Doktori (Ph.D.) értekezés

A twinfilin-1 hatása az aktin szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira

Takács-Kollár Veronika

Témavezető: Dr. Hild Gábor

Program: Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Dr. Sümegi Balázs†, Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Alprogram (B-130): Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Biofizikai Intézet
Pécs, 2020

„Mindegy hogy érzed magad, kelj fel, öltözz fel és küzdj az álmaidért…”

Adam Lambert

TARTALOMJEGYZÉK

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 5
1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 8
2.1. Aktin 8
2.2. Aktin-kötő fehérjék 13
2.3. Twinfilin 16
3. CÉLKITŰZÉSEK 23
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 24
4.1. A kísérletekhez használt fehérjék előállítása és fluoreszcens jelölése 24
4.1.1. Aktin preparálása 24
4.1.2. Egér twinfilin-1 expressziója és tisztítása 24
4.1.3. Az aktin fluoreszcens jelölése 25
4.2. Fluoreszcencia anizotrópia mérések 28
4.3. Nukleotid kicserélődés vizsgálata 29
4.4. Fluoreszcencia kioltási kísérletek 30
4.5. Hőmérsékletfüggő FRET mérések 32
4.6. Koszedimentációs kísérletek 34
4.7. Aktin depolimerizációs esszé 34
4.8. Evaneszcens mező mikroszkópia (TIRFM) 34
4.9. Differenciális pásztázó kalorimetria mérések 35
4.10. Adatok statisztikai elemzése 37
5. EREDMÉNYEK 38
5.1. Egér Twinfilin-1 hatása az aktin monomer szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira 38
5.1.1. Twinfilin-1 G-aktinhoz való affinitásának meghatározása 38
5.1.2. Nukleotid kicserélődés vizsgálata aktin monomeren 39
5.1.3. Fluoreszcensen jelölt ATP hozzáférhetőségének vizsgálata kioltási kísérletekkel 41
5.1.4. Az aktin monomer kis doménjének szerkezeti és dinamikai vizsgálata FRET módszerrel 45
5.1.5. Az aktin monomer termodinamikai stabilitásának vizsgálata 49
5.1.6. A twinfilin aktin kölcsönhatásának vizsgálata koszedimentációs kísérletekkel 51
5.2. Egér twinfilin-1 kölcsönhatásának vizsgálata F-aktinnal 53
5.2.1. Az egér twinfilin-1 aktin filamentumhoz való kötésének vizsgálata 53
5.2.2. A twinfilin-1 hatása az aktin filamentum depolimerizációjának dinamikájára 54
5.2.3. A twinfilin-1 egyedi aktin filamentumokra gyakorolt hatásának vizsgálata 57

5.2.4. Az aktin filamentum termodinamikai stabilitásának vizsgálata 59
6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉS 61
7. IRODALOMJEGYZÉK 64

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Hild Gábornak. Köszönetemet fejezem ki a munkám során nyújtott kiváló szakmai irányításáért, türelméért és támogatásáért.

Köszönettel tartozom Professzor Dr. Kellermayer Miklósnak, hogy az egyetem elvégzését követően munkalehetőséget biztosított számomra a Biofizikai Intézetben.

Köszönettel tartozom Professzor Dr. Nyitrai Miklósnak, hogy a doktori program vezetőként Intézetében lehetőséget adott kutatómunkám elvégzéséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Ujfalusi Zoltánnak és Dr. Kardos Rolandnak, hogy értékes tanácsaikkal segítették munkámat, valamint köszönöm a Biofizikai Intézet összes munkatársának a mindennapokban nyújtott segítségét.

Szeretném hálásan megköszönni családomnak, hogy mindvégig türelmesen támogattak és bátorítottak doktori kutatásaim során. Végezetül köszönetet mondok kisfiamnak, Milánnak, hogy szeretetével boldoggá teszi a mindennapokat.

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADF-H	aktin depolimerizáló faktor homológ
ADP	adenozin-5'-difoszfát
Alexa488SE	alexa fluor 488 szukcinimidil észter
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
BSA	marha szérum albumin
DABCO	1,4-diazabiciklo-[2.2.2] oktán
DSC	differenciális pásztázó kalorimetria
DTT	ditiothreitol
ε-ATP	N^6-etenoadenozin-5'-trifoszfát
FRET	fluoreszcencia (Förster) rezonancia energia transzfer
FITC	fluoreszcein-5-izotiocianát
IAEDANS	N-jód-acetaminoetil-1-naftilamin-5-szulfonsav
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
LatA	latrunkulin A
MEA	β-merkapto-etanol
MOPS	3-(N-morfolino)-propánszulfonsav
NaN_3	nátrium-azid
Pirén	N-(1-pirén)-jódacetamid
SD	standard szórás
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SDS-PAGE	SDS poliakrilamid gélelektroforézis
Srv2/CAP	RAS gén szupresszor / cikláz-asszociált fehérje
TIRFM	teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia
TWF	twinfilin
WH2	Wiskott–Aldrich szindróma fehérje homológ domén

SZINONÍMÁK

aktin monomer – G-aktin

aktin filamentum – F-aktin

domén – alegység

szöges vég – plusz vég – + vég

hegyes vég – mínusz vég – - vég

üledék – pellet – P

felülúszó – szupernatáns – SN

„severing” – fragmentáló – daraboló

„szekvesztráló” – monomer formában tartó

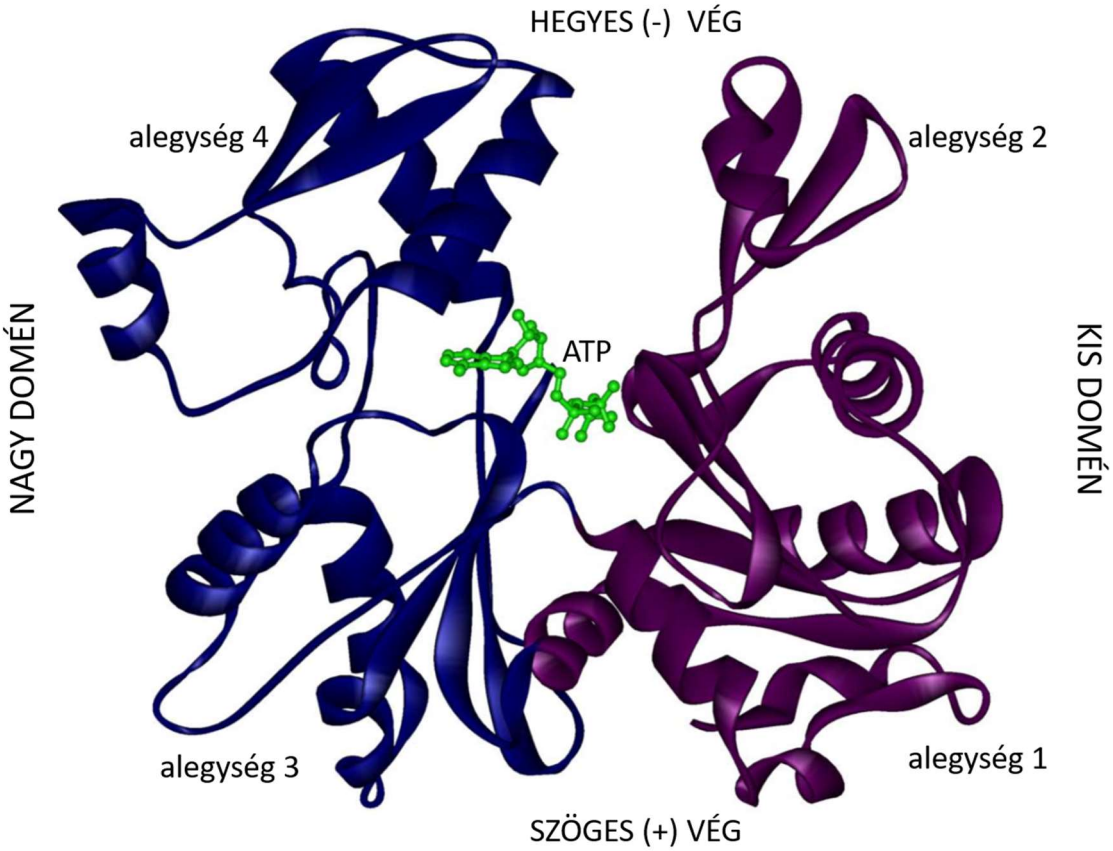
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Aktin

Az aktin az eukarióta sejtekben legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje, a mikrofilamentum-rendszer fő alkotó eleme. A sejtműködés szabályozásának nélkülözhetetlen funkcionális egysége, mely olyan folyamatokban játszik kulcsszerepet, mint a sejtváz kialakítása, transzport folyamatok létrejötte vagy a sejtmozgás [1,2,3].

Az aktin 1942-es véletlennek köszönhető felfedezése Banga Ilona és Szent-Györgyi Albert nevéhez fűződik [4,5,6]. A felfedezést megelőzően Szent-Györgyi kutatócsoportjának már sikerült izolálniuk egy alacsony viszkozitású miozint nyúl vázizomból 0,6 M KCl jelenléte mellett, melyet miozin A-nak neveztek el. Egy fehérje preparálás során Banga Ilona a miozin extrakciót későn fejezte be, ezért a fehérjét éjszakán át hidegszobában hagyta 0,6 M-os kálium-klorid oldatban. Másnap egy érdekes megfigyelést tett, a miozin zselészerű, viszkózus anyaggá alakult át (miozin B) az éjszaka során. Feltételezték, hogy az oldat eltérő viselkedése egy másik fehérje megjelenésének tulajdonítható. Ennek igazolására izolálták a miozin A-t, majd a maradék aprított izmot éjszakán át hidegszobában hagyták. Másnap desztillált vízzel történő mosást követően acetonnal szárították az izomforgácsot annak érdekében, hogy eltávolítsák a maradék KCl-ot és egyéb citoplazmatikus fehérjét. Az aceton-extrahált izomforgácsból kinyert fehérje a miozin B-hez hasonlóan igen viszkózus oldatot képzett a miozin A-val. Az így felfedezett fehérjéről azt gondolták, hogy egy **akt**ivált mioz**in**, és ez alapján Szent-Györgyi Albert aktinnak nevezte el [7]. Az aktin izolálásának kidolgozásában és kivitelezésében egy fiatal biokémikusnak, Straub Ferenc Brúnónak nagy szerepe volt. Straub azt is felfedezte, hogy az extraháló oldattól függően kétféle aktint különböztethetünk meg. Egy víz alapú extrakcióval alacsony viszkozitású oldatot kapunk (aktin monomer), melyhez kálium-kloridot adva megnő annak viszkozitása (F-aktin) [8]. A későbbiekben azt is sikerült kimutatni, hogy az aktin monomer ATP-t köt, mely a polimerizáció során adenozin-5'-difoszfáttá és inorganikus foszfáttá hidrolizál [9]. Csak később írták le, hogy az aktin nemcsak az izomnak, hanem a nem-izom sejtek citoszkeletonjának is alapvető építő eleme [10,11].

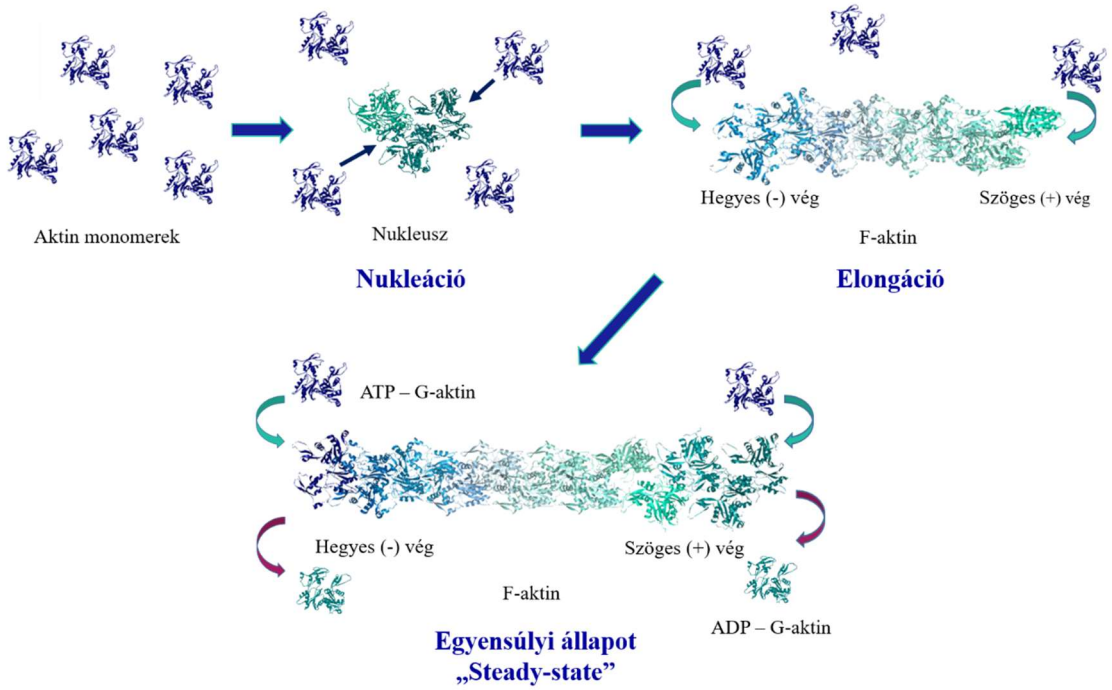
Az aktin egy 375 aminosavból álló, 42,3 kDa molekulatömegű fehérje, mely a sejtben monomer (G-aktin) vagy filamentális (F-aktin) formában fordul elő. Az aktin monomer - DNáz I komplex háromdimenziós röntgen-krisztallográfiás szerkezete 1990- ben vált ismertté [12]. Az aktin molekula szerkezetileg két doménre osztható, melyeket további két-két alegység alkot. A kis domén az 1-es és 2-es alegységből, a nagy a domén 3-as és 4-es alegységből áll *(1. ábra)* [13].



1. ábra: Az aktin monomer szerkezete (PDB: 1ATN)

A molekula szerkezetében megfigyelhető két árok. Az 1-es és 3-as alegység közötti árok az aktin monomer szöges végén (+ vagy „*barbed-end”*) helyezkedik el és elsődleges kötőhelye az aktin monomer-kötő fehérjéknek. A fehérje hegyes (- vagy „*pointed end”*) végén, a 2-es és 4-es alegység között található egy hidrofób árok, mely kötőhelye az adenin-nuleotidoknak (ATP vagy ADP) és divalens kationoknak [14]. Az ATP jelenléte nélkülözhetetlen az aktin monomer stabilitásához, nukleotid-mentes környezetben a fehérje gyorsan denaturálódik. Az aktin molekula számos konformáció változáson mehet keresztül attól függően, hogy milyen nukleotidot és/vagy kation köt. Az aktin-kötő fehérjék kötődése módosítani képes a molekula szerkezetét. Az aktin monomerek megfelelő körülmények között képesek egymáshoz kötni és polimerizáció révén létrehozzák az aktin filamentumot. Filamentum képződéshez a legkedvezőbb a Mg-ATP - G-aktin állapot [15]. Az aktin polimerizáció egy több lépésből álló szabályozott folyamat, ahol a következő szakaszokat különböztetjük meg: 1) nukleáció, 2) elongáció és 3) dinamikus egyensúly („treadmilling” vagy „taposómalom”) *(2. ábra)*.

1) Nukleáció során két aktin monomer összekapcsolódásából jönnek létre az aktin dimerek, majd egy újabb monomer hozzákapcsolódásával alakulnak ki a trimerek, másnéven nukleációs magok vagy nukleuszok. Az így létrejött nukleuszok nagyon instabilak, könnyen monomerekké eshetnek szét, kialakulásuk pedig egy viszonylag lassú folyamatnak tekinthető [16]. A nukleuszok kialakulásának sebessége meghatározza az aktin polimerizációs sebességét.
2) A polimerizáció következő szakasza az elongáció, melynek során a nukleuszokból felépül az aktin filamentum.
3) Az utolsó fázisban beáll egy dinamikus egyensúly, az úgynevezett „taposómalom" („*treadmilling"*). Ebben az egyensúlyi állapotban monomerek épülnek be a filamentumba (asszociáció) és válnak le a filamentumról (disszociáció) eltérő kinetikával, miközben a filamentumok hossza nem változik.

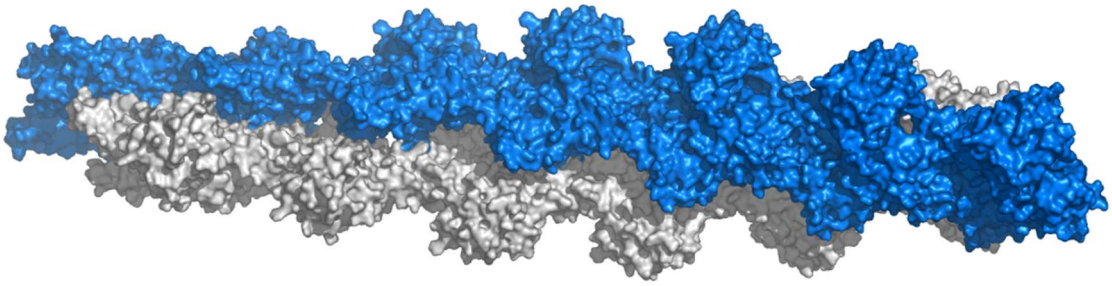


2. ábra: Az aktin polimerizáció lépései [6,17,18]

Az aktin polimerizációja során kialakult F-aktinra jellemző, hogy szerkezeti és kinetikai polaritással rendelkezik, ami az aktin monomerek rendezett orientációjának a következménye. Szerkezetét tekintve két protofilamentum összekapcsolódásából álló jobbmenetes α-hélixnek tekinthető. Megkülönböztethetünk egy gyorsan növő plusz (szöges vég) véget és egy lassan növő mínusz (hegyes vég) véget [19]. A szöges vég alegységei elsősorban ATP-t, míg a hegyes vég alegységei inkább ADP-t kötnek. A monomerek asszociációja és disszociációja a

filamentum mindkét végén végbemenő folyamat. Mindkét vég esetén meghatározható egy disszociációs egyensúlyi állandó – másnéven kritikus koncentráció ($c_{kritikus}$) –, ami az asszociációs (k_+) és disszociációs (k_-) állandók hányadosából számolható ki (k_-/k_+). A kritikus koncentráció az a G-aktin koncentráció, amely felett spontán lejátszódik a polimerizáció folyamata. Értéke Mg^{2+}- ATP - G-aktin esetén a szöges végen ~100 nM, míg a hegyes végen ~ 700 nM [20].

Az aktin filamentum egy körülbelül 7 nm átmérőjű homo-oligomer. A filamentum az aktin monomerek alkotta két lineáris láncból áll, melyek egymással kettős hélixet alkotnak *(3. ábra)* [14,21]. Az első nagy felbontású aktin filamentumról készült szerkezeti modell Kenneth Holmes nevéhez fűződik *(3. ábra)* [12]. Az egyik legismertebb aktin filamentum modell az Oda és kutatócsoportja által 2009-ben leírt modell, mely 3,3 Å sugárirányú és 5,6 Å ekvatoriális felbontásban mutatja az aktin filamentum szerkezetét [22]. A polimerizáció során létrejött aktin filamentum az aktin protomerekből álló polarizált hélix, mely egy duplaszálú 37 nm-es menetemelkedésű jobbmenetes hélixként, valamint egy egyszálú alacsony menetemelkedésű (2,75 nm) balmenetes hélixként (genetikus hélix) definiálható [22]. A legújabb 5,5 Å felbontású aktin filamentumot leíró modellt Krio elektronmikroszkópos technika segítségével hozták létre 2017-ben [23].



3. *ábra: Az aktin filamentum Kenneth Holmes által leírt modellje, mely 13 ismétlődő alegységet (G-aktin) tartalmaz [24].*

Az aktinnak számos izoformája létezik [25]. Rendszertani besorolástól függően eltérő számú aktin gén ismert, melyek az aktin izoformákat kódolják. Élesztők esetén egy gént, míg *Drosophila melanogasterben* és emlősökben 6 aktin gént különböztethetünk meg. A humán genom két citoplazmatikus és négy funkcionális izom aktin gén tartalmaz, melyekről 6 izoforma fejeződik ki [26]. Így megkülönböztethetünk alfa (α)-szkeletális, szívizom, simaizom és γ2-simaizom specifikus izoformákat. Beszélhetünk továbbá β és γ1 citoszkeletális aktin izoformákról is. Szekvenciájukat tekintve elmondható, hogy az aktin izoformák csak néhány

aminosavban térnek el egymástól. Ennek megfelelően a főbb szerkezeti és biokémiai tulajdonságaik hasonlóak, de kisebb eltérések megfigyelhetők közöttük.

Az aktinnak számos homológja ismert prokariótákban. Ilyen például az MreB („murein cluster E B”) [27,28] és a ParM („Partitioning M”). Ezek szerkezetüket és funkciójukat tekintve is nagyon hasonlítanak az eukarióta aktinhoz, amiből feltételezhető, hogy egy közös őstől származnak [29].

2.2. Aktin-kötő fehérjék

Az aktin monomerek filamentumba épülése, a polimerizáció/depolimerizáció folyamata sejttípustól függetlenül aktin-kötő fehérjék szabályozása alatt áll. A partner fehérjék az aktin monomerhez és/vagy a filamentumhoz kapcsolódva képesek módosítani annak szerkezetét, ezáltal megváltoztatni biológiai funkcióit. Nagyszámú aktin-kötő fehérje ismert, melyeket általában az aktinra kifejtett hatásuk alapján osztályoznak *(4. ábra)*. Ez alapján az alábbi aktin-kötő fehérje családokat különböztethetjük meg [30,31]:

1) *„Szekvesztráló”* fehérjék
2) Nukleációs faktorok
3) Filamentum depolimerizációját elősegítő fehérjék
4) Sapkázó *(„capping”)* fehérjék
5) Aktin filamentum stabilizáló fehérjék
6) Keresztkötő fehérjék
7) Motor fehérjék.

Nem-izom sejtekben a monomerek koncentrációja körülbelül 100 µM, ami megközelítőleg 50%-a az összaktin koncentrációnak. Ahhoz, hogy a sejtek fenn tudják tartani ezt a nagy mennyiségű nem polimerizált aktin raktárt, aktin monomer-kötő fehérjékre van szükség, melyek G-aktinhoz való kötésükkel megakadályozzák a monomerek filamentumba való beépülését, úgynevezett *„szekvesztráló”* funkciót látnak el. Ilyen fehérje például a timozin-β4, a profilin vagy az általunk vizsgált twinfilin is [32,33,34].

Az aktin-kötő fehérjék egy másik csoportja, a nukleációs faktorok. Ezek a fehérjék háromféle módon képesek elősegíteni az aktin nukleációját. Az egyik legismertebb nukleációs faktor az Arp 2/3, mely az aktin nukleusz mimikálásával, nukleációt elősegítő fehérjékkel kölcsönhatva segíti elő a nukleációt és rövid elágazódásokat tartalmazó aktin filamentumokat hoz létre [35]. A WH2 domént tartalmazó fehérjék több aktin monomert képesek megkötni, így segítve a polimerizáció folyamatát. A létrejött filamentumok elágazódásoktól mentesek [36]. Ebbe a csoportba tartoznak a formin fehérjecsalád tagjai is. Közös jellemzőjük, hogy képesek gyorsítani az aktin filamentum nukleációját [37,38], és módosíthatják az elongáció sebességét is. A forminok FH2 (formin homológia 2) alegysége játszik döntő szerepet az aktin filamentummal alkotott kölcsönhatás kialakításában [39].

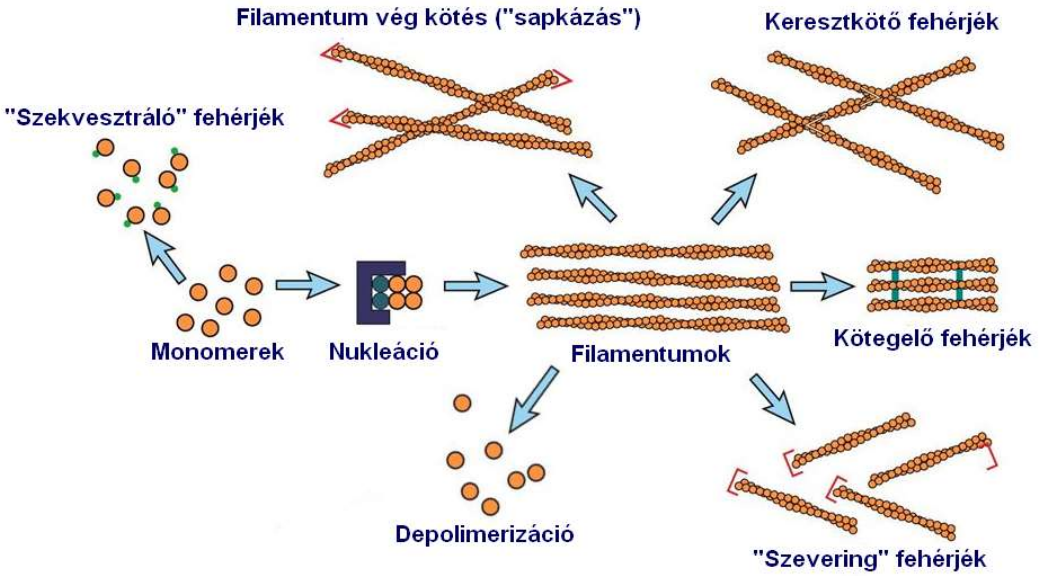
Az aktin filamentum depolimerizációját elősegítő fehérjékre jellemző, hogy hozzájárulnak az F-aktin G-aktinná való átalakulásához. Ide tartoznak a fragmentáló fehérjék is, melyek az aktin

filamentumhoz kötődve képesek azt feldarabolni, ezt *„severing”* funkciónak hívjuk. Ilyen tulajdonsággal rendelkezik például a kofilin és a gelsolin [30].

Az aktin-kötő fehérjék következő típusa a sapkázó fehérjék, melyek az F-aktinhoz kötve megakadályozzák például a filamentum szétszerelődését vagy más fehérjékkel való komplex formálódását. Ilyen fehérje például a gelsolin vagy a twinfilint is kötő heterodimer *„capping”* protein (CP) [40], melynek részletes tárgyalása a dolgozat következő fejezetében történik.

A kialakult aktin filamentum stabilizálását tropomiozinok valamint keresztkötő fehérjék, mint például az α-aktinin végzik [41,42]. A keresztkötések következményeként alakulhatnak ki az aktin hálózatok és kötegek. Ezeknek olyan magasabb szintű szerkezettel rendelkező struktúrák kialakulásában van szerepe, mint például a mikrovillusok vagy filopódiumok [43].

A miozin fehérjecsaládba nagyszámú fehérje tartozik, melyek filogenetikailag XXXIV különálló csoportba oszthatók [44], de ezek közül csak a miozin II izomspecifikus [45]. A miozinok aktin alapú motorfehérjék, melyek az aktin filamentum mentén a plusz vég irányába mozognak és mechanikai erőt képesek kifejteni az ATP hidrolízis kémiai energiáját felhasználva [46]. Nélkülözhetetlenek olyan folyamatokban, mint például a sejtmozgás, sejtosztódás, vezikuláris transzport vagy izomösszehúzódás folyamata [47].



4. ábra: Az aktin-kötő fehérjék szerepe a polimerizáció és depolimerizáció folyamatában [48].

Érdemes megjegyezni, hogy létezik az aktin-kötő fehérjéknek másfajta felosztása is, ahol nem a funkció, hanem szerkezeti alegység szerint csoportosíthatjuk az aktin-kötő fehérjéket. Vannak olyan fehérjék is, melyek nem egyértelműen sorolhatók be egy adott családba, mivel több funkcióval is rendelkeznek. Ilyen például a gelsolin, ami a „*severing*” hatása mellett képes az aktin filamentum szöges végét is sapkázni [30].

2.3. Twinfilin

A twinfilinek az aktin-kötő fehérjék ADF/kofilin fehérjecsaládhoz tartoznak [49]. A családba tartozó fehérjékre általánosságban jellemző, hogy rendelkeznek legalább egy aktin depolimerizáló faktor homológia *(„actin-depolymerizing-factor homology – ADF- H”)* alegységgel. Az ADF-H alegység egy 13-19 kDa nagyságú globuláris modul, mely egyaránt képes az aktin monomerhez és a filamentumhoz is kötni. Elsődleges szerkezetvizsgálatok alapján a család további öt fehérje-osztályra bontható, így beszélhetünk az ADF/kofilin; twinfilin (TWF); Abp1/drebrin; koaktozin és glia-érési faktor (GMF) osztályról [50]. A fehérjék sematikus szerkezetét és kötőpartnereik listáját az alábbi táblázat mutatja be *(1. táblázat)*.

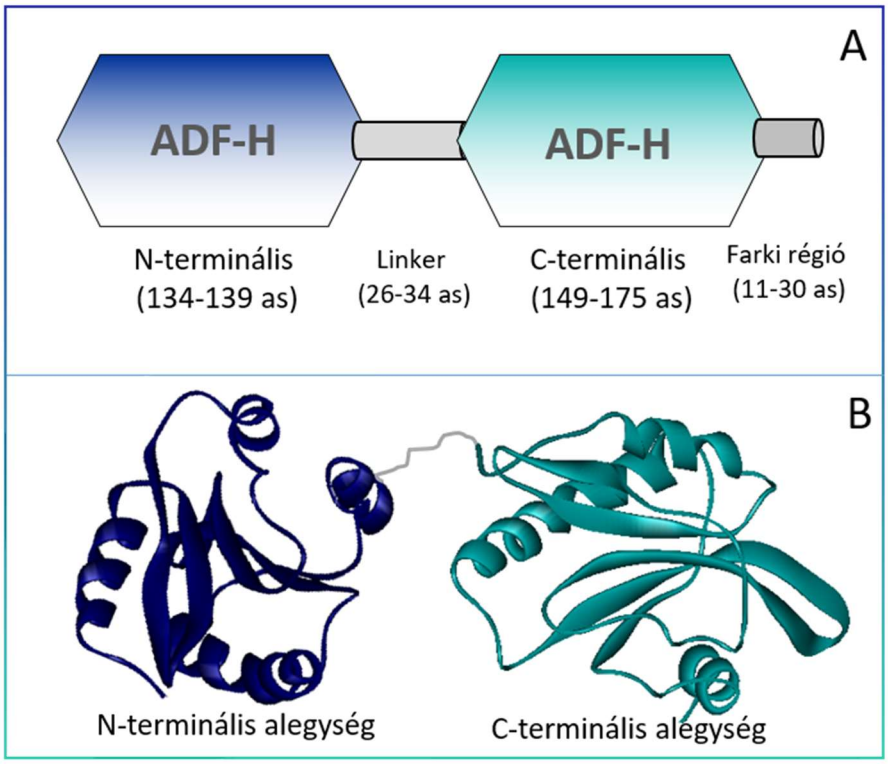
	Szerkezet	ADF-H alegység kötőpartnere
ADF/kofilin	ADF-H	G-aktin, F-aktin
Twinfilin	ADF-H ADF-H	G-aktin
GMF	ADF-H	Arp2/3 komplex
Koaktozin	ADF-H	F-aktin
Abp1 - élesztő	ADF-H CA pp SH3	F-aktin
- emlős	ADF-H CH pp SH3	F-aktin
Drebrin	ADF-H CH pp H H	F-aktin ?

1. *táblázat: Az ADF/kofilin családhoz tartozó fehérjék összehasonlítása szerkezet és aktinhoz való kötés alapján (ADF-H – aktin depolimerizáló faktor homológia alegység, CA – központi savas régió, pp – prolin gazdag régió, CH – töltött hélix, SH3 – Src homológ alegység, H – Homer-kötési mintázat) [50].*

Az ADF-H alegységek csak körülbelül 20%-os szekvencia azonosságot mutatnak aminosav szinten, ennek ellenére a doménre egy általános feltekeredési mintázat *(„folding”)* jellemző [50][51]. A hasonló harmadlagos és negyedleges szerkezet ellenére az ADF/kofilin család tagjai jelentősen eltérő biokémiai és sejtbiológia tulajdonságokkal rendelkeznek.

A twinfilint először 1994-ben írták le A6 protein tirozin kináz néven [52,53]. További vizsgálatok során azonban kiderült, hogy a twinfilin nem tartalmazza a protein kinázokra jellemző szekvencia mintázatot és nincs kimutatható kináz aktivitása. Ezt követően Goode és kutatócsoportja 1998-ban *Saccharomyces cerevisiae* genomjából azonosított egy addig ismeretlen fehérjét, mely két kofilin-szerű szekvenciát tartalmaz és elnevezték twinfilinnek, ami annyit tesz „kofilin-szerű ismétlődés" (*„cofilin-like repeats"*) [54]. A sarjadzó élesztőn kívül leírták, hogy a twinfilineknek létezik *Caenorhabditis elegans,* egér és humán izoformája is [54], mely alapján elmondható, hogy egy evolúciósan konzervált fehérjecsaládról van szó.

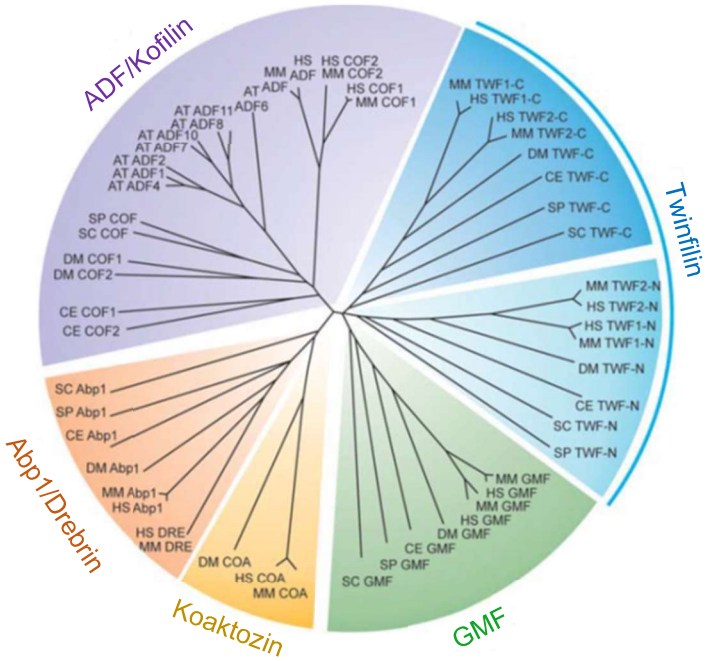
A twinfilinek körülbelül 37 kDa molekulatömegű fehérjék, melyek a növényeket kivéve az összes eukariótában megtalálhatók. Két ADF-H alegységből, az ezeket összekötő rövid kapocs régióból és egy flexibilis C-terminális farki régióból épülnek fel *(5. ábra)*.



5. *ábra: A) A twinfilin sematikus felépítése és B) lehetséges szerkezeti modellje az ismert N és C terminális alegységek alapján (PDB:1M4J és 2HD7)[34] .*

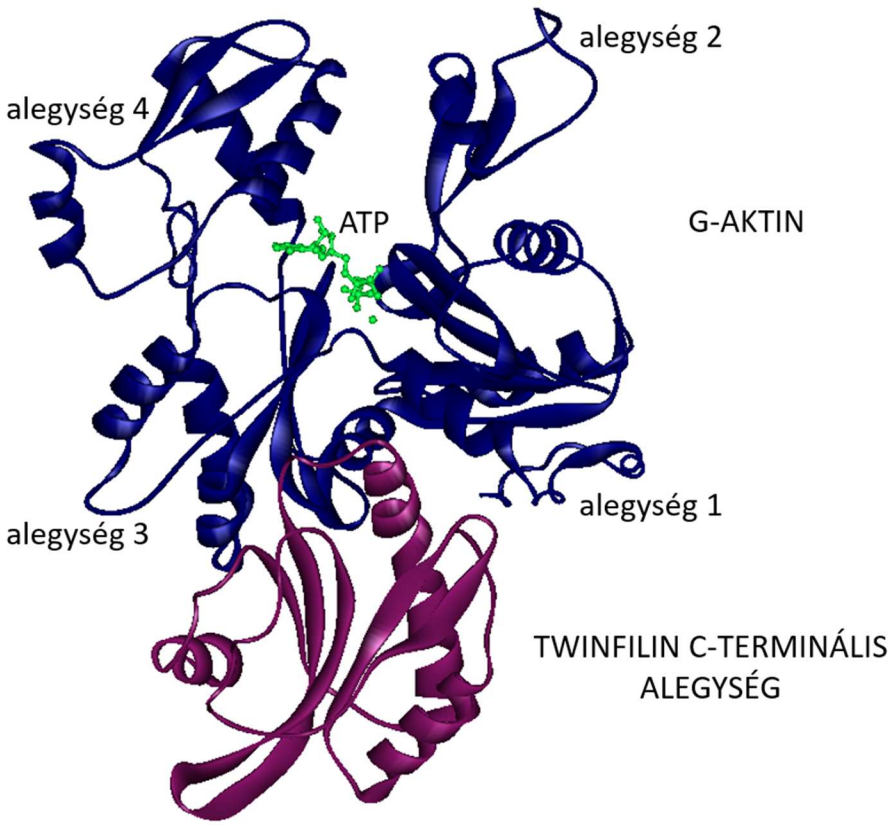
A két alegység körülbelül 25%-os szekvencia azonosságot mutat és ~20% -ban hasonló szekvenciával rendelkezik összehasonlítva más ADF-H mintázattal rendelkező fehérjék alegységeivel [49,54]. A filogenetikai analízisek azt mutatják, hogy az eltérő fajokból származó egyedi ADF-H alegységek közelebbi rokonságban állnak egymással, mint egy adott fehérjéhez tartozó két alegység *(6. ábra)*. Ebből arra következtethetünk, hogy a twinfilinekben kialakult

ADF-H alegység duplikátum még azelőtt kialakult, mielőtt a fajok elkülönülése megtörtént volna. [50].



6. *ábra: Az ADF-H alegységgel rendelkező fehérjék filogenetikai analízise. Szomszédösszevonó vagy „Neighbor-Joining" (NJ) klaszterező módszerrel és CLUSTAL-W modell segítségével készített filogenetikai fa, mely humán (HS), egér (MM), Drosophila melanogaster (DE), Cenorhabditis elegans (CE), Saccharomyces cerevisiae (SC), Schizosaccharomyces pombe (SP) és Arabidopsis thaliana (AT) fajok ADF-H alegységeit kódoló aminosav szekvenciák alapján készült [50].*

A twinfilin C-terminális domén-aktin monomer komplex kristályszerkezetét Paavilainen és munkatársai írták le 2008-ben *(7. ábra)* [55]. A szerkezet ismeretében megállapítható volt, hogy az ADF-H alegységek egy strukturálisan konzerválódott aktin-kötő mintázatot hoznak létre. Kimutatták, hogy kémiailag a kofilin és twinfilin N-terminális alegysége nagyon hasonló, és a legnagyobb különbségek a kofilin aktin filamentum-kötő régiójánál figyelhető meg. Ezek a differenciák szerkezetileg is bizonyítják a két fehérjecsalád eltérő kötődését az aktin filamentumhoz [55].



7. ábra: A twinfilin C-terminálisának aktin monomerrel alkotott komplexe 2,55 Å felbontásban (PDB:3DAW).

