást is folyadékfázisban kell végeznie a manipulálás előtt és után. Mivel folyadékban a rugólapka rezonanciafrekvenciája lecsökken a szabad levegőn mérhető rezonanciafrekvenciájához képest (csillapított rezgés a folyadékban), a felbontás rosszabb lesz a csillámfelületen történt pásztázásénál, illetve a jel/zaj viszony javul a csillapítás miatt, a műszer kevésbé érzékeny a külső mechanikai vibrációkra. A mintát (rendszerint 10-20 μl) hordozóra cseppentettük, s tíz perc inkubáció után Na^+ -os, vagy Mg^{2+} -os hígító oldattal mostuk le a ki nem tapadt molekulákat, s a teljes rendszert (beleértve a rugólapkát is) folyadékcseppbe mártottuk.

3.8. Dezmin filamentumok szétbontása kémiai úton

Az esetlegesen aggregálódott dezmin filamentumok egymástól történő szétválasztását Triton X-100 nemionos detergenssel végeztük, melyet a polimerizáció során alkalmazott kationnak megfelelő hígító oldattal 0,1%-os végkoncentrációig hígítottuk.

Alkalomszerűen sor került a már polimerizált dezmin ciklusos szét- illetve összeszerelésére, melyet 6M ureával (pH 7,5, 4°C) szemben történő többlépéses (3 x 2 óra) dialízissel, majd azt követő polimerizálással értünk el.

A dezmin filamentumok szerkezetének fellazítását foszfátkezeléssel végeztük (Aebi és mtsai, 1983). Na-foszfát puffert (pH 7,5) alkalmaztunk 5 mM végkoncentrációban, melyet vagy oldatban hígított dezminnel reagáltattuk, vagy a már hordozófelületre kitapadt dezminen végeztük helyben a foszfátkezelést. Utóbbi esetben a kitapadt molekulákat fedő pufferoldatot cseréltük le 5 mM (pH 7,5) Na-foszfátra. Az inkubáció jellemzően 1 perctől 1 óráig tartott.

A filamentumokat kémiai úton kétértékű kationokra specifikus kelátorokkal kezeltük: a Ca^{2+} ionokra jóval specifikusabb EGTA-t 40 mM koncentrációban alkalmaztunk egészen 21 napos inkubációs időn át, míg a Mg^{2+} iránt nagyobb affinitást

mutató EDTA 16 mM koncentrációval jellemzően 2 órán át került alkalmazásra. Az inkubáció során valamennyi oldat pH-ját imidazollal állítottuk be 7,4-re.

Valamennyi kezelést követően a minták 20 μ l-ét frissen hasított csillámfelszínen inkubáltuk 10 percig, desztillált vizes mosást és nitrogéngázzal történő beszáritást követően szárazon pásztáztuk le AFM-mel.

3.9. Elektronmikroszkópia

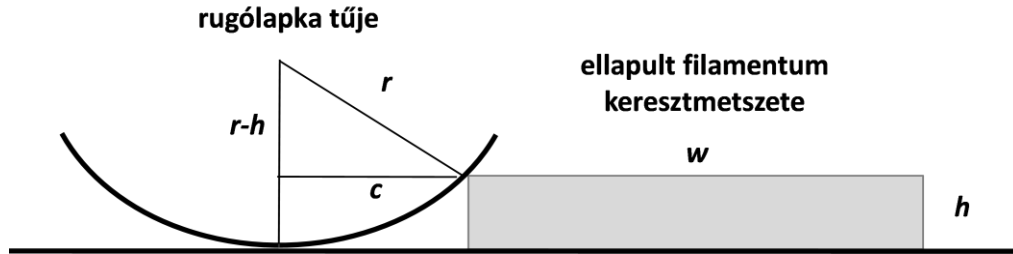
A dezmin elektronmikroszkópos vizsgálatához 25-50 μ g/ml végkoncentrációjú mintákat használtunk. Ívlámpás gerjesztést alkalmazó vákuumgőzölő segítségével finom szénzemcsékkel bevont tárgytartó rácstra vittük fel a vizsgálandó mintát, melyet rendszerint 1%-os uranil acetáttal, vagy 2%-os foszforwolframsavval festettünk negatívan. A negatív festési eljárás lényege, hogy a preparátum mélyedéseibe, a dezmin filamentum alá és mellé jutó festék beszárad, míg a kiemelkedő részek nem festődnek. Ezzel a módszerrel az AFM-nél sokkal pontosabban jellemezhetőek a filamentumok szélességi paraméterei. Mintáinkat Hitachi 7100 típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk (Hitachi, Ltd. Tokyo, Japán), az alkalmazott gyorsítófeszültség 80 kV, a felvételeket 60 000 – 80 000-szeres nagyítás mellett készítettük.

3.10. Képanalízis

Az AFM vezérlését az Igor Pro 6.03 program kezelőfelületén végeztük. Az erőgörbékre a Wormlike Chain (WLC) polimermodellt Igor Pro alá szerkesztett kiegészítő alkalmazással az (1) egyenlet alapján illesztettük. A statisztikai elemzés szintén Igor Pro-val történt, az adatokat Microsoft Excel 2010 programba exportáltuk. A hisztogramokat és a spektrumokat Microsoft Excel 2010 programmal ábráztuk. A polimerizációs kinetika elemzéséhez KaleidaGraph 4.0 programot, míg a képanalízishez ImageJ 1.43 programot használtunk. A függvények illesztését, ezáltal a perzisztenciahossz meghatározása IgorPro és KaleidaGraph programokkal történt.

Az AFM segítségével készült képeken az átlagos filamentumhossz (h) meghatározásához egy tetszőlegesen kiválasztott, egyedül álló filamentum kontúrja

mentén több ponton mértük a felszín és a filamentum felső határa közti magasságkülönbséget, majd azokat átlagoltuk. A filamentumok tényleges hosszát az AFM-tű és a minta konvolúciója miatt az alábbi korrekcióval végeztük (**12. ábra**).



12. ábra: Ellapult filamentumok korigált szélességének meghatározása az AFM-felvételek elemzésével.

A filamentum tényleges szélessége (w) a filamentum AFM képen mutatott keresztmetszeti képének félmaximális magasságánál mért szélességéből (full width at half maximum, FWHM = A) a (6) egyenlet szerint számítható.

$$w = A - 2c, \quad (6)$$

ahol c egy korrekciós faktor, mely az alábbiak szerint számítható:

$$c = \sqrt{2rh - h^2}, \quad (7)$$

A korrekciós faktor figyelembe veszi a mérés során alkalmazott rugólapka tűjének geometriai paramétereit is. A nagy feloldóképesség miatt a méréseinkhez AC160TS rugólapkát használtunk, a korrekciós számításokhoz pedig a rugólapkának az Olympus által gyárilag megadott görbületi sugarát használtuk: $r = 9 \pm 2$ nm.

A hajlítómerevséget jellemző perzisztenciahossz meghatározható a felszínre adszorbeálódott filamentumok geometriai orientáció-eloszlása alapján is, amennyiben feltételezzük, hogy a filamentumok felszíni (2D) elhelyezkedése hűen tükrözi az oldatbeli orientációt, azaz a regisztrált AFM-es kép az oldatbeli háromdimenziós orientáció kétdimenziós „lenyomata”. A perzisztenciahossz (P) tehát meghatározható a filamentum átlagos négyzetes vég-vég távolságának, illetőleg kontúrhosszának (L) ismeretében a (8) egyenlet szerint (Rivetti és mtsai, 1996).

$$\langle R^2 \rangle_{2D} = 4PL \left(1 - \frac{2P}{L} \left(1 - e^{-\frac{L}{2P}} \right) \right). \quad (8)$$

A perzisztenciahossz segítségével egy adott polimerre jellemző makroszkopikus mennyiségek is meghatározhatók, ha feltételezzük, hogy az adott polimer homogén test. Az anyag hosszanti nyújthatóságát jellemző rugalmassági, vagy Young-modulus (E), illetve az oladlirányú nyújthatóságot, lehajlítást jellemző másodrendű nyomaték (I) az alábbi összefüggéssel származtatható:

$$P = \frac{EI}{k_B T}, \quad (9)$$

ahol k_B a Boltzmann állandó és T az abszolút hőmérséklet. Mivel méréseinket szobahőmérsékleten végeztük, így az egyenletbe 293 K értéket helyettesítettünk. A másodrendű nyomaték egy kör-keresztmetszeű rúd esetében:

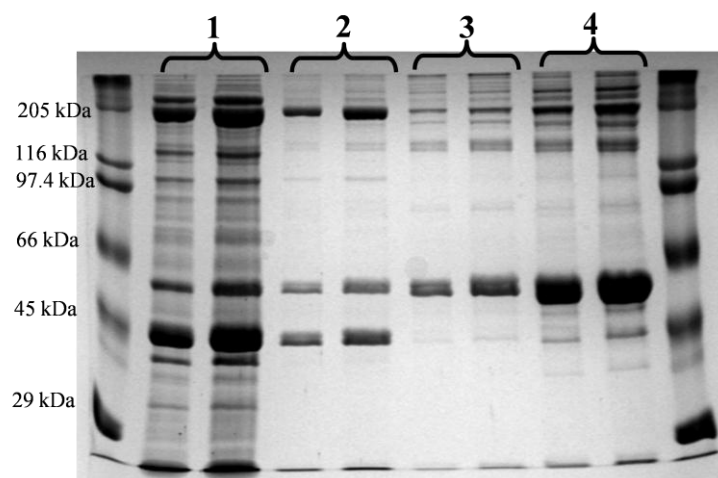
$$I = \frac{\pi d^4}{64}, \quad (10)$$

ahol d a filamentum átmérője (Aebi és mtsai, 1983).

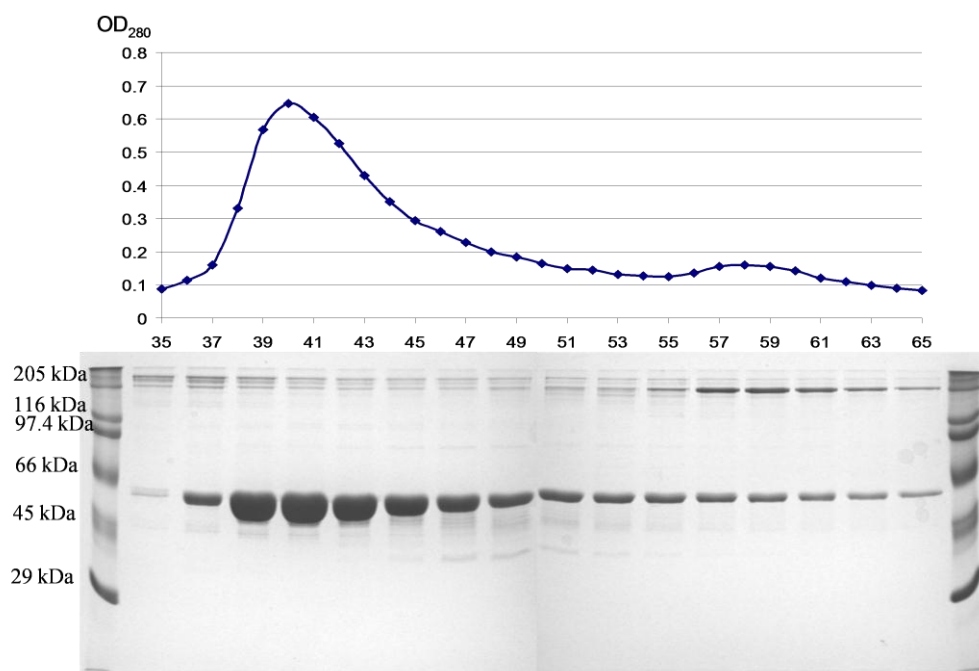
4. Eredmények

4.1. Dezmin izolálása

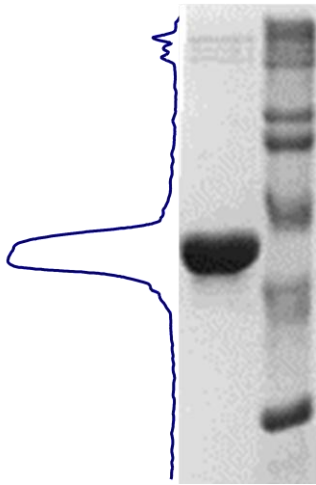
A fehérje izolálása során az egyes lépések során eltett mintákról készült SDS-PAGE elektroforetogramok láthatók a **13. és 14. ábrán**. A gélek szélső zsebeiben 5, illetve 10 μ l SDS-6H molekulásúly-standard futott (a standard fehérjekomponenseinek molekulásúly-értékei a gélben történő helyzetüknek megfelelően van feltüntetve).



13. ábra: A dezmin preparálása: „1” jelzésű zsebekben 10 és 20 μ l zúza-homogenizátum, a „2” zsebekben 10 és 20 μ l mosott és centrifugált pellet, a „3” zsebekben 10 és 20 μ l KI-os extrakció pelletje, a „4” zsebekben 10 és 20 μ l etanosol



14. ábra: A DEAE-Cellulóz oszlopról eluált frakciók fényelnyelése és a belőlük készített SDS-PAGE elektroforetogramok



15. ábra: A dezminminta denzitogramja

A 13. ábrán látható, hogy az izolálás során a dezmin feldúsult („4” zseb, 53 kDa), azonban a miozin (200 kDa körül) és aktin (42 kDa), mint fő szennyezők megmaradtak. A gélszűrést és az anioncserés kromatográfiát (DEAE-Cellulóz) követően ezektől a szennyezőktől javarészt megszabadultunk.

A **14. ábrán** az anioncserés kromatográfia során a frakciók 280 nm-en detektált fényelnyelése, és a frakciókból készült elektroforézis eredménye látható. A 35-65. frakciókat párosával vittük fel két gél zsebeibe, melyek képét számítógéppel illesztettük egymás mellé. A gélen és a kromatogramon egyaránt jól elkülönül a dezmin (39-43-as frakciók) és a miozin nehézlánc (57-

61). A 39-43-as frakciók együttese képezte a dezminmintát (**15. ábra**). A gél számítógépes programmal feldolgozva a minták átlagosan 97 %-os tisztaságúnak adódtak. A fehérje koncentrációja Bradford Assay alapján 1,37 mg/ml.

4.2. Immunoblot

A dezmin monomerek specifikus kimutatására a 13. ábrán bemutatott gélről vittük át a fehérjéket egy nitrocellulóz membránra, majd dezmin monomerre specifikus



16. ábra:
Immunoblot a dezminen

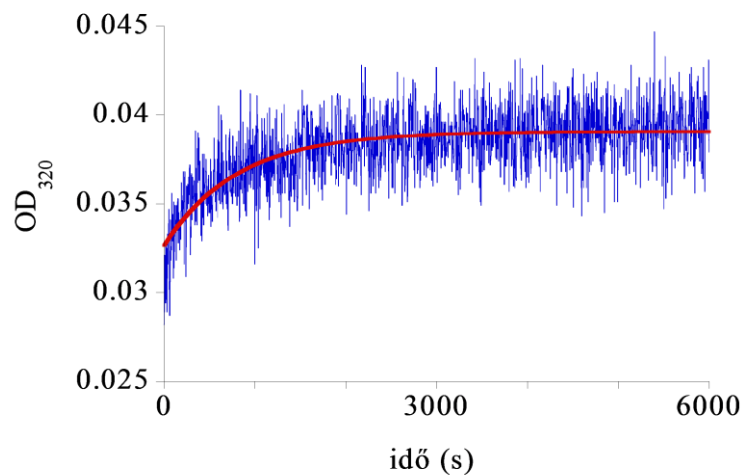
monoklonális antitesttel jelöltük meg a fehérjéket. A jelölés eredményességét egy az első antitestre specifikus másodlagos antitesttel vizsgáltuk, melyhez kovalensen kötött peroxidáz enzim feketés színreakciót eredményezett a NiCl₂-DAB szubsztráton (**16. ábra**). A membrán jobb oldalán a ceruzával berajzolt vízszintes vonalak az SDS-6H molekulasúly-standard komponenseinek helyét jelölik, melyek specifikus immunreakció hiányában nem látszódnak a membránon, de előzőleg Ponceau-S festékkel ideiglenesen festődtek.

