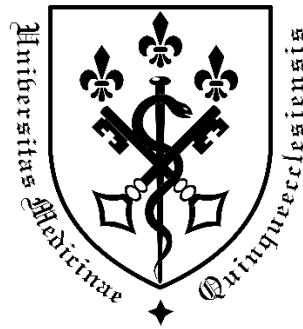


Ph.D. értekezés

**A miozin 16 C-terminális konformációs
dinamikai és funkcionális karakterizálása**

Telek Elek



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Általános Orvostudományi Kar

Biofizikai Intézet

2021

Interdiszplináris Doktori Iskola: D93

Doktori Iskola Vezetője: Prof. Sümegei Balázs†, ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc

Doktori Program: B-130

Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai módszerekkel

Doktori Program Vezetője: Prof. Dr. Nyitrai Miklós

Témavezetők: Dr. Lukács András

Dr. Bugyi Beáta

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	5
1.1 Konvencionális miozinok	7
1.2 Nem-konvencionális miozinok	8
1.3 Nem-konvencionális miozin XVI	8
1.3.1 Miozin XVI felfedezése	8
1.3.2 Miozin XVI evolúciója	9
1.3.3 Miozin XVI genetikai jellemzése	9
1.3.4 Miozinok C-terminális extenzióval	9
1.3.5 Miozin XVI szerkezete	10
1.3.6 Myo16Tail szerkezetének jellemzése	11
1.3.7 Miozin XVI lehetséges funkciói	12
1.3.7.1 Szövet-specifikus lokalizáció	12
1.3.7.2 Intracelluláris lokalizáció	13
1.3.7.3 N-terminális Myo16Ank szerepe a PP1c szabályozásban	14
1.3.7.4 Myo16 motor funkció és feltételezett szabályozási folyamatok	15
1.3.7.5 Myo16Tail szerepe szabályozási folyamatokban	18
1.3.7.5.1 Sejtciklus szabályozás	18
1.3.7.5.2 Aktin citoskeleton szabályozás	19
1.3.7.5.3 Prolin-gazdag régió lehetséges szerepe	22
1.4 Miozin XVI szerepe humán megbetegedésekben	24
1.5 Rendezetlen fehérjék	25
1.5.1 Rendezetlen fehérjék szerkezeti és funkcionális jellemzői	25
1.5.2 Rendezetlen fehérjék és neurodegeneratív kórképek kapcsolata	28
2. Célkitűzések	30
3. Anyagok és módszerek	31
3.1 Bioinformatikai analízis	31
3.2 Fehérjék tervezése és tisztítása	31
3.2.1 Rekombináns Myo16Tail klónozás	31
3.2.2 Myo16Tail expresszió és tisztítás bakulovírus/Sf9 rendszerben	32
3.2.3 Kísérletek során használt egyéb fehérjék előállítása	33
3.3 Western blot analízis	34
3.4 Fehérjék fluoreszcens jelölése	34

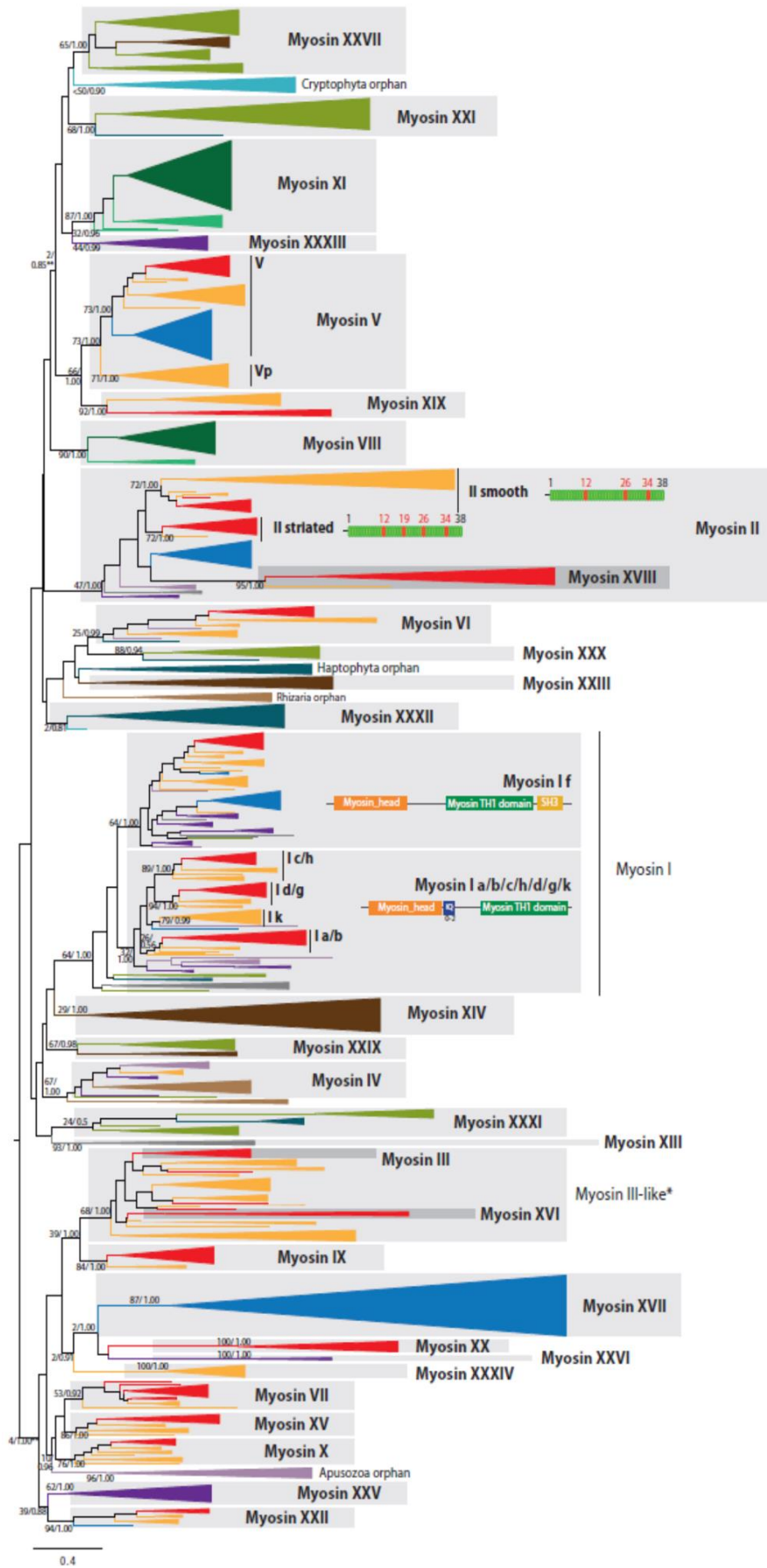
3.5	Spektroszkópai módszerek	35
3.5.1	Fluoreszcencia emisszió.....	35
3.5.2	Fluoreszcencia kioltás	36
3.5.3	Steady-state anizotrópia	36
3.5.4	Időkorrelált egy foton számlálás (TCSPC)	37
3.5.5	Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD)	38
3.5.6	Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)	39
3.5.7	Polimerizációs kinetika.....	39
4.	Eredmények	40
4.1	Myo16Tail bioinformatikai szekvencia analízis	40
4.1.1	Myo16Tail aminosav szekvencia összetétel vizsgálata	40
4.1.2	Myo16Tail rendezetlenség és szerkezeti dinamika prediktálása	41
4.1.3	Myo16Tail poszttranszlációs módosulási helyek predikciója	43
4.1.4	Myo16Tail szekvencia konzerváció vizsgálata	44
4.1.5	Myo16Tail szerkezet modellezése	48
4.2	Myo16Tail előállítás.....	49
4.3	Myo16Tail szerkezetének karakterizálása	51
4.3.1	Myo16Tail konformációs tulajdonságainak vizsgálata	51
4.3.2	Myo16Tail triptofán hozzáférhetőség vizsgálata.....	56
4.3.3	Myo16Tail szerkezeti kooperativitása	59
4.3.4	Myo16Tail konformációs dinamikája.....	60
4.3.5	Myo16Tail másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata	63
4.3.6	Myo16Tail termodinamikai stabilitásának karakterizálása	66
4.4	Myo16Tail funkcionális vizsgálata	68
4.4.1	Myo16Tail funkcionálisan aktív és kölcsönhat a Myo16Ank doménnel	68
4.4.2	Myo16Tail nem befolyásolja az aktin polimerizáció dinamikáját.....	71
5.	Összefoglalás	75
5.1	Myo16Tail bioinformatikai analízise	75
5.2	Myo16Tail konformáció vizsgálata	76
5.3	Myo16Tail biokémiai karakterizálása	80
6.	Konklúzió	81
7.	A témában elért új eredmények	82
8.	Rövidítések.....	84
9.	Köszönetnyilvánítás	86

10. Referenciák	87
11. Publikációs lista	101
11.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	101
11.2 Az értekezéshez kapcsolódó közlemények	101
11.3 Az értekezés eredményeit bemutató előadások	101
11.4 Az értekezés eredményeit bemutató poszterek	102
11.5 Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények	103
11.6 Idézhető absztraktok	103
11.7 Az értekezéshez nem kapcsolódó előadások	103
11.8 Az értekezéshez nem kapcsolódó poszterek	104

1. BEVEZETÉS

A miozin motorfehérjék kutatása egészen a 19. századig nyúlik vissza, mikor Wilhelm Friedrich Kühne német fiziológus 1864-ben sikeresen izolált izomszövetből egy oldható fehérjét, amely a „miozin” nevet kapta [1]. Akkor még nem tudta, hogy egy nagy fehérjecsalád első tagját fedezte fel, amely esszenciális szerepet játszik az élőlények szinte minden életfolyamatában. Kezdetben azt gondolták, hogy a miozinok csak kontraktilis funkciót látnak el a harántcsíktolt izomrostokban. Később viszont kimutatták jelenlétüket simaizmokban, valamint számos sejt típusban. Az elmúlt évtizedekben különböző miozinokat írtak le eltérő szerkezettel, funkcióval és szabályozási mechanizmussal, viszont a fehérje motor funkciója, amely az erőkifejtésért és motilitásért felelős minden miozin fehérjében megtalálható. Ezt követően Engelhardt és Ljubimova hosszas kutatások után 1939-ben leírták, hogy a vázizom miozin (miozin II) fehérje ATPáz aktivitással rendelkezik. Ennek relevanciája korábbi feltételezések alapján az volt, hogy az ATP, mint energiaforrás szerepet játszhat az izomműködésben, a kontrakcióban. A miozin ATPáz aktivitását hangsúlyozó elméletet a kutatói társadalom viszont kétségek közt fogadta [2]. Szent-Györgyi Albert és Banga Ilona kutatásaik során megerősítették Engelhardt és Ljubimova megfigyeléseit 1940-ben [3–5]. Két évvel később Straub F. Brúnó és Banga Ilona 1942-ben a szegedi egyetemen felfedezte és karakterizálta a vázizom miozin egyik kölcsönható partnerét az aktin fehérjét, ami a későbbiekben nem csak a harántcsíktolt izomrost, de az eukarióta sejt váz alapvető „építőelemének” bizonyult [6]. Ezt követően a miozin fehérjék kutatása dinamikus fejlődésnek indult annak érdekében, hogy megérthessék az izomműködés alapjait.

A miozinok korán alakultak ki az eukarióta organizmusok evolúciója során, feltehetően gén duplikációval és különféle diverzifikációs mechanizmusokkal [7–9]. A miozinok minden eukarióta sejtben megtalálhatóak az amőbától és az élesztőtől a növényeken át egészen az emlősökig, valamint a miozin izoformák számának növekedése egyenesen arányos az evolúciós fejlettségi szinttel [10]. A miozin szupercsaládba tartozó különféle aktin alapú motor fehérjék létfontosságú szerepet töltenek be celluláris folyamatokban, többek között a sejt váz alkotó fehérjék horgonyzásában, stressz szálak és lamellipódiumok kialakításában, sejtosztódásban, sejtmozgásban vagy a vezikuláris transzport folyamatokban [11–14]. A több, mint kétezer miozin izoforma [15] osztályozására számos filogenetikai analízis született. Ezek közül a legfrissebb 2014-ben harmincnégy különböző osztályba sorolta a miozin fehérjéket korábban nem vizsgált eukarióta törzseket (állati egysejtűek és algák) is bevonva az analízisbe (**1. ábra**) [16].



1. ábra. A miozin motor fehérjék legfrissebb filogenetikai osztályozása [16].

A miozinok közös tulajdonsága az ATP hidrolízisből nyert kémiai energia átalakítása mechanikai energiává, ami a különféle motorikus funkciókban létfontosságú [7,8,14]. Szerkezetük három fehérje régióra tagolható: (1) a motor domén, amely ATP-t hidrolizál és az aktin fehérjét ATP koncentrációfüggő módon képes kötni, (2) a nyaki régió a könnyű láncok kötéséért felelős, valamint (3) a változatos és különféle funkciót ellátó C-terminális fark domén. A miozin motor domén a leginkább konzervált része a molekulának. A könnyű lánc kötésben szerepet játszó nyaki régió IQ szekvencia motívumokat tartalmaz. Az IQ motívumok száma 1-7 között változik miozin típustól függően és kalmodulin vagy kalmodulin-szerű könnyű láncok kötődhetnek hozzá [17]. A fark domén a legváltozatosabb része a miozin molekulának, mind hosszát, mind aminosav szekvenciáját tekintve. Ezek a C-terminális régiók állhatnak részben vagy teljes egészében coiled-coil egymásba csavarodó α -helikális motívumokból, ami a miozinok dimerizálódását és polimerizációját segíti elő. Másrészt léteznek olyan miozinok is, amelyek nem képesek dimerizálódni. Továbbá tartalmazhatnak specifikus funkciót ellátó doméneket, úgy mint SRC homológia 3 (SH3), Rho GTPáz aktivátor (GAP), FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin), pleckstrin homológia (PH), miozin homológia 4 (MYTH4) vagy PDZ domén [18–20]. A fehérjeszerkezet és a funkció alapján a miozinok konvencionális és nem-konvencionális csoportba sorolhatók.

1.1 KONVENCIONÁLIS MIOZINOK

Azok a miozinok, amelyek képesek dimerizációra és filamentumokat alkotnak konvencionális miozinoknak nevezzük. Ebbe a csoportba tartozik az elsőként leírt, harántcsíkt izomrostból izolált miozin II osztály, ami a nevét a fehérjemolekulák dimer megjelenése miatt kapta. Továbbá ide tartozik a simaizom, a celluláris nem-izom miozin IIA, IIB, IIC izoformák, valamint az egyedi miozin XVIII [21–23]. Habár a nem-izom miozin IIA, IIB és IIC a konvencionális miozinok struktúrális jellegzetességeit mutatják, funkciójukat tekintve inkább a nem-konvencionális miozin osztályokra hasonlítanak, mivel különböző specifikus feladatot látnak el más-más sejttípusokban [24]. A konvencionális miozinok hexamer szerkezetűek. A motor domént és a nyaki régiót tartalmazó nehéz lánc fark régiók helikálisan egymásba csavarodva hozzák létre a dimer szerkezetet. A dimerizálódott nyaki régiókhöz könnyű láncok kapcsolódnak: a szabályozó funkciót ellátó ~20 kDa molekulatömegű regulatórikus könnyű lánc (RLC), valamint a kevésbé ismert ~17 kDa-os esszenciális könnyű lánc (ELC), amely a nehéz lánc stabilizálásban játszhat szerepet [25].

1.2 NEM-KONVENCIONÁLIS MIOZINOK

A másik csoportot a nem-konvencionális miozinok alkotják, amelyek nem képeznek dimert, inkább monomer formában funkcióképesek. Egy miozin kivétel az előbb említett csoportosítás alól: a monomer miozin V, ami egy rövid coiled-coil szakasz segítségével dimerizálódik [26]. Továbbá említésre méltó a monomer miozin VI, amely szintén tartalmaz prediktált coiled-coil motívumot, de kísérletekben nem bizonyított a dimerizációja. Ezért csak feltételezhető, hogy például C-terminális kötő fehérjék, vagy foszforiláció által szabályozott folyamat állhat a miozin VI dimerizációjának hátterében [27]. A nem-konvencionális miozinok szerkezete igen változó és számos funkcionális domént tartalmaznak, ezáltal intracelluláris szerepük is szerteágazó a különféle sejttípusok biológiai folyamataiban, mint például kemotaktikus motilitás, endocitózis, exocitózis, fagocitózis, vezikula transzport és szekréció [8,19,28–33].

1.3 NEM-KONVENCIONÁLIS MIOZIN XVI

1.3.1 Miozin XVI felfedezése

A miozin XVI felfedezése közel 20 évre nyúlik vissza, mikor Patel és munkatársai 2001-ben sejt motilitásért felelős motorfehérjéket kerestek migráló cerebelláris neuronokban és asztrocitákban [34]. Sejtvonalakból cDNS könyvtárakat készítettek, majd a miozin motor domén konzervált szekvenciája ellen degenerált primereket terveztek és PCR segítségével szakaszokat amplifikáltak. Az amplifikációt követően restriktív enzimátikus hasítást, végül szekvenálást végeztek a mintákon. Az eredményeket összehasonlították a miozinok korábban leírt filogenetikai családfájával [35], és találtak egy új miozin szekvenciát, ami nem mutatott homológiát egyik ismert miozinnal sem, kivéve a konzervált motor régiót. Az új miozint először „myr8a” néven tartották számon (patkány 8. nem-konvencionális miozin, myosin in rat), később viszont egy új miozin osztályba sorolták, ami a miozin XVI nevet kapta [34].

Az emlősökben expresszálandó miozin XVI osztálynak korábbi vizsgálatok alapján két splicing variánsa különböztethető meg. A rövidebb, citoplazmatikus izoforma a miozin 16a (Myo16a) DNS szekvenciája 3969 bp, és a fehérje 1322 aminosavból áll, míg a predomináns izoforma – amely tartalmaz egy 590 aminosav hosszúságú C-terminális extenziót – a miozin 16b (Myo16b) nevet kapta (5738 bp, 1912 aminosav) [34].

1.3.2 Miozin XVI evolúciója

A filogenetikai analízisek alapján az újonnan leírt miozin XVI viszonylag későn jelent meg az evolúció során és csak gerinces élőlényekben fordul elő. Jelenleg a miozin XVI az egyetlen gerinces élőlényekre specifikus miozin osztály, valamint génje konzervált a gerinchúrosok (Chordata) törzsében [15]. A miozin motor domén szekvenciák alapján végzett filogenetikai klasszifikáció szerint a miozin XVI legközelebbi rokonságban a miozin III és a miozin IX osztályokkal áll, amelyek szintén tartalmaznak egy specifikus, különböző funkciót ellátó N-terminális pre-motor extenziót [16].

1.3.3 Miozin XVI genetikai jellemzése

Patkányban (*Rattus norvegicus*) vizsgált *MYO16* genomikai régiója ~362 kb kiterjedésű és a 16q12.5 kromoszóma régióiban található, míg a humán *MYO16* a 13q33.3 kromoszómán található régiója ~660 kb, amely genetikai szinténiát (azonos gének - azonos sorrend) feltételez. A miozin XVI izoformák 34 kódoló exont tartalmaznak patkány és humán genomban egyaránt, viszont a méretük 66 bp és 1296 bp között változik [36].

1.3.4 Miozinok C-terminális extenzióval

A miozin osztályok között a C-terminális farok extenzió a leginkább variábilis régió mind szekvenciát, mind funkciót tekintve. A konvencionális miozinok esetében a C-terminális nagyrészt alfa-helikális coiled-coil motívumokból épülhet fel, ami a fehérje dimerizálódását segíti elő. A nem-konvencionális miozinok általában specifikus funkciót ellátó doméneket tartalmaznak, amiknek esszenciális szerepük van intracelluláris funkciókban. Ezek a domének leggyakrabban a nem-konvencionális miozinok C-terminális régióiban találhatóak, úgymint az SRC homológia 3 (SH3), Rho GTPáz aktivátor (GAP), FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin), pleckstrin homológia (PH), miozin homológia 4 (MYTH4) vagy PDZ domének. Ezek a domének számos feladatot látnak el a sejt életében, például: horgonyzás, cargo molekula kötés, celluláris lokalizáció, fehérje-fehérje interakció [18,19,29–31,37,38]. A miozin C-terminális régiók további funkciója lehet az autoreguláció, ami a C-terminális farok és a polipeptid N-terminális végének interakciója révén valósulhat meg egyfajta visszacsatoló mechanizmusként. Ezáltal egy olyan konformáció alakulhat ki, ami kinetikai és mechanikai szempontból inaktív állapotot idézhet elő a motor domén funkciójában [30]. Ezt a fajta autoregulációs mechanizmust számos miozin osztályban leírták: miozin IIA, V, VI, VII és X [39–42]. A Myo16b C-terminális aminosav szekvenciája alapján – más miozin C-terminális

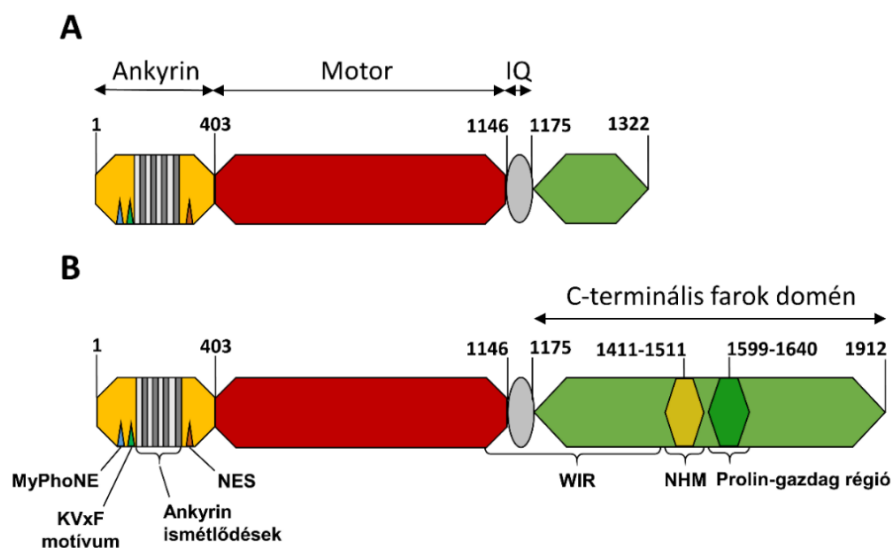
régióktól eltérően – feltehetően egyedi, rendezetlen szerkezetű fehérje fragmentumként funkcionális [43].

1.3.5 Miozin XVI szerkezete

Az alternatív splicing mechanizmusnak köszönhetően kialakult két Myo16 izoforma azonosságot mutat az 1-1321. aminosav régió között (Myo16a), tartalmazva az N-terminális ankyrin domént (Myo16Ank), a motor domént és az IQ motívumot, valamint egy 174 aminosavból álló rövid fark régiót. A másik izoformában (Myo16b) található egy 590 aminosavval hosszabb C-terminális extenzió (Myo16Tail), amely szerkezete több szempontból is egyedülálló a miozinok között (**2. A, B ábra**).