A twinfilinekre jellemző, hogy képesek G - aktint kötni és annak ellenére, hogy két potenciális aktin-kötő hellyel rendelkeznek, stabil 1:1 arányú komplexet képeznek az aktin monomerrel [54,56,57]. A twinfilin gátolja a nukleotid kicserélődést a monomer aktinon és megakadályozza azok beépülését az aktin filamentum szöges végéhez [54,58]. A kofilinekhez hasonlóan a twinfilinek is nagyobb affinitással kötődnek az ADP - G - aktinhoz (K_D=0,05 µM), mint az ATP - G - aktinhoz (K_D=0,47 µM) fiziológiás ion-koncentráció mellett [59]. Az emlős twinfilin két ADF-H alegysége egymástól függetlenül képes kötni és verseng az aktin monomer kötésért. A C-terminális alegység hasonló affinitással köt a G-aktinhoz, mint a teljes hosszúságú fehérje és körülbelül 10-szer nagyobb affinitással, mint az N-terminális domén [59]. A fentiek alapján feltételezhető, hogy a twinfilin először az N-terminálisán keresztül köt a G -aktinhoz, majd egy konformációváltozást követően a nagyobb affinitással kötődő C-terminális veszi át az aktin monomert [59].

Tanulmányok igazolják, hogy a twinfilin képes az aktin filamentumhoz is kapcsolódni. Az élesztő twinfilin képes az aktin filamentumhoz kötni és feldarabolni azt, ezáltal gyorsítja a filamentum szétszerelődését *in vitro* [60]. Az egér twinfilin képes sapkázni a filamentum szöges

végét és ezt nagyobb affinitással teszi abban az esetben, ha a végen lévő aktin ADP-t köt [58]. A twinfilin sapkázó funkciójához mindkét ADF-H alegység jelenléte szükséges, ami magyarázatul szolgálhat, hogy miért két nagyon hasonló alegységből épül fel a twinfilin [58].
A twinfilinnek az aktinon kívül ismert egy másik kötő partnere, a heterodimer „*capping protein"* (CP vagy sapkázó fehérje), melyhez a C-terminális végével köt. A CP egy szabályozó fehérje, mely képes a filamentum szöges végéhez is kötni. A két fehérje interakciója nem befolyásolja az aktin kötést és a „sapkázó" funkciót, ugyanakkor nélkülözhetetlen élesztők esetén a twinfilin megfelelő sejten belüli lokalizációjához és funkciójához *in vivo* [56,61]. Nemrégiben leírták, hogy a twinfilin C-terminálisán lévő farki régiója tartalmaz sapkázó fehérje gátló (CPI-szerű) szekvenciát, melyen keresztül kötődik a fehérjéhez. Bizonyos fehérjék, mint például a V-1 és a CARMIL, képesek megakadályozni a fehérje filamentum végzáró funkcióját, annak direkt gátlása vagy a filamentum szöges végéről való leválasztása révén. A twinflin a CP fehérjéhez való kapcsolódásával képes lesz megvédeni azt a fent említett fehérjék gátló hatásától [62].
A twinfilin aktivitása komplex módon szabályozott folyamat, habár a szabályozás mechanizmusának részletei még nem ismertek. Élesztő és egér twinfilin esetében ismeretes, hogy kötődnek a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfáthoz (PI(4,5)P_2) és a kötődés létrejötte korlátozza a fehérje szekvesztráló aktivitását, továbbá élesztőnél a PI(4,5)P_2 kötődése gátolja a filamentum-daraboló funkciót is [56,61]. A legújabb eredmények szerint a twinfilin nemcsak a PI(4,5)P_2-höz, hanem más foszfo-inozitolokhoz is képes kötni, és ezek nagy affinitású kötőhelye a fehérje C-teminális végén helyezkedik el. Elektrosztatikus kölcsönhatás révén a twinfilin a sejtmembránhoz kapcsolódik a következő sorrendet részesítve előnyben: PI(3,5)P_2, PI(4,5)P_2, and PI(3,4,5)P_3 [63]. A kialakult twinfilin-foszfoinozitol kapcsolat akadályozza a twinfilin aktinhoz való kötődését. Az is ismeretes, hogy a foszfoinozitolok és a CP fehérje kötőhelyei átfedésben vannak, így feltétezehető, hogy a foszfoinozitolokkal létrejött kölcsönhatás gátolja a heterodimer „capping protein" kötését [63]. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a twinfilin C-terminális farki régiója egy konzerválódott multifunkcionális kötőhelyet tartalmaz, mely elengedhetetlen a sapkázó fehérje kötéséhez és a twinfilin foszfoinozitolokban gazdag membránokhoz való kapcsolódásához [63].
A twinfilinnek számos izoformája létezik. Alacsonyabb rendű eukariótákban egy ismert, míg emlősökben három izoformáját különböztethetjük meg, így beszélhetünk twinfilin-1, twinfilin-2a és twinfilin-2b izoformáról. A twinfilin-2a és 2b ugyanarról a *twf2* génről íródik át és csak az N-terminálisukban mutatnak kis mértékű eltérést [64]. Annak ellenére, hogy a különböző izoformák nagyon hasonló biológiai és biokémiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mégis eltérő

expressziós mintázatot mutatnak. A twinfilin-1 és twinfilin-2a főleg embriókban, felnőttek esetén pedig a nem-izom sejtekben expresszálódnak, míg a twinfilin-2b főleg a felnőtt szív- és vázizomban figyelhető meg [64]. A legújabb tudományos kísérletek alapján elmondható, hogy az emlősökben megtalálható három izoforma mindegyike képes gyorsítani a szöges vég depolimerizációját [65]. Ez a felfedezés arra enged következtetni, hogy ez egy közös őstől származó, az evolúció során kizárólagosan megtartott funkciója a fehérjének. Egér izoformákkal végzett kísérletek során kimutatható volt továbbá, hogy mindhárom izoforma Srv2/CAP fehérjével kölcsönhatva indukálja a gyors mínusz vég depolimerizációt ellentétben az élesztő twinfilinnel, melynél ez a funkció hiányzik. Mindemellett kimutatták, hogy alacsony twinfilin koncentráció esetén a twinfilin önállóan nem képes a gyors depolimerizációt elősegíteni, csak ha az Srv2/CAP N-terminális vége is jelen van [65].

A nagyszámú tanulmány ellenére a twinfilin pontos biológiai funkciója még felderítésre vár, napjainkban is számos kutatás folyik ezen a területen. Például az élesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) twinfilin génjében bekövetkező defektus ellenére a sejtek életképesek voltak, ugyanakkor szubkortikálisan megnövekedett aktin-aggregátumok jöttek létre. A twinfilin gén deléció bizonyos kofilin és profilin mutációkkal együtt letális [54,61,66]. Élesztőkben a fehérje túltermeltetése az aktin citoszkeleton depolimerizációjához vezetett és a citoplazmában kötegek létrejöttét indukálta [54]. A közönséges muslica (*Drosophila melanogaster*) twinfilin génjének erős hipomorf mutációjának következtében bizonyos aktin által vezérelt folyamatok károsodtak; abnormális sörtenövekedés és szem-morfológia volt megfigyelhető, valamint károsodott az axonális növekedés az agyban [67]. A twinfilin-1 túlzott expressziója nem-izom egér sejtkultúrában kevesebb stressz szál és abnormális, féregszerű aktin filamentumok kialakulását eredményezte [57].

Számos betegség kialakulásánál vizsgálták és leírták a twinfilin esetleges szerepét. A TWF-1 szabályozza az intracelluláris aktin dinamikáját, ezáltal befolyásolja a sejtmozgást és a migrációt. Szerepet játszik emellett az embrionális fejlődésben, így a fehérje defektusa daganatképződéshez és sejtkárosodáshoz is vezethet [68]. A twinfilin - 1 sejtmorfológia szabályozásában betöltött szerepét igazolja például, hogy szívizom hipertrófia esetén emelkedett twinfilin szint volt kimutatható [69]. Számos kutatócsoport vizsgálja, hogy a citoszkeletális hálózat szabályozásában résztvevő fehérjék géndefektusai miként hatnak a tumorok progressziójára és a kapott eredményeket hogyan lehet hasznosítani a daganatos megbetegedések kezelésében. Leírták, hogy a twinfilinnek szerepe lehet bizonyos kemoterápiás szerek hatékonyságának elősegítésében. A kísérletekben egérmodelleket használtak, amelyekben tumorok kialakulását indukálták bizonyos génszakaszok elnémításával egy

speciális shRNS („small hairpin”/rövid hajtű RNS) könyvtár segítségével [70]. Megállapították, hogy a limfóma sejtek egyensúlyának fenntartásában az aktin dinamikáját és a sejtmozgását szabályozó fehérjéknek kulcsfontosságú szerepe van. A vizsgálatok kiderítették, hogy ezek a fehérjék „*bona fide”* célterületei a limfóma gyógyszeres kezelésének. Kimutatták, hogy az alkalmazott két célfehérje (Rac2-t, twinfilin-1) szupressziója erősítheti a kemoterápiás szerként alkalmazott vincristine hatását [71].

A twinfilin-2 izoformát nemrégiben egy új sztereociliáris fehérjeként azonosították és a belső fül szőrsejtjeinek a működésében játszott szerepét vizsgálták [72]. A sztereocílium nyúlványok aktinban gazdag kötegekből állnak és az aktin dinamikának fontos szerepe van a fenntartásukban. Emellett feltételezik, hogy a nyúlványok hosszának szabályozásával kapcsolatban két miozin, a miozin VIIa és a miozin XVa is szerepet játszhatnak. A miozin XVa a sztereocíliumok csúcsán expresszálódik a nyúlvány hosszával arányosan, hiányában lépcsőzetes kötegeket tartalmazó nagyon rövid nyúlványok alakulnak ki. A miozin VIIa viszont a rövid sztereocíliumokban mutatható ki, hiánya miatt pedig abnormális hosszúságú sztereocíliumok jönnek létre. Leírták, hogy a miozin VIIa és a twinfilin-2 kölcsönhatásban állnak egymással. A twinfilin-2 a szőrsejtek aktin filamentumainak a „szöges”-végén gátolja a polimerizációt, lokalizációja pedig átfedést mutat a miozin VIIa elhelyezkedésével. A miozin VIIa fibroblasztban történő exogén expressziója során azt tapasztalták, hogy csökkent a filopódiumok száma, és ezek csúcsai körül akkumulálódott a twinfilin-2. Eredményeikből arra a következtetésre jutottak, hogy a twinfilin-2 és a miozin VIIa közötti kölcsönhatás alacsony arányú aktin „turnover” kialakulását okozza a rövid sztereocíliumokban és így felelős ezek lépcsőzetes kötegeinek hosszváltozásaiért [72].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám során célul tűztem ki, hogy vizsgáljam az aktin monomer szerkezetében és dinamikájában twinfilin jelenlétében bekövetkező változásokat és meghatározzam a twinfilin aktin filamentum depolimerizációjára kifejtett hatásait.

A következő kérdésekre kerestem a választ:

1) Képes-e kötődni az általunk expresszált Hisztidin-taggel rendelkező egér twinfilin-1 az aktin monomerhez, és ha igen, milyen affinitással teszi ezt?
2) Van-e hatása a twinfilin-1-nek az aktin nukleotid kicserélődésére?
3) Hogyan változik meg a nukleotid-kötő zseb konformációja twinfilin-1 jelenlétében?
4) Hogy változtatja meg a twinfilin-1 az aktin monomer kis alegységének szerkezeti és konformációs dinamikáját?
5) Van-e összefüggés a konformáció-változás és az aktin monomer termodinamikai stabilitása között?
6) Az általunk használt twinfilin-1-es izoforma képes-e kötni az aktin filamentumhoz és ha igen, milyen erős a kötődés?
7) A twinfilin-1 befolyásolja-e az aktin filamentum depolimerizációját? Mutat-e a folyamat pH-függést, és ha igen, hogy változik a depolimerizáció sebességi állandója twinfilin jelenlétében eltérő pH értékeken?
8) Rendelkezik-e az egér twinfilin-1 izoforma aktin filamentum daraboló funkcióval? Milyen körülmények között valósulhat meg ez a hatás?
9) Van-e hatása a twinfilin-1-nek az F-aktin termodinamikai stabilitására?

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A kísérletekhez használt fehérjék előállítása és fluoreszcens jelölése

4.1.1. Aktin preparálása

Jelen tudományos munkában az egér twinfilin-1 hatásait vizsgáltuk az aktin monomer és filamentum tulajdonságaira. Az általunk használt twinfilin izoforma a citoszkeleton mikrofilamentális rendszeréhez kapcsolódik, ugyanakkor vázizomból preparált aktin izoformát (α-aktin) használtunk a kísérletes munkáinknál a jól bejáratott, eredményes fehérjepreparálás miatt. Kísérleteinkhez használt aktin preparáláshoz először aceton-extrahált izomforgácsot készítettünk nyúl vázizomból (*Oryctolagus cuniculus)* [8]. Ezt követően a kalcium kötött G - aktin (Ca^{2+}-ATP-G-aktin) izolálása és tisztítása Spudich és Watt módszere alapján Mossakowska által módosított módon történt [73,74]. A tisztított G-aktint A pufferben (4mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM $CaCl_2$, 0,2 mM ATP, 0,5 mM MEA és 0,005% NaN_3) tároltuk. Az aktin koncentrációjának meghatározása Jasco V-660 spektrofotométerrel 280 nm-en történt, ehhez a hullámhosszhoz rendelhető extinkciós együttható (1,11 mg^{-1} ml cm^{-1}) és a relatív molekulatömege (42,3kDa) felhasználásával [75].

4.1.2. Egér twinfilin-1 expressziója és tisztítása

A fehérje szekvenciáját kódoló génszakasz pHAT2 ampicillin rezisztens expressziós vektorban állt rendelkezésünkre. A pHAT2-TWF1 plazmidot *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS sejtekbe transzformáltuk, majd 100 µg/ml ampicillint hozzáadva növesztettük a transzformált baktériumkultúrát LB tápoldatban 0,6-as OD érték eléréséig. A sejtek indukciója 0,2 mM IPTG hozzáadását követően 3 órán át 37 °C- on történt. A fehérjét tartalmazó sejteket a tápoldattól centrifugálással (Hermle Z36HK, 5630 g, 10 perc, 4 °C) választottuk el. A kinyert sejteket 20 mM-os Tris pufferrel (pH 7,5) átmostuk, majd 20 mM imidazol, 50 mM NaCl, 10 mM Tris jelenlétében, a sejttömeggel arányos proteáz inhibitor koktél (Sigma–Aldrich) és 0,01 mg/ml DNáz-I enzim hozzáadásával homogenizáltuk és szonikáltuk, hogy a fehérjét kinyerjük a sejtekből. A fehérjét tartalmazó komponenst centrifugálással (Sorvall ultracentrifuga, 4 °C, 30000xg, 1 óra) különítettük el a sejttörmeléktől, majd a His-taggel rendelkező twinfilin-1 fehérjét affinitás kromatográfiával 20 mM – 1 M imidazol grádienst alkalmazva választottuk el a sejtszuszpenzióból. A nem kívánatos fehérjék eltávolítására ioncserélő kromatográfiát

(Q- Sepharose), majd gélfiltrációs elválasztást (GE Healthcare, Superdex 75) alkalmaztunk. A twinfilint tartalmazó eluátumot Vivaspin 10-kDa *„cut off”* (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Németország) csőben koncentráltuk 100-300 µM koncentráció eléréséig, majd folyékony nitrogénben fagyasztottuk és felhasználásig - 80 °C-on tároltuk. A tároló puffer ATP mentes A puffer (4 mM Tris, 0,1 mM $CaCl_2$, 0,5 mM MEA, 0,005% NaN_3) volt, amire azért volt szükség, hogy ne kelljen a fehérje pufferösszetevőinek, például sóknak az aktinra kifejtett hatásaival számolni. Az egyes tisztítási lépések között a rekombináns fehérje tisztaságát SDS poliakrilamid gélektroforézissel ellenőriztük. A fehérje koncentrációjának meghatározásához az extinkciós együtthatót a ProtParam program segítségével határoztuk meg, ami 39100 M^{-1} cm^{-1} -nek adódott [76].

4.1.3. Az aktin fluoreszcens jelölése

A fluoreszcencia spektroszkópiai és mikroszkópiai kísérleteink kivitelezéséhez az aktin különböző fluorofórokkal való jelölésére volt szükség.

1, N^6-etenoadenozin-5'-trifoszfát (ε-ATP) jelölés:
Az aktin monomer fluoreszcens ATP analóggal történő jelölését Perelroizen és munkatársai által leírt módon valósítottuk meg [77]. A G-aktin koncentrációját 50 µM-ra állítottuk be 1,2 ml végtérfogatban. Az oldatban lévő szabad ATP molekulákat ioncserélő gyanta (180 µl, 50% DOWEX 1x2-400, Sigma-Aldrich) hozzáadásával távolítottuk el. A G-aktin és az ioncserélő gyanta elegyét centrifugáltuk (Eppendorf 5415R, 16100 g, 4 °C, 3 perc), ezzel eltávolítva a gyantát. A felülúszóhoz ismét 180 µl DOWEX-et adtunk, hogy a maradék szabad ATP-t eltávolítsuk. Rövid inkubációt (5 perc) követően a centrifugálást megismételtük, hogy teljesen elkülönítsük a G-aktin oldatot az ioncserélő gyantától. A Ca-G-aktin mintát (50 µM) ötszörös moláris töménységű ε-ATP-vel (a végső koncentráció 250 µM) összekevertük és éjszakán át jégen inkubáltuk. Másnap az ε-ATP-vel jelölt G-aktin-t 3 percig inkubáltuk az ioncserélő gyantával, majd centrifugálás következett (Eppendorf 5415R, 16100 g, 4 °C, 3 perc), hogy leredukáljuk az aktinhoz nem kötött ATP analóg mennyiségét. A jelölt aktin koncentrációját spektrofotometriás mérésekkel határoztuk meg, és ehhez 1,11 mg^{-1} ml cm^{-1} extinkciós koefficiens értéket használtunk 280 nanométeren, melyet a fluorofór 320 nm-en mért abszorbanciája segítségével korrigáltunk.

N-jód-acetaminoetil-1-naftilamin-5-szulfonsav (IAEDANS) jelölés:

Az aktin monomer cisztein 374 aminosav jelölését Miki és kutatócsoportja által leírt módon végeztük [78]. 23 µM G-aktint polimerizáltunk 2 órán át szobahőmérsékleten MEA mentes A pufferben. Az F-aktinhoz 15-szörös moláris feleslegben adtuk a fluorofórt és 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A jelölést 2 mM β-merkaptoetanol hozzáadásával állítottuk le. Ultracentrifugálást (Beckman Coulter Optima Max Ultracentrifuga, 32800 g, 40 perc, 4 °C) követően a jelölt aktint tartalmazó pelletet homogenizáltuk, majd éjszakán át dializáltuk A pufferben. Az IAEDANS jelölt aktin koncentrációját spektrofotometriás mérésekkel határoztuk meg, és ehhez 0,63 mg $ml^{-1}cm^{-1}$ extinkciós koefficiens értéket használtunk 290 nanométeren, melyet a fluorofór 290 nm-en mért abszorbanciája segítségével korrigáltunk. Az IAEDANS koncentrációját 336 nm-en határoztuk meg 6100 $M^{-1}cm^{-1}$ extinkciós koefficienst használva. A jelölési arány 80-100% volt.

Fluoreszcein-5-izotiocianát (FITC) jelölés:

Az aktin 61-es lizin aminosavának fluoreszcein-5-izotiocianáttal (FITC) történő jelölése a Burtnick által módosított Miki és kutatócsoportja szerint leírt módon történt [79]. Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer kísérleteinkhez duplán jelölt aktinra volt szükség, így az előzőleg IAEDANS-szel jelölt aktin monomer egy részét megjelöltük FITC fluorofórral is. A jelölés megkezdése előtt az IAEDANS jelölt G-aktint 4 mM borátot tartalmazó pufferben (pH 8,5) 0,5 mM ATP, 0,1 mM $CaCl_2$, 1 mM MEA) dializáltuk éjszakán át. A fluorofórt, melyet 0,1 M NaOH-ban oldottunk fel, tízszeres moláris feleslegben adtuk az aktinhoz, majd a reakcióelegyet óvatosan kevertetve inkubáltuk szobahőmérsékleten 3 órán át. Mivel a FITC jelölt aktin polimerizációs képessége sérül, így a nem jelölt aktin eltávolítása érdekében a mintát polimerizáltuk 100 mM KCl és 2 mM $MgCl_2$ hozzáadásával szobahőmérsékleten 2 órán át. Centrifugálást (Beckman Coulter Optima Max Ultracentrifuga, 32800 g 40 perc, 4 °C) követően a jelölt aktint tartalmazó felülúszóból a nem kötődött fluoreszcens festéket PD10 oszloppal távolítottuk el. Utolsó lépésként a FITC - G-aktint dializáltuk A pufferben. Az IAEDANS-FITC duplán jelölt aktin monomer koncentrációját Bradford fehérje esszé reagens segítségével, a FITC koncentrációját pedig spektrofotometriásan 74500 $M^{-1}cm^{-1}$ abszorpciós koefficiens segítségével 493 nm-en határoztuk meg. A jelölési arány minden esetben 80-100% volt.

N-(1-pirén)-jódacetamid jelölés:

Az aktint N-(1-pirén)-jódacetamiddal jelöltük az aktin filamentum depolimerizációs kinetikájának a vizsgálatához fluoreszcencia spektroszkópiai kísérleteink során [80]. Első lépésként a G-aktint (23 μM) MEA mentes A pufferben polimerizáltuk szobahőmérsékleten 1 órán át. Az így létrehozott F-aktinhoz adtuk a fluorofórt 10%-os tömegarány feleslegben, majd inkubáltuk szobahőmérsékleten 18 órán át. Ultracentrifugálás (Beckman Coulter Optima Max Ultracentrifuga, 32800 g, 45 perc, 4 °C) segítségével különítettük el a pirén jelölt aktint az oldatban jelenlévő szabad fluoreszcens festéktől. Homogenizálást és dialízist követően a pirén jelölt aktin koncentrációját Jasco V-660 spektrofotométerrel határoztuk meg a 0,63 mg^{-1} ml cm^{-1} extinkciós együttható felhasználásával 290 nm-en. Az aktinhoz kötött pirén koncentrációját pedig a 344 nm-hez tartozó abszorpciós együttható (45000 M^{-1} cm^{-1}) segítségével határoztuk meg. A jelölési arány 70-90 % között volt.

Alexa Fluor 488 szukcinimidil észter (Alexa488SE) jelölés:

TIRF mikroszkópos kísérleteink során az aktin vizualizálására Alexa Fluor 488 szukcinimidil észtert használtunk. A jelölés során a G-aktint (50 μM) Pipes pufferben (20 mM Pipes, 0,2 mM $CaCl_2$, 0,2 mM ATP, 0,1 M KCl, pH 6,9) dializáltuk éjszakán át 4 °C-on). Ezt követően 6-szoros moláris feleslegben adtuk az Alexa488SE-t (dimetil-formamidban oldva) az F-aktinhoz, ezt 1 órás inkubáció követte. A reakciót 10 mM Tris- HCl (pH 7,8) hozzáadásával állítottuk le. Ultracentrifugálást (Beckman Coulter Optima Max Ultracentrifuga, 32800 g, 40 perc, 20 °C) követően a jelölt aktint tartalmazó pelletet felszuszpendáltuk és homogenizáltuk. A felesleges festéket PD-10 oszlop alkalmazásával távolítottuk el. Következő lépésben a jelölt G-aktint 2 mM $MgCl_2$ és 100 mM KCl jelenlétében polimerizáltuk (30 perc, szobahőmérséklet), majd ultracentrifugáltuk a mintát. Az aktint tartalmazó pelletet G pufferbe (4 mM Tris-HCl, 0,1 mM $CaCl_2$, 0,2 mM ATP, 1 mM DTT, 0,01% NaN_3 pH 7,8) dializáltuk fénytől védve éjszakán át 4 °C-on. Az Alexa488SE jelölt G-aktin koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg 280 nm-en, ahol az abszorpciós koefficiens 1,11 mg^{-1} ml cm^{-1}, a korrekciós faktor pedig 0,46 volt. Az Alexa488SE koncentrációját 495 nm-en 71000 M^{-1} cm^{-1} extinkciós együtthatót alkalmazva számoltuk ki. A jelölési arány 40-60 % között volt.

4.2. Fluoreszcencia anizotrópia mérések

„Steady-state” fluoreszcencia anizotrópia kísérleteket végeztünk a twinfilin-1 G-, valamint F - aktinhoz való affinitásának meghatározására, különböző fluoreszcens festékkel jelölt aktint alkalmazva. A fluoreszcencia anizotrópia vizsgálata egy igen közismert módszer fehérje-fehérje kapcsolatok létrejöttének igazolására, ha az egyik kötő partner rendelkezik belső fluorofórral vagy alkalmas fluoreszcens festékkel való jelölésre anélkül, hogy a jelölés megváltoztatná annak funkcióit [81,82,83]. A fluoreszcencia anizotrópia mérése során a minta megvilágítása és az emisszió detektálása polarizátorokon keresztül történik. A fotoszelekciónak köszönhetően azok a fluorofórok kerülnek gerjesztett állapotba, melyek abszorpciós vektora a gerjesztő fény polarizációs síkjának megfelelő forgáskúpon belül helyezkedik el. Az anizotrópiát az határozza meg, hogy gerjesztés után a vizsgált molekula emissziós dipólusai mennyire maradnak rendezettek. Értékét a következő képlet segítségével határozhatjuk meg:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \qquad (1)$$

ahol I_{VV} és I_{VH} a vertikálisan polarizált fénnyel gerjesztett fluorofór emissziójának vertikálisan és horizontálisan polarizált komponense (intenzitása), G pedig a G - faktor, amely a műszer vertikálisan és horizontálisan polarizált fényre vonatkoztatott eltérő érzékenységét jellemzi:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \qquad (2)$$

ahol I_{HV} és I_{HH} a horizontálisan polarizált fénnyel gerjesztett fluorofór emissziójának vertikális és horizontális komponense.

Ha az általunk vizsgált rendszerben a hőmérséklet nem 0 K, akkor számolni kell azzal, hogy a fluorofórok rotációs diffúziós mozgást végeznek, így az emissziós vektorok iránya megváltozik. Ezt a rotációs mozgást számos paraméter befolyásolja, mint például a közeg viszkozitása, az oldat hőmérséklete vagy éppen a vizsgált molekula mérete. Az általunk vizsgált rendszerben a mért anizotrópia értékkel a fluorofórral jelölt teljes fehérjét érintő forgás jellemezhető. Ezáltal egy partner molekulával létrejött kölcsönhatás is jól követhető, mivel várhatóan egy fehérje komplex létrejöttével a globális fehérjeméret növekszik, forgása lelassul. A mérések során termosztálható küvettatartóval ellátott *Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3* fluorimétert használtunk. Az aktin monomert ε-ATP-vel jelöltük a mérésekhez és a kísérleteket ATP mentes A pufferben végeztük el. Az ε-ATP – G-aktin anizotrópiáját (1 μM) növekvő twinfilin koncentráció (0-8 μM) mellett vizsgáltuk, 320 és 410 nm gerjesztési és emissziós

hullámhossz beállítás mellett 22 °C-on. A twinfilin aktin filamentumhoz való affinitásának meghatározásához IAEDANS jelölt aktin monomert használtunk, melyet 2 mM $MgCl_2$ és 100 mM KCl jelenléte mellett polimerizáltuk szobahőmérsékleten 2 órán át. Ebben a kísérletsorozatban az IAEDANS-jelölt F-aktin (5 µM) anizotrópiájának változását követtük növekvő twinfilin koncentráció (0-60 µM) mellett, a gerjesztési és emissziós hullámhossz 350 és 479 nm volt. Meghatároztuk a twinfilin affinitását IAEDANS jelölt G-aktinhoz is, ahol a jelölt aktin (2 µM) anizotrópiáját mértük növekvő TWF koncentráció (0-10 µM) mellett. Az affinitás értékeket az alábbi egyenlet segítségével határoztuk meg:

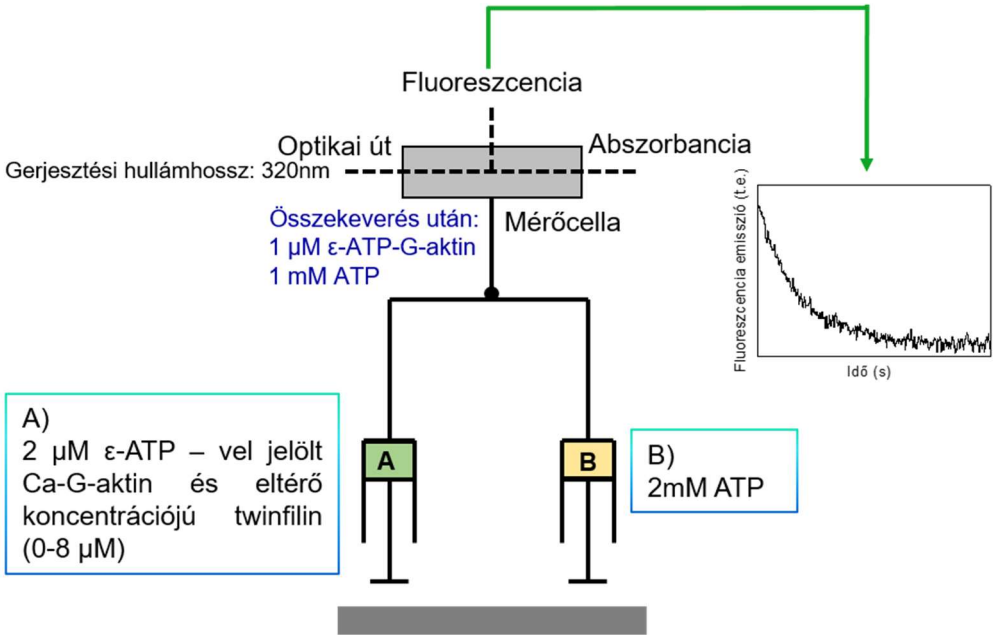
$$\frac{\Delta r}{\Delta r_{max}} = \frac{r_{mért} - r_{min}}{r_{max} - r_{min}} = \frac{([L_{total}]+[P_{total}]+K_D) - \sqrt{([L_{total}]+[P_{total}]+K_D)^2 - 4[P_{total}][L_{total}]}}{2[P_{total}]} \quad (3)$$

ahol Δr a mért fluoreszcencia anizotrópia értékek ($r_{mért}$) és a fluoreszcensen jelölt, de komplexet nem képező fehérje anizotrópiájának (r_{min}) különbsége, a Δr_{max} a liganddal komplexet képző fehérjék (r_{max}) és r_{min} közti különbséget jelenti. L_{total} a ligand összkoncentrációját, a P_{total} a fehérje végkoncentrációját, K_D pedig a disszociációs egyensúlyi állandót jelölik.

4.3. Nukleotid kicserélődés vizsgálata

A nukleotid kicserélődés vizsgálatára *„stopped flow”* (megállított áramlású reaktor) gyorskinetikai mérési technikát alkalmaztunk. A mérés során a minták betöltése erre alkalmas fecskendők segítségével történik. A módszer lehetőséget nyújt eltérő cellákban lévő minták gyors összekeverésére. Nagyon rövid holtidőt (miliszekundumos) követően a minta egy megállító fecskendőbe jut, ami az áramlást ideiglenesen leállítja. A mérőcellában az elegyek reakciókinetikai folyamatokat kísérő fotometriai változások (abszorpció, fluoreszcencia emisszió) nyomon követhetők *(8. ábra)*.

A kísérleteket *Applied Photophysics Stopped-flow* műszerrel végeztük. Ennek során 2 µM G-aktint használtunk, melyet előzőleg ε-ATP-vel jelöltünk. A G-aktint különböző koncentrációjú twinfilin-1 - gyel (0-8 µM) inkubáltuk 4 °C-on minimum 30 percig. Mérés során a fehérjéket tartalmazó mintát kevertük 1 mM ATP-t tartalmazó A pufferel (pH 8,0) *(8. ábra)*. A fluoreszcencia intenzitás változását követtük nyomon, a minimális idő 1000 szekundum volt. A nuleotid kicserélődés sebességét vizsgáltuk, mérve az ε-ATP csökkenő fluoreszcencia intenzitását, ahogy disszociál az aktin monomerről. A fluoreszcens jelölőt 320 nm-en gerjesztettük és az emissziót FG 385 szűrőt használva detektáltuk.



8. ábra: A nukleotid kicserélődés vizsgálatának sematikus mérési elrendezése.

4.4. Fluoreszcencia kioltási kísérletek

Fluoreszcencia kioltási kísérletekkel lehetőség nyílik az aktinhoz kötött fluorofór környezetében bekövetkező konformációs változások vizsgálatára. A fluoreszcencia kioltás során a fluorofórok által kibocsájtott fény intenzitása csökken olyan molekulák jelenlétében, melyek elektronszerkezete megfelelő ahhoz, hogy a gerjesztett állapotban lévő fluorofórral kölcsönhatásba lépve annak gerjesztési energiáját átvegyék, majd azt valamilyen formában disszipálják. Többféle kioltási mechanizmus különböztethető meg, így beszélhetünk statikus és dinamikus kioltásról. Statikus kioltás esetén a kioltó molekula és a fluorofór még a gerjesztés előtt komplexet alkot egy sötét komplexet hozva létre, ami nem lesz képes fényt emittálni. Így csak a komplexben nem lévő fluorofórok fluoreszcenciája figyelhető meg, a kioltás ezen típusa független a fluorofór élettartamától [84]. Dinamikus kioltás esetén a kioltó molekula és a fluorofór diffúzió révén egymás közelébe kerülve egy úgynevezett ütközési komplex jön létre és a gerjesztett fluoreszcens festék átadja az energiáját a kioltó molekulának. Ebben az esetben a fluorofór élettartamában csökkenés figyelhető meg. A kioltás folyamatát az is befolyásolja, hogy az adott fluoreszcens festék szabad vagy kötött, esetleg mindkét formában jelen van a rendszerben. A kioltás mértékének szemléltetésére a Stern-Volmer ábrázolás, kvantifikálására

a Stern-Volmer egyenlet alkalmazható, melyből meghatározható a Stern-Volmer állandó értéke *(K_{SV})*. Egyszerű kioltás során az alábbi egyenlet alkalmazható:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (4)$$

ahol F_0 a fluoreszcencia intenzitás a kioltó molekula hiányában, F a fluoreszcencia intenzitás a kioltó molekula jelenlétében, *[Q]* a kioltó koncentrációja.
Élettartam mérés esetén pedig az alábbi egyenlettel határozható meg a dinamikus Stern-Volmer állandó *(K_{SV_D})*:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV_D}[Q] \quad (5)$$

ahol τ_0 a fluoreszcencia élettartam a kioltó molekula hiányában, τ a fluoreszcencia élettartam a kioltó molekula jelenlétében, *[Q]* a kioltó koncentrációja.
Azokban az esetekben, ha egynél több fluorofór populáció van jelen (például aktinhoz kötött és szabad ε-ATP az oldatban) eltérő kioltási mechanizmusokkal, akkor a Stern-Volmer egyenlet speciális, módosított formájának alkalmazása szükséges:

$$\frac{F_0}{F} = \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{f_i}{\left(1+K_{SV_{Si}}[Q]\right)\left(1+K_{SV_{Di}}[Q]\right)}\right)^{-1} \quad (6)$$

ahol K_{SV_Si} és K_{SV_Di} az *i.* populációhoz tartozó statikus és dinamikus Stern-Volmer állandó értékek.
Perkin Elmer LS50B és *Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3* fluorimétereket használtunk a *„steady-state”* kioltási kísérleteinkhez, melynek során 5 μM ε-ATP-vel jelölt G-aktint titráltunk növekvő koncentrációjú (0-3 M) akrilamiddal. A gerjesztési hullámhossz 320 nm volt és az emissziós spektrumokat 330 – 600 nm között rögzítettük, 5 nm-es réseket alkalmazva mind a gerjesztési, mind az emissziós oldalon.
Időfelbontású fluoreszcencia kioltási kísérleteinket *ISS K2 Multifrekvenciás fázisfluorométerrel* végeztük 22 ° C-on. A mérések során a gerjesztő fényt egy 300-W-Xe-ívlámpa szolgáltatta, amit egy dupla-kristályos pockel cella modulált. A modulációs frekvenciát 10 lépésben 2 és 64 MHz között állítottuk be. A gerjesztési hullámhossz 320 nm volt és az

emissziós jelet egy FG 385 felül-áteresztő szűrő alkalmazásával rögzítettük. Minden mérés során referenciaként frissen preparált glikogén oldatot használtunk, melynek élettartama 0 ns.

4.5. Hőmérsékletfüggő FRET mérések

FRET méréseinket termosztálható mintatartóval felszerelt Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 spektrofluoriméterrel végeztük. Kísérleteinkben az aktin molekulán belüli fluoreszcencia rezonancia energiatranszfert vizsgáltuk. Az aktin 1-es alegységében lévő 374-es ciszteint IAEDANS-szel jelöltük, ez funkcionált donorként, míg az akceptor molekula a 2-es alegység lizin-61 aminosavjához konjugált FITC fluorofór volt. A donor fluoreszcenciáját követtük nyomon az akceptor hiányában és jelenlétében, 350 nm volt a gerjesztési hullámhossz, míg az IAEDANS fluoreszcencia intenzitását 475 nm – en jegyeztük fel. Ezen a hullámhossz értéken az akceptor hozzájárulása a mért intenzitáshoz elhanyagolható volt. A méréseket különböző hőmérsékleten végeztük el, 5 és 35 °C között 5 °C-os lépésekben. A küvetta párásodásának elkerülése érdekében páramentesítő berendezést használtunk a küvettatérben. A fluoreszcencia intenzitás értékeket az alábbi egyenlet felhasználásával korrigáltuk az „*inner filter*" effektusra:

$$F_{korrigált} = F_{megfigyelt} antilog[(OD_{ex}/2) + (OD_{em}/10)] \quad (7)$$

ahol $F_{megfigyelt}$ a mért fluoreszcencia intenzitás, OD_{ex} és OD_{em} pedig a minta abszorbanciája az adott gerjesztési és emissziós hullámhosszon. A FRET hatásfokát a következő egyenlet segítségével határoztuk meg:

$$E = \left[1 - \left(\frac{F_{DA}}{F_D} \cdot \frac{c_D}{c_{DA}}\right)\right] / \beta \quad (8)$$

ahol F_D és F_{DA} a donor molekula fluoreszcencia intenzitása, c_D és c_{DA} a donor molekula intenzitása az akceptor hiányában és jelenlétében figyelembe véve az akceptor jelölési arányát (β).

A duplán jelölt aktin esetén a pontos donor koncentráció (c_{DA}) meghatározásához a mérést követően az aktint tripszin (0,4 mg/ml) jelenlétében éjszakán át 4 °C-on emésztettünk. Tripszin hatására az aktin kis peptidekké és nagy fragmentumokká emésztődik, így a donor és az akceptor molekula elkülöníthetők egymástól. Tekintettel arra, hogy a fluorofór intenzitása

arányos a koncentrációval, a c_{DA} pontosan meghatározható a donor emésztést követő intenzitásának a mérésével.
A transzferhatásfok felhasználásával lehetőség nyílik a donor és akceptor molekula között távolság (R) meghatározására, melyhez az alábbi összefüggést alkalmaztuk:

$$E = R_0^6/(R_0^6 + R^6) \quad (9)$$

ahol R_0 a Förster-féle kritikus távolság, amelynél a transzfer hatásfoka 50%-os (IAEDANS-FITC pár esetén 5,07 nm 20 °C-on [85]).
Az R_0 értéke az alábbi egyenlettel határozható meg:

$$R_0^6 = (8{,}79 \cdot 10^{11}) \cdot n^{-4} \cdot \kappa^2 \cdot \Phi_D \cdot J(\lambda) \quad (10)$$

ahol κ^2 egy orientációs faktor, ami a két fluorofór relatív helyzetét jellemzi; n a donor és akceptor molekula közötti közeg törésmutatója; Φ_D a donor kvantumhatásfoka, J(λ) pedig az akceptor abszorpciós spektrumának (ε_A (λ)) és a donor emissziós spektrumának
$(F_D(\lambda))$ az átfedési integrálja [84]. Az általunk alkalmazott hőmérsékleti pontokhoz tartozó R_0 értékeket egy Nyitrai és munkatársai által publikált értékekre alapuló, kalibrációs egyenes segítségével határoztuk meg [86].
A FRET hatásfok ismeretében meghatározható az úgynevezett *f'* paraméter, melynek ismerete információt ad a donor és az akceptor közötti fehérjemátrix rugalmasságáról. A molekulán belüli fluktuáció a hőmérséklet emelkedésével növelhető és befolyásolja az *f'* paraméter értékét. Egy flexibilis fehérje mátrixban a fluktuáció amplitúdója nagyobb, mint egy merevebb szerkezettel rendelkező molekula esetén. Az *f'* értékét az alábbi egyenlettel határoztuk meg[87]:

$$f' = E/F_{DA} \quad (11)$$

ahol E a FRET hatásfoka, F_{DA} pedig a donor molekula fluoreszcencia intenzitása az acceptor jelenlétében.

