

综 述

肌联蛋白：结构、亚型分类及功能调节

郭春杰, 于亮, 李彦锦, 周越*

北京体育大学运动生理学教研室, 北京 100084

摘 要: 肌联蛋白(titin)作为生物体分子量最大的蛋白质, 具有N2A、N2BA、N2B三种亚型, 在肌肉基本结构维持、力的产生、传导与调节方面发挥重要作用。20世纪50年代以来肌肉收缩产力的解释建立在粗细肌丝滑行理论基础上, 一定程度上忽略了骨架蛋白在力产生与传导中的贡献。随着肌纤维中不溶性蛋白残基与大分子量蛋白质的发现, 除粗细肌丝外的第三肌丝——肌联蛋白逐渐进入人们视野。20世纪80年代后由于单分子力学技术与基因测序技术的发展, 肌联蛋白在肌节中的详细排列、结构、弹性特性及组分的研究大量涌现。本文就肌联蛋白基本结构、亚型分类、弹性功能及调节因素进行综述, 以期更好地了解肌联蛋白。

关键词: 肌肉弹性; 肌节; 骨架蛋白; 肌联蛋白; 肌联蛋白亚型

Titin: structure, isoforms and functional regulation

GUO Chun-Jie, YU Liang, LI Yan-Jin, ZHOU Yue*

Department of Exercise Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China

Abstract: Titin, the largest known protein in the body expressed in three isoforms (N2A, N2BA and N2B), is essential for muscle structure, force generation, conduction and regulation. Since the 1950s, muscle contraction mechanisms have been explained by the sliding filament theory involving thin and thick muscle filaments, while the contribution of cytoskeleton in force generation and conduction was ignored. With the discovery of insoluble protein residues and large molecular weight proteins in muscle fibers, the third myofilament, titin, has been identified and attracted a lot of interests. The development of single molecule mechanics and gene sequencing technology further contributed to the extensive studies on the arrangement, structure, elastic properties and components of titin in sarcomere. Therefore, this paper reviews the structure, isoforms classification, elastic function and regulatory factors of titin, to provide better understanding of titin.

Key words: muscle elasticity; sarcomere; cytoskeleton; titin; titin isoforms

肌联蛋白(titin)作为骨架蛋白的一种, 是肌肉中含量第三多的蛋白质(约10%)^[1, 2]。而不同骨架成分构成贯穿细胞内外的统一体系^[3, 4]。肌联蛋白纵向排列于肌节内, 连接Z盘和肌球蛋白, 在肌节的结构稳定、被动张力的维持、弹性势能的储存、收缩时力的增加方面有重要作用^[5-10]。肌节是力产生的基本结构和功能单位, 此前针对肌节的研究大多集中于粗、细肌丝, 而辅助力产生与传导的第三

肌丝——肌联蛋白(除粗、细肌丝外)却被忽略^[11]。

肌肉收缩和力的产生机制是建立在粗、细肌丝相对滑行理论与横桥循环理论基础上^[12-14], 这些理论却不能完全解释某些现象, 如肌原纤维在去除粗、细肌丝后仍表现出一定的弹性^[13], 肌肉离心收缩力大于向心收缩等^[15]。若假设肌节中有与粗肌丝串联的弹性肌丝, 上述现象就容易理解^[16]。随着Maruyama等^[17]发现肌纤维中不溶性的弹性蛋白

This work was supported by the National Key Research and Development Program of the Ministry of Science and Technology of China (No. 2018YFF0300405) and the Fundamental Research Fund for Central Universities of China (No. 2022YB013).

*Corresponding author. Tel: +86-10-62984792; E-mail: chowyue@163.com

残基及 Wang 等^[18]发现分子量巨大的肌联蛋白，具有弹性和连接功能的第三肌丝及三肌丝滑动模型理论逐渐进入人们的视野^[19, 20]。原子力显微镜和激光光学捕捉技术出现后，肌联蛋白在肌节中排列、结构及弹性特性的研究大量涌现^[2, 21]。目前国内有关肌联蛋白的研究处于相对滞后阶段，因此本文综述了肌联蛋白基础结构、亚型分类和弹性功能调节的最新研究成果，以期更好地了解肌联蛋白。

1 肌联蛋白的基本结构及亚型分类

1.1 肌联蛋白的基本结构及维持肌节稳定的功能

肌联蛋白是已知蛋白质中分子量最高的一种，由一个单一的多肽链（超过 30 000 个氨基酸残基）组成，在横纹肌中分子量达 3.7 MDa^[8, 22]，长约 0.9~1.5 μm 、直径 3~4 nm，从 Z 盘到 M 线横跨半个肌节^[22-24]。每个肌球蛋白束周围有六个与细肌丝平行的肌联蛋白分子连接^[25]，该蛋白由四个结构和

功能区组成，被划分为 N 端 Z 盘区、I 带区、A 带区和 C 端 M 线区，现有研究认为仅有 I 带区具有弹性和可扩展性^[22]。肌联蛋白因为其具有的分布与理化性质特点，被认为是维持肌原纤维完整性和稳定性，维持肌节高度有序结构和保持肌肉静息张力的主要结构之一^[2, 26-28]。

肌联蛋白分子的 N 端（氨基端）与 Z 盘和细肌丝结合，C 端（羧基端）与粗肌丝和 M 线相连^[6]，主要部分（90%）由 152 个串珠样连接的免疫球蛋白（immunoglobulin, Ig）结构域、132 个纤维连接蛋白-3（fibronectin type-III, FnIII）结构域、31 个富含脯氨酸（P）、谷氨酸（E）、缬氨酸（V）、赖氨酸（K）结构域（PEVK）、蛋白激酶结构域、7 个 Z 盘重复域和一些有独特序列的结构域排列组成^[6, 8, 29, 30]（图 1），这些结构域包括：肌节 M 线、N2A 片段、N2B 片段和 PEVK 区域附近的激酶结构域，以及 M 线、I 带和 Z 盘的磷酸化区^[31]。