Néhány miozin család rendelkezik speciális funkciót ellátó N-terminális extenzióval a motor domént megelőzően. A Myo16 pre-motor doménje (45 kDa), az úgynevezett ankyrin domén (Myo16Ank) nyolc tandem ankyrin ismétlődést tartalmaz, amely nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutat az ankyrin membrán alatti fehérje domén szerkezetével [44], valamint más fehérjékben is gyakori előfordulásuk [45]. A konszenzus ankyrin motívumot 33 aminosav alkotja, amelynek közel fele, 15 aminosav nagymértékben konzervált (GxTPLHxAxGHxxxV/AxxLLxxGxN/Dxxxxx). Szerkezetére jellemző a β -hajtú – α -hélix – hurok – α -hélix felépítés [46,47].

A Myo16Ank N-terminális része tartalmaz egy MyPhoNE (miozin foszfatáz N-terminális elem) szekvencia motívumot. Ezt követi a protein foszfatáz 1 katalitikus alegység (PP1c) konzervált kötőhelye, a négy aminosavból álló KVxF motívum, valamint a nyolc ankyrin ismétlődő motívum [48]. A Myo16Ank disztális részén pedig egy nukleáris export szignál (NES) is található.



2. ábra. A miozin 16 izoformák domén szerkezete. (A) A Myo16a tartalmazza az ankyrin domént, a motor domént, az IQ motívumot, valamint egy rövid C-terminális régiót. Az ankyrin domén különböző szekvencia motívumokat tartalmaz, úgymint, miozin foszfatáz N-terminális elem (MyPhoNE), KVxF motívum, ankyrin ismétlődések és egy nukleáris export szignál (NES). **(B)** A Myo16b ezen felül tartalmaz egy C-terminális farki régiót specifikus szakaszokkal: WAVE interakciós régió (WAVE Interaction Region - WIR), neuronális tirozin-foszforilált foszfoinozítid 3-kináz adaptor (NYAP) homológia motívum (NHM), valamint prolin-gazdag régió.

A konzervált Myo16 motor domén (~90 kDa) tartalmazhat egy ATP kötő zsebet (purinkötő hurok, P-hurok, switch I és switch II régiók) [49], valamint egy aktin-kötő helyet. Azonban a Myo16 motor domén ATPáz aktivitása és direkt aktin kölcsönhatása kísérleti úton még nem bizonyítottak.

A rövid nyaki régió egyetlen, könnyű lánc kötésért felelős IQ motívumot tartalmaz ([ILV]QxxxRGxxx[RK]), ami más miozinok esetében általában kalmodulin (CaM) kötésért lehet felelős [17]. A nem-konvencionális miozionokban megtalálható IQ motívum viszont nem kizárólagos kalmodulin kötőhely, hanem regulatórikus könnyűlánc (RLC) kötésben is szerepet játszhat [50,51].

A Myo16Tail csak a Myo16b izoformában található meg és a jósolt rendezetlen szerkezet mellett számos egyedi szekvencia motívumot tartalmaz.

1.3.6 Myo16Tail szerkezetének jellemzése

A Myo16Tail aminosav szekvencia analízis során Paircoil 2 bioinformatikai programmal [52] vizsgálva nem sikerült lehetséges coiled-coil motívumot kimutatni, ami arra utal, hogy a C-terminális Myo16Tail nem képes dimerizálódni és valószínűleg monomer formában funkcionális. A Myo16Tail proximális régiója tartalmaz két prediktált nukleáris lokalizációs szignált (NLS) (PPPKPKR motívum). Továbbá egy NYAP homológia motívumot (NHM), amely két már korábban azonosított foszforilációs helyet is tartalmaz (Y¹⁴¹⁶ és Y¹⁴⁴¹ egerekben, *Mus musculus*) [53]. Az NHM motívum felfedezésével a Myo16b-t a NYAP fehérjecsald új tagjaként azonosították [53]. A Myo16Tail disztális régiója tartalmaz egy prolin-gazdag régiót is [C-G-(P/A)-(P/A)-(P/S)-(A/V)-P]6, amelyben a prolin aminosavak 15%-át teszik ki a Myo16Tail szekvenciának. A prolin aminosavak magas aránya eleve gátolja a stabil másodlagos szerkezet kialakulását a fark régióban [54] **(3. ábra)**.

EVTSIKSFLQSTEDMALKTYDALVIQNASDIAREHDRLRKEVHAAYHRNRQEEGTKRAEDQGGCRHAH
SNSVPVPMVAVDSLALQALAGPSSRSPSLHSVFSMDDSTGLPSPRKQPPPKPKRDPNTRLSASYEAVSAC
LSATKDAASEALTRPRPHSDDYSTMKKIIPRKPGRSPHTKLSGSYEEIWGPRPSGTMGQVKGHHAPGT
LGVQWASPDSPMPQCTPQLPLHLPLPQGDYDDDGEPVYIEMVGNAAARAGGSETDSPDQGESVHEEMKYV
LPEEGCGPGLTFLPASPPFLFLETRKAIILEAGEGSCQPLKDTCDIPPPFPNLLPHRPPLLVFPTPV
TCSPASDESPLTPLEVKKLPVLETNLKYPVQSEGSSPLSPQYSKAQKGENDQLTSPGFVPVFNGPSRIS
PPATPPPPPGPPPAPCGPPSAPCGPPPAPCGPPVPVCGPPPAPCGPPPAPCGAAPAPCRPPTHFAFPP
DSVLVTAAKALTNNDLPRTPQPKSSAPVLGPCSPFVKAPYSPGRTARADLRKASSTFSPPSPYSPNS
RPLSSPLDELASLFNSGRSVLRRSAVGRRIREAEGFETNMNLSRDEPSSSEMASETQDRNANNHGTQ
LSSSLSSVVAEANGNPVTNGLAEDDGC SRLCLSGMGTSSSFQRHRESHTTQVIHQRLRSENEVALQEL
LDWRRKLCESREGWQEAMQHPEPRAPPPPPCKKPTLLKKPEGGSCTRLSSQLWDSI

3. ábra. A Myo16Tail szekvencia alapú domén térképe. A WAVE interakciós régió (WIR) C-terminálisban található része kék színnel, míg az NHM motívum narancssárga és a prolin-gazdag régió zöld színnel jelölve. Az ismert tirozin foszforilációs helyek pirossal vannak kiemelve (UniProt: Q9ERC1.1 adatok alapján).

1.3.7 Miozin XVI lehetséges funkciói

A közelmúltban felfedezett miozin XVI osztályról egyelőre kevés információ áll rendelkezésre; nem tisztázott pontosan, hogy az egyedi strukturális elemei révén milyen folyamatokban játszhat szerepet fiziológiás körülmények között.

1.3.7.1 Szövet-specifikus lokalizáció

A Myo16 elsősorban az idegrendszerben fordul elő, de néhány perifériás szövetben is kimutatták már jelenlétét, pl., húgyhólyagban, tüdőben, vesében és kisebb mennyiségben a csecsemőmirigyben, sima-, váz-, és szívizomban. Northern-blot analízis során kimutatták, hogy a prevalens Myo16b expressziója az embrionális hippokampális neuronokban és felnőtt agyban dominál az agykéreg és a kisagy területein egérben és patkányban. Patkány kísérletekben ez az időszak az utolsó embrionális és az 1-2. posztnatális hétre korlátozódik [34,53], ami egybeesik a neuronok migrációjával, az axonok hosszabbodásával, a dendritek formálódásával, valamint az agykéreg szinaptikus denzitásának növekedésével [55]. Posztnatális 10 napos (P10) patkány kisagyban a Myo16 migráló granuláris neuronokba lokalizálódik a külső granuláris rétegben, valamint kisebb mennyiségben a Purkinje sejtekben is megtalálható. Felnőtt kisagyban alacsonyabb Myo16 expressziós szintet figyeltek meg, elsősorban Purkinje sejtekben, glia sejtek elongációs folyamataiban és a belső granuláris réteg neuronjaiban [34]. Primer patkány

neuronális sejt kultúrában a Myo16 különböző sejt típusokban is megtalálható, úgymint 1-es típusú asztrocitákban, cerebelláris granuláris és hippocampális neuronokban. Érdekes módon a Myo16 kortikális neuronokban is megtalálható embrionális 18,5 napos korban (E18,5) lévő patkány (Whistar) agykéregben, viszont hiányzik az asztrocita sejtekből ebben az embrionális szakaszban [53].

1.3.7.2 Intracelluláris lokalizáció

A Myo16b lokalizációja idegsejtekben két populációra oszlik, egy membránhoz kötött, illetve egy citoplazmatikus frakcióra [34]. A Myo16b élő sejtben történő előfordulását modell rendszerként használt COS7 és Rat2 sejt vonalakban vizsgálták [36]. A COS7 sejteket GFP-jelölt teljes hosszúságú Myo16b-vel, valamint annak különböző fragmentumaival transzfektálták. A kísérleti eredmények azt mutatták, hogy a Myo16b megtalálható a citoplazmában, ahol a plazmamembránhoz és a perinukleáris citoplazmában lokalizálódik. Továbbá a sejt magba is bejut, és a sejt ciklus G1, S1 és G2 fázisaiban felhalmozódik, viszont nem kötődik kromoszómákhoz vagy a mitotikus orsóhoz [34,36,56]. Ezzel ellentétben a Myo16a csak a citoplazmában található meg, annak ellenére, hogy a rövid farki régiója tartalmazza a prediktált nukleáris lokalizációs szignált (NLS) [36].

A Myo16b szintén jelen van idegsejtek citoplazmájában, ahol a membrán-asszociált és a szolubilis frakcióban egyaránt megtalálható [34,53]. Purkinje sejtekben a Myo16 a dendrit tüskékben halmozódik fel [57]. A teljes hosszúságú GFP-fuzionált Myo16b citoplazmatikus frakciója nem kolokalizálódik az aktin filamentumokkal és mikrotubulusokkal COS7 sejtekben. Ezzel ellentétben az izolált Myo16Tail citoplazmatikus frakciója főként a plazmamembrán mentén lokalizálódik a filopodium és lamellipodium struktúrákban, ahol viszont az aktin filamentumokkal együtt található meg [36].

Az endogén Myo16b immunfluoreszcens jelölése és a GFP-fuzionált Myo16b tranziens transzfekciója COS7 sejtekben közel azonos megoszlást mutatott a sejt magban és a citoplazmában, viszont a predomináns nukleáris vagy a citoplazmatikus fehérje megoszlás alacsonyabb expressziós szinten volt jelen [36,56]. Továbbá a Myo16b sejt magi lokalizációja egér cerebellumban (P23, P31) *in vivo* körülmények között is megfigyelhető volt [34,36]. A Myo16b intracelluláris lokalizációját szabályozó útvonalak, valamint a nukleáris export és import folyamatok részletesebb vizsgálatához még további kísérletek szükségesek.

Különböző hosszúságú Myo16b fragmentumok intracelluláris lokalizációját is vizsgálták. A Myo16Ank eltávolítása során a sejtmagi lokalizáció fokozódott, viszont önmagában a Myo16Ank szinte kizárólag a sejtmagban és a sejtmagvacskában volt megtalálható [36]. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a Myo16Ank szerepe kettős, egyrészt gátolja a citoplazmában a nukleáris importot, másrészt a sejtmagvacskába juttatja a Myo16b fehérjét.

A Myo16Ank és a motor domén között található egy konszenzus leucin-gazdag motívum (LX_{2,3}[LIVFM]_{x2}Lx[LI]), amit nukleáris export szignálként (NES) azonosítottak [58]. A NES motívumot tartalmazó fehérjék a sejtmagból történő export folyamatokért felelősek [59]. Amikor leptomicin B-vel blokkolták a NES és a CRM1 export receptor fehérje közötti interakciót, akkor a Myo16b megnövekedett mennyiségét figyelték meg a sejtmagban, ami arra utalhat, hogy a Myo16b nukleocitoplazmatikus előfordulása szabályozott folyamat következménye. A Myo16 két prediktált nukleáris lokalizációs szignált (NLS) tartalmaz, amelyek közül az első NLS megtalálható a Myo16a rövid C-terminálisán is, viszont a Myo16a csak a citoplazmában lokalizálódik. A Myo16 Tail disztális fragmentum (1616-1912 aminosav) transzfekciós vizsgálatai során viszont nukleáris lokalizációt tapasztaltak, annak ellenére, hogy ez a régió nem tartalmazott prediktált NLS motívumot [36].

Az eredmények arra utalnak, hogy a prediktált NLS motívumok nem funkcionálisak, így a Myo16 sejtmagba juttatásáért feltehetően atípusos lokalizációs mechanizmusok felelősek.

1.3.7.3 N-terminális Myo16Ank szerepe a PP1c szabályozásban

Az N-terminális Myo16Ank szekvencia analízise során derült ki, hogy 50%-os szekvencia homológiát mutat a miozin foszfatáz célzó alegység 1 (MYPT1) fehérjével [43]. A MYPT1 kötődik a protein foszfatáz 1 katalitikus alegység (PP1c) fehérjékhez az N-terminális polipeptidláncon keresztül [60]. Ez az interakció növeli a PP1c defoszforilációs aktivitását a specifikus célmolekula felé, ami a miozin regulatórikus könnyű lánc (RLC).

Posztnatális patkány kisagyból extrahált mintákból koimmun-precipitációs kísérletekben kimutatták, hogy a Myo16b képes kötődni a miozin foszfatáz katalitikus alegységeihez, a PP1 α és a PP1 γ izoformákhoz [34]. Később ezeket az interakciós kísérleteket Kengyel és munkatársai is megerősítették, amikor *in vitro* felületi plazmon rezonancia kísérletek során szubmikromoláris affinitást mutattak ki a rekombináns Myo16Ank és PP1 α és a PP1 γ izoformák között [43]. A MYPT1 homológia, valamint a PP1c izoformákkal kialakított erős

kölcsönhatás ellenére a Myo16Ank nem képes megnövelni a PP1c defoszforilációs aktivitását az RLC-re, viszont a PP1c foszfatáz aktivitása jelentősen csökkent az Myo16Ank jelenlétében. A PP1c alegységek fontos szerepet játszanak a dendritikus tüskékben, ahol az aktin citoskeleton funkciójában, sejtmagi folyamatokban (gén transzkripció és sejtciklus reguláció), valamint a szinaptikus plaszticitás és a memória formálásban is elengedhetetlen [61–63].

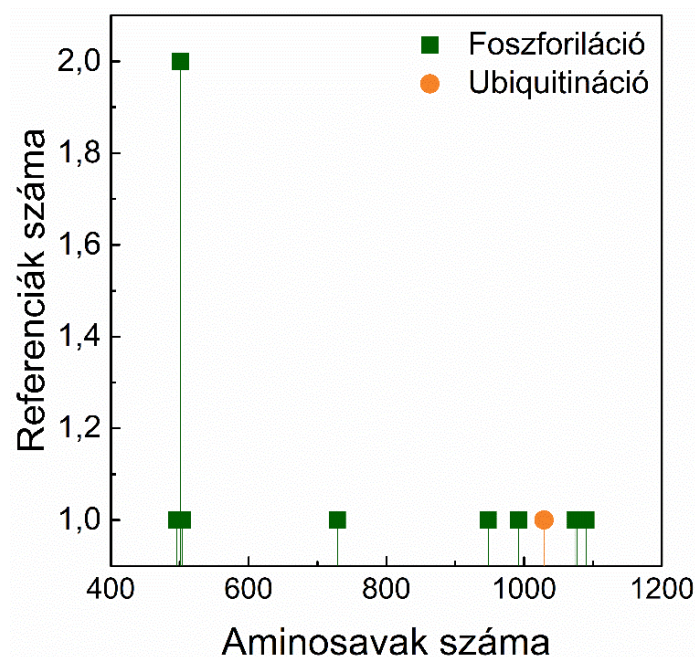
Mindezek az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a Myo16Ank versenghet a PP1c alegységeken található RLC kötőhelyekért [43], valamint a Myo16b mediátorként szerepet játszhat a PP1c alegységek sejtmagba történő transzportjában [36]. Tehát a Myo16b és a PP1c interakciója meghatározó lehet az idegrendszer szabályozási folyamataiban.

1.3.7.4 Myo16 motor funkció és feltételezett szabályozási folyamatok

A miozinok egyik alapvető funkciója, hogy motor doménjük ATP-függő módon képes kötni a filamentális aktint (F-aktin); az ATP hidrolízis során nyert kémiai energia révén pedig mechanikai munkát végezni. A Myo16 motor domén funkciójáról jelenlegi tudásunk szerint kevés információ áll rendelkezésre.

Korábbi tanulmányok során Patel és munkatársai koszedimentációs kísérleteket végeztek posztnatális nyolc napos patkány agyszövetből (P8) preparált lizátummal és F-aktinnal. ATP jelenlétében csak kis mennyiségű Myo16 ülepedett a koszedimentációs kísérletek során, viszont ha hexokináz segítségével elvonták az ATP-t a rendszerből, akkor a Myo16b nagy mennyiségben ülepedett az aktin filamentumokkal [34]. Purkinje sejtek dendritikus tüskéibe tranziens transzfelekcióval bejutatott GFP-Myo16 motor domén szintén a filamentális struktúrákhoz lokalizálódott összhangban a feltételezett asszociációval [64]. A Myo16 motor domén és aktin kötés direkt vagy indirekt természete még nem tisztázott. Az ATP-kötőszekvencia analízise során fény derült arra, hogy a zárt konformáció stabilizálásáért felelős arginin aminosav a switch-1 régió belül [65] aminosav szubsztitúció révén cisztein aminosavra cserélődött emlős és madár Myo16 izoformákban [36,66]. Ezek az evolúció során kialakult biokémiai változások azt feltételezik, hogy a Myo16 csökkent ATPáz aktivitással és gyenge aktin kötéssel rendelkezhet, mint ahogy más miozinoknál is kimutatták már ezt a jelenséget [67,68]. A miozin motor aktivitás kinetikai tulajdonságai különböző, miozinra specifikus módon szabályozódhatnak, például foszforiláció, könnyűlánc kötés és úgynevezett „backfolding” visszacsatoló interakció által [30,69,70]. A foszforiláció az egyik lehetséges szabályozási útvonal, amely a motor domén enzimatis és mechanokémiai aktivitását kontrollálhatja. A miozin motor domének szekvenciáiban találhatóak motor funkciót

szabályozó bizonyos konszenzus foszforilációs helyek, amiket a jelenlévő aminosavak alapján, treonin (T), glutaminsav (E), asparaginsav (D) és szerin (S) úgynevezett TEDS helyként írtak le korábban. A TEDS szabály alapján, ha a TEDS hely szekvencia motívumát megelőző 16. aminosav pozícióban treonin (T) vagy szerin (S) található akkor ezek az aminosavak foszforilálódhatnak szabályozva a motor domén enzimikus aktivitását. Ezzel szemben, ha a szekvencia motívumot megelőző 16. aminosav helyén, feltehetően aminosav szubsztitúció révén glutaminsav (E) vagy aszparaginsav (D) szerepel akkor a foszforiláció nem történhet meg (foszfomimetikus szubsztitúció) a motor domén aktivitás szabályozásához [69–71]. Néhány példán keresztül bemutatva; az alacsonyabb rendű miozin I motor domén ATPáz aktivitása aktiválódik foszforiláció által *Acanthaomeba* [72], *Dictyostelium* [73,74] és élesztők esetében [75]. Ezzel ellentétben az *Acanthaomeba* miozin II ATPáz aktivitása csökken foszforiláció hatására [76]. A humán miozin IIIA egy glutaminsav (E) aminosavat tartalmaz a TEDS helyen (⁶⁶⁰Ex¹⁶DAMAK⁶⁸⁰), habár kináz doménje által autofoszforilálódik két treonin (T) foszforilációs helyen a hurok régióban (T⁹⁰⁸ and T⁹¹⁹) [77–79]. Az autofoszforiláció növelheti a miozin IIIA ATPáz aktivitását, ezáltal befolyásolja az ATPáz ciklus lépéseit, valamint negatívan szabályozza az aktin affinitást. Egér miozin VI esetében treonin (T) található és foszforilálódik a TEDS helyen (⁴⁰⁶Tx¹⁶DALAK⁴²⁶), habár nem befolyásolja a motor domén ATPáz aktivitását [80]. Mivel a Myo16 motor domén funkció szabályozásáról még nincsenek ismereteink, ezért a szekvencia alapján bioinformatikai analízisek segítségével vizsgáltuk a lehetséges poszttranszlációs módosulási helyeket, valamint azok konzerváltságát az evolúció során (**4. ábra; 1. táblázat**).



4. ábra. A Myo16 motor domén lehetséges poszttranszlációs módosulási helyek bioinformatikai elemzése. A szekvenciaelemzést a PhosphoSitePlus program segítségével végeztük [81]. A predikció megbízhatóságát a referenciák száma jelzi. A zöld négyszög a prediktált foszforilációs helyeket, míg a narancssárga kör az ubiquitinizációs helyet jelöli.

Motor domén											
Konszenzus szekvencia ¹	P-hurok (497 – 504 aa)			DLLAK motívum (722 – 742 aa)			S ⁹⁴⁸	S ⁹⁹²	K ¹⁰²⁹	Y ¹⁰⁷⁵ GY ¹⁰⁷⁷	Y ¹⁰⁹⁰
	*	*	:	:	:	:	.	.	*	*	*
<i>Hs</i>	S	[GERG	SGKS]	DMI	IRRH	TIQIAEFFRDLLAK	S	S	K	YGY	Y
<i>Mm</i>	S	[GERG	SGKT]	DVI	IRRH	TIQMAAFYRDLLAK	S	S	K	SGY	Y
<i>Rn</i>	S	[GERG	SGKT]	DVI	IRRH	TQIAAFYRDLLAK	S	S	K	YGY	Y
<i>Gg</i>	S	[GESG	SGKT]	DMIV	RRH	TIEMAEFYRDLLAK	S	S	K	YGY	Y
<i>Xt</i>	S	[GESG	SGKT]	DMIT	RRH	SVDTAEFYRDLLAK	S	G	K	YGY	Y
<i>Dr</i>	S	[GESG	SGKS]	DVIT	RRH	TVEMSNHHRDLLTK	C	N	K	YGY	Y

1. Táblázat. Myo16 motor domén poszttranszlációs módosulási helyek konzerváltságának vizsgálata különböző gerinces osztályok képviselőiben. A szekvenciaanalízist Clustal-X programmal végeztük [82]. A felhasznált szekvenciák UniProt adatbázisban elérhető kódjai a következők: *Homo sapiens* (*Hs*): Q9Y6X6, *Mus musculus* (*Mm*): Q5DU14, *Rattus norvegicus* (*Rn*): Q9ERC1, *Gallus gallus* (*Gg*): XP_416950.3, *Xenopus tropicalis* (*Xt*): A0A5G3IJG7, *Danio rerio* (*Dr*): F1QE80. A prediktált foszforilációs/ubiquitinizációs helyek zöld, illetve narancssárga színnel láthatóak kiemelve. Továbbá a szekvenca konzerváltság szintjét különböző szimbólummal jelöltük: teljes konzerváció (*), erős hasonlóság (:), és gyenge hasonlóság (.). ¹Az aminosav pozíciókat a patkány Myo16 szekvenca alapján adtuk meg.

