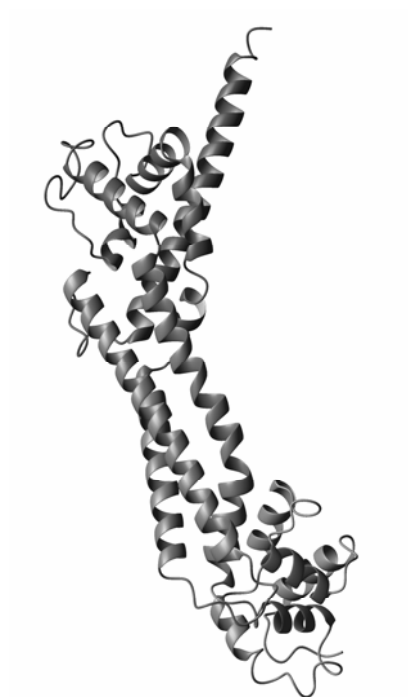


## PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

# A forminok hatása az aktin filamentumok polimerizációs tulajdonságaira és dinamikai jellemzőire



BUGYI BEÁTA

Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Biofizikai Intézet

2006.

## PhD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

### **A forminok hatása az aktin filamentumok polimerizációs tulajdonságaira és dinamikai jellemzőire**

**Bugyi Beáta**

Program: Biokémia és molekuláris biológia

Programvezető: Dr. Sümegi Balázs

Alprogram: B-130: Funkcionális fehérjedynamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Alprogramvezető: Dr. Somogyi Béla

Témavezetők: Dr. Somogyi Béla, Dr. Nyitrai Miklós



Pécsi Tudományegyetem  
Általános Orvostudományi Kar  
Biofizikai Intézet

2006.



## Bevezetés

Az aktin citoszkeleton (a mikrofilamentum rendszer) az eukarióta sejtek citoplazmájában található fehérjehálózat felépítésében résztvevő, nagymértékben konzervált, filamentális szerkezetű sejtvázkomponens. A sejt alakjának és mechanikai ellenálló képességének biztosítása mellett a sejt dinamikus tulajdonságainak meghatározásában is alapvető szerepet játszik. A strukturálisan differenciált szerveződést mutató aktin filamentum hálózatok kialakításának hátterében az asszociált fehérjék diverzitása, azok térben és időben összehangolt működése, illetve a mikrofilamentumok polimerizációjával kapcsolatos molekuláris mechanizmusok állnak.

A mikrofilamentum rendszer fő alkotóeleme az aktin fehérje. Az aktin, a sejtben két formában, monomér (globuláris, G - aktin), illetve a monomérek összekapcsolódása során (polimerizáció) létrejövő polimer (filamentális, F - aktin) formában fordul elő. Az aktin monomér szerkezete két doménre osztható. A domének közötti hasadéokban találhatóak az elsődleges kation-, és nukleotid-kötő helyek. A kötött kétértékű kation fiziológiásan a  $Mg^{2+}$ , *in vitro* körülmények között pedig a  $Ca^{2+}$ . A nukleotid-kötő hely ATP-t, ADP.P<sub>i</sub>-t vagy ADP-t tart kötve. Az aktin polimerizációja három fő szakaszra osztható. A nukleáció fázisában két aktin monomér összekapcsolódása során aktin dimérek, majd egy újabb monomér kapcsolódása révén aktin trimérek (nukleuszok) jönnek létre. Az elongáció szakaszában újabb monomérek épülnek a filamentumba, amely annak növekedéséhez vezet. Az utolsó fázisban egy dinamikus egyensúly, úgynevezett taposómalom (vagy „treadmilling”) áll be, amelynek során a kialakult filamentumok hossza már nem változik. Ebben az állapotban a filamentum mindkét végén végbemegy mind a monomérek asszociációja, mind a disszociációjuk. Ezekre a folyamatokra az egyes végeken eltérő kinetika jellemző, ennek következtében a filamentum szöges végén a monomérek asszociációja, a hegyes végén pedig a disszociációjuk a domináns folyamat. E folyamatokra jellemző disszociációs ( $k_-$ ) és asszociációs ( $k_+$ ) állandók hányadosaként mindkét vég esetén megadhatunk egy, az adott vég egyensúlyára jellemző, disszociációs egyensúlyi állandót, az ún. kritikus koncentrációt.

A taposómalom mechanizmus következtében a filamentumok egyensúlyi állapotára jellemző kritikus koncentráció a szöges és a hegyes vég dinamikáját jellemző kritikus koncentráció értékek közötti monomér koncentrációval lesz egyenlő, de úgy, hogy értéke számottevően közelebb van a szöges vég kritikus koncentrációjához.

A filamentumok „korát” egy belső óráként az ATP hidrolízise és a foszfát csoport disszociációja méri. Az előbbi folyamat gyorsabb, a monomérek filamentumba épülése után másodperceken belül bekövetkezik ( $0.3 \text{ s}^{-1}$ (1)), míg az utóbbi sokkal lassabban megy végbe ( $0.002 \text{ s}^{-1}$ (2)). A foszfát csoport disszociációját egy konformációs változás kíséri, amelynek következtében a filamentumok destabilizálódnak.

A sejtekben lejátszódó folyamatok során a különböző extra-, és intracelluláris stimulusok hatására az aktin citoskeleton gyors átrendeződése következik be. Ebben kulcsszerepet játszik az aktin filamentumok dinamikus polimerizációja, illetve depolimerizációja. A spontán aktin polimerizáció leglassabb lépése a nukleáció folyamata a dimérek, illetve a trimérek instabilitása miatt (3). A polimerizáció felgyorsítására a sejten belül különböző mechanizmusok léteznek, amelyek eredményeképpen a szabad szöges végek kialakulása felgyorsul, vagy a kialakuló végek száma megnő (2). A nukleációt gyorsító faktorok (forminok, Arp 2/3 komplex (4,5), spire(6,7)) a mikrofilamentum rendszer szabályozásában résztvevő fehérjék, amelyek az aktin filamentumok képződését a nukleáció elősegítésével gyorsítják. A nukleációs faktorok egyik családját alkotják a forminok. A formin fehérjéket az evolúció során nagymértékben konzervált régióik (ún. formin homológia domének: FH1, FH2 és FH3 domén (8)) alapján azonosíthatjuk. A forminok egy alcsaládját alkotják a „Diaphanous-related” forminok (Dia). Ezen fehérjék rendelkeznek még további doménnel, amelyek a fehérje aktivitásának szabályozásában vesznek részt (9). Az FH2 domén meghatározó szerepet játszik az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában. A domén funkcionális formája a két FH2 domén összekapcsolódása során létrejövő FH2 dimér. A dimerizációban kulcsszerepet tölt be az FH2 domén N-terminálisán található, azt az FH1 doménnel összekötő flexibilis „linker” régió (10). Az FH2 dimér a nukleáció szakaszát elősegíti, míg a különböző fajokból származó FH2 domének az elongáció szakaszát részlegesen vagy teljesen gátolják (11,12).

Az FH2 domén N-terminálisán található a prolinban gazdag szekvenciákat tartalmazó, kevésbé konzervált formin homológia 1 domén (FH1), amely kötőhelyeket biztosít az aktin monomér-kötő fehérjének a profilinnak (8). Az FH1 doménhez kötött profilin az FH1FH2 által katalizált nukleációt még inkább elősegíti. Az FH1FH2 és a profilin együttes jelenlétében az elongáció sebessége is nagyobb a szabad szöges végek elongációs sebességéhez képest. Az FH1FH2 sajátja a processzivitás, amelynek eredményeképpen az elongáció során a polimerizáció előrehaladtával képes hosszú ideig a filamentumok szöges végén maradni (13,14).