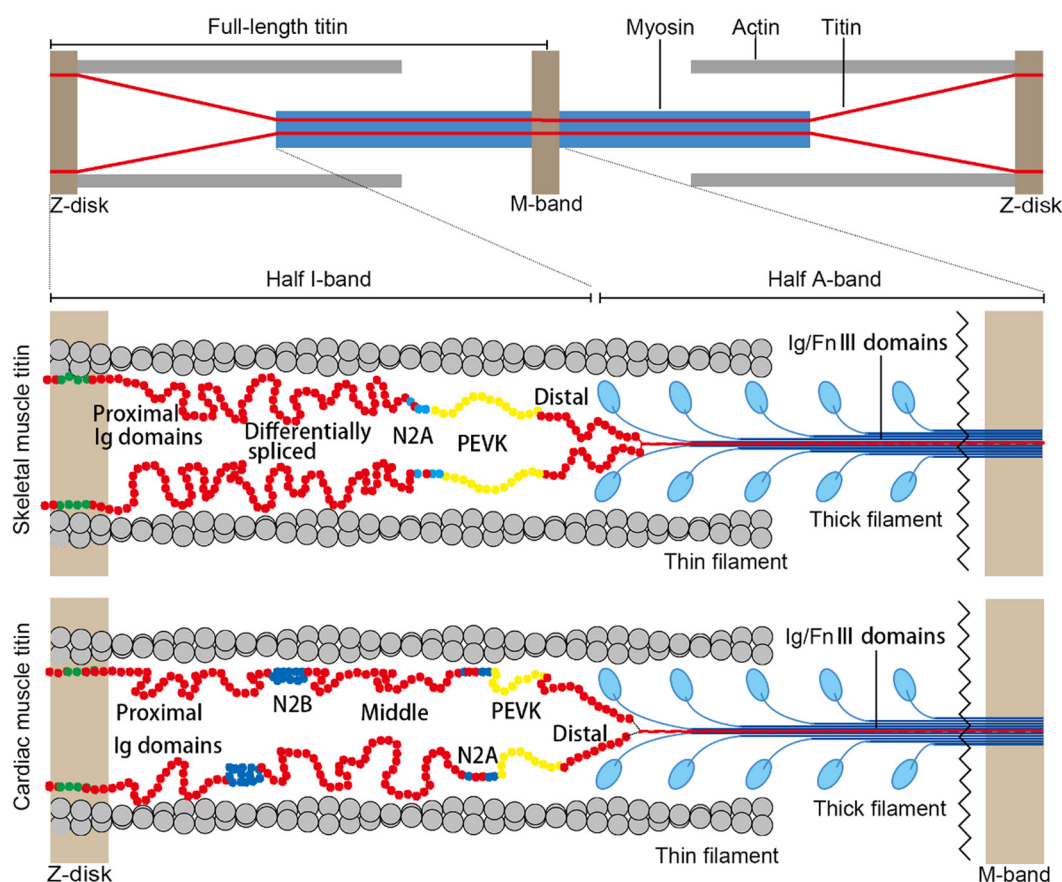


图 1 骨骼肌与心肌肌联蛋白分子模式图

Fig. 1. Molecular pattern of titin in the skeletal muscle and cardiac muscle. Titin is a force-generating muscle protein under regulatory control. Modified with permission from Freundt *et al*^[30].

肌联蛋白具有弹性成分的区域主要在 I 带, 具有多种排列形式, 主要由三种类型的连接基序组成: (1) 串联 Ig 结构域; (2) 独特具有弹性的 PEVK 区域 (70% 富含 PEVK 残基); (3) N2B (心肌) 或 N2A (骨骼肌) 片段形成第三个弹簧元素^[32] (图 1)。肌节在静息长度时 Ig 结构域处于固有的折叠状态^[33], PEVK 区域亦处于折叠状态。当采用较小的力拉伸肌节时, 肌联蛋白的分子弹簧区并不是均匀伸展的, 而是随着拉伸在肌节伸展过程中依次伸展^[34]。拉伸静息长度的肌节首先导致: (1) 串联 Ig 结构域的延长, PEVK 区域仍处于折叠状态, 这提供了在低拉力下的初始扩展性; (2) 当拉伸力进一步增大时, 刚度较大的 PEVK 区域延长, 发挥弹簧作用, 形成被动张力, 并提供了足够的可扩展性; (3) 随着进一步拉伸, 当肌节具有弹性的可扩展区域延伸至完全伸展状态时 (长度增加约 10%), 力将大幅上升^[35, 36]。肌肉进行收缩和舒张时, Ig 结构域、PEVK 区域及非结构化区的动态展开及重新折叠辅助肌肉进行收缩与舒张。

肌联蛋白的 Z 盘区、M 线区不具有扩展性, 主要功能在于固定肌联蛋白和调节粗细肌丝相对位置^[37]。N 端通过 Z 盘区重复序列与邻近极性相反的 α -肌动蛋白的结合来实现对 Z 盘的牢固锚定^[6]。Z 盘区的两个氨基末端 Ig 结构域、锚定蛋白-1 和加帽蛋白与 Z 盘周围肌质网和 T 小管的关联可能有助于固定肌联蛋白^[38], 但也有学者认为加帽蛋白与 Ig1/Ig2 结构域的结合对于将肌联蛋白固定在 Z 盘上的作用较小^[39]。研究显示, 伴肌动蛋白和丝状蛋白 C 的相互作用使肌联蛋白 N 端的第一个独特序列与肌节内外细胞骨架的其他成分相连接, 提供了额外的结构稳定性^[40]。在 Z 盘区域的外围, Ig8/Ig9 与遮蔽蛋白的结合、Ig9/Ig10 与肌动蛋白的结合可以起到稳定、支持力在肌节处的传导和机械传感器的功能^[40]。

肌联蛋白的 M 线区包括肌联蛋白激酶和 Ig 结构域, 通过一个非弹性的远端 Ig 结构域连接粗肌丝末端^[22]。在小鼠模型或心肌细胞中缺失这一区域会破坏肌肉的结构^[41]。研究显示, 肌联蛋白的 C 端头部区域含有另外两种多肽 M 蛋白和肌间蛋白, 肌间蛋白可直接与肌联蛋白分子 M 线结构域 Ig146 结合, 起到稳定 M 线的作用^[42]。有学者认为 M 线区域 Ig147 和 Ig148 之间的独特序列与桥接整合因子 1 的相互结合亦有助于维持肌节的结构稳定^[43]。

A 带区是肌联蛋白中分子量最大的部分 (约 2.1 MDa), 其序列在不同的物种和肌肉类型中高度保守^[2]。A 带区由重复的 FnIII 和 Ig 结构域组成, FnIII 与肌球蛋白相互作用, 排列成不同的超重复模式, 与肌球蛋白紧密相连^[2]。A 带区 Ig 结构域和 FnIII 结构域以 7 和 11 结构域的超重复排列, 分别重复 6 次 (Ig97~Ig108/FnIII12~FnIII41) 和 11 次 (Ig109~Ig139/FnIII42~FnIII129), 超重复区分别具有 14 和 43 nm 的周期性, 其中 11 次重复的结构域具有与肌球蛋白相似的 43 nm 轴向周期性, 这与粗肌丝中肌球蛋白和肌球蛋白结合蛋白 C 的重复排列非常匹配, 可起到维持肌节肌球蛋白丝中心位置的功能, 因此有学者认为肌联蛋白组织了粗肌丝结构^[44]。研究表明, 肌联蛋白 A 带区在肌节的生理范围内是不可扩展的^[45, 46], 有关肌联蛋白分子 A 带区的具体结构和功能还有待深入的探索。

1.2 肌联蛋白的亚型分类及其性质

人体肌联蛋白基因包含 364 个编码外显子, 理论上可以编码 38 138 个氨基酸残基, 大约有三分之一是差异拼接的, 多重剪接及差异表达, 导致肌联蛋白亚型的多样性^[8, 47, 48]。目前已知的亚型大小从 600 kDa 到 3.7 MDa 不等, 心肌主要表达两种亚型, 较长且顺应性更高的 N2BA 亚型 (3.2~3.7 MDa) 由 313 个外显子表达, 较短且坚硬的 N2B 亚型 (3.0 MDa) 由 191 个外显子表达^[8]。健康成年人心脏表达的肌联蛋白中 30%~40% 为 N2BA 亚型, 60%~70% 为 N2B 亚型^[49]。骨骼肌表达 N2A 亚型 (3.3~3.7 MDa), 由 312 个外显子表达, 缺少编码 N2B 片段的第 49 号外显子, 可变剪接编辑导致其长度亦有较大差异^[50, 51]。目前还不清楚为什么大多数 160~200 号外显子没有在任何亚型中表达 (图 2)。