A Myo16 esetében is megfigyelhető a TEDS szabály ($^{722}\text{Dx}^{16}\text{DLLAK}^{742}$) [34,66]. Annak ellenére, hogy a DLLAK motívumot megelőző 16. aminosav pozícióban aszparaginsav (D) található, a Myo16 motor szekvenciában a bioinformatikai analízisek alapján konzervált szerin (S) és treonin (T) foszforilációs helyek valószínűsíthetőek az ATP-kötő zsebben található P-hurok régióban és a motor domén disztális végén (**4. ábra; 1. táblázat**). Mindez arra utalhat, hogy a Myo16 motor funkció szabályozása történhet foszforiláció által, ahogy azt a miozin IIIA-nál is megfigyelték.

A prediktált foszforilációs helyek mellett található egy feltételezett ubiquitinilációs hely is a Myo16 motor szekvenciában (K^{1029}). Az ubiquitiniláció elősegíti a fehérje hidrolízist és a fehérjék lebomlását az ubiquitin-proteaszóma útvonalon és a 26S proteaszómán keresztül [83]. Ehhez kapcsolódóan a feltételezett ubiquitinilációs helynek szerepe lehet a 26S proteaszóma által történő Myo16 degradációban [56].

1.3.7.5 Myo16Tail szerepe szabályozási folyamatokban

1.3.7.5.1 Sejtciklus szabályozás

Cameron és munkatársai a sejtmag különböző alkotóelemeit tanulmányozva fedezték fel, hogy a GFP-vel fuzionált Myo16Tail tranziens transzfekciót követően, valamint endogén Myo16b-t vizsgálva kolokalizáció volt kimutatható a Ciklin A-val és a proliferáló sejt nukleáris antigénnel (PCNA) COS7 sejtekben. Abban az esetben, ha a Myo16 a citoplazmatikus frakcióban volt jelen a PCNA nem volt képes a sejtmagba lokalizálódni [36,56]. A PCNA számos nukleáris funkcióban játszik központi szerepet, többek között részt vesz a DNS replikációban, a kromatin reorganizációjában és a sejtciklus szabályozásban is [84]. A PCNA a sejtciklus S-fázisában halmozódik fel a sejtmagban, ahol a Ciklin A-val komplexet képezve részt vesznek a DNS megkettőződésében [85]. A kísérletek alapján valószínűsíthető, hogy a Myo16Tail szerepet játszhat a PCNA sejtmagba történő lokalizációjában [36].

A Myo16b a sejtciklus szabályozásban is részt vesz. A kísérletek során azt tapasztalták, hogy a Myo16b mRNS és a fehérje expresszió megnövekedett a késői G1-fázisban, az S-fázisban érte el a csúcspontját, majd az M-fázis kezdetén csökkent az expressziós szint Rat2 sejtekben. A sejtosztódás során a profázisban a Myo16b elsősorban a nem-kromoszómális nukleáris régiókba lokalizálódik, míg a metafázistól a telofázisig a citoplazmában található meg [36,56]. Amennyiben a Myo16b-t tranziens transzfekcióval túlexpresszálják a sejtek nagyobb hányada marad S-fázisban, késleltetve a G2 fázisba történő átmenetet [36]. Az eredmények alapján a Myo16 fontos szerepet játszhat a sejtosztódásban és a sejtciklus szabályozásában.

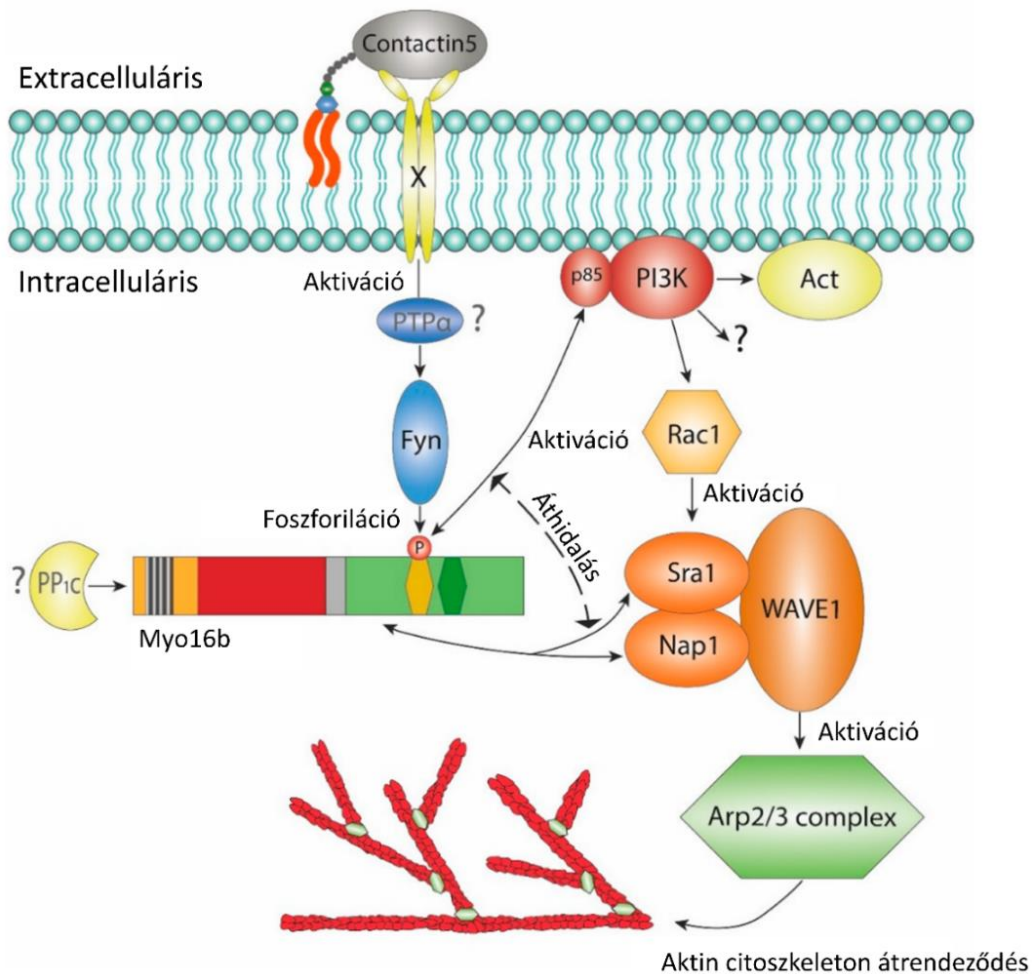
1.3.7.5.2 Aktin citoszkeleton szabályozás

A Myo16Tail-ben található funkcionális domének közül (WIR-átfedésben a motor és IQ motívummal, NHM, prolin-gazdag motívum) (**2. ábra**) a WIR és az NHM részt vesz az aktin sejtvez szabályozásában. A Myo16b izoformát a közelmúltban azonosították a NYAP molekuláris adaptor fehérjecsald új tagjaként, mikor Yokoyama és munkatársai Src nem-receptor tirozin kináz család szubsztát fehérjéket kerestek humán hippokampusz cDNS könyvtár segítségével [53].

A NYAP fehérjék sajátága, hogy konzervált tirozin (YxxM) foszforilációs helyeken keresztül aktiválják a foszfoinozítid 3-kináz (PI3K) közvetített jelátviteli útvonalat. A PI3K szignál transzdukciós útvonal kiemelkedő fontosságú a neuronális fejlődésben (neuronok polaritása, dendritek növekedése és elágazódások fejlődése, valamint dendritikus tüskék kialakítása) [86–89].

Szekvencia analízis alapján a patkány Myo16Tail tartalmaz egy neuronális tirozin foszforilált adaptor (NYAP) homológia motívumot (NHM), ezért a NYAP3 nevet kapta [53]. A Myo16 foszforiláció egy glikozil-foszfadilinozitol (GPI) horgonyzott membrán fehérje, a Contactin5 által stimulált folyamat. A Contactin fehérjék alsaldja a neuronális sejt-adhéziós molekulák (Ig-CAM) immunglobulin szupercsaldjába tartozik és fontos szerepet töltenek be a neuronok fejlődésében és a szinapszisok formálásában [90]. A Contactin5 aktiválja az Src tirozin kináz Fyn fehérjét indirekt módon, feltételezhetően a protein tirozin foszfatáz (PTP α) fehérjén keresztül [91,92]. A Myo16Tail NHM motívumban található két konzervált tirozin (Y¹⁴¹⁶xxM és Y¹⁴⁴¹xxM) foszforilálódik az aktivált Fyn fehérje által egér agyban [53]. A Fyn fontos szerepet játszik jelátviteli folyamatokban különböző transzmembrán receptorok esetében, valamint fokozza a szinaptikus hatékonyságot, plaszticitást, tanulási és memória folyamatokat [93]. Ezt követően a tirozin-foszforilált Myo16Tail kötődik a PI3K-p85 alegységéhez, a Myo16-PI3K komplex kialakulása a PI3K-p110 katalitikus alegységének, valamint az Act és Rac1 downstream effektorainak aktivációját eredményezi [53]. A Rho GTPáz Rac1 fehérje a WAVE regulációs komplex (WRC) egyik kanonikus aktivátora, amely aktiválja az Arp2/3 komplexet, ezáltal katalizálva az aktin citoszkeleton hálózat elágazásainak kialakulását [94,95]. A Myo16 továbbá kötődik a WAVE1 komplex Sra1 és Nap1 alegységeihez is a WIR régión keresztül, amely a motor domén és az NHM motívum között található [53]. Az elképzések szerint a PI3K:Myo16b:WRC hármas komplex kialakulását követően a Myo16 képes megfelelő közelségbe hozni a PI3K-Rac1 komplexet a WAVE1

komplex egyidejű kötődése révén áthidalással, ez által hozzájárulhat az aktin citoskeletális hálózat átszerveződéséért felelős WRC–Arp2/3 komplex aktiválásához (5. ábra). Ennek a hármas komplex szabályozásnak egy közvetlen bizonyítéka volt a rekombináns Myo16Tail fragmentum HeLa sejtekbe történő juttatása tranziens transzfekcióval az aktin sejtvez filamentális struktúráinak megbomlását eredményezte. A kísérlet felvetette továbbá, hogy a WIR és az NHM régió együttesen szükségesek a jelátviteli funkció szerepének betöltéséhez [53].

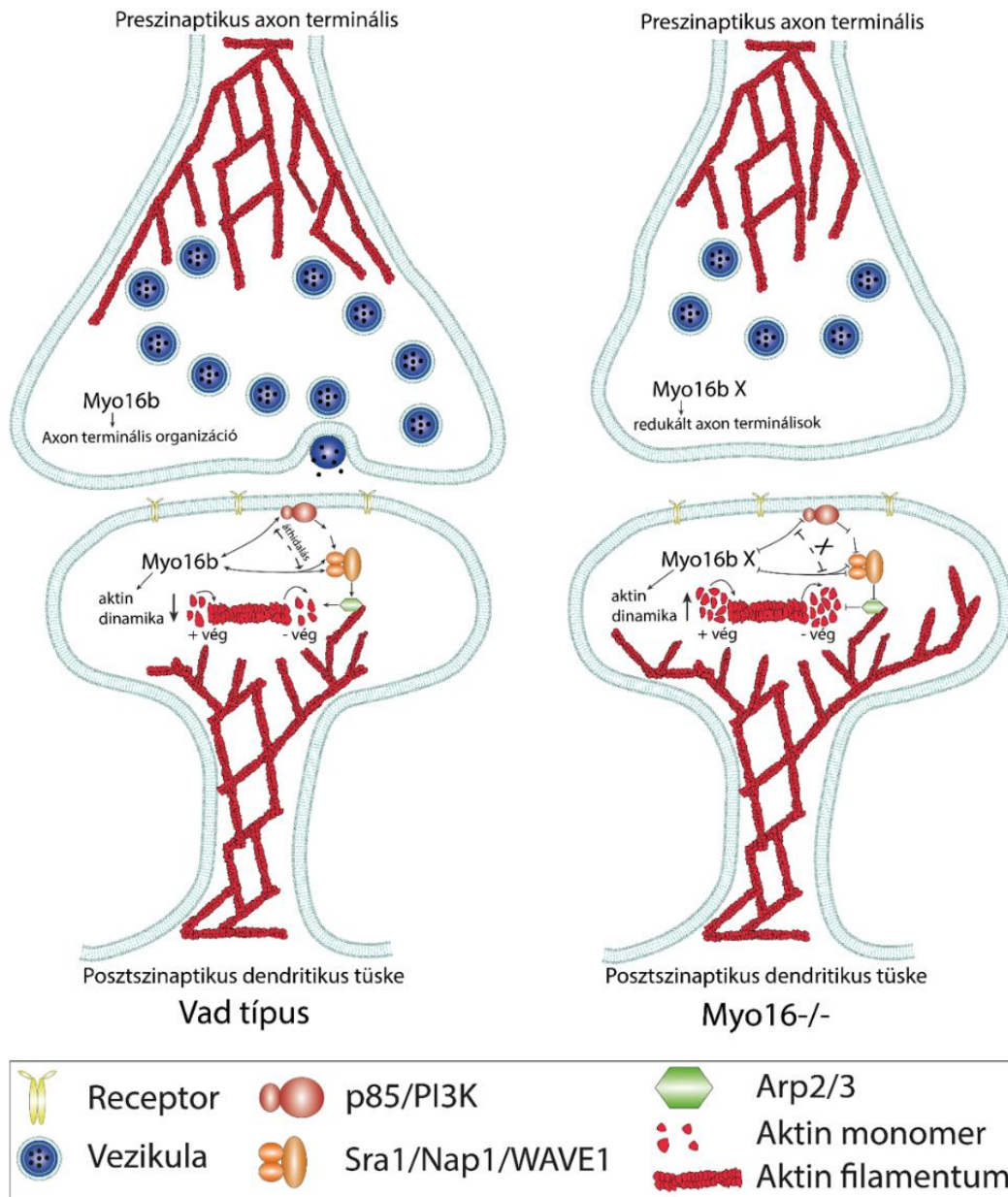


5. ábra. A Myo16Tail foszforiláció szerepe a PI3K jelátvitelben. A sárgával jelölt membrán receptor X jelölése a receptor ismeretlen mivoltára utal. A kérdőjelek a fehérjék még nem bizonyított funkcióját mutatja, hogy hol kapcsolódhat be a jelátviteli kaszkádba. Az ábra módosítva [53] alapján.

A Myo16 által szabályozott aktin dinamika fiziológiai relevanciáját tovább vizsgálták *Myo16* gén kiütés (*MYO16*^{-/-} egér) kísérletekben. Purkinje sejtek posztszinaptikus dendritikus tüskéin végzett FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) kísérletek kimutatták, hogy a *MYO16* gén hiányában az F-aktin dinamika fokozottabb. Hasonló hatás volt megfigyelhető, ha a WRC vagy az Arp2/3 komplexet gátolták a vad típusú vagy *MYO16*^{-/-} egérben, ami arra

utal, hogy a Myo16 a WRC–Arp2/3 komplexen keresztül szabályozhatja az aktin citoskeletont [64]. Tehát az *in vitro* és *in vivo* adatok összhangban vannak és feltételezhetjük, hogy a WRC–Arp2/3 komplex aktivációja a Myo16 által negatívan szabályozza az aktin citoskeleton dinamikát. Továbbá a Myo16 integrálja a jelátviteli folyamatokat összekapcsolva az aktin hálózat reorganizációjával, ezáltal egy indirekt szabályozó fehérjeként funkcionál a Purkinje sejtek dendritikus tüskéiben. A *MYO16*^{-/-} egerek cerebelláris molekuláris rétegeiben fenotípusos különbségek is megfigyelhetők voltak, ami a szinaptikus vezikulák számának és a preszinaptikus axon terminális területének drasztikus csökkenésében nyilvánult meg a granuláris sejtekben [64].

Összefoglalva, a Myo16 fontos szerepet játszhat az aktin citoskeleton szabályozásában a posztszinaptikus dendritikus tüskékben, valamint a preszinaptikus axon terminális fenotípusos organizációjában, ezáltal kialakítva a Purkinje sejtek granuláris rétegeinek szinapszisaiban a megfelelő szerkezetet, plaszticitást és funkciót (**6. ábra**). Továbbá *in vivo* állatkísérletekben vizsgálták a Myo16 neurális funkció fiziológiai relevanciáját [53,64,96]. Tripla *NYAP*^{-/-} egér modellben a három NYAP fehérje együttes hiányát vizsgálva (NYAP 1, NYAP2, Myo16/NYAP3) kisebb agyméretet és súlycsökkenést tapasztaltak, ami neurális hipertrófiára utal [53]. Ha csak egyetlen *MYO16*^{-/-} (Myo16/NYAP3) gént ütöttek ki, akkor nem figyeltek meg anatómiai elváltozást a cerebellum területén [64]. A *MYO16*^{-/-} egér kísérletekben vizsgálva a viselkedés mintázatok változását fenotípusos változást nem volt kimutatható a lokomotoros aktivitás, motoros tanulás, szociális interakció és a viselkedés tekintetében, habár a *MYO16* epigenetikai szabályozását korábban már leírták egérmodellben tanulás-alapú kísérletekben [96].



6. ábra. A Myo16 Purkinje sejt szinapszisokra gyakorolt hatásának sematikus modellje. A Myo16 a PI3K-WRC-Arp2/3 útvonalon keresztül szerepet játszik a Purkinje sejtek posztzinaptikus dendritikus tuskék szerveződésében az aktin citoskeleton dinamikájának szabályozásában. A preszinaptikus axon terminálisok esetében a Myo16 befolyásolja a szinaptikus vezikulák számát és az axon terminálisok morfológiáját. Az X jelölés a Myo16-PI3K és a WAVE1 hármas komplex interakció hiányára utal. A modell ábra forrása Telek és munkatársai alapján: [97].

1.3.7.5.3 Prolin-gazdag régió lehetséges szerepe

A Myo16Tail tartalmaz egy prolin-gazdag poliprolin régiót, valamint az NHM motívumban is magas a prolin aminosavak aránya. A prolin-gazdag motívumok hajlamosak

poliprolin hélix II (PP II hélix) szerkezetet felvenni [98]. A nagy mennyiségű prolin gátolhatja a globuláris fehérje feltekeredést, ezért nem meglepő módon a prolinban gazdag fehérjék rendezetlen régiókat, vagy teljes rendezetlenséget mutathatnak [98,99]. A foszforilációs helyek gyakoribb előfordulása is a prolin tartalmú régiókra és a rendezetlen szerkezetű fehérje régiókra jellemző [100–102]. A poliprolin hélixek általában oldatnak kitett, amfipatikus interakciós felszínnel rendelkeznek, gyors és dinamikus interakciót biztosítva globuláris fehérjékkel [103–105]. A tandem prolin-gazdag régiók adaptor rendszer részét képezik és általában fehérje-fehérje interakciós hálózatok kialakításában vesznek részt [98,105].

A prolin-gazdag motívumok konszenzus szekvenciái alapján hat különböző osztályba sorolhatók (Proline-rich motif-PRM) [106,107]. A PRM osztályokra jellemző szekvencia motívumok (3-6 aminosav) az egymást követő prolin aminosavak számában és a nem-prolin aminosavak (jelölés: X) jelenlétében különböznek. A PRM1 osztály konszenzus szekvencia motívuma (XPPPPP) általában egy nem-prolin aminosavat tartalmaz a proximális oldalon (X=G, L, I, S, A), amelyet legalább öt prolin követ. A PRM1 motívumot tartalmazó fehérjék képesek profilint kötni, amely többek között az aktin citoszkeleton szabályozásában fontos szerepet játszik [108]. A profilin egy aktin-kötő fehérje, amely szerepet játszik az aktin citoszkeleton szabályozásában a PRM1 motívumot tartalmazó prolin-gazdag ligandokhoz – úgy mint a forminok, VASP és a WAVE család fehérjéi – kötődve [94,98,106,109]. A profilin fehérjének négy izoformáját különböztethetjük meg, amelyeket különböző gének kódolnak (*PFN1-4*). A PFN1 izoforma általánosan fordul elő, míg a PFN2 expressziója főként az agyra korlátozódik. A PFN1 és PFN2 fontos szerepet játszik az aktin-alapú idegrendszeri folyamatokban; a PFN1 szabályozza az axonális növekedést és regenerációt, míg a PFN2 pedig a szinaptikus plaszticitással hozható összefüggésbe [110,111]. A PRM2 osztály központi motívuma (FPPPP), EVH1 domént tartalmazó fehérjéket képes kötni, amelyben a proximális fenilalanint négy egymás utáni prolin követ. A PRM osztályokban felfelé haladva a konszenzus motívumok egyszerűsödnek, a PRM3 osztály központi motívuma 4 aminosavból áll (**PXXP**). A motívumon kívül eső csillag jelölés bázikus vagy hidrofób aminosavak jelenlétére utal. Ez az osztály SH3 domént tartalmazó fehérjékhez képest kötődni. A PRM4 (PPLP), PRM5 (PPPXY) és a PRM6 osztály (PSP) kevésbé ismert, kötőpartnerük lehetnek a két triptofánt (W) tartalmazó (WW), a glicin-tirozin-fenilalanin (GYF) és az ubiquitin E2 variáns (UEV) domének [106,107]. Jellemzően a különböző PRM osztályok konszenzus szekvencia motívumaiban található nem-prolin aminosavak határozzák meg a kötés specificitását [107], míg a prolin aminosavak száma pedig az affinitás erősségét befolyásolja [98].

Cameron és munkatársai izolált, GFP-jelölt Myo16Tail COS7 sejtek tranzienst transzfekciója során kolokalizációt mutattak ki nukleáris aktin filamentumokkal és profilin-asszociált struktúrákkal [36]. Feltételezésük szerint a Myo16b a C-terminális segítségével indirekt módon szabályozhatja az aktin polimerizáció dinamikáját a profilin kötésén keresztül [36].

A Myo16Tail szekvenciát elemezve felfedezhető egy prolin aminosavakat tartalmazó, kanonikus szekvencia motívum (PxxP) tandem ismétlődése, ami SH3 doméneket tartalmazó ligandokat és nem-konszenzus interakciós helyeket is képes felismerni és velük kölcsönhatni [112,113]. A Fyn kináz, ahogy azt már korábban említettük foszforilálja a Myo16Tail-t direkt kölcsönhatáson keresztül. A Fyn kötőhelyét még nem azonosították a Myo16Tail szekvencián belül, viszont ezek az Src családba tartozó kináz fehérjék tartalmaznak egymás utáni SH2 és SH3 doméneket, amiknek szerepük van az intra-, és intermolekuláris kölcsönhatásokban [114].