Bár több modell is született a forminok molekuláris kölcsönhatásainak és működési mechanizmusának leírására a forminok hatásának háttérében álló pontos mechanizmus részletei még ma sem ismertek. A korábbi tanulmányok nem szolgáltak információval arról, hogy melyik a fehérjének az a legkisebb egysége, amely nélkülözhetetlen az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatásának előidézéséhez. Azzal kapcsolatban sem voltak pontos ismeretek, hogy a forminok előidézik-e szerkezeti változásokat az aktin filamentumban. Túlnyomórészt ismeretlen volt az is, hogy képesek-e a forminok befolyásolni az aktin filamentumoknak más fehérjékkel kialakított kölcsönhatását. Nem volt ismert továbbá a formin fehérjék háromdimenziós atomi szerkezete sem.

## Célkitűzések

Az egérben található mDia1 formin központi FH2 doménjének háromdimenziós atomi szerkezetének röntgen-krisztallográfiai módszerrel történő meghatározása, 2.6 Å-os felbontásban kollaborációs partnerünkkel (Prof. Alfred Wittinghoffer, Dr. Atsushi Shimada, Max Planck Institute Für Molekulare Physiologie, Dortmund, Németország) való együttműködés keretében történt. Ez volt az első ismert formin szerkezet. Vizsgálataink során az emlős (mmammalian) Dia forminok családjába tartozó, a központi FH2 domént (mDia1, mDia2 és mDia3), illetve az FH2 domént és annak az N-terminálisán található „linker” régiót is tartalmazó (mDia1 és mDia3) formin fragmentumokat tanulmányoztunk.

Munkánk középpontjában a forminok funkciója és szerkezeti sajátosságai közötti kapcsolatok pontosabb megismerése állt. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy miként befolyásolják a forminok az aktin filamentumok polimerizációjának folyamatát, illetve az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságait.

- Kísérleteink első fázisában arra kerestük a választ, hogy hogyan módosulnak az aktin polimerizációját, depolimerizációját és kritikus koncentrációját jellemző paraméterek a különböző, egérből származó mDia formin fragmentumok jelenlétében.
- Vizsgálni kívántuk továbbá azt is, hogy a formin fragmentumok mely régiói szükségesek a funkció betöltéséhez.
- A munkánk második felében arra kerestük a választ, hogy módosulnak-e az aktin filamentumok konformációs tulajdonságai az mDia1 fehérje központi FH2 doménjének, illetve ugyanezen fehérjének a „linker” régiót is tartalmazó fragmentumának jelenlétében.
- Tanulmányoztuk azt is, hogy milyen hatása van a forminok által az aktin filamentumokban előidézett konformációs állapotbeli változásnak a filamentumok funkcionális tulajdonságaira és más fehérjékkel való kölcsönhatásukra.

## Alkalmazott módszerek

### *Fehérjék*

Az aktint nyúl vázizomból preparáltuk (15,16). Az izolálás után az aktin puffer A-ban (4 mM TRIS - HCl (pH7.3), 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT) volt feloldva.

Az emlős (egér) mDia fehérjéket kódoló génszakaszt tartalmazó PGEX-4-T3 típusú plazmidot kollaborációs partnerünktől kaptuk (Prof. Alfred Wittinghoffer, Dr. Atsushi Shimada, Max Planck Institute Für Molekulare Physiologie, Dortmund, Németország). Az mDia fragmentumokat rekombináns GST-fúziós fehérje-expressziós rendszerben termeltettük meg, prokarióta sejtekben. A GST-mDia fehérjéket affinitás kromatográfias módszerrel, GSH-oszlopról történő trombinos hasítással választottuk el. Az eluátumot gélfiltrációs eljárással tisztítottuk. Az mDia fragmentumokat az expresszió és a tisztítás után -80°C-on, 50 mM TRIS - HCl-t (pH7.3), 50 mM NaCl-t, 5 mM DTT-t és 5 % glicerint tartalmazó pufferben tároltuk.

### *Ioncsere, polimerizálás*

Az izolálás után az aktin monomér formában (G - aktin), Ca<sup>2+</sup>-mal telítve van. A kötött Ca<sup>2+</sup>-nak Mg<sup>2+</sup>-ra való kicserélése során az aktin monoméreket tartalmazó oldathoz 200 µM EGTA-t és 50 µM MgCl<sub>2</sub>-ot adtunk (17). A kationcserét követően az aktin monomérek polimerizációját 10 mM KCl és 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> hozzáadásával indítottuk el. A forminok hatásának ionerősségfüggésének vizsgálatokor alkalmazott további ionerősségek rendre 50 mM KCl és 1 mM MgCl<sub>2</sub>, illetve 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> voltak. Az ionerősséget az ionok koncentrációjának ( $c_i$ ) és töltésének ( $z_i$ ) ismeretében az alábbi egyenlet alapján számoltuk:

$$[\text{ionerősség}] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (1)$$



Abban az esetben, ha a minta formin fragmentumot is tartalmazott, azt közvetlenül a polimerizációt megelőzően adtuk az oldathoz. Annak érdekében, hogy a formin fehérjék tárolópufferének hatását kizárjuk, a tárolópuffer térfogatát mind a formin fragmentumot tartalmazó, mind pedig a formin nélküli mintákban állandó (5 %-a a teljes térfogatnak) értéken tartottuk.

#### *Az aktin fluoreszcens jelölése*

A fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok érdekében az aktin monoméren a 374-es pozícióban lévő cisztein aminosavat megfelelő fluorofórokkal jelöltük. A fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) mérésekhez az IAEDANS – IAF jelölőpárt alkalmaztuk. Az aktin polimerizációs folyamatának vizsgálatára pirén-jódacetamidot használtunk.

#### *Spektrofotometria*

A vizsgált fehérjék, illetve az alkalmazott fluoreszcens jelölők koncentrációját a minták abszorpciója alapján határoztuk meg. Az abszorpciót Shimadzu UV-2100 típusú fotométerrel mértük. Az mDia fragmentumok koncentrációját a 6 M-os GuHCl-ban, 280 nm-en mért abszorpció értékei alapján számoltuk (18), az extinkciós koefficienseket az aminosav szekvenciák alapján a ProtParam segítségével határoztuk meg (<http://us.expasy.org/tools/>). Az ATP enzimatis hasítása során képződő szerves foszfát ( $P_i$ ) mennyiségének, illetve az aktin filamentumokról való disszociáció kinetikájának vizsgálatára a Webb által kidolgozott módszert alkalmaztuk (19). A mérések során a minta abszorpciójának időbeli változását 360 nm-es hullámhosszon követtük nyomon.

„Steady – state” fluoreszcencia spektroszkópia

A „steady-state” fluoreszcencia vizsgálatokat termosztálható mintatartóval ellátott Perkin-Elmer LS50B típusú spektrofluoriméterrel végeztük. A hullámhosszat monokromátorral állítottuk a megfelelő értékre. A réseket mind az emissziós, mind pedig a gerjesztési oldalon 5 nm-re állítottuk. Munkánk során az aktin polimerizációs folyamatát jellemző paramétereket (elongációs, depolimerizációs sebesség) a pirén fluoreszcencia emissziójának időbeli változásából határoztuk meg. A kritikus koncentrációt különböző koncentrációjú aktin minták emissziós spektrumai alapján számoltuk. A hőmérsékletfüggő fluoreszcencia rezonancia energia transzfer méréseket 6 és 30°C között végeztük. A transzfer hatásfokát ( $E$ ) a donor akceptor nélküli ( $F_D$ ) és akceptor jelenlétében ( $F_{DA}$ ) mért, az „inner filter” effektusra korrigált fluoreszcencia emissziójából számoltuk (20):

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2)$$

A FRET hőmérsékletfüggésének nyomon követésével lehetőség nyílik a fehérje eltérő flexibilitású és / vagy konformációs állapotú formái közötti különbség kimutatására. Az energia transzfer hatásfokának és a donor akceptor jelenlétében mért intenzitásának hányadosaként megadható az  $f'$  paraméter (21):

$$f' = \frac{E}{F_{DA}} \quad (3)$$

Az  $f'$  paraméter hőmérsékletprofilja a donor és akceptor molekula közötti fehérjemátrix flexibilitásáról szolgáltat információt (21,22). Annak érdekében, hogy a különböző mérések eredményeit összehasonlítsuk, meghatároztuk a normált  $f'$  értékeit is, mint az adott hőmérsékletre számolt  $f'$  paraméter értékeinek és a legkisebb hőmérsékletre (6°C) tartozó értéknek a hányadosa.