肌联蛋白产生的被动张力大小与亚型组成、数量和长度密切相关, 不同类型肌肉的被动张力亦有差异^[52]。在心肌中, 肌联蛋白转录通过不同的剪接途径进行加工, 产生刚性的 N2B 亚型和顺应性更高的 N2BA 亚型 (同时含 N2B 和 N2A 片段)。研究表明心肌肌联蛋白的 N2B 亚型与 N2BA 亚型刚度差异主要表现在具有可扩展性的 I 带区, N2BA 亚型和 N2B 亚型相比, 蛋白分子量大, 且 I 带区较长、更具弹性和扩展性^[53]。此外, N2BA 亚型中增加了一个可变长度的中间 Ig 结构域、N2A 片段和 PEVK 区域, Greaser^[54] 研究显示, N2BA 亚型中 PEVK 区域含 800 个氨基酸残基, 最大伸展长度为

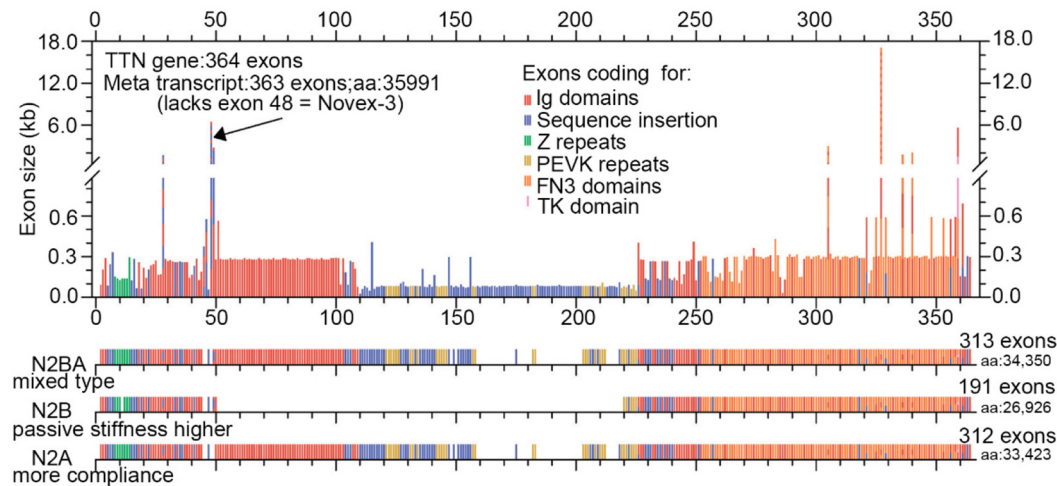


图 2. 肌联蛋白外显子构成
Fig. 2. Exon structure of titin (TTN) gene. Top: Exon sizes and numbers for the 364-exon human TTN gene. Bottom: Exon usage in the different titin isoforms. aa, amino acid. Modified with permission from Linke [48].

200 nm，而 N2B 亚型中 PEVK 区域含 188 个氨基酸残基，最大拉伸长度为 60 nm。因此 N2B 亚型比例高的心肌刚度更大，N2BA 亚型比例高的心肌顺应性更高。骨骼肌中仅有 N2A 亚型，慢肌纤维表达较长的 N2A 亚型，而快肌纤维表达较短的 N2A 亚型 [51]。

心肌肌联蛋白的 N2B 和 N2BA 亚型比例在内外部因素影响下可发生一定程度的变化，以适应生理机能的需要 [55]。研究显示，高心率的小动物（如鼠、兔）左心室内 N2B 亚型肌联蛋白含量远高于心率较慢的体型较大的动物（如牛、羊）[29, 56]（表 1）。高心率时，心脏射血量与心室舒张期充盈速率与程度密切相关。Helmes 等 [57] 研究显示，心率与左心室 N2B 亚型蛋白表达的比例相关，高比例的 N2B 亚型可以使心率非常快的动物（如啮齿类动物）在舒张期快速充血，使其具备更大的恢复力。生物体处在不同的发育阶段，心肌 N2B 和 N2BA 亚型的比例呈现非线性变化，最早检测到的哺乳动物胎儿心脏肌联蛋白是 3.7 MDa 的 N2BA 亚型，在胚胎发育期刚度较大的 N2B 比例逐渐增加 [58]。啮齿类动物胎儿心脏表达长 N2BA 亚型，肌节的顺应性更高，

在低拉伸力下容易伸展，而成年啮齿类动物心脏表达高比例的 N2B 和少量 N2BA 亚型，肌节具有较大的刚度 [59]。

病理状态下心肌 N2B 和 N2BA 亚型的比例与正常状态存在较大的差异。在终末期心力衰竭中，N2BA/N2B 比值经常增加，并导致被动刚度降低 [60]。心脏病啮齿动物模型显示顺应性更高的 N2BA 亚型的比例越高，心肌的刚度就越低，这可能是一种补偿机制，可以抵消基于肌联蛋白磷酸化的刚度增加或在衰竭心脏中经常出现的细胞外基质刚度增加 [22, 61, 62]。肌联蛋白亚型向 N2B 的转变偶有在心脏疾病动物模型中观察到，但几乎从未在人类心力衰竭模型中观察到 [22]。在心力衰竭患者中，被动刚度的降低与正常新生儿心脏发育过程相反，在正常新生儿心脏发育过程中，肌联蛋白表达主要从 N2BA 亚型转变为 N2B 亚型，导致被动刚度增加 [59]。

2 肌联蛋白在肌肉活动中的双向调整作用

研究显示，肌联蛋白的 I 带可扩展区域是一个类似于蹦极索性质的分子弹簧 [63]，起着双向弹簧的作用，可产生两个相反方向的作用力辅助肌肉收缩

表1. 不同体型动物心肌肌联蛋白特征

Table1. Characteristics of myocardial titin in animals of different body sizes

Animal body size (adult)	N2B:N2A	Stiffness	Compliance	Resting heart rates [56]
Small (rat, rabbit)	High	High	Low	> 180 beats per min
Large (cattle, sheep)	Low	Low	High	< 100 beats per min

与放松,从而提高肌肉输出效率^[5, 10, 64, 65]。当拉长的肌肉缩短时, I 带可扩展区域储存的弹性能释放(生理范围内 0~5 pN/分子),辅助粗细肌丝的相对滑动, Z 盘彼此靠近,肌联蛋白分子缩短^[65]。肌节缩短到静息长度以下时, I 带可扩展区域储存的弹性能完全释放后,随着 I 带可扩展区域的进一步缩短,将会反向储存促进肌节恢复静息长度的力,使 Z 盘之间有彼此分离之势。肌节缩短至静息长度以下时,肌联蛋白可扩展区域的作用力方向与肌节伸长方向相反,产生恢复力,将 Z 盘推向彼此远离的静息长度位置^[10]。例如心肌细胞在收缩初期释放弹性势能,并在收缩末期储存反向弹性恢复作用力,促进舒张期心室的充盈,有学者认为肌联蛋白是心肌细胞在肌小节生理长度范围内被动张力的主要决定因素^[66, 67]。