4.6. Koszedimentációs kísérletek

A twinfilin-1 szekvesztráló hatásának és az aktin filamentummal alkotott kölcsönhatásának a vizsgálatára koszedimentációs kísérleteket végeztünk. Első lépésként az aktint szobahőmérsékleten polimerizáltuk 2 mM $MgCl_2$ és 100 mM KCl jelenlétében (2 óra), majd az F-aktint eltérő koncentrációjú (0-4 μM) twinfilinnel inkubáltuk szobahőmérsékleten. A minták ultracentrifugálását (Beckman Coulter Optima Max Ultracentrifuga 300000 g, 30 min, 22 °C) követően a felülúszót és a pelletet szétválasztottuk. Az egyes minták fehérjetartalmát SDS poliakrilamid gélelektroforézist követően Coomassie blue-val történő festéssel tettük láthatóvá, majd a fehérjekomponensek intenzitását a Syngene bioimaging system program segítségével határoztuk meg.

4.7. Aktin depolimerizációs esszé

Pirén jelölt G-aktint használtunk az aktin filamentum depolimerizációs kinetikájának vizsgálatára, amit Safas Xenius FLX és Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 spektrofluoriméterek segítségével végeztünk el. A jelölt Mg-G-aktint 2 mM $MgCl_2$ és 100 mM KCl jelenlétben a küvettában polimerizáltuk szobahőmérsékleten. A depolimerizációs mérések kezdetén az F-aktin koncentrációját, ami 1 μM volt a kritikus koncentráció alatti értékre hígítottuk (20 nM) és a pirénnel jelölt aktin fluoreszcencia intenzitását követtük nyomon twinfilin hiányában és jelenlétében (1,3 μM) eltérő pH környezetben. A gerjesztési hullámhossz 365 nm volt, a fluoreszcencia intenzitást pedig 407 nm-en detektáltuk. A depolimerizáció sebességét a depolimerizációs görbe kezdeti szakaszára (első 120 másodperc) illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg.

4.8. Evaneszcens mező mikroszkópia (TIRFM)

Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópiai (TIRFM) kísérleteket végeztünk az aktin depolimerizációjának részletesebb vizsgálatára a korábban leírtakhoz hasonlóan [88]. A módszer lehetőséget nyújt az üvegfelszínhez kötött egyedi aktin filamentumok vizsgálatára, valamint a polimerizációs/depolimerizációs folyamatok egyes szakaszainak az elkülönítésére. A kísérletekben N-etil-maleimid konjugált miozinnal kezelt üveg felszínt alkalmaztunk, biztosítva az aktin filamentumoknak az evaneszcens mezőbe való

jelenlétét. Alexa488SE jelölt aktint használtunk a kísérletek során, melyet előzőleg polimerizáltunk. Következő lépésben miozin pufferrel (0,5% metilcellulóz, 100 mM DTT, 10 mM DABCO, 0,5% BSA, 0,6 M KCl és 2 mM $MgCl_2$, pH 8,0) mostuk a cellákat, majd 0,1% (w/v) BSA-t adtunk a rendszerhez és mikroszkópos oldattal (0,5% (w/v) metilcellulóz, 10% (w/v) BSA, 10 mM DABCO és 10 mM DTT F pufferben (0,5% metilcellulóz, 100 mM DTT, 10 mM DABCO, 0,5% BSA, 100 mM KCl és 2 mM $MgCl_2$ (pH 8,0)) ekvilibráltuk azt. A Mg^{2+} - F-aktin (10%-ban jelölt Alexa488SE-aktint tartalmaz) depolimerizációját twinfilin hiányában és jelenlétében (1,53 µM) követtük nyomon F pufferben (0,5% metilcellulóz, 100 mM DTT, 10 mM DABCO, 0,5% BSA, 100 mM KCl és 2 mM $MgCl_2$ (pH 8,0)). A méréseket egy lézer alapú (491 nm) TIRF rendszerrel kiegészített Olympus IX81 epifluoreszcens mikroszkóppal végeztük szobahőmérsékleten, egy Olympus APON 60X NA 1.45 TIRF olaj immerziós objektívet és egy CCD kamerát (Hamamatsu ORCA-ER) használva. Az analízist *Fiji* szoftver segítségével végeztük el. Az aktin depolimerizáció időbeli követése érdekében a képeket 10 másodpercenként rögzítettük. Az F-aktin depolimerzációs sebességének (µm/másodperc) a meghatározásához *ImageJ* szoftver *MultipleKymograph plugin* csomagját alkalmaztuk és a hosszcsökkenés sebességét az alábbi egyenlettel határoztuk meg:

$$v = \frac{\Delta l}{\Delta t} = tan\alpha \qquad (12)$$

ahol $tan\alpha$ a filamentum hossz (l) - idő (t) függvény meredeksége. Az így kapott értékből meghatározható a filamentumok depolimerizációjának sebessége alegység/másodpercben feltételezve, hogy 1 µm 370 alegységet tartalmaz [19].

4.9. Differenciális pásztázó kalorimetria mérések

A kalorimetriás méréseket Setaram Micro DSC II és Micro DSC-III (Longjumeau Cedex, Franciaország) kalorimétereket alkalmazva végeztük el. Kísérleteinkben 20-100 °C hőmérséklettartományt használtunk, és a fűtési/hűtési sebesség minden esetben 0.3 K/perc volt. Méréseink során referenciaként MOPS tartalmú A puffert használtunk (4 mM MOPS (pH 8,0), 0,1 mM $CaCl_2$, 0,2 mM ATP, 0,5 mM MEA és 0,005% NaN_3), melyet a mintacellától termikusan elkülönített cellába helyeztünk. A monomerrel történő mérések során az aktin és a twinfilin koncentrációja egyaránt 23 µM volt. Az aktin filamentummal végzett mérések esetén 46 µM (2 mg/ml) aktint polimerizáltunk 100 mM KCl és 2 mM $MgCl_2$ jelenlétében, majd az

F-aktint inkubáltuk 7,5 μM twinfilin-1 jelenlétében legalább 1 órán át szobahőmérsékleten. Minden mérés során dupla felfűtést alkalmaztunk vizsgálva az adott fehérje hődenaturációjának reverzibilitását. Az analízis során az első felfűtésből származó adatokat korrigáltuk a második felfűtés adataival, majd a hőáramot ábrázoltuk a hőmérséklet függvényében. A fehérjék denaturációs (olvadási) hőmérsékletét a hődenaturációs görbék csúcsához tartozó hőmérséklet értékekből határoztuk meg.

A DSC görbéket tovább analizálva az illesztett Gauss-görbékből integrálással meghatározható a görbe alatti terület, ami megadja a kalorimetrikus entalpiaváltozást. Kiszámolható továbbá az adott állapothoz tartozó csúcsnak a félértékszélessége, a $T_{1/2}$. A fázisátalakulásokhoz tartozó aktiválási energia értékeket is meghatároztuk, ami a hődenaturáció kialakulásához (kezdő lépéséhez) szükséges energia. Az aktiválási energia értékét a Sanchez-Ruiz módszer szerint határoztuk meg, aminek a Lumry és Eyring által leírt modell az alapja [89,90]. Ez a modell azt mondja ki, hogy egy fehérje irreverzibilis denaturációjának folyamata két lépésből áll, egy reverzibilis denaturációs lépést egy irreverzibilis követ

$$N \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\rightleftarrows}} D \rightarrow k_2 I \qquad (13)$$

ahol N a natív, D a reverzibilisen denaturálódott, I pedig a fehérje irreverzibilisen denaturálódott formája. A k_{+1} és k_{-1} a reverzibilis folyamathoz tartozó sebességi állandók, k_2 pedig az irreverzibilis folyamat sebességi állandója.

A denaturáció aktiválási energiája a kalorimetrikus entalpiaváltozással függ össze és az alábbi egyenlet segítségével határozható meg:

$$ln\left(ln\left(\frac{dH_{kal}}{dH_{kal}-dH}\right)\right) = \frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \qquad (14)$$

ahol E_A az aktiválás energia, dH_{kal} a teljes denaturáció entalpiaváltozása, dH az egyes hőmérsékleti pontokhoz (T) tartozó entalpiváltozás, T_m az olvadási hőmérséklet, R pedig az egyetemes gázállandó (8,314 $Jmol^{-1}K^{-1}$).

4.10. Adatok statisztikai elemzése

A mérések során feltüntetett adatok legalább három egymástól független mérésből származnak. Az ábrák az adott mérések adataiból számolt átlagot és a standard deviációt (szórás) mutatják. Az aktin filamentum depolimerizációs kinetikájának vizsgálata során kapott eredmények statisztikai elemzéséhez az SPSS szoftver 26-os verzióját használtuk. Első lépésként Shapiro-Wilk teszttel meghatároztuk az adatok eloszlását, melyek normál eloszlást mutattak. A szignifikancia mértékének meghatározására Mann Whitney U tesztet alkalmaztunk az alacsony mintaszám miatt. A $p<0,05$ értéket tekintettük szignifikancia szintnek.

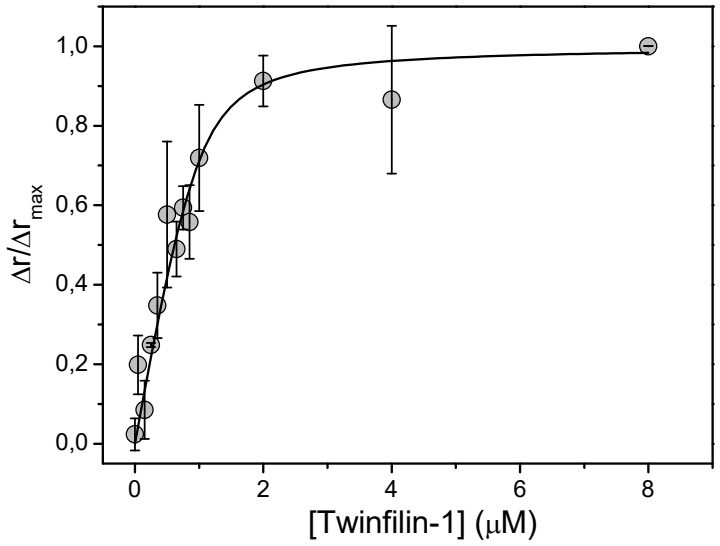
5. EREDMÉNYEK

Kísérleteink során elsősorban kalcium-kötött G-aktint használtunk. A Ca^{2+}-G-aktin stabilabb, amely lehetővé teszi a nem-specifikus környezeti hatások csökkentését ezzel párhuzamosan az eredmények reprodukálhatósága növelhető. Magnézium-kötött G-aktint a hőmérséklet függő FRET mérések során és az F-aktinnal végzett kísérleteknél alkalmaztunk.

5.1. Egér Twinfilin-1 hatása az aktin monomer szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira

5.1.1. Twinfilin-1 G-aktinhoz való affinitásának meghatározása

Kutatómunkám során vizsgáltam az egér twinfilin-1 hatásait az aktin szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. Kísérleteinkben egy hisztidin-taggel rendelkező fehérjét használtunk, melyet *Escherichia coli* expressziós rendszerben állítottunk elő. Az expresszált fehérje funkcióképességének ellenőrzése céljából *„steady-state”* fluoreszcencia anizotrópia kísérleteket végeztünk, melynek segítségével a twinfilin kalcium-kötött aktin monomerhez való affinitását kívántuk meghatározni. A kísérlet során ε-ATP-vel jelölt aktint használtunk, melynek koncentrációját 1 μM-ra állítottuk be. A kísérlet megkezdése előtt meghatároztuk a szabad ε-ATP fluoreszcencia anizotrópiáját, ami $0{,}0012 \pm 1 \cdot 10^{-4}$. Ez az igen alacsony anizotrópia a fluorofór szabad és gyors mozgásáról ad információt. A jelölt aktin anizotrópiája $0{,}028 \pm 7 \cdot 10^{-4}$ volt twinfilin hiányában [76]. Ez egy viszonylag kis anizotrópia érték, mely azt jelzi számunkra, hogy az ATP analóg fluorofór az aktinhoz való bekötést követően is megtartja mozgási szabadságát, valamint feltételezzük, hogy bizonyos arányban szabad ε -ATP is jelen van. Egy jelentős mértékű anizotrópia emelkedést figyeltünk meg, amikor eltérő koncentrációban (0-8 μM) adtuk a twinfilin-1-et az ε-ATP jelölt G-aktinhoz. Az emelkedett anizotrópia érték a fehérje-fehérje komplex kialakulásának tulajdonítható. A mért *„steady-state”* anizotrópia értékeket ábrázoltuk a twinfilin koncentráció függvényében *(9. ábra)* és a 3. egyenletet alkalmazva meghatároztuk az egyensúlyi disszociációs állandó értékét, ami $0{,}12 \pm 0{,}04$ μM-nak adódott, jelezve a twinfilin-1 és a Ca - G-aktin között kialakult erős kötést *(9. ábra)* [76].

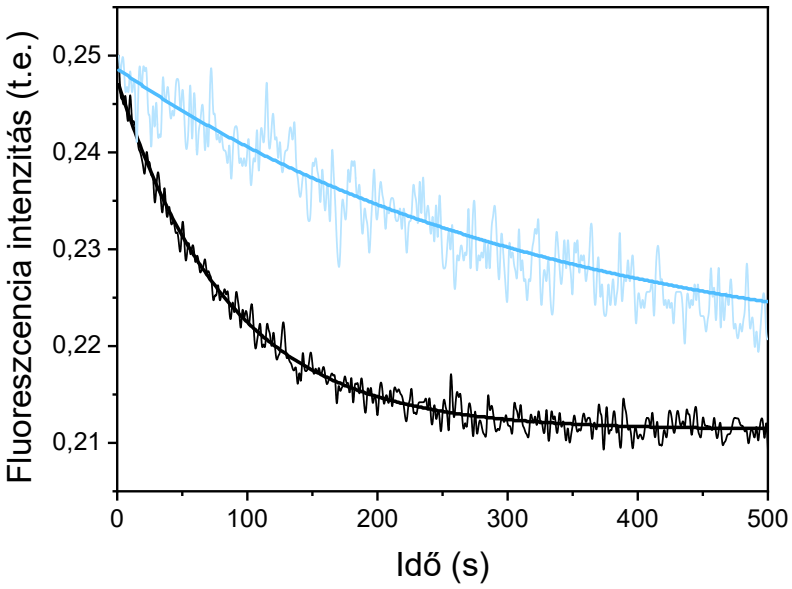


9.ábra: Twinfilin-1 aktin monomerhez való kötésének vizsgálata.
ε-ATP jelölt G-aktin fluoreszcencia anizotrópiájának változása a twinfilin-1 koncentráció (0-8 μM) függvényében. Az alkalmazott aktin koncentráció 1 μM volt. A kapott egyensúlyi disszociációs állandó 0,12 ± 0,04 μM. A hibahatárok a legalább három független mérési pont alapján számolt szórást (SD) jelzik.

5.1.2. Nukleotid kicserélődés vizsgálata aktin monomeren

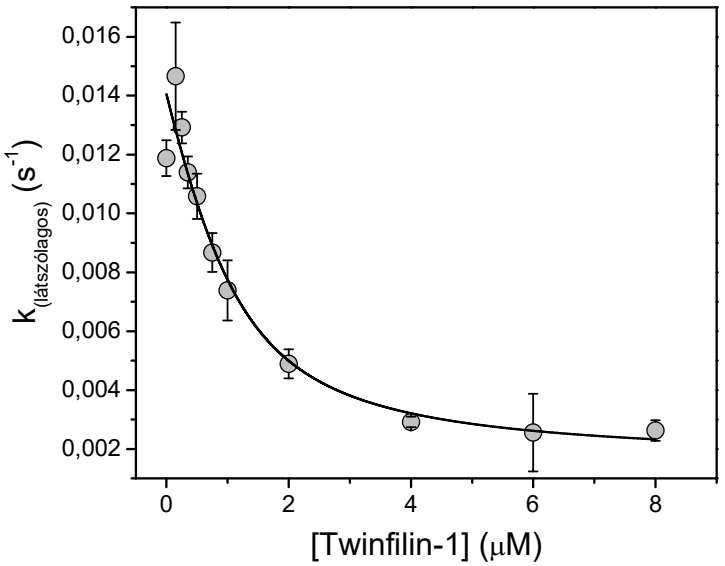
Az ADF/kofilin család fehérjéire jellemző, hogy képesek megváltoztatni az aktin nukleotid-kötő tulajdonságait, így vizsgáltuk a twinfilin aktin nukleotid-kicserélődésére gyakorolt hatását gyorskinetikai módszerrel [76]. ATP analóg ε-ATP-vel jelölt aktin monomert használtunk, melynek a mérések során 1 μM volt a koncentrációja. A nukleotid kicserélődés egyensúlyjának beállását követően jelöletlen ATP-t adtunk nagy feleslegben (1 mM) a rendszerhez. A kötött és szabad ε-ATP fluoreszcencia intenzitása eltér, így a nukleotid-kicserélődés a fluoreszcencia intenzitás érték változásával jól nyomon követhető. Az intenzitás változásból az elsőrendű disszociációs sebességi állandó ($k_{(látszólagos)}$) meghatározható, ami aktin monomer esetén 0,012 s^{-1} *(10. ábra)*. Ezt követően a mérés megkezdése előtt az aktint előinkubáltuk eltérő koncentrációjú twinfilinnel (0-8 μM). Azt tapasztaltuk, hogy twinfilin jelenlétében jelentősen lecsökkent a disszociációs sebességi állandó értéke, ami a legmagasabb twinfilin koncentráció esetén 0,003 s^{-1}-nek adódott *(10. ábra)*. Tehát a twinfilin aktinnal való kölcsönhatásának eredményeképpen a nukleotid-kicserélődés sebessége jelenlősen csökkent. A számolt

disszociációs sebességi állandó értékeket ábrázoltuk a TWF-1 koncentráció függvényében és a 3. egyenletet alkalmazva meghatároztuk az affinitás értéket (0,49 ± 0,27 μM), ami jól illeszkedik az anizotrópia mérésekből meghatározott affinitás értékekhez *(11. ábra)* [76].



10. ábra: Nukelotid kicserélődés kinetikája ε-ATP jelölt G-aktin monomeren twinfilin- 1 hiányában és jelenlétében.

Az aktinhoz kötött ε-ATP (1 μM) fluoreszcencia intenzitás változásának nyomon követése feleslegben hozzáadott ATP hatására twinfilin hiányában és jelenlétében. Az elsőrendű disszociációs sebességi állandót a görbékre illesztett egyszerű exponenciális függvényből határoztuk meg twinfilin hiányában és jelenlétében. Aktinra (fekete) 0,012 s^{-1} *értéket kaptunk, míg 8 μM twinfilin jelenlétében (kék) a* $k_{(látszólagos)}$ *értéke 0,003* s^{-1}*-re csökkent.*



11. ábra: Twinfilin-1 hatása a nukleotid kicserélődésre aktin monomeren.
Nukleotid kicserélődés vizsgálata gyorskinetikai módszerrel 1μM ε-ATP jelölt aktin 1mM ATP-vel szemben. Az egyes twinfilin koncentrációkhoz (0-8 μM) tartozó elsőrendű disszociációs sebességi állandó értékét ábrázolva a K_D értéke meghatározható, ami 0,49 ± 0,27 μM-nak adódott. A hibahatárok legalább három független mérésből számolt szórást mutatják.

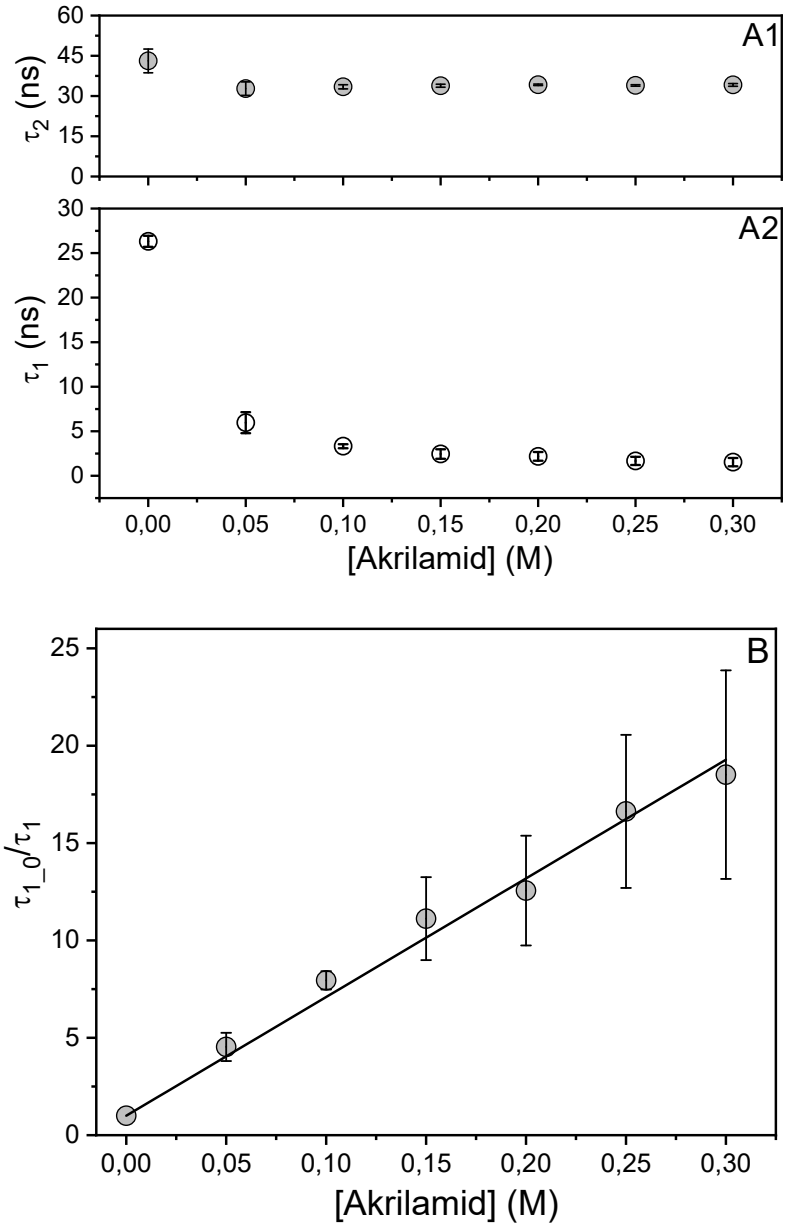
5.1.3. Fluoreszcensen jelölt ATP hozzáférhetőségének vizsgálata kioltási kísérletekkel

Az aktin-kötő fehérjék képesek lehetnek az aktin monomer és/vagy filamentum szerkezetét módosítani a fehéjékhez való kötésük során. Az aktin molekulában a kis és nagy domént elkülönítő, 2-es és 4-es alegység közötti nukleotid-kötő árok kimondottan érzékeny ilyen szempontból. Vannak olyan fehérjék, mint például a profilinek, melyek jelenlétében egy nyitottabb; míg például toxofilin vagy kofilin bekötésekor egy zártabb konformációs állapot figyelhető meg [82,83]. Feltételeztük, hogy az általunk vizsgált twinfilin is hatással lesz a nukleotid-kötő zseb szerkezetére, mivel a nukleotid-kicserélődés sebessége jelentősen lecsökkent twinfilin jelenlétében *(10. és 11. ábra).*

A mérések során az aktin kötött ε-ATP fluoreszcencia intenzitását követtük nyomon növekvő koncentrációban hozzáadott akrilamid mellett twinfilin hiányában és jelenlétében. A mérések során kapott ε-ATP fluoreszcencia intenzitás értékek F_0/F hányadosát az akrilamid kioltó molekula koncentrációjának függvényében feltüntetve a Stern-Volmer ábrázolást kapjuk. Mivel az alkalmazott fluorofór esetén beszélhetünk szabad és aktinhoz kötött populációról és

eltérő kioltási mechanizmusokról, ezért egy módosított Stern-Volmer egyenlet (6. egyenlet) felhasználásával értékeltük ki a kapott eredményeket és meghatároztuk a Stern-Volmer (K_{SV}) állandó értékét.

Fluoreszcencia élettartam mérésekből ismert, hogy a szabad ε-ATP - hez tartozó dinamikus K_{SV} érték 54,05 ± 1,02 M^{-1} és a statikus Stern-Volmer állandó értéke 0. [82]. Tekintettel arra, hogy egy fluorofór fluoreszcencia élettartama nem érzékeny a statikus kioltási mechanizmusokra, így az élettartam meghatározását célzó kísérletekkel a fluorofór dinamikus kioltási mechanizmusait vizsgálhatjuk. Fluoreszcencia élettartam mérésekkel vizsgáltuk, hogy az aktinhoz kötött ATP analóg dinamikus kiolthatósága hogyan módosul twinfilin jelenlétében. Az időfüggő kísérletekben megfelelő fluoreszcens jel érdekében a jelölt aktin koncentrációját 20 μM-ra állítottuk be, a twinfilin koncentrációja 40 μM volt, míg az akrilamid koncentrációját 0 M-tól 0,3 M –ig növeltük 0,05 M-os lépésekben. Az ε-ATP-hoz tartozó élettartam értékeket a nem lineáris legkisebb négyzetek módszerével határoztuk meg. Kétféle fluorofór populáció volt megfigyelhető, melyhez két eltérő élettartam értéket azonosítottunk. A hosszabb ~ 35 ns élettartam érték nem volt érzékeny a kioltó jelenlétére *(12/A1. ábra).* A rövidebb élettartam érték a szabad fluorofórhoz tartozik, érzékeny volt az akrilamid jelenlétére és értéke 26,3 ± 0,6 ns-ról 1,5 ± 0,5 ns-ra változott a növekvő aktrilamid koncentráció jelenlétében *(12/A2. ábra).* Az 5. egyenletet alkalmazva meghatároztuk a K_{SV} értéket (60,93 ± 1,49 M^{-1}), ami egyértelműen az oldatban jelenlévő szabad fluorofórhoz tartozik *(12/B. ábra).* Mivel a rövidebb élettartam komponens egyértelműen a szabad fluorofórhoz tartozik, így a hosszabb élettartam kizárólag az aktinhoz kötött ε-ATP lehet.



12. ábra: Az ε – ATP-vel jelölt aktin monomer fluoreszcencia élettartamának kioltása akrilamiddal twinfilin jelenlétében. A jelölt aktin 20 μM, a twinfilin 40 μM koncentrációban volt jelen a kísérletek során.

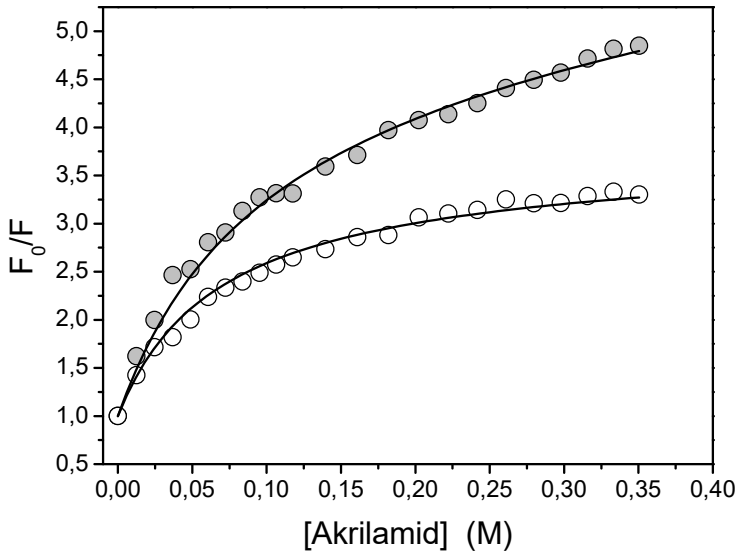
A1) A hosszabb élettartamú komponens (35 ns) élettartama, ami az aktinhoz kötött ε-ATP élettartama twinfilin jelenlétében.

A2) A szabad ε-ATP rövidebb élettartamának kioltását mutatja.

B) A szabad ε-ATP rövidebb élettartamának Stern-Volmer diagramja eltérő akrilamid koncentrációk (0-0,3 M) mellett. A dinamikus Stern-Volmer állandó értékét az 5. egyenlet segítségével határoztuk meg, ami 60,93 ± 1,49 M^{-1} – nak adódótt. A hibasávok az standard szórást mutatják (n≥3).

A kapott eredményeink azt mutatják, hogy az aktinhoz kötött ε - ATP nem kioltható dinamikusan twinfilin jelenlétében, így a 6. egyenletben a K_{SV_D} érték 0 M^{-1}-nek felel meg. A fentieket figyelembe véve a módosított Stern-Volmer egyenletben egy ismeretlen paraméter, az aktin-kötött ε-ATP statikus Stern-Volmer állandó értéke marad, ami információt szolgáltat a fluorofór hozzáférhetőségéről.

Az akrilamid koncentrációja 0 és 0,35 M között változott. A jelölt aktin és twinfilin koncentrációja 5-5 μM volt, ami a korábban meghatározott affinitás értéket figyelembe véve azt feltételezi, hogy a twinfilin molekulák több mint 90% komplexben van. Az aktin-kötött ε-ATP statikus Stern-Volmer állandó értéke twinfilin hiányában 0,33 ± 0,11 M^{-1}, míg twinfilin jelenlétében 0,05 ± 0,108 M^{-1}-nak adódott *(13. ábra)*. A kötött ε-ATP relatív előfordulása 64 ± 21 % volt a csak aktint tartalmazó minták esetén, míg twinfilin jelenlétében 85 ± 9 %. A K_{SV} állandó értéke az alkalmazott fluorofór hozzáférhetőségéről nyújt információt, annak növekedése a fluorofór kedvezőbb hozzáférhetőségére, míg csökkenése a kontrolhoz képest a kevésbé hozzáférhetőségére utal [82]. Twinfilin jelenlétében a kötött ε-ATP Stern-Volmer állandójának értéke jelentősen lecsökkent, ami a lecsökkent hozzáférhetőségét tükrözi. Ebből arra következtethetünk, hogy twinfilin jelenlétében az aktin nukleotid-kötő zsebe egy zártabb konformációs állapotba kerül, aminek a következménye, hogy a zsebbe kötő ATP analóg kevésbé lesz hozzáférhető az akrilamid számára. Mivel jelenleg nem áll rendelkezésünkre sem a teljes twinfilin, sem az aktin-twinfilin komplex röntgenkrisztallográfiás szerkezete, így nem zárható ki annak a lehetősége, hogy a twinfilin N-terminális alegysége sztérikusan blokkolja a nukleotid-kötő zsebet és ezért csökken az ε-ATP hozzáférhetősége.



13. ábra: Az ε-ATP fluoreszcenciájának akrilamiddal történő kioltásának reprezentatív Stern-Volmer ábrázolása.

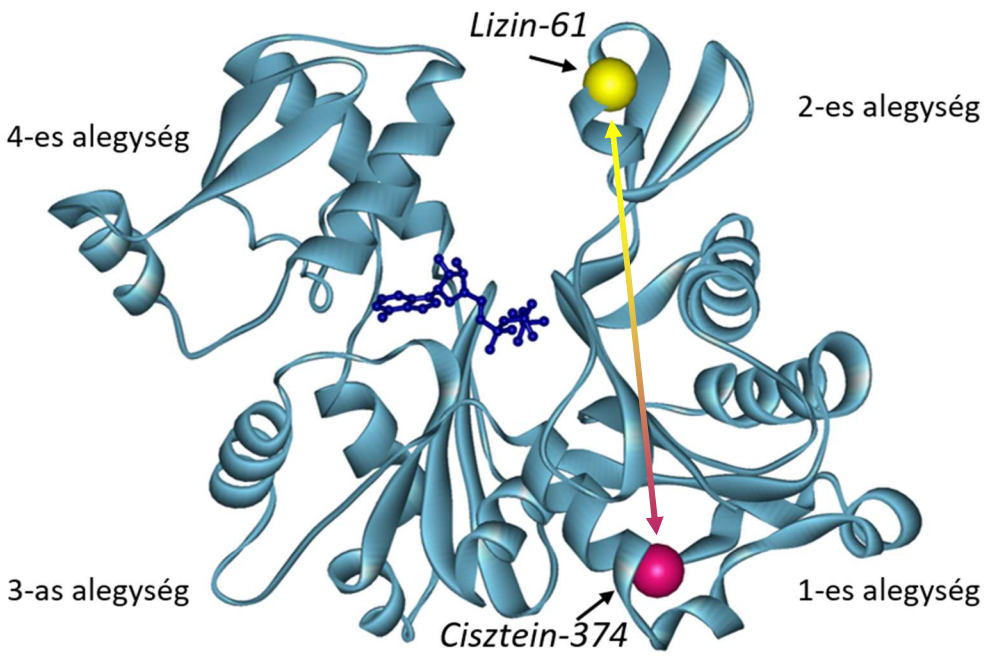
A kísérletekben az ε-ATP jelölt aktin és twinfilin koncentrációja egyaránt 5-5 μM volt, az akrilamid koncentrációja pedig 0-0,35 M között változott.

Az adatpontokra az illesztést a 2. egyenletet alkalmazva végeztük el. Meghatároztuk a kötött ε-ATP statikus kioltásához rendelhető K_{SV} értéket, mely aktin esetén 0,33 ± 0,11 M^{-1} (szürke). Twinfilin jelenlétében ez az érték 0,05 ± 0,108 M^{-1}-re csökkent (fehér). Az ábra legalább három független mérésből származó adatokat tartalmaz.

5.1.4. Az aktin monomer kis doménjének szerkezeti és dinamikai vizsgálata FRET módszerrel

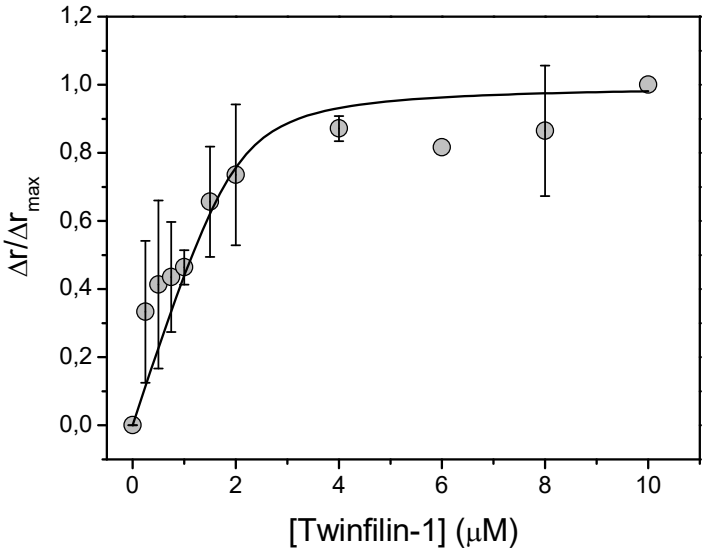
Fluoreszcencia rezonancia energia traszfer (FRET) méréseket végeztünk annak megállapítására, hogy a twinfilin jelenléte milyen hatással van az aktin monomer kis doménjének szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. A rezonancia energia traszfer során egy donor és egy akceptor között bizonyos feltételek mellett energia átadás következik be, melynek következtében a donor molekula gerjesztése során az akceptor molekula emissziója lesz detektálható [91]. A módszer előnye, hogy a donor és az akceptor jelenlétében mért fluoreszcencia intenzitásokból meghatározható az energia traszfer hatásfoka és a donor-akceptor közötti távolság. A meghatározott donor-akceptor távolságból következtetni lehet a molekulán belüli szerkezeti és dinamikai változásokra.

A mérésekhez az aktint fluoreszcens festékkel jelöltük, az 1-es alegység 374-es ciszteinjét IAEDANS-szal, ami a mérés során a donor szerepét töltötte be. FITC fluorofórral jelöltük a 2-es alegység 61-es lizin aminosavát, ami akceptorként funkcionált *(14. ábra)*.



14. ábra: A FRET mérések során alkalmazott szelektív floureszcens jelölők az aktin monomer háromdimenziós szerkezetén (PDB kód: 3HBT).

FRET mérés során felvettük a csak donort tartalmazó minta fluoreszcencia intenzitását, valamint a duplán jelölt (FITC-IAEDANS) aktin intenzitását. A twinfilin az aktin monomer 1-es és 3-as alegysége közötti árokba köt, ahol az IAEDANS-jelölt cisztein 374-es aminosav található. Első lépésként meghatároztuk a twinfilin IAEDANS-aktinhoz való affinitását fluoreszcencia anizotrópia méréssel a korábban leírt módon az 5. egyenletet alkalmazva (*15. ábra*). Ebben az esetben a számolt affinitás érték 0,16 ± 0,1 μM, ami közelítőleg megegyezik a korábban ε-ATP-jelölt aktin monomerre meghatározott affinitás értékkel (0,12 ± 0,04 μM) (*9. ábra*), így kizárható, hogy a jelölés kedvezőtlenül befolyásolja az aktin-twinfilin komplex kialakulást.



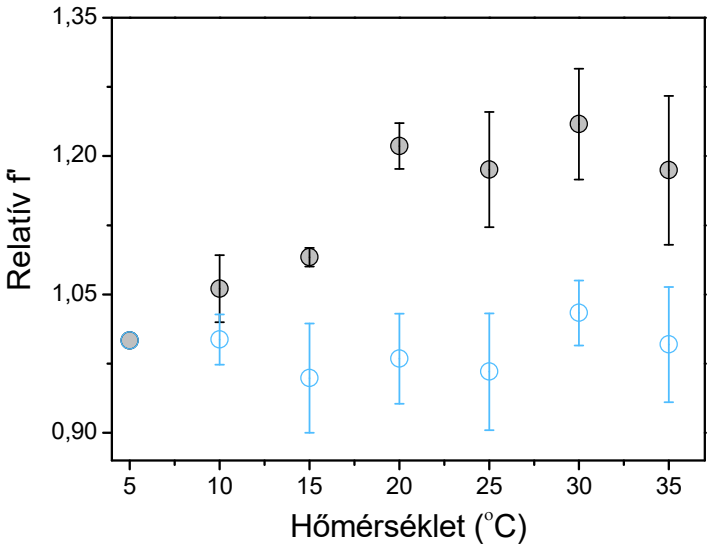
15. ábra: A twinfilin-1 affinitásának meghatározása IAEDANS-jelölt aktinhoz.
Az ábra az IAEDANS - G-aktin (2 μM) anizotrópiájának változását mutatja növekvő twinfilin koncentráció (0-10 μM) mellett. Az 5. egyenletből meghatározott K_D érték 0,16 ± 0,1 μM. A hibahatárok a legalább három független mérési pont alapján számolt standard szórást (SD) mutatják.