1.4 MIOZIN XVI SZEREPE HUMÁN MEGBETEGEDÉSEKBEN

A Myo16 elsősorban idegrendszeri szövetekben termelődik az agy fejlődése során. A PI3K jelátvitel létfontosságú az idegrendszer normális működéséhez, amelyben szintén érintett a Myo16 [53]. Ezért feltételezhető, hogy a Myo16 szerepet játszhat az idegrendszer korai fejlődésében. Irodalmi adatok alapján számos humán neurodegeneratív kórképpel hozható összefüggésbe a *MYO16* gén lokusz és annak szomszédos régiói.

Skizofrén betegek genetikai vizsgálatai kimutatták, hogy a Myo16 kódoló régiója és az egy pontos nukleotid-polimorfizmus (Single Nuclear Polymorphism-SNP) között szignifikáns összefüggés van [115]. Az SNP egy nukleotid változást követően létrejött DNS szekvencia variáció [116]. Mindezek mellett megfigyelték a Myo16 megnövekedett szintjét skizofrén páciensek frontális agykérgében [115].

Az autizmus (Autism spectrum disorder-ASD) neurológiai fejlődési betegségek csoportja, amelyet szociális viselkedési zavar és csökkent kommunikációs képesség jellemez. Feltételezések szerint a Myo16 szerepet játszhat az autizmusban. Élesztő két-hibrid rendszer segítségével kimutatták, hogy a Myo16 kötődik a neurexin 1- α preszinaptikus membrán adhéziós fehérjéhez [117], és komplexet alakít ki a neuroligin fehérjével a szinaptogenezis során, aminek fontos szerepe van a kognitív folyamatok kialakításában. A neurexin-neuroligin komplex elősegíti az axo-dendritikus kapcsolatokat és stabilizálja a szinapszisokat. Patel és munkatársai szerint ezeknek a fehérjéknek a mutációja összefüggésben állhat az autizmus betegséggel [118]. Továbbá a Myo16 kötődik a KIRELL3 szinaptikus adhéziós fehérje

extracelluláris doménjével, amely szintén fontos a neurális fejlődésben és meghibásodása szellemi fogyatékosághoz vezethet [119]. Nem utolsó sorban megfigyelték a *MYO16* gén delécióját fejlődési rendellenesség, szellemi fogyatékoság és autizmusban szenvedő páciensek esetében [120].

A *Myo16* major depresszióban is szerepet játszhat, ami egy gyakori pszichiátriai kórkép a humán populációban. Genomikai kísérletekben vizsgálták az 5-metil citozin (5mc) epigenetikai modifikációját, valamint génextpresszióra gyakorolt hatását depressziós humán páciensek prefrontális agykérgében. Az 5mc oxidációja révén 5-hidroximetil citozin (5hmC) képződik különösképp az agyszövetben, valamint gének szabályozásért felelős genomikai régióiban. A kísérletek alapján az 5hmC befolyásolja a *MYO16* gén expressziót major depressziós egyének prefrontális agykérgében [121].

Bipoláris szindrómában (BP-II) szenvedő betegekből vett genetikai minták segítségével számos SNP-t azonosítottak, amelyek között találtak *MYO16* gént érintő polimorfizmust is [122]. A *Myo16* érintettsége nem meglepő a bipoláris szindrómában, mivel ez a betegség skizofréniával is összefügg és a két neuropszichiátriai megbetegedés közös patofiziológiai háttérrel rendelkezik [123].

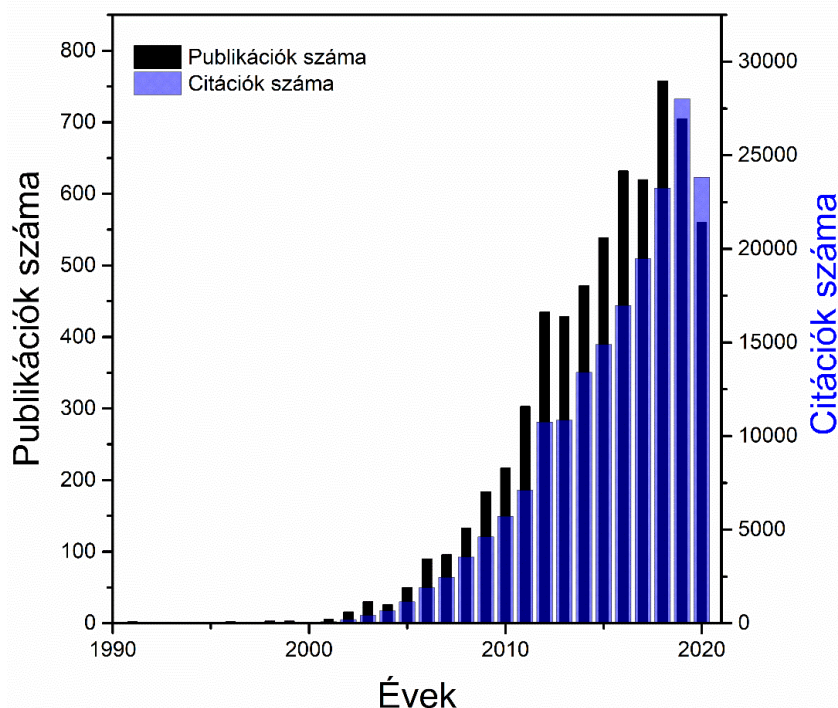
1.5 RENDEZETLEN FEHÉRJÉK

1.5.1 Rendezetlen fehérjék szerkezeti és funkcionális jellemzői

A hagyományos nézet szerint a fehérjék jól definiált háromdimenziós térszerkezetben látják el funkciójukat (szerkezet-funkció paradigma) [124]. A fehérjéknek viszont van egy olyan csoportja, amelyek natív, funkcionális állapotban sem rendelkeznek szerkezettel, vagyis rendezetlen szerkezetűek [125–127]. Ezeket a rendezetlen fehérjéket, fehérje régiókat az angol nomenklatúra alapján IDP-nek (intrinsically disordered proteins) vagy IDR-nek (intrinsically disordered regions) nevezik, mert ez a szerkezeti sajátosság a fehérjék „belső”, natív állapotára jellemző tulajdonság [126]. A rendezetlen szerkezetű fehérjék leginkább a globuláris fehérjék denaturált állapotaira emlékeztetnek [128]. Alapvetően viszont eltérnek a globuláris fehérjéktől: egyrészt nem rendelkeznek stabil térszerkezettel a harmadlagos kölcsönhatások hiányának köszönhetően, valamint kevés másodlagos szerkezeti elemet tartalmaznak [125,126].

A rendezetlen fehérjék gyorsabban fejlődtek az evolúció során, mint a globuláris fehérjék, ami feltehetően a szelekciós nyomásból származó aminosav szubsztitúciós ráta növekedésének

köszönhető [129–131]. Elsősorban a szubsztitúció által megnövekedett cisztein és prolin aminosavak száma vezethet a rendezetlen szerkezet kialakulásához, mivel ezek az aminosavak interferálnak a kooperatív fehérje feltekeredéssel [132]. Bioinformatikai analízis alapján a rendezetlen fehérjék gyakoriak különféle proteomokban, és előfordulások az organizmus komplexitásával növekszik [133–135]. Az eukarióta fehérjék közel 40%-a tartalmaz rendezetlen fehérje régiókat [136]. Mindezek miatt a rendezetlen fehérjék egyre nagyobb figyelmet kaptak és a 2000-es évektől kutatásuk dinamikusan fejlődik (7. ábra).

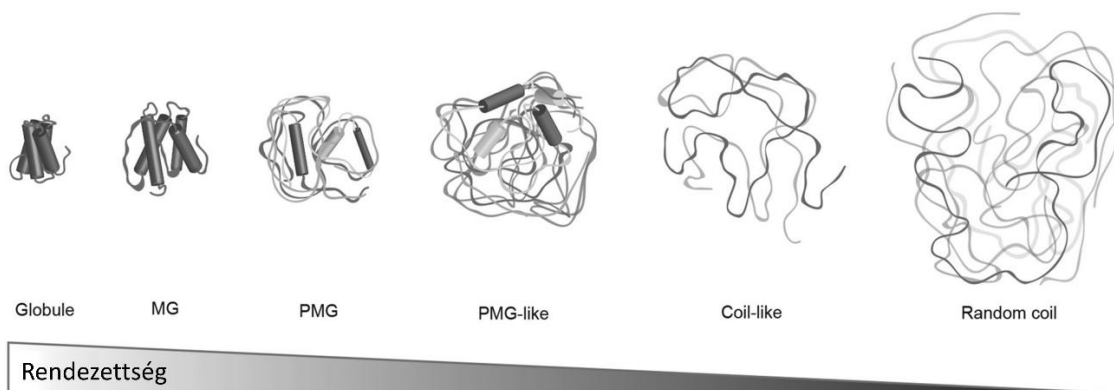


7. ábra. A rendezetlen fehérjékkel foglalkozó kutatások. Publikációk és citációk száma egymást követő öt éves periódusokban felfedezésüktől kezdve (1990) napjainkig (Web of Science adatok alapján).

A rendezetlenség alapja a fehérjét alkotó eltérő aminosav összetétel, amennyiben a rendezetlen szerkezetet elősegítő aminosavak gyakoriak a fehérjékben, mint például az Ala, Gly, Arg, Asp, His, Gln, Lys, Ser, Glu, Pro. Ezzel szemben a rendezettséget elősegítő aminosavak aránya lényegesen kisebb a rendezetlen fehérjékben, úgy mint a Trp, Phe, Tyr, Ile, Met, Leu, Val, Asn, Cys, Thr [125]. A rendezetlenséget jellemző elsődleges fizikai paraméterek: a nagy nettó töltés és az alacsony hidrofóbicitás, amelyek meggátolják a kompakt térszerkezet kialakulását [137]. A fehérje rendezetlenség tehát nem egy feltekeredési/folding probléma, sokkal inkább funkcionális előny a fehérje számára. A rendezetlen fehérjéknek különböző szerkezeti és funkcionális csoportjai különíthetők el.

Szerkezetüket tekintve sok esetben nem teljesen rendezetlenek, hanem szignifikáns

mennyiségű szerkezeti elemet tartalmazhatnak, úgynevezett molten globula (MG) [138] és pre-molten globula (PMG) [139] konformációt vehetnek fel, valamint ezek között intermediér konformációs állapotok is előfordulhatnak natív állapotban (PMG-like, coil-like átmenetek). Tehát ezek a fehérjék különböző arányban tartalmaznak rendezetlen és rendezett régiókat, és ritkább esetben lehetnek teljesen rendezetlenek (random coil). A **8. ábra** a globuláris szerkezettől kezdve mutatja be a fehérjék konformációs állapotait [140].



8. ábra. Fehérjék konformációs állapotai. A globuláris fehérjékre jellemző a kompakt szerkezet. A molten globula konformációs állapottól kezdve különböző fokú rendezetlenség figyelhető meg a fehérjék szerkezetében (MG, PMG, PMG-like, Coil-like), valamint ritkábban lehetnek teljesen rendezetlenek ezek a fehérjék (random coil). Az ábra forrása [140].

A különféle rendezetlen régiókat tartalmazó konformációs állapotokban a lokális szerkezeti elemek összefüggést mutatnak azokkal a szerkezeti elemekkel, amit ezek a fehérjék kötött állapotban vehetnek fel. Ezek az úgynevezett tranziens szerkezeti elemek, amik előre kialakult kötőhelyeknek (preformed structural element – PCS) [141] vagy molekuláris felismerő elemeknek (molecular recognition element – MoRE) [142] nevezhetők.

A rendezetlen fehérjék hat funkcionális osztályra oszthatók a partner fehérje kötési jellemzői alapján. Működésük során köthetnek tranziensen vagy permanensen valamilyen partnermolekulát, de lehetnek funkcionálisak partner kötése nélkül is. Ezek alapján a rendezetlen fehérjék lehetnek entrópikus láncok, bemutató helyek, chaperonok, effektorok, összeszerelők, raktározók és akár ezek kombinációi is [143,144]. Az entrópikus láncok nem kötődnek partner fehérjéhez, általában flexibilis linker funkciót látnak el. A bemutató hely funkciót ellátó rendezetlen fehérjék tranziensen kötik partnerüket és nagyobb számban tartalmazhatnak poszttranszlációs módosulási (PTM) helyeket. A poszttranszlációs módosulások létrejöttéhez elvárt a fehérje felszínén a hozzáférhetőség a kötőpartner számára, ezért nem meglepő, hogy a rendezetlen fehérjékben a lokálisan rendezetlen régiók számos

poszttranszlációs módosulási helyet tartalmazhatnak, úgy mint pl. foszforilációs helyek [145]. A következő funkcionális osztály a chaperonok, amelyek szintén tranziens módon kötik partnerüket, és feladatuk a rossz fehérje feltekeredés felismerése, valamint a hibás szerkezet fellazítása. Az effektorok permanens módon kötődnek a partnerfehérjéhez és azok aktivitását befolyásolják, ami általában negatív irányban. Az összeszerelők nagy fehérje komplexek összeállításában játszanak szerepet. A raktározók osztálya kisebb ligandumok raktározására vagy neutralizálására specializálódott. A rendezetlen fehérjék különböző funkcióiban a belső rendezetlenségnek funkcionális előnyei vannak, amelyek a fehérjék komplexitás növekedése miatt az evolúciós hajtóerők révén alakultak ki. Ilyen funkcionális előnyök a következők: szerkezeti flexibilitás, funkcionális plaszticitás, nagy kötőfelszín és specificitás a kötés erősség növekedése nélkül, valamint egyszerre több funkció egyidejű ellátása [146–148]. Partner fehérje kötés által indukált esetben a rendezetlen fehérjék tranziens feltekeredése során konformációs entrópiájuk jelentősen csökkenhet. Ilyenkor a korábban említett kötődés specificitása és erőssége fordított arányban változik, vagyis a nagy kötési specificitás alacsony affinitással párosulhat, ami szabályozó funkciók esetén a kölcsönhatás reverzibilitásában nyilvánul meg [143]. A rendezetlenség funkcionális relevanciáját szemlélteti, hogy gyakoriak jelátviteli folyamatokban, sejtciklus szabályozásban és transzkripcióban szerepet játszó fehérjékben [133–135].

1.5.2 Rendezetlen fehérjék és neurodegeneratív kórképek kapcsolata

A rendezetlen fehérjék és fehérje régiók számos humán megbetegedésben játszanak szerepet, mint például kardiovaszkuláris rendellenességek, tumoros elváltozások, diabétesz, amiloidózis és neurodegeneratív betegségek [149–152]. Jóllehet, mindegyik megbetegedés súlyos következményekkel járhat, de a rendezetlen fehérjékre jellemző hibás fehérje feltekeredés és aggregáció különösen gyakori neurodegeneratív kórképekben, csak néhány példát említve: Alzheimer kór, Parkinson kór, Prion betegségek, Motoros neuron betegségek, Huntington kór, Spirocerebelláris ataxia és Spinális izomatófia [153].

A rendezetlen fehérjék gyakoriságának oka neurodegeneratív betegségekben a sajátos szerkezeti és funkcionális tulajdonságaikban keresendő. Az egyedi szerkezeti flexibilitás és plaszticitás, konformációs és adaptációs képesség a környezeti változásokra, valamint az interakciós sokféleség mind jellemző a jelátviteli, szabályozási és a partner fehérje funkciók kontrollálásában [127,154–156]. A poszttranszlációs módosulások (foszforiláció, acetiláció és glikoziláció) szigorú kontroll alatt tartják a rendezetlen fehérjék biológiai aktivitását [155,157,158]. Továbbá a rendezetlen fehérjék különféle fehérje interakciós hálózatok

csomópontjaként funkcionálhatnak, ezáltal kontrollálhatják a közvetett úton kapcsolódó fehérjék funkcióját is [159]. Nem utolsó sorban a rendezetlen fehérjék különböző konformációs állapotokat és másodlagos szerkezetet vehetnek fel különféle partner fehérjék kötésekor [160]. Mivel a rendezetlen fehérjék funkciója meghatározó számos biológiai folyamatban, nem meglepő, hogy hibás működésük esetén szerepük van humán betegségekből, különösképp neurodegeneratív folyamatokban.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a nem-konvencionális miozin XVI osztályba tartozó miozin 16b (Myo16b) izoforma C-terminális szakaszának szerkezeti és funkcionális tulajdonságait vizsgáltuk.

A szekvencia összetétel alapján a miozin 16b C-terminális farok (Myo16Tail) feltehetően natív rendezetlen szerkezetben funkcionális. Ahhoz, hogy megértsük a Myo16Tail biológiai folyamatokban betöltött szerepét először a fehérje fragmentum szerkezetét tanulmányoztuk *in silico* és *in vitro* körülmények között a következő kérdésekre keresve a választ:

- milyen szerkezetet jeleznek előre a bioinformatikai analízisek?
- hogyan befolyásolja a denaturáló ágens a fehérje-kitekeredés kooperativitását?
- hogyan hat a fehérje-kitekeredés a Myo16Tail konformáció dinamikájára?
- tartalmaz-e másodlagos szerkezeti elemeket a Myo16Tail?
- milyen a Myo16Tail termodinamikai stabilitása?

Kutatásaink második felében funkcionális kísérleteket végeztünk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a Myo16Tail milyen fehérjékhez képes kötődni és ez által milyen folyamatokat lehet képes befolyásolni. Ehhez a következő kérdéseket tettük fel:

- kötődik-e a Myo16Tail az N-terminális Myo16Ank-hoz?
- befolyásolja-e az IQ motívum a Myo16Tail interakciós tulajdonságait?
- képes-e a Myo16Tail befolyásolni az aktin filamentumok összeszerelődését?

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 BIOINFORMATIKAI ANALÍZIS

A Myo16Tail rekombináns fehérje konstrukció tervezéséhez az NCBI fehérje adatbázisban elérhető aminosav szekvencia információt használtuk (UniProtKB: Q9ERC1.1). A patkány Myo16Tail kódoló DNS szekvenciát (Gene ID: 192253, *Rattus norvegicus*) bakulovírus/Sf9 expressziós rendszer tRNS készletéhez optimalizálták OptimumGene™ kodon optimalizáló program segítségével (GenScript, Piscataway, NJ, USA) [161]. A rekombináns fehérje fragmentum oldhatóságát PROSO II (Protein Solubility Evaluator II) (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/prosoII>) webszerver [162], míg a molekulatömeg és extinkciós koefficiens meghatározása ExPASy (ProtParam) program (<https://web.expasy.org/protparam/>) segítségével történt [163].

A Myo16Tail szekvencia analízisét különböző szerkezeti és funkcionális információt prediktáló bioinformatikai programokkal végeztük. A fehérje konstrukció aminosav összetétele alapján rendezetlen szerkezetet feltételezünk, amelyet különböző rendezetlenséget valószínűsítő programok kombinációjával vizsgáltunk: VLXT [164,165], VL3-BA [166], VLS2b [167], Ronn [168] és IUPred [169–171]. A fehérje szerkezet flexibilitását DynaMine programmal analizáltuk (<http://dynamine.ibsquare.be/>) [172,173]. A foszforilációs helyek predikcióját, mint lehetséges poszttranszlációs módosulás, a PhosphositePlus program segítségével végeztük (<https://www.phosphosite.org>) [81]. Az általunk vizsgált patkány Myo16Tail szekvenciát különböző gerinces osztályok képviselőinek szekvenciájával hasonlítottuk össze és vizsgáltuk Clustal-X program segítségével [82]. A Myo16Tail lehetséges háromdimenziós szerkezetét az aminosav szekvencia alapján I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) webszerver segítségével modelleztük [174] és Discovery Studio Visualizer programmal vizualizáltuk [175].

3.2 FEHÉRJÉK TERVEZÉSE ÉS TISZTÍTÁSA

3.2.1 Rekombináns Myo16Tail klónozás

Az IQ motívumot is tartalmazó Myo16Tail fehérje fragmentumot (1146-1912 aminosav) pFastBac (ThermoFisher Scientific) bakulovírus kompatibilis shuttle vektorba klónoztuk. Az 5' primer NcoI, míg a 3' primer SalI restriktációs helyet tartalmazott. A plazmid konstrukció 5' végén Hisztidin affinitás (6 His), valamint TEV proteáz felismerő mintázatot tartalmaz: ExxYxxQG/S, jelen esetben ENLYFQG aminosav szekvenciát. Az N-terminális ankyrin

doménnel kialakított kölcsönhatás vizsgálatához egy további, IQ motívumot nem tartalmazó Myo16Tail (-IQ) rekombináns konstrukciót is készítettünk (1176-1912 aminosav).