4.3. A dezmin polimerizációja

A 320 nm-en végzett fényeszórás mérés (17. ábra) készített görbén látható a polimerizáció exponenciális kinetikája, melyre az

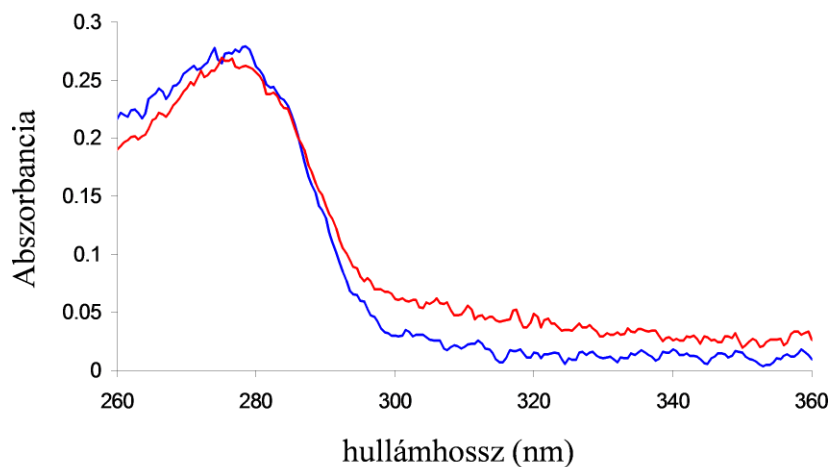
$$y = m_1 + m_2(1 - e^{-m_3 x}) \quad (11)$$

egyenletet illesztettük, ezt mutatja a piros görbe. Az egyenletben szereplő m_1 a minta fényeszórása a $t=0$ időpontban (y-tengelymetszet), m_2 az exponenciális kinetika



17. ábra: A dezmin fényeszórás változása 2 órás polimerizáció alatt

amplitúdóparamétere, míg az m_3 tag a reakció sebességi állandója $= 0,0012 \text{ s}^{-1}$. Ennek megfelelően a polimerizáció időállandója $\sim 800 \text{ s}$, így nagyjából 1 óra elteltével már csaknem teljes a polimerizáció. Így a filamentumok vizsgálatához célszerű legalább 1

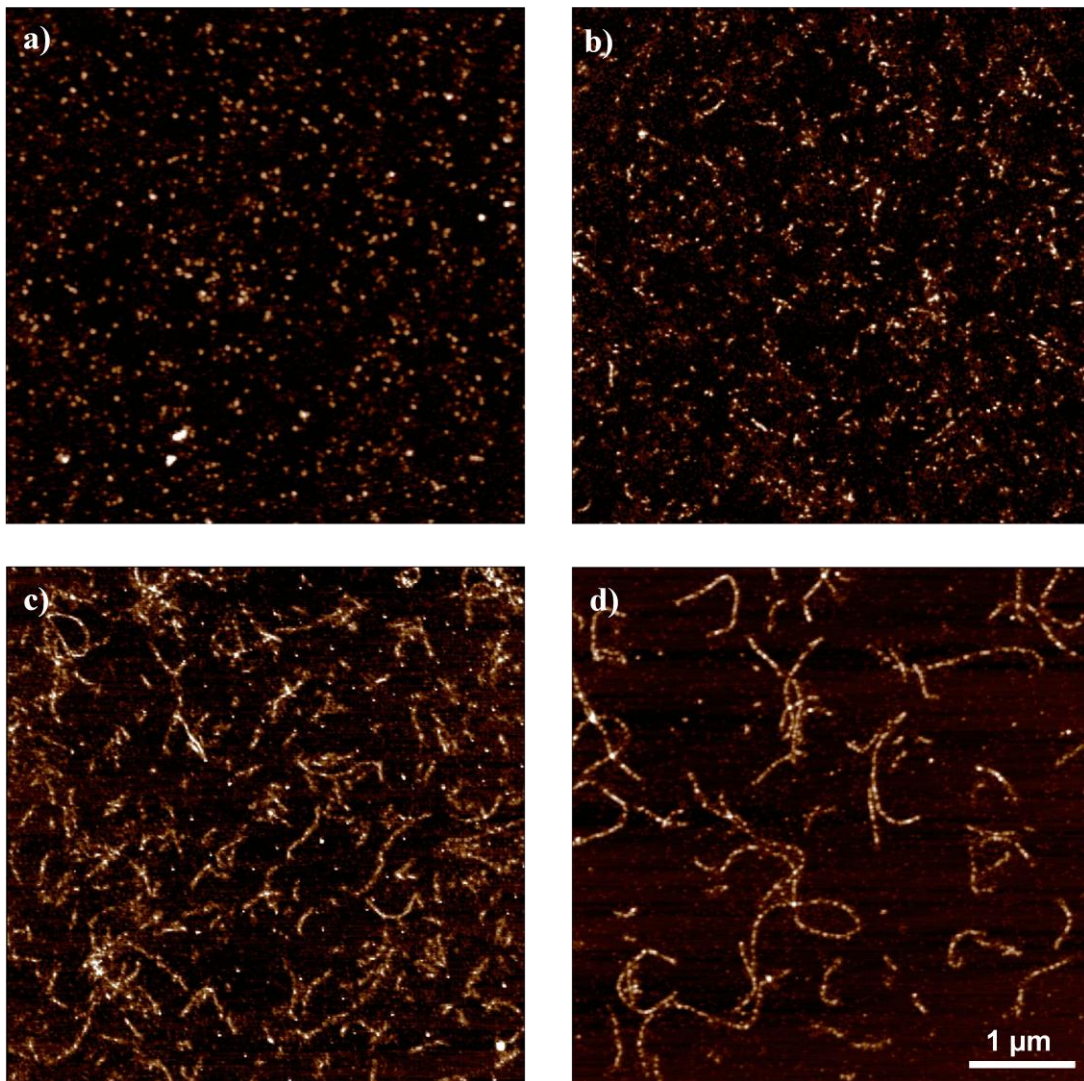


18. ábra: A dezmin spektruma a polimerizáció előtt (kék görbe), és a polimerizáció után (piros görbe)

órán át polimerizálni a dezmin. A polimerizációt követően a dezmin spektrumában a 300 nm felett megnövekedett OD értékek a filamentumok számának, és ezzel azok fényszórásának növekedésével kapcsolatosak (**18. ábra**).

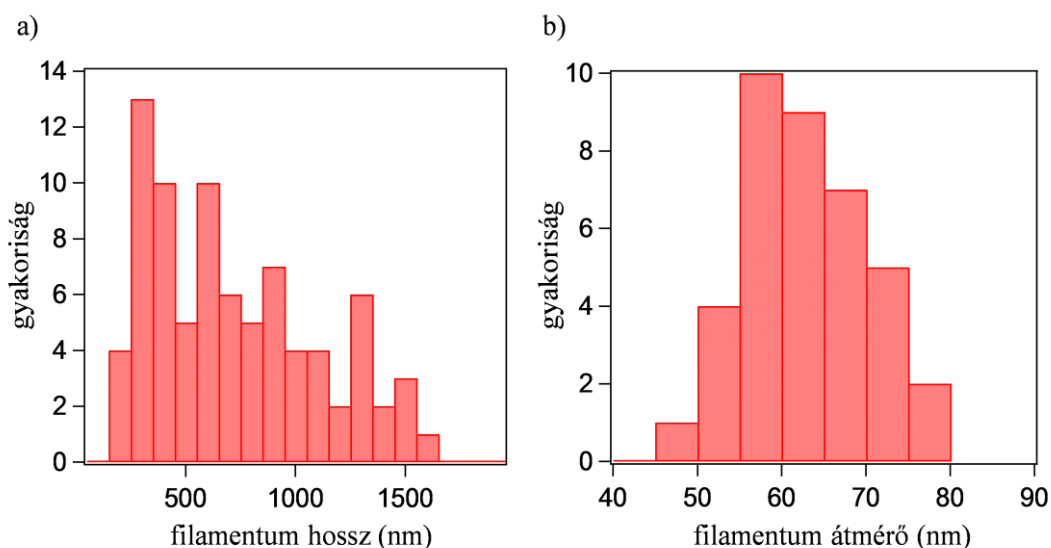
4.4. Dezmin filamentumok morfológiája AFM-mel

A dializált dezmin polimerizációját NaCl-imidazol, illetve MgCl₂-imidazol pufferekkel végeztük. A polimerizáció indítását követően 20 µl mintát cseppentettünk a hordozófelületre, majd a nem kötődött filamentumokat desztillált vízzel mostuk le, végül a mintát nitrogéngázzal szárítottuk. A polimerek morfológiáját, valamint a polimerizáció kinetikáját MFP-3D műszerrel vizsgáltuk. A képalkotáshoz „tapping”



19. ábra: a dezmin NaCl indukált polimerizációja. Az egymást követő felvételek 1 perc, 20 perc, 2 óra és 2 nap polimerizációt követően készültek.

üzemmódot használtunk, azaz a pásztázás során nagy rezonanciafrekvenciával rezgettük a rugólapkát a felszín közelében. Mivel ilyenkor nem alakul ki jelentős kölcsönhatás a tű hegye és a felszínen levő molekula között, így ez a módszer kiválóan alkalmas puha biológiai minták vizsgálatára. NaCl hozzáadásával indítva a polimerizációt, percek belül megjelennek a filamentumok (**19. ábra**). A polimerizációban és a morfológiában nem tapasztaltunk lényeges különbséget a NaCl-dal, illetve $MgCl_2$ -dal kezelt minták esetén. A filamentumok hossza 100 nm és 1,6 μm között multimodálisan oszlik meg, az 1 μm -nél rövidebb filamentumok előfordulása jellemzően gyakoribb (**20. ábra a**). Az AFM-mel készült képek alapján mért filamentum átmérők normál eloszlást közelítenek 60 nm körüli várható értékkel (**20. ábra b**).

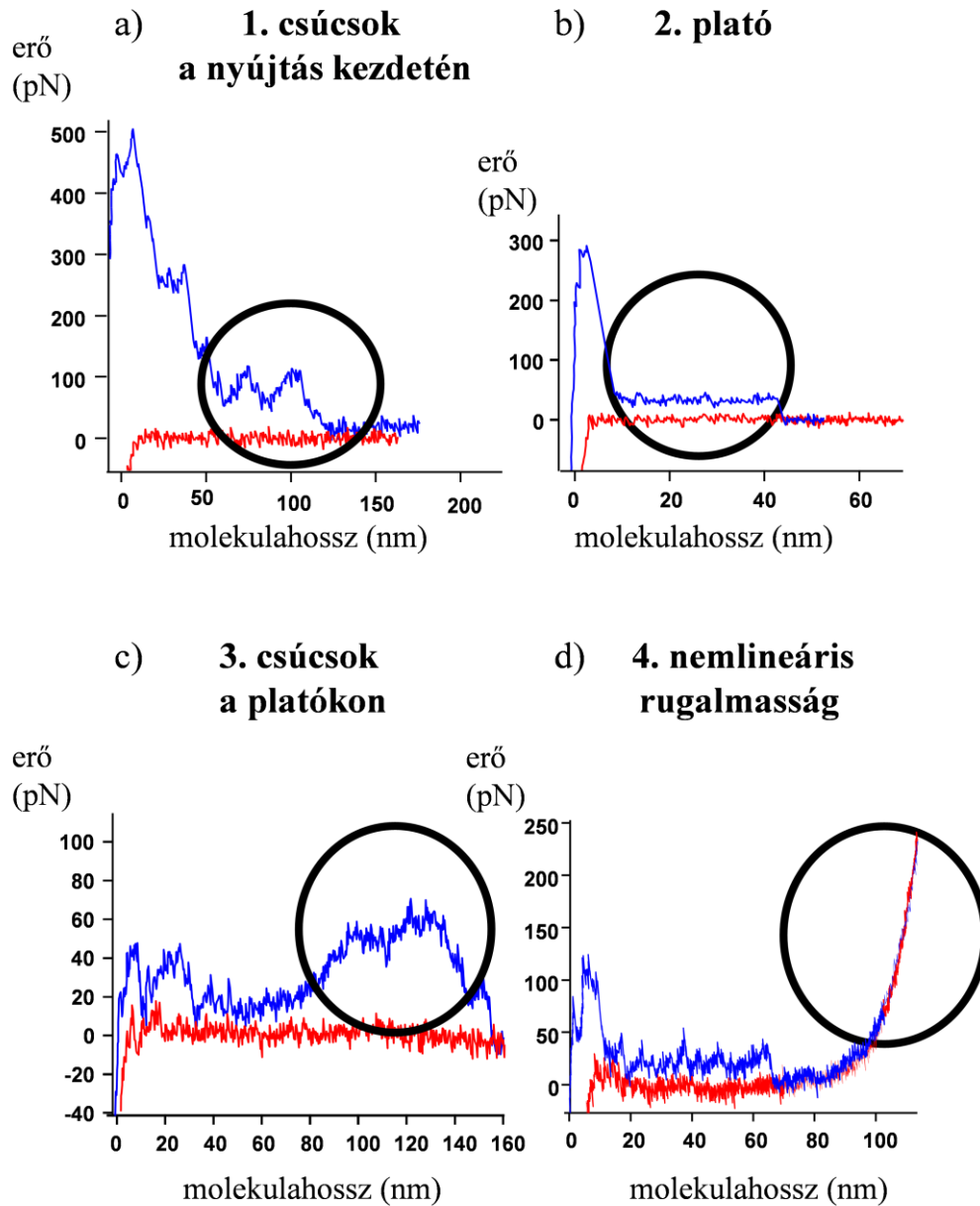


20. ábra: A pásztázott képek alapján mért filamentum hosszok és átmérők

4.5. A dezmin rugalmas erőválaszának mérése

20 μl polimerizált dezmint 10 percig inkubáltunk a hordozófelszínen, majd mosást követően hígító pufferben MFP-1D berendezéssel regisztráltuk a dezmin rugalmas erőválaszát. A dezmin molekulákat nonspecifikusan az MFP-rugólapka végén levő tűvel fogtuk meg, majd feszítés-relaxáció ciklusokban manipuláltuk. A mérés során a molekulában kifejlődő rugalmas erőt néztük a megnyúlás függvényében, az adatokat grafikusán ábrázoltuk, majd elemeztük. A megnyúlás a felszín és az AFM tű közötti távolságot jelenti, ami a gyakorlatban a megfogott molekulaköteg vég-vég távolságával

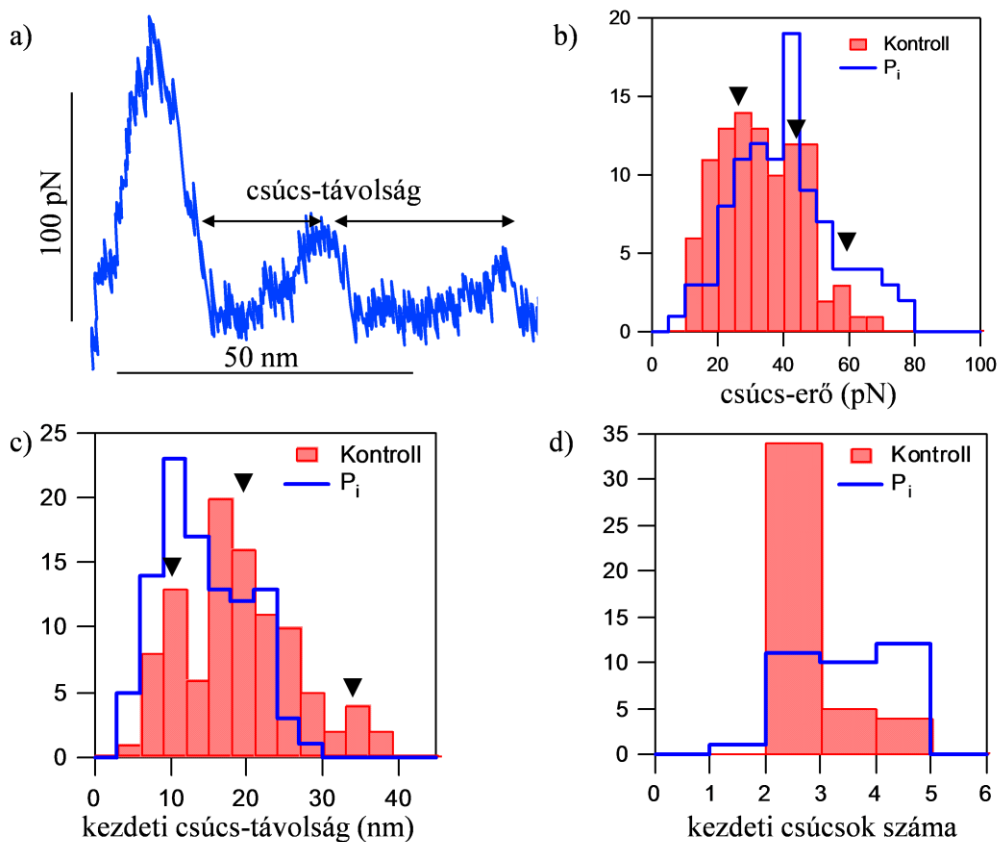
egyenlő. Négyféle, egymástól eltérő, jellegzetes mechanikai választ regisztráltunk a manipuláció során, ezek pedig a következők voltak: 1) csúcsok a nyújtás kezdetén, 2)



21. ábra: A dezmin jellegzetes molekulahossz-rugalmas erő függvényei.

állandó nagyságú erő mellett tapasztalt megnyúlás, mely az erőgörbéken „plató” formájában jelentkezik, 3) a platókra szuperponálódó csúcsok, 4) nemlineáris rugalmasság (21. ábra). Gyakran fordult elő a fenti alapjelenségek komplex kombinációja egyazon feszítés-relaxációs ciklus során is. Egy jellegzetes molekulahossz-erő függvény grafikonja egy teljes húzási ciklust ábrázol: a kék görbe

mentén a molekula húzása történt, míg a piros görbe a visszaengedést mutatja. Az első csúcscsoport a görbe felszálló szárán rendszerint a rugólapka és a hordozófelszín kölcsönhatásának eredménye, míg a további csúcsok jellemzőek a megnyújtott molekula belső szerkezeti átmeneteire, vagy jelezhetik a felszint borító molekulahalmazból a húzás hatására kiszakadó egyedi molekulákat. A mechanikai manipuláció során gyakori jelenség volt, hogy a húzás és visszaeresztés során mért erők azonos megnyúlás mellett különböztek, azaz a mechanikai rendszer más utat járt be a két esetben (erőhiszterézis).



