

Ph.D. értekezés tézisei

# A twinfilin-1 hatása az aktin szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira

Takács-Kollár Veronika

Pécs, 2020



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**  

---

**ÁLTALÁNOS ORVOSTUDÁNYI KAR**

Ph.D. értekezés tézisei

# A twinfilin-1 hatása az aktin szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira

Takács-Kollár Veronika

2020

Témavezető: Dr. Hild Gábor

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola D93

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

## BEVEZETÉS

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 sejtvázas kialakítása, transzport folyamatok létrejötte vagy a sejtmozgás [1,2,3]. Az aktin egy ATPáz aktivitással rendelkező, 375 aminosavból álló, 42,3 kDa molekulatömegű fehérje, mely a sejtben monomer (G-aktin) vagy filamentális (F-aktin) formában fordul elő. Az aktin molekula szerkezetileg két doménre osztható, melyeket további két-két alegység alkot. A kis domén 1-es és 2-es alegységből, a nagy 3-as és 4-es alegységből épül fel [4]. A molekula szerkezetében megfigyelhető két árok. Az 1-es és 3-as alegység közötti elsődleges kötőhelye az aktin monomer-kötő fehérjéknek. A 2-es és 4-es alegység között egy hidrofób árok található, mely adenin-nucleotidnak (ATP vagy ADP) és divalens kationoknak biztosít kötő helyet [5]. Megfelelő körülmények mellett az aktin monomerek egymással összekapcsolódva egy kétszálú, hélixet hoznak létre, melyet filamentumnak (F-aktin) nevezünk. Az aktin polimerizáció egy több lépésből álló szabályozott folyamat, ahol a következő szakaszokat különböztetjük meg: nukleáció, elongáció és dinamikus egyensúly („taposómalom”). Az aktin filamentum polaritással rendelkezik; beszélhetünk egy gyorsan növő, szöges (pozitív) és lassan növő, hegyes (negatív) végről. Az aktin monomerek filamentumba épülése, a polimerizáció/depolymerizáció folyamata sejttypustól 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 [6,7]. Az aktin nagyon érzékeny a környezetét érintő változásokra, valamint az aktin-kötő fehérjék jelenlétére [6,7,8].

### *ADF/kofilin fehérjecsald*

A fehérjecsald tagjaira jellemző, hogy nagyon sokféle módon képesek szabályozni az aktin monomerek/filamentumok arányának alakulását és azok sejtben belüli lokalizációját. Elsődleges szerkezetvizsgálatok alapján a család további öt fehérje-osztályra bontható, így beszélhetünk ADF/kofilin; twinfilin (TWF); Abp1/drebrin; koaktozin és glia-érési faktor (GMF) osztályról [9,10]. A családba tartozó fehérjékre általánosságban jellemző, hogy rendelkeznek legalább egy aktin depolymerizáló faktor homológia („*actin-depolymerizing-factor homology*” – ADF- H)

alegységgel. Szekvencia analízisek alapján megállapították, hogy a családba tartozó fehérjék aktinnal való interakciójához az ADF-H alegység megléte elengedhetetlen. Arra következtethetünk, hogy a fehérjecsaládba tartozó összes fehérje képes az aktinnal kölcsönhatásba lépni [11,12].