### *Koszedimentációs módszer*

A különböző mDia fragmentumoknak az aktin filamentumokhoz való kötődését ultracentrifugáláson alapuló koszedimentációs módszer alkalmazásával vizsgáltuk. A mintákat 400,000 g-n, 30 percig, 20 °C-on centrifugáltuk Beckman Optima Max asztali ultracentrifugával (rotor: TLA-100). Az üledékek és a felülúszók fehérjetartalmát SDS-poliakrilamid gél (12.5 %) analízis alkalmazásával vizsgáltuk. Az egyes fehérjekomponensek sávjainak intenzitását a Syngene Bio-Imaging System gél dokumentációs és kiértékelő műszer segítségével határoztuk meg. Az affinitást ( $K_d$ ) az alábbi egyenlet alapján számoltuk (23,24):

$$[A]_0 S^2 - ([A]_0 + [mDia]_0 + K_d)S + [mDia]_0 = 0 \quad (4)$$

ahol  $[A]_0$  és  $[mDia]_0$  jelöli rendre a mintában lévő teljes aktin, illetve formin koncentrációját,  $S$  pedig a kötött formin arányát, amit az üledékben található formin sáv és az aktin sáv intenzitásának hányadosaként kaptunk.

A kofilinnel végzett kísérleteinkben a felülúszóban található aktin koncentrációját a felülúszóban ( $B^{SN}$ ) illetve az üledékben ( $B^P$ ) található aktin sávok korrigált intenzitásai és a mintában található aktin koncentrációja ( $c_{aktin}$ ) alapján határoztuk meg:

$$c_{aktin}^{SN} = \frac{B^{SN}}{B^{SN} + B^P} \cdot c_{aktin} \quad (5)$$

### *Differenciális pásztázó kalorimetriai kísérletek*

Az aktin filamentumok termodinamikai tulajdonságait a differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) módszerével vizsgáltuk. A kísérleteket SETARAM Micro DSC II kaloriméteren, 0 és 100°C közötti hőmérséklettartományon végeztük. A mérés során kapott denaturációs görbék egyes denaturációihoz tartozó kalorimetrikus entalpiaváltozás értékeket ( $\Delta H$ ) a denaturációs csúcsokra ( $T_m$ ) illesztett Gauss-görbék területeinek arányaiból számítottuk ki.

A denaturáció entrópiaváltozását ( $\Delta S$ ) a denaturáció hőmérsékletére ( $T_m$ ) számítva az alábbi képlettel kaptuk:

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (6)$$

A Gibbs-féle szabadentalpia-változást a következő egyenlet alapján számítottuk ki  $T = 22^\circ\text{C}$ -ra:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

## Eredmények és következtetések

### *Az mDia fehérjék hatása az aktin polimerizációjára*

Megmutattuk, hogy a különböző mDia forminok központi FH2 doménjeinek jelenlétében az aktin filamentumok elongációs, illetve depolimerizációs sebessége kisebb, a kritikus koncentráció értéke pedig megnövekszik, összehasonlítva ezen paramétereknek a spontán aktin polimerizációt jellemző értékeivel. Vizsgálataink szerint az mDia1 központi FH2 doménjében létrehozott pontmutációk gátolták a központi FH2 doménnek az aktin polimerizációs folyamatára kifejtett hatását. Eredményeink alapján mindhárom vizsgált formin fragmentum monomér formájú központi FH2 doménje a sapkafehérjékhez hasonló mechanizmus révén, a filamentumok szöges végével kialakított kölcsönhatás következtében, lassítja e vég polimerizációs dinamikáját. A forminban létrehozott mutációk hatásának vizsgálata során tapasztalt funkcióvesztés alapján arra következtethetünk, hogy az általunk vizsgált központi FH2 domén mindkét vége szerepet játszik az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában.

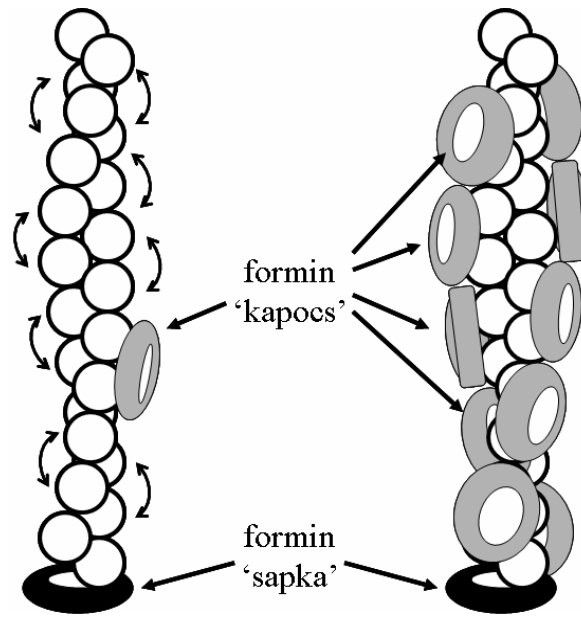
Ellentétes hatást figyeltünk meg a „linker” régiót is tartalmazó mDia1 és mDia3 fragmentumok esetén. Ezen domének feltételezhetően a nukleációs fázisban az aktin nukleuszok képződésének elősegítése révén gyorsítják a polimerizáció folyamatát. A hatásbeli különbségek hátterében a szerkezetbeli sajátosságok állnak. A „linker” régióval rendelkező fragmentumok ugyanis e régió révén képesek diméreket alkotni. A dimerizáció folyamata alapvetően szükséges az aktin polimerizációjának nukleációs fázisára kifejtett gyorsító hatásához.

Megmutattuk továbbá azt is, hogy a vizsgált mDia fehérjék kötnek az aktin filamentumok oldalához.

### *Az mDia fehérjék hatása az aktin filamentumok konformációjára*

Az mDia1-FH2 dimér fragmentumának az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságaira kifejtett hatását hőmérsékletfüggő FRET mérések segítségével kívántuk tanulmányozni. Kontroll kísérleteket végeztünk annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a FRET módszere alkalmazható-e a formin aktin kölcsönhatás leírására. Eredményeink szerint sem a hőmérséklet, sem pedig a jelölők nem befolyásolták az mDia fragmentumok aktivitását, továbbá az alkalmazott kísérleti körülmények nem módosították az aktin kritikus koncentrációját. Ezek alapján a FRET módszere alkalmazhatónak bizonyult a forminok által kiváltott hatás leírására.

Megmutattuk, hogy a dimér mDia1-FH2 domén jelenlétében módosul az aktin filamentumok konformációja, ami a filamentumok flexibilitásának növekedésében nyilvánul meg. Alacsony koncentrációban jelen lévő dimér mDia1-FH2 fragmentum esetén a flexibilitás a formin koncentrációval együtt növekedett körülbelül 1 : 10 formin : aktin protomér koncentráció arányig, magasabb koncentráció értékek esetén a koncentráció növekedésével egyre kisebb hatást tapasztaltunk. A dimér mDia1-FH2 által előidézett hatás formin : aktin moláris protomér koncentráció aránytól való függése arra enged következtetni, hogy a hatás kiváltásában két mechanizmus játszik szerepet. Figyelembe véve, hogy a forminok mind az aktin filamentumok szöges végéhez (erősebb kötés), mind pedig azok oldalához (gyengébb kötés) képesek kötni (13,25), *jelen munka*) az mDia1-FH2 dimér által kiváltott szerkezeti módosulást a következő módon értelmezhetjük. A filamentumok szöges végéhez kötődő mDia1-FH2 dimér (formin sapka) hosszú hatótávolságú alloszterikus kölcsönhatások révén képes a filamentumok szerkezetét fellazítani, míg a filamentumok oldalához kapcsolódó mDia1-FH2 domének (formin kapsok) a filamentumok szerkezetét stabilizálják (*1. ábra*).