A mérések során a Mg^{2+} - G-aktin koncentrációja 2 μM, míg a twinfilin-1 - és 8 μM volt, a korábban kapott egyensúlyi állandót alkalmazva az aktin monomerek körülbelül 97%-a volt komplexben a mérések során [76]. A donor emissziós spektrumát 345 és 650 nm között rögzítettük és az energia transzfer számításához a 475 nm-es csúcshoz tartozó korrigált fluoreszcencia intenzitást vettük alapul a mérések során. A FRET hatásfokot a 8. egyenlet, majd a donor-akceptor távolságokat a 9. egyenlet felhasználásával határoztuk meg twinfilin hiányában és jelenlétében, ahol mindkét érték esetén enyhe csökkenés figyelhető meg a hőmérséklet növelésével *(2. táblázat)*. Megfigyeltük, hogy a twinfilin jelenléte nem okoz eltérést a donor-akceptor távolság értékekben *(2. táblázat)* [76]. A hőmérsékletfüggő FRET méréseket tovább analizálva kívántuk vizsgálni a twinfilin aktin monomer kis doménjének intramolekuláris flexibilitására gyakorolt hatását. Meghatároztunk egy speciális paramétert, az *f'*-t *(11. egyenlet)*, ami az alkalmazott fluorofórokat körülölelő fehérjemátrix flexibilitásáról ad információt [86,87]. A relatív flexibilási paraméter értéket ábrázolva a hőméréséklet függvényében egy növekvő tendencia figyelhető meg twinfilin hiányában *(16. ábra)*. Egy flexibilisebb fehérjerész esetén meredekebb összefüggést láthatunk egy rigidebb fehérjemátrixszal összehasonlítva. Twinfilin jelenlétében nincs szignifikáns különbség az

egyes hőmérsékleti értékeken (*16. ábra*), rámutatva arra, hogy a twinfilin aktinhoz való kötésével az aktin monomer kis doménjének fehérjemátrixa rigidebbé válik [76].

T (°C)	R_0 (nm)	E (%)		R (nm)	
		G-aktin	G-aktin + twinfilin	G-aktin	G-aktin + twinfilin
5	5,31	67,65 ± 2,48	71,42 ± 1,26	4,74 ± 0,06	4,6 ± 0,07
10	5,23	66,15 ± 1,99	70,30 ± 0,48	4,66 ± 0,06	4,56 ± 0,06
15	5,15	68,70 ± 1,32	66,44 ± 1,77	4,57 ± 0,05	4,58 ± 0,06
20	5,07	67,46 ± 1,87	66,73 ± 1,41	4,53 ± 0,05	4,53 ± 0,04
25	4,98	65,38 ± 0,64	66,07 ± 1,69	4,47 ± 0,03	4,47 ± 0,08
30	4,9	62,69 ± 0,55	63,92 ± 1,48	4,45 ± 0,07	4,46 ± 0,05
35	4,82	62,02 ± 1,58	61,6 ± 1,23	4,44 ± 0,05	4,39 ± 0,05

2. táblázat: Hőmérsékletfüggő FRET mérések eredményeinek összefoglaló táblázata. R_0 az IAEDANS-FITC párra vonatkoztatott Förster-féle kritikus távolság , E a százalékban kifejezett transzferhatásfok, R pedig a számolt donor-akceptor közötti távolságérték magnézium kötött aktin monomernek twinfilinnel alkotott komplexére vonatkoztatva.

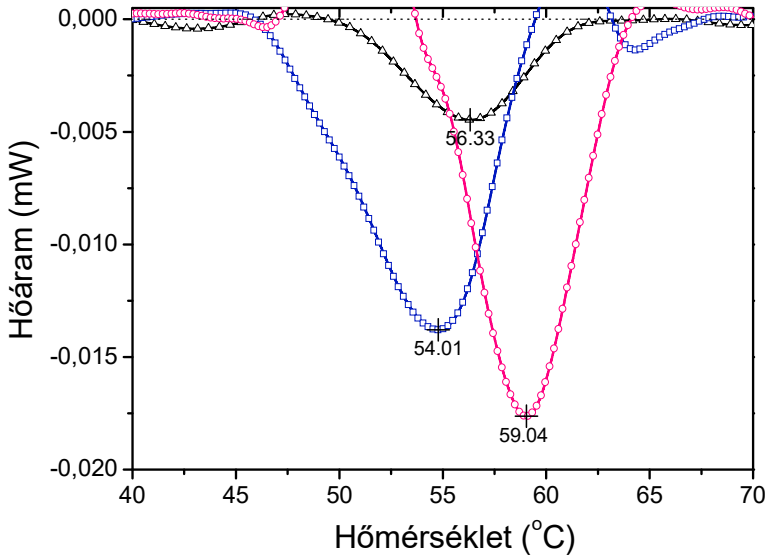


16. ábra: A Mg^{2+} - G-aktinhoz tartozó relatív f' hőmérsékletfüggése twinfilin hiányában (szürke) és jelenlétében (kék).

A FRET kísérletek során meghatároztuk a relatív f' értékét twinfilin hiányában és jelenlétében eltérő hőmérsékleteten (5 – 35 °C között). A mérések során az aktin koncentrációja 2 µM, a twinfiliné pedig 8 µM volt. A hibaértékek a standard deviációt mutatják legalább három, egymástól független mérésből származó adatokra vonatkoztatva.

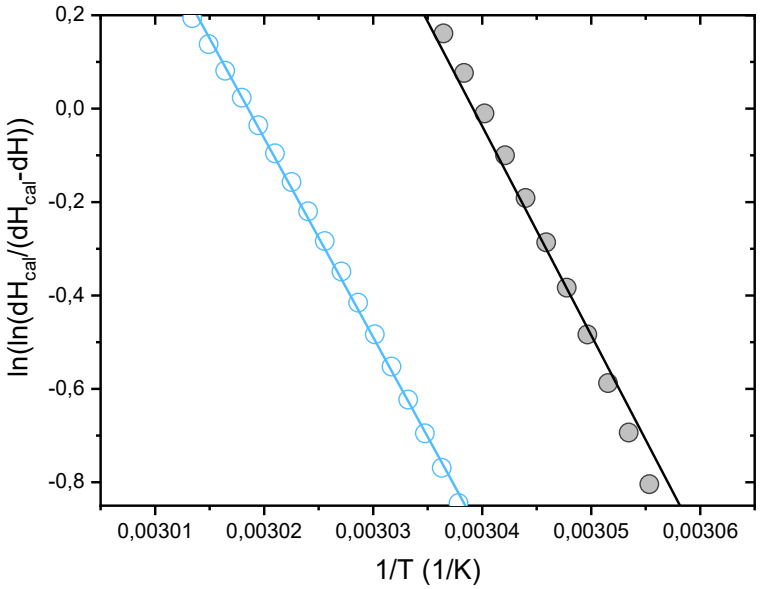
5.1.5. Az aktin monomer termodinamikai stabilitásának vizsgálata

A fluoreszcencia spektroszkópiás méréseink azt mutatták, hogy twinfilin-1 jelenlétében megváltozik az aktin monomer konformációja. A konformáció változás gyakran társul a fehérjék stabilitásának megváltozásával, ezért vizsgáltuk a G-aktin termodinamikai stabilitását twinfilin jelenlétében differenciális pásztázó kaloriméter alkalmazásával. Referenciaként MOPS tartalmú A puffert használtunk, melyet a mintacellától termikusan elkülönített cellába helyeztünk. Az alkalmazott aktin monomer koncentráció 23 µM volt és az olvadási hőmérsékletre 56,33 ° C-os értéket kaptunk, mely jól korrelál a korábban leírt eredményekkel [92,93]. 23 µM twinfilin esetén az olvadási hőmérséklet 54,01 ° C-nak adódott. A fehérje komplex vizsgálata során a twinfilint előinkubáltuk a G-aktinnal, jégen legalább 1 órán át *(17. ábra)*. A komplexképződés során 23 - 23 µM volt a koncentráció, ami azt jelenti, hogy az aktin monomerek 93%-a vett részt a komplex képződésben a korábbi kísérleteink során kapott K_D értéket alapul véve [76]. Aktin-twinfilin komplex esetében egy magasabb olvadási hőmérséklet (T_m=59 °C) volt megfigyelhető, egy termodinamikailag stabilabb komplex jött létre összehasonlítva a kapott értéket az aktinra mért olvadási hőmérséklettel [76,93].



17. ábra: A Ca^{2+} - G-aktin twinfilinnel alkotott komplexének hődenaturációs görbéje.
Az ábra a Ca^{2+} - G-aktin (fekete), a twinfilin-1 (sötétkék) és a Ca^{2+} - G-aktin twinfilin-1 komplex (pink) reprezentatív hődenaturációs görbéit mutatja. A fehérjék koncentrációja mindhárom esetben 23-23 µM volt.

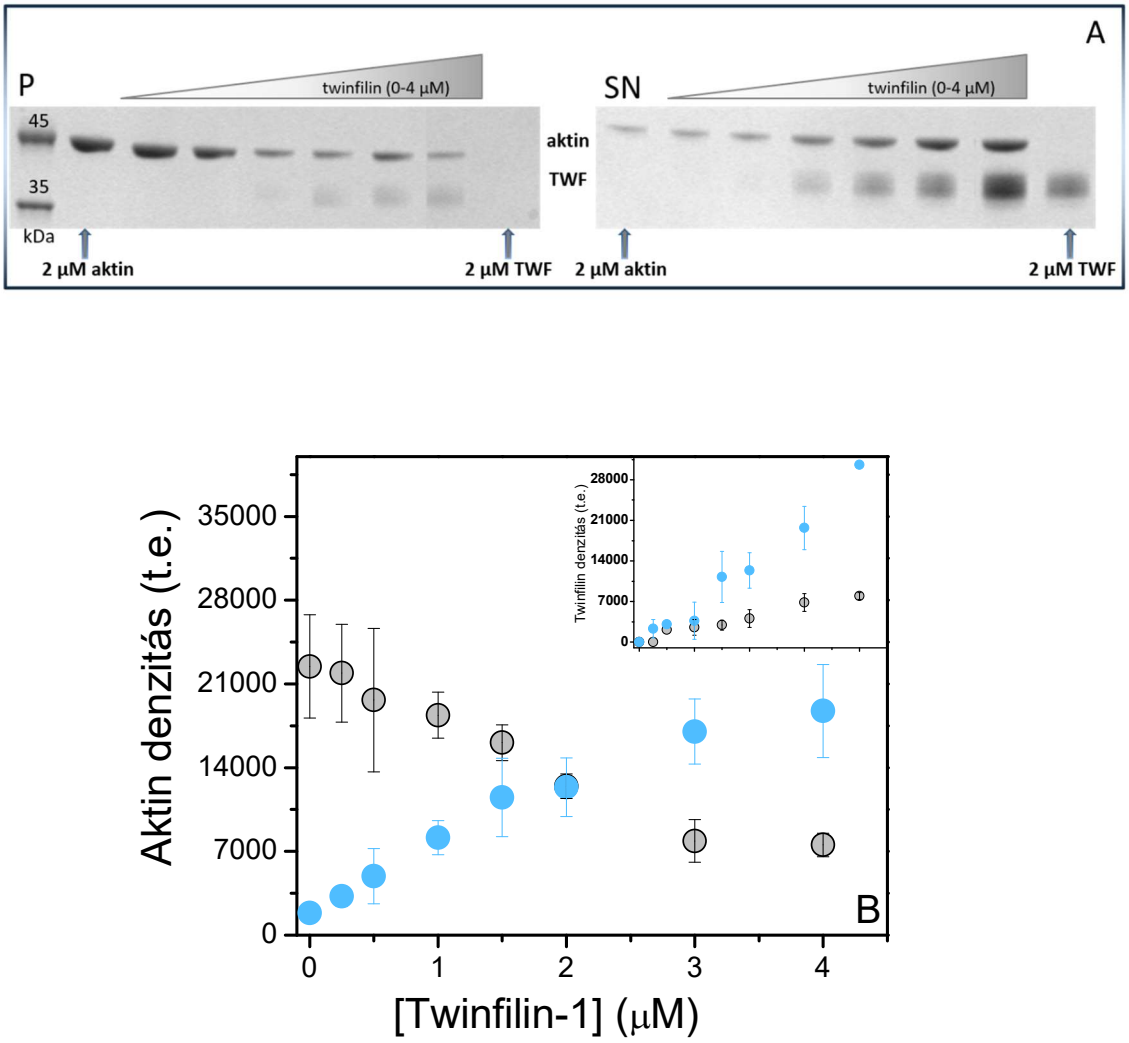
Részleteiben kívántuk vizsgálni, hogy az aktin kötő fehérje jelenléte milyen további változást okozhat az aktin monomer termodinamikai tulajdonságaiban. Ezért az olvadási hőmérséklet mellett meghatároztunk az aktin monomerre jellemző félértékszélességet ($T_{1/2}$) és aktiválási energia (E_A) értékét twinfilin hiányában és jelenlétében. A $T_{1/2}$ érték a hőáram görbe Gauss illesztéséhez tartozó félértékszélesség, ami az aktin molekula denaturációjának kooperativitásáról nyújt információt. Az aktiválási energia az a minimális energiamennyiség (energia gát), ami egy reakció lezajlásához/előrehaladásához szükséges. Meghatároztuk az aktin monomer hőáramgörbéjének félértékszélességét twinfilin hiányában és jelenlétében. A Ca-kötött aktin monomerre a $T_{1/2}$ érték 4,76 K-t adott, míg twinfilin jelenlétében ez az érték 5, 8 K-re emelkedett, ami 22%-os növekedésnek felel meg [94]. Ez a növekedés kisebb kooperativitásra utalhat. Az aktiválási energia meghatározásához a $\ln(\ln(dH_{kal}/dH_{kal}-dH))$ paramétert ábrázoltuk a Kelvinben kifejezett hőmérsékleti értékek reciprokának függvényében és az egyes adatpontokra illesztett egyenesek meredekségéből határoztuk meg a 9. egyenlet alapján. A twinfilin jelenléte az aktiválási energia értékében is változást okozott, 372 kJ mol^{-1}-ről 355 kJ mol^{-1}-ra csökkent. Az aktiválási energia értékében megfigyelt kismértékű (4,6%) csökkenés arra utalhat, hogy a twinfilin -G-aktin komplex esetében kevesebb energia szükséges a denaturáció elindulásához összehasonlítva az aktin monomerre kapott eredménnyel (*18. ábra*) [94].



18. ábra: Az aktin monomer aktivációs energiájának (E_A) meghatározása twinfilin -1 hiányában (szürke) és jelenlétében (világoskék).
Kalcium-kötött G-aktinra a számolt aktiválási energia 372 kJ mol^{-1}, ami twinfilin jelenlétében 355 kJ mol^{-}1-ra csökkent.

5.1.6. A twinfilin aktin kölcsönhatásának vizsgálata koszedimentációs kísérletekkel

Számos tanulmány igazolja, hogy a twinfilinnek szerepe van az aktin monomer és filamentum sejten belüli arányának a fenntartásában azáltal, hogy megköti a szabad aktin monomereket, emellett pedig képes az aktin filamentum gyorsan növő végéhez is kapcsolódni [58]. A szekvesztráló aktivitás, valamint a twinfilin F-aktin kölcsönhatás igazolására koszedimentációs kísérleteket végeztünk. A kísérletekben a 2 µM F-aktinhoz adtuk növekvő koncentrációban (0 - 4 µM) a twinfilint. Ultracentrifugálást követően a minták két részre oszthatók. Elkülöníthetünk egy üledék és egy felülúszó frakciót. Ezen kísérletnél az várható, hogy tömegüknél fogva az aktin filamentumok a pelletben, míg a monomerek a felülúszóban lesznek megtalálhatók. Az elkülönített üledék és a felülúszó fehérjetartalmát a *19/A. ábra* szemlélteti.



19. ábra: A) Aktin koszedimentációs esszé eredményeként kapott pelletek (P) és felülúszók (SN) SDS-PAGE gél felvétele. B) Az eredmények denzitometriás analízise. Twinfilin - 1 koncentrációjának növekedésével az aktin denzitása növekedett (kék), míg az üledék denzitása csökkent (szürke) a felülúszóban.

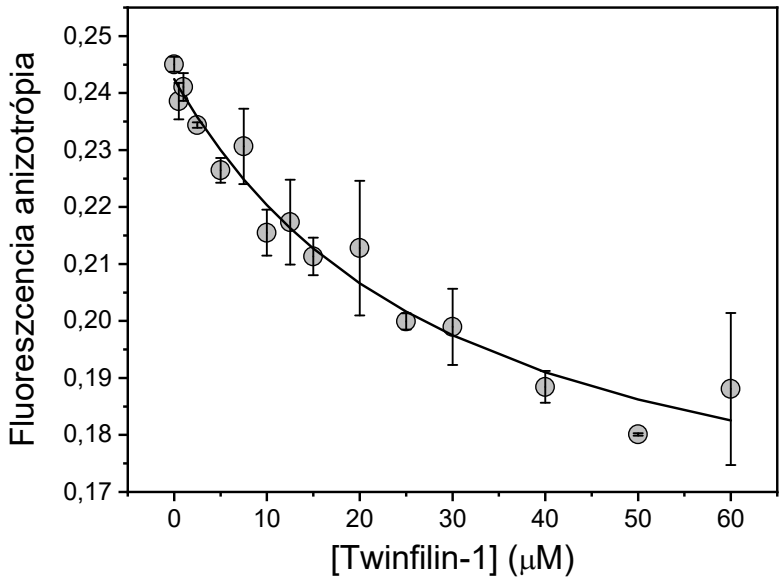
Megállapítottuk, hogy a twinfilin-1 koncentrációjának növekedésével az aktin denzitása növekedett a felülúszóban, amiből arra következtethetünk, hogy az aktin monomerek koncentrációja növekedett. Az üledéket elemezve elmondható, hogy az üledék denzitása a twinfilin koncentrációjának a növekedésével csökkent, tehát az F-aktin koncentrációja csökkenő tendenciát mutat. Magasabb twinfilin koncentrációt alkalmazva az aktin mellett megjelent a twinfilin is az üledékben, önmagában viszont nem pelletálódott (*19/B. ábra*). Az irodalmi adatokkal összhangban a szedimentációs vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a twinfilin-1 képes az aktint monomer formában tartani, valamint kölcsönhatásba tud lépni az aktin filamentummal is.

5.2. Egér twinfilin-1 kölcsönhatásának vizsgálata F-aktinnal

Korábbi tanulmányokból ismert, hogy a twinfilin nemcsak az aktin monomerhez, hanem az aktin filamentumhoz is képes kötni, melyet koszedimentációs kísérleteinkkel is alátámasztottunk. Leírták továbbá, hogy az élesztő twinfilin aktin filamentum daraboló funkcióval rendelkezik [58,60]. A fentieket alapul véve vizsgálni kívántuk az általunk létrehozott rekombináns egér twinfilin 1-es izoforma - aktin filamentum kölcsönhatás természetét. Doktori munkám során meghatároztuk a twinfilin F-aktinhoz való affinitását, vizsgáltuk az aktin filamentum depolimerizációját és termodinamikai tulajdonságait twinfilin - 1 jelenlétében.

5.2.1. Az egér twinfilin-1 aktin filamentumhoz való kötésének vizsgálata

„Steady-state" fluoreszcencia anizotrópia méréseket végeztünk, hogy vizsgáljuk a twinfilin aktin filamentum-kötését. A kísérletek során IAEDANS jelölt Mg^{2+} - F-aktint használtunk, melynek koncentrációja 5 μM volt és ehhez adtuk növekvő koncentrációban (0 - 60 μM) a twinfilint. Meghatároztuk a jelölt F- és - G-aktin anizotrópia értékét, előbbi 0,245 ± 0,001, utóbbi pedig 0,147 ± 0,003. Az F-aktin anizotrópia értékeiben egy csökkenő tendencia volt megfigyelhető a növekvő twinfilin koncentrációjától függően, 60 μM twinfilin mellett a mért anizotrópia érték 0,188 ± 0,005 értékre esett vissza (*20. ábra*). Az 5. egyenletet alkalmazva meghatároztuk az egyensúlyi disszociációs állandót az F-aktin twinfilin komplexre, ami 25,7 ± 8,5 μM lett. Korábbi tanulmányokat figyelembe véve megállapítható, hogy az anizotrópia értékben bekövetkező csökkenés a twinfilin szekvesztráló funkciójának tulajdonítható. Az sem kizárható, hogy a szekvesztrálás mellett a twinfilin esetleges filamentum daraboló hatása is közrejátszik a *„steady-state*" anizotrópia érték csökkenésében.

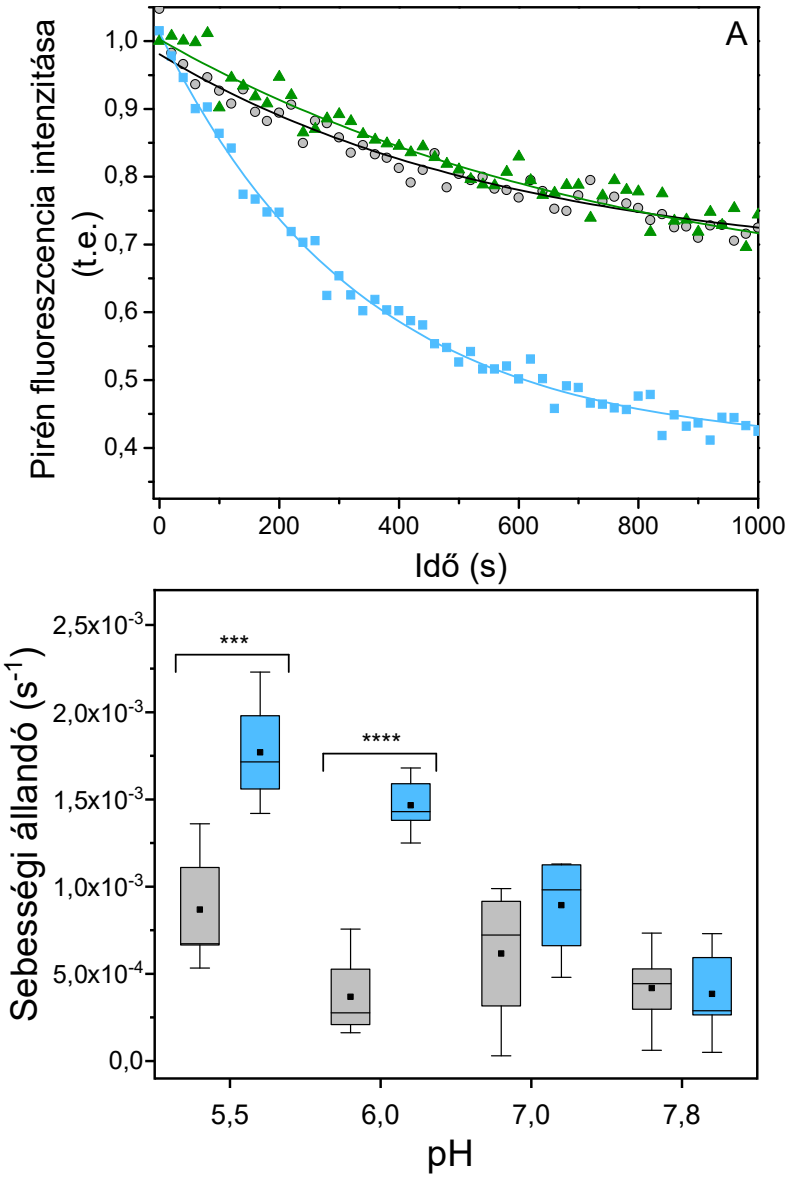


20. ábra: A twinfilin aktin filamentumhoz való kötésének vizsgálata.
Az ábra az IAEDANS-jelölt F-aktin (5 μM) fluoreszcencia anizotrópiáját mutatja növekvő twinfilin koncentráció (0-60 μM) mellett. Az 1. egyenletet alkalmazva az adatpontokra való illesztésből meghatároztuk a twinfilin – F-aktin kötést jellemző K_D értéket, ami 25,7 ± 8,5 μM. A hibaértékek a legalább három független mérési pont alapján számolt szórást (SD) mutatják.

5.2.2. A twinfilin-1 hatása az aktin filamentum depolimerizációjának dinamikájára

Hígítás indukálta depolimerizációs teszttel vizsgáltuk a twinfilin hatását a filamentum depolimerizációjára. Irodalomból ismert, hogy az élesztő twinfilin pH-függő aktin filamentum fragmentáló funkcióval *(„severing")* is rendelkezik [60], ezért pH függő hígítás-indukált depolimerizációs kísérleteket végeztünk az egér twinfilin esetleges „severing" funkciójának a felderítésére. Pirén jelölt aktin filamentumot használtunk, melynek koncentrációját 1 μM-ról 20 nM-ra hígítottuk, ezáltal az aktin koncentrációja a kritikus koncentráció alá csökkent, ezzel elősegítve a filamentum depolimerizációját. A kísérletben a pirén fluoreszcencia intenzitásának csökkenése arányos a csökkenő F-aktin koncentrációjával. A módszer előnye, hogy a vizsgált fehérje filamentum daraboló hatása teljes mértékben kizárható, ugyanis ilyen funkció esetén az aktin-kötő fehérje által megkötött és monomer formában tartott aktin monomerek nem befolyásolják a depolimerizációt. A mérések során a pirén jelölt aktin filamentumhoz adtuk a twinfilint és nyomon követtük a pirén fluoreszcencia emissziójának a változását. A pirén aktin jelölési aránya ~50% volt és 1,3 μM twinfilin volt jelen a reakció során, ami megközelítőleg 5% twinfilin-aktin komplexnek felel meg. A kísérleteket különböző pH értéken (5,0 - 7,8)

végeztük el, majd meghatároztuk a depolimerizáció sebességi állandóját a pirén fluoreszcencia intenzitás változására illesztett egyenes meredekségéből. A mérések során meghatároztuk a sebességi állandó értékét twinfilin hiányában, jelenlétében (1,3 μM), valamit latrunkulin A (5 μM) alkalmazása mellett is (*21/A. ábra*). Ez utóbbi képes az aktint monomer formában tartani, tehát egy szekvesztráló pozitív kontrolnak használtuk. Twinfilin hiányában a sebességi állandó értéke $8,7 \times 10^{-4} \pm 3,5 \times 10^{-4}$ s^{-1}-ról $4,2 \times 10^{-4} \pm 2,3 \times 10^{-4}$ s^{-1}-re csökkent. Twinfilin jelenlétében a növekvő pH-val az érték $17,7 \times 10^{-4} \pm 3,4 \times 10^{-4}$ -ról $3,8 \times 10^{-4} \pm 2,7 \times 10^{-4}$ s^{-1}-re csökkent (*21/B. ábra*). Aktin esetén a sebességi állandó értéke jelentősen nem változik, twinfilin jelenlétében egy csökkenő tendencia figyelhető meg a pH érték növelésével és pH=5,5 és 6,0 értékeken szignifikáns különbség ($p<0,05$) volt megfigyelhető, melyet kétmintás t-próbát alkalmazva határoztuk meg (*21/B. ábra*). Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az egér twinfilin-1 izoforma pH érzékeny aktin filamentum daraboló funkcióval rendelkezik.



21. ábra: A twinfilin hatása az aktin filamentum depolimerizációjára.

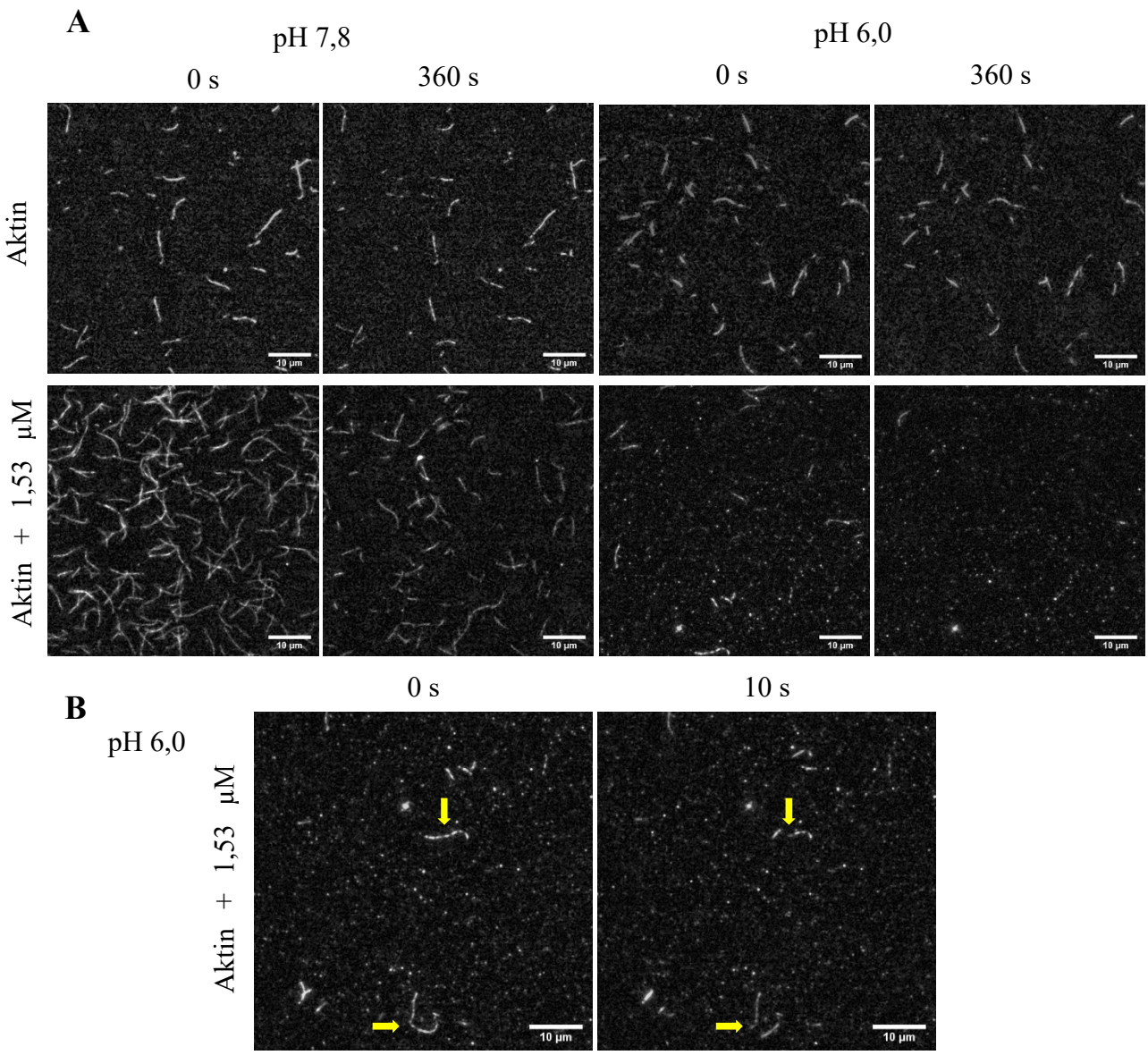
A) Hígítás indukálta F-aktin depolimerizációjának reprezentatív görbéi, aktin (1 µM→0,02 µM) partnerfehérje nélkül (szürke), 5 µM latrunkulin A (zöld) vagy 1,3 µM twinfilin (kék) jelenlétében (pH=6,0).

B) Az aktin depolimerizációját jellemző sebességi állandó pH-függése twinfilin hiányában (szürke) és jelenlétében (kék). A sebességi állandó értékét a depolimerizációs görbére illesztett egyenes meredekségéből határoztuk meg. Twinfilin jelenlétben az depolimerizáció pH-függést mutat, pH=5,5 és 6,0 értéken szignifikáns a különbség ($p<0,05$) a twinfilint is tartalmazó minta sebességi állandója és az aktinra meghatározott sebességi állandó értékek között.

5.2.3. A twinfilin-1 egyedi aktin filamentumokra gyakorolt hatásának vizsgálata

Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia alkalmazásával tettük láthatóvá a twinfilin valós idejű egyedi filamentumokra kifejtett hatását. Az előző részben tárgyalt depolimerizációs kísérletek azt mutatták, hogy a twinfilin hatása pH 6.0 értéknél érvényesül leginkább, így a mikroszkópos kísérletek pH 7,8 és 6,0 környezetben végeztük el. Első lépésként 0,5 µM 10%-ban Alexa488SE – G-aktint tartalmazó Mg^{2+} - G-aktint polimerizáltunk miozinnal bevont felszínen áramlási cellában 400 másodpercig. Ezt követően a szabad monomereket mosással eltávolítottuk, majd F-puffer hozzáadásával elősegítettük a depolimerizációt. Meghatároztuk az aktin filamentumok hosszát és a depolimerizáció sebességi állandóját twinfilin hiányában és 1,53 µM jelenlétében eltérő pH értéken [95]. Az átlagos filamentum hossz 3,7 ± 1,49 µm volt twinfilin hiányában és 3,48 ± 1,56 µm twinfilin jelenlétében pH 7,8-on. Az alacsonyabb pH értéken twinfilin jelenlétében az aktin filamentumok hossza 3,05 ± 1,27 µm-ről 1,69 ± 0,74 µm-re csökkent *(3. táblázat)*. Meghatároztuk továbbá a depolimerizáció sebességét is. A depolimerizáció sebessége twinfilin hiányában 6,41 ± 1,89 alegység/másodperc volt, míg twinfilin jelenlétében 7,24 ± 3,14 alegység/másodperc pH 7.8-on. Ezzel szemben pH 6,0 értéknél a twinfilin jelenlétének hatására a depolimerizáció sebessége 6,18 ± 1,49 alegység/másodpercről 9,29 ± 2,69 alegység/másodpercre növekedett. Megfigyeltük továbbá, hogy az alacsony pH értéknél az aktin filamentumok száma 47%-kal csökkent *(3. táblázat)* (*22. ábra*). A mikroszkópos vizsgálatok eredményeiből arra következtethetünk, hogy a twinfilin effektív fragmentáló hatással rendelkezik alacsony pH környezetben alátámasztva a fluoreszcencia spektroszkópiai kísérleteinket.

Mind a spektroszkópiai, mind a mikroszkópiai eredményeink azt mutatják, hogy a twinfilin alacsony pH értéken képes gyorsítani az aktin monomerek disszociációját az aktin filamentumról és/vagy feldarabolja azt. Ezen eredmények alapján arra következtethetünk, hogy olyan esetekben, mikor az intracelluláris pH érték jelentősen lecsökken, például bizonyos betegségek vagy stressz esetén, a twinfilinnek kulcsfontosságú szerepe lehet az aktin filamentum szétszerelődésében.



22. ábra: A TIRF mikroszkópos kísérleteink reprezentatív összehasonlító felvételei.

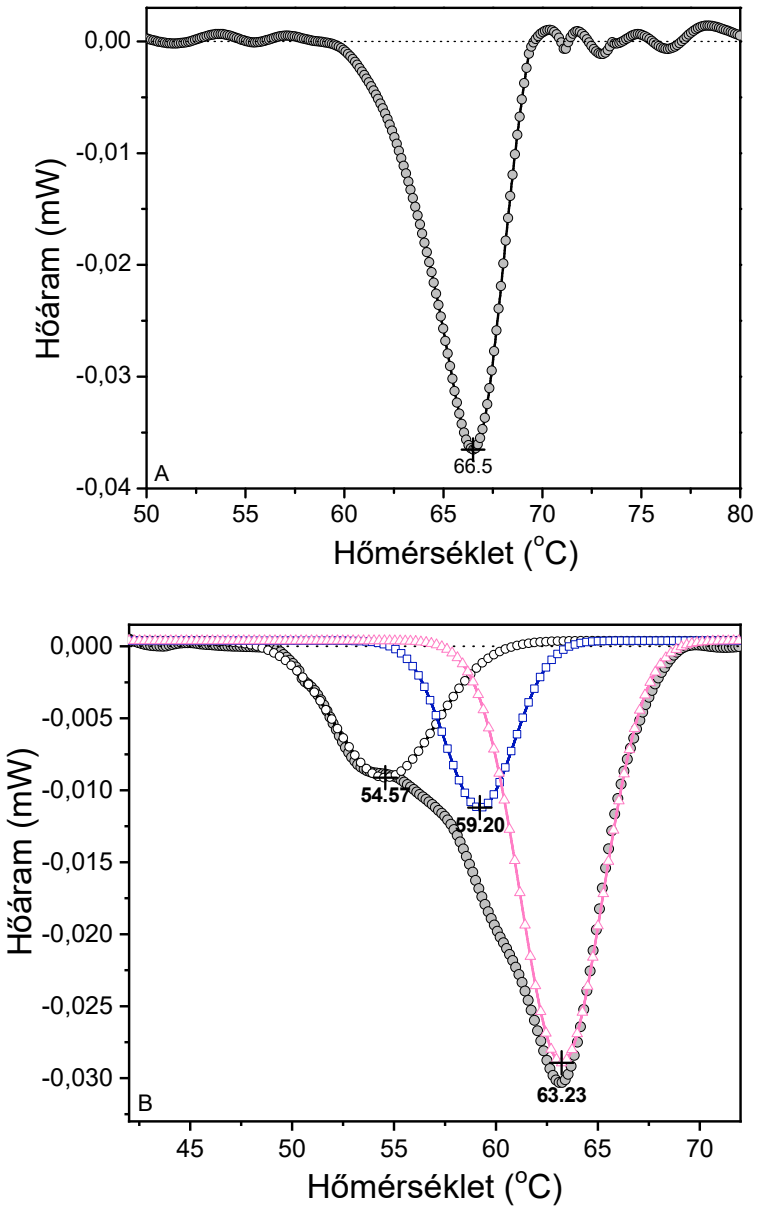
Az aktin depolimerizációját követtük nyomon twinfilin hiányában és jelenlétben eltérő pH körülmények mellett. A méretvonal 10 µm. A kísérletekben a fehérjék végkoncentrációja aktin esetén 0,5 µM (10% Alexa488SE jelölt aktin), twinfilin-1 esetén 1,53 µM. A depolimerizáció folyamatát 10 másodpercenként rögzítettük. A) Az aktin depolimerizációja twinfilin hiányában és jelenlétben eltérő pH értékeken (pH=7,8 vagy 6,0). B) Twinfilin-1 pH-függő filamentum daraboló hatásának vizualizálása TIRF mikroszkóppal.

	pH 6,0		pH 7,8	
	G-aktin	G-aktin + twinfilin-1	G-aktin	G-aktin + twinfilin-1
Filamentum hossz (µm)	3,05 ± 1,27	1,69 ± 0,74	3,7 ± 1,49	3,48± 1,56
Depolimerizáció sebessége (alegység/s)	6,18 ± 1,49	9,29 ± 2,69	6,41 ± 1,89	7,24 ± 3,14

3. *táblázat: TIRFM mérések összefoglaló táblázata.*

5.2.4. Az aktin filamentum termodinamikai stabilitásának vizsgálata

Korábbi méréseinket kiegészítve differenciális pásztázó kalorimétert alkalmazva vizsgáltuk a twinfilin hatását a Mg^{2+} - F-aktin termodinamikai stabilitására. A mérések során az F-aktin koncentrációja 46 µM volt, ami 2 mg/ml-nek felel meg. Először felvettük az F-aktin hődenaturációs görbéjét és meghatároztuk az olvadási hőmérsékletet, ami 66,5 °C-nak. Ez az irodalomban aktin filamentumra jellemző olvadási hőmérsékletnek megfelelő érték (*23/A. ábra*) [96,97]. Azonos körülmények között megismételtük a mérést 7,5 µM twinfilin jelenlétében. Itt egy komplex, három komponensből álló görbe volt megfigyelhető *(23/B. ábra*). Az egyes komponensekhez az alábbi olvadási hőmérsékleteket határoztuk meg: 54,6° C; 59,2° C és 63,23° C. A legalacsonyabb olvadási hőmérséklet az aktin monomernek feleltethető meg. A twinfilin aktin monomer komplexre korábban meghatároztunk egy 59,04° C-es olvadási hőmérsékletet, így a második érték ehhez a komplexhez tartozhat. A legmagasabb hőmérsékleti értéket korábbi méréseink során nem figyeltük meg. Feltételezzük, hogy a twinfilin jelenléte az aktin filamentumhoz tartozó olvadási hőmérséklet értékét csökkenti, így valószínűleg ez a twinfilin – F-aktin komplexhez tartozó érték. Tudott, hogy a twinfilin képes az F-aktinhoz kötni és a kapott eredményünk alapján elgondolható, hogy a twinfilin képes lazítani F-aktin molekulán belül a szomszédos protomerek közötti kölcsönhatást, aminek az alacsonyabb olvadási hőmérséklet tulajdonítható.