### *Twinfilin*

A twinfilinek evolúciósan konzerválódott aktin-kötő fehérjék, melyek a növényeket kivéve az összes eukariótában megtalálhatók [10]. A twinfilint először 1994-ben írták le A6 protein tirozin kináz néven [13]. A twinfilinek körülbelül 40 kDa molekulatömegű fehérjék, melyek két ADF-H alegységből, az ezeket összekötő rövid kapocs régióból és egy flexibilis C-terminális farki régióból épülnek fel. A két alegység körülbelül 25%-os szekvencia azonosságot mutat és ~20% -ban hasonló szekvenciával rendelkezik összehasonlítva más ADF-H alegységet tartalmazó fehérjék alegységeivel [10]. Mindkét ADF-H alegység egymástól függetlenül képes az aktinhoz kötni. A C-terminális alegység hasonló affinitással köt az aktinhoz, mint a teljes hosszúságú fehérje és tízszer nagyobb affinitással, mint az N-terminális vég. Annak ellenére, hogy a twinfilin két potenciális aktin-kötő hellyel rendelkezik, stabil 1:1 arányú komplexet képez az aktin monomerrel [14]. A twinfilin C-terminális domén aktin monomerrel alkotott komplex kristályszerkezetét Paavilainen és munkatársai írták le 2008-ben [15]. A szerkezet ismeretében megállapítható volt, hogy az ADF-H alegységek egy strukturálisan konzerválódott aktin-kötő mintázatot hoznak létre. Továbbá kimutatták, hogy kémiaiilag a kofilin és twinfilin N-terminális alegysége nagyon hasonló és a legnagyobb különbségek a kofilin aktin filamentum-kötő régiójánál figyelhetők meg. Ezek az eltérések szerkezetileg is bizonyítják a két fehérjecsalád eltérő kötődését az aktin filamentumhoz [15]. A twinfilinek aktin monomer-kötő és szekvesztráló fehérjék, melyek képesek gátolni a nukleotid kicserélődést a monomeren és megakadályozzák azok beépülését az aktin filamentum szöges végéhez [11,13]. A kofilinhez hasonlóan a twinfilinek is nagyobb affinitással kötődnek az ADP - G-aktinhoz ( $K_D=0,05 \mu\text{M}$ ), mint az ATP - G-aktinhoz ( $K_D=0,47 \mu\text{M}$ ) fiziológiás ion-koncentráció mellett [14]. Tanulmányok igazolják, hogy a twinfilin képes az aktin filamentumhoz is kapcsolódni. Az élesztő twinfilin képes az aktin filamentumhoz kötni és feldarabolni azt, ezáltal gyorsítva a filamentum szétszerelődését *in vitro* [11,14]. 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 [14]. 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 lezárni a filamentum szöges végét. A két fehérje interakciója nem befolyásolja az aktin kötést és a sarkázó funkciót, ugyanakkor nélkülözhetetlen élesztők esetén a twinfilin megfelelő sejten belüli lokalizációjához és funkciójához *in vivo* [16,17]. A twinfilinnek számos izoformája létezik. Alacsonyabb rendű eukariótákban egy, míg emlősökben három izoforma ismert, így beszélhetünk twinfilin-1, twinfilin-2a és twinfilin-2b izoformáról [12,18]. A twinfilin-1 és twinfilin-2a főleg embriókban, felnőttek esetén pedig a nem-izom sejtekben expresszálódnak. A twinfilin-2b főleg a felnőtt szív- és vázizomban figyelhető meg [18]. A twinfilin számos biológiai funkciója ismert. Leírták, hogy a twinfilinnek szerepe lehet bizonyos kemoterápiás szerek hatékonyságának elősegítésében. Kimutatták, hogy a twinfilin-1 szupressziója erősítheti egyes kemoterápiás szerek hatását [19]. A twinfilin - 1 sejt morfológia szabályozásában betöltött szerepét igazolja például, hogy szívizom hipertrófia esetén emelkedett twinfilin szint volt kimutatható [20].

## CÉLKITŰZÉSEK

A számos, átfogó tanulmány ellenére sok esetben a twinfilin biológiai funkcióit, az aktin citoszkeletonra gyakorolt hatását, valamint a folyamatok mögött álló molekuláris kölcsönhatásokat még nem sikerült tisztázni.

Doktori munkám során érdeklődésem középpontjában az aktin monomer szerkezetében és dinamikájában bekövetkező változások vizsgálata állt egér twinfilin-1 jelenlétében. Célul tűztem ki, hogy meghatározzam a twinfilin aktin filamentum depolimerizációjára kifejtett hatásait.

A következő kérdésekre kerestem a választ:

- 1) Képes-e kötődni az általunk expresszált Hisztidin-taggal 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 jelenlétében?
- 4) Hogy változtatja meg a twinfilin 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 twinfilinnek az F-aktin termodinamikai stabilitására?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Fehérjék preparálása*

Kísérleteinkhez használt aktin preparálása és tisztítása nyúl vázizom aceton-extrahált izomforgácsból történt [21,22,23]. A tisztított G-aktint A pufferben (4mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM ATP, 0,5 mM MEA és 0,005% NaN<sub>3</sub>) tároltuk. Az aktin koncentrációjának meghatározása Jasco V-660 spektrofotométerrel történt 280 nm-en, ahol a fehérje extinkciós együtthatója 1,11 mg<sup>-1</sup> ml cm<sup>-1</sup>, a relatív molekulatömege 42,3kDa [24].

A hisztidin taggal rendelkező egér twinfilin-1 expressziója *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS expressziós rendszerben történt a korábban leírtak szerint [25]. A fehérje konstrukciót tartalmazó plazmidot transzformáltuk, majd 100 µg/ml ampicillin jelenléte mellett növesztettük a 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 sejtek lízisét követően a fehérje tisztítása 3 lépésben történt; affinitás kromatográfiát (Nikkel-NTA, Qiagen), ioncserélő kromatográfiát (Q-sepharose, GE Healthcare), valamint gélfiltrációs elválasztást (Superdex 75, GE Healthcare) alkalmaztunk. A tisztított fehérjét folyékony nitrogénben fagyasztottuk és felhasználásig - 80 °C-on ATP mentes A pufferben (4 mM Tris, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MEA, 0,005% NaN<sub>3</sub>) tároltuk. A fehérje koncentrációjának a meghatározásához az extinkciós együtthatót a ProtParam program segítségével határoztuk meg, ami 39100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> -nek adódott.