肌肉收缩时具有低成本和高力量产出的特性,这可以在单独制备的肌肉样本中得到证明,这些样本包括完整的肌肉、单个肌纤维、肌原纤维,甚至单个孤立的肌节^[68, 69]。Joumaa 等^[70]发现拉伸未被激活的猫比目鱼肌时,被动张力增加持续了数秒。由于肌联蛋白具有双向弹簧作用,因此被拉伸后缩短的速度并不是呈线性关系。Minajeva 等^[71]探索了非激活状态下兔骨骼肌和人的心脏肌原纤维被拉伸后无负荷缩短的特征,发现肌原纤维的弹性回缩速度起初最快,缩短速度在几十毫秒内大大减慢,认为这种现象是弹性回缩被粘性阻力和肌联蛋白可伸展区域双向弹簧阻力抑制所致。

肌联蛋白分子 I 带可扩展区域储存的弹性势能作用于肌肉的主动收缩需满足以下条件:(1) 肌肉中的肌节必须被拉伸到一定程度,使肌联蛋白单分子力至少达到 4 pN。啮齿类动物和人类肌肉拉伸范围很长,对于大多数肌肉来说满足上述条件。(2) 在收缩期间, I 带可扩展区域的弹性回缩速度(Ig 结构域的重新折叠)需大于粗细肌丝的滑动速度,以防止在收缩过程中肌联蛋白松弛^[72]。研究显示,肌原纤维中 Ig 结构域的展开-再折叠的时间低于 100 ms^[10],此外,在活体状态下,肌细胞中聚集大量分子伴侣,可以增加 Ig 结构域折叠速率^[73]。肌联蛋白的特性促使其可以比最快的肌肉收缩速度快得多的速度与肌节中的任何力保持平衡^[74]。(3) Ig 结构域的折叠需在肌节中多个平行肌联蛋白中同步发生^[75]。Eckels 等^[75]认为在粗肌丝周围平行排列的 6 个肌联蛋白 Ig 结构域会同时折叠,当分子张

力小于 4 pN 时, 6 个平行 Ig 结构域中的第一个随机折叠时,作用在其他 5 个 Ig 结构域上的力瞬间减小, Ig 结构域展开或折叠的速度与力成指数关系,因此力的一点点减少都会加速其他平行域的折叠,折叠的功率输出表现出高度的协同性。

3 Ca^{2+} 浓度、磷酸化水平对肌联蛋白功能的调节

肌联蛋白作为可调节刚度的双向分子弹簧,可以有效储存被动力,辅助肌肉收缩与舒张,肌联蛋白分子刚度的大小一定程度上会影响被动力的储存与释放,从而影响肌肉工作效率。骨骼肌与心肌工作时肌联蛋白刚度的调节均发生在肌肉激活之后、力产生之前^[76],且肌肉失活后肌联蛋白刚度水平持续数秒^[77],可有效避免肌丝滑行过程中由于肌联蛋白刚度变化导致力产出不稳定的可能。肌肉激活是肌联蛋白刚度调节的起点,心肌舒张时无兴奋,亦不需张力的增加,仅在收缩期产生兴奋,上调心肌肌联蛋白刚度,以提高心肌收缩力^[78]。骨骼肌在离心制动与向心收缩时均处于激活状态,通过增加骨骼肌肌联蛋白在离心制动与向心收缩时的刚度,以达到在尽可能短的时间内产生与传导较大的收缩力^[79]。有关肌联蛋白(或任何分子弹簧)增加其刚度的基本机制有两种:(1) 增加自身固有刚度(材料性质的变化);(2) 缩短可扩展区域长度(静止长度)而其材料性质保持不变^[5]。目前有关肌联蛋白刚度调节的研究主要集中在 Ca^{2+} 浓度变化及磷酸化的作用。

3.1 Ca^{2+} 浓度对肌联蛋白刚度的调节

肌联蛋白弹性力一定程度依赖高 Ca^{2+} 诱导的刚度增加,并且这种效应随着肌联蛋白刚度的增加而增加。肌细胞内 Ca^{2+} 浓度对肌联蛋白刚度的调节主要表现在与肌动蛋白的相互作用,在肌肉激活时增加肌联蛋白刚度^[80]。Cornachione 等^[81]发现在激活的肌纤维中,非横桥结构的张力和刚度增加,推测 Ca^{2+} 浓度的增加会在一定程度上提高肌联蛋白刚度。随着研究的深入,学者们发现 Ca^{2+} 在被动与激活状态肌肉中起着调节肌联蛋白刚度开关的作用^[77, 82–86](图 3)。 Ca^{2+} 改变肌联蛋白刚度可表现为两方面:一是通过与肌联蛋白的结合改变其力学性质,直接影响被动力,单分子力学实验表明, Ca^{2+} 的作用区域主要为 N2A 片段与 PEVK 区域(降低 PEVK 区域的刚度),但 Ca^{2+} 对肌联蛋白本身刚度

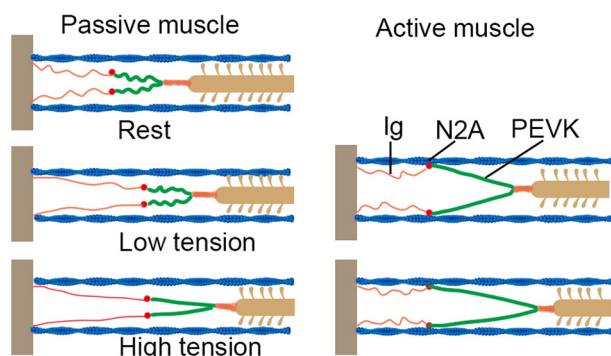
图 3. 肌联蛋白刚度调节示意图^[86]

Fig. 3. Schematic of titin stiffness adjustment. Modified with permission from Nishikawa^[86].

的直接调节作用相对较小^[87]; 另一方面, Ca^{2+} 可以通过调节肌联蛋白与细肌丝的相互作用间接影响肌联蛋白刚度, Ca^{2+} 触发的肌动蛋白与肌联蛋白的结合在离心收缩力增强时尤为显著^[88]。

当肌细胞内 Ca^{2+} 浓度增加时, 肌联蛋白近端 N2A 片段可特异性地与肌动蛋白结合, 将顺应性较高的串联 Ig 结构域与刚度较高的 PEVK 区域分离, 潜在地减少 I 带可扩展区域的长度, 从而增加肌联蛋白的刚度和张力^[88, 89]。Dutta 等^[90] 通过共沉淀实验及单分子力光谱分析技术证实 Ca^{2+} 增加了 N2A 与肌动蛋白相互作用的强度和稳定性, 并发现 N2A 与 F-肌动蛋白结合及肌联蛋白被拉断时的力随着 Ca^{2+} 浓度的增加有增加趋势。Powers 等^[91] 研究显示, Ca^{2+} 诱导的肌联蛋白刚度增加, 15% 是由于肌联蛋白自身性质的改变, 85% 是由于肌联蛋白与肌动蛋白的相互作用。

肌联蛋白对 Ca^{2+} 敏感性在不同条件下亦有较大差异, 其中最明显的是肌节被拉伸后长度依赖性激活 (length-dependent activation, LDA)。LDA 的特征是在肌节拉伸期间肌丝的 Ca^{2+} 敏感性立即增加, 表现为肌联蛋白刚度的增加更显著^[92]。Zhang 等^[93] 研究了肌节初始长度分别为 1.9 μm (蓝线) 和 2.3 μm (红线) 时肌纤维收缩力与 Ca^{2+} 浓度变化关系 (图 4), 发现肌节被拉伸后在相同 Ca^{2+} 浓度条件下收缩力增加, 即肌节被拉伸后肌联蛋白对 Ca^{2+} 敏感程度增加, 肌节长度减小时肌联蛋白对 Ca^{2+} 敏感程度降低^[48, 94]。有学者认为 LDA 是由于减少了肌丝间距, 在 Ca^{2+} 作用下促使横桥结合效率提高, 从而增加力的输出^[95]。不过, 亦有研究显示, 肌丝 Ca^{2+} 敏感性受肌节长度本身的影响, 不受减少的肌丝间距的