22. ábra: Erőválaszok a dezmin filamentum nyújtásának kezdetén. Kontroll: polimerizált dezmin, P_i : foszfátkezelt dezmin.

4.5.1. Csúcsok a nyújtás kezdetén

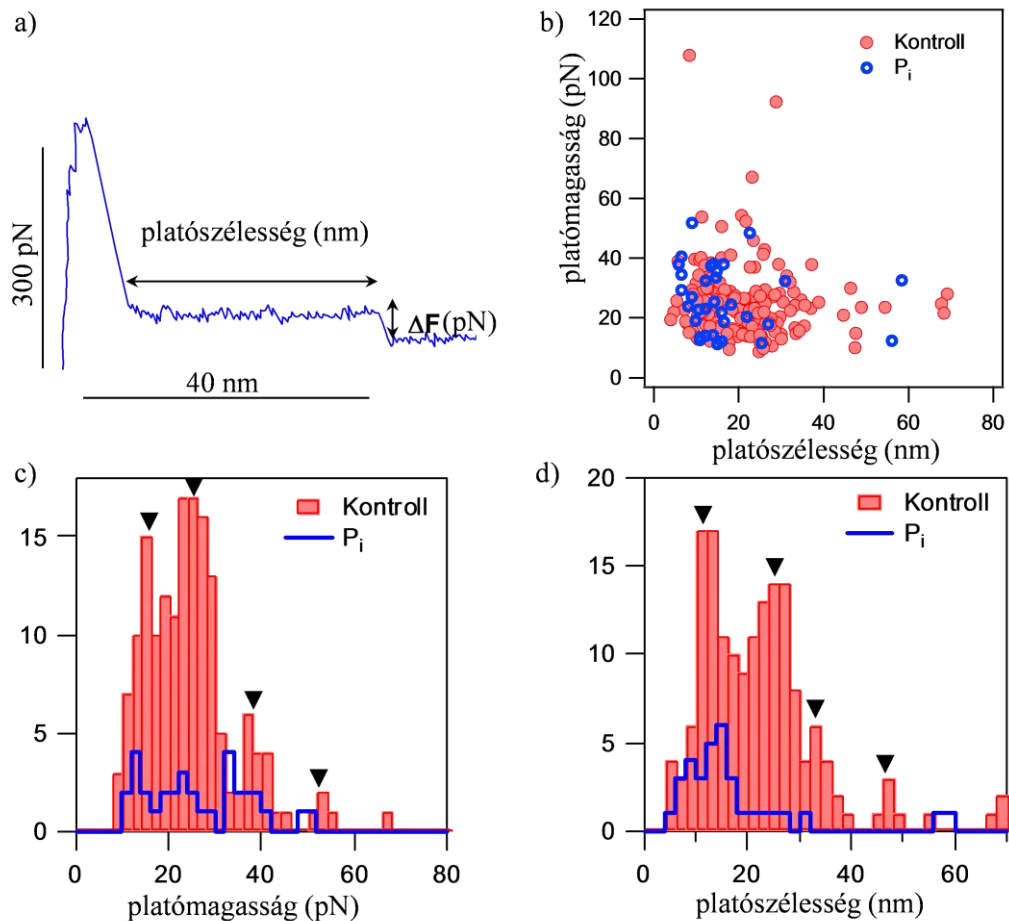
A nyújtás kezdetén megfigyelhető csúcsokat egy átmeneti, viszonylag rövid platóként definiáltuk, mely egy fokozatosan felfutó, illetve egy fokozatosan csökkenő szakaszú erőválaszt jelent a nyújtás kezdetén (**22. ábra a**). A nyújtás kezdeti csúcsok fontos kritériuma volt az erőválaszhoz kapcsolódó megnyúlás: ennek maximális értékét

az ULF hosszában (60 nm) határoztuk meg (Herrmann és Aebi 2004; Kreplak és mtsai 2004). Az analízis során a csúcs-távolság, a csúcshoz tartozó erő, illetve a megfigyelhető csúcsok száma alapján hisztogramokat készítettünk. Az elemzés során vizsgáltuk, hogy a gyakorisági eloszlás hogyan változik foszfátkezelés (P_i) hatására, itt az érett, polimerizált dezmin filamentumokat tekintettük viszonyítási alapnak. Az erőválasz nagysága, illetve a közben mért megnyúlás között nem találtunk korrelációt, így feltehetően a két paraméter egymástól függetlenül alakul. A nyújtás kezdetén mért maximális erő multimodális eloszlást mutat (22. ábra b), nagyjából 22, 44 és 60 pN értékek fordultak elő a leggyakrabban. A nyújtás kezdetén tapasztalt hossznövekmény is multimodális eloszlású, 11, 22, 33 nm körüli helyi maximumokkal (22. ábra c). A kezdeti erőátmenetek száma leggyakrabban kettőnek adódott egy húzási cikluson belül, de egyetlen esetben sem tapasztaltunk 4-nél több csúcsot egy ciklus során (22. ábra d). Foszfátkezelés hatására a kezdeti csúcs-távolság a kisebb értékek irányába tolódott, illetve átlagosan nagyobb számú csúcs volt tapasztalható az egyes húzási ciklusok során.

4.5.2. Erőplatók analízise

A dezmin mechanikai manipulációja során megfigyelt másik jelenség az úgynevezett „plató” (23. ábra). Ilyenkor a rugólapka tűjével megragadott molekulaköteg nyújtása során fellépő erő konstans értéken marad, majd bizonyos megnyúlás elérése után hirtelen lecsökken. Egy erőátmenetet abban az esetben tekintettünk platónak, amennyiben a visszaengedési görbével párhuzamos, nem mutat jelentős erőfluktuációkat, illetve nincsen felfutó / lefutó szára, hanem az erő hirtelen lecsökken a plató végén. A platók analízise során a platómagasságot (ΔF) és a plató szélességét vizsgáltuk (23. ábra a). Gyakran tapasztaltunk lépcsőzetes erőválaszt is, ahol több plató szekvenciálisan követte egymást. A platómagasság és platószélesség között az érett dezmin filamentumok esetében nem mutatkozott korreláció (23. ábra b), azaz a platóhoz tartozó erő független az erőválasz során mért megnyúlástól. A platómagasság hisztogram multimodális eloszlást mutat, a csúcsok rendre 13, 26, 39 és 52 pN erőknél jelentkeznek (23. ábra c). A platószélesség-eloszlás is multimodális, a csúcsok 12, 24, 36 és 48 nm körül figyelhetők meg. Na-foszfát jelenlétében sem a platómagasság eloszlása, sem pedig a platószélesség-hisztogram nem változott meg jelentősen.

Kiemelendő azonban, hogy foszfátkezelés esetén az erőplatók jellemzően jóval ritkábban fordulnak elő, ennek megfelelően mind a platómagasság, mind pedig a platószélesség hisztogramok értékelése fenntartásokkal kezelendő.

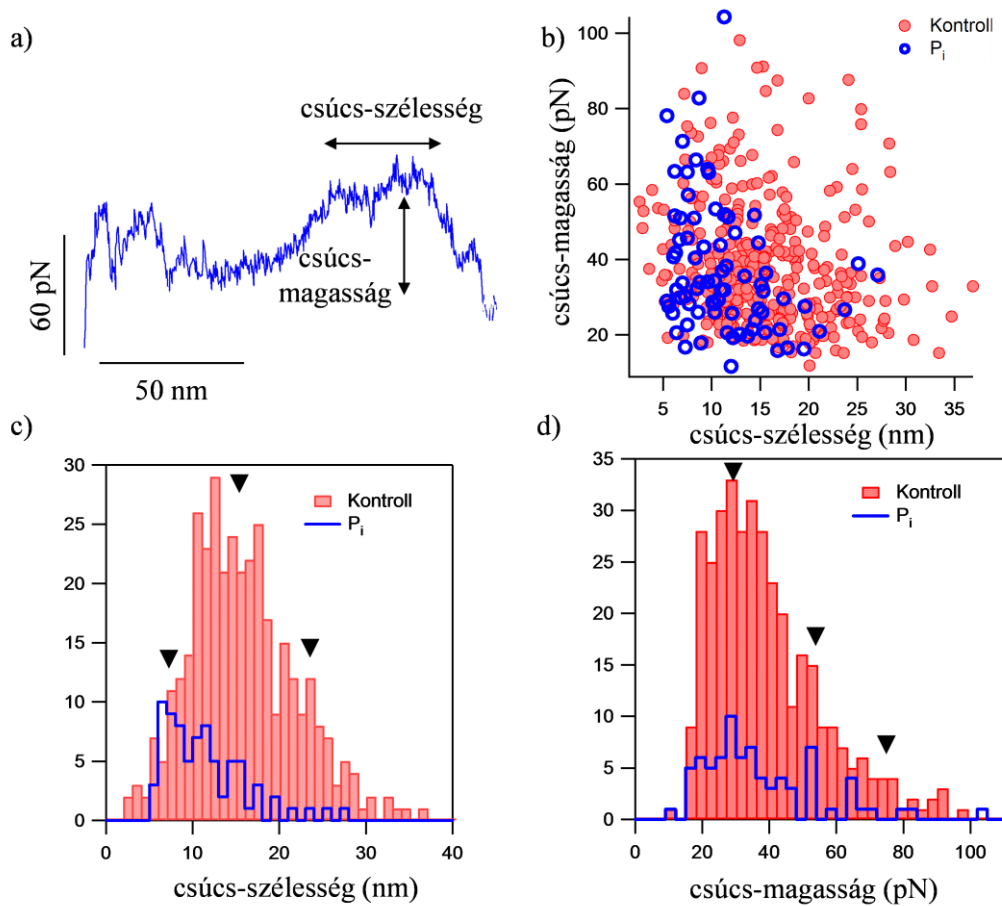


23. ábra: Erőplatók a dezmin nyújtása során. Kontroll: polimerizált dezmin, P_i : foszfátkezelt dezmin.

4.5.3. A platókra szuperponálódó csúcsok elemzése

Amennyiben a már korábban említett, felfutó és lefutó éllel jellemezhető erőválasz összességében 60 nm-nél hosszabb megnyúlással jár, azaz a megnyújtott molekula hossza meghaladja az ULF hosszát, akkor erőplatóra szuperponálódó csúcsként vettük figyelembe. Hasonlóan a nyújtás kezdetén észlelt csúcsokhoz, a platókra szuperponálódó csúcsok esetén is mértük a csúcshoz tartozó erőt, azonban mivel itt a csúcsok egy mérhető szélességű platóra szuperponálódnak, nem az egymást követő csúcsok távolságát, hanem a platóra szuperponálódó csúcsok szélességét

elemztük (24. ábra a). Hasonlóan a korábbiakhoz, a csúcsok szélessége, illetve a csúcshoz tartozó maximális erő nem korreláltak egymással (24. ábra b). A csúcsok szélességének gyakorisága 8, 16 és 24 nm-nél mutatott halmozódást (24. ábra c), míg az erők esetében 25, 50 és 75 pN-os lokális maximumokat találtunk (24. ábra d).



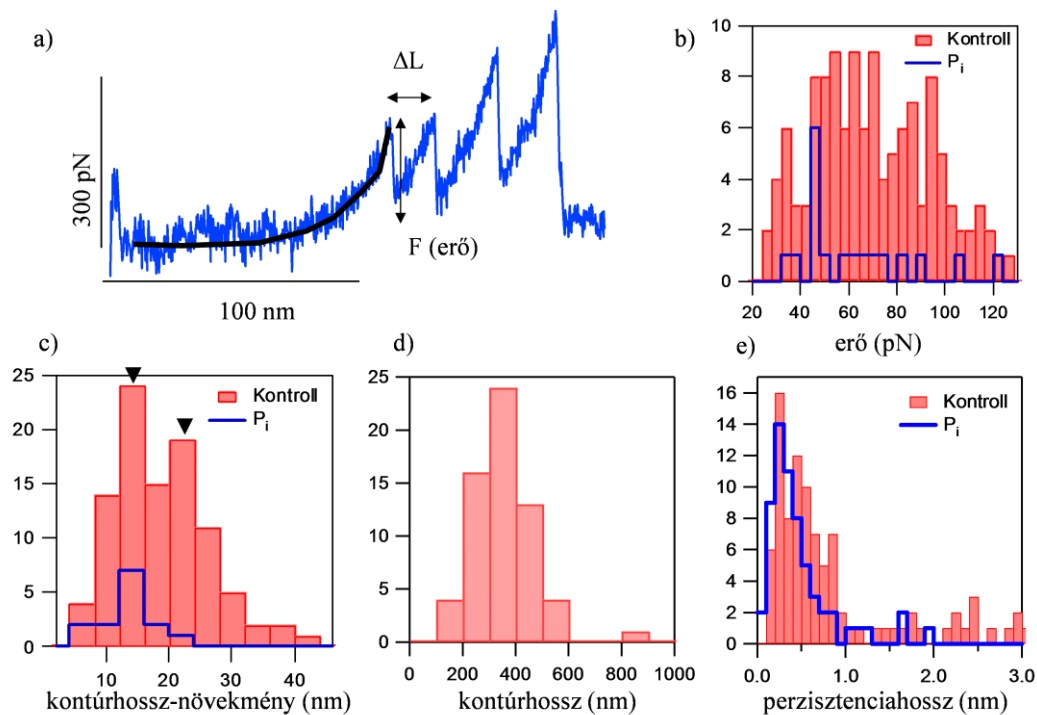
24. ábra: A platóra szuperponálódó csúcsok analízise. Kontroll: polimerizált dezmin, P_i: foszfátkezelt dezmin.

Foszfátkezelés hatására a platóra szuperponálódó csúcsok szélessége a kisebb értékek felé tolódott el, viszont a maximális erő eloszlása nem változott lényegesen a kontrollhoz képest.

4.5.4. Nemlineáris rugalmasság a nyújtás során

Nagyobb, jellemzően 200 nm feletti megnyúlás esetén nemlineáris, fűrészfog-szerű, ismétlődő erőválaszokat regisztráltunk. Ez a fűrészfog-mintázat rendszerint olyan polimerláncok nyújtásakor jelentkezik, melyeknél a kontúrhossz hirtelen lépésekben növekszik a nyújtás során. A nemlineáris rugalmasság általunk meghatározott kritériuma egy nemlineárisan emelkedő erőválasz, amely a maximális értékének elérését

követően hirtelen lecsökken további erőátmenetek nélkül (**25. ábra a**). A fűrészfogak a dezmin megnyújtásakor gyakran erőplatókra szuperponálódtak. A fűrészfogakhoz tartozó erő multimodális eloszlást mutat, 30 pN-os elemi erővel, valamint annak egész számú többszöröseivel (25. ábra b). Foszfátkezelés hatására a nemlineáris erőválasz nagysága átlagosan a kisebb erők irányába tolódott. Az erőhatásra bekövetkező kontúrhossz-növekmény (ΔL) inkább bimodális, 12 és 24 nm-nél mutat halmozódást (25. ábra c), mely foszfát jelenlétében az alacsonyabb, 12 nm-es csúcs irányába tolódott. A mechanikai manipuláció során a molekulában kifejlődő maximális erő több száz pN is lehet. Az nemlineáris erőválasz további analízise során görbéinkre a féregszerű, vagy Wormlike Chain (WLC) polimer modellt illesztettük. A modellt leíró hiperbolikus egyenlet (1) a 25. ábrán bemutatott görbe leszálló szárának hordozófelszínhez közeli részére jól illeszkedik (fekete görbe), azaz a molekula mechanikus viselkedése ebben az erőtartományban jól közelíthető a WLC polimer modellel. A molekula vég-vég



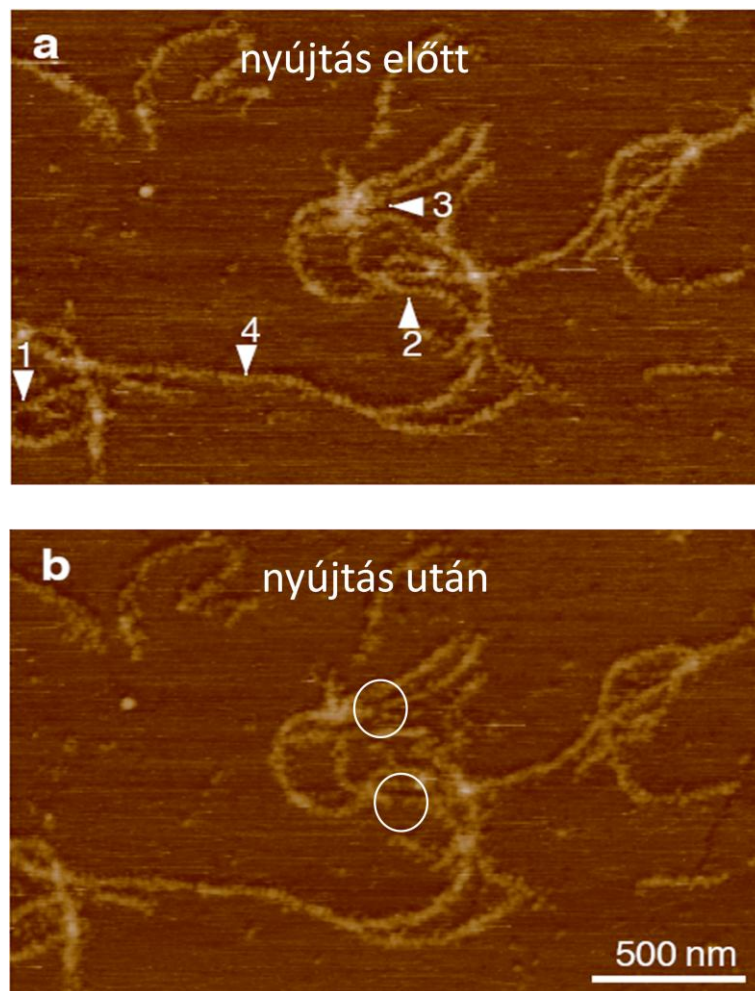
25. ábra: Nemlineáris erőválasz a dezmin nyújtása során. Kontroll: polimerizált dezmin, P_i : foszfátkezelt dezmin.

hosszának (megnyúlás), illetve a molekula nyújtásához szükséges erőnek az ismeretében az (1) egyenlet felhasználásával lehetőségünk van a molekula kontúrja

mentén mérhető ún. kontúrhossz és a molekula hajlítómerevségét jellemző perzisztenciahossz meghatározására. A kontúrhossz-hisztogram alapján megállapítható, hogy maximálisan akár 800 nm hosszúságú dezmin molekulát is sikerült megnyújtani (25. ábra d), az átlagos kontúrhossz a manipulációk során 338 nm-nek adódott (± 116 nm SD). A perzisztenciahossz eloszlás erősen az alacsonyabb értékek irányába tolódott, az eloszlás módusza 0,4 nm körüli értéknek adódott a kontroll esetben, míg foszfátkezelt filamentumok esetében ennél is kisebb értékek voltak tapasztalhatók. A legnagyobb mért értékek 3 nm felettiéek voltak.