3.2.2 Myo16Tail expresszió és tisztítás bakulovírus/Sf9 rendszerben

A pFastBac-Myo16Tail és pFastBac-Myo16Tail (-IQ) plazmidot DH10Bac kompetens sejtekbe transzformáltuk, majd LB (Luria Broth) táptalajra (VWR) szélesztettük. A táptalaj a következő összevetőket tartalmazta: három féle antibiotikum (kanamicin, gentamicin, tetraciklin), izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), Bluo-gal és LB. A lemezek 48 órás 37 °C-on történő inkubációját követően kék-fehér szelektálással mintát vettünk a fehér kolóniákból, tartalmazva a transzformánst. A fehér kolóniából vett mintát LB tápoldatban amplifikáltuk éjszakán át, 37 °C-os inkubátorban, rázatás mellett. A felnövesztett transzformáns DH10Bac kompetens sejtekből rekombináns bacmid DNS-t izoláltunk és tisztítottunk, majd a klónokat PCR reakció segítségével ellenőriztük. A bacmid DNS-t Sf9 (*Spodoptera fugiperda*) sejtekbe transzfektáltuk Cellfectin (Invitrogen) reagenssel. A sejt kultúrát 3-5 napig inkubáltuk 27 °C-on, 125 rpm rázatás mellett. A sejt kultúrát centrifugáltuk (Sigma 4-16K, 1500 g, 10 perc, 4 °C) és a szupernatánst összegyűjtöttük, amely tartalmazza a P1 generációs rekombináns Myo16Tail vírustörzsoldatot. Ezt követően P1 generációs vírusoldattal fertőztük az Sf9 sejteket, majd három nap után centrifugálást követően a szupernatánst összegyűjtöttük (P2 vírusgeneráció). A P2 vírustörzsszel hasonlóan fertőztük az Sf9 sejteket, majd három napos 27 °C-os, 125 rpm rázatás mellett inkubáció és centrifugálás után előállítottuk a harmadik generációs P3 vírustörzsoldatot. A Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) expresszió optimalizálását követően a P3 vírusoldat hozzáadásával termeltettük a rekombináns fehérje fragmentumokat Sf9 sejteket tartalmazó Insectagro Sf9 tápoldatban (serum-Free/Protein-Free 1x medium, Corning). Továbbá a sejt kultúrához 10 μ g/ml antibiotikum-antimikotikum (Biowest) oldatot adtunk. Három nap után az Sf9 sejteket lecentrifugáltuk (1500 g, 2 perc, 4 °C), a felülúszót leöntöttük és a sejt pelletet folyékony nitrogénben lefagyasztottuk későbbi felhasználásra. A Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) tisztítás minden lépése Nátrium-foszfát (Na_3PO_4) pufferben (0,2 M Na_2HPO_4 és 0,2 M NaH_2PO_4 megfelelő arányú keveréke, pH 8,0) [176] történt 4 °C-on. A fagyasztott sejt pelletet a felolvasztást követően lízis pufferben [50 mM Na_3PO_4 (pH 8,0), 500 mM NaCl, 10 mM BME, 0,2 mM PMSF és 1% Triton-X 100 detergens] extraháltuk. Ezután homogenizáltuk és szonikáltuk (Bandelin Sonoplus GM 3100, MS 73 készülékkel, 4x1 perc, 80% amplitúdó és 0,4 sec impulzusidő). A sejt lizátumot 20 μ g/ml DNáz (AppliChem, PanReac) és Protein inhibitor koktél (Sigma-Aldrich, 8465) hozzáadása után 4 °C-on 1 órán

keresztül kevertettük. A lizátumot ultracentrifugáltuk (Hitachi, 20000 g, 20 perc, 4 °C), amely során a Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) a pellet frakcióba ülepedett. A Myo16Tail oldatban tartásához 6 M GuHCl denaturáló ágenst adtunk a lizátumhoz, majd mechanikai homogenizálással feloldottuk a sejt pelletet. Újabb ultracentrifugálással (Hitachi, 20000 g, 20 perc, 4 °C) pelletáltuk a fennmaradó sejttörmelékét, majd a felülúszóhoz 20 µg/ml RNáz-t (ThermoFisher Scientific) adtunk az RNS eliminálásához. A felülúszót ~1,5 ml nikkell gyöngyhöz (Protino Ni-NTA, ~6 ml/1 l lizátum) adtuk, majd éjszakán át lassan kevertettük. Másnap a gyöngyöket oszlopra töltöttük és 8 M ureát tartalmazó csökkenő pH-ra beállított pufferekkel mostuk és eluáltuk a Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) rekombináns fragmentumokat. Először a nikkell oszlopot 20 ml mosó pufferrel öblítettük (8 M urea, 50 mM Na₃PO₄, 500 mM NaCl, 10 mM BME, pH 7,0). Az eluálás pH 6 és pH 4-re beállított 10-10 ml eluáló pufferrel (8 M urea, 50 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM BME) történt és az eluálás során 2 ml-es frakciókat gyűjtöttünk. Az expresszió és tisztítás lépéseiből mintákat vettünk és 10%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforetizáltuk. A megfelelő elúciós frakciókat összegyűjtöttük és 3 lépésben dializáltuk. Az első dialízis során 6 órán keresztül kevertettük a Myo16Tail vagy a Myo16Tail (-IQ) rekombináns fehérje fragmentumokat 4 M ureát tartalmazó dialízis pufferben (4 M urea, 50 mM Na₃PO₄, 200 mM NaCl, 5 mM BME, pH 8,0). Második lépésben már urea mentes pufferben (50 mM Na₃PO₄, 100 mM NaCl, 2,5% glicerin, 1% szukróz, 5 mM BME, pH 8,0) történt a dialízis éjszakán át. Harmadik lépésben szintén 6 órán keresztül dializáltunk tároló pufferben (50 mM Na₃PO₄, 100 mM NaCl, 5 mM BME, pH 8,0). A dialízist követően koncentráció csőben (Amicon Ultra 50-kDa, Sigma-Aldrich) koncentráltuk és végül centrifugálással tisztítottuk (Beckman, 1000 g, 2 perc, 4 °C) a fehérje fragmentumokat az egyéb szennyeződésektől. A fehérje koncentrációt UV-VIS abszorpciós spektroszkópiai módszerrel (JASCO) határoztuk meg. A fehérjét a felhasználásig jégen tároltuk.

3.2.3 Kísérletek során felhasznált egyéb fehérjék előállítása

A kötésen alapuló kísérleteink kiegészítéséhez rekombináns Myo16IQ peptidet (*Rattus norvegicus*, 1146-1175 aminosav) szintetizáltattunk 4,9 mg/ml végkoncentrációban erre specializálódott cég segítségével (Genscript). A gyártó tömegspektrometriás módszerrel meghatározta a Myo16IQ molekulatömegét (MW: 3,6386 kDa). A Myo16IQ peptidet a gyártó által biztosított felhasználási protokoll alapján kezeltük. A liofilizált Myo16IQ-t 1 ml miliQ vízben feloldottuk és a fehérje oldathoz koncentrált puffert adtunk, hogy a kívánt puffer körülményekre higítsuk a fehérje oldatot (50 mM Na₃PO₄, 100 mM NaCl, 5 mM BME, pH 8,0).

Az aktin fehérjét nyúl vázizomból (*Musculus psoas*) nyertük ki több lépcsős procedúra során. Először az aktin izolálását aceton forgácsból végeztük [177], majd egy korábban leírt rutinszerűen alkalmazott módszerrel tisztítottuk [178]. Végül az aktint 'A' pufferben tárueltük (4 mM TRIS, 0,2 mM Na₂ATP, 0,5 mM BME, 0,2 mM CaCl₂, 0,005% NaN₃, pH=7,4).

A rekombináns Myo16Ank termeltetése bakteriális *Escherichia coli* rendszerben zajlott LB tápoldatban IPTG hozzáadással. A tisztítási procedúra Kengyel és munkatársai által kidolgozott módszer alapján történt [43].

A rekombináns egér profilin (PFN1 izoforma) fehérjét LB tápoldatban expresszáltuk IPTG hozzáadásával és a szakirodalomból ismert protokoll alapján tisztítottuk [108].

3.3 WESTERN BLOT ANALÍZIS

A fehérje expresszió és tisztítás során vett mintákat 10%-os SDS-poliakrilamid gélen elektroforetizáltuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk Trans-blot Turbo transzfer (Bio-Rad) rendszer segítségével. A nem specifikus elsődleges antitestkötő helyeket 3%-os tejpor oldattal blokkoltuk ((3% tejpor, Tris pufferelt NaCl, 0,5% Tween-20 (TBST)). A nitrocellulóz membránt 1,5 órán át inkubáltuk az elsődleges anti-His antitesttel (Sigma-Aldrich egér monoklonális IgG SAB1305538, hígítás 1:3000). Ezt követően TBST oldattal mostuk a nitrocellulóz membránt, majd 45 percig inkubáltuk HRP konjugált másodlagos anti-egér antitesttel (Millipore AP160P, hígítás 1:10 000). A kemilumineszcens reakcióhoz előhívó oldatot használtunk (Luminata Crescendo Western Western HRP Substrate, Merck) és a felvételt az előhívó készülék segítségével rögzítettük (Multi Genius Bio imaging system, Syngene).

3.4 FEHÉRJÉK FLUORESZCENS JELÖLÉSE

A rekombináns Myo16Ank, a szintetizált Myo16IQ peptid és a profilin fluoreszcens jelöléséhez Alexa568 festéket használtunk (Alexa Fluor® 568 C₅ maleimide, Invitrogen). A jelölési protokoll során először az Alexa568 festéket tízszeres moláris feleslegben adtuk a BME-mentes pufferben [10 mM MOPS, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, pH 7,4] található fehérje oldathoz folyamatos kevertetés mellett mágneskeverő használatával. Ezt követően a fehérjék éjszakán át inkubálódtak 4 °C-on, majd másnap 10 mM BME hozzáadásával állítottuk le a jelölési reakciót. Végül a fehérje oldatot 4 °C-on, éjszakán át dializáltuk 10 mM BME-t tartalmazó pufferben (10 mM MOPS, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM BME pH 7,4) annak érdekében, hogy elimináljuk a nem kötött Alexa568 festéket az oldatból. Az Alexa568-jelölt

fehérjék koncentrációját UV-VIS abszorpciós spektroszkópiai eljárással határoztuk meg (JASCO) és korrigáltuk az Alexa568 festék abszorpciójával 280 nm-en.

3.5 SPEKTROSKÓPIAI MÓDSZEREK

3.5.1 Fluoreszcencia emisszió

A triptofán és 1-anilino-8-naftalin szulfonát (ANS) fluoreszcencia emissziós méréseket Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spektrofluoriméteren végeztük, 20 °C-on. A Myo16Tail és G-aktin mintákban található triptofán aminosavakat 295 nm-en gerjesztettük, majd a steady-state fluoreszcencia emissziót 300-450 nm-es hullámhossz tartományban detektáltuk növekvő Guanidin-hidroklorid (GuHCl) koncentráció függvényében. Az ANS (250 μM) gerjesztés 360 nm-en történt és a fluoreszcencia emissziót 400-650 nm között detektáltuk szintén növekvő GuHCl koncentráció mellett. A GuHCl háttérintenzitását kivonva korrigáltuk a mért adatokat. A triptofán fluoreszcencia mérések esetében gerjesztési és emissziós rések nagysága 2,5 nm volt, míg az ANS mérések esetében 5 nm. A mérések során 5-5 μM fehérje mintát használtunk. Három mérés eredményét átlagoltuk és az eredményeket Origin 2020 szoftver segítségével értékeltük ki. A maximális hullámhossz (maximális emisszóhoz tartozó hullámhossz) adatok illesztéséhez Boltzmann függvényt használtunk (1. egyenlet) [179,180], ahol x a GuHCl koncentrációja, a λ_N a natív és a λ_U a denaturált fehérjét jellemző maximális hullámhossz, a D az inflexiós ponthoz tartozó GuHCl koncentráció, míg az a fordítottan arányos az inflexiós ponthoz húzott egyenes meredekségével.

$$\lambda = \lambda_N + \frac{(\lambda_U - \lambda_N)}{1 + \exp\left(\frac{D-x}{a}\right)} \quad (1. \text{ egyenlet})$$

A Myo16Tail ANS fluoreszcencia mérések esetében a maximális hullámhossz adatokra a fent említett Boltzmann függvényt illesztettük (1. egyenlet). A kontroll G-aktin ANS fluoreszcencia eltérő tendenciájú maximális hullámhossz adatokat eredményezett a rendezett, globuláris fehérje szerkezet miatt. Emiatt a kontroll mérések adataira Gauss függvényt illesztettünk (2. egyenlet), ahol A a terület, y_0 az alapvonal, x a [GuHCl], x_c a Gauss görbe maximális értékéhez tartozó [GuHCl], a w pedig a félértékszélesség.

$$y = y_0 + \frac{Ae^{-\frac{4 \ln(2)(x - x_c)^2}{w^2}}}{w \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln(2)}}} \quad (2. \text{ egyenlet})$$

3.5.2 Fluoreszcencia kioltás

Triptofán fluoreszcencia kioltás kísérleteinket a kontroll G-akin és Myo16Tail fehérjéken végeztük elektromos töltését tekintve semleges akrilamid kioltó segítségével. A fluoreszcencia intenzitás kioltás méréseket Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spektrofluoriméterrel, míg a kioltás során mért fluoreszcencia élettartam kísérleteket Horiba Jobin Yvon Nanolog készülékkel végeztük 20 °C-on. A kioltás kísérletek során a gerjesztési és emissziós paraméterek a következők voltak: $\lambda_{ex}=295$ nm, $\lambda_{em}=350$ nm. A kísérletek során 5 μ M fehérje mintát használtunk. Az akrilamid koncentrációját 0-1,2 M között fokozatosan növeltük. A kísérletek során kapott adatokat a klasszikus Stern-Volmer egyenlet felhasználásával értékeltük ki (3. és 4. egyenlet) Origin 2020 szoftver segítségével. Az adatokat korrigáltuk a „belső szűrő” (inner filter) effektusra.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (3. \text{ egyenlet})$$

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} [Q] \quad (4. \text{ egyenlet})$$

A Stern-Volmer egyenletekben az F_0 vagy a τ_0 a triptofán fluoreszcencia intenzitása/élettartama akrilamid kioltó molekula hiányában és az F vagy a τ a triptofán fluoreszcencia intenzitása/élettartama különböző akrilamid koncentrációk esetén $[Q]$. A Stern-Volmer kioltási állandó (K_{sv}) értéke az F_0/F és a $[Q]$ alapján ábrázolt adatpontokra illesztett egyenes meredekségének felel meg.

3.5.3 Steady-state anizotrópia

A triptofán fluoreszcencia anizotrópia mérések során a G-aktin (kontroll) és Myo16Tail fehérje mintákat növekvő GuHCl koncentráció hozzáadás mellett vertikálisan polarizált fényrel gerjesztettük 295 nm-en. Ezt követően az emissziót 350 nm-en detektáltuk vertikális és horizontális szűrőkön keresztül.

Fehérje:fehérje kölcsönhatásra irányuló fluoreszcencia anizotrópia kísérletek során 1-1,2 μ M Alexa568-jelölt Myo16Ank fehérjét és 1 μ M Alexa568-jelölt Myo16IQ peptidet használtunk ($\lambda_{ex}=578$ nm, $\lambda_{em}=601$ nm). Az Alexa568–Myo16Ank-hoz Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) fehérjét, míg az Alexa568–Myo16IQ-hoz Myo16Ank fehérjét adtunk növekvő koncentrációban és vizsgáltuk az anizotrópia változását. Az Alexa568–Myo16Ank:Myo16Tail és Alexa568–Myo16Ank:Myo16Tail (-IQ), valamint az Alexa568–Myo16IQ:Myo16Ank komplexet jellemző disszociációs egyensúlyi állandó értékeket (K_D) az

5. egyenlet alapján határoztuk meg. Az egyenletben szereplő A_0 és T_0 a fluoreszcensen jelölt Myo16Ank vagy Myo16IQ és a jelöletlen Myo16Tail/Myo16Tail (-IQ) vagy Myo16Ank koncentrációkat jelöli, r_A az Alexa568–Myo16Ank/Myo16IQ steady-state anizotrópiája Myo16Tail/Myo16Tail (-IQ) hiányában, r_{AT} az Alexa568–Myo16Ank/Myo16IQ steady-state anizotrópiája a Myo16Tail/Myo16Tail (-IQ) telítési koncentrációja mellett.

$$\frac{r - r_A}{r_{AT} - r_A} = \frac{A_0 + T_0 + K_D - \sqrt{(A_0 + T_0 + K_D)^2 - 4A_0 T_0}}{2} \quad (5. \text{ egyenlet})$$

A triptofán és az Alexa568-jelölt fluoreszcencia anizotrópia kísérletek során a gerjesztési és emissziós rések nagysága 2,5 nm volt egyaránt és az anizotrópiát 10 percen át mértük, majd az értékek átlagát határoztuk meg. A kísérletekhez Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spektrofluorimétert használtunk és a mérések 20 °C-on zajlottak.

3.5.4 Időkorrelált egyfoton számlálás (TCSPC)

A triptofán fluoreszcencia élettartam és anizotrópia lecsengés méréseket Horiba Jobin Yvon Nanolog spektrofluoriméterrel végeztük. A triptofán aminosavakat Nanoled impulzus üzemű fényforrással gerjesztettük 295 nm-en és az emittált fényt 350 nm-en detektáltuk. A kísérletek során a kontroll G-aktin és Myo16Tail koncentrációja 5-5 μM volt. Az egyes mérésekhez növekvő koncentrációban GuHCl oldatot adtunk (0, 1, 2, 3, 4 M). A kísérletek során a csatornaszélesség 0,055 ns/csatorna volt, a résszélesség élettartam mérések esetén 3 nm, míg anizotrópia lecsengés esetén 10 nm volt. További fontos mérési paraméterek: detektor feszültség 950 V, mérési tartomány 200 ns, ismétlési frekvencia 1 MHz, impulzus időtartam <1ns, szinkronizálás késleltetés 50 ns. Legalább három mérést átlagoltunk és az adatokat Origin 2020 program segítségével értékeltük ki. Az időfüggő triptofán fluoreszcencia élettartam értékeket (τ) a 6. egyenlet segítségével számoltuk. Az egyenletben az $I(t)$ az időfüggő fluoreszcencia intenzitás, az IRF a műszer impulzus válasz függvénye, A_i az i -edik komponens amplitúdója 0 időpillanatban, és a τ_i az i -edik komponens fluoreszcencia élettartama. Az adatokra Fluofit (PicoQuant) program segítségével exponenciális függvényt illesztettünk.

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt' \quad (6. \text{ egyenlet})$$

Az időfüggő anizotrópia lecsengés adatokra két exponenciális függvényt illesztettünk Origin 2020 program segítségével, majd a 7. egyenlet segítségével határoztuk meg a fehérjék rotációs korrelációs idejét (θ). Az egyenletben szereplő $r(t)$ az időfüggő anizotrópia, az r_∞ a

végtelen időpontban mért anizotrópia ($t=\infty$, limitáló anizotrópia), az A_i az i -edik komponens pre-exponenciális faktora, végül a θ_i az i -edik komponens rotációs korrelációs ideje.

$$r(t) = r_{\infty} + \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-\frac{t}{\theta_i}} \quad (7. \text{ egyenlet})$$

3.5.5 Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia (CD)

A Myo16Tail lehetséges másodlagos szerkezetét Peltier típusú temperáló egységgel ellátott Jasco J-810 spektropolariméter (Japan Spectroscopic Co., Tokio, Japán) segítségével vizsgáltuk. A méréseket távoli UV tartományban (190-250 nm) végeztük 25 °C-on. A Myo16Tail koncentrációja 12,7 μM (1,1 mg/ml) volt az egyes mérések során. A kísérleti paraméterek a következők: 0,01 cm úthossz, sáv szélesség 1 nm, scannelési sebesség 20 nm/min, válaszidő 4 másodperc. A Myo16Tail pufferrel (50 mM Na_3PO_4 , 100 mM NaCl, pH 8,0) szintén elvégeztük a kísérletek ugyanazon beállításokkal. Legalább három mérés CD spektrumát átlagoltuk és a Myo16Tail pufferrel mért CD spektrummal korrigáltunk. A CD adatokat BestSel webszerver (<http://bestsel.elte.hu>) segítségével analizáltuk. Továbbá a CD adatok segítségével kiszámoltuk az egy aminosavra eső moláris ellipticitás (θ) értékeket (8. egyenlet) 222 és 220 nm-en ($[\theta]_{222} = -5813 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ és $[\theta]_{200} = -8865 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$), amelyek alapján a fehérjék különböző rendezetlen konformációs állapotainak populációi jellemezhetőek egy kettős hullámhossz ábrázolás segítségével [181]. Az egyenletben a θ az egy aminosavra eső moláris ellipticitás, a $\Delta\varepsilon$ a moláris extinkciós koefficiens különbsége a jobbra és balra cirkulárisan poláros fény különböző elnyelődése alapján, valamint a korrekciós faktor értéke 3298 abban az esetben, ha az egy aminosavra eső moláris ellipticitás $\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$, a $\Delta\varepsilon \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ mértékegységben van megadva [182].

$$\theta = \Delta\varepsilon \cdot 3298 \quad (8. \text{ egyenlet})$$

A hőmérsékletfüggő CD spektroszkópiai kísérletek során 1,15 μM (0,1 mg/ml) Myo16Tail fehérjét használtunk és a méréseket 1 mm úthosszúságú cellával végeztük. A nagyobb úthossz végett a Myo16Tail pufferében csökkentettük a NaCl koncentrációt 20 mM-ra. A CD spektrumokat 10-100 °C között mértük 1 °C/min felfűtési sebességgel. A felfűtés során 10° C-ként vettünk fel egy újabb CD spektrumot, majd három mérést átlagoltunk és az adatokat BestSel programmal értékeltük ki¹.

¹ A CD spektroszkópiai méréseket az ELTE TTK Biokémia tanszéken végeztük.

3.5.6 Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)

A kalorimetriás méréseket Setaram Micro DSC-III készülékkel végeztük. A fehérje mintákat 20 °C-ról 100 °C-ra fűtöttük fel 0,3 K/min felfűtési sebességgel. A Myo16Tail minták Na_3PO_4 -ot tartalmazó puffer közegben (50 mM Na_3PO_4 , 100 mM NaCl, 5 mM BME, pH 8,0), a G-aktin kontrollt (4 mM TRIS, 0,2 mM Na_2ATP , 0,5 mM BME, 0,2 mM CaCl_2 , 0,005% NaN_3 , pH=7,4) 'A' pufferben tároltuk jégen. A referencia mérések során a fehérjék tároló pufferét használtuk. A Myo16Tail és a G-aktin koncentrációja 1 mg/ml volt a mérések során. Minden esetben a minta kétszer került felfűtésre az adott hőmérséklet tartományban. A második felfűtést követő mérés igazolja, hogy a kontroll G-aktin és a Myo16Tail az első felfűtés alatt már irreverzibilis módon denaturálódott. A kísérletek során három mérést végeztünk és az adatokat Origin 2020 program segítségével értékeltük ki, valamint a hőáram görbékre Gauss függvényt illesztettünk (2. egyenlet).

3.5.7 Polimerizációs kinetika

A Myo16Tail hatását az aktin polimerizációra N-(1-pirén)jódacetamid (pirén)-jelölt aktin fehérje alkalmazásával végeztük (2 μM , 2% jelölt). A polimerizációt 100 mM KCl és 2 mM MgCl_2 hozzáadásával indítottuk. A pirén jellemző tulajdonsága, hogy a fluoreszcencia intenzitása arányosan növekszik az aktin filamentumok mennyiségével, aminek köszönhetően az aktin polimerizáció kinetikai szempontból karakterizálható. A mérésekhez Safas Xenius FLX spektrofluorimétert használtunk ($\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 407 \text{ nm}$). A polimerizációs sebesség meghatározása érdekében egyenest illesztettünk a polimerizációs tranziensek kezdeti, lineáris szakaszára (0 – 500 s). Az adatokat Origin 2020 program segítségével értékeltük ki.

4. EREDMÉNYEK

4.1 MYO16TAIL BIOINFORMATIKAI SZEKVENCIA ANALÍZIS

4.1.1 Myo16Tail aminosav szekvencia összetétel vizsgálata

Kísérleteink első fázisában *in silico* bioinformatikai módszerekkel vizsgáltuk a rekombináns Myo16Tail konstrukció aminosav szekvenciáját (1146-1912 aminosav), amely tartalmazza az IQ motívum (30 aminosav) és a C-terminális kódoló régiót. Az analízis első felében azt vizsgáltuk, hogy a Myo16Tail szekvencia milyen arányban tartalmaz rendezett, kompakt szerkezetet elősegítő (Trp, Phe, Tyr, Ile, Met, Leu, Val, Asn, Cys, Thr), vagy rendezetlen szerkezetet elősegítő aminosavakat (Ala, Gly, Arg, Asp, His, Gln, Lys, Ser, Glu, Pro). Az eredmények alapján magas a rendezetlen szerkezetet elősegítő aminosavak aránya (68%), míg a másodlagos és harmadlagos szerkezet kialakulásáért felelős aminosavak aránya ezzel szemben kevesebb volt (32%). Említésre méltó az alfa-hélix szerkezetet megtörő prolin [183] aránya, amely 15%-ot tesz ki a teljes Myo16Tail szekvenciában. A Myo16Tail középső régiójában található prolin-gazdag szekvencia motívumban még ennél is magasabbnak, 30,7%-nak mutatkozott a prolin aminosav aránya. Az aminosavak csoportosítását és megoszlását a **2. táblázat** mutatja.