1. ábra: A dimér mDia1–FH2 fragmentum és az aktin filamentumok kölcsönhatását leíró modell sematikus ábrázolása. Az üres körök az aktin filamentumot alkotó protoméreket jelölik, a fekete, illetve a szürke ellipszisek a filamentumok szögcs végére, illetve azok oldalához kötődő formin diméreket jelölik. Az ábra bal oldali része az alacsony formin : aktin arány, a jobb oldali ábra pedig a magas formin : aktin arány esetén jellemző állapotot mutatja.

Vizsgálataink szerint a monomér FH2 fragmentum is előidézte az aktin filamentumok flexibilitásának növekedését. A filamentumok szerkezetében bekövetkezett fellazulás azonban kisebb mértékű volt, mint a dimér fragmentum esetén és az mDia1–FH2 dimér jelenlétében megfigyelt koncentrációfüggést sem tapasztaltuk. Így eredményeink alátámasztják az mDia1–FH2 dimér hatását leíró modellünket.

#### *A formin aktin kölcsönhatás természete*

A vizsgált forminoknak az aktin polimerizációs folyamatára és a filamentumok dinamikai tulajdonságaira kifejtett hatása ionerősségfüggést mutatott: magasabb ionerősségen kisebb hatást tapasztaltunk, mint alacsonyabb ionkoncentrációt alkalmazva. Hasonló ionerősségfüggést figyeltünk meg a forminoknak az aktin filamentumok oldalához való kötését jellemző affinitás értékeiben is.

Elképzeléseink szerint a magasabb ionerősségen megfigyelt kisebb hatást a forminok és az aktin között kialakuló kötés gyengülése eredményezi. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a formin – aktin kölcsönhatás kialakításában fontos szerepük lehet a két fehérje között kialakuló elektrosztatikus kölcsönhatásoknak is, és gyengébb kötés azért alakul ki magasabb ionerősségek mellett, mert az oldat hatása leárnyékolja a fehérje csoportok elektrosztatikus kölcsönhatásait.

*Az mDia fehérjék hatása az aktin filamentumok funkcionális tulajdonságaira és a kofilinnel való kölcsönhatásukra*

Vizsgálataink szerint a forminok hatására módosult konformációs állapotba került aktin filamentumok funkcionális tulajdonságai és más fehérjékkel való kölcsönhatásuk is megváltozott. A forminok jelenlétében flexibilisebb aktin filamentumok termodinamikai stabilitása lecsökkent és az aktin ATPáz enzim hatására során képződő foszfát csoport filamentumokról való disszociációjának sebessége megnőtt. Ezek alapján szoros korreláció áll fenn az aktin filamentumok flexibilitása és funkcionális tulajdonságai között.

A forminok által fellazított aktin filamentumoknak módosult a kofilinnel való kölcsönhatásuk is. Megmutattuk, hogy az mDia1-FH2 dimér által nukleált, flexibilisebb filamentumokat a kofilin hatékonyabban depolimerizálja.



*Eredményeink biológiai jelentősége: egy lehetséges új mechanizmus az aktin citoskeleton szabályozásában*

Az élő sejtekben előforduló aktin struktúrákat morfológiájuk és a sejten belüli elhelyezkedésük alapján csoportosíthatjuk. Az eltérő aktin képletek a sejt különböző funkcióiban játszanak szerepet. Számos megfigyelés utal arra, hogy az egyes képleteket alkotó aktin filamentumok más és más fehérjékkel vannak kapcsolatban (26,27). A munkánk eredményei alapján felállított hipotézis szerint a forminok kötődésük révén képesek megváltoztatni az aktin filamentumok konformációs állapotát. A forminok kötődésének hatására módosult konformációs állapotba került aktin filamentumoknak az egyes aktin-kötő fehérjékhez való affinitásuk megnő, más fehérjék kötésére mutatott affinitásuk lecsökken a módosítatlan filamentumok affinitásához képest. Ezen tulajdonságuk révén a forminok meghatározó szerepet játszhatnak az aktin és az aktin-kötő fehérjék között kialakuló szupramolekuláris kölcsönhatások szabályozásában.

A jelen munkánk során megalkotott hipotézis általános érvényű is lehet a citoskeletonális fehérjekomplexek szabályozásában. A nukleációs faktorok sajátosága, hogy az aktin-kötő fehérjék közül elsőként kerülnek kapcsolatba a keletkező filamentumokkal. A forminokkal végzett kísérleteink során tett megállapításainkat általánosítva elképzelhető, hogy a fehérje komplexek térbeli és időbeli kialakulásának szabályozásában meghatározó a nukleációs faktorok azon tulajdonsága, mely szerint az aktin filamentumokhoz való kötődésük révén képesek módosítani azok konformációját és így az aktin-kötő fehérjékhez való affinitásukat. Ennek révén az aktin filamentumok nem pusztán passzív szálak, hanem aktív résztvevőként - információ továbbítására alkalmas szabályozó csatornaként - vesznek részt a sejtek működése során végbemenő folyamatokban.

## Összefoglalás

Munkánk során megállapítottuk, hogy:

- Az mDia fehérjék monomér formájú központi FH2 doménje, az aktin filamentumok szöges végéhez kötődve lassítja a filamentumok polimerizációját.
- Az mDia1 központi FH2 doménjében létrehozott mutációk vizsgálata során tapasztalt funkcióvesztés alapján az általunk vizsgált központi FH2 domén mindkét vége szerepet játszik az aktin filamentumokkal való kölcsönhatás kialakításában.
- Az FH2 domén amino-terminálisán található flexibilis „linker” régiót is tartalmazó mDia fragmentumok az aktin polimerizációs folyamatát gyorsítják a nukleációs fázis elősegítése révén.
- A hatásbeli különbségek hátterében a fehérjék szerkezetében megfigyelhető eltérések állnak. A flexibilis „linker” régiót tartalmazó domének ugyanis képesek összekapcsolódásuk során diméreket alkotni. A dimerizáció, illetve a dimerizáció létrejöttében alapvető szerepet játszó „linker” régió szükséges a fehérje *in vivo* funkciójának a betöltéséhez.
- A dimér mDia1-FH2 fragmentum jelenlétében módosulnak az aktin filamentumok dinamikai tulajdonságai. A filamentumok szöges végéhez kapcsolódó formin dimérek alloszterikus kölcsönhatások révén azok szerkezetét fellazítják, míg a filamentumok oldalához kapcsolódó formin dimérek stabilizáló hatást fejtenek ki.
- A dimér fragmentum hatására flexibilisebb konformációs állapotba került aktin filamentumok funkcionális sajátosságai is megváltoztak:
  - csökkent a filamentumok termodinamikai stabilitása,
  - megnőtt az aktin ATPáz enzimátikus hasítása során képződő foszfát filamentumokról való leválásának a sebessége,
  - valamint módosult a filamentumok kofilinnel való kölcsönhatása is.

### **Az értekezés alapjául szolgáló közlemények**

Bugyi B., G. Papp, G. Hild, D. Lőrinczy, EM. Nevalainen, P. Lappalainen, B. Somogyi, M. Nyitrai: Formins regulate actin filament flexibility through long-range allosteric interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **281.**, 10727-10736, 2006. IF: 6.355

Shimada A., M. Nyitrai , IR. Vetter, D. Kuhlmann, B. Bugyi, S. Narumiya, MA. Geeves, A. Wittinghofer: The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Molecular Cell*, **4.**, 511-522, 2004. IF: 16.811

### **Az értekezéshez kapcsolódó előadások**

Bugyi B., G. Papp, G. Hild, D. Lőrinczy, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, B. Somogyi and M. Nyitrai: Formins regulate actin filament flexibility through long-range allosteric interactions. 2006. június 15-17., EMBO/HHMI Central European Scientists Meeting, Dubrovnik, Horvátország.

Bugyi B., G. Papp, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, M. Nyitrai and B. Somogyi: Formin caps and cramps on actin filaments: A possible mechanism to regulate the formation of cytoskeletal protein complexes. 2005. szeptember 25-28., 8th International Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Ausztria.