### *Az aktin fluorofórokkal történő jelölése*

A fluoreszcencia spektroszkópai kísérletekhez az aktint ε-ATP, IAEDANS, FITC, N- (1- pirén) - jódacetamid és ALEXA488SE fluoreszcens festékekkel jelöltük meg a korábban leírt eljárások szerint [26,27,28,29,30].

### *Fluoreszcencia anizotrópia kísérletek*

Az „steady-state” fluoreszcencia méréseket Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 fluoriméterrel végeztük el (Longjumea Cedex, Franciaország). Az ε-ATP jelölt aktin monomer (1µM) fluoreszcenciáját mértük eltérő twinfilin koncentráció (0-8 µM) mellett. Az egyen twinfilin koncentrációkhoz rendelhető  $\Delta r/\Delta r_{\max}$  paramétert ábrázolva és a megfelelő egyenletet alkalmazva meghatározható a twinfilin aktin monomerhez való affinitása. A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer vizsgálatokhoz IAEDANS jelölt aktint használtunk. Mivel a

twinfilin kötőhelye nagyon közel van az IAEDANS pozíciójához, meghatároztuk a twinfilin affinitását IAEDANS jelölt G-aktinhoz is, ahol a jelölt aktin (2  $\mu\text{M}$ ) anizotrópiáját mértük növekvő TWF koncentráció (0-10  $\mu\text{M}$ ) mellett. Hasonló módszert alkalmaztunk a twinfilin-1 IAEDANS jelölt  $\text{Mg}^{2+}$  - F-aktinhoz való affinitásának a meghatározására is. Ebben a kísérletsorozatban az IAEDANS-jelölt F-aktin (5  $\mu\text{M}$ ) anizotrópiájának változását követtük növekvő twinfilin koncentráció (0-60  $\mu\text{M}$ ) mellett, a gerjesztési és emissziós hullámhossz 350 és 479 nm volt.

#### *Nukleotid kicserélődés vizsgálata*

A kísérleteket *Applied Photophysics Stopped-flow* műszerrel végeztük. Ennek során 2  $\mu\text{M}$  G-aktint használtunk, melyet előzőleg  $\epsilon$ -ATP-vel jelöltünk. A G-aktint különböző koncentrációjú twinfilin-1 - el (0-8  $\mu\text{M}$ ) inkubáltuk 4 °C-on minimum 30 percig. Mérés során a fehérjét tartalmazó mintát kevertük 1 mM ATP-t tartalmazó A pufferrel (pH 8,0). A fluoreszcencia intenzitás időbeli változását követtük nyomon. A nukleotid kicserélődés sebességét vizsgáltuk, mérve az  $\epsilon$ -ATP csökkenő fluoreszcencia intenzitását, ahogy disszociál az aktin monomerről. A fluoreszcens jelölőt 320 nm-en gerjesztettük és az emissziót (FG 385 „cut-off” szűrőt használva) detektáltuk.

#### *Fluoreszcencia kioltási kísérletek*

*Perkin Elmer LS50B* és *Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3* fluorimétereket használtunk a „steady-state” kioltási kísérleteinkhez, melynek során 5  $\mu\text{M}$   $\epsilon$ -ATP-vel jelölt G-aktint titráltunk eltérő koncentrációjú (0-3 M) akrilamiddal. A gerjesztési hullámhossz 320 nm volt és az emissziós spektrumokat 330 – 600 nm között rögzítettük. Fluoreszcencia kioltási kísérletekkel lehetőség nyílik az aktinhoz kötött fluorofór környezetében bekövetkező konformációs változások vizsgálatára.

A kioltás mértékének szemléltetésére és kvantifikálására a Stern-Volmer egyenlet alkalmazható, melyből meghatározható a Stern-Volmer állandó értéke ( $K_{SV}$ ), ami információt szolgáltat a fluorofór hozzáférhetőségéről [31].

Időfelbontású fluoreszcencia kioltási kísérleteinket *ISS K2 Multifrekvenciás fázisfluoriméterrel* 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 felüláteresztő szűrő alkalmazásával rögzítettük. Minden mérés során referenciaként frissen preparált glikogén oldatot használtunk, melynek élettartama 0 ns.



### *Hőmérséklet-függő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) kísérletek*

FRET méréseinket termosztálható mintatartóval felszerelt Horiba Jobin Yvon Fluorolog-3 spektrofluoriméterrel végeztük. Kísérleteinkben az aktin molekulán belüli fluoreszcencia rezonancia energiáttranszfert vizsgáltuk, ahol az 1-es alegység 374-es ciszteinjét IAEDANS-szel jelölve, mint donor és a 2-es alegység lizin-61 aminosavját FITC fluorofórral jelölve, mint akceptor volt jelen. A donor fluoreszcenciáját követtük nyomon az akceptor hiányában és jelenlétében. Az alkalmazott gerjesztési hullámhossz 350 nm volt, 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. Meghatároztuk az energia transzfer hatásfokát, a donor akceptor távolságot és az  $f'$  paramétert [25,32].