23. ábra: A Mg-kötött F-aktin valamint twinfilin-1-el alkotott komplexének reprezentatív hődenaturációs görbéi.

A) 46 µM (2 mg/ml) F-aktin koncentrációt alkalmazva az olvadási hőmérséklet 66,5 °C. B) Twinfilin-1 jelenlétben (7,5 µM) a B ábrán látható több komponensből álló eredményt kaptuk. Azonosítottunk egy 54,57 °C-os olvadási hőmérséklettel rendelkező komponenst, ami az aktin monomernek felel meg (fekete). A rendszerben megjelenik egy korábban azonosított komplex, a G-aktin - twinfilin, aminek a T_m értéke 59,2° C (sötétkék)*. A harmadik komponens esetén a meghatározott T_m érték 63,23 °C lett. Feltételezzük, hogy ez csúcs a twinfilin F-aktin komplexként azonosítható (rózsaszín).*

6. ÖSSZEFOGLALÁS ÉS KÖVETKEZTETÉS

A doktori munkám fő kérdése, hogy az emlős twinfilin-1 milyen szerepet tölthet be az aktin citoszkeleton dinamikájának szabályozásában. A twinfilinek evolúciósan konzerválódott aktin kötő fehérjék, melyek két kofilin-szerű alegységből épülnek fel. Képesek mind az aktin monomerhez, mind a filamentumhoz kötni. Annak ellenére, hogy nagyszámú tanulmány vizsgálta már az egyes twinfilin izoformák hatásait és biológiai szerepét *in vitro* és *in vivo* rendszerekben, az egyes funkciók hátterében álló molekuláris változások és kölcsönhatások máig nem tisztázódtak.

Az általam végzett kísérletes munka két egymással szorosan összefüggő egységre osztható. Vizsgáltam a twinfilin hatását az aktin monomer szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira, ezt követően pedig twinfilin F-aktin kölcsönhatásra fókuszáltam.

Főbb eredményeimet az alábbiakban ismertetem:

1) Sikeresen expresszáltuk az egér twinfilin-1 aktin kötő fehérjét *Escherichia coli* rendszerben, majd meghatároztuk az aktin monomerhez való affinitását fluoreszcencia anizotrópia kísérletekkel, ami 0,12 ± 0,04 μM lett.
2) Az ADF/kofilin fehérje családra jellemző, hogy befolyásolják az aktin nukleotid-kötő tulajdonságait, ezért gyorskinetikai módszerrel vizsgáltuk a twinfilin hatását a nukleotid kicserélődésére. A kísérletekben ε-ATP- jelölt aktint használtunk és meghatároztuk az elsőrendű disszociációs sebességi állandó értékét ($k_{látszólagos}$). Megállapítottuk, hogy twinfilin jelenlétében a $k_{látszólagos}$ lecsökkent. A sebességi állandó értékeket ábrázolva a twinfilin koncentrációjának függvényében az 1. egyenletet alkalmazva meghatároztuk a twinfilin G-aktinhoz való affinitását, ami 0,49 ± 0,27 μM-nak adódott.
3) Feltételezhetjük, hogy a nukleotid-kicserélődés gátlása együtt jár valamiféle konformációváltozással. Vizsgáltuk, hogy a twinfilin jelenléte milyen hatással van fluoreszcensen jelölt ATP hozzáférhetőségére a kioltó molekula (akrilamid) számára. Ezért fluoreszcencia kioltási kísérleteket végeztünk és meghatároztuk a Stern-Volmer állandó értékét twinfilin hiányában és jelenlétében. Megállapítottuk, hogy aktin esetén a K_{SV_S} 0,33 ± 0,11 M^{-1}, míg twinfilin jelenlétében ez az érték 0,05 ± 0,108 M^{-1}-re csökkent. Tehát a twinfilin hatására a flourofór hozzáférhetősége lecsökkent, amiből arra következtethetünk, hogy a twinfilin aktinhoz való kötődése egy zártabb konformációs állapotot hoz létre.

4) Förster-féle rezonancia energia traszfer méréseket végeztünk annak megállapítására, hogy a twinfilin jelenléte milyen hatással van az aktin monomer kis doménjének szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. Az aktin monomert IAEDANS és FITC fluorofórokkal jelöltük és a kísérletek elvégzése után kiszámoltuk az energiatranszfer hatásfokát twinfilin jelenléte nélkül és jelenlétében, valamint meghatároztuk a két fluorofór közötti távolságot. A twinfilin jelenléte lényegi eltérést nem okozott. Ezt követően hőmérsékletfüggő FRET méréseket végeztünk és meghatároztuk az f' paraméter értékét. Twinfilin jelenlétében nem figyeltünk meg szignifikáns különbséget az egyes hőmérsékleti értékeken, ami arra utalhat, hogy a twinfilin aktinhoz való kötésével az aktin monomer kis doménjének fehérjemátrixa rigidebbé válik.
5) Vizsgáltuk az aktin monomer termodinamikai tulajdonságait és a twinfilin hatását ezen paraméterekre. Hődenaturációs görbék segítségével meghatároztuk az aktin monomer olvadási hőmérsékletét twinfilin hiányában és jelenlétében. Az tapasztaltuk, hogy a twinfilin jelenléte egy magasabb olvadási hőmérsékletet eredményez, ami egy kompaktabb szerkezetre utal.
6) Koszedimentációs kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a twinfilin képes az aktint monomer formában tartani, ugyanakkor az F-aktinhoz is tud kötődni.
7) *„Steady-state"* fluoreszcencia anizotrópia kísérletekkel meghatároztuk a twinfilin F-aktinhoz való affinitását, ami 25,7 ± 8,5 μM lett.
8) Vizsgáltuk a twinfilin hatását a filamentum depolimerizációjára hígítás indukálta depolimerizációs tesztekkel. Leírtuk, hogy a depolimerizációt jellemző sebességi állandó aktin esetén jelentősen nem változik a pH érték változtatásával, míg twinfilin jelenlétében egy csökkenő tendencia figyelhető meg a pH érték növelésével. Bizonyítottuk továbbá, hogy a twinfilin pH-függő filamentum daraboló funkcióval rendelkezik.
9) Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia alkalmazásával tettük láthatóvá a twinfilin valós idejű egyedi filamentumokra kifejtett hatását. Meghatároztuk az aktin filamentumok hosszát és a depolimerizáció sebességi állandóját twinfilin hiányában és jelenlétében eltérő pH-n. Magasabb pH értéken a twinfilin jelenléte nem okozott jelentős eltérést. Míg pH 6,0 esetén az aktin filamentumok hossza lecsökkent twinfilin jelenlétében, addig a depolimerizáció sebessége növekedett. Sikerült vizualizálnunk a twinfilin filamentum fragmentáló aktivitását is.
10) Kiegészítő kísérletként vizsgáltuk a twinfilin hatását a Mg^{2+} - F-aktin termodinamikai stabilitására. Leírtuk, hogy a twinfilin F-aktinhoz való kötésének hatására az aktin

filamentum olvadási hőmérséklete lecsökkent, ezáltal feltételezhető, hogy az F-aktin egy lazább konformációs állapotba kerül twinfilin jelenlétében.

Az aktin egy nagyon sokoldalú fehérje, létfontosságú a sejtek számára, számos biológiai folyamat kulcsfehérjéje. Feltételezhető, hogy attól függően, hogy milyen funkciót kell ellátnia, képes adaptálódni a környezetéhez, a kötőpartnerhez és változtatja a lokalizációját és/vagy a szerkezetét. A mi kísérletes eredményeink azt támasztják alá, hogy a twinfilin jelenléte képes megváltoztatni mind az aktin monomer, mind az aktin filamentum szerkezeti és dinamikai tulajdonságait, ezen ismeretek pedig segítenek a sejten belül lejátszódó biológiai folyamatok megértéséhez.

7. IRODALOMJEGYZÉK

[1] H.H. Chowdhury, M.R. Popoff, R. Zorec, Actin cytoskeleton and exocytosis in rat melanotrophs, Pflugers Arch 439 (2000) R148-149.

[2] T.D. Pollard, Actin cytoskeleton. Missing link for intracellular bacterial motility?, Curr Biol 5 (1995) 837-840.

[3] T.D. Pollard, L. Blanchoin, R.D. Mullins, Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells, Annu Rev Biophys Biomol Struct 29 (2000) 545-576.

[4] F.B. Straub, Actin, Studies from the Institute of Medical Chemistry, Szeged 2 (1942) 15.

[5] I. Banga, [Results of muscle research], Orv Hetil 124 (1983) 2440-2443.

[6] B. Bugyi, M. Kellermayer, The discovery of actin: "to see what everyone else has seen, and to think what nobody has thought", J Muscle Res Cell Motil (2019).

[7] F.B. Straub, Muscle, Annu Rev Biochem 19 (1950) 371-388.

[8] G. Feuer, F. Molnar, et al., Studies on the composition and polymerization of actin, Hung Acta Physiol 1 (1948) 150-163.

[9] F.B. Straub, G. Feuer, [Adenosine triphosphate, the functional group of actin], Kiserl Orvostud 2 (1950) 141-151.

[10] S. Hatano, F. Oosawa, Isolation and characterization of plasmodium actin, Biochim Biophys Acta 127 (1966) 488-498.

[11] S. Brown, W. Levinson, J.A. Spudich, Cytoskeletal elements of chick embryo fibroblasts revealed by detergent extraction, J Supramol Struct 5 (1976) 119-130.

[12] K.C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard, W. Kabsch, Atomic model of the actin filament, Nature 347 (1990) 44-49.

[13] W. Kabsch, H.G. Mannherz, D. Suck, E.F. Pai, K.C. Holmes, Atomic structure of the actin:DNase I complex, Nature 347 (1990) 37-44.

[14] B. Qualmann, M.M. Kessels, Endocytosis and the cytoskeleton, Int Rev Cytol 220 (2002) 93-144.

[15] R. Dominguez, Actin-binding proteins--a unifying hypothesis, Trends Biochem Sci 29 (2004) 572-578.

[16] T.D. Pollard, J.A. Cooper, Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions, Annu Rev Biochem 55 (1986) 987-1035.

[17] B. Bugyi, Actin and actin binding proteins, in: M.S.Z. Kellermayer (Ed.), Muscle contraction: a Hungarian perspective, Semmelweis Publishers, Budapest, 2018.

[18] G. Hild, B. Bugyi, M. Nyitrai, Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function, Cytoskeleton (Hoboken) 67 (2010) 609-629.

[19] J. Hanson, J. Lowy, The Structure of Actin Filaments and the Origin of the Axial Periodicity in the I-Substance of Vertebrate Striated Muscle, Proc R Soc Lond B Biol Sci 160 (1964) 449-460.

[20] L. Blanchoin, T.D. Pollard, Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin, Biochemistry 41 (2002) 597-602.

[21] P. Sheterline, J. Clayton, J. Sparrow, Actin, Protein Profile 2 (1995) 1-103.

[22] T. Oda, M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maeda, A. Narita, The nature of the globular- to fibrous-actin transition, Nature 457 (2009) 441-445.

[23] P.S. Gurel, L.Y. Kim, P.V. Ruijgrok, T. Omabegho, Z. Bryant, G.M. Alushin, Cryo-EM structures reveal specialization at the myosin VI-actin interface and a mechanism of force sensitivity, Elife 6 (2017).

[24] https://www.wikidoc.org/index.php/Actin.

[25] B.J. Perrin, J.M. Ervasti, The actin gene family: function follows isoform, Cytoskeleton (Hoboken) 67 (2010) 630-634.

[26] L.N. Sparrow JC, Actin genetic diseases, in: C.D. dos Remedios CG (Ed.), Actin-Binding Proteins and Disease NY: Springer., 2008, pp. 16-36.

[27] R. Carballido-Lopez, The bacterial actin-like cytoskeleton, Microbiol Mol Biol Rev 70 (2006) 888-909.

[28] O. Esue, M. Cordero, D. Wirtz, Y. Tseng, The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin, J Biol Chem 280 (2005) 2628-2635.

[29] J.W. Shaevitz, Z. Gitai, The structure and function of bacterial actin homologs, Cold Spring Harb Perspect Biol 2 (2010) a000364.

[30] C.G. dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, N.J. Nosworthy, Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, Physiol Rev 83 (2003) 433-473.

[31] T.D. Pollard, Actin and Actin-Binding Proteins, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology (2016).

[32] T. Huff, C.S. Muller, A.M. Otto, R. Netzker, E. Hannappel, beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions, Int J Biochem Cell Biol 33 (2001) 205-220.

[33] W. Witke, The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes, Trends Cell Biol 14 (2004) 461-469.

[34] S. Palmgren, M. Vartiainen, P. Lappalainen, Twinfilin, a molecular mailman for actin monomers, J Cell Sci 115 (2002) 881-886.

[35] R.D. Mullins, J.A. Heuser, T.D. Pollard, The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments, Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 6181-6186.

[36] B. Qualmann, M.M. Kessels, New players in actin polymerization--WH2-domain-containing actin nucleators, Trends Cell Biol 19 (2009) 276-285.

[37] F. Li, H.N. Higgs, The mouse Formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition, Curr Biol 13 (2003) 1335-1340.

[38] M. Evangelista, D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone, A. Bretscher, Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast, Nat Cell Biol 4 (2002) 260-269.

[39] F. Rivero, T. Muramoto, A.K. Meyer, H. Urushihara, T.Q. Uyeda, C. Kitayama, A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa, BMC Genomics 6 (2005) 28.

[40] A.M. McGough, C.J. Staiger, J.K. Min, K.D. Simonetti, The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions, FEBS Lett 552 (2003) 75-81.

[41] L. Blanchoin, T.D. Pollard, S.E. Hitchcock-DeGregori, Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin, Curr Biol 11 (2001) 1300-1304.

[42] M. Edlund, M.A. Lotano, C.A. Otey, Dynamics of alpha-actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with alpha-actinin-green fluorescent protein, Cell Motil Cytoskeleton 48 (2001) 190-200.

[43] T. Svitkina, The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility, Cold Spring Harb Perspect Biol 10 (2018).

[44] A. Sebe-Pedros, X. Grau-Bove, T.A. Richards, I. Ruiz-Trillo, Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach, Genome Biol Evol 6 (2014) 290-305.

[45] R.F. Thompson, G.M. Langford, Myosin superfamily evolutionary history, Anat Rec 268 (2002) 276-289.

[46] D.D.R. Thomas, C. G., Molecular Interactions of Actin, Springer-Verlag,, Berlin Heidelberg, 2002.

[47] M.A. Geeves, R. Fedorov, D.J. Manstein, Molecular mechanism of actomyosin-based motility, Cell Mol Life Sci 62 (2005) 1462-1477.

[48] https://www.hashopp.com/product_detail.php?c=capping%20proteins%20actin%20filament%20disassembly&p=22.

[49] P. Lappalainen, M.M. Kessels, M.J. Cope, D.G. Drubin, The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module, Mol Biol Cell 9 (1998) 1951-1959.

[50] M. Poukkula, E. Kremneva, M. Serlachius, P. Lappalainen, Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics, Cytoskeleton (Hoboken) 68 (2011) 471-490.

[51] H. Hatanaka, K. Ogura, K. Moriyama, S. Ichikawa, I. Yahara, F. Inagaki, Tertiary structure of destrin and structural similarity between two actin-regulating protein families, Cell 85 (1996) 1047-1055.

[52] J.F. Beeler, B.K. Patel, M. Chedid, W.J. LaRochelle, Cloning and characterization of the mouse homolog of the human A6 gene, Gene 193 (1997) 31-37.

[53] J.F. Beeler, W.J. LaRochelle, M. Chedid, S.R. Tronick, S.A. Aaronson, Prokaryotic expression cloning of a novel human tyrosine kinase, Mol Cell Biol 14 (1994) 982-988.

[54] B.L. Goode, D.G. Drubin, P. Lappalainen, Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by twinfilin, a ubiquitous actin monomer-sequestering protein, J Cell Biol 142 (1998) 723-733.

[55] V.O. Paavilainen, E. Oksanen, A. Goldman, P. Lappalainen, Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin, J Cell Biol 182 (2008) 51-59.

[56] S. Palmgren, P.J. Ojala, M.A. Wear, J.A. Cooper, P. Lappalainen, Interactions with PIP2, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin, J Cell Biol 155 (2001) 251-260.

[57] M. Vartiainen, P.J. Ojala, P. Auvinen, J. Peranen, P. Lappalainen, Mouse A6/twinfilin is an actin monomer-binding protein that localizes to the regions of rapid actin dynamics, Mol Cell Biol 20 (2000) 1772-1783.

[58] E. Helfer, E.M. Nevalainen, P. Naumanen, S. Romero, D. Didry, D. Pantaloni, P. Lappalainen, M.F. Carlier, Mammalian twinfilin sequesters ADP-G-actin and caps filament barbed ends: implications in motility, EMBO J 25 (2006) 1184-1195.

[59] P.J. Ojala, V.O. Paavilainen, M.K. Vartiainen, R. Tuma, A.G. Weeds, P. Lappalainen, The two ADF-H domains of twinfilin play functionally distinct roles in interactions with actin monomers, Mol Biol Cell 13 (2002) 3811-3821.

[60] J.B. Moseley, K. Okada, H.I. Balcer, D.R. Kovar, T.D. Pollard, B.L. Goode, Twinfilin is an actin-filament-severing protein and promotes rapid turnover of actin structures in vivo, J Cell Sci 119 (2006) 1547-1557.

[61] S. Falck, V.O. Paavilainen, M.A. Wear, J.G. Grossmann, J.A. Cooper, P. Lappalainen, Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction, EMBO J 23 (2004) 3010-3019.

[62] A.B. Johnston, D.M. Hilton, P. McConnell, B. Johnson, M.T. Harris, A. Simone, G.K. Amarasinghe, J.A. Cooper, B.L. Goode, A novel mode of capping protein-regulation by twinfilin, Elife 7 (2018).

[63] M. Hakala, M. Kalimeri, G. Enkavi, I. Vattulainen, P. Lappalainen, Molecular mechanism for inhibition of twinfilin by phosphoinositides, J Biol Chem 293 (2018) 4818-4829.

[64] M.K. Vartiainen, E.M. Sarkkinen, T. Matilainen, M. Salminen, P. Lappalainen, Mammals have two twinfilin isoforms whose subcellular localizations and tissue distributions are differentially regulated, J Biol Chem 278 (2003) 34347-34355.

[65] D.M. Hilton, R.M. Aguilar, A.B. Johnston, B.L. Goode, Species-Specific Functions of Twinfilin in Actin Filament Depolymerization, J Mol Biol 430 (2018) 3323-3336.

[66] A.K. Wolven, L.D. Belmont, N.M. Mahoney, S.C. Almo, D.G. Drubin, In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin, J Cell Biol 150 (2000) 895-904.

[67] G. Wahlstrom, M. Vartiainen, L. Yamamoto, P.K. Mattila, P. Lappalainen, T.I. Heino, Twinfilin is required for actin-dependent developmental processes in Drosophila, J Cell Biol 155 (2001) 787-796.

[68] J. Bockhorn, R. Dalton, C. Nwachukwu, S. Huang, A. Prat, K. Yee, Y.F. Chang, D. Huo, Y. Wen, K.E. Swanson, T. Qiu, J. Lu, S.Y. Park, M.E. Dolan, C.M. Perou, O.I. Olopade, M.F. Clarke, G.L. Greene, H. Liu, MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11, Nat Commun 4 (2013) 1393.

[69] Q. Li, X.W. Song, J. Zou, G.K. Wang, E. Kremneva, X.Q. Li, N. Zhu, T. Sun, P. Lappalainen, W.J. Yuan, Y.W. Qin, Q. Jing, Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy, J Cell Sci 123 (2010) 2444-2452.

[70] C.E. Meacham, E.E. Ho, E. Dubrovsky, F.B. Gertler, M.T. Hemann, In vivo RNAi screening identifies regulators of actin dynamics as key determinants of lymphoma progression, Nat Genet 41 (2009) 1133-1137.

[71] J.J. Zhao, D.G. Sun, J. Wang, S.R. Liu, C.Y. Zhang, M.X. Zhu, X. Ma, Retinoic acid downregulates microRNAs to induce abnormal development of spinal cord in spina bifida rat model, Childs Nerv Syst 24 (2008) 485-492.

[72] A.K. Rzadzinska, E.M. Nevalainen, H.M. Prosser, P. Lappalainen, K.P. Steel, MyosinVIIa interacts with Twinfilin-2 at the tips of mechanosensory stereocilia in the inner ear, PLoS One 4 (2009) e7097.

[73] J.A. Spudich, S. Watt, The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, J Biol Chem 246 (1971) 4866-4871.

[74] M. Mossakowska, J. Belagyi, H. Strzelecka-Golaszewska, An EPR study of the rotational dynamics of actins from striated and smooth muscle and their complexes with heavy meromyosin, Eur J Biochem 175 (1988) 557-564.

[75] M. Elzinga, J.H. Collins, W.M. Kuehl, R.S. Adelstein, Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle, Proc Natl Acad Sci U S A 70 (1973) 2687-2691.

[76] V. Takacs-Kollar, M. Nyitrai, G. Hild, The effect of mouse twinfilin-1 on the structure and dynamics of monomeric actin, Biochim Biophys Acta 1864 (2016) 840-846.

[77] I. Perelroizen, M.F. Carlier, D. Pantaloni, Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin, J Biol Chem 270 (1995) 1501-1508.

[78] M. Miki, C.G. dos Remedios, J.A. Barden, Spatial relationship between the nucleotide-binding site, Lys-61 and Cys-374 in actin and a conformational change induced by myosin subfragment-1 binding, Eur J Biochem 168 (1987) 339-345.

[79] L.D. Burtnick, Modification of actin with fluorescein isothiocyanate, Biochim Biophys Acta 791 (1984) 57-62.

[80] A.H. Criddle, M.A. Geeves, T. Jeffries, The Use of Actin Labeled with N-(1-Pyrenyl)Iodoacetamide to Study the Interaction of Actin with Myosin Subfragments and Troponin Tropomyosin, Biochemical Journal 232 (1985) 343-349.

[81] Z. Ujfalusi, M. Kovacs, N.T. Nagy, S. Barko, G. Hild, A. Lukacs, M. Nyitrai, B. Bugyi, Myosin and tropomyosin stabilize the conformation of formin-nucleated actin filaments, J Biol Chem 287 (2012) 31894-31904.

[82] R. Kardos, K. Pozsonyi, E. Nevalainen, P. Lappalainen, M. Nyitrai, G. Hild, The effects of ADF/cofilin and profilin on the conformation of the ATP-binding cleft of monomeric actin, Biophys J 96 (2009) 2335-2343.

[83] L. Czimbalek, V. Kollar, R. Kardos, D. Lorinczy, M. Nyitrai, G. Hild, The effect of toxofilin on the structure and dynamics of monomeric actin, FEBS Lett 589 (2015) 3085-3089.

[84] J.R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Springer ed., 2006.

[85] P. Wu, L. Brand, Resonance energy transfer: methods and applications, Anal Biochem 218 (1994) 1-13.

[86] M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos, B. Somogyi, Effect of Ca2+-Mg2+ exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin, Biophys J 74 (1998) 2474-2481.

[87] B. Somogyi, J. Matko, S. Papp, J. Hevessy, G.R. Welch, S. Damjanovich, Forster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix, Biochemistry 23 (1984) 3403-3411.

[88] S. Barko, B. Bugyi, M.F. Carlier, R. Gombos, T. Matusek, J. Mihaly, M. Nyitrai, Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of Drosophila DAAM, J Biol Chem 285 (2010) 13154-13169.

[89] J.M. Sanchez-Ruiz, J.L. Lopez-Lacomba, M. Cortijo, P.L. Mateo, Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin, Biochemistry 27 (1988) 1648-1652.

[90] E.H.C.c.o.p. Lumry R, Conformation changes of proteins., J Phys Chem. (1954) 58:110–120.

[91] B. Valeur, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001.

[92] A.V. Pivovarova, N.A. Chebotareva, E.V. Kremneva, P. Lappalainen, D.I. Levitsky, Effects of actin-binding proteins on the thermal stability of monomeric actin, Biochemistry 52 (2013) 152-160.

[93] J. Orban, D. Lorinczy, M. Nyitrai, G. Hild, Nucleotide dependent differences between the alpha-skeletal and alpha-cardiac actin isoforms, Biochem Biophys Res Commun 368 (2008) 696-702.

[94] M.N. Veronika Takács-Kollár, Dénes Lőrinczy, Gábor Hild, Resolving the similarities and differences between the effect of structurally different actin-binding proteins on the thermodynamic properties of G-actin, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (2017) 127:1261–1266.

[95] V. Takacs-Kollar, D. Lorinczy, M. Nyitrai, G. Hild, Spectroscopic characterization of the effect of mouse twinfilin-1 on actin filaments at different pH values, J Photochem Photobiol B 164 (2016) 276-282.

[96] R. Kardos, A. Vig, J. Orban, G. Hild, M. Nyitrai, D. Lorinczy, The effect of jasplakinolide on the thermodynamic properties of ADP.BeF(x) bound actin filaments, Thermochim Acta 463 (2007) 77-80.

[97] K.P. J. Orbán, K. Szarka, S. Barkó, E. Bódis, D. Lőrinczy, Thermal characterisation of actin filaments prepared from ADP-actin monomers, J. Therm. Anal. Calorim. 84 (2006) (2006) 619–623 613.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Veronika Takács-Kollár, Miklós Nyitrai, Dénes Lőrinczy, Gábor Hild: Resolving the similarities and differen-ces between the effect of structurally different actin binding proteins on the thermodynamic properties of G-actin. JOURNAL OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY 127: pp. 1261-1266. (2017)
Impakt faktor: 2,209
Nyilvános idézők összesen: 1, Független: -,

Veronika Takács-Kollár, Dénes Lőrinczy, Miklós Nyitrai, Gábor Hild: Spectroscopic characterization of the effect of mouse twinfilin-1 on actin filaments at different pH values. JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B-BIOLOGY 164 pp. 276 - 282., 7 p. (2016)
Impakt faktor: 2,673
Nyilvános idézők összesen: -, Független:-

Veronika Takács-Kollár, Miklós Nyitrai, Gábor Hild: The effect of mouse twinfilin-1 on the structure and dynamics of monomeric actin. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-PROTEINS AND PROTEOMICS 1864 : 7 pp. 840-846., 7 p. (2016)
Impakt faktor: 2,773
Nyilvános idézők összesen: 5, Független: 2

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

Kollár Veronika, Kardos Roland, Nyitrai Miklós és Hild Gábor: A twinfilin-1 hatása az aktin szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. II. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia, Pécs, 2013. május 15-17.

Veronika Kollár, Roland Kardos, Miklós Nyitrai and Gábor Hild: The effect of mouse Twinfilin-1 on the structure and dynamics of actin
27th European Cytoskeletal Forum Meeting, Pécs, Hungary, 3-7 November 2012.

Veronika Kollár, Roland Kardos, Pekka Lappalainen and Gábor Hild: The effects of mouse twinfilin 1 on the structure and dynamics of monomeric actin. 8th European Biophysics Congress, Satellite Conference: Intracellular Fluorescence Spectroscopy, Pécs, Hungary, 20-22 August 2011. Winner of poster competition.

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK

Veronika Kollár, Roland Kardos, Pekka Lappalainen Miklós Nyitrai and Gábor Hild**:** The effects of mouse Twinfilin-1 on the structure and dynamics of actin. 28th European Cytoskeletal Forum Meeting, Fribourg, Switzerland, 1-5 September 2013

Kollár Veronika, Kardos Roland, Nyitrai Miklós és Hild Gábor: Twinfilin-1 hatása az aktin szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. A Magyar Biofizikai Társaság XXIV. Kongresszusa, Veszprém 2013. augusztus 27-30.

Veronika Kollár, Roland Kardos, Pekka Lappalainen Miklós Nyitrai and Gábor Hild**:** The effect of mouse Twinfilin-1 on the structure and dynamics of actin. 27th European Cytoskeletal Forum Meeting, Pécs, Hungary, 3-7. November 2012

Veronika Kollár, Roland Kardos, Pekka Lappalainen Miklós Nyitrai and Gábor Hild: The effects of mouse twinfilin 1 on the structure and dynamics of monomeric actin. Regional Biophysics Conference 2012, Kladovo, Serbia, 3-7 September 2012.

Veronika Kollár, Roland Kardos, Pekka Lappalainen and Gábor Hild: The effects of mouse twinfilin 1 on the structure and dynamics of monomeric actin. 8th European Biophysics Congress, Budapest, Hungary, 23-27 August 2011.

Veronika Kollár, Roland Kardos, Pekka Lappalainen and Gábor Hild: The effects of mouse twinfilin 1 on the structure and dynamics of monomeric actin. 8th European Biophysics Congress Satellite Conference, Intracellular Fluorescence Spectroscopy, 20-22 August 2011, Pécs, Hungary

Kokas Ágnes, Tóth Mónika Ágnes, Türmer Katalin, **Kollár Veronika**, Kardos Roland, Nyitrai Miklós, Hild Gábor: Twinfilin-1 hatása az aktin szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira 41. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2011. május 17-20.

AZ ÉRTEKEZÉSBHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

Veronika Takács-Kollár, Miklós Nyitrai, Dénes Lőrinczy, Gábor Hild: Calorimetric characterisation of the toxofilin–G-actin complex. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (1388-6150 1572-8943): 131 2 pp 1307-1311 (2018)
Impakt faktor: 2,471
Nyilvános idézők összesen: -, Független: -,

Lívia Czimbalek**, Veronika Kollár,** Roland Kardos, Dénes Lőrinczy, Miklós Nyitrai and Gábor Hild: The effect of toxofilin on the structure and dynamics of monomeric actin. FEBS LETTERS 589 : 20 pp. 3085-3089. , 5 p. (2015)
Impakt faktor: 3,519
Nyilvános idézők összesen:5, Független: 0,

Kollar, V ; Szatmari, D ; Grama, L ; Kellermayer, MSZ: Dynamic Strength of Titin's Z-Disk End. JOURNAL OF BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY 2010: 838530, 8 p. (2010)
Impakt faktor: 1,23
Nyilvános idézők összesen: 4, Független: 0,

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK

Lívia Czimbalek, **Veronika Kollár**, Roland Kardos, Gábor Hild: The effect of Toxofilin on the structure of monomeric actin. 27th European Cytoskeletal Forum Meeting, Pécs, Hungary, 3-7 November 2012."

Roland Kardos, Balázs Mester, **Veronika Kollár**, Miklós Nyitrai, Gábor Hild: Effect of cofilin on the polymerization of actin. 27th European Cytoskeletal Forum Meeting, Pécs, Hungary, 3-7 November 2012.

Veronika Kollár, Lívia Czimbalek, Beáta Bugyi, Miklós Nyitrai and Gábor Hild: The effect of Toxofilin on the structure of monomeric actin. 55th Annual Meeting, USA, Maryland, Baltimore, March 5-9, 2011.

Veronika kollár, Lívia Czimbalek, Gábor Hild, Miklós Nyitrai: The effect of toxofilin on the structure of monomeric actin. Regional Biophysics Conference, Primoŝten, Croatia, 15-18 September 2010.

Czimbalek Lívia, **Kollár Veronika**, Nyitrai Miklós, Hild Gábor: A toxofilin hatása az aktin monomerek szerkezetére. 40. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2010. május 18-21.

Kollár Veronika, Murvai Ünige, Szatmári Dávid, Kiss Balázs, Grama László és Kellermayer Miklós: A titin Z1Z2 és Z1Z2-telethonin komplex nanomechanikai vizsgálata. A Magyar Biofizikai Társaság XXIII. Kongresszusa, Pécs 2009. augusztus 23-26.

Kollár Veronika, Murvai Ünige, Szatmári Dávid, Kiss Balázs, Grama László és Kellermayer Miklós: Titin Z-lemez horgonyzó komplex nanomechanikai vizsgálata. 39. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2009. május 19-22.

Dávid Szatmári, Tamás Huber, Viktória Németh, **Veronika Kollár**, László Grama and Miklós Kellermayer: Dissecting the mechanosensor functions of titin. 9th Symposium on Instrumental Analysis, Pécs, Hungary, June 29 - July 2, 2008.

Szatmári Dávid, Huber Tamás, Németh Viktória, **Kollár Veronika**, Grama László és Kellermayer Miklós: A titin mechanoszenzor tulajdonságainak vizsgálata. 38. Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, Magyarország, 2008. május 20-23.

Kollár Veronika, Németh Viktória, Jakab Ferenc, Varga Levente, Nyúl Zoltán, Douglas K. Mitchell, David O. Matson, Szűcs György: Humán norovírusok által okozott fertőzések jellemzése, epidemiológiai, klinikai és molekuláris biológiai vonatkozásban Magyarországon. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2006. évi Nagy gyűlése Keszthely, Magyarország, 2006. október 18-20.

Összesített impakt faktor:14,875

Biochimica et Biophysica Acta 1864 (2016) 840–846

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap

The effect of mouse twinfilin-1 on the structure and dynamics of monomeric actin

Veronika Takács-Kollár [a], Miklós Nyitrai [a,b,c], Gábor Hild [a,d,*]

[a] University of Pécs, Medical School, Department of Biophysics, Pécs, Szigeti Str. 12, H-7624, Hungary
[b] Szentágothai Research Center, Pécs, Ifjúság Str. 34, H-7624, Hungary
[c] MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Pécs, Szigeti Str. 12, H-7624, Hungary
[d] University of Pécs, Medical School, Department of Radiology, Pécs, Ifjúság Str. 13. H-7624, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 November 2015
Received in revised form 2 April 2016
Accepted 7 April 2016
Available online 12 April 2016

Keywords:
Actin
Mouse twinfilin-1
Fluorescence spectroscopy
Differential scanning calorimetry

ABSTRACT

The effect of twinfilin-1 on the structure and dynamics of monomeric actin was investigated with fluorescence spectroscopy and differential scanning calorimetry experiments. Fluorescence anisotropy measurements proved that G-actin and twinfilin-1 could form a complex. Due to the formation of the complexes the dissociation of the nucleotide slowed down from the nucleotide-binding pocket of actin. Fluorescence quenching experiments showed that the accessibility of the actin bound ε-ATP decreased in the presence of twinfilin-1. Temperature dependent fluorescence resonance energy transfer and differential scanning calorimetry experiments revealed that the protein matrix of actin becomes more rigid and more heat resistant in the presence of twinfilin-1. The results suggest that the nucleotide binding cleft shifted into a more closed and stable conformational state of actin in the presence of twinfilin-1.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The actin cytoskeleton of eukaryotic cells plays a key role in many processes like cell motility and cytokinesis [1]. The structure and dynamics of the cytoskeleton are regulated by a large number of proteins that interact with monomeric (G) actin and/or filamentous (F) actin. Several actin binding proteins can directly regulate the nucleation and the elongation of actin filaments. The members of the ADF/cofilin family can regulate the turnover of actin in many ways [2]. This family consists of three phylogenetically distinct classes: the ADF/cofilins, the drebrin/Abp1s and the twinfilins [3]. Based on sequential analysis the residues that have been indicated to be essential for actin binding in the ADF/cofilin family are also well conserved in other classes, which led to the conclusion that all the ADF-H domain containing proteins can interact with actin. ADF/cofilins can bind both G- and F-actins, drebrin/Apb1s seems to bind to filamentous actin, and twinfilins are capable to bind to the actin monomers and filaments as well [3–5].

Twinfilin (TWF) was described first by Goode and co-workers in budding yeast in 1998 [2]. They also identified human, mouse and *Caenorhabditis elegans* homologues of twinfilin from their sequence database. This result further supported that twinfilins are evolutionarily conserved actin binding proteins [3]. Twinfilins are ~40 kDa proteins composed of two ADF-homologue domains connected by a short linker region plus a C-terminal tail.

The crystal structure of twinfilin's C-terminal ADF-H domain in complex with an actin monomer was presented in 2008 [6]. This domain binds between actin subdomains 1 and 3 through an interface that is conserved among ADF-H domain proteins. Based on this structure a mechanism is suggested by which ADF/cofilin and twinfilin inhibit the nucleotide exchange on actin monomer and a model is presented for how ADF/cofilin induces filament depolymerisation by weakening intrafilament interactions [6].

Twinfilins have a crucial role in the polymerisation/depolymerisation cycle of actin. They can effectively inhibit actin filament assembly by hindering the nucleotide exchange on actin monomers [2,7]. Yeast twinfilin can bind and sever actin filaments to accelerate filament disassembly under in vitro conditions and promotes rapid turnover of actin structures in vivo [8]. It was reported recently that the depolymerisation at the ends of the actin filament can be catalysed by twinfilin and Srv2/CAP [9]. Although in bulk assays twinfilin-1 had no effect on the disassembly rate at the pointed end of actin filament, in time-lapse TIRF microscopy experiments twinfilin alone or in the presence of Srv2 protein could induce rapid depolymerisation from the ends of the filaments with no visible severing [9]. TWF-1 and the N-terminal region of Srv2 increased the speed of the actin filament disassembly ~17 times at the pointed ends and ~3 times at the barbed ends. Furthermore, in the recent work it was revealed that twinfilin-1 has at least three distinct domains which

* Corresponding author at: Department of Biophysics (University of Pécs, Medical School, Pécs, Szigeti Str. 12, H-7624, Hungary) and the Department of Radiology (University of Pécs, Medical School, Pécs, Ifjúság Str. 13. H-7624, Hungary).
E-mail address: gabor.hild@aok.pte.hu (G. Hild).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.04.002
1570-9639/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

are required for the acceleration of pointed-end depolymerisation [9]. According to latest investigation with electron microscopy analysis the twinfilin-1 decorated filaments could be transformed into a supercoiled structure [9].

Like ADF/cofilin, twinfilin binds ADP-G-actin ($K_D = 0.05$ μM) with ~10-fold higher affinity than ATP-G-actin ($K_D = 0.47$ μM) under physiological ionic conditions [10]. Twinfilins can form a 1:1 complex with G-actin despite they have two potential actin binding sites (ADF-H domains) [2,11,12]. The two ADF-H domains of mammalian twinfilins interact independently with G-actin in a competitive manner. The C-terminal domain of twinfilin has a similar affinity for G-actin as the full-length protein and approximately 10 fold higher affinity, than the N-terminal domain alone. The C-terminal ADF-H domain might be responsible for the initial monomer binding, whereas the N-terminal ADF-H domain can mediate filament severing [8]. The linker and the tail region do not take part in the actin binding [10].

Twinfilin also interacts with the capping protein (CP) via its conserved C-terminal tail region. Capping protein is a heterodimeric regulatory protein and it binds the barbed end of the actin filaments. The interaction between TWF and CP does not affect the actin binding and capping activity, however, this interaction is essential for correct subcellular localization and function of twinfilin in yeast in living cells [12,13].