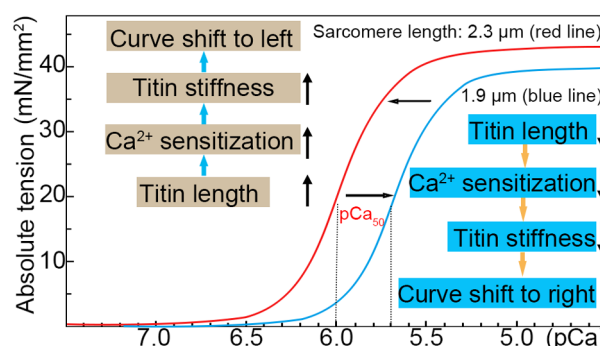
图 4. 不同初始长度肌节张力与 Ca^{2+} 浓度关系

Fig. 4. Relationship between tension and Ca^{2+} with different initial sarcomere length (blue: 1.9 μm ; red: 2.3 μm). Modified with permission from Zhang *et al*^[93].

影响^[96]。因此, LDA 增加肌纤维力输出的具体机制还有待深入的研究, 可能是肌联蛋白通过其应变传感功能发挥作用, 但其现象已是公认的事实。

3.2 磷酸化水平对肌联蛋白刚度的调节

在肌节中, 肌联蛋白形成了一个连续的纤维网络, 影响被动张力的产生, 并在一定程度上调节主动收缩。肌联蛋白刚度的微调主要通过翻译后修饰进行, 其中有关翻译后修饰改变肌联蛋白刚度的研究主要集中在磷酸化方面。磷酸化在许多生物发生过程中都很重要^[97], 并在肌细胞功能的调节中发挥关键作用^[98]。研究表明, 改变肌联蛋白 I 带磷酸化状态会改变骨骼肌细胞和心肌细胞中肌联蛋白的弹力^[99]。到目前为止, 已经确定的磷酸化位点有 cAMP 依赖性蛋白激酶、cGMP 依赖性蛋白激酶^[100]、 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶 C^[101]、细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2) 位点^[102] 和 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II δ (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase-II δ , CaMKII δ) 位点^[103]。Hamdani 等^[104] 认为肌联蛋白分子 Z 盘区、I 带区和 M 线内磷酸化位点各有 15 个, A 带内有 22 个。具备磷酸化作用的蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 可通过磷酸化肌联蛋白 N2B 片段或 PEVK 区域来改变肌联蛋白的被动刚度^[52, 105]。

目前只发现 PKC 可以增加肌联蛋白基础刚度, 而 PKA、PKG、ERK2 和 CaMKII δ 四种激酶可以降低这种刚度^[101-103]。肌联蛋白中组成 PEVK 区域的两个高度保守的丝氨酸残基可被 PKC 磷酸化,

从而特异性调节弹性 PEVK 区域的刚度^[101]。单分子力-长度曲线表明, PKC 通过磷酸化 PEVK 区域 C 端的两个丝氨酸残基 (Ser-26 和 Ser-170), 减少了 PEVK 区域的长度, 从而提高肌联蛋白的被动张力^[101]。

PKA 是第一个报道能够在体外磷酸化肌联蛋白弹性 I 带区、N2B 片段的激酶, 这种修饰也可以被 β 肾上腺素诱导^[43, 106]。心肌肌联蛋白 N2B 片段的独特序列是 PKA 的底物, 磷酸化调节可降低心肌细胞的被动张力^[107]。被动张力的降低可能是由于磷酸化诱导 N2B 区域固有结构稳定性降低, 延长了肌联蛋白可扩展区域长度, 因此降低了被动张力^[107]。质谱分析结果显示, 肌联蛋白 N2B 或 N2A 片段的相关位点磷酸化可改变其长度, 基础长度越长, 拉伸肌联蛋白所需的力就越小, 被动刚度越小^[103]。在心肌中, PKA 和 PKG 都可磷酸化心脏特异性 N2B 片段中的丝氨酸残基, 增加该片段的长度 (约 2 倍), 从而降低被动刚度^[103]。PKG 介导的肌联蛋白磷酸化并不局限于 N2B 片段, 在 N2A 片段中也能检测到, 虽然这种修饰对肌联蛋白刚度影响较小^[100, 108]。Krüger 等^[108]利用模型预测 N2B 片段长度的增加将使整个心脏肌联蛋白弹性区域的被动张力降低近 20%。N2B 片段不仅可被 PKA 磷酸化, 还可以被 cGMP 依赖的 ERK2 和 CaMKII δ 磷酸化, 导致自身刚度下调^[102]。

4 总结与展望

肌联蛋白是已知分子量最高的蛋白质, 在结构方面横跨半个肌节, 由起固定作用且不具扩展性的 N 端 Z 盘区、A 带区、C 端 M 线区及具有弹性和扩展性的 I 带区组成。在亚型分类方面, 心肌肌联蛋白表达较长且顺应性更高的 N2BA 亚型和较短且坚硬的 N2B 亚型, 骨骼肌表达 N2A 亚型。心肌 N2B/N2BA 比值在内外部因素影响下可发生变化, 以适应生理功能需要, 在胚胎时随年龄的增长比值增加, 在老年时随年龄增加或在病理条件下比值减小。在功能方面, 肌联蛋白在肌肉收缩中起双向弹簧作用, 在拉伸或压缩时产生被动力, 协助肌肉收缩与放松。当肌细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 肌联蛋白通过与肌动蛋白结合减小可扩展区域长度、改善自身性质两种形式增加刚度。PKC 可通过肌联蛋白磷酸化位点降低 PEVK 区域长度, 增加刚度; PKA、PKG、ERK2 和 CaMKII δ 四种激酶通过诱导肌联蛋白部分可扩展区域延长, 降低其刚度。

研究显示, 肌联蛋白不仅能够储存纵向拉伸与压缩力, 还具有储存旋转力的功能^[109], 未来研究可通过建立模型探索肌纤维在不同收缩速度下肌联蛋白储存旋转力功能与运动效率的关系。运动与肌联蛋白基本功能及其表型的关系还有待深入的探索。肌联蛋白作为贯穿肌肉的基本骨架, 是接受与协调应激刺激的理想蛋白, 研究表明肌联蛋白突变与肌萎缩、扩张型心肌病等的信号调节密切相关, 可能是治疗上述肌肉疾病的重要靶点蛋白之一^[98, 110], 后续需要进行进一步的研究验证, 从而为临床治疗提供新思路和新方法。