### *Koszédimentációs kísérletek*

A twinfilin-1 szekvesztráló hatásának és az aktin filamentummal alkotott kölcsönhatásának a vizsgálatára koszedimentációs kísérleteket végeztünk. 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.

### *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 valósítottunk meg. A jelölt Mg-G-aktint 2 mM MgCl<sub>2</sub> és 100 mM KCl jelenlétben a küvétában 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.

### *Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia (TIRFM)*

A TIRFM kísérletek során az aktin filamentum (0,5  $\mu\text{M}$ , 10% Alexa488SE jelölt aktin) depolimerizációs kinetikáját az egyedi filamentumok szintjén követtük nyomon twinfilin-1 hiányában és jelenlétében. A kísérletekben N-etil-maleimid jelölt vázizom miozin II-vel funkcionálizált üveg felszínre kötöttük a filamentumokat, biztosítva azok evanescens mezőbe való jelenlétét. Az aktin depolimerizáció időbeli követése érdekében a képeket 10 másodpercenként rögzítettük. Az analízist *Fiji* szoftver segítségével végeztük el. Az F-aktin depolimerizációs sebességét ( $\mu\text{m}/\text{másodperc}$ ) és a filamentumok hosszát a *ImageJ* szoftver *MultipleKymograph plugin* csomagját alkalmazva határoztuk meg és feltételeztük, hogy 1  $\mu\text{m}$  370 alegységet tartalmaz [33].

### *Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) 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. A mintákat minden esetben kétszer fűtöttük fel. A második hevítés utáni mérések azt mutatták, hogy az aktin már az első felfűtés során irreverzibilis változásokon esett át. A monomerrel történő mérések során az aktin és a twinfilin koncentrációja egyaránt 23  $\mu\text{M}$  volt. Az aktin filamentummal végzett mérések esetén 46  $\mu\text{M}$  (2 mg/ml) aktint polimerizáltunk 100 mM KCl és 2 mM  $\text{MgCl}_2$  jelenlétében, majd az F-aktint inkubáltuk 7,5  $\mu\text{M}$  twinfilin-1 jelenlétében legalább 1 órán át szobahőmérsékleten. A fehérjék denaturációs (olvadási) hőmérsékletét ( $T_m$ ) a hődenaturációs görbék csúcsához tartozó hőmérséklet értékekből határoztuk meg. A DSC görbéket tovább elemezve meghatároztuk az adott állapothoz tartozó csúcshoz a félértékszélességét ( $T_{1/2}$ ), valamint a fázisátalakulásokhoz tartozó aktiválási energia értékeket Sanchez-Ruiz és munkatársai által leírt módszer és Lumry és Eyring modellje alapján [34,35].

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink során elsősorban  $\text{Ca}^{2+}$  - G-aktint használtunk. A  $\text{Ca}^{2+}$  - G-aktin stabilabb, amely lehetővé teszi a nem-specifikus környezeti hatások csökkentését ezzel párhuzamosan az eredmények reprodukálhatósága növelhető.  $\text{Mg}^{2+}$  - G-aktint a hőmérséklettől függő FRET kísérleteinkben és az F-aktinnal végzett kísérleteknél alkalmaztunk. A Ca-kötött aktin monomer alkalmazását is kísérletekben az is alátámasztja, hogy egyes sejtekben és a sejtek intracelluláris régiójában átmenetileg kialakulhatnak  $\text{Ca}^{2+}$  - G-aktin raktárak, melyek lokálisan fontos szerepet játszhatnak az aktin citoskeleton dinamikájában szabályozásában [36].

### I. EGÉR TWINFILIN-1 HATÁSA AZ AKTIN MONOMER SZERKEZETI ÉS DINAMIKAI TULAJDONSÁGAIRA

#### *Twinfilin-1 G-aktinhoz való affinitásának meghatározása*

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 „steady-state” anizotrópia érzékeny a vizsgált fluorofór forgásában bekövetkező változásokra. Ezen változások egyik leggyakoribb forrása a teljes fehérje forgásának megváltozása, amelyhez a fluorofór kapcsolódik. Egy partner kötődése egy fehérjéhez a fluorofór anizotrópiájának megváltozásával járhat. Egy jelentős mértékű anizotrópia emelkedést figyeltünk meg, amikor eltérő koncentrációban (0-8  $\mu\text{M}$ ) adtuk a twinfilint az  $\epsilon$ -ATP jelölt G-aktinhoz (1  $\mu\text{M}$ ). Az emelkedett anizotrópia érték a fehérje-fehérje komplex kialakulásának tulajdonítható. A mért „steady-state” anizotrópia értékeket ábrázoltuk a twinfilin koncentráció függvényében és meghatároztuk az egyensúlyi disszociációs állandó értékét, ami  $0,12 \pm 0,04 \mu\text{M}$ -nak adódott, jelezve a twinfilin-1 és a Ca - G-aktin között kialakult erős kölcsönhatást.