4.6. *In situ* AFM egyedi filamentumokon

Annak érdekében, hogy azonosítsuk, milyen molekuláris struktúra felelős a

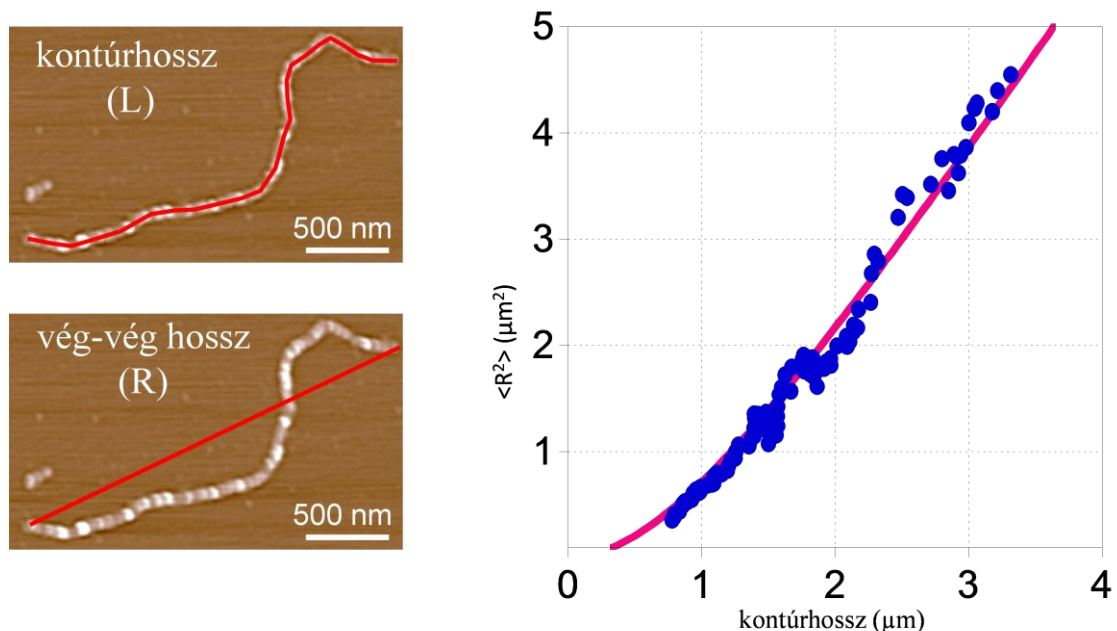


26. ábra: *In situ* AFM a dezmin filamentumokon.

rugalmas erőválaszért és a szerkezeti átmenetekért, az MFP-3D által készített topografikus kép kiválasztott pontján mechanikai manipulációt végeztünk az éppen ott levő biológiai mintán a rugólapka vertikális mozgásával (AFM és MFP kombinációja) (26. ábra). A módszer alkalmas arra, hogy a manipulálás után a filamentumban beállt jelentősebb szerkezeti változásokat megmutassa. A manipulációt megelőzően, és azt követően készült képekből a mechanikai perturbáció mértékére következtethetünk. A mechanikai manipulációt megelőzően készült képen számozott nyílhegyek jelölik a későbbi mechanikai manipulációk helyeit (26. ábra a). A nyújtás után készült képen (26. ábra b) csak a két körrel jelzett helyen látható a teljes filamentum keresztmetszetére kiterjedő feloldható folytonosságihiány, jóllehet valamennyi manipulált területről rugalmas, komplex erőválaszt nyertünk.

4.7. Perzisztenciahossz a geometriai orientáció-eloszlás alapján

A 10 perces inkubációs idő alatt a csillámfelületre adszorbeálódott dezmin filamentumok vég-vég hosszának, illetve kontúrhosszának ismeretében lehetőség nyílik a (8) egyenlet felhasználásával a teljes dezmin filamentumra jellemző rugalmassági

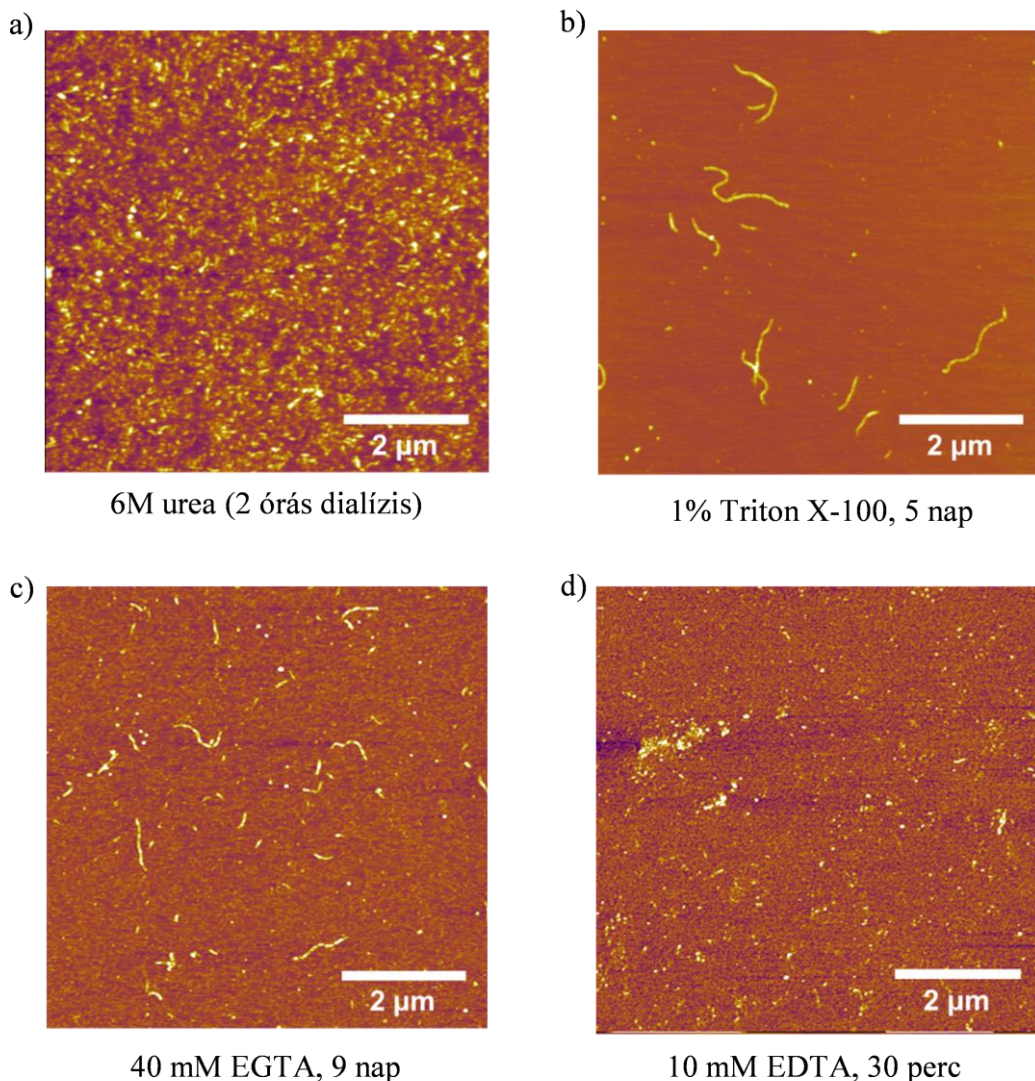


27. ábra: A dezmin filamentum perzisztenciahosszának meghatározása a felszínre adszorbeálódott filamentumok vég-vég hosszának és kontúrhosszának ismeretében paraméter, a filamentum perzisztenciahosszának (P) meghatározására. Az átlagos

négyzetes vég-vég távolság (R), illetve a kontúrhossz (L) közötti exponenciális függvény alapján a teljes filamentum becsült perzisztenciahossza $\sim 0,45 \mu\text{m}$ -nek adódott (27. ábra).

4.8. Dezmin filamentumok kémiai szétszerelése

A Mg^{2+} ionok jelenlétében bepolimerizált, érett dezmint 6M ureás dialízisnek, 1%-os Triton X-100 nemionos detergenssel történő kezelésnek, valamint 40 mM EGTA és 10 mM EDTA kezelésnek tettük ki (28. ábra). 6M ureában történő 2 órás dialízis

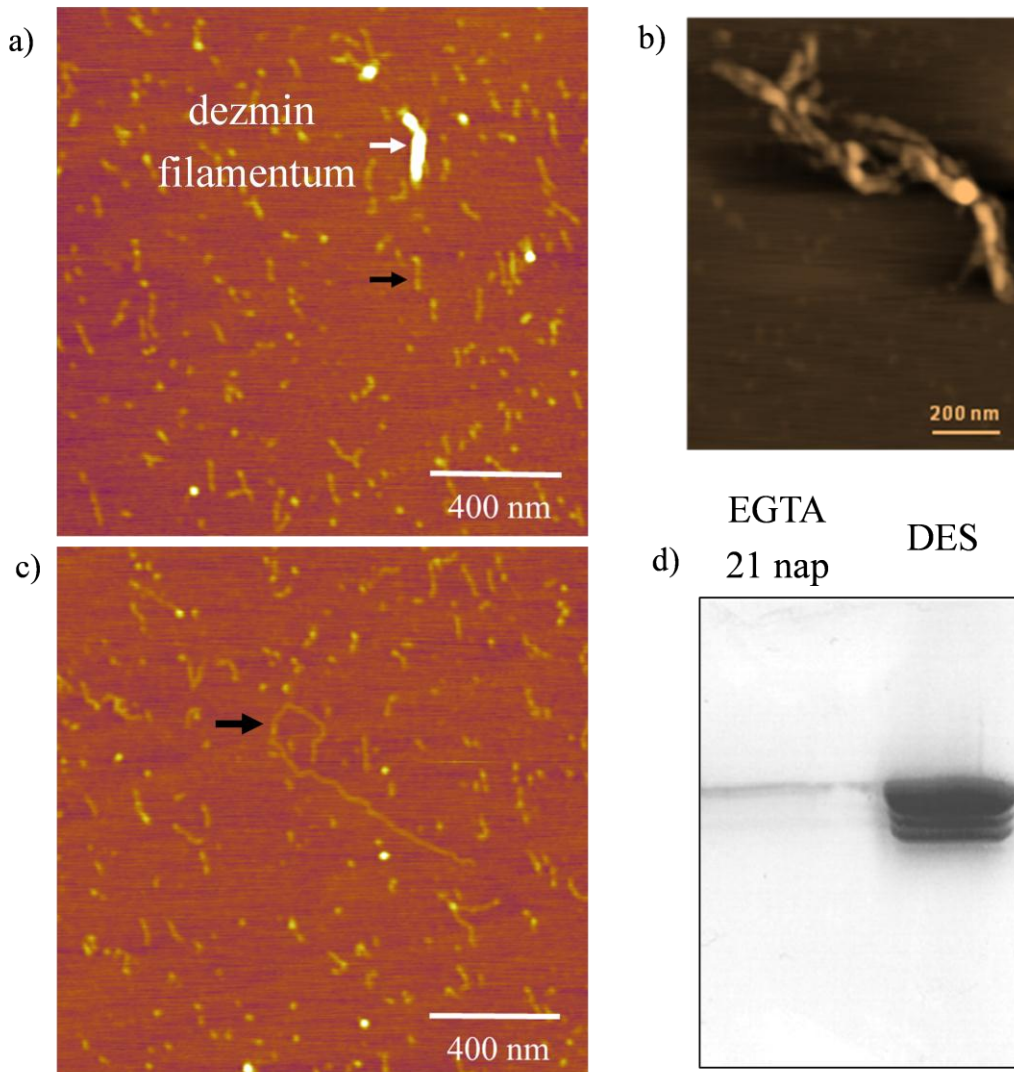


28. ábra: Detergensok és kationkelátorok hatása a dezmin filamentumokra teljesen szétbontotta a korábban jelen levő filamentumokat, a csillámfelszint nagy arányban 40-50 nm-es globuláris képletek borították (28. ábra a). 1%-os Triton X-100

nemionos detergenssel több napon át kezelve a filamentumokat, nem tapasztaltunk az egyedi filamentumok morfológiájában az AFM-mel feloldható változást (28. ábra b), viszont a Tritont nem tartalmazó mintákban jellemzően előforduló dezmin aggregátumok jóval ritkábban fordultak elő kisebb, 0,1%-os koncentrációjú Triton X-100 jelenlétében. Helyettük a különálló filamentumok fordultak elő nagy számban, megkönnyítve ezzel az egyedi filamentumok geometriai orientációjának analizését. Kétértékű kation-keletorok jelenlétében a kisebb számban jelen levő dezmin filamentumok mellett, azoknál jóval alacsonyabb, illetve kisebb átmérőjű fibrilláris szerkezetek jelentek meg. A Ca^{2+} ionokra specifikusabb EGTA esetében (K_d^{EGTA} , 20°C , $\text{pH}=7,4 = 60,5 \text{ nM}$) több napos inkubációra volt szükség, hogy megjelenjenek a fibrilláris struktúrák (28. ábra c). A Mg^{2+} ionokra specifikusabb EDTA esetében (K_d^{EDTA} , 20°C , $\text{pH}=7,4 = 2 \text{ nM}$) már kisebb koncentráció alkalmazásakor is percekben belül nagyon rövid fibrillumok tűntek fel a dezmin filamentumok mellett (28. ábra d). A továbbiakban ezen fibrilláris struktúrák morfológiáját elemeztük nagyfelbontású AFM-es képek segítségével.