### **Az értekezéshez kapcsolódó poszterek**

Bugyi B., G. Papp, Z. Ujfalusi, G. Hild, M. Nyitrai: The FH2 domain of Diaphanous Related formin mDia1 affects the dynamic properties of actin filaments. Meeting of International Research Scholars. 2005. június 22-25., Mérida, Mexikó.

Bugyi B., Papp G., Barkó Sz., Ujfalusi Z., Nyitrai M.: A formin homológ 2 domén hatása az aktin filamentumok dinamikájára. Magyar Biofizikai Társaság XXII. Kongresszusa, 2005. június 26-29., Debrecen.

Bugyi B., Kelemen F., Barna I., Nyitrai M.: A formin homológ 2 domén hatása az aktin polimerizációjára. XXXIV. Membrán-Transzport Konferencia, 2004. június 1-4., Sümeg.

#### **Az értekezésben nem szereplő közlemények**

Papp G.\*, Bugyi B.\*, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai: Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end. *Biophysical Journal*, 2006., in press. IF: 4.584

Halasi Sz., G. Papp, B. Bugyi, Sz. Barkó, J. Orbán, Z. Ujfalusi and B. Visegrády: The Effect of Pyrene Labelling on the Thermal Stability of Actin Filaments. *Thermochim. Acta*, **Vol. 445.**, 185 – 189, 2006. IF: 1.161

Bugyi B., G. Papp, Sz. Halasi, B. Visegrády: The effect of toxins on the thermal stability of actin filaments by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 275 – 279, 2005. IF: 1.478

Orbán J., Sz. Halasi, G. Papp, Sz. Barkó, B. Bugyi: Thermodynamic Characterisation of Different Actin Isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 287 – 290, 2005. IF: 1.478

Papp G., B. Bugyi, Z. Ujfalusi., Sz. Halasi, J. Orbán: The Effect of pH on the Thermal Stability of Alpha-Actin Isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 281 – 285, 2005. IF: 1.478

A cikkek összesített impakt faktora: 33.345

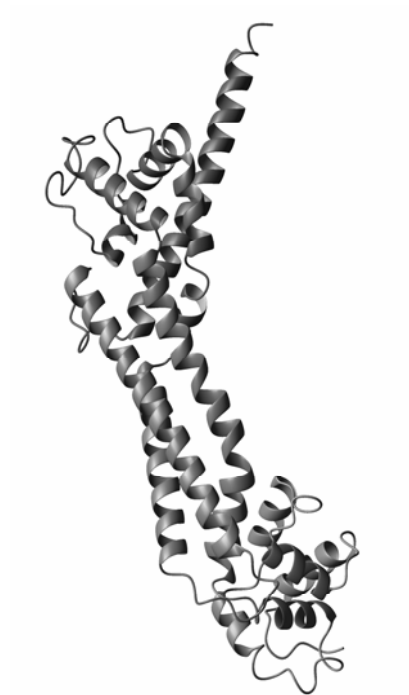
\*: közös első szerzők

## Irodalomjegyzék

1. Blanchoin, L., and Pollard, T. D. (2002) *Biochemistry* **41**(2), 597-602
2. Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2000) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 545-576
3. Pollard, T. D., and Cooper, J. A. (1986) *Annu Rev Biochem* **55**, 987-1035
4. Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D. (1994) *J Cell Biol* **127**(1), 107-115
5. Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2001) *Annu Rev Biochem* **70**, 649-676
6. Baum, B., and Kunda, P. (2005) *Curr Biol* **15**(8), R305-308
7. Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E., and Mullins, R. D. (2005) *Nature* **433**(7024), 382-388
8. Higgs, H. N. (2005) *Trends Biochem Sci* **30**(6), 342-353
9. Wallar, B. J., and Alberts, A. S. (2003) *Trends Cell Biol* **13**(8), 435-446
10. Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L., and Eck, M. J. (2004) *Cell* **116**(5), 711-723
11. Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002) *Science* **297**(5581), 612-615
12. Kovar, D. R., Harris, E. S., Mahaffy, R., Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2006) *Cell* **124**(2), 423-435
13. Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (2004) *Cell* **119**(3), 419-429
14. Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., and Watanabe, N. (2004) *Science* **303**(5666), 2007-2010
15. Feuer, G., Molnár, F., Pettkó, E., and Straub, F. B. (1948) *Hung. Acta Physiol.* **1**, 150-163
16. Spudich, J. A., and Watt, S. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**(15), 4866-4871.
17. Strzelecka-Golaszewska, H., Moraczewska, J., Khaitline, S. Y., Mossakowska, M. (1993) *Eur J Biochem* **211**, 731-742
18. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) *Protein Science* **4**(11), 2411-2423
19. Webb, M. R. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11), 4884-4887
20. Lakowicz, J. R. (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York
21. Somogyi, B., Matkó, J., Papp, S., Hevessy, J., Welch, G. R., and Damjanovich, S. (1984) *Biochemistry* **23**, 3403-3411
22. Somogyi, B., Lakos, Z., Szarka, A., and Nyitrai, M. (2000) *J. Photochem. Photobiol. B* **59**(1-3), 26-32
23. Kurzawa, S. E., and Geeves, M. A. (1996) *J Muscle Res Cell Motil* **17**(6), 669-676
24. Nyitrai, M., Szent-Gyorgyi, A. G., and Geeves, M. A. (2003) *Biochem J* **370**(Pt 3), 839-848
25. Li, F., and Higgs, H. N. (2003) *Curr Biol* **13**(15), 1335-1340
26. Iida, K., and Yahara, I. (1999) *Genes Cells* **4**(1), 21-32
27. Pruyne, D. W., Schott, D. H., and Bretscher, A. (1998) *J Cell Biol* **143**(7), 1931-1945
28. Cooper, J. A., Walker, S. B., and Pollard, T. D. (1983) *J Muscle Res Cell Motil* **4**(2), 253-262

**PhD THESIS**

**The effect of formins on the polymerisation and dynamic  
properties of actin filaments**



**BEÁTA BUGYI**

University of Pécs  
Faculty of Medicine  
Department of Biophysics

2006.

PhD THESIS

**The effect of formins on the polymerisation and dynamic properties of actin  
filaments**

**Beáta Bugyi**

Program: Biochemistry and molecular biology

Head of the program: Dr. Balázs Sümegi

Subprogram: B-130: Investigation of functional protein dynamics with biophysical  
methods

Head of the subprogram: Dr. Béla Somogyi

Supervisors: Dr. Béla Somogyi, Dr. Miklós Nyitrai



University of Pécs  
Faculty of Medicine  
Department of Biophysics  
2006.





## Introduction

The actin cytoskeleton (microfilaments and associated proteins) is one of the three polymer systems, which take part in the construction of protein backbone of the eukaryotic cells. Besides providing the shape and mechanical properties of cells the actin cytoskeleton determine the dynamic behaviour of living cells as well. The structurally different actin filament networks have distinct mechanical properties due to the spatially and temporally well coordinated work of diverse actin-binding proteins.

The main component of the microfilaments is the actin. In cells, actin can be found both in monomeric (globular, G - actin) and filamentous (F - actin) form. The structure of actin monomer can be divided into two domains. Between these domains, the high affinity cation-, and nucleotide binding cleft can be found. The bound divalent cation is  $Mg^{2+}$  *in vivo* or  $Ca^{2+}$  *in vitro*. The bound nucleotide can be ATP, ADP.P<sub>i</sub> or ADP. The assembly of actin monomers into filaments, the polymerization process involves three main phases. After the activation of monomers, in the first step two actin monomers form a dimer. Joining of and additional monomer to actin dimers results in actin trimers, or nuclei. In the elongation phase the actin filaments growth by incorporating the monomers into the filaments. In the last step, in steady – state a so called treadmilling occurs, in which the length of the filaments do not change. In this phase the actin monomers associate to and dissociate from both ends of the filaments with different kinetics. This results in the polarity of actin filaments. At the fast growing end (or barbed end) the association while at the slow growing end (or pointed end) the dissociation of monomers is the dominant process. At each end as the ratio of the dissociation ( $k_-$ ) and association ( $k_+$ ) constants of these processes the critical concentration can be defined. As a consequence of treadmilling the value of critical concentration characteristic for steady – state is between the values of the critical concentration of the barbed and pointed end so that its value is closer to the critical concentration of barbed end.