#### *Twinfilin-1 hatása a nukleotid kicserélődésre*

Az ADF/kofilin család fehérjeire jellemző, hogy képesek megváltoztatni az aktin nukleotid-kötő tulajdonságait, így vizsgáltuk a twinfilin aktin nukleotid-kicserélődésére gyakorolt hatását gyorskinetikai módszerrel [37]. ATP analóg  $\epsilon$  -ATP-vel jelölt aktin monomert (1  $\mu\text{M}$ ) használtunk a kísérletek során míg a twinfilin koncentrációja 0-8  $\mu\text{M}$  között változott. A nukleotid kicserélődés egyensúlyának beálltát követően jelöletlen ATP-t adtunk nagy

feleslegben (1 mM) a rendszerhez. A kötött és szabad  $\epsilon$ -ATP fluoreszcencia intenzitása eltér, így a nukleotid-kicserélődés a fluoreszcencia intenzitás érték változásával jól nyomon követhető. Az intenzitás változásból az elsőrendű disszociációs sebességi állandó meghatározható, ami aktin monomer esetén  $0,012 \text{ s}^{-1}$ -nak adódott, míg  $8 \text{ }\mu\text{M}$  twinfilin-1 jelenlétében  $0,003 \text{ s}^{-1}$ -re csökkent.

Az aktin-kötő fehérjék képesek lehetnek az aktin monomer és/vagy filamentum szerkezetét módosítani a fehérjékhez való kötésük által. 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 profilin, melyek jelenlétében egy nyitottabb; míg például toxofilin vagy kofilin bekötésekor egy zártabb konformációs állapot figyelhető meg [37,38]. Feltételeztük, hogy az általunk vizsgált twinfilin is hatással lesz a nukleotid-kötő zseb szerkezetére, mivel a nukleotid-kicserélődés sebessége jelentősen lecsökkent a jelenlétében. Ennek igazolására kioltási kísérleteket végeztünk  $\epsilon$ -ATP-jelölt aktin monomerrel twinfilin hiányában és jelenlétében. A mérések során kapott etieno-ATP fluoreszcencia intenzitás értékek  $F_0/F$  hányadosát az akrilamid kioltó molekula koncentrációjának függvényében feltüntetve a Stern-Volmer ábrázolást kaptuk, amiből meghatároztuk a Stern-Volmer állandó értékét ( $K_{SV}$ ). Megállapítottuk, hogy twinfilin-1 jelenlétében a Stern-Volmer állandó értéke  $0,33 \pm 0,11 \text{ M}^{-1}$ -ről  $0,05 \pm 0,108 \text{ M}^{-1}$  értékre csökkent, ami a fluorofór hozzáférhetőségének csökkenésére utal. Feltételezhetjük, hogy twinifilin-1 jelenlétében a nukleotid-kötő zseb egy zártabb konformációs állapotba kerül.

#### *Twinfilin-1 hatása az aktin kis doménjának konformációjára és dinamikájára*

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) kísérleteket végeztünk, hogy vizsgáljuk a twinfilin-1 hatását az aktin monomer kis doménjének szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. A mérésekhez az aktin fluoreszcens festékkel jelöltük, az 1-es alegység 374-es cisztein aminosavát IAEDANS-szal, ami a mérés során a donor szerepét töltötte be. FITC-cel jelöltük a 2-es alegység 61-es lizin aminosavát, ami pedig akceptorként funkcionált. Első lépésként meghatároztuk a twinfilin IAEDANS-aktinhoz való affinitását fluoreszcencia anizotrópia módszer alkalmazva [25]. A számolt affinitás érték  $0,16 \pm 0,1 \text{ }\mu\text{M}$ -nak adódott, ami közelítőleg megegyezik a korábban  $\epsilon$ -ATP-jelölt aktin monomerre meghatározott affinitás értékkel ( $0,12 \pm 0,04 \text{ }\mu\text{M}$ ). Így kizárható, hogy a jelölés kedvezőtlenül befolyásolja az aktin-twinfilin komplex kialakulást. Meghatároztuk az energia transzfer hatásfokát és a donor-akceptor távolságot twinfilin hiányában és jelenlétében. Megállapítottuk, hogy a donor-akceptor távolság nem érzékeny a twinfilin-1 jelenlétére. 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, ami az alkalmazott fluorofórok körülölelő fehérjemátrix flexibilitásáról ad információt [32,39]. Eredményeink azt mutatták, hogy a twinfilin-1 jelenlétében az  $f'$  értéke nem változik szignifikánsan a hőmérséklet növekedésével, amből arra következtethetünk, hogy a twinfilin aktinhoz való kötésével az aktin monomer kis doménjének fehérjemátrixa rigidebbé válik.