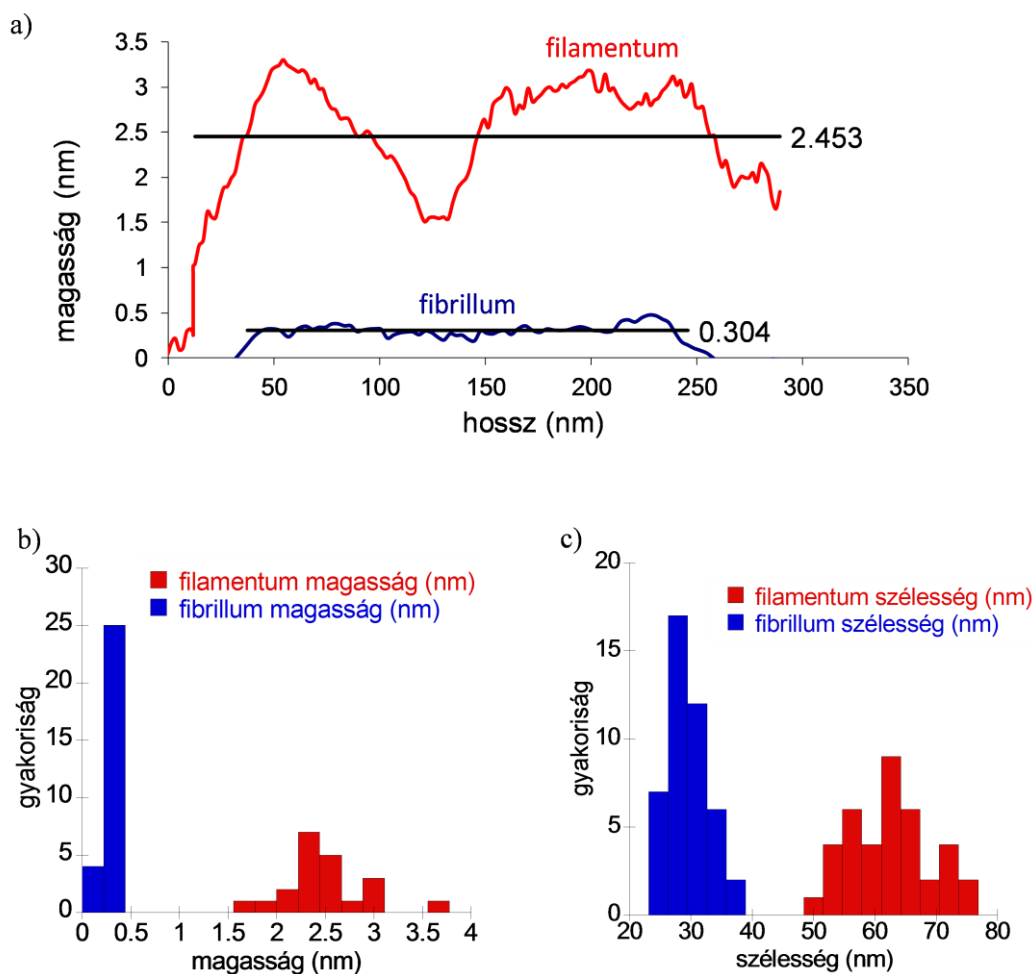
4.8.1. EGTA-kezelésre megjelenő fibrilláris struktúrák morfológiája

A nagyobb nagyítású AFM-es képen 9 napos 40 mM EGTA kezelést követően ábrázolódnak a dezmin filamentumok (**29. ábra** a, fehér nyíl), illetve jól elkülönülnek a dezmin filamentumnál laposabb és keskenyebb fibrilláris struktúrák (29. ábra a, fekete nyíl). Annak ellenére, hogy a legtöbb struktúra viszonylag rövid, néhány száz nm-es kontúrhosszú, akár $1 \mu\text{m}$ hosszúságú fibrillumot is találtunk (29. ábra c, fekete nyíl). Gyakran megfigyelhető volt, hogy ezek a vékony, alacsony fibrillumok egy vastag dezmin filamentumból tekeredtek ki (29. ábra b). Annak érdekében, hogy kizárhassuk a több, akár 21 napos inkubáció esetén esetleg felmerülő proteolízist, SDS-PAGE eljárással meggyőződünk arról, hogy a fibrilláris struktúrát tartalmazó minta nem tartalmaz fehérjefragmentumokat (EGTA, 21 nap), hanem a dezmin monomer molekulásúlyának megfelelő helyen (DES) tűnik fel az elektroforetogramon (29. ábra d). A fibrillumokat és a dezmin filamentumokat magasságuk, illetve az AFM-es kép alapján mért szélességük alapján összehasonlítottuk. Egyetlen dezmin filamentum kontúrja mentén magasságprofil-képet készítve az átlagos magasság $2,45 \text{ nm}$ (**30. ábra** a), ez összhangban van más kutatók vimentin intermedier filamentumokon végzett



29. ábra: Dezmin filamentumok kezelése 40 mM EGTA-val, (9 nap inkubáció). Az ábrán fekete nyilak mutatnak a fibrilláris struktúrákra, míg fehér nyíl mutat a dezmin filamentumra.

AFM-es magasságmérési eredményeivel (Kreplak és mtsai, 2008). A dezmin filamentum kontúrja mentén azonban jelentős magassági fluktuáció figyelhető meg, ennek varianciája $0,607 \text{ nm}^2$ -nek adódott. Ezzel szemben a fibrillumok jóval laposabbnak tűntek (30. ábra a: $0,3 \text{ nm}$), illetve rájuk nem volt jellemző a filamentumnál tapasztalt magassági fluktuáció. Az érett dezmin filamentumok magassága átlagosan $2,32 \text{ nm}$ ($SD=0,40 \text{ nm}$, $n=87$), míg a fibrillumok átlagos magassága $0,3 \text{ nm}$ ($SD=0,03 \text{ nm}$, $n=101$) (30. ábra b). A filamentumok AFM-es kép alapján meghatározott látszólagos szélessége (A) $62,3 \text{ nm}$ ($SD=6,71 \text{ nm}$, $n=38$), míg a vékony fibrillumok hasonló paramétere $30,05 \text{ nm}$ ($SD=3,76 \text{ nm}$, $n=44$). A látszólagos szélesség az AFM tű és a minta konvolúciója miatt korrekcióra szorul, így a (6)



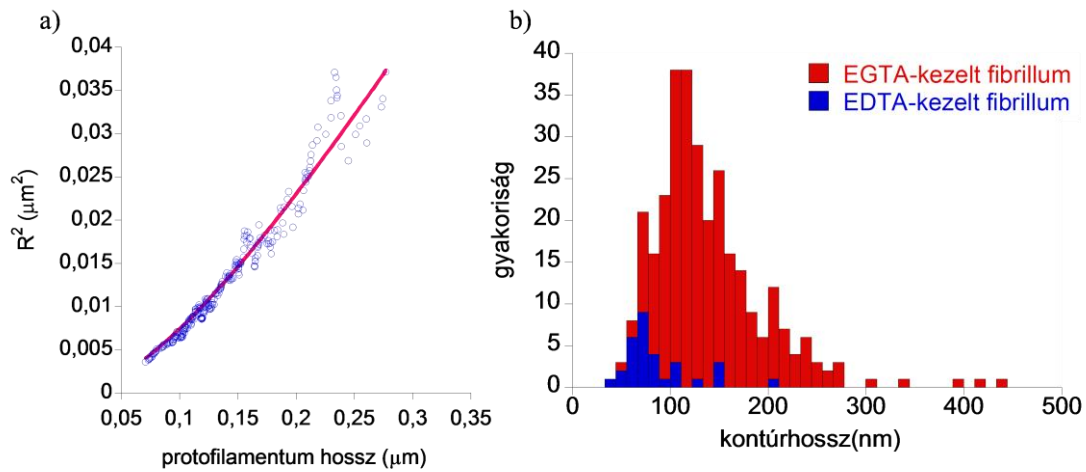
30. ábra: EGTA-kezelést követően megjelenő fibrillaris struktúrák és a dezmin filamentumok morfológiájának összehasonlítása

egyenlet segítségével korrigált valós szélesség (w) a dezmin filamentumok esetében 50,6 nm, míg a fibrillumok esetében 25,52 nm.

4.8.2. Fibrillumok rugalmassága a geometriai orientáció-eloszlás alapján

A csillámra kitapadt dezmin filamentumok esetében elvégzett geometriai orientáció-eloszlás analízist elvégeztük az EGTA-kezelt fibrillumokon. Az átlagos négyzetes vég-vég hossz (R) és kontúrhossz (L) ismeretében a fibrillumok perzisztenciahossza 0,05 μm , míg a (9) egyenlet alapján becsült Young-modulus 10,6 MPa (31. ábra a). Az EGTA- és EDTA-kezelt fibrillumok esetében a kontúrhosszak eltérőnek adódtak, az EDTA kezelés hatására jellemzően nagyon rövid fibrillumok keletkeztek már nagyon rövid inkubációs idő után (26. ábra d). A multimodális

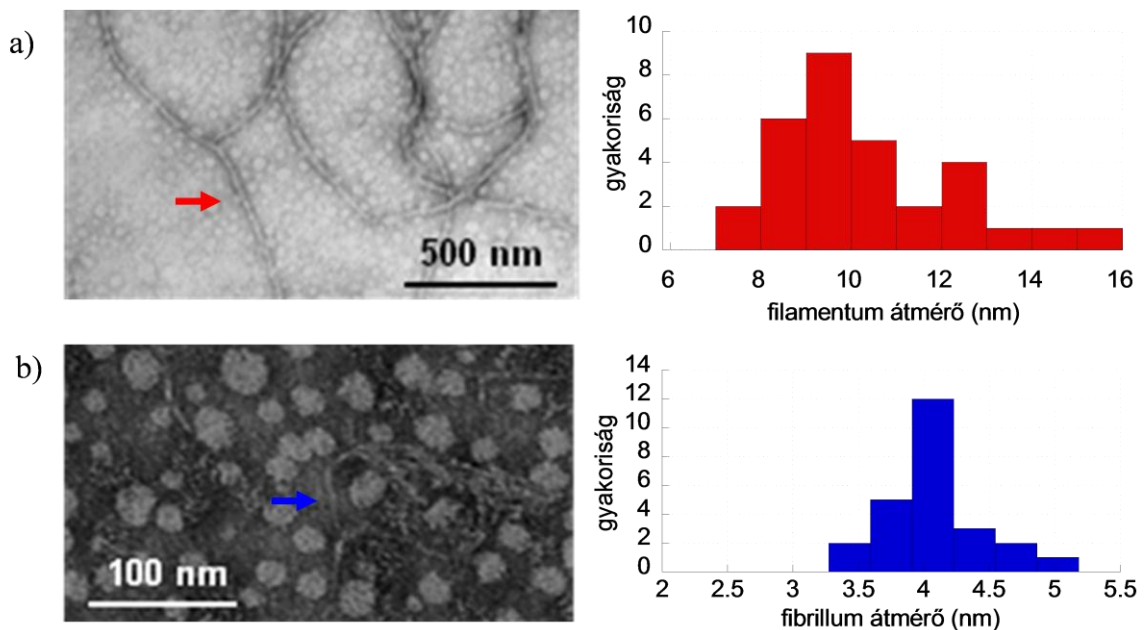
kontúrhossz-eloszlás alapján meghatározható elemi hosszegység 60 nm körüli mind az EGTA, mind pedig az EDTA kezeléseket esetében (31. ábra b).



31. ábra: A dezmin fibrillumok rugalmassági paramétereit

4.9. Elektronmikroszkópia a filamentumokon és fibrillumokon

A dezmin filamentumok, valamint az EGTA- és EDTA-kezelés hatására megjelenő fibrillumok morfológiáját transzmissziós elektronmikroszkóppal is megvizsgáltuk. A dezmin filamentumok átmérője átlagban 10,3 nm (30. ábra a), míg a fibrillumok átlagos átmérője 4,1 nm (30. ábra b).



30. ábra: Dezmin filamentumok és protofibrillumok elektronmikroszkópos morfológiája

5. Megbeszélés

5.1. Dezmin izolálása és polimerizációja

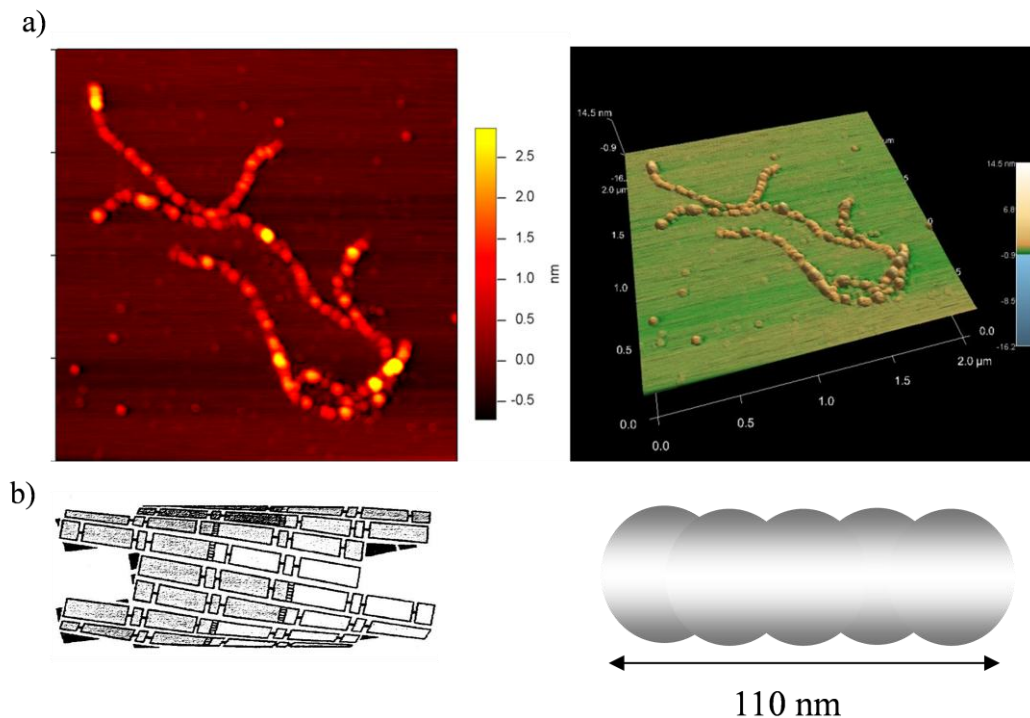
Mivel a dezmin meglehetősen stabil fehérje (Geisler és Weber, 1980), az izolálás során erősen denaturáló körülményekre volt szükség, míg a csirke zúzában filamentális struktúrát alkotó dezmin monomer formájában kinyertük. A monomerekből sók (NaCl vagy $MgCl_2$) hozzáadásával kialakuló filamentumok oldatban is meglehetősen stabilak, $4^\circ C$ -on több hónapon át tárolva sem degradálódnak (Kiss és mtsai, 2006). A Na^+ , illetve Mg^{2+} jelenlétében polimerizálódott dezmin filamentumok nem mutattak AFM-mel feloldható morfológiai eltérést, így vélhetően az ionok mérete, illetve töltésük értéküské nem játszik jelentős szerepet a polimerizáció során. Az ionos kölcsönhatásoknak a tetramerek oldalirányú összekapcsolásában lehet jelentős szerepük (Geisler és mtsai, 1992). Irodalmi adatok (Mücke és mtsai, 2004) szerint az intermediér filamentumok polimerizációjához szükséges minimális monomerkoncentráció $0,1$ mg/ml körüli. Mivel az izolálás során egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban álltak rendelkezésünkre monomerek, a dezmin polimerizációjában ez nem jelentett korlátozó tényezőt. Az immunoblot eljárással specifikusan voltak kimutathatók a dezmin monomerek, az 53 kDa molekulásúlyú fehérje azonban gyakran több, $2-3$ egymáshoz közeli sávban volt megtalálható a gélelektroforetogramon, melyek mindegyike immunoreaktívnak bizonyult, tehát tartalmazta a megfelelő epitópot (16. ábra). Más epitópra specifikus antitesttel (Cell Signaling 4024) is elvégeztük az immunoblot eljárást, mely hasonló eredménnyel zárult, amennyiben nagy mennyiségben vittünk fel dezmin a géltre.

5.2. Dezmin morfológiája atomerőmikroszkóppal vizsgálva

Az AFM-es képek alapján az érett dezmin filamentum átmérőjét nagyjából 30 nm-esnek mértük. Ez 2 jelenségre vezethető vissza: $1)$ a filamentumok folyadék-közegben, illetve beszárítást követően a hordozófelszínen ellapulnak; $2)$ vékony, néhány nm-es kiterjedésű struktúrák vizsgálatakor az AFM oldalirányú felbontását nagymértékben meghatározza a minta és a rugólapka tujének kölcsönhatása,

konvolúciója. A tű görbületi sugara kb. 10 nm, mely pásztázáskor a filamentumon mintegy „átgördülve” kétszer is hozzáadódik a filamentum valós szélességéhez ($30 \text{ nm} = 10 \text{ nm}$ átmérőjű filamentum + 10 nm -es átmérőjű tű a filamentum előtt + 10 nm -es átmérőjű tű a filamentum után). A két tényező együttes következménye a filamentumok látszólagos kiszélesedése, mely összhangban van az egyéb intermedier filamentumok AFM-es vizsgálatára vonatkozó irodalmi adatokkal (Ando és mtsai, 2004). Az átmérő pontosabb meghatározása a filamentum kerületének mérésével lehetséges, melybe már a filamentum lelapulását is belekalkuláljuk (6. egyenlet). Ilyen mérésekkel a filamentum átmérője az elektronmikroszkópos mérések eredményeihez hasonlóan nagyjából 10 nm (Tokuyasu, 1983), amelyet mi is igazoltunk.

A felszínről készített nagyfelbontású pásztázott kép alapján egy speciális algoritmussal elkészíthető a felszín háromdimenziós szoftveres képrekonstrukciója (**33. ábra a**). A pásztázott és a rekonstruált képen a filamentum szegmentálnak imponál, amely összhangban van mások vimentinre vonatkozó kísérletes megfigyeléseivel (Ando, 2004). A nem homogén kontúrú molekula nem lehet szárítási műtermék,



33. ábra: a) Desmin filamentum háromdimenziós rekonstrukciója. b) A szegmentált szerkezet lehetséges magyarázata a nem tengelyirányú tetramerek orientációja (Ando és mtsai, 2004 nyomán).

ugyanis folyadékban pásztázva is mefigyelhető a jelenség. Lehetséges, hogy a filamentum valós térszerkezetét kialakító protofilamentumok, vagy tetramerek nem a filamentum hossz tengelyével párhuzamosan helyezkednek el, hanem attól eltérő szögben, s ez vezet egy „csavart” szerkezet kialakulásához (33. ábra b).