The lifetime of the filaments is determined by the rate of ATP hydrolysis and dissociation of the inorganic phosphate from filaments. The former occurs within seconds ( $0.3 \text{ s}^{-1}$ (1)) after the incorporation of monomers into the filaments, the latter is much slower ( $0.002 \text{ s}^{-1}$ (2)). The phosphate dissociation is accompanied by a conformational change in protomers, which results in the destabilization of actin filaments.

In living cells owing to different extra-, and intracellular stimuli the fast rearrangement of actin cytoskeleton occurs. The dynamic polymerization and depolymerisation of actin filaments are essential in these processes. The rate-limiting step in spontaneous polymerisation of actin is the nucleation phase due to the instability of actin dimers and trimers (3). In cells various mechanisms exist to induce polymerization, which are productively accelerate the production or increase the number of free barbed ends (2).

The nucleation factors (formins, Arp2/3 complex (4,5), spire (6,7)) are actin-binding proteins, which govern the dynamic remodelling of the actin cytoskeletons. Ubiquitous actin nucleation factors are the formin proteins that play essential roles in a wide range of cellular and developmental processes. The defining features of formins are the forming homology domains (FH1, FH2 and FH3 domain (8)). Subsets of formins the Diaphanous-related formins (Dia) involve additional domains, which mediate the regulation of the proteins through intramolecular autoinhibitory interactions (9).

The FH2 domain is the central catalytic element of formins, which responsible for the effect on actin. The FH2 dimer, composed of two antiparallel FH2 domains is the functional form of this domain. The flexible linker region at the N-terminal of the FH2 domain linking it to the FH1 domain is the key structural element in dimerisation (10). The FH2 dimer nucleates actin filament assembly. The FH2 domains from different species partially or completely inhibit filament elongation (11,12). The FH1 domain at the N-terminal of the FH2 domain consists of proline rich sequences providing binding sites for the actin monomer binding protein: profilin (8).

The profilin bound to the FH1 domain promotes the nucleation catalysed by the FH1FH2 domain and increases the rate of elongation compared to the rate of freely elongating barbed ends. The characteristic feature of the FH1FH2 is the processivity: it does not need to dissociate and reassociate to the barbed end every time when a monomer adds or removes but can remain at the barbed end of the filaments as they elongate (13,14).

Despite the numerous studies characterizing the effects of formins on actin the exact mechanism has not been revealed yet. The smallest region of formins, which is essential for their effect on actin polymerisation was not defined. It was also not clarified whether the formins can induce conformational changes within the actin filaments or formins can modify their interactions with other proteins. The three dimensional atomic structure of formins has not been determined.

## Aims

The first three dimensional atomic structure, the structure of the core FH2 domain of mDia1 (from mouse) was determined at 2.6 Å resolution within the framework of international collaboration between our laboratory and Professor Alfred Wittinghoffer (Max Planck Institute, Dortmund, Germany). In the present work the core FH2 domains and the FH2 domain involving an additional flexible linker region at its N-terminal from mammalian Dia formins (mDia1, mDia2 and mDia3) were investigated.

Our work was focused on the characterization of the interactions between mDia formins and rabbit skeletal actin *in vitro*. The effects of mDia fragments on the polymerization kinetics and dynamic properties of actin filaments were examined.

- In the first part of our research we described how the mDia fragments modify the polymerization, depolymerisation process and the critical concentration of actin assembly.
- We investigated which residues of the core FH2 domain were important for the effect.
- In the second part of our research we examined how the mDia fragments modify the conformational properties of actin filaments.
- We studied whether the functional properties of actin filaments and their interactions with other proteins were modified in the presence of formins.

## Methods

### *Proteins*

Actin from rabbit skeletal muscle was prepared according to the method of Spudich and Watt (15,16) and stored in buffer A (4 mM TRIS - HCl (pH7.3), 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT).

The plasmids (PGEX-4-T3) encoding the mDia proteins were obtained from our collaboration partner. The fragments of mammalian formin mDia were expressed as GST-fusion proteins in *E.coli* strain BL21 (DE3) pLysS. The GST-fusion proteins were loaded onto a GSH-column, eluted from the column after cleavage by thrombin and further purified by size exclusion chromatography. After the preparation the formin fragments were kept in  $-80^{\circ}\text{C}$  in storing buffer (50 mM TRIS - HCl (pH7.3), 50 mM NaCl and 5 % glycerol).

### *Cation exchange and polymerisation*

After isolation the actin is in monomeric form and binds Ca<sup>2+</sup>. The bound Ca<sup>2+</sup> was replaced by Mg<sup>2+</sup> by adding 200  $\mu\text{M}$  EGTA and 50  $\mu\text{M}$  MgCl<sub>2</sub> (17). The Mg<sup>2+</sup>-actin was polymerized with 10 mM KCl and 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>. The ionic strength dependence of the effect of formins was investigated using 50 mM KCl and 1 mM MgCl<sub>2</sub> or 100 mM KCl and 2 mM MgCl<sub>2</sub> as well. The ionic strength was calculated from the concentration ( $c_i$ ) and the charge ( $z_i$ ) of each ion according to the following equation:

$$[\text{ionic strength}] = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (1)$$

If the sample contained formin fragments that were added to the solution prior to the polymerization. In order to exclude the effect of the storing buffer its volume regardless of whether it was added with or without formins was kept constant (5 % of the total volume) in the samples.

#### *Fluorescence labelling of actin*

Towards the fluorescence spectroscopic measurements the Cys<sup>374</sup> residue of actin monomer was labelled with appropriate fluorophores. In the temperature dependent fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurement the IAEDANS – IAF dyes were used as a donor – acceptor pair. To investigate the polymerization process of actin pyrene - iodoacetamide was used.

#### *Spectrophotometry*

The concentration of the examined proteins and the fluorescence labels were determined on the basis of absorption of the samples. The absorption was measured with a Shimadzu UV-2100 spectrophotometer. The concentrations of mDia fragments were determined by measuring the absorption at 280 nm in 6 M GuHCl (18), the extinction coefficients were estimated with ProtParam from the sequences (<http://us.expasy.org/tools/>).

The amount and the dissociation rate of the inorganic phosphate from actin filaments were measured based on the method originally described by Webb (19). The time kinetics of the absorbance of the samples at 360 nm was monitored.

#### *Steady – state fluorescence spectroscopy*

Fluorescence was measured with a Perkin Elmer LS50B spectrofluorometer equipped with a thermostated sample holder. The appropriate values of the excitation and emission wavelengths were set with monochromators. Both the excitation and emission slits were set to 5 nm.

The parameters describing the polymerization of actin (e.g.: the rate of elongation and depolymerisation) were determined from the measured pyrene transients. The critical concentration of actin was calculated from the emission spectra of pyrene labelled actin samples at different concentrations. The temperature dependent FRET measurements were carried out between 6 and 30°C. The transfer efficiency ( $E$ ) was obtained from the emission of donor in the absence ( $F_D$ ) and in the presence of acceptor ( $F_{DA}$ ) (20):

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2)$$

The intensities were corrected for the inner filter effect. To obtain more information regarding the dynamic and conformational properties of actin filaments a special FRET parameter, the  $f'$  parameter was calculated as follows (21):

$$f' = \frac{E}{F_{DA}} \quad (3)$$

It was shown that the temperature dependence of the  $f'$  parameter is informative regarding the flexibility of the protein matrix between the donor and the acceptor molecules (21,22). In order to compare the results from different measurements we gave the relative  $f'$  parameter defined as the value of the  $f'$  parameter at a given temperature divided by the value obtained at the lowest temperature (6°C).

#### *Co-sedimentation assay*

To characterise the binding of mDia fragments to actin filaments co-sedimentation assays, based on ultracentrifugation were carried out. The samples were centrifuged at 400,000 g for 30 min at 20°C with a Beckman Optima MAX benchtop ultracentrifuge and a TLA-100 rotor. The protein content of the pellets and supernatants were analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (12.5 %) and the gels were stained with coomassie blue.