#### *Twinfilin-1 hatása az aktin monomer hő stabilitására*

Fluoreszcencia spektroszkópiás méréseink azt mutatták, hogy twinfilin-1 jelenlétében megváltozik az aktin monomer konformációja. A konformáció változás gyakran társul a fehérjék szerkezeti állapotának a megváltozásával, ezért vizsgáltuk a G-aktin termodinamikai stabilitását twinfilin jelenlétében differenciális pásztázó kaloriméter alkalmazásával. Az alkalmazott aktin monomer koncentráció 23  $\mu\text{M}$  volt és az olvadási hőmérsékletre 56,33 °C-os értéket kaptunk. Twinfilin jelenlétében (23  $\mu\text{M}$ ) egy magasabb olvadási hőmérséklet ( $T_m=59,04$  °C) volt megfigyelhető. Termodinamikailag stabilabb komplex jött létre összehasonlítva a kapott értéket az aktinra mért olvadási hőmérséklettel. 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 [40]. Az aktiválási energia az a minimális energiamennyiség (energia gát), ami egy reakció lezajlásához/előrehaladásához szükséges. Megállapítottuk, hogy twinfilin jelenlétében az olvadási hőmérséklet 22%-kal növekedett, ami kisebb kooperativitásra utal. A twinfilin-1 jelenléte az aktiválási energia értékében kis mértékben (4,6%) csökkent. Ez a csökkenés arra utalhat, hogy a twinfilin -G-aktin komplex esetében kevesebb energia szükséges a denaturáció elindulásához összehasonlítva az aktin monomerre kapott eredménnyel.

#### *A twinfilin-1 aktin kölcsönhatásának vizsgálat 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 [11]. A szekvesztráló aktivitás, valamint a twinfilin F-aktin kölcsönhatás igazolására koszedimentációs kísérleteket végeztünk. A kísérletekben a 2  $\mu\text{M}$  F-aktinhoz adtuk növekvő koncentrációban (0- 4  $\mu\text{M}$ ) a twinfilint. Megállapítottuk, hogy a twinfilin 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-1 koncentrációt alkalmazva az aktin mellett megjelent a twinfilin is pelletben, önmagában viszont nem ülepedett. Az irodalmi adatokkal összhangban a szedimentációs vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a twinfilin „sequestering” aktivitással rendelkezik, valamint kölcsönhatásba tud lépni az aktin filamentummal is [11].

## II. EGÉR TWINFILIN-1 KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA F-AKTINNAL

### *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 - F-aktint használtunk, melynek koncentrációja 5  $\mu\text{M}$  volt és ehhez adtuk növekvő koncentrációban (0 - 60  $\mu\text{M}$ ) a twinfilint. Az F-aktin anizotrópia értékeiben egy csökkenő tendencia volt megfigyelhető a twinfilin-1 koncentrációjától függően. Meghatároztuk az egyensúlyi disszociációs állandót az F-aktin twinfilin-1 komplexre, ami  $25,7 \pm 8,5 \mu\text{M}$  lett. Korábbi tanulmányokat figyelembe véve elmondható, hogy az anizotrópia értékben bekövetkező csökkenés a twinfilin szekvesztráló funkciójának tulajdonítható [18]. Továbbá az sem kizárható, hogy a szekvesztrálás mellett a twinfilin esetleges filamentum daraboló hatása is közrejátszik a „steady-state” anizotrópia érték csökkenésében.

### *A twinfilin-1 hatása az aktin filamentum depolimerizációjának dinamikájára*

Hígítás indukálta depolimerizációs kísérleteket végeztünk annak felderítésére, hogy a twinfilin-1 jelenléte miként változtatja meg az aktin depolimerizáció kinetikáját. Pirén jelölt aktin filamentumot használtunk, melynek koncentrációját 1  $\mu\text{M}$ -ról 20 nM-ra hígítottuk, ezáltal az aktin koncentrációja a kritikus koncentráció (100 nM) alá csökkent, ezzel elősegítve a filamentum depolimerizációját. A módszer előnye, hogy a vizsgált fehérje „szekvesztráló” hatása teljes mértékben kizárható, ugyanis ilyen funkció esetén az aktin-kötő fehérje által megkötött és monomer formában tartott aktin monomerek nem befolyásolják a depolimerizációt. Irodalmi adatokból ismert, hogy az élesztő twinfilin filamentum fragmentációra képes alacsony pH értékeken [41]. Kísérleteinkben az egér twinfilin-1 hatását vizsgáltuk az aktin depolimerizációra eltérő pH értékeken (5,0 – 7,8). A mérések során