5.3. Dezmin filamentumok nanomechanikája

5.3.1. Csúcsok a dezmin nyújtásának kezdetén

A dezmin nyújtásának kezdetén megfigyelt erőválaszok átlagosan 45 nm-es megnyúlást eredményeztek (csúcs-távolság), mely érték jó egyezést mutat a dezmin dimer hosszával (Herrmann és Aebi, 2004; Kreplak és mtsai, 2004). Kísérleteink során ez az erőválasz volt a leggyakrabban előforduló jelenség a dezmin manipulációjakor, ismételt nyújtások alkalmával nagymértékben reprodukálható volt. Megfigyeltük olyan esetekben is, amikor a mechanikai maipulációt követően a filamentum szerkezeti folytonossága megszakadt (26. ábra b). A fentiek figyelembe vételével a csúcsok eredetére utaló leginkább valószínű magyarázat a dezmin dimerek filamentum felszínéből történő kiszakítása lehet. A csúcsok számának analiziséből az következik, hogy ez a kiszakadás leggyakrabban egy kétlépcsős folyamat, amelyek legvalószínűbben 2 elektrosztatikus kölcsönhatás felszakadásának következményei (Herrmann és Aebi, 2004; Kreplak és mtsai, 2004) egy dimer fej és a szomszédos dimer között. Ritkán megfigyelhető volt a kezdeti erőválasz reverzibilitása, mely arra utalhat, hogy a kihúzott dezmin dimerek képesek visszaépülni a filamentumba.

5.3.2. Erőplatók és a platókra szuperponálódó csúcsok

A 60 nm-es hosszúságot meghaladó megnyújtott dezmin szálak esetében nagyon gyakran konstans erőt mértünk a nyújtás során, mely hirtelen lecsökkenve platót eredményezett az erőgörbén. Akkor lehetséges ilyen erőválasz, ha a mechanikai rendszer úgy képes megnyúlni, hogy közben nem szükséges járulékos erő a folyamathoz. Ilyen erőválaszok regisztrálhatók számos polimer hordozófelszínről történő leválasztásakor (Chatellier és mtsai, 1998; Haupt és mtsai, 1999; Conti és mtsai, 2001; Hugel és mtsai, 2001; Seitz és mtsai, 2003; Friedsam és mtsai, 2004), illetőleg β -lemezek amiloid fibrillumból történő kiszakításakor (Karsai és mtsai, 2005;

Kellermayer és mtsai, 2005). Ezekben az esetekben egy sor, a nyújtás irányában álló kötés egymás utáni felszakítása, „szétcipzározása” történik apró, a műszerrel fel nem oldható lépésekben. Mivel minden egyes kötés felszakításakor csak egyetlen kötés terhelődik, az erő így állandó marad a folyamat során. A dezmin esetében 3 lehetséges mechanizmus magyarázhatja az erőplatók létrejöttét: 1) protofilamentumok leválasztása a filamentum felszínéről; 2) coiled-coil dezmin domének kitekeredése és 3) coiled-coil dimerek egymás melletti elcsúszása. Mivel a platókra gyakran csúcsok szuperponálódtak, a fent vázolt szerkezeti átmenetek diszkrét lépésekben valósulnak meg. A nyújtás geometriája alapján a legvalószínűbb a protofilamentumok leválasztása, ugyanis a filamentum orientációja nem változott meg a manipulációt követően (26. ábra b). A nagyjából 10-60 pN nagyságú erők, melyeket kísérleteinkben mértünk, elegendőek lehetnek α -helikális szerkezettel rendelkező fehérjék kitekeréséhez. A kalmomodulin α -helikális doménje gyakorlatilag feloldhatatlanul kis erők hatására felszakítható (Carrion-Vazquez és mtsai, 2000), a miozin coiled-coil farki doménje 40 pN erővel már kitekerhető (Root és mtsai, 2006). A 22 nm-es elemi platószélesség, illetve a 16 nm-es platócsúcs-szélesség jól egyezik a nagyjából 20 nm-es irodalmi értékkel, mely az egymáshoz oldalirányban kapcsolódó dezmin dimerek átlapolásának hossza (Bär és mtsai, 2004; Herrmann és Aebi, 2004; Kreplak és mtsai, 2004). Ennek megfelelően a dimérek közti tengelyirányú elcsúszás is lehetséges magyarázata a platók kialakulásának. Ilyen esetben a dezmin feji doménje egy szomszédos dimer láncához kapcsolódva biztosítja a megnyújtott fehérjeszál folytonosságát.

5.3.3. Fűrészfog, illetve nemlineáris rugalmasság

Ritkán, 200 nm feletti megnyúlás esetén fűrészfogra emlékeztető erőválaszt regisztráltunk a dezmin filamentumok mechanikai manipulációjakor. Tipikusan ilyen erőválasz jellemző a β -hordó szerkezetű titin immunglobulin-domének kitekeredésére, melyeket egyetlen – az erőhatás irányába álló – hidrogénhid stabilizál. Amennyiben ezt a hidrogénhidat mechanikai erővel felszakítjuk, akkor a teljes domén hirtelen kitekeredése következik be a „minden vagy semmi” elv alapján (Rief és mtsai, 1997). A dezmin esetében megfigyelt kontúrhossz-növekmény 10-30 nm közötti, illetve a maximális erők 20-120 pN között alakultak, melyek jóval alacsonyabbak a titin immunglobulin domén kitekerésekor mért értékeknél. Nem valószínű azonban, hogy ez

az erőválasz dezmin domének kitekeredését jelzi, ugyanis az α -hélixek és coiled-coil domének már jóval kisebb erők hatására kitekerednek (Carrion-Vazquez és mtsai, 2000; Root és mtsai, 2006). Így leginkább a láncon belüli felszakadás vagy a megnyújtott fehérjelánc belső átrendeződése állhat a fűrészfogak háttérében. További lehetséges magyarázat, hogy a nyújtás során a dezmin dimer feji doménje a szomszédos dimereken addig csúszik, amíg új kötőhelyet nem talál: a kötődés magyarázhatja a hirtelen megemelkedő erőt.

A dezmin esetében viszonylag gyakran megfigyelt nemlineáris, entropikus rugalmasság számos biomolekulára, például DNS-re (Smith és mtsai, 1996) vagy titinre (Kellermayer és mtsai, 1997) jellemző. Egy fehérjelánc esetében akkor várhatunk tisztán rugalmas viselkedést, ha a megnyújtott fehérje mindkét végét stabilan sikerült megragadni és a fehérjeláncon belül viszkózus hatások, strukturális átrendeződés nincs jelen. A dezminnél tehát legvalószínűbben akkor fordulhat elő ilyen erőválasz, ha szubfilamentális egységek (protofibrillum, protofilamentum) erősen rögzülnek a rugólapkán, illetve a hordozófelszínen. A megnyújtott struktúrák hajlítómerevségét jellemző perzisztenciahossz módusza nagyjából 0,4 nm, a legnagyobb értékek 3 nm körüliek. Ezek az értékek 3 nagyságrenddel kisebbnek adódtak, mint az irodalomban az intermedier filamentum egyensúlyi rendszerben mért perzisztenciahossz értékei (Hohenadl és mtsai, 1999; Mücke és mtsai, 2004). Ez az igen alacsony átlagérték a denaturált, kitekert fehérje perzisztenciahosszával mérhető össze, amely így jellemző lehet a szubfilamentális dezmin-struktúrákra vagy akár a monomeren belüli kitekeredett doménekre, de semmiképp sem a teljes filamentumot jellemzi. A kontúrhosszak átlaga 340 nm, mely így meghaladja a dezmin dimer hosszát (amely 48 nm) és nagyjából duplája az elméletileg teljesen kitekert monomer polipeptidláncának általunk számított kontúrhosszának (a monomer 470 aminosavból áll, 1 peptidkötés hossza 0,38 nm, így az elméletileg teljesen kitekert fehérje kontúrhossza $470 \times 0,38 \text{ nm} = 178,6 \text{ nm}$). Ez aggregátumok, hosszanti irányban összeállt szerkezetek jelenlétére utalhat. A kb. 180 nm-nél kisebb értékek nem asszociálódtak, egyedi szubfilamentális molekuláknak felelhetnek meg. Ahhoz viszont, hogy két, sorosan kapcsolt dezmin dimer teljesen kitekerhető legyen, feltételeznünk kell egy megfelelően stabil (hosszanti vagy oldalirányú) kapcsolatot a két dimer között.

5.3.4. Foszfátkezelés hatása a dezmin rugalmasságára

Elektronmikroszkópos mérések alapján a foszfátkezelés a keratin filamentumok szétszerelődését indukálja (Aebi és mtsai, 1983), feltehetően a tetramereket összetartó ionos kölcsönhatások megváltoztatásával. A foszfátkezelt filamentumok erőválaszaiban legmarkánsabban az alábbi jelenségek voltak megfigyelhetők: 1) lecsökkent nyújtás kezdeti csúcs-távolság; 2) lecsökkent platószélesség; 3) lecsökkent kontúrhossz-növekmény és maximális erő a fűrészfog-mintázat esetén. Jellemző volt még emellett, hogy a nyújtás kezdetén megfigyelhető erőválasz rendszerint több (3-4) csúcsot tartalmazott. Fentiek figyelembe vételével a legvalószínűbb lehetőség, hogy a foszfátkezelés hatására a dezmin diméreket oldalirányban összetartó és ez által a protofilamentumot stabilizáló kötések száma, vagy erőssége lecsökken.

5.3.5. *In situ* AFM

A mechanikai manipulációk során nem minden esetben tapasztaltunk a teljes filamentum keresztmetszetére kiterjedő, AFM-mel feloldható folytonossághiányt, pedig rugalmas erőválasz ezekben az esetekben is regisztrálható volt (26. ábra b). A filamentum folytonos kontúrjának megszakításával járó nyújtási kísérletek sem okozták a dezmin filamentum orientációjának megváltozását, emellett a pásztázott képek alapján mért, filamentumot jellemző kontúrhosszak jóval nagyobbak a húzási kísérletben mértéknél. Mindezek figyelembe vételével húzáskor vélhetően nem a teljes filamentum erőválaszát regisztráltuk, hanem szubfilamentális szerkezeteket manipuláltunk. Ennek megfelelően a WLC-moddal kalkulált rugalmassági paraméter (0,4 nm-es perzisztenciahossz) sem a teljes filamentumra jellemző, hanem kisebb, szubfilamentális egységekre.

5.4. Perzisztenciahossz a geometriai orientáció alapján

A fentiek tükrében célunk volt egy, a teljes filamentum keresztmetszetére jellemző rugalmassági paraméter meghatározása. Mivel a dezmin filamentum végei nem foghatók meg szelekítven antitestekkel vagy kovalens keresztkötőkkel, a teljes filamentum keresztmetszetét jellemző perzisztenciahosszt vagy rugalmassági modulust a filamentum AFM tüvel történő oldalirányú szétvágásával (Kreplak és mtsai, 2004),

vagy egy mikromélyedés felett kifeszített filamentum AFM tűvel történő lenyomásával (Guzmán és mtsai, 2006) igyekeztek meghatározni. A csillámfelületre adszorbeálódott filamentumok geometriai orientáció-eloszlásából a vég-vég hossz és a kontúrhossz ismeretében lehetőségünk van a perzisztenciahossz meghatározására (8. egyenlet). Mivel a filamentumoknak kellően hosszú inkubációs idő állt rendelkezésre a leülepedésre, illetve nyíróerőknek nem voltak kitéve az ülepedés során, feltételezhetjük, hogy a felületre tapadt filamentumok orientációja tükrözi a korábbi, oldatbeli orientációt. Ennek megfelelően a dezmin filamentum perzisztenciahossza $0,45 \mu\text{m}$, míg a (9) egyenlet alapján becsült Young-modulusa $3,7 \text{ MPa}$, mely nagyságrendileg egyezik más intermedier filamentumok egyensúlyi rendszerben mért hasonló értékeivel (Hohenadl és mtsai, 1999; Mücke és mtsai, 2004).

5.5. Dezmin filamentumok kémiai szétbontása

A denaturációnak meglehetősen ellenálló filamentumok 6M ureával szemben 2 órán át tartó dialízise a filamentumok szétesését eredményezte. Bár az ureának a denaturáns hatása még jelenleg sem tisztázott pontosan (Guinn és mtsai, 2011), a dezmin filamentum esetében vélhetően mind a hidrofób, mint pedig a hidrofil és ionos kölcsönhatásokat befolyásolja. Az ureával denaturált fehérje renaturációt (ciklikus dialízis) követően ismét polimerizációra volt képes (nem publikált adat). Triton X-100 nemionos detergensként $0,1\%$ -os koncentrációban előnyösen alkalmazható az aggregálódott, összetapadt dezmin filamentumok szétválasztására, de tízszeres koncentrációban alkalmazva sem okoz AFM-mel feloldható morfológiai változást a már kialakult filamentumokban. Irodalmi adatok szerint bizonyos, S-100 családba tartozó Ca-kötő fehérjék stimulálják a dezmin szétesését (Garbuglia és mtsai, 1996), de ennek molekuláris mechanizmusa jelenleg nem tisztázott. Divalens kation-keletorok (EGTA, EDTA) alkalmazása esetén a dezmin filamentumok kisebb alegységekre estek szét. Míg a Mg^{2+} ionokra (amelyeket a dezmin polimerizációjához is használtunk) specifikusabb EDTA esetében néhány perc, a magasabb Ca^{2+} affinitást mutató EGTA esetében több nap volt szükséges a fibrilláris struktúrák megjelenéséhez. Hosszan, akár 21 napon keresztül tartó inkubáció esetén is kizárható azonban a nonspecifikus

fehérjedegradáció, ugyanis az különböző hosszúságú fehérjefragmentumok megjelenéséhez vezetne („smear” = elkent csík) az elektroforetogramon.

5.5.1. EGTA-kezelésre megjelenő fibrilláris struktúrák morfológiája

Az EGTA (és EDTA) kezelés hatására megjelenő fibrilláris struktúrák jelentősen eltérő morfológiájúak a dezmin filamentumhoz képest. A dezmin filamentumok csillám hordozófelszínen ellapultak, szélesség-magasság arányuk nagyjából 25. Hasonló jelenséget más kutatók is leírtak a dezmin AFM-es vizsgálata esetében (Kreplak és mtsai, 2008). Az ellapulást legvalószínűbben a mintaelőkészítésnek tulajdoníthatjuk: a csillámfelszínre tapadás, részleges kiszáradás játszhat szerepet a jelenség létrejöttében. A dezmin filamentumok AFM-es képek alapján mért korrigált szélessége 50,6 nm, míg az átlagos magasság 2,09 nm. Az ellapult filamentumoknál téglalap keresztmetszetet feltételezve 105,84 nm-nek adódik a terület, azonban ha intakt filamentumot feltételezünk, akkor ez a terület 33,68 nm-es átmérőjű körhöz tartozik. Így nincs kizárva, hogy a filamentumok a felszíni kitapadásuk során egy duzzadáson mennek keresztül, mely 3,4-szeres átmérőbeli változást okoz a filamentum esetén. A filamentumok a kontúrjuk mentén jelentős magassági fluktuációt mutattak, amit más kutatók is leírtak mind AFM-es (Kreplak és mtsai, 2005), mind pedig elektronmikroszkópos képalkotás során (Aebi és mtsai, 1983; Milam és Erickson, 1984). Autokorrelációs analízist végezve 105 nm-es átlagos ismétlődési mintázatot tapasztaltunk, ennek háttérében talán a filamentum tengelyétől eltérő irányban álló tetramerek, esetleg ULF-ek állhatnak (Kreplak és mtsai, 2004). EDTA kezelés hatására viszonylag gyorsan nagyon rövid fibrillumok jelentek meg, minimális hosszuk összevethető az ULF hosszával (~60 nm), míg EGTA esetében jóval hosszabb inkubációs időre volt szükség, azonban a fibrillumok jóval szélesebb, 60-1500 nm-es kontúrhossz-tartományban fordultak elő. A vékony fibrillumok a filamentumokhoz hasonlóan ellapult struktúráknak bizonyultak, átlagosan 0,3 nm magasak voltak és jóval kisebb mértékű fluktuációt mutattak a kontúrjuk mentén, mint a filamentumok. A fibrillumok AFM-mel mért korrigált szélessége 25,52 nm, ezt az értéket magassággal összevetve, téglalap keresztmetszetet feltételezve a fibrillumok kerülete 51,62 nm-nek adódik. A fibrillumokat hengerként modellezve a fenti kerülethez 16,44 nm-es átmérő tartozik. A filamentumoknál már leírt duzzadási mechanizmust feltételezve célszerűnek

tűnik a fibrillumok esetén is 3,4-szeres átmérőbeli változással kalkulálni, ekkor a fibrillumok valós átmérője 4,83 nm. Ez az érték jól egyezik a keratin protofibrillumok átmérőjével (Aebi és mtsai, 1983), így feltételezéseink szerint EDTA és EGTA kezelés hatására a dezmin *protofibrillumokra* szerelődik szét. Az előző számítások ellenőrzése céljából transzmissziós elektronmikroszkópiát végeztünk mind a dezmin filamentumokon, mind pedig a protofibrillumokon. Az alkalmazott negatív festési eljárással a dezmin filamentumok átlagos átmérője 10,3 nm, míg a protofibrillumok átmérője 4,1 nm. Figyelembe véve az elektronmikroszkópia esetében alkalmazott mintaelőkészítést, nem zárhatjuk ki, hogy a dezmin, illetve bármely más fehérje esetében zsugorodási artefaktal állunk szemben, azaz lehetséges, hogy az AFM-mel alkotott kép sokkal jobban megközelíti, jellemzi az élő sejtben jelen levő dezmin filamentumokat. Nincs kizárva, hogy az egyedimolekula-módszerek és a nagyfelbontású pásztázó mikroszkópos módszerek elterjedésével célszerű lesz átgondolni az élő sejtben levő struktúrákról alkotott képünket.