Despite comprehensive studies the exact biological roles of twinfilin remained unclear. In budding yeast TWF1 deficient cells are viable, but show poorly enlarged cortical actin patches and synthetic lethality when combined with certain cofilin and profilin mutants. This observation supports that twinfilin has a role in the regulation of actin dynamics in yeast cells together with profilin and cofilin [2,13,14]. Twinfilin has only one isoform in unicellular organisms and invertebrates, while three twinfilin isoforms (TWF-1, TWF-2a, TWF-2b) are expressed in mammalian cells. Despite the similarity in their biochemical properties these isoforms display distinct expression patterns. Twinfilin-1 and twinfilin-2a are the major isoforms in embryos and in most adult mouse non-muscle cells, whereas twinfilin-2b is the predominant isoform in adult heart and skeletal muscles [7]. In cultured murine non-muscle cells overexpression of twinfilin-1 leads to fewer stress fibres and the appearance of abnormal wormlike actin-filament structure [11]. Twinfilin-1 was described as a suppressor of lymphoma cell migration and it can enhance the action of the chemotherapeutic vincristine, which supports the role of TWF in cell migration [15]. Recent results demonstrate that twinfilin has a role in heart diseases as well [16]. The levels of twinfilin-1 were increased in cardiac hypertrophy, supporting the role of this protein in cell morphogenesis [16]. Recent study identified twinfilin-2 as a novel stereociliary protein. Actin filaments in stereocilia are uniformly oriented with their barbed ends toward the tips of the stereocilia. In the mouse cochlea the barbed end capping protein twinfilin-2 is present at the tips of middle and short rows of stereocilia. Twinfilin-2 was suggested to have a role in suppressing the elongation of actin filaments. Overexpression of twinfilin-2 in cochlear inner hair cells resulted in a significant reduction of stereocilia length. The presence of twinfilin-2 in adult stereocilia suggests that it might play a role in controlling the mature length of the middle and short rows of stereocilia [17].

Our aim was to describe and understand the effects of mouse twinfilin-1 on the conformational dynamics of actin monomer. We determined the affinity of TWF1 to the ATP-actin monomer with fluorescence anisotropy measurements. Steady-state and time dependent fluorescence, stopped-flow and DSC experiments were performed to characterize the molecular detail behind the twinfilin binding to monomeric actin. The results showed that twinfilin could reduce the accessibility of the nucleotide binding cleft, which suggests that the cleft shifted to a more compact conformational state. The TWF1 increased the thermodynamic stability of the monomeric actin. The increased rigidity of actin in the presence of twinfilin-1 was also observed with temperature dependent FRET experiments.

2. Experimental procedures

2.1. Protein preparation and fluorescent labelling of the samples

Acetone-dried muscle powder was obtained from rabbit skeletal muscle as was described earlier by Feuer et al. [18]. The calcium bound G-actin was prepared according to the method of Spudich and Watt modified by Mossakowska et al. [19,20]. The G-actin was stored in buffer A, containing 4 mM Tris–HCl, 0.1 mM $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich), 0.2 mM ATP, 0.5 mM MEA and 0.005% NaN_3 (Merck) at pH 8.0. The concentration of the G-actin was determined spectrophotometrically with a Jasco V-550 spectrophotometer by using the absorption coefficient of 1.11 mg ml^{-1} cm^{-1} (46,090 M^{-1} $cm^{-}1$) at 280 nm [21]. The relative molecular mass of 42,300 Da was used for G-actin [22].

During the whole study mainly Ca-ATP G-actin was used in the experiments. The Ca-G-actin is more stable which makes it possible to reduce the influence of nonspecific environmental effects. Parallel to the reduced experimental errors the reproducibility of the results can be improved. Mg-G-actin was only used in the temperature dependent energy transfer measurements to describe the effect of twinfilin-1 on the flexibility of the small domain of actin because the flexibility parameter of Ca-G-actin is not sensitive on the applied temperature range (5 and 35 °C) [23]. Another reason that can support our decision to work with Ca-actin is that it was suggested before that in some cells and in some intracellular regions of cells calcium-actin pools may be present temporary, which can be locally important in the dynamics of actin cytoskeleton [24]. The Mg-G-actin was prepared from Ca-G-actin according to the method of Strzelecka-Golaszewska and colleagues [25].

The plasmid for expression of His-tagged twinfilin-1 in *Escherichia coli* was digested with NcoI and HindIII and the cDNA fragment was cloned into the pHAT2 vector to create plasmid pPL144. *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells were transformed with the pHAT2-TWF1 construct and grown in Luria broth medium in the presence of 100 μg/ml ampicillin (Sigma-Aldrich) until the OD of the culture at 600 nm reached 0.6. Expression was induced by addition of 0.2 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (Sigma-Aldrich) and performed for 3 h at 37 °C. Harvested cells were washed once with 20 mM Tris (pH 7.5), resuspended to 40 ml of 20 mM imidazole, 50 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), supplemented with 0.01 mg/ml DNaseI (ApliChem, Germany), and were lysed by pulsed sonication (5 min, 80% intensity, Bandelin Sonopuls HD3100). Cell debris was removed by centrifugation for 1 h at 30,000 ×*g* at 4 °C. The supernatant was loaded onto a nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column (Qiagen) and eluted with a linear 20 mM–1 M imidazole gradient. The fractions containing the His-tagged twinfilins were then further purified with Q-Sepharose anion-exchange column what was equilibrated with 20 mM Tris (pH 7.5), and the proteins were eluted with a 0–1 M NaCl gradient. The peak fractions were concentrated to 1 ml in Vivaspin 10-kDa cut off device (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany) and loaded onto a Superdex-75 HiLoad gel filtration column (GE Healthcare), which had been equilibrated with ATP free buffer A (pH 8.0). The peak fractions containing twinfilins were pooled, concentrated to a final concentration of 100–300 μM, frozen in liquid N_2, and stored at −70 °C. Protein concentration was determined spectrophotometrically, using the molar extinction coefficient of 39,100 M^{-1} cm^{-1} determined with the ProtParam tool.

The labelling of actin monomers with ε-ATP was performed as described previously [26]. A fluorescent nucleotide analogue etheno-ATP (Invitrogen) was attached to the Ca-G-actin according to the method of Perelroizen et al. [27]. The actin concentration was determined spectrophotometrically by using the absorption coefficient of 1.11 mg ml^{-1} cm^{-1}at 280 nm [21] and it was corrected with the absorbance of the fluorophore.

The labelling of cysteine in 374 position on actin monomers with IAEDANS (N-(Iodoacetaminoethyl)-1-naphthylamine-5-sulfonic acid) (Sigma-Aldrich) was performed as described by Miki and co-workers

[28].The concentration of the labelled G-actin was calculated by using the absorption coefficient of 0.63 mg ml^{-1} cm^{-1} at 290 nm to correct with the contribution of the light absorption of IAEDANS to the actin absorption at 290 nm. The fluorophore concentration was determines by using extinction coefficient 6100 M^{-1} cm^{-1} at 336 nm [25]. For FRET measurements double labelled actin monomers are needed therefore the certain amount of IAEDANS-G-actin was labelled with fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) (Sigma-Aldrich) at Lys-61 according to the method of Burtnick modified by Miki and co-workers [28,29]. The concentration of FITC-IAEDANS-actin was determined with the Bradford protein assay reagent. The FITC concentration was determined spectrophotometrically with an absorption coefficient of 74,500 M^{-1} cm^{-1} at 493 nm [30]. The extent of labelling was 80–100% of actin monomer in both cases.

2.2. Fluorescence anisotropy measurements

Steady-state fluorescence measurements were performed with a Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 fluorimeter (Longjumeau Cedex, France) which contains a thermostated cuvette holder. The ε-ATP labelled actin was used in ATP free buffer A solution for these experiments. The applied concentration of ε-ATP-actin was 1 μM in these experiments. The fluorescence anisotropy of ε-ATP-actin was measured in the presence of increasing twinfilin concentration (0–8 μM).

The affinity of the twinfilin for actin was determined by using the following equation:

$$\frac{\Delta r}{\Delta r_{max}} = \frac{r_{actual} - r_{min}}{r_{max} - r_{min}} = \frac{([L_{total}] + [P_{total}] + K_D) - \sqrt{([L_{total}] + [P_{total}] + K_D)^2 - 4[P_{total}][L_{total}]}}{2[P_{total}]} \quad (1)$$

where Δr is the difference of the measured anisotropy value (r_{actual}) and the anisotropy value for the fluorescently labelled un-complexed protein (r_{min}), r_{max} is the highest signal from the complexed protein, L_{total} is the total ligand concentration, P_{total} is the total protein concentration and K_D is the equilibrium dissociation constant.

2.3. Nucleotide exchange assay

For the nucleotide exchange measurements an Applied Photophysics stopped-flow equipment was used. We applied 2 μM Ca-G-actin labelled with ε-ATP and varying concentration of twinfilin from 0 to 8 μM. The protein sample was mixed with an ATP free buffer A supplemented with 1 mM ATP. The fluorescence intensity was followed for at least 1000 s. The nucleotide exchange rate is monitored by following the decrease of fluorescence intensity of ε-ATP as it was dissociated from the actin monomers. The fluorophore was excited at 320 nm and the fluorescence emission was filtered with an FG 385 cut-off filter.

2.4. Fluorescence quenching measurements

Steady-state fluorescence measurements were carried out with a Perkin-Elmer LS50B (Waltham, MA) and a Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 (Longjumeau Cedex, France) spectrofluorometer equipped with a thermostated cuvette holder. 5 μM ε-ATP bound actin was titrated at 22 °C with acrylamide from 0 to 0.3 M. The excitation wavelength was 320 nm and the emission spectra were recorded between 330 nm and 600 nm with 5 nm slits on the excitation and emission side as well.

With the fluorescence quenching experiments it is possible to test the conformational changes around the actin bound fluorophore in the presence of twinfilin. When more than one fluorophore population affected in the sample (e.g. actin bound and free ε-ATP is in the solution) with different quenching mechanisms this complex situation can be resolved by using a complex form of the Stern–Volmer equation:

$$\frac{F_0}{F} = \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{f_i}{(1 + K_{SV_{Si}}[Q])(1 + K_{SV_{Di}}[Q])} \right)^{-1} \quad (2)$$

where K_{SV_Si} and K_{SV_Di} are the static and dynamic Stern–Volmer constant of the ith population represented by the fraction of f_i, respectively. The K_{SV} values can inform us about the accessibility of the fluorophore to the quencher molecules [31]. A decrease in the K_{SV} value can indicate a decreased accessibility, which can suggest a more closed nucleotide binding cleft [26].

The time-resolved fluorescence quenching measurements were performed on an ISS K2 Multifrequency Phase Fluorometer (ISS Fluorescence Instrumentation, Champaign, IL) at 22 °C. The excitation light was provided by a 300-W Xe-arc lamp, and was modulated with a double-crystal Pockel cell. The modulation frequency was varied in 10 steps from 2 to 64 MHz. The excitation wavelength was 320 nm and the emitted light was observed through an FG 385 high-pass filter. We used freshly prepared glycogen solution as a reference (lifetime = 0 ns).

2.5. Temperature dependent FRET experiments

FRET measurements were carried out with Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 fluorimeter (Longjumeau Cedex, France) spectrofluorimeter equipped with a thermostated cuvette holder. Actin was labelled with IAEDANS (donor) in subdomain 1 at Cys_{374} and with FITC (acceptor) in subdomain 2 at Lys_{61} as described by Miki and co-workers [28]. The donor fluorescence intensity was monitored in the absence and in the presence of the acceptor. The excitation wavelength was 350 nm whist the fluorescence intensity of IAEDANS was registered at 475 nm, where the contribution of acceptor to the measured fluorescence was insignificant. The measurements were performed at different temperatures from 5 to 35 °C in steps of 5 °C by employing dehumidifier machinery. The fluorescence intensities were corrected for inner filter effect by using the following equation modified by own experimental setup [32]:

$$F_{corr} = F_{obs} antilog[(OD_{ex}/2) + (OD_{em}/10)] \quad (3)$$

where F_{obs} is the measured fluorescence intensity, and OD_{ex} and OD_{em} are the absorption of sample at the excitation and emission wavelengths, respectively.

The transfer efficiency for IAEDANS-FITC FRET pair was calculated as follows:

$$E = 1 - (F_{DA}/F_D) \quad (4)$$

where F_D and F_{DA} are the fluorescence intensities of the donor molecule in the absence and the presence of the acceptor, respectively, taking account of the labelling ratio of acceptor. It is possible to calculate the distance between the donor and acceptor molecules by knowing the energy transfer from the equation below:

$$E = R_0^6 / \left(R_0^6 + R^6 \right) \quad (5)$$

where R_0 is the Förster's critical distance defined as the donor–acceptor distance where the fluorescence resonance energy transfer efficiency is 50%.

The f' parameter can be calculated as described earlier [23,33].

$$f' = E/F_{DA} \quad (6)$$

The flexibility of protein can be characterized by flexibility parameter f'. To determine the f' parameter between the donor and acceptor for

actin molecule as a function of increasing temperature we can get information about the relative fluctuation of the fluorophores.

2.6. Differential scanning calorimetry (DSC) experiments

DSC measurements were carried out with a Setaram Micro DSC-III (Longjumeau Cedex, France) calorimeter. The applied temperature range was 0–100 °C and the heating rate was 0.3 K min^{-1}. The Buffer A prepared with MOPS served as a reference solution during the DSC measurements. The actin concentration was 23 μM (0.97 mg/ml) in the experiments and the concentration of twinfilin was also adjusted to 23 μM. All the DSC data were analysed with the Microcal Origin software (version 6.0). In all cases, the samples were heated twice. The measurements after the second heating indicated that the denaturation of the actin during the first run was fully irreversible.

3. Results and discussion

In the present work the effect of twinfilin-1 on the structure and dynamics of monomeric actin was studied by fluorescence spectroscopy and DSC measurements. The first goal was to determine the affinity of twinfilin for Ca-G-actin. Steady-state fluorescence anisotropy is sensitive to changes in the rotation of the investigated fluorophore. One of the common sources of these changes is the change in the rotation of the whole protein to which the fluorophore is attached. The binding of a partner to a protein can thus be monitored through the change of the anisotropy of the protein bound fluorophores. We used this method to characterize the concentration of twinfilin–actin complexes under various conditions following the signal from the actin bound fluorescent ATP analogue. The anisotropy was 0.028 ± 0.007 in the absence of twinfilin. The relatively small steady-state anisotropy measured for the actin bound ε-ATP indicates that the fluorophore retained a relatively large degree of motional freedom even after binding to the protein. The measured steady-state anisotropy value for the unbound ε-ATP was $0.0012 \pm 2 \cdot 10^{-4}$. This very small anisotropy value reflects the free and rapid rotation of the fluorophore. The anisotropy was 0.028 ± 0.007 in the absence of twinfilin-1. The observed relatively small steady-state anisotropy of actin bound ε-ATP was potentially due to the presence and contribution of free ε-ATP. When ε-ATP labelled actin monomers (1 μM) were mixed with twinfilin in different concentration (0–8 μM) the measured fluorescence anisotropy gradually increased to 0.047 ± 0.007 (Fig. 1). As the increase of fluorescence anisotropy can be related to the complex formation, the binding affinity of twinfilin for the actin monomers was determined from the concentration dependence of anisotropy by fitting Eq. (1) to the data points. The resolved equilibrium dissociation constant is 0.12 ± 0.04 μM, indicating that twinfilin-1 can tightly bind to the Ca-actin monomers.

The interaction of actin with ADF/cofilin family proteins often resulted in the change of its nucleotide binding properties [26]. To test the functional properties of twinfilin we carried out nucleotide exchange experiments. Actin monomers (1 μM) were incubated with ε-ATP to allow equilibrium nucleotide binding, and then unlabelled ATP was added at a greater concentration (1 mM). Due to its large concentration it could replace the fluorescent nucleotide on actin. The displacement was accompanied by a fluorescence intensity change allowing the measurement of the dissociation rates. When the experiments were carried out in the absence of twinfilin the first order dissociation rate constant was found to be 0.012 s^{-1}. The experiments were repeated in the presence of twinfilin in various concentrations (0–8 μM). We observed that the binding of twinfilin decreased the rate of dissociation to 0.003 s^{-1} at the maximal twinfilin concentration (Fig. 2). Applying Eq. (1) we also attempted to determine the affinity of twinfilin-1 for actin. The affinity was found to be 0.49 ± 0.27 μM which is in good correlation with the affinity (0.12 ± 0.04 μM) we found in fluorescence anisotropy measurements (Fig. 1).

It was suggested previously that the nucleotide binding region between the small and large domains of actin is sensitive to the presence of actin binding proteins [34]. The nucleotide binding region was proved to be closed in the presence of cofilin and toxofilin [26,35] while profilin was related to the open structure of the binding region [22]. The change of the nucleotide dissociation rate in the presence of twinfilin can be due to the altered conformation of the nucleotide binding pocket. To test this idea fluorescence quenching experiments were performed to describe the accessibility of the actin bound fluorescently labelled ATP in the presence of twinfilin. The fluorescence intensity of actin (5 μM) bound ε-ATP was recorded in the presence of acrylamide in various concentrations (0–0.3 M). The experiments were carried out either in the absence or presence (5 μM) of twinfilin. Based on the determined affinity more than 90% of the twinfilin bound actin under these conditions. With the fluorescence intensities Stern–Volmer plots were created and the plots were analysed by fitting Eq. (2) to the experimental data [26]. The calculated K_{SV_D} value for the free ε-ATP was 48.02 ± 8.35 M^{-1}. The results of the fluorescence lifetime measurements showed that dynamic quenching components were not present and the fluorescence of the actin bound ε-ATP was only quenched by static quenching processes in the presence of twinfilin.

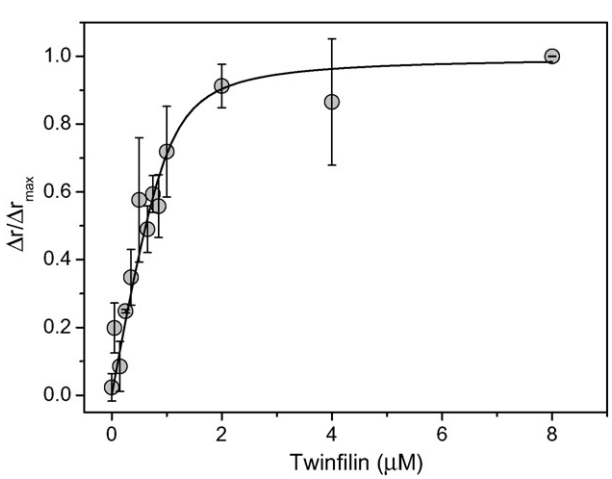


Fig. 1. Binding of mouse twinfilin-1 to G-actin. The change of fluorescence anisotropy of ε-ATP labelled G-actin in the presence of increasing twinfilin concentration (0–8 μM). The applied actin concentration was 1 μM (n = 3). The error bars represent the standard deviation (SD) values. The obtained K_D value is 0.12 ± 0.04μM.

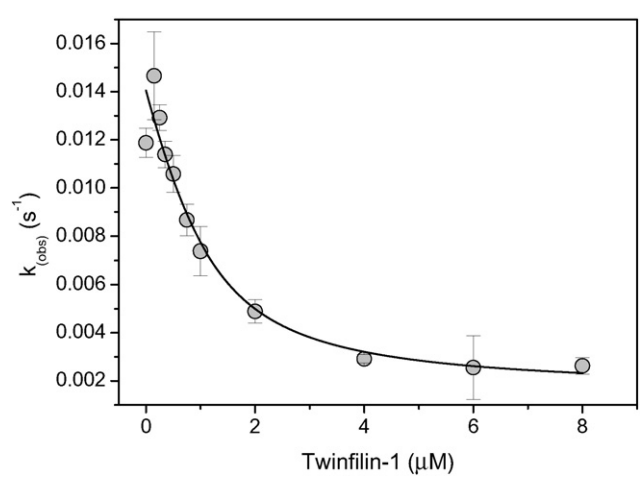


Fig. 2. Effect of twinfilin-1 on nucleotide exchange on G-actin. The nucleotide exchange experiment on ε-ATP labelled monomeric actin (1 μM) versus 1 mM ATP in the absence and presence of increasing twinfilin concentration (0–8 μM). Errors presented are standard deviation from three independent experiments.

While the K_{SV} was 0.33 ± 0.11 M^{-1} in the absence of twinfilin, its value decreased by almost ten-fold to 0.05 ± 0.108 M^{-1} in the presence of twinfilin (Fig. 3). The relative abundance of the bound etheno-ATP was 64 ± 21% and 85 ± 9% in the absence and presence of twinfilin-1 respectively. The large decrease of the K_{SV} reflected the decrease of the accessibility of the fluorophore to the solvent and suggested that the nucleotide located in a more compact, closed nucleotide-binding pocket. The structure of the actin-twinfilin complex is not available yet. Although the change of the overall structure of actin and the nucleotide binding pocket in actin is the likely explanation for our observation, we cannot exclude the possibility that the accessibility of the nucleotide pocket decreased because the N-terminal domain of twinfilin sterically blocked the nucleotide binding cleft on actin.

FRET experiments were performed to study the structure and dynamics of the small domain of monomeric actin in the presence of twinfilin-1. The temperature sensitive energy transfer measurements were completed with Mg-G-actin. The actin monomer was labelled with the fluorescent donor IAEDANS on cysteine 374 in subdomain 1. FITC as a fluorescent acceptor was attached to lysine 61 in subdomain 2. The donor emission spectrum was recorded between 345 nm and 650 nm, and the corrected fluorescence intensities at 475 nm were used to calculate the energy transfer. The contribution of acceptor to the measured fluorescence intensity was negligible at this wavelength. The concentration of the labelled actin was 2 μM, while the twinfilin concentration was 8 μM in these experiments. The binding site of twinfilin on actin monomer is close to the position of IAEDANS. The affinity of twinfilin for IAEDANS labelled G-actin was determined by steady state fluorescence anisotropy measurements to exclude the adverse effect of labelling on complex formation. In these experiments the G-actin concentration was 2 μM while the twinfilin concentration was changed from 0 to 10 μM. Eq. (1) was applied to calculate the K_D value for the complex of IAEDANS labelled G-actin with twinfilin-1. The calculated K_D value was 0.16 ± 0.1 μM which is similar to the K_D value that was obtained for twinfilin binding to the ε-ATP labelled actin monomers (0.12 ± 0.04 μM). Based on the calculated equilibrium constant around 97% of actin was in complex with twinfilin-1 in the measurements.

Then fluorescence resonance energy transfer efficiency was calculated by using Eq. (4). The R_0 values for the IAEDANS-FITC fluorophore pair was taken from the work of Nyitrai and colleagues (Table 1) [23]. In the measurements the FRET efficiency and the R values slightly decreased while the temperature increased from 5 to 35 °C (Table 1). The comparison of the data obtained in the presence and absence of twinfilin-1 indicated that the donor–acceptor distance was not sensitive to the binding of the actin-binding protein at any of the applied temperatures (Table 1). The calculated distance and the tendency of its change were similar to the results of our previous measurements [29]. To assess the effect of twinfilin-1 on the intra-molecular flexibility of the small domain of actin the temperature dependent FRET measurements were further analysed. The temperature dependence of a special FRET parameter, f', provides information regarding the flexibility of the protein matrix between the applied labels. A steeper temperature dependence can be related to a more flexible protein matrix [23,33]. The f' flexibility parameter was calculated by using Eq. (6). The relative change of the f' increased in case of Mg-G-actin as the temperature increased from 5 to 35 °C. In the presence of twinfilin-1 the f' did not significantly change as the temperature increased (Fig. 4), indicating that the binding of twinfilin made the protein matrix of the actin monomers more rigid.

Table 1
Temperature dependence of the transfer efficiency (E) of the IAEDANS-FITC pair, the calculated donor–acceptor distances (R) and the Förster's critical distance (R_0) values for G-actin (Mg^{2+}) and G-actin-twinfilin complex.

T (°C)	R_0 (nm)	E (%)		R (nm)	
		G-actin	G-actin:TWF	G-actin	G-actin:TWF
5	5.31	67.65 ± 2.48	71.42 ± 1.26	4.74 ± 0.06	4.60 ± 0.07
10	5.23	66.15 ± 1.99	70.30 ± 0.48	4.66 ± 0.06	4.56 ± 0.06
15	5.15	68.70 ± 1.32	66.44 ± 1.77	4.57 ± 0.05	4.58 ± 0.06
20	5.07	67.46 ± 1.87	66.73 ± 1.41	4.53 ± 0.05	4.53 ± 0.04
25	4.98	65.38 ± 0.64	66.07 ± 1.69	4.47 ± 0.03	4.47 ± 0.08
30	4.9	62.69 ± 0.55	63.92 ± 1.48	4.45 ± 0.07	4.46 ± 0.05
35	4.82	62.02 ± 1.58	61.6 ± 1.23	4.44 ± 0.05	4.39 ± 0.05

Our fluorescence experiments showed that the binding of twinfilin-1 changed the conformation of the Mg-actin monomer. Local conformational changes often correlate with the overall stability of proteins [35, 36]. To investigate the twinfilin induced changes in the global heat resistance of actin, differential scanning calorimetry experiments were carried out. The heat transitions of 23 μM Ca-G-actin was recorded in the absence or presence of 23 μM twinfilin (Fig. 5). Under these conditions approximately 93% of actin was in complex with twinfilin-1 based on the determined K_D values (0.12 ± 0.04 μM). We found that the melting temperature of twinfilin bound actin (T_m = 59.04 °C) was higher than that of the twinfilin free actin monomers (T_m = 56.33 °C) and higher than twinfilin alone (T_m = 54.01 °C). These data suggest that parallel

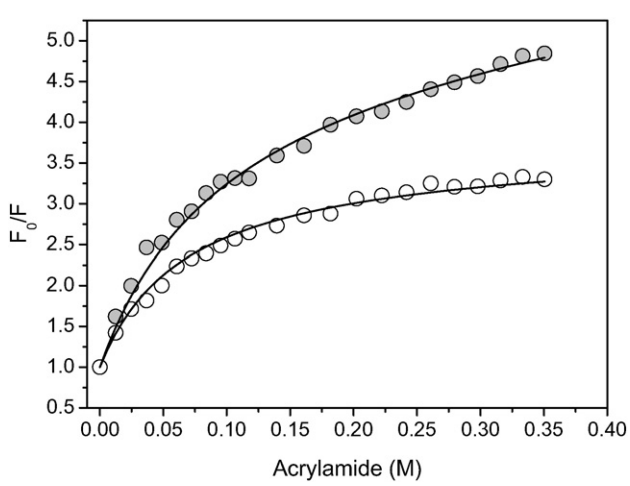


Fig. 3. The Stern–Volmer plots of the steady-state quenching measurements with ε-ATP labelled actin monomers. The Stern–Volmer plot of ε-ATP labelled monomeric actin (5 μM) in the absence (grey circle) and in the presence of twinfilin (white circle) with acrylamide (0–0.3 M). Solid lines represent the fits obtained with Eq. (2). The calculated K_{SV_S} value is 0.33 ± 0.11 M^{-1} for the actin bound ε-ATP molecules, and the K_{SV_S} value is 0.05 ± 0.11 M−1 in the presence of twinfilin. The plot contains individual data sets from at least three independent measurements in the presence and absence of twinfilin-1.

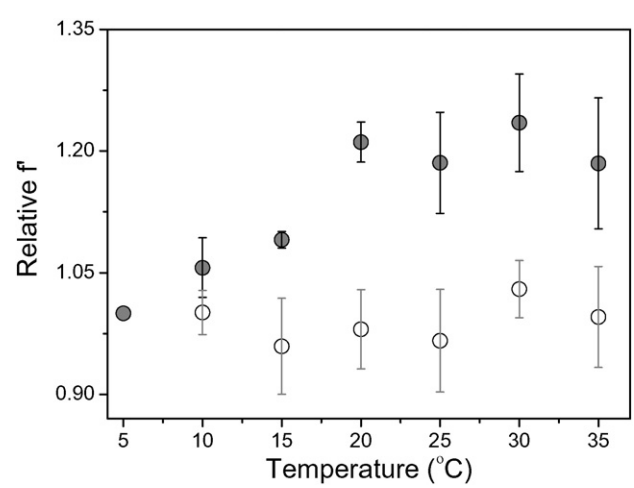


Fig. 4. Temperature dependence of relative f' of Mg-G-actin in the presence of twinfilin-1. The temperature dependent FRET experiments were completed with 2 μM actin monomer in the absence (grey circle) or presence of 8 μM twinfilin (empty circle). The presented error bars are the standard deviations from at least three independent experiments.

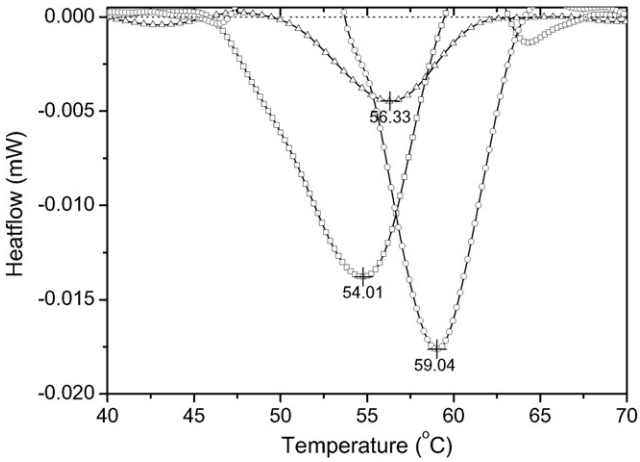


Fig. 5. The thermal denaturation curve of Ca-G-actin in complex with twinfilin. The figure shows the representative experimental data for the 23 μM Ca-G-actin (empty triangle), 23 μM twinfilin (empty square) and 23 μM actin-twinfilin complex (empty circle).

to the conformational transitions responsible for the more compact nucleotide binding cleft of actin the thermal stability of the actin increased after the binding of twinfilin. However, as we obtained a single heat transition peak for the twinfilin–actin complex, we cannot exclude the possibility that the stability of twinfilin-1 has also changed in this complex. Our observation is different from the results of Pivovarova and colleagues as they found that twinfilin-1 did not change the melting temperature of ATP-G-actin significantly [37]. The incoherence between the data can be resolved considering that they used Mg-ATP-actin in their work, while in the present work Ca-ATP-actin was applied in the DSC measurements.

Profilins, ADF (actin depolymerizing factor)/cofilins and twinfilins are evolutionarily conserved actin binding proteins and exist in organism from yeast to mammals. Profilins form an individual actin binding protein family while ADF/cofilins and twinfilins are the members of ADF/cofilin family [2]. Cofilin and twinfilin are able to bind to monomer and/or filamentous actin but profilin exclusively binds to the G-actin [38]. Cofilin contains one ADF domain while twinfilin consist of two cofilin-like domains. As they have similar structure they produce similar biochemical functions. Cofilins and twinfilins also inhibit spontaneous nucleotide exchange on G-actin [10,26]. They bind to ADP-G-actin with a significantly higher affinity than ATP-G-actin (cofilins: $K_{D\text{-}ADP\text{-}G\text{-}actin} = 0.02–0.15$ μM, $K_{D\text{-}ATP\text{-}G\text{-}actin} = 0.6–8.0$ μM; twinfilins: $K_{D\text{-}ADP\text{-}G\text{-}actin} = \sim 0.05$ μM, $K_{D\text{-}ATP\text{-}G\text{-}actin} = 0.5–2$ μM) [10,39,40]. Consequently twinfilins show similar binding characteristics to G-actin than cofilins. In contrast to the functions of cofilins and twinfilins, profilin is very different. Profilins are small (12–16 kDa) actin binding proteins and they have a higher affinity for ATP-G-actin ($K_D = 0.1$ μM) than ADP-G-actin ($K_D = 0.5$ μM). Profilin catalyses the nucleotide exchange on G-actin as well [41].

Profilins have a distinct structure and function compared to the ADF/cofilins and twinfilins. Profilins can shift the nucleotide binding cleft on actin into an open position [26]. They can bind between the subdomains 1 and 3 on the actin monomer but their function is mainly to prepare the monomers for the incorporation into the actin filaments. To this subclass of the G-actin sequestering proteins an uncovering function can be related. Both the ADF/cofilins and the twinfilins probably due to their similar structural elements can shift the nucleotide binding region on actin into a closed conformation [26]. Beyond their structural and functional similarities there is an overlap between their binding sites on actin as well [42]. In cells they are partly responsible for carrying the actin monomers. During this transportation it seems they try to keep the central and functionally important actin bound nucleotide in an enclosed position. Based on these they can be considered as a subclass within the G-actin sequestering proteins with sheltering function.

4. Conclusion

In living cells actin is responsible for many biological functions. To fulfil these functions actin has to be properly localized and structurally adapted to the requirements. It is a well-established idea that actin can adopt and change its conformation by reacting to the changes of various environmental conditions or to the binding of its partner proteins. The present work can support this idea by characterizing the intramolecular changes in actin monomers upon the binding of twinfilin-1. The rapid and well-designed structural response of actin to the binding of its partners is central in the efficient control of the cytoskeletal actin network. The key molecular mechanisms behind the reaction of the actin cytoskeleton can help to understand the nature of the interactions of these proteins, and thus deserves future investigations.

Acknowledgements

We thank the work of Roland Kardos for his exceptional technical assistance and Pekka Lappalainen for his scientific support.

This study was supported by grants from the Hungarian Science Foundation (OTKA) NN107776 and K112794 (to MNy), grants from the Hungarian National Office for Research and Technology (GVOP-3.2.1.-2004-04-0190/3.0 and GVOP-3.2.1.-2004-04-0228/3.0 (to MNy)) and by the Grant of PTE ÁOK-KA-2013/1 (to GH). This work was also supported by 'Science, Please! Research Team on Innovation' (SROP-4.2.2/08/1/2008-0011) programme and by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program'.

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

References

[1] T.D. Pollard, J.A. Cooper, Actin, a central player in cell shape and movement, Science 326 (2009) 1208–1212.
[2] B.L. Goode, D.G. Drubin, P. Lappalainen, Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by twinfilin, a ubiquitous actin monomer-sequestering protein, J. Cell Biol. 142 (1998) 723–733.
[3] P. Lappalainen, M.M. Kessels, M.J. Cope, D.G. Drubin, The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module, Mol. Biol. Cell 9 (1998) 1951–1959.
[4] E. Helfer, E.M. Nevalainen, P. Naumanen, S. Romero, D. Didry, D. Pantaloni, P. Lappalainen, M.F. Carlier, Mammalian twinfilin sequesters ADP-G-actin and caps filament barbed ends: implications in motility, EMBO J. 25 (2006) 1184–1195.
[5] E.M. Nevalainen, A. Skwarek-Maruszewska, A. Braun, M. Moser, P. Lappalainen, Two biochemically distinct and tissue-specific twinfilin isoforms are generated from the mouse Twf2 gene by alternative promoter usage, Biochem. J. 417 (2009) 593–600.
[6] V.O. Paavilainen, E. Oksanen, A. Goldman, P. Lappalainen, Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin, J. Cell Biol. 182 (2008) 51–59.
[7] M.K. Vartiainen, E.M. Sarkkinen, T. Matilainen, M. Salminen, P. Lappalainen, Mammals have two twinfilin isoforms whose subcellular localizations and tissue distributions are differentially regulated, J. Biol. Chem. 278 (2003) 34347–34355.
[8] J.B. Moseley, K. Okada, H.I. Balcer, D.R. Kovar, T.D. Pollard, B.L. Goode, Twinfilin is an actin-filament-severing protein and promotes rapid turnover of actin structures in vivo, J. Cell Sci. 119 (2006) 1547–1557.
[9] A.B. Johnston, A. Collins, B.L. Goode, High-speed depolymerization at actin filament ends jointly catalysed by twinfilin and Srv2/CAP, Nat. Cell Biol. 17 (2015) 1504–1511.
[10] P.J. Ojala, V.O. Paavilainen, M.K. Vartiainen, R. Tuma, A.G. Weeds, P. Lappalainen, The two ADF-H domains of twinfilin play functionally distinct roles in interactions with actin monomers, Mol. Biol. Cell 13 (2002) 3811–3821.
[11] M. Vartiainen, P.J. Ojala, P. Auvinen, J. Peranen, P. Lappalainen, Mouse A6/twinfilin is an actin monomer-binding protein that localizes to the regions of rapid actin dynamics, Mol. Cell. Biol. 20 (2000) 1772–1783.
[12] S. Palmgren, P.J. Ojala, M.A. Wear, J.A. Cooper, P. Lappalainen, Interactions with PIP2, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin, J. Cell Biol. 155 (2001) 251–260.
[13] S. Falck, V.O. Paavilainen, M.A. Wear, J.G. Grossmann, J.A. Cooper, P. Lappalainen, Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction, EMBO J. 23 (2004) 3010–3019.
[14] A.K. Wolven, L.D. Belmont, N.M. Mahoney, S.C. Almo, D.G. Drubin, In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin, J. Cell Biol. 150 (2000) 895–904.

[15] C.E. Meacham, E.E. Ho, E. Dubrovsky, F.B. Gertler, M.T. Hemann, In vivo RNAi screening identifies regulators of actin dynamics as key determinants of lymphoma progression, Nat. Genet. 41 (2009) 1133–1137.
[16] Q. Li, X.W. Song, J. Zou, G.K. Wang, E. Kremneva, X.Q. Li, N. Zhu, T. Sun, P. Lappalainen, W.J. Yuan, Y.W. Qin, Q. Jing, Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy, J. Cell Sci. 123 (2010) 2444–2452.
[17] A.W. Peng, I.A. Belyantseva, P.D. Hsu, T.B. Friedman, S. Heller, Twinfilin 2 regulates actin filament lengths in cochlear stereocilia, J. Neurosci. 29 (2009) 15083–15088.
[18] G. Feuer, F. Molnar, et al., Studies on the composition and polymerization of actin, Hung. Acta Physiol. 1 (1948) 150–163.
[19] M. Mossakowska, J. Belagyi, H. Strzelecka-Golaszewska, An EPR study of the rotational dynamics of actins from striated and smooth muscle and their complexes with heavy meromyosin, Eur. J. Biochem./FEBS 175 (1988) 557–564.
[20] J.A. Spudich, S. Watt, The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, J. Biol. Chem. 246 (1971) 4866–4871.
[21] T.W. Houk Jr., K. Ue, The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods, Anal. Biochem. 62 (1974) 66–74.
[22] M. Elzinga, J.H. Collins, W.M. Kuehl, R.S. Adelstein, Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70 (1973) 2687–2691.
[23] M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos, B. Somogyi, Effect of Ca^{2+}–Mg^{2+} exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin, Biophys. J. 74 (1998) 2474–2481.
[24] A.W.K. Michael, T. Maloney, W. Chi, R. Pak James, Bamburg protein reviews, in: D.C. Cristobal, G. dos Remedios (Eds.), Actin-binding Proteins and Disease, Springer 2008, pp. 83–187.
[25] A. Strzelecka, B. Pyrzynska, K. Kwiatkowska, A. Sobota, Syk kinase, tyrosine-phosphorylated proteins and actin filaments accumulate at forming phagosomes during Fcgamma receptor-mediated phagocytosis, Cell Motil. Cytoskeleton 38 (1997) 287–296.
[26] R. Kardos, K. Pozsonyi, E. Nevalainen, P. Lappalainen, M. Nyitrai, G. Hild, The effects of ADF/cofilin and profilin on the conformation of the ATP-binding cleft of monomeric actin, Biophys. J. 96 (2009) 2335–2343.
[27] I. Perelroizen, M.F. Carlier, D. Pantaloni, Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin, J. Biol. Chem. 270 (1995) 1501–1508.
[28] M. Miki, C.G. dos Remedios, J.A. Barden, Spatial relationship between the nucleotide-binding site, Lys-61 and Cys-374 in actin and a conformational change induced by myosin subfragment-1 binding, Eur. J. Biochem./FEBS 168 (1987) 339–345.
[29] L.D. Burtnick, Modification of actin with fluorescein isothiocyanate, Biochim. Biophys. Acta 791 (1984) 57–62.
[30] R. Bernhardt, N.T. Ngoc Dao, H. Stiel, W. Schwarze, J. Friedrich, G.R. Janig, K. Ruckpaul, Modification of cytochrome P-450 with fluorescein isothiocyanate, Biochim. Biophys. Acta 745 (1983) 140–148.
[31] J.R. Lakowicz, Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and applications to cell membranes, Subcell. Biochem. 13 (1988) 89–126.
[32] J.R. Lakowicz, Instrumentation for fluorescence spectroscopy, Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York 1983, pp. 43–47.
[33] B. Somogyi, J. Matko, S. Papp, J. Hevessy, G.R. Welch, S. Damjanovich, Forster-type energy transfer as a probe for changes in local fluctuations of the protein matrix, Biochemistry 23 (1984) 3403–3411.
[34] J.K. Chik, U. Lindberg, C.E. Schutt, The structure of an open state of beta-actin at 2.65 A resolution, J. Mol. Biol. 263 (1996) 607–623.
[35] L. Czimbalek, V. Kollar, R. Kardos, D. Lorinczy, M. Nyitrai, G. Hild, The effect of toxofilin on the structure and dynamics of monomeric actin, FEBS Lett. 589 (2015) 3085–3089.
[36] R. Kardos, E. Nevalainen, M. Nyitrai, G. Hild, The effect of ADF/cofilin and profilin on the dynamics of monomeric actin, Biochim. Biophys. Acta 1834 (2013) 2010–2019.
[37] A.V. Pivovarova, N.A. Chebotareva, E.V. Kremneva, P. Lappalainen, D.I. Levitsky, Effects of actin-binding proteins on the thermal stability of monomeric actin, Biochemistry 52 (2013) 152–160.
[38] V.O. Paavilainen, E. Bertling, S. Falck, P. Lappalainen, Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins, Trends Cell Biol. 14 (2004) 386–394.
[39] M.F. Carlier, V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.X. Xia, Y. Hong, N.H. Chua, D. Pantaloni, Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility, J. Cell Biol. 136 (1997) 1307–1322.
[40] S.K. Maciver, A.G. Weeds, Actophorin preferentially binds monomeric ADP-actin over ATP-bound actin: consequences for cell locomotion, FEBS Lett. 347 (1994) 251–256.
[41] T.D. Pollard, L. Blanchoin, R.D. Mullins, Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29 (2000) 545–576.
[42] V.O. Paavilainen, M.C. Merckel, S. Falck, P.J. Ojala, E. Pohl, M. Wilmanns, P. Lappalainen, Structural conservation between the actin monomer-binding sites of twinfilin and actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin, J. Biol. Chem. 277 (2002) 43089–43095.