meghatároztuk a sebességi állandó értékét twinfilin hiányában, jelenlétében (1,3  $\mu\text{M}$ ) valamint latrunkulin A (5  $\mu\text{M}$ ) jelenlétében. A latrunkulin A képes az aktint monomer formában tartani, ezért ezt „sequestering” pozitív kontrolnak tekinthető. Twinfilin-1 jelenlétében a pirén-aktin fluoreszcenciája jelentős csökkenést mutatott az alacsonyabb pH értékeken. Meghatároztuk a depolimerizáció sebességi állandóját a pirén fluoreszcencia intenzitás változására illesztett egyenes meredekségéből twinfilin-1 hiányában és jelenlétében minden egyes pH-n. Megállapítottuk, hogy a sebességi állandó a pH érték növelésével lecsökkent és pH=5,5 és 6,0 értékeken a különbség szignifikánsnak ( $p < 0,05$ ) bizonyult. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az egér twinfilin-1 izoforma pH érzékeny aktin filamentum fragmentáló funkcióval rendelkezik.

#### *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. A depolimerizációs kísérleteink azt mutatták, hogy a twinfilin hatása pH 6,0-on érvényesül leginkább, így a mikroszkópos kísérletek pH 7,8 és 6,0 környezetben végeztük el. A filamentumok hosszát és a depolimerizáció sebességi állandóját határoztuk meg twinfilin-1 hiányában és jelenlétében (1,53  $\mu\text{M}$ ) a kijelölt pH értékeken. Megállapítottuk, hogy magasabb pH-n a twinfilin-1 jelenléte nem okozott lényegi változást sem az aktin filamentumok hosszában, sem a sebességi állandó értékében. Ezzel szemben alacsonyabb pH érték esetén a twinfilin-1 jelenléte a filamentumok hosszának a csökkenését eredményezte. Emellett a depolimerizáció sebességi állandója is változott twinfilin-1 jelenlétében, egy kismértékű növekedés volt megfigyelhető. A mikroszkópos eredményeiből arra következtethetünk, hogy a twinfilin effektív „severing” hatással rendelkezik alacsony pH környezetben alátámasztva a fluoreszcencia spektroszkópiái kísérleteinket.

#### *A twinfilin-1 hatása az aktin filamentum termodinamikai stabilitására*

Korábbi méréseinket kiegészítve differenciális pásztázó kalorimétert alkalmazva vizsgáltuk a twinfilin hatását a  $\text{Mg}^{2+}$  - F-aktin termodinamikai stabilitására. A mérések során az F-aktin koncentrációja 46  $\mu\text{M}$  volt, ami 2 mg/ml-nek felel meg. Először felvettük az F-aktin hődenaturációs görbét és meghatároztuk az olvadási hőmérsékletet, ami 66,5 °C. Ez az irodalomban aktin filamentumra jellemző olvadási hőmérsékletnek megfelelő érték [42]. Majd azonos körülmények között megismételtük a mérést 7,5  $\mu\text{M}$  twinfilin jelenlétében. Itt egy

komplex, három komponensből álló görbe volt megfigyelhető. Az egyes komponensekhez az alábbi olvadási hőmérsékleteket határoztuk meg:  $54,6^{\circ}\text{C}$ ,  $59,2^{\circ}\text{C}$  és  $63,23^{\circ}\text{C}$ . A legalacsonyabb olvadási hőmérséklet az aktin monomernek feleltethető meg. A twinfilin aktin monomer komplexre korábban meghatároztunk egy  $59,04^{\circ}\text{C}$ -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 feltételezhető, hogy a twinfilin képes lazítani F-aktin molekulán belül a szomszédos protomerek közötti kölcsönhatást, aminek az alacsonyabb olvadási hőmérséklet tulajdonítható.



## A Ph.D. MUNKÁM SORÁN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK

Az élő sejtekben az aktin számos biológiai funkcióért felel, mely ellátásához az aktin megfelelő lokalizációja és szerkezeti adaptációja nélkülözhetetlen. Az aktin citoskeleton szabályozás mögött álló kulcsfontosságú molekuláris mechanizmusok vizsgálata rendkívül fontos a szabályozó fehérjékhez kapcsolódó kölcsönhatások természetének a megértéséhez. Mindezeket figyelembe véve a jövőben is hangsúlyt kell fektetni az ilyen irányú kutatásokra.