参考文献

- 1 Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(9): 679–689.
- 2 Labeit S, Kolmerer B. Titins: giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science* 1995; 270(5234): 293–296.
- 3 Li JP (李俊平), Xu YM, Fang WB. Effects of hypoxia and hypoxic exercise on content of titin and nebulin of skeletal muscle. *J Beijing Sport Univ* (北京体育大学学报) 2010; 33(1): 42–44 (in Chinese).
- 4 Zhou Y (周越). Dystrophin content and membrane function affected by eccentric exercise [D/OL]. *Beijing Sport University* (北京体育大学), 2005 (in Chinese). https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=s1YNj1Y_QLMkYzKA-4z43PhMJN8Rux23dhFH8mX45n2RbjkqB8_LMXkkrL_H22f4VQBleCUWv-c_DoivKLZ9fq5mft8IEZ2maBuM-LZiokHOIBVXjUSkPhw==&uniplatform=NZKPT&language=gb
- 5 Herzog W. The multiple roles of titin in muscle contraction and force production. *Biophys Rev* 2018; 10(4): 1187–1199.
- 6 Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S. Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11(1): 18–25.
- 7 Gautel M, Djinić-Carugo K. The sarcomeric cytoskeleton: from molecules to motion. *J Exp Biol* 2016; 219(Pt 2): 135–145.
- 8 Bang ML, Centner T, Fornoff F, Geach AJ, Gotthardt M, McNabb M, Witt CC, Labeit D, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual approximately 700-kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system. *Circ Res* 2001; 89(11): 1065–1072.
- 9 Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitás K, Geach AJ, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio CC, Labeit S. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric

- protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol* 2001; 153(2): 413–427.
- 10 Rivas-Pardo JA, Eckels EC, Popa I, Kosuri P, Linke WA, Fernández JM. Work done by titin protein folding assists muscle contraction. *Cell Rep* 2016; 14(6): 1339–1347.
- 11 Zhao Q (赵倩), Zhang XL. Discussion on the revision of the sliding filament theory on the questions of eccentric contraction mechanism. *Acta Physiol Sin* (生理学报) 2021; 73(1): 143–147 (in Chinese).
- 12 Huxley AF, Niedergerke R. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* 1954; 173(4412): 971–973.
- 13 Huxley H, Hanson J. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 1954; 173(4412): 973–976.
- 14 Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem* 1957; 7: 255–318.
- 15 Hill AV. The heat of activation and the heat of shortening in a muscle twitch. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1949; 136(883): 195–211.
- 16 Schappacher-Tilp G, Leonard T, Desch G, Herzog W. A novel three-filament model of force generation in eccentric contraction of skeletal muscles. *PLoS One* 2015; 10(3): e0117634.
- 17 Maruyama K, Natori R, Nonomura Y. New elastic protein from muscle. *Nature* 1976; 262(5563): 58–60.
- 18 Wang K, McClure J, Tu A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(8): 3698–3702.
- 19 Maruyama K, Kimura S, Ohashi K, Kuwano Y. Connectin, an elastic protein of muscle. Identification of “titin” with connectin. *J Biochem* 1981; 89(3): 701–709.
- 20 Spierts IL, Akster HA, Granzier HL. Expression of titin isoforms in red and white muscle fibres of carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to different sarcomere strains during swimming. *J Comp Physiol B* 1997; 167(8): 543–551.
- 21 Wang K. Titin/connectin and nebulin: giant protein rulers of muscle structure and function. *Adv Biophys* 1996; 33: 123–134.
- 22 Linke WA, Hamdani N. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin. *Circ Res* 2014; 114(6): 1052–1068.
- 23 Huxley HE. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J Mol Biol* 1963; 7: 281–308.
- 24 Tskhovrebova L, Trinick J. Titin and nebulin in thick and thin filament length regulation. *Subcell Biochem* 2017; 82: 285–318.
- 25 Liversage AD, Holmes D, Knight PJ, Tskhovrebova L, Trinick J. Titin and the sarcomere symmetry paradox. *J Mol Biol* 2001; 305(3): 401–409.
- 26 Chen M (陈明). The third myofilament of striated muscle myofibrils - titin. *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展) 1994; 21(5): 403–406, 473 (in Chinese).
- 27 Horowitz R, Kempner ES, Bisher ME, Podolsky RJ. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature* 1986; 323(6084): 160–164.
- 28 Bennett P, Rees M, Gautel M. The axial alignment of titin on the muscle thick filament supports its role as a molecular ruler. *J Mol Biol* 2020; 432(17): 4815–4829.
- 29 Yakupova EI, Vikhlyantsev IM, Lobanov MY, Galzitskaya OV, Bobylev AG. Amyloid properties of titin. *Biochemistry (Mosc)* 2017; 82(13): 1675–1685.
- 30 Freundt JK, Linke WA. Titin as a force-generating muscle protein under regulatory control. *J Appl Physiol* (1985) 2019; 126(5): 1474–1482.
- 31 Gautel M. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing. *Pflugers Arch* 2011; 462(1): 119–134.
- 32 Helmes M, Trombitás K, Centner T, Kellermayer M, Labeit S, Linke WA, Granzier H. Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin’s unique N2B sequence: titin is an adjustable spring. *Circ Res* 1999; 84(11): 1339–1352.
- 33 von Castelmur E, Marino M, Svergun DI, Kreplak L, Ucurum-Fotiadis Z, Konarev PV, Urzhumtsev A, Labeit D, Labeit S, Mayans O. A regular pattern of Ig super-motifs defines segmental flexibility as the elastic mechanism of the titin chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(4): 1186–1191.
- 34 Li H, Linke WA, Oberhauser AF, Carrion-Vazquez M, Kerkvliet JG, Lu H, Marszalek PE, Fernandez JM. Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* 2002; 418(6901): 998–1002.
- 35 Linke WA, Ivemeyer M, Olivieri N, Kolmerer B, Rüegg JC, Labeit S. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J Mol Biol* 1996; 261(1): 62–71.
- 36 Sanchez GN, Sinha S, Liske H, Chen X, Nguyen V, Delp SL, Schnitzer MJ. *In vivo* imaging of human sarcomere twitch dynamics in individual motor units. *Neuron* 2015; 88(6): 1109–1120.
- 37 Swist S, Unger A, Li Y, Vöge A, von Frieling-Salewsky M, Skärén Å, Cacciani N, Braun T, Larsson L, Linke WA. Maintenance of sarcomeric integrity in adult muscle cells crucially depends on Z-disc anchored titin. *Nat Commun* 2020; 11(1): 4479.
- 38 Zou P, Pinotsis N, Lange S, Song YH, Popov A, Mavridis I, Mayans OM, Gautel M, Wilmanns M. Palindromic assembly