The intensities of the bands corresponding to the proteins were determined with a Syngene Bio-Imaging System. The affinities of formins to the side of the actin filaments ( $K_d$ ) were estimated using the following equation (23,24):

$$[A]_0 S^2 - ([A]_0 + [mDia]_0 + K_d)S + [mDia]_0 = 0 \quad (4)$$

where  $[A]_0$  and  $[mDia]_0$  the total actin and formin concentration, respectively.  $S$  is the fraction of bound formin calculated as the ratio of the corrected intensity of formin bands to that of the actin bands found in the pellets.

When the effect of formins on the interaction of actin filaments with cofilin was tested the actin concentrations in the supernatants ( $c_{actin}^{SN}$ ) were determined from the corrected intensities of actin bands in the supernatants ( $B^{SN}$ ) and in the pellets ( $B^P$ ) with knowledge of the total actin concentration in the sample ( $c_{actin}$ ) as follows:

$$c_{actin}^{SN} = \frac{B^{SN}}{B^{SN} + B^P} \cdot c_{actin} \quad (5)$$

#### *Differential scanning calorimetry*

The thermal properties of actin filaments were investigated using differential scanning calorimetry (DSC). The thermal denaturation of actin filaments was monitored between 0 and 100°C with a SETARAM Micro DSC II calorimeter. The calorimetric enthalpy change ( $\Delta H$ ) of the endothermic transition was calculated from the area under the heat denaturation curve. The enthalpy change ( $\Delta S$ ) was determined for the peak transition temperature ( $T_m$ ):

$$\Delta S = \frac{\Delta H}{T_m} \quad (6)$$



The Gibbs free enthalpy change was calculated for  $T=22^{\circ}\text{C}$  according to the following equation:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

## Results and discussion

### *The effect of mDia fragments on the polymerization kinetics of actin*

The sensitivity of pyrene to the polymerization of actin was used to investigate the effect of mDia formins on the polymerization kinetics of actin (28). We found that in the presence of the core FH2 domain of mDia formins both the rate of elongation and depolymerisation decreased and the critical concentration of actin assembly increased compared to the values of these parameters characteristic for the spontaneous actin assembly. The mutations of mDia1 inhibited the effect of the core FH2 fragment on the actin polymerisation. On the basis of our results all the three monomeric core FH2 fragments due to their interaction with the barbed end of actin filaments inhibit the spontaneous polymerization of actin through a similar mechanism observed for capping proteins. The loss of function of the mutations indicates that both ends of the core FH2 domain are required for the activity. The linker region containing fragments from mDia1 and mDia3 have dramatically different effect: they accelerate actin polymerisation through their effect on the nucleation phase. The different structural features of the fragments result in different effects on actin. The flexibility of the linker region between the FH1 and FH2 domains is essential for the dimerisation of the fragments and dimerisation is essential for the nucleation of actin filaments.

The results from co-sedimentation experiments proved that all mDia fragments can bind to the side of actin filaments.

### *The effect of mDia fragments on the conformation of actin filaments*

Temperature dependent fluorescence resonance energy transfer measurements were carried out to describe the effect of the dimeric mDia1-FH2 fragments on the protomer - protomer interactions in the actin filaments. In order to clarify whether the FRET method can be applicable to investigate the formin - actin interaction we made control experiments. The results showed that neither the temperature nor the labelling affected the activity of mDia fragments. We also found that the applied experimental circumstances did not change the critical concentration of actin assembly. These results indicate that FRET can be applied for examining the effects of mDia1 on actin filaments.

The results from FRET measurements revealed that the binding of the dimeric mDia1-FH2 to actin filaments induces conformational changes in the filaments making their structure more flexible. The effect strongly depends on the formin : actin protomer concentration ratio. The effect of mDia1-FH2 dimer increased with increasing formin concentration up to 1 : 10 = formin : actin ratio. Above this the effect of formin became smaller with increasing formin concentration. This suggests that more than one mechanism is responsible for the effect of mDia1-FH2 dimer. One can interpret the results considering the barbed-end binding (with stronger affinity) and filament side binding (with weaker affinity) mechanisms of formins (13,25), *the present work*) as follows. A formin 'cap' at the barbed end increases the flexibility of the filament through long range allosteric interactions, while formins bound to the side of the actin filaments as formin 'cramps' linking actin protomers along the sides of filaments can stabilise the molecular interactions between neighbouring protomers and make the filaments stiffer (*Figure 1.*). The superposition of these two effects was observed in the measurements.

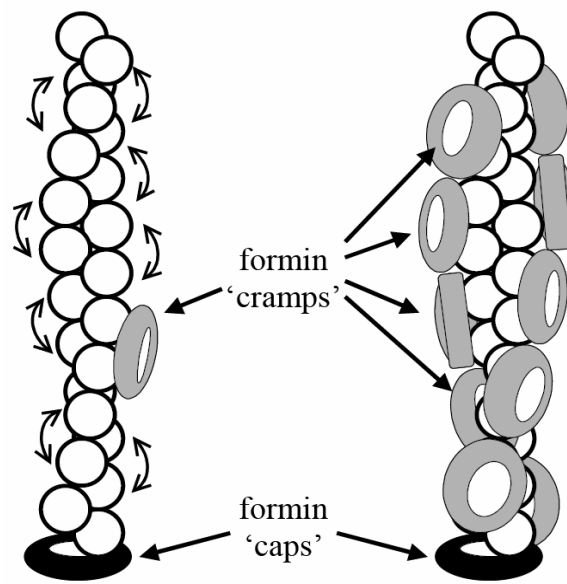


Figure 1.: The schematic representation of the proposed model for the formin - actin interaction. Actin protomers in the filaments are indicated with open circles. The formin fragments bound to the barbed end (formin caps) and to the side of the actin filaments (formin cramps) are represented by black and grey ellipses, respectively. The left side of the figure shows the situation at low formin : actin stoichiometry while the right side of the figure corresponds to high formin concentration.

We found that the monomeric mDia1 fragment induced increase in the flexibility of actin filaments but the magnitude of the loosening was smaller than in the presence of the dimeric fragment and did not show such concentration dependence. These observations support our model describing the effect of mDia1-FH2 dimer.

### *The nature of the formin actin interaction*

We showed that the effects of formins on the polymerisation process and the conformation properties of actin filaments depended on the ionic strength: the effect was smaller applying higher ion concentration than smaller ionic strength. Similar ionic strength dependence of the affinity of the side binding of formins could be observed. We assume that higher ionic strength results in the loosening of the binding of formins to actin filaments. This observation can imply that the electrostatic interactions play important role in the interactions of the two proteins. The weakening of the electrostatic interactions between protein groups resulted from the effect of solvent causes the weaker binding of formin to actin.

### *The effect of mDia fragments on the functional properties of actin filaments and their interaction with cofilin*

In order to obtain more detailed information regarding the mechanism of formins we investigated whether the functional properties of actin filaments were modified in the presence of formins. The results showed that actin filaments were thermodynamically less stable and the dissociation rate of the inorganic phosphate from filaments increased in the presence of formins. These observations suggest that there is direct correlation between the flexibility and the functional properties of actin filaments.

The formin induced change in the conformation of actin filaments was accompanied by modification in their interaction with cofilin. We found that cofilin depolymerises more effectively the formin nucleated actin filaments, which could be due to the destabilisation effect of formins on the actin filament structure.

*The biological relevance of our research: a possible new mechanism in the regulation of actin cytoskeleton*

In living cells the actin structures can be classified on the basis of their morphology and intracellular localization. The different actin networks play role in different functions of cells. In many cases the proteins involved in these complexes can be attributed to specific actin nucleation factors. In cells a group of proteins localize to formin-nucleated actin structures (e.g.: tropomyosin (27)), while other proteins are typically associated with actin filaments nucleated by the Arp2/3 complex (eg: ADF/cofilins (26)). However how the formation of these protein complexes is regulated is unknown.