*Főbb eredményeimet az alábbiakban ismertetem:*

- Sikeresen expresszáltuk a hisztidin-tag egér twinfilin-1 fehérjét *Escherichia coli* rendszerben. Meghatároztuk az aktin monomerhez való affinitását fluoreszcencia anizotrópia kísérletekkel, ami  $0,12 \pm 0,04 \mu\text{M}$  lett, utalva a twinfilin-1 – Ca-G-aktin közötti szoros kölcsönhatásra.
- Megállapítottuk, hogy a twinfilin-1 gátolja a nukleotid kicserélődést az aktin monomeren.
- Feltételezhetjük, hogy a nukleotid-kicserélődés gátlása együtt jár valamiféle konformációváltozással. Fluoreszcencia kioltási kísérletekkel meghatároztuk, hogy twinfilin-1 hatására az aktin nukleotid-kötő zsebéhez lokalizált flouorofór hozzáférhetősége lecsökkent.
- Förster-féle rezonancia energia traszfer méréseket végeztünk annak megállapítására, hogy a twinfilin jelenléte milyen hatással van az aktin monomer kis doménjának szerkezeti és dinamikai tulajdonságaira. A donor - akceptor távolság nem volt érzékeny a twinfilin-1 jelenlétére. 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 doménjának fehérjemátrixa rigidebbé válik.
- Differenciális pásztázó kalorimetriás méréseink azt mutatták, hogy twinfilin-1 jelenlétében az aktin monomer termodinamikai stabilitása növekedett.
- Koszedimentációs kísérletekkel igazoltuk az általunk használt twinfilin-1 izoforma szekvesztráló funkcióját és aktin filamentumhoz való kötődését.
- „Steady-state” fluoreszcencia anizotrópia kísérletekkel meghatároztuk a twinfilin F- aktinhoz való affinitását, ami  $25,7 \pm 8,5 \mu\text{M}$  lett.

- Hígítás indukálta depolimerizációs kísérleteinkkel bebizonyítottuk, hogy a twinfilin-1 pH-függő filamentum daraboló funkcióval rendelkezik.
- Teljes belső visszaverődésen alapuló fluoreszcencia mikroszkópia alkalmazásával tettük látható a twinfilin valós idejű egyedi filamentumokra kifejtett hatását és igazoltuk a twinfilin-1 pH-függő filamentum fragmentáló aktivitását.
- Kiegészítő kísérletként vizsgáltuk a twinfilin hatását a Mg – 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.

*Összeségében elmondható, hogy twinfilin-1 jelenlétében az aktin monomer nukleotid-kötő zsebe egy zártabb, termodinamikailag stabilabb konformációs állapotot vesz fel.*

*Az egér twinfilin-1 képes gyorsítani a monomerek disszociációját a filamentumról és/vagy az F-aktin fragmentálódását alacsony pH körülmény mellett. A Twinfilin-1 fontos szabályozó fehérje lehet a filamentum depolimerizációja során, olyan speciális biológiai folyamatokban vagy stresszhelyzetekben, ahol a pH jelentősen alacsonyabb, mint a fiziológias érték.*

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

**Veronika Takács-Kollár**, Miklós Nyitrai, 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 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

27<sup>th</sup> 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. 8<sup>th</sup> 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. 28<sup>th</sup> 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. 27<sup>th</sup> 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. 8<sup>th</sup> 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.

## 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, L. Blanchoin, R.D. Mullins, Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29 (2000) 545-576.
- [3] T.D. Pollard, Actin cytoskeleton. Missing link for intracellular bacterial motility?, *Curr Biol* 5 (1995) 837-840.
- [4] 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.
- [5] B. Qualmann, M.M. Kessels, Endocytosis and the cytoskeleton, *Int Rev Cytol* 220 (2002) 93-144.
- [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] T.D. Pollard, Actin and Actin-Binding Proteins, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (2016).
- [8] G. Hild, B. Bugyi, M. Nyitrai, Conformational dynamics of actin: effectors and implications for biological function, *Cytoskeleton (Hoboken)* 67 (2010) 609-629.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.

- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] J.A. Spudich, H.E. Huxley, J.T. Finch, Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin, *J Mol Biol* 72 (1972) 619-632.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] L.D. Burtnick, Modification of actin with fluorescein isothiocyanate, *Biochim Biophys Acta* 791 (1984) 57-62.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] E.H. Lumry R, Conformation changes of proteins, *J Phys Chem.* 58:110–20. (1954).
- [36] T.M. A.W.K. Michael, W. Chi, R. Pak James, , Actin-binding Proteins and Disease, in: C. dos Remedios, Chhabra, Deepak (Eds.) (Ed.), Springer, 2008, pp. 83–187.
- [37] 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.

- [38] 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.
- [39] M. Nyitrai, G. Hild, Z. Lakos, B. Somogyi, Effect of  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  exchange on the flexibility and/or conformation of the small domain in monomeric actin, *Biophys J* 74 (1998) 2474-2481.
- [40] L.D. Biltonen RL, The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. , *Chem Phys Lipids* (1993) 64:129–142.
- [41] 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.
- [42] 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