Rendezett szerkezetet elősegítő aminosavak									
Trp	Phe	Tyr	Ile	Met	Leu	Val	Asn	Cys	Thr
6	16	13	16	15	67	32	21	21	39

Rendezetlen szerkezetet elősegítő aminosavak									
Ala	Gly	Arg	Asp	His	Gln	Lys	Ser	Glu	Pro
59	49	47	34	19	34	34	88	45	116

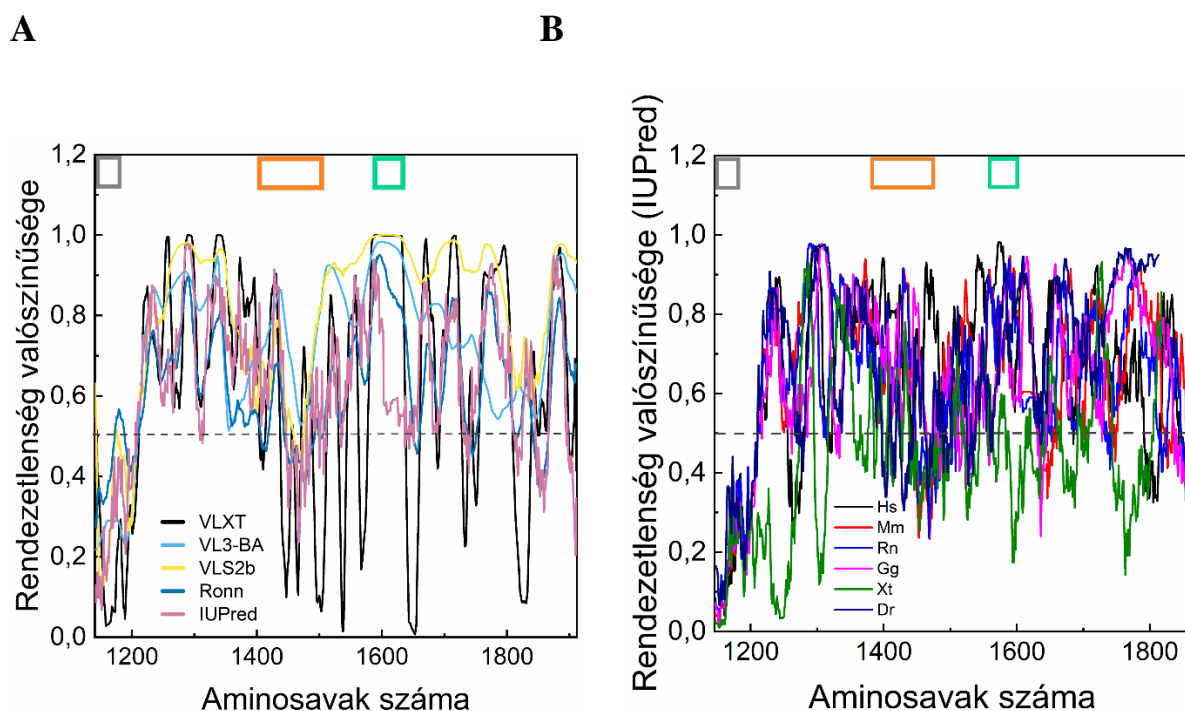
2. táblázat. A Myo16Tail szekvenciában található aminosavak csoportosítása és megoszlása. Az aminosavak három betűs kódja alatt látható a szekvenciában előforduló aminosavak száma.

A rendezetlen fehérjék evolúciójában jelentős szerepet töltenek be bizonyos aminosavak szubsztitúciói (Ile, Ser, és Pro) [132]. A szekvencia elemzésből látható, hogy a rendezett szerkezet jelenlétét jelző izoleucin száma kevés, ezzel szemben a rendezetlenséget elősegítő szerin és prolin aminosavak száma jelentős a Myo16Tail szekvenciában. A szerin és a prolin a másodlagos szerkezeti elemek kialakulását gátolja, továbbá a szerin aminosavak nagy száma

korrelálhat a foszforilációs helyek előfordulásával is. Tehát az egyedi aminosav eloszlások alapján feltételezhetjük, hogy a Myo16Tail rendezetlen szerkezetű C-terminális fehérje fragmentum.

4.1.2 Myo16Tail rendezetlenség és szerkezeti dinamika prediktálása

A Myo16Tail lehetséges szerkezeti dinamikáját különböző rendezetlenséget előrejelző program kombinációjával tanulmányoztuk: VLXT, VL3-BA, VSL2b, Ronn és IUPred (9. A ábra). A predikción a szaggatott vonal alatti rész ($<0,5$) utal a rendezett fehérje szerkezetre, míg a szaggatott vonal felett ($>0,5$) a fehérje rendezetlen szerkezetűnek tekinthető a szekvencia alapján. Az ábrán szembevetendő a jól ismert, alfa-helikális szerkezettel rendelkező IQ motívum (szürke téglalap), amely feltehetően rendezettebb szerkezetet mutat [184]. A Myo16Tail C-terminális további része, illetve a NYAP és a prolin-gazdag régiók nagyfokú rendezetlenséget mutatnak (9. A ábra).

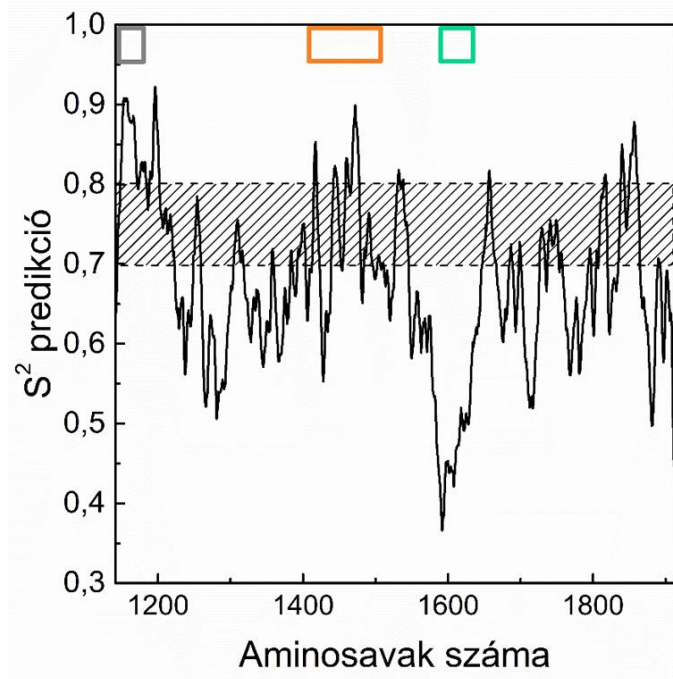


9. ábra. A Myo16Tail szerkezeti rendezetlenség valószínűségének vizsgálata. Az ábrákon az ismert fehérje motívumokat színes téglalapokkal jelöltük. Az IQ motívum szürke, a NHM narancssárga és a prolin-gazdag régió zöld színnel jelölve. **(A)** A Myo16Tail rendezetlen szerkezetének vizsgálata különböző webszerverek kombinációjával történt: VLXT (fekete), VL3-BA (világoskék), VLS2b (sárga), Ronn (sötétkék), IUPred (rózsaszín). A vízszintes szaggatott vonal küszöbértéke (0,5) felett 50% a valószínűsége a rendezetlen szerkezet jelenlétének. Ezen érték alatt pedig a fehérje szerkezete vélhetően rendezett és a másodlagos szerkezeti elemek dominálnak. **(B)**. A rendezetlenség

konzerváltságának vizsgálata különböző gerinces osztályok képviselőinél IUPred program segítségével. Az analízishez a következő UniProt fehérje adatbázisban található szekvenciákat használtuk: *Homo sapiens* (Hs): Q9Y6X6, *Mus musculus* (Mm): Q5DU14, *Rattus norvegicus* (Rn): Q9ERC1, *Gallus gallus* (Gg): XP_416950.3, *Xenopus tropicalis* (Xt): A0A5G3IJG7, *Danio rerio* (Dr): F1QE80.

Tovább vizsgáltuk a patkány Myo16Tail feltételezett szerkezeti rendezetlenségét összehasonlítva különböző gerinces osztályok képviselőinek Myo16Tail szekvenciáival IUPred webszerver segítségével (**9. B ábra**). Az elemzés során szembevető a szerkezeti rendezetlenség valószínűségek átfedése az egyes szekvenciák esetében (*Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Rattus norvegicus* (Rn), *Gallus gallus* (Gg), *Xenopus tropicalis* (Xt), *Danio rerio* (Dr)). A funkcionális fehérje régiók közül az IQ motívum esetében szintén a rendezettség utaló szerkezet valószínűsíthető, míg az NHM és a prolin-gazdag régió minden vizsgált gerinces faj szekvenciájában nagymértékű rendezetlenséget valószínűsít. Mindezek arra utalnak, hogy a rendezetlen fehérje régiók konzerválódtak az evolúció során.

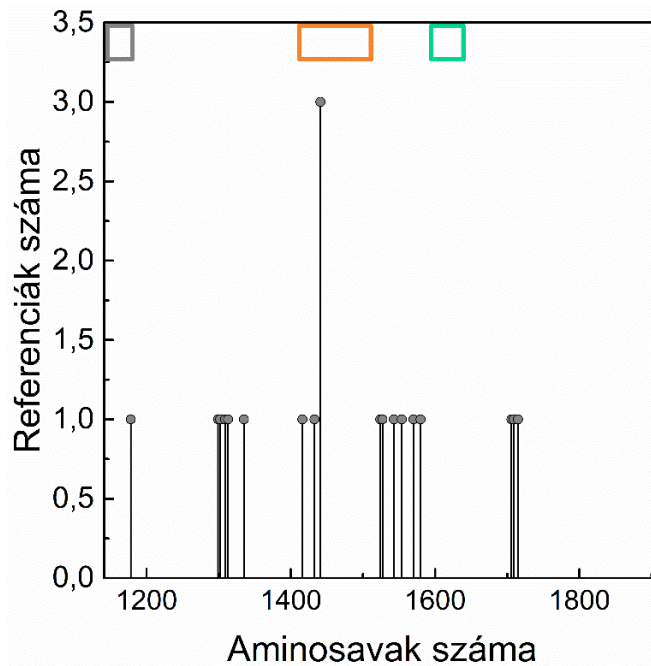
A Myo16Tail szekvenciát tovább vizsgáltuk a szerkezeti flexibilitást prediktáló DynaMine program segítségével (**10. ábra**). A predikció alapján a Myo16Tail 70%-a flexibilisnek tekinthető (S^2 érték $<0,7$), míg a merev fehérje szerkezet valószínűsége csak 20% (S^2 érték $>0,8$). Az elemzésben található egy átmeneti régió (S^2 érték $0,7-0,8$), amely a kontextusfüggő konformációs sajátságokra utalhat (10%), pl. partner fehérje kötődésekor a rendezetlen fehérje konformáció változáson mehet keresztül és vehet fel egy rendezettebb szerkezetet [185]. A DynaMine predikció alapján a Myo16Tail szerkezete flexibilisnek tekinthető. Jól elkülönül a rendezett IQ motívum a predikcióban, ami a merev szerkezeti régióban található. A Myo16Tail C-terminális többi része – magába foglalva az NHM és a prolin-gazdag motívumokat – nagymértékű szerkezeti flexibilitás mutat (**10. ábra**).



10. ábra. A Myo16Tail szerkezeti flexibilitásának vizsgálata DynaMine program segítségével. Az alacsony ($<0,7$) S^2 predikció értékek nagymértékű fehérje szerkezeti flexibilitásra utalnak, míg a magas ($>0,8$) S^2 értékek a merev, kompakt szerkezet jelenlétét valószínűsítik. A ferdén vonalkázott tranzien régió ($0,7-0,8$ S^2 predikciós értékek között) egy kontextusfüggő szerkezeti dinamikát feltételez. Az ismert fehérje motívumokat különböző színű téglalapok jelzik az aminosav szekvencia alapján. Az IQ motívum szürke, az NHM narancssárga és a prolin-gazdag régió zöld színnel van jelölve.

4.1.3 Myo16Tail poszttranszlációs módosulási helyek predikciója

A szakirodalom alapján a rendezetlen fehérjék gazdagabbak poszttranszlációs módosulási helyekben, mint a rendezett szerkezetű társaik [186]. Ezért a Myo16Tail szekvenciát tovább vizsgáltuk PhosphositePlus programmal lehetséges poszttranszlációs módosulási helyeket keresve [81]. A referencia alapú predikció szerint a Myo16Tail 17 foszforilációs helyet tartalmazhat (10 Ser, 4 Thr és 3 Tyr foszforilációs hely). Közvetlen az IQ motívum után található harmadik treonin aminosav egy feltételezett foszforilációs hely, aminek a poszttranszlációs modifikációja a könnyűlánc kötésben játszhat szerepet. További prediktált foszforilációs helyek találhatóak az NHM motívumban, továbbá jelentős mennyiségben a rendezetlen régiókban (**11. ábra**).



11. ábra. Poszttranszlációs módosulási helyek vizsgálata a Myo16Tail szekvenciában. Az ábrán az ismert fehérje motívumokat különböző színű téglalapokkal jelöltük az aminosav szekvencia alapján. Az IQ motívum szürke, az NHM régió narancssárga, valamint a prolin-gazdag motívum zöld színnel jelölve. A referencia számérték nagyobb értéke megbízhatóbb valószínűséget feltételez.

4.1.4 Myo16Tail szekvencia konzerváció vizsgálata

A Myo16Tail szekvencia konzerváltságának további elemzéséhez a patkány Myo16Tail szekvenciát hasonlítottuk össze a gerinces osztályok (emlősök, rágcsálók, madarak, kételtűek, halak) képviselőinek Myo16Tail szekvenciáival Clustal-X program segítségével (**12. ábra**) [82]. A részletes analízisben a szekvencia konzerváltságáról és annak mértékéről kaphatunk információt (teljes konzerváltság – 100%, erős hasonlóság – 80% és gyenge hasonlóság – 60%). Az eredmények alapján a Myo16Tail 47% -os teljes szekvencia homológiát mutatott, ami utal az egyes fehérje régiók konzerváltságára. Az ismert motívumokat vizsgálva az IQ 86%, az NHM 49%-ban mutat egyezést, míg a prolin-gazdag motívum mindössze 2,4%-os homológiát mutat (**12. ábra; 3. táblázat**). Tehát a szekvencia analízis alapján nagymértékű szekvencia konzerváció figyelhető meg az ismert motívumok közül az IQ és NHM motívumban, viszont a prolin-gazdag régió nem tűnik konzerváltnak. Más fehérje régiókban szintén jelentős mértékű a konzerváltság, ami arra utal, hogy a prediktált rendezetlen szerkezetű régiók konzerválódtak az evolúció során a gerinces élőlényekben. Az összehasonlító Clustal-X szekvencia analízis összhangban van az IUPred által vizsgált gerinces osztályok képviselőinek szekvencia egyezésével a rendezetlenség tekintetében (**9. B ábra**).

A fehérje térszerkezet kialakításáért elsődlegesen felelős aminosavak határozzák meg a funkciót, amelyek nagymértékű konzerválódást mutatnak. Ezért hasonlóságot találhatunk a fehérje funkcióban 25%-os szekvencia homológia felett [143]. Az irodalmi adatok alapján a Myo16Tail szerepet játszhat neurodegeneratív megbetegedésekben [115,120,122,187,188], ezért feltételezzük, hogy a konzervált rendezetlen szerkezetnek funkcionális jelentősége lehet a humán Myo16 és a hozzá kapcsolódó neurodegeneratív kórképek esetében.

A rendezetlen fehérje szerkezettel összefüggésben lévő prediktált poszttranszlációs módosulási helyek relevanciájának megerősítéséhez további lehetőséget teremt a szekvencia összehasonlításon alapuló konzerváltság analízis (**12. ábra**). Ezért azt vizsgáltuk, hogy a Myo16Tail szekvenciában milyen mértékű a korábbi fejezetben bemutatott, PhosphoSitePlus (**11. ábra**) által prediktált foszforilációs helyek konzerváltsága. A lehetséges foszforilációs helyeket az aminosavak fölött látható lefelé mutató piros nyíl jelzi (**12. ábra**). Az IQ motívumot követő első lehetséges foszforilációs hely (T¹¹⁷⁸) nem mutat hasonlóságot a szekvencia összehasonlításban. Három lehetséges foszforilációs hely található az NHM motívumban, melyek teljes konzerváltságot mutatnak (100%-os egyezés a gerinces élőlények szekvenciáiban). Ezek közül két tirozin (Y¹⁴¹⁶ és Y¹⁴⁴¹) szerepét már korábban leírták, ahol a Fyn kináz által a tirozin aminosavakon keresztül foszforilálódott Myo16Tail képes kötődni a foszfoinozitid 3-kináz (PI3K) p85 alegységéhez, ezáltal aktiválva a PI3K jelátviteli útvonalat [53]. A további lehetséges foszforilációs helyek mind a rendezetlen régiókban találhatóak és ezek közül kilenc foszforilációs hely teljes konzerváltságot mutat, egy prediktált szerin gyenge hasonlóságot feltételez, míg két prediktált szerin nem mutat egyáltalán homológiát (**12. ábra**).

Összefoglalva a foszforilációs helyek konzerváltságának elemzését azt mondhatjuk, hogy a 17 lehetséges foszforilációs helyből 13 konzervált a gerinces élőlények szekvenciáiban, melyek szinte kivétel nélkül a prediktált rendezetlen régiókban találhatóak. Az analízis biológiai relevanciáját tekintve, a konzervált foszforilációs helyek alapján feltételezhetjük, hogy a Myo16Tail rendezetlen régióinak foszforilációja fontos szerepet játszhatott a Myo16 fehérje evolúciójában.

::*:***:*:****::: :*: :*: *::: :*: *****:*****: :
 Hs 1 LQRKIITCQKVIIRGFLARQHLLQRISIRQQEVTSSINSFLQNTEDMGLKTYDALVIQNASDIARENDRLR
 Mm 1 LQRKIVTCQKVIIRGFLARQHLLQRMSIKQQEVTSSIKSFLQSTEDMALKTYDALVIQNASDIAREHDRLR
 Rn 1 MQRKIVTCQKVIIRGFLARQHLLQRMSIKQQEVTSSIKSFLQSTEDMALKTYDALVIQNASDIAREHDRLR
 Gg 1 LQKKIITCQKVIIRGFLARQVLRQKMSIKQQEITSVKGFQNVEDMGLKTYDALVIQNASDIARENDRIR
 Xt 1 LQKKIILCQKVIIRRFLARQHLQKKLDTKENEDTFIKDFIQTIENMGQOQSYHSLVIQNASDIAREKVALQ
 Dr 1 LHRKIITCQKVIIRGFLARQVRRRLTSRQQLCNVQRFLOGAEDLGLRITYDNLVIQNAADIARENDRLR

. :. * . :. : *
 Hs 70 SEMNAPYHKEKLEVRNMQEEGSKRTDDKSG-----PRHFHPSSMSVCAAVDGLGQCLVGP
 Mm 70 KEVHTAYH-----RNRQEEGTKRAEDQGG-----CRHVHSNSVPVPMVDSLAQALTGPS
 Rn 70 KEVHAAYH-----RNRQEEGTKRAEDQGG-----CRHAHSNSVPVPMVDSLAQALAGPS
 Gg 70 NEMNAAYHREKLEARNRPEEVHKRAEDKGGKLPEDGF-AGYRAPKHFHSSSVPMMAVEGLVHSAAGSS
 Xt 70 IESNTAYS-----AMESICNKEEMLKR-----YSLFFSSFLPLQIVSN-----IALSS
 Dr 70 GHISAPPLGERPEPVGKEEDSPKRVVEKSGRNDVANRGGNRPIRHFSSSVPLPLVMDSLVHSSIGAS

. : * :. . . * *****:*. ***** * : : *.:*****
 Hs 125 IWSPSLHSVFSMDDSS--SLSPRKQPPPKPRDPNTRLSASYEAVSACL SAA-REAANEALARPRPHS
 Mm 119 TRPPSLHSVFSMDDST--GLSPRKQPPPKPRDPNTRLSASYEAVSACL SAA-KDAAGEALTRPRPHS
 Rn 119 SRSPSLHSVFSMDDST--GLSPRKQPPPKPRDPNTRLSASYEAVSACL SAT-KDAASEALTRPRPHS
 Gg 137 IRSPLHSVFSMEDNS--SLSPRKQPPPKPRDPNTRLSASYEAVSACL SAASKEANEVLTTRPRPHS
 Xt 112 IRSLSLHSVLSMDDGN--GLSPRKQPPPKPRDPNTRLSASYEAVSACL FAASVDIDNEALSRPRPHS
 Dr 139 IKAALQPTPHSTDEGNNGGSLSPRKQPPPKPRDPNTRLSASYEAVSACL SIAPKDSPAEALAKPRPHS

***** *****:***:*.*** . . :. :.
 Hs 190 DDYSTMKKIPPKPKRSPN TKLSGSYEEISGS-RPGDARPA-----APG-----AAARVLTPTGTPQCA
 Mm 184 DDYSTMKKIPPKPKRSPN TKLSGSYEEI IWGPPRPSGTMGQGGRHQAPGTLVQWARPDSVPQCTPQLP
 Rn 184 DDYSTMKKIPPKPKRSPN TKLSGSYEEI IWGP-RPSGTMGQVGHKHPAGTLVQWASPDSMPQCTPQLP
 Gg 203 DDYSTMKKIPPKPKRSPN TKLSGSYEEI IPGQ-KPGDVKQANTVAKQGS-----YDTAGVQRAASADVP
 Xt 178 DDYSTMKKIPPKPKRSPN TKLSSSFEESISAH-NSGELNTFSTIVRKVHR-----DIGTIQRAASADGP
 Dr 207 DDYSTMKKIPPKPKRSPN TKLTGSYEEI SVSP-SPARPTDMKLVSLVRGG-----HCLGLIQRASADGP

. : : * ***** * : ** : ** :***** :.
 Hs 247 LP--PAAPPD-EDDSEPVVYIEMLGHAARP-----DSPDPGESVYEEEMK CCLPDDGG-----PGAGSFL
 Mm 252 LH--LPLPQGDYDDDAEPVYIEMVGNAAARAGGSETDSPDQGESVYEEEMKYILPEEG-----CGLGMLT
 Rn 251 LH--LPLPQGDYDDDGEVYIEMVGNAAARAGGSETDSPDQGESVYEEEMKYVLPPEEG-----CGPGMLT
 Gg 265 QHGTLSLYMSQEEEEENEPVYIEMVGNAMKHSSAAEAESPEQGESVYEEEMKYFLPEEGI-----NSNGIIP
 Xt 240 HHGILTLCMSEEEDEAEPVYIEMAGTAGKCHFIERS SPEQGEAVYEEEMKYHHPDHI-----NINN
 Dr 270 HSSVLSLYPCQ---DEEDVYIEMV GASRALS LADTHSPEPGEAVYEEEMKYFPNDEIVSTPVVKPEAVNP