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology 164 (2016) 276–282

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Spectroscopic characterization of the effect of mouse twinfilin-1 on actin filaments at different pH values

Veronika Takács-Kollár [a], Dénes Lőrinczy [a], Miklós Nyitrai [a,b,c], Gábor Hild [a,d,*]

[a] University of Pécs, Medical School, Department of Biophysics, Pécs, Szigeti str. 12, H-7624, Hungary
[b] Szentágothai Research Center, Pécs, Ifjúság str. 34, H-7624, Hungary
[c] MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Pécs, Szigeti str. 12, H-7624, Hungary
[d] University of Pécs, Medical School, Department of Radiology, Pécs, Ifjúság str. 13, H-7624, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:
Received 17 July 2016
Received in revised form 26 September 2016
Accepted 30 September 2016
Available online 3 October 2016

Keywords:
Actin
Twinfilin
Cytoskeleton
Fluorescence
Calorimetry
Spectroscopy

ABSTRACT

The effect of mammalian twinfilin-1 on the structure and dynamics of actin filaments were studied with steady state fluorescence spectroscopy, total internal reflection fluorescence microscopy and differential scanning calorimetry techniques. It was proved before that the eukaryotic budding yeast twinfilin-1 can efficiently bind and severe actin filaments *in vitro* at low pH values. In the present work steady-state anisotropy measurements revealed that twinfilin can bind efficiently to F-actin. Dilution-induced depolymerization assay proved that mammalian twinfilin-1 has an actin filament severing activity. This severing activity was more pronounced at low pH values. Total internal reflection fluorescence microscopy measurements could support the severing activity of mouse twinfilin-1. The average rate of depolymerization was more apparent at low pH values. The differential scanning calorimetry measurements demonstrated that mammalian twinfilin-1 could reduce the stiffness within the actin filaments before the detachment of the actin protomers. The structural and dynamic reorganization of actin can support the twinfilin-1 induced separation of actin protomers. The measured data indicated that mammalian twinfilin-1 was able to accelerate the monomers dissociation and/or sever the filaments effectively at low pH values.

It was concluded that twinfilin-1 can affect the F-actin in biological processes or under stress situations when the pH is markedly under the physiological level.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Actin cytoskeleton is involved in several cellular processes in eukaryotic cells like cytoskeletal formation, cell division, motility and polarization of cells [1]. Based on the cell type and localization in cells the actin cytoskeleton can be stable or very dynamic [2,3]. Actin has monomeric (G-actin) or filamentous (F-actin) form. Under physiological ionic conditions actin filaments are evolved from actin monomers during the process of polymerization.

The ratio of intracellular monomeric and/or filamentous actin is maintained by the control of the actin-binding proteins. The actin binding proteins can effectively modify the structural and dynamic properties of actin [4–13]. Actin is highly sensitive for the changes in the environmental properties and to the presence of its binding partners [1,2,6–10,12–18]. The actin filaments are generally susceptible to pH dependent reorganization by several actin regulatory proteins. The ADF/cofilin [19], the cyclase-associated protein 1 (CAP1) [20] and the actin-interacting protein 1 (AIP1) [21] can efficiently modify the actin filament dynamics in a pH dependent way. The ADF/cofilin can promote the disassembly of actin filaments at higher pH values [19] and the CAP1 and AIP1 can effectively support the disassemble of the ADF/cofilin bound F-actin in a pH sensitive mode [20,21]. Proteins that interact with G- and/or F-actin originate from several protein families. The members of the actin depolymerizing factor homology domain (ADF-H) proteins can regulate actin turnover in many ways [7]. This family is divided into three phylogenetically variant classes: the ADF/cofilins, the drebrin/Abp1s and the twinfilins [6,11,22]. ADF-H domains show a collective fold that consist of five internal beta-strands and at least four alpha-helices [23].

Twinfilins (TWFs) are evolutionarily conserved actin binding proteins that can be found from yeast to mammals [11]. Twinfilins are ~ 40 kDa proteins consisting of two ADF-H/cofilin-like domains connected by a short linker region and a C-terminal tail. The two domains of twinfilins display approximately 20% sequence similarity to each other and also to other cofilin-like domain containing proteins [11]. Both ADF-H domains of mammalian twinfilins are able to bind G-actin independently. The C-terminal region is capable of binding actin monomer with similar affinity as the full-length protein and about 10-fold higher

* Corresponding author at: University of Pécs, Medical School, Department of Biophysics, Pécs, Szigeti u. 12, H-7624, Hungary.
E-mail address: gabor.hild@aok.pte.hu (G. Hild).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.044
1011-1344/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

than the N-terminal ADF-H domain [24]. Although twinfilins have two potential actin-binding sites the ratio of G-actin:twinfilin is usually 1:1 in *in vitro* experiments. Apparently the N-terminal domain of twinfilin binds an actin monomer and through conformational changes the G-actin binding is transmitted to the C-terminal domain [24]. Twinfilins are actin monomer binding and sequestering proteins and so they are key proteins in the regulation of polymerization/depolymerization cycle of actin filaments. They can efficiently inhibit actin filament assembly by reducing the nucleotide exchange on G-actin [25]. Twinfilins can form more stable complex with ADP-G-actin ($K_D = 0.05$ μM) than ATP-G-actin ($K_D = 0.47$ μM) similarly to ADF/cofilins [24]. Mammalian twinfilins can interact with the barbed-ends of actin filaments by both of the ADF-H domains [26,27]. During this process the N-terminal domain interacts with the terminal G-actin while the C-terminal domain - with weak affinity to the filament's sides - binds between two adjacent subunits on the side of the filament [26,28]. Through the capped barbed ends of the filaments twinfilins can efficiently prevent further filament assembly/disassembly. Yeast TWF displays actin severing activity at acidic pH under *in vitro* conditions [29]. The severing activity can become more noticeable in tissues where the intracellular pH decreases under pathological conditions. Severing function is not related to other twinfilin isoforms so far.

Twinfilins are able to bind capping proteins (CP) as well [30]. The interaction between TWF and CP is required for proper localization of twinfilin in yeast but has no effect on twinfilin-actin binding [30,31].

Twinfilins have only one isoform in organisms with less complexity and three isoforms (twinfilin-1, twinfilin-2a and twinfilin-2b) are differentiated in mammals [25,27]. In muscle cells twinfilin-2b is expressed whereas twinfilin-1 and 2a isoforms are mainly expressed in non-muscle tissues. Furthermore twinfilin-1 isoform can be found in lamellipodial actin meshes and in cell-cell connections as well [25].

Several biological roles of twinfilins have been described to date. In yeast twinfilin deficiency showed extended cortical actin patches and lethality together with several cofilin and profilin mutations [30,32]. Mammalian TWF-1 was identified as a suppressor of lymphoma cell migration and a stimulator of the chemotherapeutic vincristine to confirm the role of this actin binding protein in cell migration [33]. Furthermore twinfilin-1 has a role in heart disease as well. Increased twinfilin-1 level was exhibited in cardiac hypertrophy. This observation supports the role of TWF in cell morphogenesis [34]. Twinfilin-2a depletion inhibited the growth of neurons, whereas the overexpressed TWF-2a elevated neurite length and stimulated the varicosities development [35]. Twinfilin-2 is known to bind myosin VIIa under both *in vitro* and *in vivo* conditions, hereby TWF may regulate the length of stereocilia [36].

Despite the numerous comprehensive studies several biological function and actin cytoskeleton modifying effect of twinfilin and the corresponding molecular interactions have not been clarified yet. In our study we define the affinity of TWF-1 to Mg-F-actin. We demonstrate that the depolymerization of actin filaments is accelerated in the presence of mouse twinfilin-1 in a pH dependent manner. In addition twinfilin-1 can sever the actin filaments at pH 6.0. DSC experiments were also performed to characterize the molecular details behind the regulation of actin cytoskeleton by twinfilin.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

KCl, $CaCl_2$, Trizma Base (tris-(hydroxy-methyl) amino-methane), $MgCl_2$, Luria broth medium, ampicillin, acrylamide, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, imidazole, MOPS, Iaedans and pyrene were purchased from Sigma-Aldrich (Budapest, Hungary). ATP, MEA (mercaptoethanol), and NaN_3 were supplied by Merck (Budapest, Hungary). DNase I was taken from AppliChem, Germany. The Vivaspin 10-kDa cut-off centrifugal concentrator was obtained from Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany.

2.2. Protein Preparation and Fluorescent Labelling of the Samples

2.2.1. Actin preparation

Acetone-dried muscle powder was obtained from rabbit skeletal muscle as was described earlier by Feuer and colleagues [37]. The calcium bound G-actin was prepared according to the method of Spudich and Watt modified by Mossakowska and co-workers [38,39]. The G-actin was stored in buffer A (4 mM Tris, 0.2 mM ATP, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM MEA, and 0.005% NaN_3, pH 8.0). The concentration of the G-actin was defined spectrophotometrically with a Jasco V-660 spectrophotometer by using the absorption coefficient of 1.11 mg/ml cm^{-1} at 280 nm [40]. The relative molecular mass of 42.3 kDa was used for G-actin [41].

2.2.2. Twinfilin Preparation

Escherichia coli BL21 (DE3) pLysS cells were transformed with the pHAT2-TWF1 construct and grown in Luria broth medium in the presence of 100 μg/ml ampicillin until the OD of the culture at 600 nm reached 0.6. Expression was induced by addition of 0.2 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside and performed for 3 h at 37 °C. Harvested cells were washed once with 20 mM Tris (pH 7.5), suspended to 40 ml of 20 mM imidazole, 50 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7.5), supplemented with 0.01 mg/ml DNase I, and were lysed by pulsed sonication (5 min, 80% intensity, Bandelin Sonopuls HD3100). Cell debris was removed by centrifugation for 1 h at 30,000 × *g* at 4 °C. The supernatant was loaded onto a nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column (Qiagen) and eluted with a linear imidazole gradient. The fractions containing the His-tagged twinfilins were then further purified with Q-Sepharose anion-exchange column and Superdex-75 HiLoad gel filtration column (GE Healthcare). The peak fractions containing twinfilins were pooled, concentrated in Vivaspin 10-kDa cut-off device to a final concentration of 100–300 μM, frozen in liquid N_2, and stored at −80 °C. Protein concentration was determined spectrophotometrically, using the molar extinction coefficient of 39,100 M^{-1} cm^{-1} determined with the ProtParam tool.

2.2.3. Fluorescence Labelling of Actin

The labelling of actin monomers with IAEDANS (N-(Iodoacetaminoethyl)-1-naphthylamine-5-sulfonic acid) was performed as described by Miki and co-workers [42]. G-actin solution (50 μM) was polymerized in β-mercaptoethanol free (Mea-free) buffer A for 2 h at room temperature. The F-actin was incubated with 15-fold molar excess of fluorophore for 1 h at room temperature. The labelling was stopped by adding 2 mM β-mercaptoethanol. The sample was centrifuged (Beckman Coulter Optima Max Ultracentrifuge, 32,800 × *g* for 40 min at 4 °C). The pellet with the fluorescently labelled actin was dissolved, homogenized and dialyzed overnight in buffer A. The concentration of IAEDANS labelled G-actin was calculated by using the absorption coefficient of 0.63 mg/ml cm^{-1} at 290 nm to correct with the contribution of the light absorption of IAEDANS to the actin absorption at 290 nm. The fluorophore concentration was determined by using the extinction coefficient of 6100 M^{-1} cm^{-1} at 336 nm [43]. The extent of actin monomers' labelling was 0.80–1.

To typify the depolymerization process actin was labelled with N-(1-pyrene) iodoacetamide as described previously [44]. 23 μM G-actin was polymerized for 1 h at room temperature in mercaptoethanol free buffer A. F-actin was kept with 1.1-fold molar excess of pyrene iodoacetamide for 18 h at room temperature. To separate the labelled-actin from the free dye the sample was ultracentrifuged at 32,800 × *g* for 45 min at 4 °C. After homogenization and dialysis the concentration of actin was determined with a Jasco V-660 spectrophotometer by using the extinction coefficient of 0.63 mg^{-1} ml cm^{-1} at 290 nm. The absorption coefficient of 45,000 M^{-1} cm^{-1} at 344 nm was used for calculation of actin-bound pyrene iodoacetamide in solution. The labelling ratio was 0.7–0.9.

Actin was labelled with Alexa Fluor 488 Succinimidyl Ester (Alexa488SE) to monitor actin depolymerization with TIRF microscopy. Briefly G-actin (50 μM) was dialyzed against in F-buffer (20 mM Pipes, 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM ATP, 0.1 M KCl, pH 6.9) overnight at 4 °C. F-actin was incubated with 6-fold molar excess Alexa488SE (Invitrogen) dissolved in DMF (dimethylformamide) for 1 h. The reaction was terminated with 10 mM Tris-HCl (pH 7.8). After ultracentrifugation (32,800 ×*g*, 40 min, 20 °C) of the sample the pellet was resuspended and homogenized. Actin was kept for 1 h on ice to depolymerize by itself. By applying of PD-10 column (GE Healthcare) unbound dye was removed. The labelled G-actin was polymerized by adding 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ for 30 min at room temperature. F-actin was centrifuged (328,000*g*, 40 min, 20 °C) and the pellet was dissolved in G buffer (5 mM Tris-HCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.2 mM ATP, 1 mM DTT, 0.01% NaN_3) and dialyzed overnight in G buffer at 4 °C in dark. Labelled G-actin concentration was defined with Jasco V-660 spectrophotometer (extinction coefficient of 1.11 mg^{-1} ml cm^{-1} at 280 nm) by using 0.46 as a correction factor at 280 nm. Concentration of Alexa488SE was calculated spectrophotometrically (extinction coefficient at 495 nm 71,000 M^{-1} cm^{-1}). The labelling ratio was 0.4–0.6.

2.3. Fluorescence Anisotropy Experiments

Steady-state fluorescence measurements were performed with a Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 fluorimeter (Longjumeau Cedex, France), which contains a thermostated sample holder. The IAEDANS labelled Mg-G-actin in buffer A was polymerized in the presence of 2 mM $MgCl_2$ and 100 mM KCl for two hours at room temperature. The applied concentration of IAEDANS labelled Mg-F-actin was kept on a constant level (5 μM). The steady fluorescence anisotropy of F-actin was monitored in the presence of increasing twinfilin concentration (0-60 μM) while the excitation and emission wavelength was 350 and 479 nm, respectively. The affinity of the twinfilin for Mg-F-actin was determined by using the following equation [45]:

$$\frac{\Delta r}{\Delta r_{max}} = \frac{r - r_{min}}{r_{max} - r_{min}} = \frac{(L_{tot} + P_{tot} + K_D) \pm \sqrt{(L_{tot} + P_{tot} + K_D)^2 - 4 \cdot P_{tot} \cdot L_{tot}}}{2 \cdot P_{tot}} \quad (1)$$

where Δr is the difference of measured anisotropy value (r) and anisotropy value for the fluorescently labelled uncomplexed protein (r_{min}), the Δr_{max} is the difference of the highest anisotropy for the fluorescently labelled protein in complex with its ligand (r_{max}) and r_{min}, L_{tot} is total ligand concentration, P_{tot} is total protein concentration and K_D is the equilibrium dissociation constant.

2.4. Actin Depolymerization Assay

Pyrene labelled G-actin was applied to monitor the actin filament depolymerization kinetics. Mg-G-actin labelled with pyrene was polymerized in the presence of 2 mM $MgCl_2$ and 100 mM KCl in the sample cuvette. The actin filaments (1 μM) depolymerization was followed in the absence or presence of twinfilin-1 (1.3 μM) after diluting the actin to 0.02 μM at different pH values while the excitation and emission wavelength was 365 and 407 nm, respectively. The depolymerization rate was defined from the slope of the linear fit to the initial part of the time dependence (the first 120 s) of the pyrene fluorescence curves.

2.5. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM)

TIRFM experiments were performed as it was described previously [46]. Flow cells were incubated with N-ethylmaleimide myosin and washed extensively with myosin buffer (F buffer supplemented with 0.5 M KCl) two times. As a next step 0.1% (w/v) BSA (in F buffer) was added and equilibrated with TIRFM buffer (0.5% (w/v) methylcellulose, 10% (w/v) BSA, 10 mM 1,4-diazabicyclo- [2,2,2]octane (DABCO) and 100 mM DTT in F buffer). Depolymerization of 0.5 μM Mg^{2+}-F-actin (containing 10% Alexa488SE-G-actin) was followed in the absence and presence of twinfilin-1 (1.53 μM) in buffer F (0.5% methylcellulose, 100 mM DTT, 10 mM DABCO, 0.5% BSA, 100 mM KCl and 2 mM $MgCl_2$). Images were recorded in every 10 s with an Olympus IX81 microscope equipped with a laser-based (491 nm) TIRFM system using an ApoTIRFM 60× NA 1.45 oil objective and a Hamamatsu CCD camera. Time lapse images were analyzed with Fiji software. The depolymerization rates of actin filaments in μm/s were determined using the Multiple kymograph plugin and the length of filament in subunits per second was transformed by using 370 subunits per micron of filament as a reference [47].

2.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC) Experiments

The DSC measurements were carried out with a Setaram Micro DSC II (Longjumeau, France) calorimeter. The heat denaturation curves were recorded between 0 °C and 100 °C with 0.3 K/min scanning rate. The G-actin was polymerized in G buffer (4 mM MOPS, 0.2 mM ATP, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM MEA, and 0.005% NaN_3, pH 8.0) in the presence of 100 mM KCl and 2 mM $MgCl_2$ for 2 h and the F-actin was incubated with twinfilin at least 1 h at room temperature. The Mg-F-actin concentration was 46 μM (2 mg/ml) while the concentration of twinfilin was 7.5 μM. The heating of the sample was repeated after a cooling phase to check the reversibility of the thermal denaturation of the sample proteins. The data obtained from the first heating was adjusted by subtracting the second calorimetric trace from it. The heat flow was plotted against the temperature and was further analyzed by using the Origin Pro 8 software. The melting temperatures (T_m) of the proteins were determined from the peak of the heat denaturation curves of the samples.

3. Results and Discussion

To investigate the effect of mouse twinfilin-1 on the structure and dynamics of rabbit skeletal muscle actin fluorescence spectroscopy, TIRF microscopy and DSC measurements were performed.

The binding of TWF to F-actin was tested by steady-state fluorescence anisotropy. 5 μM IAEDANS labelled Mg-actin filaments were titrated with increasing concentrations of twinfilin from 0 to 60 μM in 15 steps. The steady-state anisotropy value for IAEDANS labelled G-actin and F-actin was 0.147 ± 0.003 and 0.245 ± 0.001, respectively. During the titration the fluorescence anisotropy of F-actin decreased to 0.188 ± 0.005 in the presence of 60 μM twinfilins-1 (Fig. 1). The affinity of the applied actin binding protein to actin can be revealed by fitting Eq. (1) to the data points. The calculated equilibrium dissociation constant (K_D) for the Mg-F-actin – twinfilin complex is 25.7 ± 8.5 μM. The decrease of the steady-state anisotropy can be related to the binding of twinfilin to F-actin. Extrapolating to infinite twinfilin concentration resulted in a limiting anisotropy value of 0.155 ± 0.012. This value is close to that observed in separate experiments for the anisotropy of G-actin ($r_{G\text{-}actin}$ = 0.147 ± 0.003). In agreement with previous reports [48] we concluded that the decrease of the anisotropy was related to the sequestering function of twinfilin. Parallel to the isolation of the actin fragments the direct severing activity of twinfilins can also be involved in the appearance of the decreased steady state anisotropy values.

Dilution-induced depolymerization assay was also performed to verify the effect of twinfilin-1 on the dynamics of actin depolymerization. During the experiments 1 μM pyrene labelled F-actin was diluted to 20 nM to trigger the net disassembly of the actin filaments. As the 20 nM is below the critical concentration of actin ($actin_{cc}$ ~ 100 nM) the actin filaments are depolymerized. Under these conditions the reversal effect of the free G-actin on the kinetics of F-actin depolymerization can also be excluded [49]. During the experiments the fluorescence

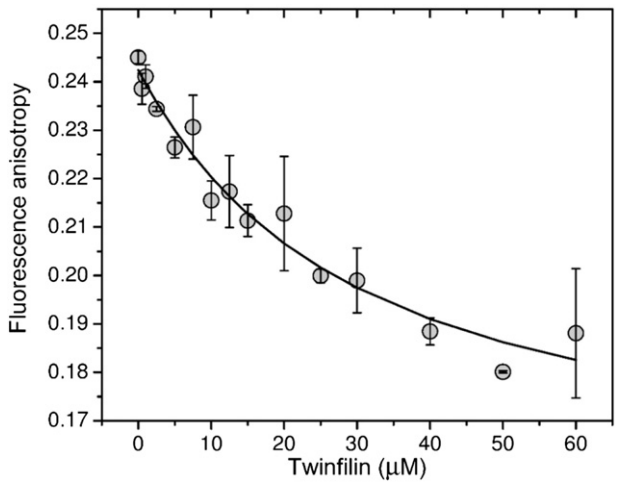


Fig. 1. Binding of mouse twinfilin-1 to the F-actin is monitored by fluorescence anisotropy. The steady-state fluorescence anisotropy of IAEDANS labelled F-actin (5 μM) was plotted against the increasing twinfilin-1 concentration (0–60 μM). The curve was fitted to the data points by using Eq. (1). In the presence of increasing twinfilin concentration the anisotropy of F-actin decreased to the level of 0.188 ± 0.005, that is typical for the IAEDANS labelled G-actin. The error bars represent the standard deviation (SD) values calculated from the results of at least three independent experiments. The calculated K_D value is 25.7 ± 8.5 μM.

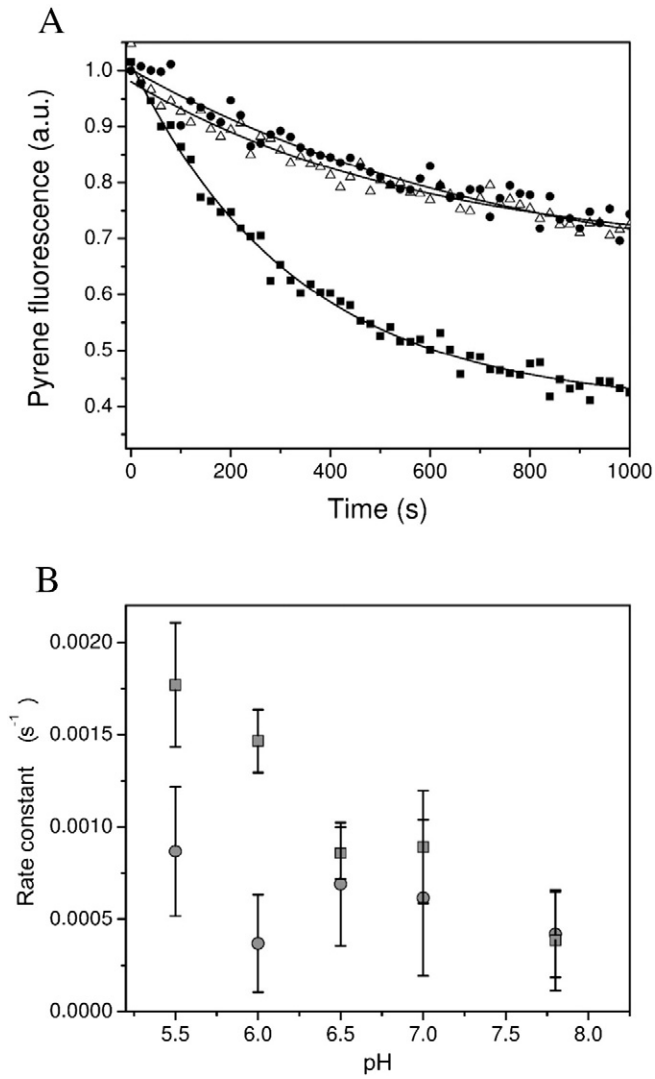


Fig. 2. The effect of twinfilin-1 on the depolymerization of actin. A. The figure represents the typical experimental data for dilution-induced depolymerization of F-actin (1 μM to 0.02 μM) alone (empty triangle) or in the presence (black squares) of twinfilin-1 (1.3 μM) or Lat-A (filled circle) at pH 6.0. B. The rate constant of actin depolymerization is determined by the slope of a linear fit to depolymerization curves in pH dependent manner. The rate constant of actin alone (20 nM) (grey circle) does not show significant change as a function of pH, while the actin rate constant (20 nM) (grey squares) changed significantly in the presence of twinfilin-1 (1.3 μM). The presented error bars represent the standard deviation (SD) values calculated from the results of at least three independent experiments.

intensity of pyrene decreases proportionally to the decrease of the actin filament concentration. As the actin monomers do not affect the depolymerization the sequestering function of an actin binding protein can also be eliminated by these experiments. The severing function of an actin binding protein can be more specifically explored by this assay.

It was described previously that yeast twinfilin can function as an actin filament severing protein at pH values below 6.0 [29]. In our measurements the effect of mouse twinfilin-1 on actin depolymerization was studied at different pH values. In these experiments mouse twinfilin was added to pyrene labelled actin filaments (pyrene labelling ratio was ~50%) and the change in the fluorescence emission of pyrene was monitored (Fig. 2). The concentration of twinfilin was 1.3 μM which suggest that about 5% of actin was in complex with twinfilin-1 and about 96% of the twinfilin-1 was unbound in the solution. The measurements were performed at six different pH values between pH 5.0 and 7.8.

With the depolymerization experiments we focused on the effect of twinfilin-1 on the depolymerization process instead of the local changes induced by the complex formation by twinfilin-1 and F-actin. Moseley and colleagues concluded before that twinfilin-1 might affect the pyrene fluorescence in depolymerization assays but the main effect of twinfilin-1 is related to the changes induced after the binding to actin filaments [29].

The depolymerization rate constants were determined from the slope of a linear fit to the initial part of the exponentially changing fluorescence of pyrene.

Latrunculin-A (Lat-A) was used as a control with sequestering function. In our measurements the Lat-A (5 μM) did not causes any effect in the depolymerization of actin filament as we expected (Fig. 2A). Twinfilin induced a more prominent decrease in the fluorescence signal compared to sample where actin was present alone.

In the measurements the rate constant has changed from $8.7 \times 10^{-4} \pm 3.5 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ to $4.2 \times 10^{-4} \pm 2.3 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ in the absence of twinfilin-1 as the pH increased from 5.5 to 7.8. When twinfilin-1 (1.3 μM) was also present in the sample the rate constant changed from $17.7 \times 10^{-4} \pm 3.4 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ to $3.8 \times 10^{-4} \pm 2.7 \times 10^{-4}\ s^{-1}$ with the increasing pH values (Fig. 2B). These results suggest that the applied twinfilin isoform has a pH sensitive actin filament severing activity.

TIRF microscopy was used to allow real-time visualization of the direct effect of twinfilins-1 on individual actin filaments. The spectroscopic experiments (Fig. 2B) showed that the twinfilin-1 dependence of the depolymerization was most prominent at pH 6.0 while no twinfilin dependence was observed at pH 7.8 (Fig. 2B). To see the maximum difference in the effect of twinfilins-1 the TIRFM measurements at these two pH values. The length of actin filaments and the rate constants of actin depolymerization were determined in the absence and presence of twinfilin-1. At first 0.5 μM Mg^{2+}-G-actin (containing 10% Alexa488SE-G-actin) was polymerized for 400 s in flow cells. The free monomers remaining after the polymerization were washed out and F-buffer or twinfilin in F buffer were added to promote the depolymerization of the actin filaments. The actin filaments disassembly was monitored for 400 s with 10 s long gaps between the images. The average filament lengths were compared in the absence and in the presence of 1.53 μM twinfilins-1. At pH 7.8 the average filament length was 3.7 ± 1.49 μm and 3.48 ± 1.56 μm after depolymerization in the absence and presence

of twinfilin-1, respectively. At pH 6.0 the value of this parameter significantly decreased from 3.05 ± 1.27 μm to 1.69 ± 0.74 μm in the presence of twinfilin-1. The average rate of depolymerization was calculated based on the length change during the available time period in the absence and presence of twilfilin-1 at both pH values.

The average rate of depolymerization was 6.41 ± 1.89 subunits/s without and 7.24 ± 3.14 subunits/s with twinfilin-1 at pH 7.8. The mean filamental depolymerization rate was 6.18 ± 1.49 subunits/s in the absence and 9.29 ± 2.69 subunits/s in the presence of twinfilin-1 at pH 6.0. Based on these results it was concluded that twinfilin-1 can effectively severe the actin filaments at low pH values. The total number of the actin filaments decreased by ~47% at pH 6.0 as a result of effective depolymerization of the actin filaments at this low pH value. This change was not observed at pH 7.8. With these TIRFM experiments it is possible to verify the existence of the pH dependent severing activity of mouse twinfilin-1.

Differential scanning calorimetry measurements were completed to describe the effect of twinfilin on the thermodynamic stability of Mg-F-actin. When only 46 μM (2 mg/ml) F-actin was present in the solution only a single denaturation peak was identified at 66.5 °C (Fig. 3A). This T_m value is in good agreement with our previously recorded data [50].

The heat denaturation curve of actin filaments was also recorded in the presence of twinfilin-1. When 7.5 μM twinfilin was added to 46 μM (2 mg/ml) F-actin a complex peak was obtained that could be resolved into the three individual curves of the components (Fig. 3B).

The peak with the lowest melting temperature (54.6 °C) can be related to the presence of actin monomers [13] while the peak with 59.2 °C can be connected to the G-actin-twinfilin complex [13]. The peak with the highest T_m value (63.23 °C) is a new component that was not observed before. It is reasonable to assume that this peak is a descendant of F-actin based on the close proximity of its T_m value to that observed for the actin filaments in the absence of twinfilin (66.5 °C).

Twinfilin has to bind to F-actin at first when it start to decompose the actin filaments. A binding equilibrium can probably be reached when the supply of twinfilin is limited. In this case the severing activity cannot be completed effectively. The result would be a population of actin polymers which are partially disintegrated and bind the effector molecule in a certain quantity. Based on these considerations the 63.23 °C T_m value probably belongs to the twinfilin–F-actin complex and the partially disintegrated actin filament in the sample.

As the T_m in this case is lower than in case of the F-actin it seems that twinfilin loosen the molecular connections between the neighboring actin protomers within the actin filaments just before the separation of the protomers from the polymeric actin. Compared to the twinfilin–G-actin complex where the T_m value was 59.04 °C [13], it seems that the twinfilin–F-actin complex (T_m = 63.23 °C) is in a thermodynamically more stable conformation.

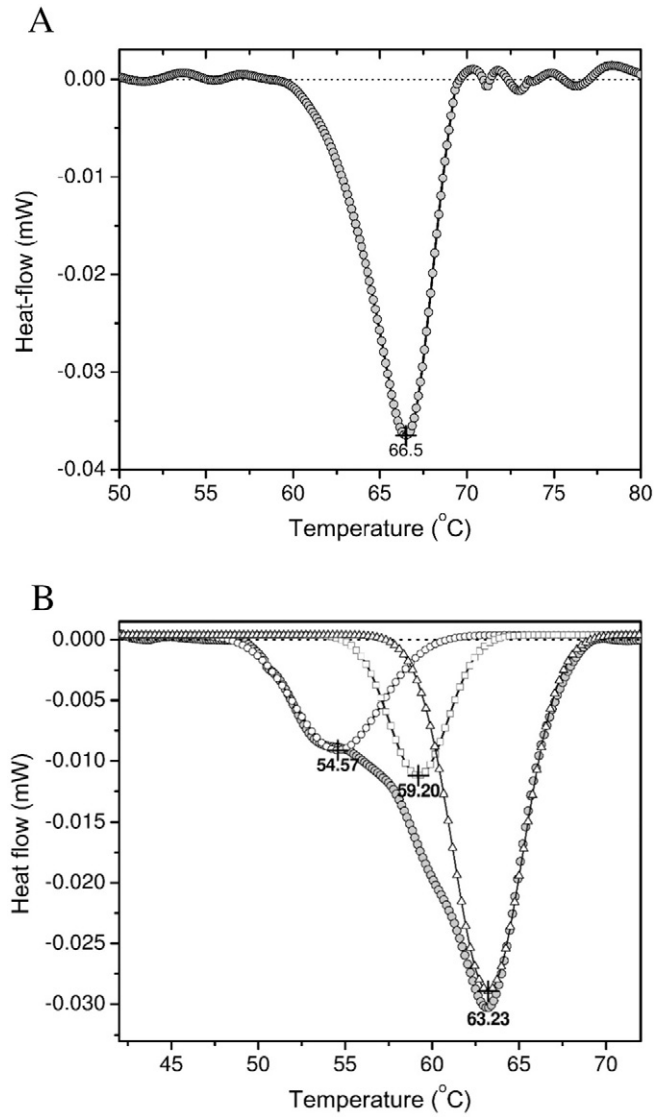


Fig. 3. The denaturation curve of Mg-F-actin in complex with twinfilin-1. A. The melting temperature (T_m) of actin filament was 66.5 °C when 46 μM F-actin was used in the DSC measurements. B. 46 μM F-actin was measured in the presence of 7.5 μM twinfilin. The original denaturation curve (filled circle) was decomposed into three individual components with distinct T_m values. The T_m 54.57 °C (empty circle) can be related to the presence of actin monomers, while the peak with 59.2 °C can be connected to the G-actin-twinfilin complex (empty square). The T_m value of 63.23 °C most probably belongs to the twinfilin affected F-actin components (empty triangle). The figures show the representative denaturation curves for the Mg-F-actin in the absence and presence of twinfilin-1.

4. Conclusion

It was proved before that budding yeast twinfilin (Twf1) can efficiently bind and severe actin filaments *in vitro* at low pH values [29]. In the present work the effects of mammalian twinfilin-1 on the structure and dynamics of actin filaments were studied with different biophysical techniques.

Steady-state anisotropy revealed that twinfilin can bind to F-actin with a K_D of 25.7 ± 8.5 μM.

To test the effect of twinfilin-1 on the dynamics of actin's depolymerization as well dilution-induced depolymerization assay was also performed. The calculated rate constant of the actin depolymerization clearly showed that the depolymerization rate decreased as the pH changed from 5 to 7.8. These results indicated that mammalian twinfilin-1 has a pH sensitive actin filament severing activity as well. TIRFM measurements further supported the existence of the pH dependent severing activity of mouse twinfilin-1.

One would assume that twinfilin and other actin severing proteins can change the conformation of the actin filaments to prepare them for efficient severing. Little has been published previously regarding this transient conformational state of actin filaments. Our DSC measurements demonstrated that the transient actin conformation can co-exist with the conformation characteristic for the filaments in the absence of severing proteins. We observed that after binding the filaments mammalian twinfilin-1 reduced the rigidity within the actin filaments. This conformational state of actin is probably the transient conformation that foster actin filament severing. Our observation can be explained by assuming weaker connections between the neighboring actin protomers in the filaments. This structural reorganization of actin can support the twinfilin induced separation of actin protomers.

All the measured data indicate that mammalian twinfilin-1 is able to accelerate the monomers dissociation and/or sever the filaments effectively at low pH values. Interestingly, significant effect of twinfilin-1 was not detected at high pH values. This behavior of the mammalian twinfilin-1 is similar to that observed for yeast twinfilin-1 [29].

One feasible explanation for the observed effect of twinfilin-1 may be related to situations when the intracellular pH is lower that the physiological values. The role of twinfilin-1 was successfully proved in some pathological situations [34,51,52]. In case of some ischemic diseases the decrease of the intracellular pH was detected [53]. Based on these considerations we propose that twinfilin can have an important regulatory effect on F-actin decomposition in some special biological processes or under stress situations where the pH is markedly lower than the physiological value.

Acknowledgements

We thank Beáta Bugyi for providing Alexa488SE labelled actin and for her helpful discussions. Additionally thanks to Csaba Gábor Talián for providing pyrene labelled actin and his beneficial advises in actin depolymerization assays. This study was supported by a grant from the Hungarian Science Foundation (NKFIH) K112794 (to MNy), grants from the Hungarian National Office for Research and Technology (GVOP-3.2.1.-2004-04-0190/3.0 and GVOP-3.2.1.-2004-04-0228/3.0 (to MNy)) and by the Grant of PTE ÁOK-KA-2013/1 (to GH). This work was also supported by 'Science, Please! Research Team on Innovation' (SROP-4.2.2/08/1/2008-0011) program and by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4. A/2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program'. The Setaram Micro DSC II (Longjumeau, France) calorimeter was supported by grant from the Hungarian Scientific Research Found (NKFIH) CO-272 (DL).