- of the giant muscle protein titin in the sarcomeric Z-disk. *Nature* 2006; 439(7073): 229–233.
- 39 Knöll R, Linke WA, Zou P, Miodic S, Kostin S, Buyandelger B, Ku CH, Neef S, Bug M, Schäfer K, Knöll G, Felkin LE, Wessels J, Toischer K, Hagn F, Kessler H, Didié M, Quentin T, Maier LS, Teucher N, Unsöld B, Schmidt A, Birks EJ, Gunkel S, Lang P, Granzier H, Zimmermann WH, Field LJ, Faulkner G, Döbelstein M, Barton PJ, Sattler M, Wilmanns M, Chien KR. Telethonin deficiency is associated with maladaptation to biomechanical stress in the mammalian heart. *Circ Res* 2011; 109(7): 758–769.
 - 40 Labeit S, Lahmers S, Burkart C, Fong C, McNabb M, Witt S, Witt C, Labeit D, Granzier H. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins. *J Mol Biol* 2006; 362(4): 664–681.
 - 41 Weinert S, Bergmann N, Luo X, Erdmann B, Gotthardt M. M line-deficient titin causes cardiac lethality through impaired maturation of the sarcomere. *J Cell Biol* 2006; 173(4): 559–570.
 - 42 Agarkova I, Perriard JC. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* 2005; 15(9): 477–485.
 - 43 Fernando P, Sandoz JS, Ding W, de Repentigny Y, Brunette S, Kelly JF, Kothary R, Megeney LA. Bin1 SRC homology 3 domain acts as a scaffold for myofiber sarcomere assembly. *J Biol Chem* 2009; 284(40): 27674–27686.
 - 44 Ehler E, Gautel M. The sarcomere and sarcomerogenesis. *Adv Exp Med Biol* 2008; 642: 1–14.
 - 45 Fürst DO, Osborn M, Nave R, Weber K. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J Cell Biol* 1988; 106(5): 1563–1572.
 - 46 Methawasin M, Farman GP, Granzier-Nakajima S, Strom J, Kiss B, Smith JE 3rd, Granzier H. Shortening the thick filament by partial deletion of titin's C-zone alters cardiac function by reducing the operating sarcomere length range. *J Mol Cell Cardiol* 2022; 165: 103–114.
 - 47 Freiburg A, Trombitas K, Hell W, Cazorla O, Fougère F, Centner T, Kolmerer B, Witt C, Beckmann JS, Gregorio CC, Granzier H, Labeit S. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity. *Circ Res* 2000; 86(11): 1114–1121.
 - 48 Linke WA. Titin gene and protein functions in passive and active muscle. *Annu Rev Physiol* 2018; 80: 389–411.
 - 49 Neagoe C, Kulke M, del Monte F, Gwathmey JK, de Tombe PP, Hajjar RJ, Linke WA. Titin isoform switch in ischemic human heart disease. *Circulation* 2002; 106(11): 1333–1341.
 - 50 Prado LG, Makarenko I, Andresen C, Krüger M, Opitz CA, Linke WA. Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J Gen Physiol* 2005; 126(5): 461–480.
 - 51 Neagoe C, Opitz CA, Makarenko I, Linke WA. Gigantic variety: expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness. *J Muscle Res Cell Motil* 2003; 24(2–3): 175–189.
 - 52 Anderson BR, Granzier HL. Titin-based tension in the cardiac sarcomere: molecular origin and physiological adaptations. *Prog Biophys Mol Biol* 2012; 110(2–3): 204–217.
 - 53 Trombitas K, Wu Y, Labeit D, Labeit S, Granzier H. Cardiac titin isoforms are coexpressed in the half-sarcomere and extend independently. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281(4): H1793–H1799.
 - 54 Greaser M. Identification of new repeating motifs in titin. *Proteins* 2001; 43(2): 145–149.
 - 55 Kellermayer D, Kiss B, Tordai H, Oláh A, Granzier HL, Merkely B, Kellermayer M, Radovits T. Increased expression of N2BA titin corresponds to more compliant myofibrils in athlete's heart. *Int J Mol Sci* 2021; 22(20): 11110.
 - 56 Hamilton N, Ianuzzo CD. Contractile and calcium regulating capacities of myocardia of different sized mammals scale with resting heart rate. *Mol Cell Biochem* 1991; 106(2): 133–141.
 - 57 Helmes M, Trombitas K, Granzier H. Titin develops restoring force in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 1996; 79(3): 619–626.
 - 58 Opitz CA, Leake MC, Makarenko I, Benes V, Linke WA. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart. *Circ Res* 2004; 94(7): 967–975.
 - 59 Lahmers S, Wu Y, Call DR, Labeit S, Granzier H. Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circ Res* 2004; 94(4): 505–513.
 - 60 Nagueh SF, Shah G, Wu Y, Torre-Amione G, King NM, Lahmers S, Witt CC, Becker K, Labeit S, Granzier HL. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110(2): 155–162.
 - 61 Li SC (李顺昌), Gao DR, Ismail L, Su QS. The effect of myocardial titin on diastolic function in diabetic rats when performing aerobic and resistance training. *Chin Sport Sci Tech (中国体育科技)* 2021; 57(11): 67–73 (in Chinese).
 - 62 Santiago CF, Huttner IG, Fatkin D. Titin-related cardiomyopathy: Is it a distinct disease? *Curr Cardiol Rep* 2022;

- 24(9): 1069–1075.
- 63 Lindstedt SL, Nishikawa KC. From Tusko to Titin: the role for comparative physiology in an era of molecular discovery. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015; 308(12): R983–R989.
 - 64 Erickson HP. Stretching single protein molecules: titin is a weird spring. *Science* 1997; 276(5315): 1090–1092.
 - 65 Linke WA, Granzier H. A spring tale: new facts on titin elasticity. *Biophys J* 1998; 75(6): 2613–2614.
 - 66 Fukuda N, Wu Y, Farman G, Irving TC, Granzier H. Titin isoform variance and length dependence of activation in skinned bovine cardiac muscle. *J Physiol* 2003; 553(Pt 1): 147–154.
 - 67 Loescher CM, Hobbach AJ, Linke WA. Titin (TTN): from molecule to modifications, mechanics and medical significance. *Cardiovasc Res* 2022; 118(14): 2903–2918.
 - 68 Ortega JO, Lindstedt SL, Nelson FE, Jubrias SA, Kushmerick MJ, Conley KE. Muscle force, work and cost: a novel technique to revisit the Fenn effect. *J Exp Biol* 2015; 218(Pt 13): 2075–2082.
 - 69 Minozzo FC, Lira CA. Muscle residual force enhancement: a brief review. *Clinics (Sao Paulo)* 2013; 68(2): 269–274.
 - 70 Joumaa V, Leonard TR, Herzog W. Residual force enhancement in myofibrils and sarcomeres. *Proc Biol Sci* 2008; 275(1641): 1411–1419.
 - 71 Minajeva A, Neagoe C, Kulke M, Linke WA. Titin-based contribution to shortening velocity of rabbit skeletal myofibrils. *J Physiol* 2002; 540(Pt 1): 177–188.
 - 72 Bianco P, Reconditi M, Piazzesi G, Lombardi V. Is muscle powered by springs or motors? *J Muscle Res Cell Motil* 2016; 37(4–5): 165–167.
 - 73 Donlin LT, Andresen C, Just S, Rudensky E, Pappas CT, Kruger M, Jacobs EY, Unger A, Zieseniss A, Dobenecker MW, Voelkel T, Chait BT, Gregorio CC, Rottbauer W, Tarakhovsky A, Linke WA. Smyd2 controls cytoplasmic lysine methylation of Hsp90 and myofilament organization. *Genes Dev* 2012; 26(2): 114–119.
 - 74 Berkovich R, Hermans RI, Popa I, Stirnemann G, Garcia-Manyes S, Berne BJ, Fernandez JM. Rate limit of protein elastic response is tether dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(36): 14416–14421.
 - 75 Eckels EC, Tapia-Rojó R, Rivas-Pardo JA, Fernández JM. The work of titin protein folding as a major driver in muscle contraction. *Annu Rev Physiol* 2018; 80: 327–351.
 - 76 Bagni MA, Colombini B, Geiger P, Berlinguer Palmini R, Cecchi G. Non-cross-bridge calcium-dependent stiffness in frog muscle fibers. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286(6): C1353–C1357.
 - 77 Joumaa V, Rassier DE, Leonard TR, Herzog W. The origin of passive force enhancement in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294(1): C74–C78.
 - 78 King NM, Methawasin M, Nedrud J, Harrell N, Chung CS, Helmes M, Granzier H. Mouse intact cardiac myocyte mechanics: cross-bridge and titin-based stress in unactivated cells. *J Gen Physiol* 2011; 137(1): 81–91.
 - 79 Attene G, Iuliano E, Di Cagno A, Calcagno G, Moalla W, Aquino G, Padulo J. Improving neuromuscular performance in young basketball players: plyometric vs. technique training. *J Sports Med Phys Fitness* 2015; 55(1–2): 1–8.
 - 80 Nishikawa K. Titin: A tunable spring in active muscle. *Physiology (Bethesda)* 2020; 35(3): 209–217.
 - 81 Cornachione AS, Leite F, Bagni MA, Rassier DE. The increase in non-cross-bridge forces after stretch of activated striated muscle is related to titin isoforms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; 310(1): C19–C26.
 - 82 Lindstedt S, Nishikawa K. Huxleys' missing filament: Form and function of titin in vertebrate striated muscle. *Annu Rev Physiol* 2017; 79: 145–166.
 - 83 Nishikawa K, Dutta S, DuVall M, Nelson B, Gage MJ, Monroy JA. Calcium-dependent titin-thin filament interactions in muscle: observations and theory. *J Muscle Res Cell Motil* 2020; 41(1): 125–139.
 - 84 Tsiros C, Punch E, Schaffter E, Apel S, Gage MJ. Identification of the domains within the N2A region of titin that regulate binding to actin. *Biochem Biophys Res Commun* 2022; 589: 147–151.
 - 85 Adewale AO, Ahn YH. Titin N2A domain and its interactions at the sarcomere. *Int J Mol Sci* 2021; 22(14): 7563.
 - 86 Nishikawa K. Eccentric contraction: unraveling mechanisms of force enhancement and energy conservation. *J Exp Biol* 2016; 219(Pt 2): 189–196.
 - 87 Labeit D, Watanabe K, Witt C, Fujita H, Wu Y, Lahmers S, Funck T, Labeit S, Granzier H. Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(23): 13716–13721.
 - 88 Herzog W, Schappacher G, DuVall M, Leonard TR, Herzog JA. Residual force enhancement following eccentric contractions: A new mechanism involving titin. *Physiology (Bethesda)* 2016; 31(4): 300–312.
 - 89 Nishikawa KC, Monroy JA, Uyeno TE, Yeo SH, Pai DK, Lindstedt SL. Is titin a 'winding filament'? A new twist on muscle contraction. *Proc Biol Sci* 2012; 279(1730): 981–990.
 - 90 Dutta S, Tsiros C, Sundar SL, Athar H, Moore J, Nelson B, Gage MJ, Nishikawa K. Calcium increases titin N2A binding to F-actin and regulated thin filaments. *Sci Rep* 2018; 8(1): 14575.
 - 91 Powers K, Schappacher-Tilp G, Jinha A, Leonard T, Nishi-