5.5.2. Protofibrillumok rugalmassága az orientáció-eloszlás alapján

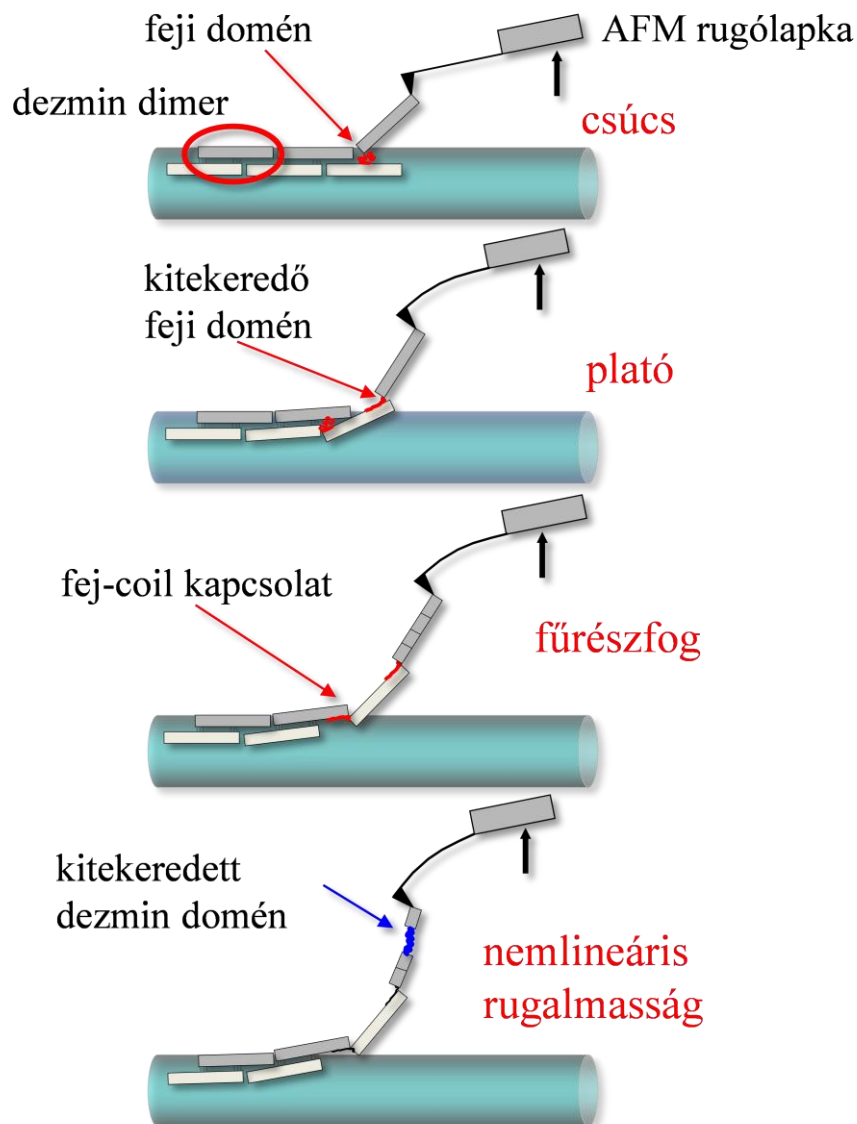
A protofibrillumok esetén is lehetőség nyílt a dezmin filamentumnál már alkalmazott geometriai orientáció-eloszlás alapján történő perzisztenciahossz és rugalmassági modulus meghatározására. A (8) egyenlet felhasználásával a dezmin protofibrillumok perzisztenciahossza 51,5 nm, míg 4,5 nm-es átmérővel számolva a rugalmassági modulusuk 10,6 MPa. Az általunk számított perzisztenciahossz jól korrelál a dezmin dimer hosszával (48 nm) (Milam és Erickson, 1984). Ez azt jelentheti, hogy a protofibrillum rugalmasságának meghatározó elemi egysége a dezmin dimer, azaz a protofibrillum sorosan kapcsolt dimerekből felépülő statisztikus, entropikus polimerláncként viselkedik. A protofibrillum esetében becsült Young-modulus nagyjából 3-szorosa a dezmin filamentum rugalmassági modulusának. Ha a filamentum homogén, izotróp testként protofibrillumokból épülne fel, akkor ugyanazt a rugalmassági modulusot kellene mérnünk mindkét test esetében. Amennyiben a filamentum a protofibrillum anyagából készült vastagabb test lenne, akkor háromszor merevebb lenne a struktúrája. Azaz, a dezmin azáltal, hogy nem homogén módon épül fel a kisebb alegységeiből, jóval rugalmasabb filamentumként töltheti be biológiai funkcióját. A dezmin polimerizációja során a dimerek, majd tetramerek kialakulása után

ULF képződik, mely további ULF-ekkel asszociálódik, így biztosítva a filamentum hosszanti növekedését. Az ULF átmérője közelíti az érett dezmin filamentum átmérőjét. A kation-keletorok hatására azonban az ULF-nél jóval vékonyabb, de akár mikrométer hosszúságú stabil protofibrillumok is önálló entitásként létezhetnek, ami azt valószínűsíti, hogy a protofibrillumot hosszirányban összetartó erők jóval nagyobbak, mint az egyes tetramereket oldalirányban stabilizáló erők.

6. Következtetések

6.1. A dezmin rugalmas erőválaszai

A dezmin rugalmas erőválaszait összefoglaló empirikus modellünkben (34. ábra) a rugalmasságot felelős fő szerkezeti elem a coiled-coil dezmin dimer. A filamentumkötegben ezek a kisebb egységek gyengébb oldalirányú kapcsolatban vannak egymással, mely jól magyarázhatja a **csúcsok** megjelenését a nyújtás kezdetén. Ez a kezdeti disszociáció legtöbbször két lépésben történik és nem ritkán reverzibilis. Az **erőplatók** háttérben feltehetően olyan szerkezeti változások állhatnak, melyek a



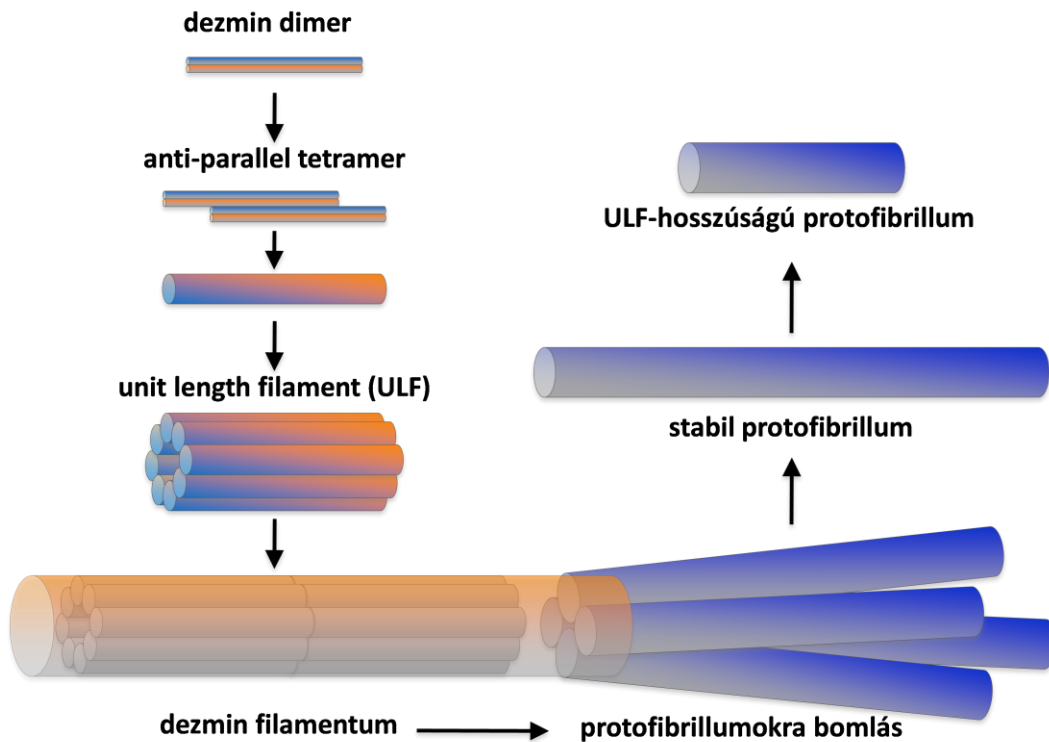
34. ábra: A dezminen végzett mechanikai manipulációhoz kötődő szerkezeti átmenetek

filamentum felszínén levő protofilamentumok folytonos leválasztódásával kapcsolatosak, illetve lehetséges, hogy α -helikális coiled-coil domén kitekerekedés és dimerek egymás melletti elcsúszásának kombinált következményei. Azt, hogy a dimerek közötti további csúszás vagy inkább protofilamentum leválasztódás történik-e a továbbiakban, a filamentumra merőlegesen ható („szétcipzározó”), illetve a megnyújtott dezmin szál tengelyében ható („kitekerő”) erők közötti egyensúly szabja meg. A **fűrészfog** a dimer-fej és a szomszédos coil közti retesszerű kapcsolat megszakadását jelezheti; amennyiben ez a kapcsolat megszakad, de egy ugrást követően egy másik dimerrel újra kialakul, az ismétlődő fűrészfogat eredményezhet az erőgörbén. A **nemlineáris erőválasz** a már kitekerekedett domének további nyújtásának eredménye lehet. Ez viszont feltételezi azt, hogy hosszirányú terhelésnél sokkal ellenállóbb a rendszer, ami vélhetően a szubfilamentumok terminális doménjeinek erősebb kölcsönhatásaival magyarázható (Johnson és Williams, 1983). A kombinált csúszás-kitekerekedés magyarázhatja az intermedier filamentumok 3,6-szeres nyújthatóságát (Kreplak és mtsai, 2005). A **foszfátkezelés** pedig vélhetően a dimerek közötti oldalirányú elektrosztatikus kölcsönhatást gyengíti.

6.2. A dezmin disszociációja protofibrillumokra

Az EGTA és EDTA kezelések hatására vélhetően a dezmin dimereket oldalirányban összetartó ionos kölcsönhatások módosulnak (vagy a Mg^{2+} elvonás vagy pedig saját töltésük miatt). Ennek értelmében egy érett dezmin filamentum 4-5 önálló, stabil entitásként létező protofibrillumra szerelődik szét (**35. ábra**). Ez a jelenség viszont azt jelenti, hogy a dezmin filamentumok összeszerelődése, illetve szétszerelődése eltérő útvonalakat követ. A polimerizáció során a tetramerekből egy a teljes filamentum átmérőjének megfelelő vastagságú ULF képződik, majd az ULF-ek hosszanti asszociátuma hozza létre a dezmin filamentumot. A szétszerelődés során viszont a protofibrillumot hosszantilag összetartó erők vélhetően nagyobbak az oldalirányú erőkhöz képest, így a protofibrillum önálló struktúraként is megjelenhet *in vitro*. Ez a disszociációs útvonal nagyon hasonlít pl. a GFAP összeszerelődéséhez (3. ábra a). Mivel a dezmin filamentum nem egy „felnagyított” protofibrillum, nem homogén, izotróp test, így a viszonylag merevebb építőkövek (dimerek,

protofibrillumok) ellenére is meglehetősen flexibilis vázat képez a sejtekben, miközben hosszanti deformációval szemben rendkívül ellenálló. Ezek értelmében a dezmin egy rugalmas, ám ugyanakkor nyújtásnak ellenálló, stabil vázat biztosíthat az izomsejtek számára.



35. ábra: Dezmin protofibrillumok kialakulásának modellje

A fentiek tükrében az AFM kiválóan alkalmas biopolimerek, egyedi molekulák nanomechanikai és nagyfelbontású morfológiai vizsgálatára. Segítségével lehetőségünk van közvetlenül megmérni filamentumok, szubfilamentális asszociátumok rugalmas tulajdonságait, ezáltal egyedi molekulák, illetve alegységek szintjén is képesek vagyunk megjósolni a külső erőbehatásra keletkező szerkezeti, illetve alakváltozásokat. Ezáltal valóságosabb képet nyerhetünk az intermedier filamentumok eddig még kevésbé ismert és vizsgált mechanikai tulajdonságairól, amely alapján pontosabb következtetéseket vonhatunk le azok biológiai szerepéről, illetve az izomban betöltött funkcióiról (Schultheiss és mtsai, 1991; Fudge és mtsai, 2003).

6.3. Új tudományos eredmények

Fentiek tükrében AFM-mel sikeresen meghatároztam a csirke zúzából izolált dezmin alapvető rugalmas erőválaszait:

- 1) A leggyakrabban megfigyelt mechanikai jelenség a molekula feszítésének kezdetén észlelt két diszkrét, nagyjából 20-60 pN nagyságú erőátmenet. Ez megfelelhet a 45 nm hosszú coiled-coil dezmin dimerek filamentális kötelékből történő kiszakadásának.
- 2) 60 nm-nél hosszabb protofilamentumok nyújtásakor platókat észleltem az erőgörbéken, melyekre rendszerint 16 nm-es távolságonként erő-csúcsok szuperponálódtak. Az erőátmenetek feltehetően protofilamentum-leválasztódás, dimer-dimer elcsúszás és coiled-coil domén kitekeredés együttes megnyilvánulásai.
- 3) A molekulakötegek további nyújtásakor nemlineáris, entropikus rugalmasság dominált, mely részlegesen denaturált dezmin dimerek mechanikai tulajdonságát tükrözheti.

Megmértem a molekula nyújtása során a hajlítómerevséget jellemző átlagos perzisztenciahosszt, a 0,4 nm-es érték azonban vélhetően a teljesen denaturált dezmin rugalmasságát jellemzi.

A pásztázás során nyert képeken a filamentumok geometriai orientáció-eloszlását vizsgáltam, a teljes filamentum keresztmetszetére kiterjedő perzisztenciahossz 0,45 μm , mely jól egyezik más intermedier filamentumok egyensúlyi rendszerben meghatározott perzisztenciahosszávmtsai

Kétértékű kation kelátorok, EGTA, illetve EDTA hozzáadásával a már polimerizálódott dezmin filamentumok órák, illetve napok alatt stabil, fibrilláris struktúrákra bontottam szét, melyeket a topografikus képek alapján meghatározott átmérő, illetve keresztmetszet alapján protofibrillumokként azonosítottam.

A dezmin filamentumok foszfátkezelésével rávilágítottam arra, hogy a dezmin erőválaszai alapján a kezelés eredményeként a dimerek közötti oldalirányú elektrosztatikus kölcsönhatás gyengül.

7. Összefoglalás

A dezmin az izomszövet intermedier filamentuma. Bár a dezmin filamentumok rugalmasságának, valamint össze- és szétszerelődésének dinamikája, illetve és a sejtek mechanikájában betöltött szerepe jelenleg élénk kutatás tárgyát képezi, a fenti jelenségek molekuláris alapjai nem ismertek pontosan. Kísérleteinkben egyedi dezmin filamentumok rugalmasságát és mechanikailag vezérelt szerkezeti átmeneteit vizsgáltuk atomerómikroszkóppal (AFM). A dezmin csirke zúzából izoláltuk, majd NaCl vagy $MgCl_2$ hozzáadásával polimerizáltuk. A hordozófelszínhez adszorbeálódott molekulákat tetszőleges pontokban az AFM rugólapkájával feszítés-relaxáció ciklusokban nyújtottuk, melyek során a dezmin rugalmasságát leíró erő-megnyúlás függvényeket vettünk fel. A leggyakrabban megfigyelt mechanikai jelenség a molekula feszítésének kezdetén észlelt két diszkrét, nagyjából 20-60 pN nagyságú erőátmenet. Ez megfelelhet a coiled-coil szerkezetű dezmin dimerek filamentális kötelékből történő kiszakadásának. 60 nm-nél hosszabb protofilamentumok nyújtásakor platókat észleltünk az erőgörbéken, melyekre rendszerint 16 nm-es távolságonként erő-csúcsok szuperponálódtak. Az erőátmenetek feltehetően protofilamentum-leválasztódás, dimer-dimer elcsúszás és coiled-coil domain kitekeredés együttes megnyilvánulásai. A molekulakötegek további nyújtásakor nemlineáris rugalmasság dominált, mely részlegesen denaturált dezmin dimerek mechanikai tulajdonságát tükrözheti. A molekula nyújtása során átlagosan igen alacsony, 0,4 nm-es, a hajlítómerevséget jellemző látszólagos perzisztenciahosszt mértünk, mely a teljesen denaturált dezmin jellemmezheti, míg a filamentumok geometriai orientáció-eloszlását vizsgálva a teljes filamentum keresztmetszetét jellemző perzisztenciahossz 0,45 μm körüli. Foszfáttal kezelt dezmin filamentumokban a szerkezetet összetartó elektrosztatikus kölcsönhatások fellazulását találtuk. EGTA, illetve EDTA hozzáadása esetén a dezmin filamentumok stabil, vékonyabb fibrilláris struktúrákra bomlottak szét, melyeket a topografikus képek alapján protofibrillumokként azonosítottunk, átlagos perzisztenciahosszuk 51,5 nm. Fentiek tükrében a dezmin filamentumon belül a protofibrillumok kötegekbe rendeződése a hosszirányú erőkkel szemben nagy szakítószilárdságot biztosít, míg oldalirányú erőhatásokra a filamentum rugalmasan viselkedik. A protofibrillumok megfigyelt stabilitása és jelentős kontúrhossza alapján a dezmin szétszerelődése vélhetően a polimerizáció lépéseitől eltérő módon zajlik.