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

References

[1] T.D. Pollard, J.A. Cooper, Actin, a central player in cell shape and movement, Science 326 (2009) 1208–1212.
[2] T.D. Pollard, G.G. Borisy, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, Cell 112 (2003) 453–465.
[3] D. Pantaloni, C. Le Clainche, M.F. Carlier, Mechanism of actin-based motility, Science 292 (2001) 1502–1506.
[4] B. Bugyi, G. Papp, G. Hild, D. Lorinczy, E.M. Nevalainen, P. Lappalainen, B. Somogyi, M. Nyitrai, Formins regulate actin filament flexibility through long range allosteric interactions, J. Biol. Chem. 281 (2006) 10727–10736.
[5] L. Czimbalek, V. Kollar, R. Kardos, D. Lorinczy, M. Nyitrai, G. Hild, The effect of toxofilin on the structure and dynamics of monomeric actin, FEBS Lett. 589 (2015) 3085–3089.
[6] C.G. dos Remedios, D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, N.J. Nosworthy, Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments, Physiol. Rev. 83 (2003) 433–473.
[7] G. Hild, B. Bugyi, M. Nyitrai, Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function, Cytoskeleton 67 (2010) 609–629.
[8] G. Hild, L. Kalmar, R. Kardos, M. Nyitrai, B. Bugyi, The other side of the coin: functional and structural versatility of ADF/cofilins, Eur. J. Cell Biol. 93 (2014) 238–251.
[9] R. Kardos, E. Nevalainen, M. Nyitrai, G. Hild, The effect of ADF/cofilin and profilin on the dynamics of monomeric actin, Biochim. Biophys. Acta 1834 (2013) 2010–2019.
[10] R. Kardos, K. Pozsonyi, E. Nevalainen, P. Lappalainen, M. Nyitrai, G. Hild, The effects of ADF/cofilin and profilin on the conformation of the ATP-binding cleft of monomeric actin, Biophys. J. 96 (2009) 2335–2343.
[11] P. Lappalainen, M.M. Kessels, M.J. Cope, D.G. Drubin, The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module, Mol. Biol. Cell 9 (1998) 1951–1959.
[12] V.O. Paavilainen, E. Bertling, S. Falck, P. Lappalainen, Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins, Trends Cell Biol. 14 (2004) 386–394.
[13] V. Takacs-Kollar, M. Nyitrai, G. Hild, The effect of mouse twinfilin-1 on the structure and dynamics of monomeric actin, Biochim. Biophys. Acta 1864 (2016) 840–846.
[14] G. Hild, M. Nyitrai, J. Belagyi, B. Somogyi, The influence of divalent cations on the dynamic properties of actin filaments: a spectroscopic study, Biophys. J. 75 (1998) 3015–3022.
[15] G. Hild, M. Nyitrai, B. Somogyi, Intermonomer flexibility of Ca- and Mg-actin filaments at different pH values, Eur. J. Biochemistry/FEBS 269 (2002) 842–849.
[16] J. Orban, D. Lorinczy, M. Nyitrai, G. Hild, Nucleotide dependent differences between the alpha-skeletal and alpha-cardiac actin isoforms, Biochem. Biophys. Res. Commun. 368 (2008) 696–702.
[17] T.D. Pollard, Mechanics of cytokinesis in eukaryotes, Curr. Opin. Cell Biol. 22 (2010) 50–56.
[18] B. Visegrady, D. Lorinczy, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai, A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide, FEBS Lett. 579 (2005) 6–10.
[19] N. Yonezawa, E. Nishida, H. Sakai, pH control of actin polymerization by cofilin, J. Biol. Chem. 260 (1985) 14410–14412.
[20] K.P. Normoyle, W.M. Brieher, Cyclase-associated protein (CAP) acts directly on F-actin to accelerate cofilin-mediated actin severing across the range of physiological pH, J. Biol. Chem. 287 (2012) 35722–35732.
[21] K. Nomura, K. Hayakawa, H. Tatsumi, S. Ono, Actin-interacting protein 1 promotes disassembly of actin-depolymerizing factor/cofilin-bound actin filaments in a pH-dependent manner, J. Biol. Chem. 291 (2016) 5146–5156.
[22] J.A. Theriot, The polymerization motor, Traffic 1 (2000) 19–28.
[23] H. Hatanaka, K. Ogura, K. Moriyama, S. Ichikawa, I. Yahara, F. Inagaki, Tertiary structure of destrin and structural similarity between two actin-regulating protein families, Cell 85 (1996) 1047–1055.
[24] P.J. Ojala, V.O. Paavilainen, M.K. Vartiainen, R. Tuma, A.G. Weeds, P. Lappalainen, The two ADF-H domains of twinfilin play functionally distinct roles in interactions with actin monomers, Mol. Biol. Cell 13 (2002) 3811–3821.
[25] M.K. Vartiainen, E.M. Sarkkinen, T. Matilainen, M. Salminen, P. Lappalainen, Mammals have two twinfilin isoforms whose subcellular localizations and tissue distributions are differentially regulated, J. Biol. Chem. 278 (2003) 34347–34355.
[26] E. Helfer, E.M. Nevalainen, P. Naumanen, S. Romero, D. Didry, D. Pantaloni, P. Lappalainen, M.F. Carlier, Mammalian twinfilin sequesters ADP-G-actin and caps filament barbed ends: implications in motility, EMBO J. 25 (2006) 1184–1195.
[27] E.M. Nevalainen, A. Skwarek-Maruszewska, A. Braun, M. Moser, P. Lappalainen, Two biochemically distinct and tissue-specific twinfilin isoforms are generated from the mouse Twf2 gene by alternative promoter usage, Biochem. J. 417 (2009) 593–600.
[28] V.O. Paavilainen, M. Hellman, E. Helfer, M. Bovellan, A. Annila, M.F. Carlier, P. Permi, P. Lappalainen, Structural basis and evolutionary origin of actin filament capping by twinfilin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 3113–3118.
[29] J.B. Moseley, K. Okada, H.I. Balcer, D.R. Kovar, T.D. Pollard, B.L. Goode, Twinfilin is an actin-filament-severing protein and promotes rapid turnover of actin structures in vivo, J. Cell Sci. 119 (2006) 1547–1557.
[30] S. Falck, V.O. Paavilainen, M.A. Wear, J.G. Grossmann, J.A. Cooper, P. Lappalainen, Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction, EMBO J. 23 (2004) 3010–3019.
[31] S. Palmgren, P.J. Ojala, M.A. Wear, J.A. Cooper, P. Lappalainen, Interactions with PIP2, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin, J. Cell Biol. 155 (2001) 251–260.
[32] A.K. Wolven, L.D. Belmont, N.M. Mahoney, S.C. Almo, D.G. Drubin, In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin, J. Cell Biol. 150 (2000) 895–904.
[33] C.E. Meacham, E.E. Ho, E. Dubrovsky, F.B. Gertler, M.T. Hemann, In vivo RNAi screening identifies regulators of actin dynamics as key determinants of lymphoma progression, Nat. Genet. 41 (2009) 1133–1137.
[34] Q. Li, X.W. Song, J. Zou, G.K. Wang, E. Kremneva, X.Q. Li, N. Zhu, T. Sun, P. Lappalainen, W.J. Yuan, Y.W. Qin, Q. Jing, Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy, J. Cell Sci. 123 (2010) 2444–2452.
[35] S. Yamada, E. Uchimura, T. Ueda, T. Nomura, S. Fujita, K. Matsumoto, D.P. Funeriu, M. Miyake, J. Miyake, Identification of twinfilin-2 as a factor involved in neurite outgrowth by RNAi-based screen, Biochem. Biophys. Res. Commun. 363 (2007) 926–930.
[36] A.K. Rzadzinska, E.M. Nevalainen, H.M. Prosser, P. Lappalainen, K.P. Steel, MyosinVIIa interacts with Twinfilin-2 at the tips of mechanosensory stereocilia in the inner ear, PLoS One 4 (2009), e7097.
[37] G. Feuer, F. Molnar, et al., Studies on the composition and polymerization of actin, Hung. Acta Physiol. 1 (1948) 150–163.
[38] M. Mossakowska, J. Belagyi, H. Strzelecka-Golaszewska, An EPR study of the rotational dynamics of actins from striated and smooth muscle and their complexes with heavy meromyosin, Eur. J. Biochemistry/FEBS 175 (1988) 557–564.
[39] J.A. Spudich, S. Watt, The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin, J. Biol. Chem. 246 (1971) 4866–4871.
[40] T.W. Houk Jr., K. Ue, The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods, Anal. Biochem. 62 (1974) 66–74.
[41] M. Elzinga, J.H. Collins, W.M. Kuehl, R.S. Adelstein, Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 70 (1973) 2687–2691.
[42] M. Miki, C.G. dos Remedios, J.A. Barden, Spatial relationship between the nucleotide-binding site, Lys-61 and Cys-374 in actin and a conformational change induced by myosin subfragment-1 binding, Eur. J. Biochemistry/FEBS 168 (1987) 339–345.
[43] E.N. Hudson, G. Weber, Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents, Biochemistry 12 (1973) 4154–4161.
[44] A.H. Criddle, M.A. Geeves, T. Jeffries, The use of actin labelled with N-(1-pyrenyl)iodoacetamide to study the interaction of actin with myosin subfragments and troponin/tropomyosin, Biochem. J. 232 (1985) 343–349.
[45] L. Blanchoin, T.D. Pollard, Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments, J. Biol. Chem. 274 (1999) 15538–15546.
[46] S. Barko, B. Bugyi, M.F. Carlier, R. Gombos, T. Matusek, J. Mihaly, M. Nyitrai, Characterization of the biochemical properties and biological function of the formin homology domains of *Drosophila* DAAM, J. Biol. Chem. 285 (2010) 13154–13169.

[47] J. Hanson, J. Lowy, The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle, J. Mol. Biol. 6 (1963) 46–60.
[48] B.L. Goode, D.G. Drubin, P. Lappalainen, Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by twinfilin, a ubiquitous actin monomer-sequestering protein, J. Cell Biol. 142 (1998) 723–733.
[49] M.L. Cano, D.A. Lauffenburger, S.H. Zigmond, Kinetic analysis of F-actin depolymerization in polymorphonuclear leukocyte lysates indicates that chemoattractant stimulation increases actin filament number without altering the filament length distribution, J. Cell Biol. 115 (1991) 677–687.
[50] J. Orbán, K. Pozsonyi, K. Szarka, S. Barkó, E. Bódis, D. Lőrinczy, Thermal characterisation of actin filaments prepared from ADP-actin monomers, J. Therm. Anal. Calorim. 84 (2006) 619–623 3 (2006).
[51] J. Bockhorn, R. Dalton, C. Nwachukwu, S. Huang, A. Prat, K. Yee, Y.F. Chang, D. Huo, Y. Wen, K.E. Swanson, T. Qiu, J. Lu, S.Y. Park, M.E. Dolan, C.M. Perou, O.I. Olopade, M.F. Clarke, G.L. Greene, H. Liu, MicroRNA-30c inhibits human breast tumour chemotherapy resistance by regulating TWF1 and IL-11, Nat. Commun. 4 (2013) 1393.
[52] J. Bockhorn, K. Yee, Y.F. Chang, A. Prat, D. Huo, C. Nwachukwu, R. Dalton, S. Huang, K.E. Swanson, C.M. Perou, O.I. Olopade, M.F. Clarke, G.L. Greene, H. Liu, MicroRNA-30c targets cytoskeleton genes involved in breast cancer cell invasion, Breast Cancer Res. Treat. 137 (2013) 373–382.
[53] S.A. Gabel, H.R. Cross, R.E. London, C. Steenbergen, E. Murphy, Decreased intracellular pH is not due to increased H+ extrusion in preconditioned rat hearts, Am. J. Phys. 273 (1997) H2257–H2262.

J Therm Anal Calorim (2017) 127:1261–1266
DOI 10.1007/s10973-016-5968-7

Resolving the similarities and differences between the effect of structurally different actin-binding proteins on the thermodynamic properties of G-actin

Veronika Takács-Kollár[1] · Miklós Nyitrai[1,2,3] · Dénes Lőrinczy[1] · Gábor Hild[1,4]

Received: 16 October 2016 / Accepted: 14 November 2016 / Published online: 23 November 2016
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2016

Abstract Differential scanning calorimetry was applied to compare the effects of mammalian twinfilin-1 or toxofilin on the thermodynamic properties of actin monomer. Although twinfilin and toxofilin have different structure and actin-binding sites, they similarly increased the thermodynamic stability of monomeric actin. The mammalian twinfilin increased, while the toxofilin did not significantly change the $T_{1/2}$ value (the width at half-height of the transition peak) during the complex formation between the actin and the monomer binding proteins. In case of toxofilin, the E_A value (activation energy) significantly increased compared to twinfilin where the activation energy was nearly insensitive to the complex formation. It seems that toxofilin can achieve its main function as an actin monomer sequestering protein by more effectively and consistently modifying the basic thermodynamic properties of the monomeric actin.

Keywords Actin · DSC · Mouse twinfilin-1 · Toxofilin

✉ Dénes Lőrinczy
denes.lorinczy@aok.pte.hu

✉ Gábor Hild
gabor.hild@aok.pte.hu

[1] Department of Biophysics, University of Pécs, Medical School, Szigeti Str. 12, Pécs 7624, Hungary

[2] Szentágothai Research Center, Ifjúság Str. 34, Pécs 7624, Hungary

[3] MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Szigeti Str. 12, Pécs 7624, Hungary

[4] Department of Radiology, University of Pécs, Medical School, Ifjúság Str. 13, Pécs 7624, Hungary

Introduction

Actin is one of the most important components of cytoskeleton which determines many processes in cells and as an essential part of the skeletal muscle that transmits force from the myosin filaments. Actin exists in monomeric (G-actin) and/or filamentous (F-actin) form and has large number of interacting partners [1–4]. Major functions of actin are regulated by actin-binding proteins. The thermodynamic properties of actin monomer were investigated with thermoanalytical techniques before. These studies revealed that the thermodynamic properties of G-actin depend largely on the bound ions and nucleotides [5–7]. The actin-binding proteins can efficiently adjust the thermodynamic stability of actin [8–10].

Twinfilins are ~40 kDa proteins composed of two ADF (actin-depolymerising factor)—homologue domains connected by a short linker region plus a C-terminal tail. They are evolutionarily conserved actin-binding proteins that exist from yeast to mammals [11]. During the complex formation, the ratio of actin–twinfilin is 1:1 although they have two potential actin-binding sites. Twinfilin can bind between actin subdomains 1 and 3 based on the crystal structure of twinfilin's C-terminal ADF-H domain in complex with G-actin [12]. Twinfilins are actin monomer binding and sequestering proteins and inhibit actin filament assembly by inhibiting the nucleotide exchange on actin monomers [11, 13]. Like ADF/cofilin, twinfilin binds ADP–G-actin ($K_D = 0.05$ μM) with ~tenfold higher affinity than ATP–G-actin ($K_D = 0.47$ μM) under physiological ionic conditions [14]. Twinfilins have only one isoform in unicellular organism and invertebrates, and three isoforms (twinfilin-1, twinfilin-2a and twinfilin-2b) are in mammals [15, 16].

Toxofilin is a 27 kDa protein that is able to bind to actin monomer ($K_D = 2.3$ μM) and to the ends of actin filaments

as well [17, 18]. Toxofilin has three independent actin-binding regions and forms a ternary complex with an antiparallel actin dimer. This toxofilin–actin complex can bind to the barbed end of the actin filaments [19]. Toxofilin decreases the nucleotide exchange on G-actin and the actin polymerisation rate [18, 19]. Presumably, toxofilin disintegrates the cytoskeleton of host cells hereby increases the ratio of actin monomers [19].

In this study, our aim was to characterise and compare the effects of mouse twinfilin-1 and toxofilin on the thermal unfolding of Ca–G-actin. Although they have very different crystal structure, the two actin-binding proteins show many similarities in their effects on actin monomer. Both twinfilin and toxofilin inhibit the nucleotide exchange on G-actin [16, 19–21], and in the presence of twinfilin or toxofilin, the nucleotide binding cleft is shifted to a closed conformational state [20, 21]. Here, we present a comprehensive study about the details behind the effect of twinfilin and toxofilin on the thermodynamic properties of Ca–ATP–G-actin.

Materials and methods

Chemicals

MOPS [3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid], Tris–HCl, NaCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, imidazole, Luria broth medium, 2X YT Microbial Medium EZMix^{TM} Powder, ampicillin, kanamycin, IPTG (isopropyl–b-D-thiogalactopyranoside), sucrose and thrombin were purchased from Sigma-Aldrich (Budapest, Hungary). ATP (adenosine-5′-triphosphate), MEA (mercaptoethanol), DTT (dithiothreitol) and NaN_3 (sodium azide) were supplied by Merck (Budapest, Hungary).

Sample preparation

Acetone-dried muscle powder was purchased from rabbit skeletal muscle as was described earlier by Feuer et al. [22]. The calcium bound actin monomer was prepared according to the method of Spudich and Watt modified by Mossakowska et al. [23], and Spudich and Watt [24]. The G-actin was stored in buffer A (4 mM Tris–HCl, 0.1 mM $CaCl_2$, 0.2 mM ATP, 0.5 mM MEA and 0.005% NaN_3) at pH 8.0. The G-actin concentration was defined spectrophotometrically with a Jasco V-550 spectrophotometer by using the absorption coefficient of 1.11 mg mL^{-1} cm^{-1} at 280 nm [25]. The relative molecular mass of 42,300 Da was applied for G-actin [26]. During the whole study, Ca–ATP–G-actin was used in the experiments.

His-tagged mammalian twinfilin-1 and toxofilin were obtained in *Escherichia coli* expression system as we described earlier [20, 21]. His-tagged twinfilin construct was grown in Luria broth medium in the presence of 100 μg mL^{-1} ampicilin until the OD of the culture at 600 nm reached 0.6. After induction with 0.2 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, the expression was performed for 3 h at 37 °C. In the next step, the collected cells were lysed, and the supernatant was purified in three steps. Nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column (Qiagen), Q-Sepharose anion-exchange column and Superdex-75 HiLoad gel filtration column (GE Healthcare) were applied to reach the purified proteins. Purified twinfilins were stored in 10 mM Tris buffer (pH 7.5) with 50 mM NaCl and 1 mM DTT at −70 °C. In case of toxofilin, the actin-binding fragment, amino acids 69–196, was used. Toxofilin$_{69–196}$ was grown in 2X YT Microbial Medium EZMix^{TM} Powder in the presence of 30 μg mL^{-1} kanamycin and induced by 1 mM IPTG and performed for overnight at 20 °C. The clarified cell lysated was purified in two steps. At first, a nickel-nitrilotriacetic acid-agarose column (Qiagen, Hungary) was applied. In the next step, His-tag was removed by digestion with thrombin at 4 °C overnight. The concentrated protein loaded onto a Superdex-75 HiLoad gel filtration column (GE Healthcare) to remove thrombin and the cleaved His-tag peptides. Toxofilin$_{69–196}$ was stored in 50 mM Tris (pH 7.3), 50 mM NaCl, 5 mM DTT and 3% sucrose at −70 °C. Proteins concentrations were determined spectrophotometrically, using the molar extinction coefficient of 39,100 M^{-1} cm^{-1} for twinfilin and 4470 M^{-1} cm^{-1} for toxofilin determined with the ProtParam tool.

DSC measurements

The thermal unfolding of the G-actin and actin treated with twinfilin or toxofilin samples was monitored by SETARAM Micro DSC-II calorimeter. All experiments were conducted between 0 and 100 °C. The heating rate was 0.3 K min^{-1} in all cases. Conventional Hastelloy batch vessels were used during the denaturation experiments with 850 μL sample volume in average. Reference sample was normal actin buffer prepared with MOPS. The sample and reference vessels were equilibrated with a precision of ±0.1 mg, so there was no need for any heat capacity correction between the sample and reference. The repeated scan of denatured sample was used as baseline reference, which was subtracted from the original DSC curve.

Calculating the activation energy of thermal denaturation

The method of Sanchez-Ruiz et al. [27] was applied before to explore the activation energy requirement of the protein's thermal denaturation. The analysis was based on the model of Lumry and Eyring [28] whose model was

previously efficiently used to explore the thermodynamic properties of muscle proteins [7, 29, 30]. They interpreted the irreversible protein denaturation process with a two-step kinetic model where a reversible denaturation step is followed by an irreversible phase:

$$N \underset{k_{-1}}{\overset{k_{+1}}{\longleftrightarrow}} D \longrightarrow k_2 I \quad (1)$$

where N is the natural, D is the reversibly denatured, while I is the irreversibly denatured form of the protein. The k_{+1} and k_{-1} are the forward and backward rate constants of the reversible, while the k_2 is the forward rate constant of the irreversible step.

Useful thermodynamic information can be achieved about the reversible unfolding of the protein if k_2 is much smaller compared to the outcome of the reversible step or when the irreversible denaturation is achieved at a different temperature than the melting temperature (T_m) of the thermodynamic conversion of the protein. The activation energy of the protein denaturation can be related to the calorimetric enthalpy change through the following equation:

$$\ln\left(\ln\left(\frac{dH_{cal}}{dH_{cal} - dH}\right)\right) = \frac{E_A}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \quad (2)$$

where dH_{cal} is the total calorimetric enthalpy change in the denaturation, the dH is the calorimetric enthalpy change until the T temperature point, T_m is the melting temperature of the denaturation, E_A is the activation energy and R is the universal gas constant (8.314 J mol^{-1} K^{-1}).

Results and discussion

Actin is highly sensitive for the physico-chemical changes in its environment [2, 31–37]. The change in the dynamics of actin due to different effectors can have a substantial effect on the functionality of cells. The actin-binding proteins can efficiently affect the basic dynamics and structure of actin [1–3, 8, 10, 38–41]. The most frequently seen effect of actin monomer binding proteins on the dynamics of actin is the increase in the thermodynamic stability of the actin monomers [2, 8, 10, 21, 39]. In the present work, the Ca–G-actin was characterised thermodynamically with DSC technique. Also, the Mg–G-actin is thought to be a more physiological species; it was indicated before that under certain conditions at some parts of cells calcium-actin pools may be present transiently, and this pool can affect the function of the actin cytoskeleton locally [42]. The main thermodynamic quantity that was studied so far is the melting temperature (T_m) of the actin monomers. In our study, we further investigated the basic changes behind the complex formation between the actin and two representatives of actin-binding proteins, the twinfilin and toxofilin. In the present measurements, the mammalian twinfilin-1 and the toxofilin69–196 fragment were used as the binding partner of actin monomers. As the main activities of the toxofilin (monomer sequestration and barbed-end capping) can be associated with the applied toxofilin69–196 fragment, it is reasonable to think that studying this part can give valuable information about the function of the whole protein as well. Beside the melting temperature, the $T_{1/2}$ (the denaturating temperature width at half-height of the of the heat flow at the transition peak) and the activation energy were also studied to explore the fundamental changes behind the main thermodynamic changes induced by the actin monomer binding proteins on actin.

The 23 μM Ca–G-actin exhibited a usual unfolding transition at around 56 °C, while the pure 23 μM twinfilin at 54 °C (Fig. 1). In case of the un-complexed twinfilin at around 63 °C, an exothermal transition can be seen that should be clarified in further studies. The T_m value for the actin monomer is in good agreement with our previous results [8]. The complex of the 23 μM Ca–G-actin with 23 μM twinfilin resulted a single transition peak with a shifted T_m value to 59 °C, suggesting a thermodynamically stable Ca–G-actin–twinfilin complex compared to the un-complex actin monomers. Considering that the K_D value is 0.12 ± 0.04 μM for the Ca–G-actin–twinfilin complex, approximately 93% of actin (21.4 μM) was in complex with twinfilin-1 during the DSC measurements [21]. The $T_{1/2}$ values of the heat denaturation curves are defined as

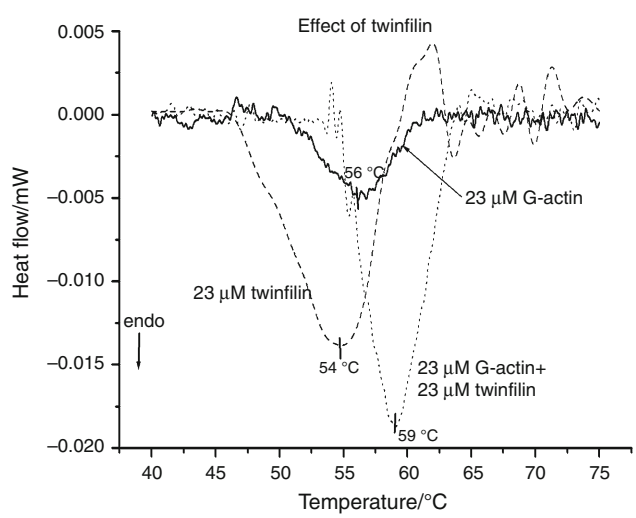


Fig. 1 Thermal denaturation curve of Ca–G-actin alone and in complex with twinfilin. The figure shows the representative heat denaturation curve of 23 μM Ca–G-actin (*thick solid line*) 23 μM twinfilin (*dashed line*) and the 23 μM Ca–G-actin + 23 μM twinfilin complex (*dotted line*). The melting temperature (T_m) is 56 °C for the Ca–G-actin, 54 °C for twinfilin and 59 °C for the Ca–G-actin–twinfilin complex

the width of the transition peak at its half-height value. The $T_{1/2}$ values were used to get information about the cooperativity of the melting of actin [43]. The $T_{1/2}$ of 4.76 K of Ca–G-actin shifted to 5.8 K as the Ca–G-actin formed a complex with twinfilin. The 22% increase in the $T_{1/2}$ can suggest that the cooperativity during the phase transition is smaller for the actin-binding protein bound actin monomers compared to the un-complexed ones. The activation energy of the phase transitions were also calculated for the Ca–G-actin and the twinfilin as well by using Eq. 2 (Fig. 1). The calculated E_A value for Ca–G-actin is 372 kJ mol^{-1}. This value is a bit higher than the calculated values of others (200–290 kJ mol^{-1}) [44], but it can be due to the different methods that were used (DNase I-inhibition assay vs DSC). The calculated E_A value for Ca–G-actin–twinfilin complex was 355 kJ mol^{-1} (Fig. 3). This small 4.6% decrease in the activation energy may suggest that in case of the actin–twinfilin complex, a little bit less energy is needed to initiate the denaturation process than in the case of the un-complexed Ca-bound actin monomers.

In the case of toxofilin (Fig. 2), the T_m value for the free toxofilin was 53.1 °C (experimental not shown), and the denaturation temperature of the Ca–G-actin complex is around 64 °C. The change in T_m for the Ca–G-actin–toxofilin complex similarly to twinfilin suggest that the actin monomers got into a thermodynamically more stable state due to the complex formation with the actin monomer binding protein. Considering that the K_D value is 4.1 ± 1.7 μM for the Ca–G-actin–toxofilin complex, approximately 47% of actin (14.1 μM) was in complex with toxofilin during the DSC measurements. The $T_{1/2}$ decreased about 4% due to the Ca–G-actin–toxofilin

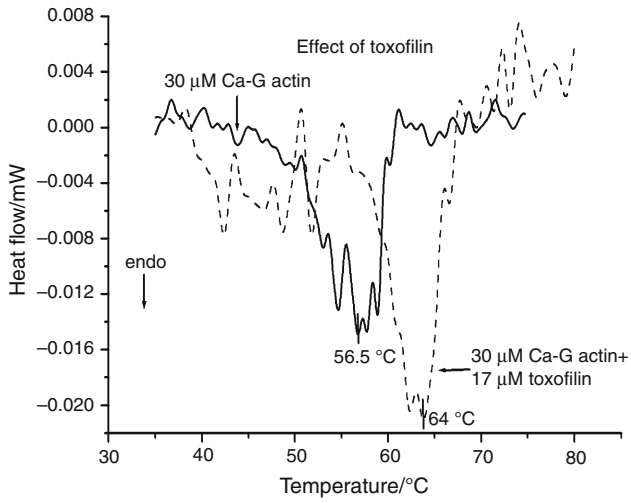


Fig. 2 Heat denaturation curve of Ca–G-actin (*solid line*) and Ca–G-actin in complex with toxofilin (*dashed line*). 30 μM G-actin was used in the DSC measurements alone or in complex with 17 μM toxofilin. The melting temperature (T_m) of actin monomer was 56.5 °C and in the presence of toxofilin this peak shifted to 64 °C

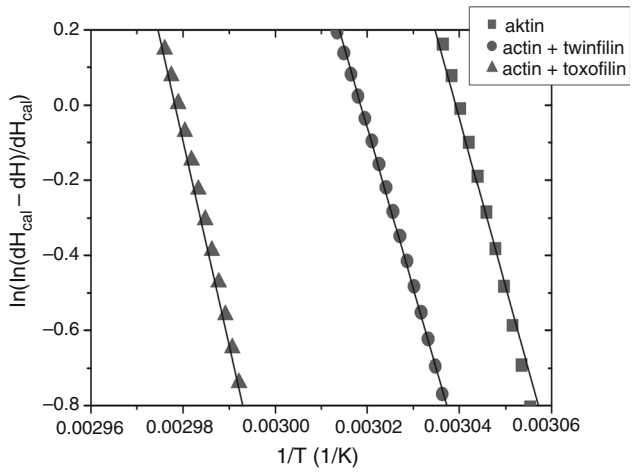


Fig. 3 Calculation of activation energy (E_A) for Ca–G-actin monomers alone (*filled square*) or in complex with twinfilin (*filled circle*) or toxofilin (*filled triangle*) based on the method of Sanchez-Ruiz et al. [27]

complex formation which suggest that the cooperativity during the phase transition of actin was insensitive for the presence of toxofilin. The calculated activation energy for Ca–G-actin–toxofilin complex is 449 kJ mol^{-1} (Fig. 3). The 21% increase in the E_A may suggest that for the actin–toxofilin complex more energy is needed to initiate the denaturation process than in the case of the un-complexed Ca-bound monomeric actin.

Conclusions

The actin-binding proteins can effectively modify the dynamics and structure of actin [1–3, 8, 10, 38–41]. The thermodynamic stability of actin monomers in their complex with the actin monomer binding proteins is usually increased [2, 8, 10, 21, 39]. In the present study, beside the melting temperature (T_m), the $T_{1/2}$ and the activation energy (E_A) were also studied to explore the detailed thermodynamic changes behind the complex formation between two representatives of the actin monomer binding proteins and G-actin.

The mammalian twinfilin-1 shifted the T_m value from 56 to 59 °C while the relative increase in $T_{1/2}$ was around 22% and the E_A value decreased by 17 kJ mol^{-1} during the complex formation with the mammalian Ca–G-actin.

The toxofilin from a parasitic protozoan (Toxoplasma gondii) shifted the T_m to 64 °C while the relative decrease of $T_{1/2}$ was around 4% and the E_A value increased by 94 kJ mol^{-1} during the complex formation with the mammalian Ca–G-actin.

The change in the T_m values suggests that toxofilin increased the thermodynamic stability of actin monomers

more efficiently. The complex between the monomer binding proteins and actin responded less cooperatively to the thermal denaturation than the un-complexed actin monomers in case of twinfilin. The E_A values indicate that to initiate and drive the thermal denaturation of the actin–actin-binding protein complex, more energy is needed in case of the toxofilin than twinfilin.

It was suggested before that the closed conformation of the nucleotide binding cleft can be related to the increased thermal stability of G-actin [8]. As the nucleotide binding cleft of actin is shifted to a closed conformation in the presence of toxofilin and twinfilin [20, 21], it is reasonable to assume that this closed conformational state can contribute to the increased thermodynamic stability of monomeric actin in the presence of the investigated actin-binding proteins. Based on the presented data, it seems that a protozoan originated actin monomer binding protein can achieve its main function as an actin monomer sequestering protein by more effectively and consistently modifying the basic thermodynamic properties of the monomeric actin.

Acknowledgements This study was supported by a Grant from the Hungarian Science Foundation (NKFIH) K112794 (to MNy), Grants from the Hungarian National Office for Research and Technology [GVOP-3.2.1.-2004-04-0190/3.0 and GVOP-3.2.1.-2004-04-0228/3.0 (to MNy)] and by the Grant of PTE ÁOK-KA-2013/1 (to GH). This work was also supported by 'Science, Please! Research Team on Innovation' (SROP-4.2.2/08/1/2008-0011) program and by the European Union and the State of Hungary, co-financed by the European Social Fund in the framework of TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 'National Excellence Program'. The Setaram Micro DSC-II (Caluire, France) calorimeter was supported by grant from the Hungarian Scientific Research Found (NKFIH) CO-272 (DL). The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the foundation of the University of Pécs, Hungary.

References

1. dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. Physiol Rev. 2003;83(2):433–73.
2. Hild G, Bugyi B, Nyitrai M. Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function. Cytoskelet (Hoboken). 2010;67(10):609–29.
3. Lappalainen P. Actin-binding proteins: the long road to understanding the dynamic landscape of cellular actin networks. Mol Biol Cell. 2016;27(16):2519–22.
4. Sheterline P, Clayton J, Sparrow J. Actin. Protein Profile. 1995;2(1):1–103.
5. Könczöl F, Belagyi J, Lőrinczy D. Thermal and dynamic behaviour of the actin monomer in case of different cations. J Therm Anal Calorim. 2013;111:1717–23.
6. Lőrinczy D, Könczöl F, Gaszner B, Belagyi J. Structural stability of actin filaments as studied by DSC and EPR. Thermochim Acta. 1998;322:95–100.
7. Orban J, Lorinczy D, Nyitrai M, Hild G. Nucleotide dependent differences between the alpha-skeletal and alpha-cardiac actin isoforms. Biochem Biophys Res Commun. 2008;368(3):696–702.
8. Kardos R, Nevalainen E, Nyitrai M, Hild G. The effect of ADF/cofilin and profilin on the dynamics of monomeric actin. Biochim Biophys Acta. 2013;1834(10):2010–9.
9. Ozawa H, Watabe S, Ochiai Y. Thermodynamic characterization of muscle tropomyosins from marine invertebrates. Comp Biochem Physiol B: Biochem Mol Biol. 2011;160(2–3):64–71.
10. Pivovarova AV, Chebotareva NA, Kremneva EV, Lappalainen P, Levitsky DI. Effects of actin-binding proteins on the thermal stability of monomeric actin. Biochemistry. 2013;52(1):152–60.
11. Lappalainen P, Kessels MM, Cope MJ, Drubin DG. The ADF homology (ADF-H) domain: a highly exploited actin-binding module. Mol Biol Cell. 1998;9(8):1951–9.
12. Paavilainen VO, Oksanen E, Goldman A, Lappalainen P. Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. J Cell Biol. 2008;182(1):51–9.
13. Goode BL, Drubin DG, Lappalainen P. Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by twinfilin, a ubiquitous actin monomer-sequestering protein. J Cell Biol. 1998;142(3):723–33.
14. Ojala PJ, Paavilainen VO, Vartiainen MK, Tuma R, Weeds AG, Lappalainen P. The two ADF-H domains of twinfilin play functionally distinct roles in interactions with actin monomers. Mol Biol Cell. 2002;13(11):3811–21. doi:10.1091/mbc.E02-03-0157.
15. Nevalainen EM, Skwarek-Maruszewska A, Braun A, Moser M, Lappalainen P. Two biochemically distinct and tissue-specific twinfilin isoforms are generated from the mouse Twf2 gene by alternative promoter usage. Biochem J. 2009;417(2):593–600.
16. Vartiainen MK, Sarkkinen EM, Matilainen T, Salminen M, Lappalainen P. Mammals have two twinfilin isoforms whose subcellular localizations and tissue distributions are differentially regulated. J Biol Chem. 2003;278(36):34347–55.
17. Delorme V, Cayla X, Faure G, Garcia A, Tardieux I. Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on Toxoplasma gondii Toxofilin. Mol Biol Cell. 2003;14(5):1900–12.
18. Poupel O, Boleti H, Axisa S, Couture-Tosi E, Tardieux I. Toxofilin, a novel actin-binding protein from Toxoplasma gondii, sequesters actin monomers and caps actin filaments. Mol Biol Cell. 2000;11(1):355–68.
19. Lee SH, Hayes DB, Rebowski G, Tardieux I, Dominguez R. Toxofilin from Toxoplasma gondii forms a ternary complex with an antiparallel actin dimer. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(41):16122–7.
20. Czimbalek L, Kollar V, Kardos R, Lorinczy D, Nyitrai M, Hild G. The effect of toxofilin on the structure and dynamics of monomeric actin. FEBS Lett. 2015;589(20 Pt B):3085–9.
21. Takacs-Kollar V, Nyitrai M, Hild G. The effect of mouse twinfilin-1 on the structure and dynamics of monomeric actin. Biochim Biophys Acta. 2016;1864(7):840–6.
22. Feuer G, Molnar F, et al. Studies on the composition and polymerization of actin. Hung Acta Physiol. 1948;1(4–5):150–63.
23. Mossakowska M, Belagyi J, Strzelecka-Golaszewska H. An EPR study of the rotational dynamics of actins from striated and smooth muscle and their complexes with heavy meromyosin. Eur J Biochem. 1988;175(3):557–64.
24. Spudich JA, Watt S. The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J Biol Chem. 1971;246(15):4866–71.
25. Houk TW Jr, Ue K. The measurement of actin concentration in solution: a comparison of methods. Anal Biochem. 1974;62(1):66–74.
26. Elzinga M, Collins JH, Kuehl WM, Adelstein RS. Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA. 1973;70(9):2687–91.

27. Sanchez-Ruiz JM, Lopez-Lacomba JL, Cortijo M, Mateo PL. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. Biochemistry. 1988;27(5):1648–52.
28. Lumry R, Eyring H. Conformation changes of proteins. J Phys Chem. 1954;58:110–20.
29. Dergez T, Könczöl F, Farkas N, Belágyi J, Lőrinczy D. DSC study of glycerol-extracted muscle fibers in intermediate states of ATP hydrolysis. JTAC. 2005;80:445–9.
30. Orbán J, Pozsonyi K, Szarka K, Barkó S, Bódis E, Lőrinczy D. Thermal characterisation of actin filaments prepared from ADP-actin monomers. JTAC. 2006;84:619–23.
31. Hild G, Nyitrai M, Belagyi J, Somogyi B. The influence of divalent cations on the dynamic properties of actin filaments: a spectroscopic study. Biophys J. 1998;75(6):3015–22.
32. Hild G, Nyitrai M, Gharavi R, Somogyi B, Belagyi J. Fluorescence quenching of the tryptophan emission from the F- and G-forms of actin. J Photochem Photobiol Biol. 1996;35(3):175–9.
33. Nyitrai M, Hild G, Belagyi J, Somogyi B. Spectroscopic study of conformational changes in subdomain 1 of G-actin: influence of divalent cations. Biophys J. 1997;73(4):2023–32.
34. Nyitrai M, Hild G, Belagyi J, Somogyi B. The flexibility of actin filaments as revealed by fluorescence resonance energy transfer. The influence of divalent cations. J Biol Chem. 1999;274(19):12996–3001.
35. Nyitrai M, Hild G, Lakos Z, Somogyi B. Effect of Ca^{2+}–Mg^{2+} exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin. Biophys J. 1998;74(5):2474–81.
36. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell. 2003;112(4):453–65.
37. Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. Science. 2009;326(5957):1208–12.
38. Gunning PW, Hardeman EC, Lappalainen P, Mulvihill DP. Tropomyosin—master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. J Cell Sci. 2015;128(16):2965–74.
39. Kardos R, Pozsonyi K, Nevalainen E, Lappalainen P, Nyitrai M, Hild G. The effects of ADF/cofilin and profilin on the conformation of the ATP-binding cleft of monomeric actin. Biophys J. 2009;96(6):2335–43.
40. Paavilainen VO, Bertling E, Falck S, Lappalainen P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. Trends Cell Biol. 2004;14(7):386–94.
41. Palmgren S, Vartiainen M, Lappalainen P. Twinfilin, a molecular mailman for actin monomers. J Cell Sci. 2002;115(Pt 5):881–6.
42. Maloney MT, Kinley AW, Pak CW, Bamburg JR. ADF/cofilin, actin dynamics, and disease. In: Remedios CG, Chhabra D, editors. Actin-binding proteins and disease. New York: Springer; 2008. p. 83–187.
43. Biltonen RL, Lichtenberg D. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. Chem Phys Lipids. 1993;64:129–42.
44. Schuler H, Lindberg U, Schutt CE, Karlsson R. Thermal unfolding of G-actin monitored with the DNase I-inhibition assay stabilities of actin isoforms. Eur J Biochem. 2000;267(2):476–86.