- kawa K, Herzog W. Titin force is enhanced in actively stretched skeletal muscle. *J Exp Biol* 2014; 217(Pt 20): 3629–3636.
- 92 Shi J, Watanabe D, Wada M. Eccentric muscle contraction potentiates titin stiffness-related contractile properties in rat fast-twitch muscles. *J Appl Physiol* (1985) 2022; 133(3): 710–720.
 - 93 Zhang X, Kampourakis T, Yan Z, Sevirieva I, Irving M, Sun YB. Distinct contributions of the thin and thick filaments to length-dependent activation in heart muscle. *Elife* 2017; 6: e24081.
 - 94 Shi J, Watanabe D, Wada M. Effects of vigorous isometric muscle contraction on titin stiffness-related contractile properties in rat fast-twitch muscles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2021; 321(6): R858–R868.
 - 95 Fuchs F, Smith SH. Calcium, cross-bridges, and the Frank-Starling relationship. *News Physiol Sci* 2001; 16: 5–10.
 - 96 Li Y, Lang P, Linke WA. Titin stiffness modifies the force-generating region of muscle sarcomeres. *Sci Rep* 2016; 6: 24492.
 - 97 Pawson T, Scott JD. Protein phosphorylation in signaling--50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(6): 286–290.
 - 98 Hamdani N, de Waard M, Messer AE, Boontje NM, Kooij V, van Dijk S, Versteilen A, Lamberts R, Merkus D, Dos Remedios C, Duncker DJ, Borbely A, Papp Z, Paulus W, Stienen GJ, Marston SB, van der Velden J. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil* 2008; 29(6–8): 189–201.
 - 99 Unger A, Beckendorf L, Böhme P, Kley R, von Frieling-Salewsky M, Lochmüller H, Schröder R, Fürst DO, Vorgerd M, Linke WA. Translocation of molecular chaperones to the titin springs is common in skeletal myopathy patients and affects sarcomere function. *Acta Neuropathol Commun* 2017; 5(1): 72.
 - 100 Kötter S, Gout L, Von Frieling-Salewsky M, Müller AE, Helling S, Marcus K, Dos Remedios C, Linke WA, Krüger M. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts. *Cardiovasc Res* 2013; 99(4): 648–656.
 - 101 Hidalgo C, Hudson B, Bogomolovas J, Zhu Y, Anderson B, Greaser M, Labeit S, Granzier H. PKC phosphorylation of titin's PEVK element: a novel and conserved pathway for modulating myocardial stiffness. *Circ Res* 2009; 105(7): 631–638.
 - 102 Raskin A, Lange S, Banares K, Lyon RC, Zieseniss A, Lee LK, Yamazaki KG, Granzier HL, Gregorio CC, McCulloch AD, Omens JH, Sheikh F. A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics. *J Biol Chem* 2012; 287(35): 29273–29284.
 - 103 Hamdani N, Krysiak J, Kreusser MM, Neef S, Dos Remedios CG, Maier LS, Krüger M, Backs J, Linke WA. Crucial role for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation. *Circ Res* 2013; 112(4): 664–674.
 - 104 Hamdani N, Herwig M, Linke WA. Tampering with springs: phosphorylation of titin affecting the mechanical function of cardiomyocytes. *Biophys Rev* 2017; 9(3): 225–237.
 - 105 Perkin J, Slater R, Del Favero G, Lanzicher T, Hidalgo C, Anderson B, Smith JE 3rd, Sbaizero O, Labeit S, Granzier H. Phosphorylating titin's cardiac N2B element by ERK2 or CaMKII δ lowers the single molecule and cardiac muscle force. *Biophys J* 2015; 109(12): 2592–2601.
 - 106 Krüger M, Kohl T, Linke WA. Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca^{2+} sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291(2): H496–H506.
 - 107 Yamasaki R, Wu Y, McNabb M, Greaser M, Labeit S, Granzier H. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes. *Circ Res* 2002; 90(11): 1181–1188.
 - 108 Krüger M, Kötter S, Grützner A, Lang P, Andresen C, Redfield MM, Butt E, dos Remedios CG, Linke WA. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. *Circ Res* 2009; 104(1): 87–94.
 - 109 Zacharchenko T, von Castelmur E, Rigden DJ, Mayans O. Structural advances on titin: towards an atomic understanding of multi-domain functions in myofilament mechanics and scaffolding. *Biochem Soc Trans* 2015; 43(5): 850–855.
 - 110 Kellermayer D, Smith JE 3rd, Granzier H. Titin mutations and muscle disease. *Pflügers Arch* 2019; 471(5): 673–682.