8. Irodalomjegyzék

Aebi, U, Fowler, WE, Rew, P, Sun, TT. (1983) The fibrillar substructure of keratin filaments unraveled. *J Cell Biol* 97: 1131-1143.

Ando, S, Nakao, K, Gohara, R, Takasaki, Y, Suehiro, K, Oishi, Y. (2004) Morphological analysis of glutaraldehyde-fixed vimentin intermediate filaments and assembly-intermediates by atomic force microscopy. *Biochim Biophys Acta* 1702: 53-65.

Bar, H, Mucke, N, Kostareva, A, Sjoberg, G, Aebi, U, Herrmann, H. (2005) Severe muscle disease-causing desmin mutations interfere with in vitro filament assembly at distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15099-15104.

Bershadsky A. D. and Vasiliev J. M, *Cytoskeleton (Cellular Organelles)*. Plenum Press, New York, 1988: 56-62.

Binnig, G, Quate, CF, Gerber, C. (1986) Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56: 930-933.

Binnig G, Rohrer H. *Scanning Tunneling Microscopy*. *Surface Science* 126 (1983) 236-244

Bonne, G, Di Barletta, MR, Varnous, S, Becane, HM, Hammouda, EH, Merlini, L, Muntoni, F, Greenberg, CR, Gary, F, Urtizberea, JA, Duboc, D, Fardeau, M, Toniolo, D, Schwartz, K. (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21: 285-288.

Bustamante, C, Marko, JF, Siggia, ED, Smith, S. (1994) Entropic elasticity of lambda-phage DNA. *Science* 265: 1599-1600.

Carrion-Vazquez, M, Oberhauser, AF, Fisher, TE, Marszalek, PE, Li, H, Fernandez, JM. (2000) Mechanical design of proteins studied by single-molecule force spectroscopy and protein engineering. *Prog Biophys Mol Biol* 74: 63-91.

Chatellier, X, Senden, TJ, Joanny, J-F, Di Meglio, J-M. (1998) Detachment of a single polyelectrolyte chain adsorbed on a charged surface. *Europhys Lett* 41: 303-308.

Clark, KA, McElhinny, AS, Beckerle, MC, Gregorio, CC. (2002) Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18: 637-706.

Conti, M, Bustanji, Y, Falini, G, Ferruti, P, Stefoni, S, Samori, B. (2001) The desorption process of macromolecules adsorbed on interfaces: the force spectroscopy approach. *Chemphyschem* 10: 610-613.

Friedsam, C, Becares, ADC, Jonas, U, Seitz, M, Gaub, HE. (2004) Adsorption of polyacrylic acid on self-assembled monolayers investigated by single-molecule force spectroscopy. *New Journal of Physics* 6: 1-16.

Fuchs, E, Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63: 345-382.

Fudge, DS, Gardner, KH, Forsyth, VT, Riekel, C, Gosline, JM. (2003) The mechanical properties of hydrated intermediate filaments: insights from hagfish slime threads. *Biophys J* 85: 2015-2027.

Fudge, DS, Gosline, JM. (2004) Molecular design of the alpha-keratin composite: insights from a matrix-free model, hagfish slime threads. *Proc Biol Sci* 271: 291-299.

Garbuglia, M, Verzini, M, Giambanco, I, Spreca, A, Donato, R. (1996) Effects of calcium-binding proteins (S-100a(o), S-100a, S-100b) on desmin assembly in vitro. *FASEB J* 10: 317-324.

Geisler, N, Schunemann, J, Weber, K. (1992) Chemical cross-linking indicates a staggered and antiparallel protofilament of desmin intermediate filaments and characterizes one higher-level complex between protofilaments. *Eur J Biochem* 206: 841-852.

Geisler, N, Weber, K. (1980) Purification of smooth-muscle desmin and a protein-chemical comparison of desmins from chicken gizzard and hog stomach. *Eur J Biochem* 111: 425-433.

Goldman, RD, Khuon, S, Chou, YH, Opal, P, Steinert, PM. (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity. *J Cell Biol* 134: 971-983.

Grosberg A. and Khokhlov A. R, *Giant Molecules: Here, There, and Everywhere*. Academic Press, Inc, 1997: 73-78.

Guinn, EJ, Pegram, LM, Capp, MW, Pollock, MN, Record, MT, Jr. (2011) Quantifying why urea is a protein denaturant, whereas glycine betaine is a protein stabilizer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 16932-16937.

Guzman, C, Jeney, S, Kreplak, L, Kasas, S, Kulik, AJ, Aebi, U, Forro, L. (2006) Exploring the mechanical properties of single vimentin intermediate filaments by atomic force microscopy. *J Mol Biol* 360: 623-630.

Haupt, BJ, Ennis, J, Sevick, EM. (1999) The detachment of a polymer chain from a weakly adsorbing surface using an AFM tip. *Langmuir* 15: 3886-3892.

Herrmann, H, Aebi, U. (1999) Intermediate filament assembly: temperature sensitivity and polymorphism. *Cell Mol Life Sci* 55: 1416-1431.

Herrmann, H, Aebi, U. (2004) Intermediate filaments: Molecular structure, assembly mechanisms, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu Rev Biochem* 73: 749-789.

Herrmann, H, Bar, H, Kreplak, L, Strelkov, SV, Aebi, U. (2007) Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 562-573.

Hohenadl, M, Storz, T, Kirpal, H, Kroy, K, Merkel, R. (1999) Desmin filaments studied by quasi-elastic light scattering. *Biophys J* 77: 2199-2209.

Huang, HY, Graves, DJ, Robson, RM, Huiatt, TW. (1993) ADP-ribosylation of the intermediate filament protein desmin and inhibition of desmin assembly in vitro by muscle ADP-ribosyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 570-577.

Hugel, T, Grosholz, M, Clausen-Schaumann, H, Pfau, A, Gaub, HE, 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.

Inagaki, M, Gonda, Y, Matsuyama, M, Nishizawa, K, Nishi, Y, Sato, C. (1988) Intermediate filament reconstitution in vitro. The role of phosphorylation on the assembly-disassembly of desmin. *J Biol Chem* 263: 5970-5978.

Johnson, P, Williams, RR. (1983) Structural analysis of the C-terminal region of chicken gizzard desmin. *Biochim Biophys Acta* 747: 1-9.

Karsai, A, Nagy, A, Kengyel, A, Martonfalvi, Z, Grama, L, Penke, B, Kellermayer, MS. (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.

Kellermayer, MS, Grama, L, Karsai, A, Nagy, A, Kahn, A, Datki, ZL, Penke, B. (2005) Reversible mechanical unzipping of amyloid beta-fibrils. *J Biol Chem* 280: 8464-8470.

Kellermayer MSZ. Mechanics of single molecules. Lecture outline. College on Biophysics: From Genetics to Structural Biology. Trieste, 2001.

Kellermayer, MSZ, Smith, SB, Granzier, HL, Bustamante, C. (1997) Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science* 276: 1112-1116.

Kitamura, S, Ando, S, Shibata, M, Tanabe, K, Sato, C, Inagaki, M. (1989) Protein kinase C phosphorylation of desmin at four serine residues within the non-alpha-helical head domain. *J Biol Chem* 264: 5674-5678.

Ko, YS, Coppen, SR, Dupont, E, Rothery, S, Severs, NJ. (2001) Regional differentiation of desmin, connexin43, and connexin45 expression patterns in rat aortic smooth muscle. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 355-364.

Kreplak, L, Aebi, U, Herrmann, H. (2004) Molecular mechanisms underlying the assembly of intermediate filaments. *Exp Cell Res* 301: 77-83.

Kreplak, L, Bär, H, Leterrier, JF, Herrmann, H, Aebi, U. (2005) Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments. *J Mol Biol* 354: 569-577.

Kreplak, L, Herrmann, H, Aebi, U. (2008) Tensile properties of single desmin intermediate filaments. *Biophys J* 94: 2790-2899.

Kusubata, M, Matsuoka, Y, Tsujimura, K, Ito, H, Ando, S, Kamijo, M, Yasuda, H, Ohba, Y, Okumura, E, Kishimoto, T, (1993) cdc2 kinase phosphorylation of desmin at three serine/threonine residues in the amino-terminal head domain. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 927-934.

Laemmli, UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lazarides, E. (1980) Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249-256.

Lieber, RL, Thornell, LE, Friden, J. (1996) Muscle cytoskeletal disruption occurs within the first 15 min of cyclic eccentric contraction. *J Appl Physiol* 80: 278-284.

Milam, L, Erickson, HP. (1984) Structural characteristics of the desmin protofilament. *J Ultrastruct Res* 89: 179-186.

Milner, DJ, Mavroidis, M, Weisleder, N, Capetanaki, Y. (2000) Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* 150: 1283-1298.

Mücke, N, Kreplak, L, Kirmse, R, Wedig, T, Herrmann, H, Aebi, U, Langowski, J. (2004) Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy. *J Mol Biol* 335: 1241-1250.

Pollock, M, Atkinson, BG. (1985) The intermediate filament protein desmin in cardiac and skeletal muscle from normal and dystrophic (BIO 14.6) hamsters. *Can J Biochem Cell Biol* 63: 430-438.

Price, MG. (1984) Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton--a putative load-bearing structure. *Am J Physiol* 246: H566-572.

Rief, M, Gautel, M, Oesterhelt, F, Fernandez, JM, Gaub, HE. (1997) Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276: 1109-1112.

Rivetti, C, Guthold, M, Bustamante, C. (1996) Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis. *J Mol Biol* 264: 919-932.

Root, DD, Yadavalli, VK, Forbes, JG, Wang, K. (2006) Coiled-coil nanomechanics and uncoiling and unfolding of the superhelix and alpha-helices of myosin. *Biophys J* 90: 2852-2866.

Rozlosnik N, Nemes Cs, Glavák Cs. Pásztázó erőméréses mikroszkópia. <http://esr.elte.hu/~noemi/labor/afm/afm1.html>

Sadoshima, J, Izumo, S. (1993) Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *Embo J* 12: 1681-1692.

Sam, M, Shah, S, Friden, J, Milner, DJ, Capetanaki, Y, Lieber, RL. (2000) Desmin knockout muscles generate lower stress and are less vulnerable to injury compared with wild-type muscles. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C1116-1122.

Schultheiss, T, Lin, ZX, Ishikawa, H, Zamir, I, Stoeckert, CJ, Holtzer, H. (1991) Desmin/vimentin intermediate filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J Cell Biol* 114: 953-966.

Seitz, M, Friedsam, C, Jostl, W, Hugel, T, Gaub, HE. (2003) Probing solid surfaces with single polymers. *Chemphyschem* 4: 986-990.

Sjuve, R, Arner, A, Li, Z, Mies, B, Paulin, D, Schmittner, M, Small, JV. (1998) Mechanical alterations in smooth muscle from mice lacking desmin. *J Muscle Res Cell Motil* 19: 415-429.

Smith, SB, Cui, Y, Bustamante, C. (1996) Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double- stranded and single-stranded DNA molecules. *Science* 271: 795-799.

Storm, C, Pastore, JJ, MacKintosh, FC, Lubensky, TC, Janmey, PA. (2005) Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature* 435: 191-194.

Strelkov, SV, Herrmann, H, Geisler, N, Wedig, T, Zimbelmann, R, Aebi, U, Burkhard, P. (2002) Conserved segments 1A and 2B of the intermediate filament dimer: their atomic structures and role in filament assembly. *Embo J* 21: 1255-1266.

Szeberényi J, *Molekuláris sejtbiológia*. Dialóg Campus, Budapest, 1999: 323-340

Tokuyasu, KT. (1983) Visualization of longitudinally-oriented intermediate filaments in frozen sections of chicken cardiac muscle by a new staining method. *J Cell Biol* 97: 562-565.

9. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Kiss, B, Karsai, A, Kellermayer, MS. (2006) Nanomechanical properties of desmin intermediate filaments. *J Struct Biol* 155: 327-339.

Kiss, B, Rohlich, P, Kellermayer, MS. (2011) Structure and elasticity of desmin protofibrils explored with scanning force microscopy. *J Mol Recognit* 24: 1095-1104.

Meyer, GA, **Kiss, B**, Ward, SR, Morgan, DL, Kellermayer, MS, Lieber, RL. (2010) Theoretical predictions of the effects of force transmission by desmin on intersarcomere dynamics. *Biophys J* 98: 258-266.

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Ifj. Dr. Kellermayer Miklósnak a több éven át tartó segítségért, áldozatos munkájáért, a bátorításokért, tanácsokért. Neki köszönhetem, hogy a Pécsi Tudományegyetem Biofizikai Intézetének, majd 2009-től a budapesti Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetének Nanobiotechnológiai és Egyedi-molekula Biofizikai Csoportjában betekintést nyerhettem a molekulák különleges, misztikus világába. Itt ismerhettem meg, mit is jelent kutatómunkát végezni, annak minden szépségével és nehézségével.

Külön köszönet illeti Dr. Grama Lászlót a műszerek, berendezések használatában nyújtott segítségéért, Dr. Nagy Attilát a molekuláris biológia terén nyújtott tanácsaiért.

Prof. Dr. Röhlich Pál nélkülözhetetlen segítséget nyújtott a dezmin filamentumokon és protofibrillumokon elvégzett elektronmikroszkópos kísérletekben és analízisben.

A pécsi laboratóriumokban Heppné Konrád Ildikó, míg Budapesten Iszlai Ágnes laborasszisztensek segédkeztek a kísérletek előkészítésében.

„A person who never made a mistake never tried anything new.”

Albert Einstein

11. Mellékletek

A dezmin izolálása során felhasznált oldatok:

- 1. „A” puffer:** 40 mM imidazol-HCl (pH 6,9); 0,6 M KCl; 1 mM EGTA; 1 mM β -merkaptoetanol
500 ml-hez 0,5 % Triton X-100
- 2. Extrakciós puffer:** 10 mM imidazol-HCl (pH 6,9); 0,6 M KI; 1 mM EGTA;
0,5% Triton X-100; 0,5 mM DTT; 0,2 mM ATP
- 3. Urea puffer:** 6 M urea; 10 mM Na-foszfát (pH 7,5); 5 mM EGTA; 0,1 % β -merkaptoetanol
Az ioncserés kromatográfiához sógradiens: 0,2 M KCl-Urea puffer
- 4. Tris-acetát puffer:** 0,01 M Trizma Base (pH 8,2); 10 mM β -merkaptoetanol

Az SDS-PAGE során felhasznált oldatok:

- „A” oldat:** 37,5 : 1 arány, 100 ml
akrilamid 29,2 g; bisz-akrilamid 0,8 g
- „B” oldat:** 100 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4% SDS
- „C” oldat:** 100 ml
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4% SDS
- „D” oldat:** 500 ml
Tris 1,5 g; glicin 7,2 g; 20% SDS 2,5 ml
- „E” oldat (3x Laemmli mintapuffer):** 30 ml
30 % glicerin (30 ml), 15 % β -merkaptoetanol (15 ml), 9 % SDS (9 g), „C” oldat
(37,5 ml)
- „F” oldat:** 1 ml
10% ammónium perszulfát (APS) 0,1g
- Futtató puffer:** 400 ml

100 ml „D” oldat; 20% SDS 2 ml

A gél készítésének lépései:

Alsó elválasztó gél: dH₂O 4,15 ml; „A” oldat 3,325 ml; „B” oldat 2,5 ml; „F” oldat 60 µl TEMED: 10 µl

Felső felsorakoztató, ún. stacking gél: dH₂O 3,25 ml; „A” oldat 0,5 ml; „C” oldat 1,25 ml; „F” oldat 80 µl TEMED: 10 µl.

A dezmin polimerizációjához és hígításához felhasznált oldatok:

Magnéziumos polimerizáló oldat:

100 µl dezmin
20 µl imidazol (pH 7; 30 mM)
2.4 µl MgCl₂ (0.1 M)

Nátriumos polimerizáló oldat:

100 µl dezmin
20 µl imidazol (pH 7; 30 mM)
6 µl NaCl (3 M)

Magnéziumos hígító oldat:

20 ml NaHCO₃ oldat (1 mM, pH 8)
120 µl imidazol-HCl (pH 7; 1 M)
70 µl MgCl₂ (1 M)

Nátriumos hígító oldat:

20 ml NaHCO₃ oldat (1 mM, pH 8)
120 µl imidazol-HCl (pH 7; 1 M)
1 ml NaCl (3 M)