The present work provides evidences that formin fragments can have substantial and allosteric effects on the conformation of actin filaments by binding to the barbed end. According to our hypothesis due to the conformational changes induced by formins by their binding formins can change the affinity of actin binding proteins to actin filaments and thus determine which proteins are involved in the corresponding complexes.

Based on this observation one can propose a special mechanism of the regulation of the formation of cytoskeletal protein complexes. In consequence of their function, actin nucleation factors are the first to bind to the newly generated actin filaments. In general one can envisage that the nucleation factors can modify the conformation of actin filaments by binding to them, which play an essential role in determining the affinity of actin binding proteins to actin filaments. The nucleation factors can change the affinity of actin binding proteins to actin filaments and in this way regulate the formation of protein complexes. By reason of this hypothesis the actin filaments are not only passive cables rather serve regulatory informational channels in living cells.

## Synopsis

In the present research we found, that:

- The monomeric core FH2 domains from mDia proteins by binding to the barbed end of the filaments inhibit the assembly of actin filaments.
- Both ends of the core FH2 domain are required for its activity.
- The linker region containing fragments can accelerate actin polymerisation by catalysing the nucleation phase.
- The different effects result from the structural differences: the linker region is essential for dimerisation and dimerisation is essential for nucleation.
- The dimeric mDia1-FH2 modifies the dynamic properties of actin filaments: a formin 'cap' bound to the barbed end increases the flexibility of actin filaments, while formin 'cramps' bound to the side of the filaments can stabilise their structure.
- The functional properties of flexible actin filaments nucleated by mDia1-FH2 dimer are modified:
  - the thermodynamic stability of actin filaments decreased,
  - the rate of phosphate dissociation from actin filaments increased,
  - and the interaction of actin filaments with cofilin was modified.

### **The publication the thesis is based on**

Bugyi B., G. Papp, G. Hild, D. Lőrinczy, EM. Nevalainen, P. Lappalainen, B. Somogyi, M. Nyitrai: Formins regulate actin filament flexibility through long-range allosteric interactions. *Journal of Biological Chemistry*, **281.**, 10727-10736, 2006. IF: 6.355

Shimada A., M. Nyitrai , IR. Vetter, D. Kuhlmann, B. Bugyi, S. Narumiya, MA. Geeves, A. Wittinghofer: The core FH2 domain of diaphanous-related formins is an elongated actin binding protein that inhibits polymerization. *Molecular Cell*, **4.**, 511-522, 2004. IF: 16.811

### **Lectures**

Bugyi B., G. Papp, G. Hild, D. Lőrinczy, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, B. Somogyi and M. Nyitrai. Formins regulate actin filament flexibility through long-range allosteric interactions. 2006. June 15-17., EMBO/HHMI Central European Scientists Meeting, Dubrovnik, Croatia.

Bugyi B., G. Papp, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, M. Nyitrai and B. Somogyi. Formin caps and cramps on actin filaments: A possible mechanism to regulate the formation of cytoskeletal protein complexes. 2005. September 25-28., 8th International Symposium on Instrumental Analysis, Graz, Austria.

### **Posters**

Bugyi B., G. Papp, Z. Ujfalusi, G. Hild, M. Nyitrai: The FH2 domain of Diaphanous Related formin mDia1 affects the dynamic properties of actin filaments. Meeting of International Research Scholars. 2005. July 22-25., Mérida, Mexico.

Bugyi B., G. Papp, Sz. Barkó, Z. Ujfalusi, M. Nyitrai: The effect of formin homology domain 2 on the dynamic properties of actin filaments, XXII. Congress of the Hungarian Biophysical Society, 2005. June 26-29., Debrecen, Hungary.



Bugyi B., F. Kelemen, I. Barna, M. Nyitrai: The effect of formin homology domain 2 on the polymerisation of actin, XXXIV. Conference of Membrane-Transport, 2004. July 1-4., Sümeg, Hungary.

### **Other publications**

Papp G.\*, Bugyi B.\*, Z. Ujfalusi, Sz. Barkó, G. Hild, B. Somogyi, M. Nyitrai: Conformational changes in actin filaments induced by formin binding to the barbed end. *Biophysical Journal*, 2006., *in press*. IF: 4.584

Halasi Sz., G. Papp, B. Bugyi, Sz. Barkó, J. Orbán, Z. Ujfalusi, B. Visegrády: The Effect of Pyrene Labelling on the Thermal Stability of Actin Filaments. *Thermochim. Acta*, **Vol. 445.**, 185 – 189, 2006. IF: 1.161

Bugyi B., G. Papp, Sz. Halasi, B. Visegrády: The effect of toxins on the thermal stability of actin filaments by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 275 – 279, 2005. IF: 1.478

Orbán J., Sz. Halasi, G. Papp, Sz. Barkó, B. Bugyi: Thermodynamic Characterisation of Different Actin Isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 287 – 290, 2005. IF: 1.478

Papp G., B. Bugyi, Z. Ujfalusi., Sz. Halasi, J. Orbán: The Effect of pH on the Thermal Stability of Alpha-Actin Isoforms. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **Vol. 82.**, 281 – 285, 2005. IF: 1.478

Sum of the impact factors: 33.345

\*: these authors contributed equally to this work

## References

1. Blanchoin, L., and Pollard, T. D. (2002) *Biochemistry* **41**(2), 597-602
2. Pollard, T. D., Blanchoin, L., and Mullins, R. D. (2000) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**, 545-576
3. Pollard, T. D., and Cooper, J. A. (1986) *Annu Rev Biochem* **55**, 987-1035
4. Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D. (1994) *J Cell Biol* **127**(1), 107-115
5. Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2001) *Annu Rev Biochem* **70**, 649-676
6. Baum, B., and Kunda, P. (2005) *Curr Biol* **15**(8), R305-308
7. Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E., and Mullins, R. D. (2005) *Nature* **433**(7024), 382-388
8. Higgs, H. N. (2005) *Trends Biochem Sci* **30**(6), 342-353
9. Wallar, B. J., and Alberts, A. S. (2003) *Trends Cell Biol* **13**(8), 435-446
10. Xu, Y., Moseley, J. B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B. L., and Eck, M. J. (2004) *Cell* **116**(5), 711-723
11. Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002) *Science* **297**(5581), 612-615
12. Kovar, D. R., Harris, E. S., Mahaffy, R., Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2006) *Cell* **124**(2), 423-435
13. Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (2004) *Cell* **119**(3), 419-429
14. Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., and Watanabe, N. (2004) *Science* **303**(5666), 2007-2010
15. Feuer, G., Molnár, F., Pettkó, E., and Straub, F. B. (1948) *Hung. Acta Physiol.* **1**, 150-163
16. Spudich, J. A., and Watt, S. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**(15), 4866-4871.
17. Strzelecka-Golaszewska, H., Moraczewska, J., Khaitline, S. Y., Mossakowska, M. (1993) *Eur J Biochem* **211**, 731-742
18. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) *Protein Science* **4**(11), 2411-2423
19. Webb, M. R. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11), 4884-4887
20. Lakowicz, J. R. (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York
21. Somogyi, B., Matkó, J., Papp, S., Hevessy, J., Welch, G. R., and Damjanovich, S. (1984) *Biochemistry* **23**, 3403-3411
22. Somogyi, B., Lakos, Z., Szarka, A., and Nyitrai, M. (2000) *J. Photochem. Photobiol. B* **59**(1-3), 26-32
23. Kurzawa, S. E., and Geeves, M. A. (1996) *J Muscle Res Cell Motil* **17**(6), 669-676
24. Nyitrai, M., Szent-Gyorgyi, A. G., and Geeves, M. A. (2003) *Biochem J* **370**(Pt 3), 839-848
25. Li, F., and Higgs, H. N. (2003) *Curr Biol* **13**(15), 1335-1340
26. Iida, K., and Yahara, I. (1999) *Genes Cells* **4**(1), 21-32
27. Pruyne, D. W., Schott, D. H., and Bretscher, A. (1998) *J Cell Biol* **143**(7), 1931-1945
28. Cooper, J. A., Walker, S. B., and Pollard, T. D. (1983) *J Muscle Res Cell Motil* **4**(2), 253-262