. : * : . **** *****:*****: ** ****
 Hs 303 LHGASPPLLHR-----APEDE-----AAGPPGD--ACDIPPPFPNLLPHRPPLLVFPPTPVTCSPAS
 Mm 312 FLPASPPFLFLETRKAIILEAAEG-----NCQPSKD--TCDIPPPFPNLLPHRPPLLVFPPTPVTTRSPAS
 Rn 311 FLPASPPFLFLETRKAIILEAGEG-----SCQPLKD--TCDIPPPFPNLLPHRPPLLVFPPTPVTCSPAS
 Gg 328 VATGSPPLVFESKKNVHVEDGTLDGNSQAALNYKD--SCDIPAPFPNLLPHRPPLLVFPPTPVTCSPAS
 Xt 299 LAMGSSLLQNMNLFENLDADIK----NEQCSKE--SCDIPAPFPNLLPHRPPLLVFPPTATVTSSPAS
 Dr 335 TPLPAPVLEIKRPVTLIEQSGTLG----GKQQGKDGMPCDIPAPFPNLLPHRPPLLVFPPTSPVTCSPAS


```

      ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓
*****:*****:**:*. * :.***:* * : : :** : : : : :** ***
Hs 358 DESPLTPLEVKKLPVLETNLKYPVQPEGSSPLSPQYSKSQKGDGRPASPLGLALFNGSGRASPPSTPPP
Mm 373 DESPLTPLEVKKLPVLETNLKYPVQSEGSSPLSPQYSKAQKGDNDQLASPGFVPVFNPSRISPPATPPP
Rn 372 DESPLTPLEVKKLPVLETNLKYPVQSEGSSPLSPQYSKAQKGENDQLTSPGFVPVFNPSRISPPATPPP
Gg 394 DESPLTPLEVKKLPVLETNLKYPVQSEGSSPLSPQYSKSQKGESERPASPLVVFNVSSKVTTPSTPPP
Xt 361 DESPLTPLEMIKLPVLETNINYTIQTDMSSPISQCLKHQR-DNERPSSPALS VFVSVSKVSPCTPPL
Dr 399 DESPLTPLEVKKLPVLETNLNYSQ-DGGSPLSPOYTRORA-----DSSPSSLILMP-DKSTPPLTPPP

* * . : : * : ** :
Hs 358 PPPP---GPP-----PAPYRCAHLAFPPPE
Mm 441 PPGPPAPCGPPPAPCGPPPAPCGPPPAPCGPPPAPCGAASACGVAPAPCRPPTHFAFPPE
Rn 440 PPGPPAPCGPPSAPCGPPPAPCGPPPAPCGPPPAPCGAA-----PAPCRPPTHFAFPPE
Gg 462 PLPPPPPPVPPP-----ISYRASTHFAFPPE
Xt 428 PQTPT-----SFQFPTHFSFPME
Dr 460 PPPPAVLP-----PPYRPPSHFPFPE

: : : * : * : : :
Hs 372 ---PAPVNAGKAGPSAEAPKVHPKPN SAPVAGPCSSFPKIPYSPVKATRADARKAGSSASPPAPYSPPS
Mm 509 ---SVLVTAALKALTNSDLRPTQPKPSSAPVPGPCSSFVKAPYSPGKTARADLRKTSSTFSPPSPYSPPN
Rn 501 ---SVLVTAALKALTNSDLRPTQPKPSSAPVLGPCSPFVKAPYSPGRTARADLRKASSTFSPPSPYSPPN
Gg 487 PCASFLINTGKTGTNSDL SKVPQRPNPAQLGCSPSPFSKLPYSP-KVARAEHKKLNSNSSSFPYSPTN
Xt 445 SSYALLVGKLNKTTNADSVKIAPK SNAVITEESCGSLTKLTFSSPIKNARTMONKSHLGSPLATSLTN
Dr 481 PN-FLALTRAASVASTESPKVSHKMGHGLAETP- PSSSKPPFSPVKTSRPEPRRAHSCSSP LLLFN PAN

: : ***** : * : ***** : * : * : * : * : : : : * : * : * :
Hs 437 SRPLSPLDELASL FNSGRSVLRKSAAGRKIREAEGFETNMNISRDDPSTSEITSETQDRNANNHGTQ
Mm 574 SRPLSPLDELASL FNSGRSVLRRSAVGRRIREAEGFETNMNLSRDEPSSSEMASETQDRNANNHGTQ
Rn 566 SRPLSPLDELASL FNSGRSVLRRSAVGRRIREAEGFETNMNLSRDEPSSSEMASETQDRNANNHGTQ
Gg 554 SRSLSPLDELASL FNSGRSVLRKSAAGRKIREPEGGETNLRNLSREDPNASDTGSETQDKNANNHGTQ
Xt 513 ISHITSPLELITTLFSSGRSLLRKSAAGRKIREQEGVEMNLNVCGGEDVAMP----DTQDNANNQDNR
Dr 547 GRPLTSPLELNTIFSSGRSLLRKSTTGKIRDSGLSNSNINLPGREDQGPISPSAQLQDKNANNHTSP

. * . ***** : ** . : : : : *
Hs 505 LNSLS SAITAENGNSISNGLPEEDGYSRLSISGTGTSTFQRHRDSHTTQVIHQRLSENESVALQELL
Mm 642 LSSSLSSDVTAENGNPVTNGLAEDDGCSRLCLSGMGTSSFQRNRESHTTQVIHQRLSENESVALQELL
Rn 634 LSSSLSSVVAEAENGNPVTNGLAEDDGCSRLCLSGMGTSSFQRNRESHTTQVIHQRLSENESVALQELL
Gg 622 SSNPLSSSVTAENGNVSNGVPEENEYSRLSASTTAGSSIQRHRESHTTQVIHQRLSENESVALQELL
Xt 577 GPNSRSSCAAFENGNSVTNG-----EYFTLENYCTKKIRNKRKNFFFOVIHQRLSKNESAAALQELM
Dr 615 NS---SNPAPIENGNQISNGTLEDEGHKPMAS--SSSTLHRHMSHTQ-----

Hs 573 DWRRKLC EEGQDWQQLLHHAEP--RVPPPPCKKPSLLKKPEGASCNRLPSELWDTTI
Mm 710 DWRRKLC EAREGWQEALQHPEP--RAPPPPPCKKPTLLKKPEGGSCTRLPSQLWDSSM
Rn 702 DWRRKLCESREGWQEAMQHPEP--RAPPPPPCKKPTLLKKPEGGSCTRLSSQLWDSSI
Gg 690 DWRRKLC EEREDWQQLHNTEQRITAPPPPPCKKPTLLKKVEDASCNRLSSGIWDTTM
Xt 638 DWRRKLC EGNGEWQTEQRNSAS-----THSS-----
Dr 659 -----

```

12. ábra. Myo16Tail szekvencia konzerváltságának vizsgálata gerinces osztályok képviselőiben. Az elemzéshez az UniProt fehérje adatbázisban található szekvenciákat használtuk: *Homo sapiens* (Hs): Q9Y6X6, *Mus musculus* (Mm): Q5DU14, *Rattus norvegicus* (Rn): Q9ERC1, *Gallus gallus* (Gg): XP_416950.3, *Xenopus tropicalis* (Xt): A0A5G3IJG7, *Danio rerio* (Dr): F1QE80. A különböző szintű

aminosav konzerváltság jelölésére különféle árnyékoltságot és jelöléseket használtunk: fekete (100%) – teljes konzerváltság (*), sötétszürke (80%) – erős hasonlóság (:) és világosszürke (60%) – gyenge hasonlóság (.). A piros nyilak a PhosphoSitePlus programmal vizsgált lehetséges foszforilációs helyeket jelölik. Az ismert motívumokat színes kerettel jelöltük: az IQ szürke, az NHM narancssárga, míg a prolin-gazdag régió zöld színnel keretezve.

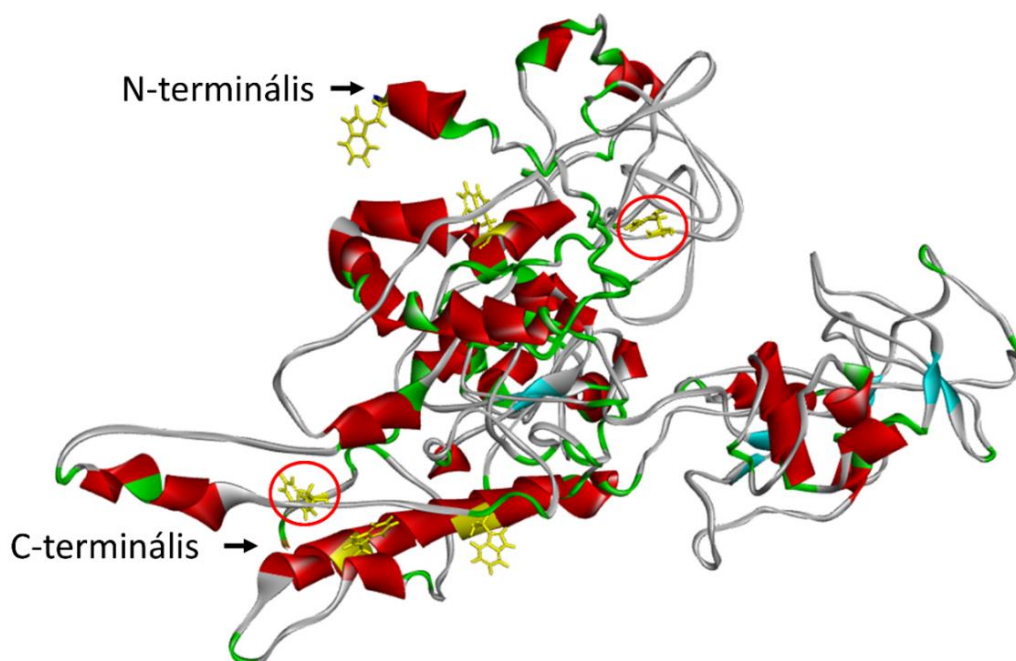
Myo16Tail szekvencia összehasonlítás gerinces fajokban	
Szekvencia összehasonlítás	Szekvencia egyezés (%)
Teljes szekvencia homológia	47
Teljes konzerváció (*)	26,5
Erős hasonlóság (:)	12,9
Gyenge hasonlóság (.)	7,8
IQ azonosság	86
NHM azonosság	49
Prolin-gazdag motívum azonosság	2,4

3. táblázat. Myo16Tail szekvencia homológia összefoglalása. A táblázat tartalmazza a különböző aminosav konzerváltsági szintek eloszlását a teljes szekvencia esetében, valamint az ismert motívumokra lebontva százalékos értékben.

4.1.5 Myo16Tail szerkezet modellezése

A bioinformatikai szekvencia analízisek alapján a Myo16Tail szerkezete nagyfokú rendezetlenséget mutat, habár kísérleteken alapuló szerkezeti adatok nem állnak még rendelkezésünkre. Ezért az aminosav szekvencia alapján I-TASSER (Iterative Threading Assembly Refinement) [174,189] programmal modelleztük a Myo16Tail lehetséges szerkezetét (**13. ábra**). A szerkezeti modell eredményeinket összehasonlítottuk a szekvencia elemzésekkel, amelyek között összhang mutatkozott. A szerkezeti modell alapján a Myo16Tail tartalmaz lehetséges α -helikális és β -lemez másodlagos szerkezeti elemeket, valamint rendezetlen szerkezetű régiókat. A szerkezeti modell jóságát a program megbízhatósági indexel jellemez, mely az általunk generált modell esetében -1,95 volt. A megbízhatósági index széles tartományban mozoghat (-5, +2). Minél magasabb az index értéke, annál nagyobb a szerkezeti modell jósága. Figyelembe véve a szerkezeti rendezetlenséget és a másodlagos szerkezeti

elemek jelenlétét a modellben feltételezzük, hogy a Myo16Tail fehérje fragmentum szerkezete leginkább a molten globula, részben rendezetlen szerkezeti állapotnak felel meg. A molten globula fehérje szerkezet egy kevésbé kompakt, inkább flexibilis és dinamikus fehérje konformációt takar [190].



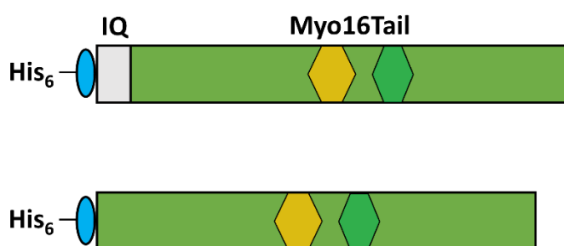
13. ábra. A Myo16Tail egy feltételezett háromdimenziós szerkezeti modellje I-TASSER szerkezeti analízis alapján. Az α -helikális (piros), a β -lemez (ciánkék) másodlagos szerkezeti elemek, valamint a fordulat (zöld) és a rendezetlen elemek (szürke) színekkel vannak jelölve [174]. A piros körök a feltételezett rendezetlen régiókban előforduló triptofán aminosavakat jelölik.

4.2 MYO16TAIL ELŐÁLLÍTÁSA

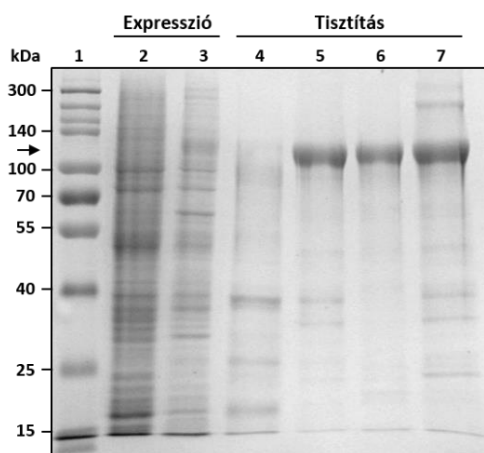
A hat hisztidin (His_6) aminosavval fuzionált rekombináns Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) fragmentumokat (**14. A ábra**) a klónozást követően bakulovírus/Sf9 rendszerben termeltettük. Az Sf9 sejtekben történő fehérje expressziót előre optimalizált koncentrációjú bakulovírus hozzáadásával indukáltuk. Az Sf9 kultúrát három nap után lecentrifugáltuk és a sejt pelletet folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd további felhasználásig $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltuk. A Myo16Tail feltárás során az Sf9 sejtlyúzátum centrifugálását követően a rekombináns fehérje fragmentum jelentős része a pellet frakcióban ülepedett. Az alacsony szolubilitás végett csak denaturáló módszerrel (GuHCl, urea) sikerült oldható állapotban tartani a Myo16Tail-t. A Myo16Tail fehérjét 6 M GuHCl-el denaturáltuk, majd szolubilis formában His_6 affinitás szekvencián keresztül nikkell gyöngyökhöz kötöttük egész éjszakán át történő kevertetés során.

Először átfolyattuk a GuHCl-t tartalmazó puffer oldatot a nikkell gyöngyökön, majd 8 M ureát tartalmazó csökkenő pH sorral mostuk és eluáltuk a Myo16Tail-t (pH 7 mosó puffer, pH 6 és pH 4 eluáló puffer). Ezt követően háromlépcsős dialízis során renaturáltuk a Myo16Tail-t. A dialízis után a mintát koncentráltuk és végül egy tisztító centrifugálást követően jégen tároltuk a felhasználásig. A Myo16Tail -80 °C-on tárolása nem lehetséges, mert a felolvasztást követően a mintában precipitáció jeleit figyeltük meg már alacsony fordulatszámú centrifugálás (75 g) hatására. A fehérje expresszió és a tisztítás során vett mosó és eluáló frakciókból mintát vettünk és SDS-poliakrilamid gélen elektroforetizáltuk, valamint a fehérje tisztítást anti-His Western blot módszerrel is megerősítettük (**14. B és C ábra**). Minimális mennyiségű szennyező fehérjék a preparálás végén jelen voltak, viszont ezeket további tisztító lépésekkel (ion grádiens, gélszűrés, imidazol koncentráció grádiens) sem sikerült teljesen eliminálni. A tisztítási folyamat végén átlagosan ~20 µM (~1,7 mg/ml) koncentrációjú fehérjét sikerült előállítani. A Myo16Tail jégen tárolva átlagosan két hétig stabil maradt és degradáció jele nem volt megfigyelhető.

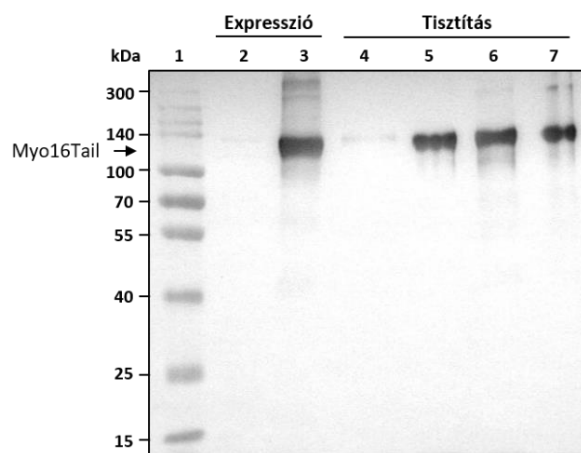
A



B



C



14. ábra. A Myo16Tail előállításának és tisztításának lépései elektroforetikus vizsgálattal. (A) A His₆ affinitás szekenciával (kék) jelölt rekombináns Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) konstrukció

sematikus ábrázolása. A sárga és a sötétzöld jelölés az NHM és a prolin-gazdag motívumot jelöli. **(B)** A Myo16Tail expresszió és tisztítás lépéseit 10%-os SDS-poliakrilamid gélen vizsgáltuk. A fehérje tisztítás denaturáló körülmények között zajlott (6 M GuHCl), valamint a mosó és elúciós lépések 8 M urea csökkenő pH grádienssel történtek. A minták az elektroferogrammon a következők: fehérje marker (1), negatív kontrollként használt Sf9 teljes sejtlizátum (2), Myo16Tail expresszált teljes sejtlizátum (3), a denaturáló feltárás 8 M ureát tartalmazó pH 7 mosó frakciója (4), az eluálás lépései csökkenő 8 M urea pH 6 és pH 4 grádienssel (5, 6), koncentrált és tisztított Myo16Tail (7). **(C)** A fehérje fragmentum előállításának lépéseit anti-His Western blot segítségével is megerősítettük. A Myo16Tail elúciós lépéseit és a koncentrált elektroforézishez használt mintát (5, 6, 7) ötszörösre hígítottuk a kemilumineszcens előhívás túlexponáltság elkerülése végett. A nitrocellulóz membránról az előhívás előtt (fehérje marker látható) és utána is készítettünk felvételt. Végül a két felvételt egymásra vetítettük a fehérje minták méretének könnyebb meghatározása érdekében.

A két rekombináns Myo16Tail konstrukció molekulatömegét ExPasy ProtParam [191] segítségével számítottunk (Myo16Tail, MW: 86,47 kDa; Myo16Tail (-IQ), MW: 81,99 kDa), viszont a gél elektroforézis során abnormális elektroforetikus fehérje migrációt figyeltünk meg (**14. B ábra**). A Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) látszólagos molekulatömege magasabban, ~120 kDa körül adódik, ami az SDS és a fehérje molekulák gyenge interakciójából adódhat. Ez az eltérő elektroforetikus migráció alapvetően az irreguláris aminosav összetételből következik, ami a rendezetlen fehérjékre jellemző [137,164]. Az SDS gél elektroforézis az első kísérleti indikáció, amely alapján feltételezhetjük, hogy a Myo16Tail szerkezete rendezetlen.

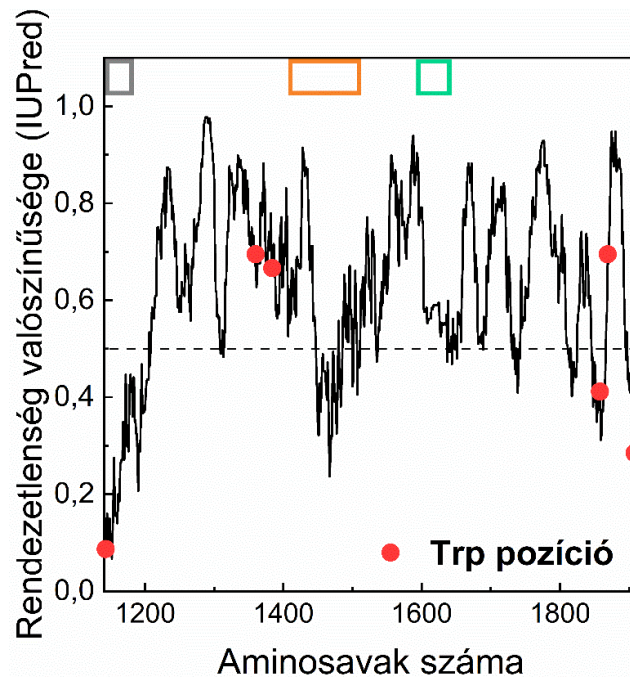
4.3 MYO16TAIL SZERKEZETÉNEK KARAKTERIZÁLÁSA

4.3.1 Myo16Tail konformációs tulajdonságainak vizsgálata

A bioinformatikai szekvencia analízis megerősítéséhez a kísérletek nagy részében triptofán fluoreszcencián keresztül vizsgáltuk a Myo16Tail szerkezeti sajátosságait. A Myo16Tail rekombináns fragmentum hat triptofán aminosavat tartalmaz. Ezek közül három a rendezett régiókban található, míg a további három triptofán a rendezetlen régiókban a rendezetlenségi valószínűség predikció alapján. Mindössze egy triptofán helyezkedik el az IQ motívum közelében, két triptofán a rendezetlen NHM régióban, valamint a fennmaradó három triptofán pozíciója nem köthető ismert szekvencia motívumokhoz (**15. ábra**).

A triptofán aminosavak, mint belső fluorofórok érzékenyek a lokális környezeti változásokra [192]. Ezért triptofán fluoreszcencia méréseken keresztül információt nyerhetünk a fehérje konformációjáról a hullámhossz függvényében. Ha a triptofánok a fehérje hidrofób

magjában találhatóak, akkor a fluoreszcencia emisszió maximális hullámhossza ~320 nm is lehet. Ezzel szemben, mikor a triptofánok flexibilis fehérje régiókban találhatóak és az oldat számára hozzáférhetőek, akkor a maximális hullámhossz vörös eltolódása figyelhető meg, ami 350 nm felett is detektálható [193]. Speciális esetekben különböző triptofán rotamerek találhatóak a fehérjében (rotációs konformációs izomerek), továbbá a fluoriméter monokromátorok hullámhosszra adott választól és a detektoroktól függően a maximális emissziós hullámhossz tovább is tolódhat ~360 nm fele [193,194].



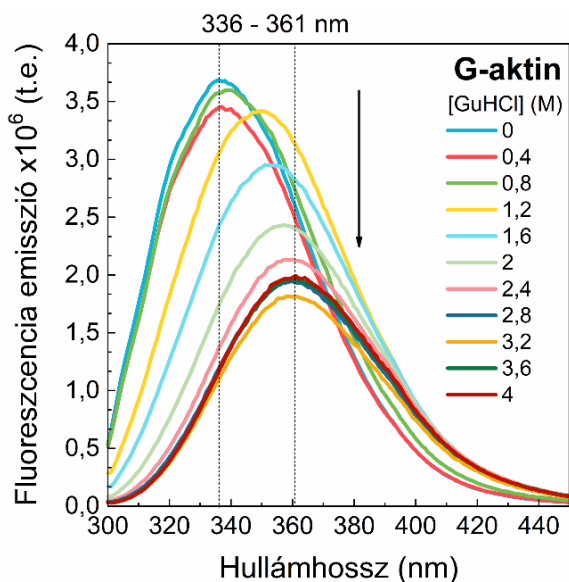
15. ábra. Myo16Tail triptofán aminosavak pozíciója a rendezetlen szerkezet valószínűségének függvényében. Az ismert motívumok színes téglalapokkal jelölve: IQ (szürke), NHM (narancssárga), prolin-gazdag régió (zöld). A triptofán aminosavak pozícióját piros pont jelöli.

A kísérletek során először a Myo16Tail triptofán fluoreszcencia emissziójának változását tanulmányoztuk növekvő GuHCl koncentráció jelenlétében. A mérésekhez G-aktin fehérjét használtunk kontrollként. A G-aktinban található négy triptofán pozíciója és a fehérje másodlagos és harmadlagos szerkezete is jól ismert [195,196]. A kontroll mérés esetében a G-aktin fluoreszcencia intenzitása ~38%-kal csökkent, és a maximális hullámhossz 25 nm vörös eltolódást mutatott 336-361 nm között (**16. A ábra**).

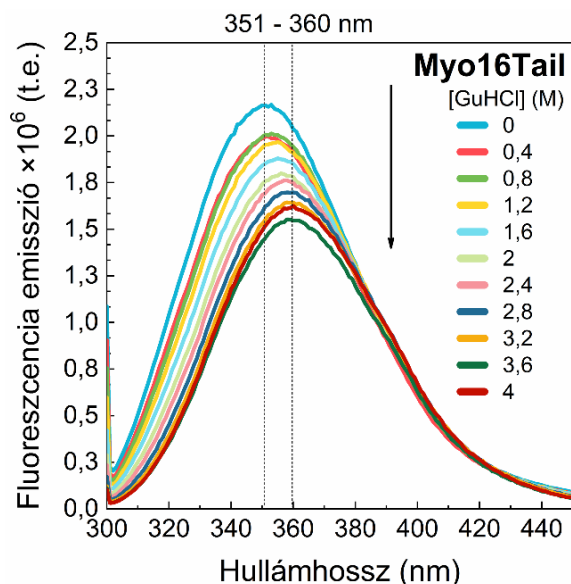
A Myo16Tail triptofán fluoreszcencia emisszió maximális hullámhossza a mérés során denaturáló ágens hiányában ~351 nm volt, valamint a fluoreszcencia intenzitásának csökkenése is kevésbé volt kifejezett (~27%). Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a triptofánok nagyobb mértékben hozzáférhetőek a natív Myo16Tail fehérjében, mint a G-aktin esetén. A

GuHCl koncentráció növelésével a Myo16Tail szerkezet csekély mértékben változott, mindössze 9 nm vörös spektrális eltolódás volt megfigyelhető 351-360 nm között (**16. B ábra**).

A



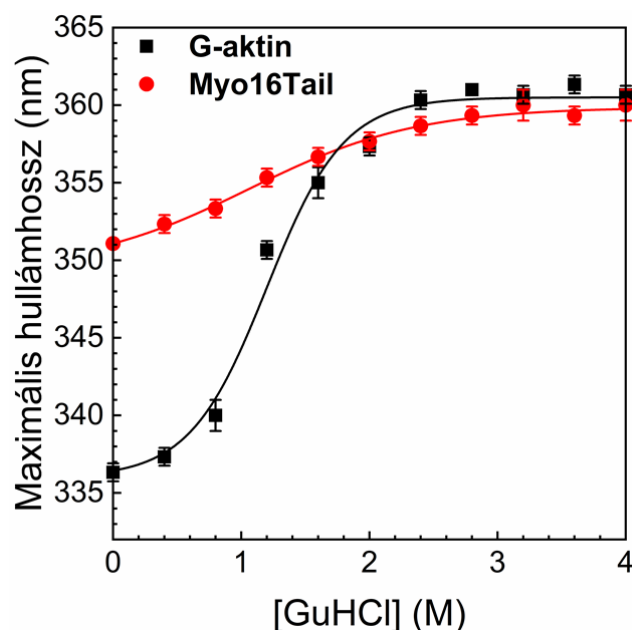
B



16. ábra. Fehérje konformációs átmenetek vizsgálata triptofán fluoreszcencia emisszió segítségével.

A fehérje kitekeredési kísérletek növekvő GuHCl koncentráció jelenlétében zajlottak. A triptofán aminosavak gerjesztése 295 nm-en történt, majd a fluoreszcencia emissziót 300-450 nm között detektáltuk. **(A)** A kontroll G-aktin fluoreszcencia emissziója 25 nm vörös eltolódást mutatott 336-361 nm között. **(B)** Ezzel szemben a Myo16Tail konformációs változása 351-360 nm között mindössze 9 nm spektrális eltolódást eredményezett. Az eredmények három mérés átlagát mutatják (n=3).

A maximális hullámhossz GuHCl koncentráció függése tovább erősíti ezt a feltételezést (**17. ábra**). Az ábrán jól látható a kontroll G-aktin és a Myo16Tail konformációs átmeneteinek eltérő karakterisztikája. A G-aktin denaturáció során a maximális hullámhosszváltozás meredek szigmoid tendenciát mutat, ami kooperatív konformációváltozásra utal. Ezzel szemben a Myo16Tail konformációváltozásában a kooperativitás hiánya figyelhető meg és csak enyhe szigmoid változást láthatunk a maximális hullámhossz értékekben (**17. ábra**). A fehérje feltekeredés vagy kitekeredés kooperativitása jól jellemzi a másodlagos és harmadlagos szerkezet kölcsönhatásainak változásait. A nagyfokú kooperativitás a globuláris, rendezett fehérje szerkezetre utal, míg az alacsony kooperativitás rendezetlen, flexibilis szerkezetet feltételez [197,198].



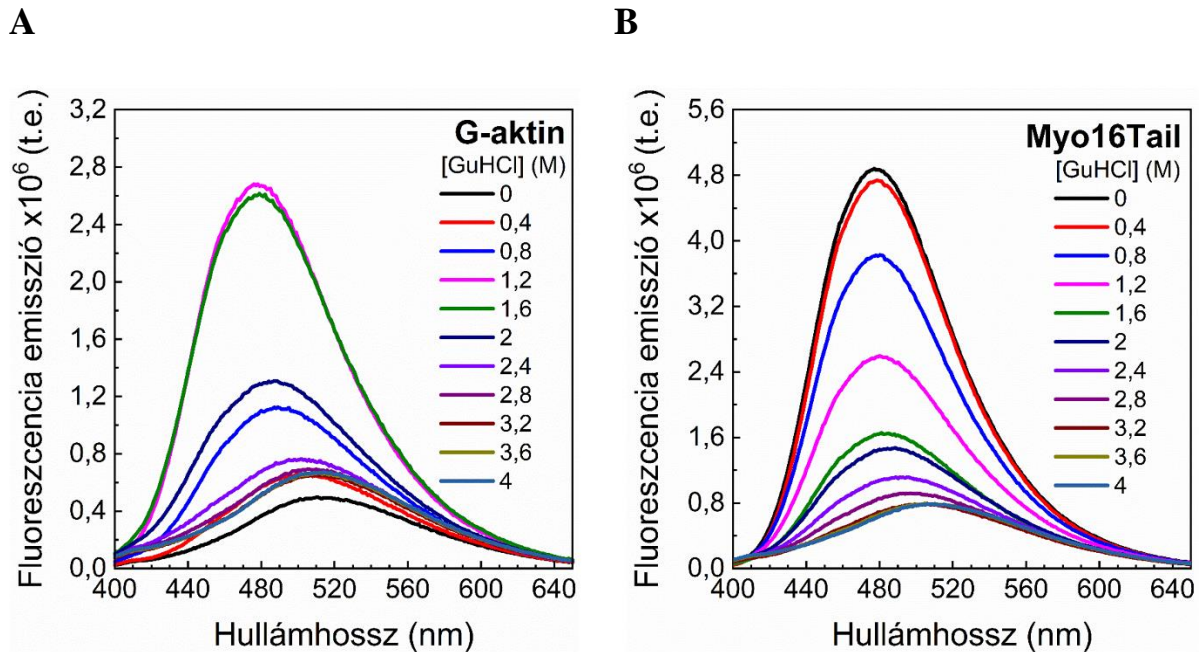
17. ábra. Fehérje kitekeredés konformációs átmeneteinek kooperativitása a triptofán fluoreszcencia emisszió maximális hullámhosszának függvényében. A spektrumok maximális hullámhossz értékeit ábrázoltuk a GuHCl koncentráció függvényében. Az adatpontokra Boltzmann függvényt illesztettünk (1. egyenlet). Az eredmények három mérés átlagát mutatják ($n=3$, átlag \pm SD).

A Myo16Tail konformációs sajátosságainak további tanulmányozása érdekében 1-anilino-8-naftalin szulfonát (ANS) alapú fluoreszcencia emissziós kísérleteket végeztünk. Az ANS eltérő módon képes kötődni a fehérjék különböző konformációihoz és alkalmas a molten globula konformációs állapot specifikus karakterizálására [199]. Az ANS fluoreszcencia intenzitás változása és a spektrális eltolódás növekvő GuHCl hozzáadására tükrözi a fehérje konformáció mikrokörnyezetének változását (rendezett szerkezet – hidrofób, rendezetlen – poláros környezet). Az ANS maximális fluoreszcencia intenzitása (kötés telítődés) kifejezetten a molten globula konformációs állapot esetén jellemző, az alacsony ANS intenzitás pedig a rendezett vagy a teljesen kitekeredett fehérjeszerkezetet reprezentálja [199].

Az ANS fluoreszcencia kísérletek első felében kontroll méréseket végeztünk G-aktin fehérjével GuHCl hiányában és jelenlétében. A kezdeti G-aktin ANS fluoreszcencia emisszió GuHCl hiányában a legalacsonyabb volt, viszont 1-2 M GuHCl koncentráció tartományban az ANS emisszió megnövekedett, ami a fehérjeszerkezet részleges kitekeredésére utal, azaz a molten globula konformációs átmenet jelenlétére (**18. A ábra**). Magasabb GuHCl koncentráción (2-4 M) az ANS emisszió újra lecsökken, ahogy a G-aktin szerkezete teljesen denaturálódik. A kontroll G-aktin ANS fluoreszcencia eredmények összhangban vannak a

fehérje kétfázisú konformációs változásával [200].

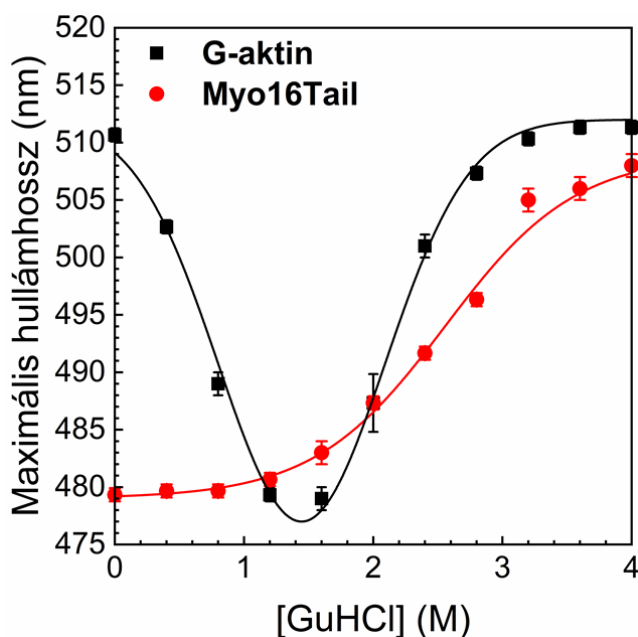
A Myo16Tail ANS fluoreszcencia intenzitása GuHCl hiányában volt a legmagasabb, majd növekvő GuHCl koncentráció függvényében fokozatosan csökkent (**18. B ábra**). A Myo16Tail kezdeti magas ANS intenzitása arra utal, hogy natív állapotban feltehetően molten globula konformációval rendelkezik.



18. ábra. Fehérje konformációs átmenetek vizsgálata ANS fluoreszcencia emisszióval. Az ANS gerjesztése 360 nm-en történt, míg az fluoreszcencia emissziót 400-650 nm között detektáltuk. **(A)** A G-aktin ANS fluoreszcencia kísérletek alapján az intenzitása 1-2 M GuHCl koncentráció tartományban volt a legmagasabb, mely utal a kezdeti nem-poláris fehérjeszerkezet kitekeredésére és molten globula konformációs átmenet jelenlétére (poláris mikrokörnyezet). **(B)** A Myo16Tail ANS fluoreszcencia mérések során GuHCl hiányában mértük a legmagasabb ANS fluoreszcencia intenzitást, majd folyamatosan csökkent egyre növekvő GuHCl koncentráció mellett. Ezek alapján a Myo16Tail natív konformációja megfeleltethető a molten globula állapotnak. A kísérletek során három mérést végeztünk (n=3).

Az ANS fluoreszcencia emissziós spektrumok adatai alapján ábrázoltuk a maximális ANS intenzitáshoz tartozó hullámhossz értékeket a GuHCl koncentráció függvényében. A G-aktin ANS mérések során a maximális ANS intenzitáshoz tartozó hullámhossz kétfázisú, kooperatív kitekeredést feltételez, valamint 1-2 M GuHCl koncentráció tartományban a maximális ANS hullámhossz (~480 nm) a molten globula konformációs állapot jelenlétére utal. Ehhez képest a Myo16Tail maximális ANS intenzitáshoz tartozó hullámhosszt 480 nm-en

detektáltuk GuHCl hiányában, ami egybeesik a G-aktin molten globula konformációs átmenetének tartományával (1-2 M GuHCl, ~480 nm). Továbbá a Myo16Tail esetében fokozatos, enyhe szigmoid átmenet figyelhető meg a fehérje kitekeredése során, ahogy emelkedik a GuHCl koncentráció (**19. ábra**). Tehát a Myo16Tail gyengén kooperatív denaturációt mutat és a maximális ANS intenzitáshoz tartozó ~480 nm hullámhossz is arra utal, hogy a Myo16Tail molten globula konformációval rendelkezik natív állapotban.



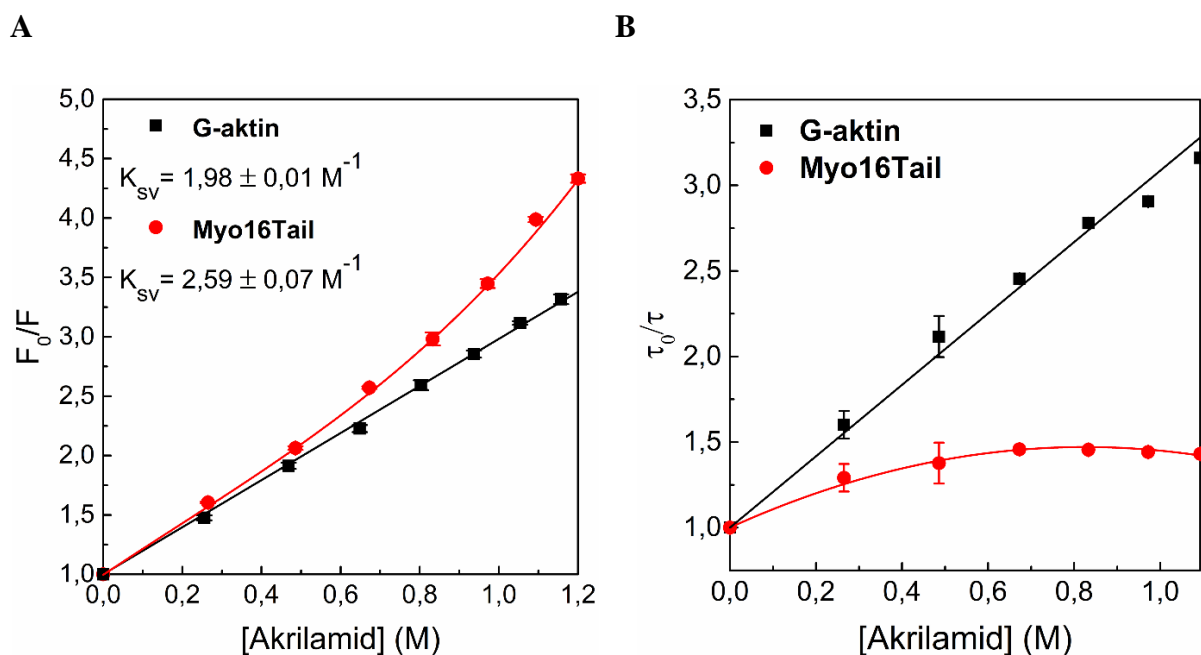
19. ábra. Fehérje konformációs átmenetnek kooperativitása az ANS fluoreszcencia függvényében.

Az ANS fluoreszcencia emissziós spektrumok maximális intenzitáshoz tartozó hullámhossz értékeit ábrázoltuk növekvő GuHCl koncentráció függvényében. A G-aktin maximális ANS hullámhossz kooperativitásra jellemző változást mutatott a kitekeredés során. A G-aktinhoz tartozó adatpontokra Gauss függvényt illesztettünk (2. egyenlet). A Myo16Tail maximális ANS hullámhossz változás viszont alacsony kooperativitást mutatott, ami a kismértékű konformáció változásra utal a kitekeredés során. A Myo16Tail adatokra Boltzmann függvényt illesztettünk (1. egyenlet). A kísérletek során végzett három mérés adatait átlagoltuk ($n=3$, átlag \pm SD).

4.3.2 Myo16Tail triptofán hozzáférhetőség vizsgálata

A triptofán hozzáférhetőség további vizsgálatához triptofán fluoreszcencia kioltás kísérleteket végeztünk, ami egy széles körben alkalmazott módszer a fehérjeszerkezet és konformációs dinamikai tulajdonságok jellemzéséhez [201,202]. A kontroll G-aktin és Myo16Tail steady-state triptofán fluoreszcencia emisszió kioltását akrilamid segítségével végeztük. A Stern-Volmer egyenlet alapján ábrázoltuk és meghatároztuk a Stern-Volmer

együtthatókat. A G-aktin kontroll mérésnél alacsonyabb ($K_{sv}=1,98 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}$), míg a Myo16Tail esetében magasabb Stern-Volmer együtthatókat kaptunk ($K_{sv}=2,59 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}$), ami utal a Myo16Tail nagyobb triptofán hozzáférhetőségére és a dinamikus konformáció változására (20. A ábra). Megfigyelhető, hogy a Myo16Tail esetében a Stern-Volmer féle ábrázolás eltér a lineáristól és jobb illesztést kaphatunk, ha quadratikusan polinomot illesztünk a felfelé görbülő tendenciát mutató adatpontokra (20. A ábra). A Myo16Tail fluoreszcencia emisszió kioltás lineáris tendenciától való eltérése arra utal, hogy nem csak dinamikus kioltás történt, hanem statikus kioltás is jelen volt. A statikus komponens jelenléte magyarázható az úgynevezett „sötét komplex” kialakulásával, ami során az akrilamid kioltó molekula nemfluoreszcens komplexet alkot a triptofán intrinzik fluorofórokkal [203]. A „sötét komplexek” nem gerjeszthetők, mivel a fluorofórok gyors hozzáférhetősége miatt még a gerjesztés előtt megtörténik a kioltás, így a „sötét komplexek” nem járulnak hozzá az időfüggő fluoreszcencia spektroszkópai mérések során végzett triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás eredményekhez.



20. ábra. Triptofán hozzáférhetőség vizsgálata fluoreszcencia kioltás kísérletekkel. (A) Triptofán fluoreszcencia emisszió kioltása akrilamid kioltó segítségével. Az adatokat a klasszikus Stern-Volmer egyenlet segítségével illesztettük és meghatároztuk a K_{sv} értékeket (\pm SD) (az illesztett egyenes meredeksége). (B) Triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás vizsgálata időfüggő spektroszkópai módszerrel. Az adatokat a fluoreszcencia élettartamra vonatkoztatott Stern-Volmer egyenlet alapján illesztettük. Az eredményeket három mérést követően átlagoltuk ($n=3$, átlag \pm SD).

Akrilamid	G-aktin		Myo16Tail	
c (M)	τ (ns)	\pm SD	τ (ns)	\pm SD
0	3,6	0,00	4,1	0,00
0,26	2,2	0,08	3,2	0,08
0,48	1,7	0,12	3,0	0,12
0,67	1,4	0,00	2,8	0,00
0,83	1,3	0,01	2,8	0,01
0,97	1,2	0,01	2,8	0,01
1,09	1,1	0,01	2,9	0,01

4. táblázat. Triptofán fluoreszcencia élettartam az akrilamid koncentráció függvényében. Az eredmények három mérés átlagát mutatják (n=3).

A triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás mérések esetében a „sötét komplex” kialakulása nem befolyásolja a fluoreszcencia élettartamot. Abban az esetben, ha csak statikus kioltás – és „sötét komplex” formálás – történik a τ_0/τ Stern-Volmer ábrázolás vízszintes, egyenes vonalat eredményezne. Dinamikus kioltás esetén a steady-state mérésekhez hasonlóan egy K_{sv} meredekségű egyenest várnánk. A triptofán fluoreszcencia kioltásban szerepet játszó statikus komponens jelenlétének további vizsgálatához időkorrelált egy foton számlálás módszerén alapuló kísérleteket végeztünk. A kontroll G-aktin triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás Stern-Volmer féle ábrázolása lineáris, ami alapján arra következtethetünk, hogy a kioltás dinamikus (**20. B ábra; 4. táblázat**). A kontroll G-aktin triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás esetében az átlagos triptofán fluoreszcencia élettartam lineáris csökkenést mutat a növekvő akrilamid koncentráció függvényében (**20. B ábra; 4. táblázat**).

A kontroll mérésekkel ellentétben a Myo16Tail triptofán fluoreszcencia kioltás Stern-Volmer τ_0/τ értékei enyhe emelkedést mutattak 0,5 M akrilamid koncentrációig, ezt követően viszont a Stern-Volmer ábrázolás ellaposodó tendenciát mutat (**20. B ábra**). Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a dinamikus kioltás mellett a statikus komponens is jelentősen mértékben hozzájárul a Myo16Tail triptofán fluoreszcencia kioltáshoz. A triptofán fluoreszcencia élettartam átlag értékeket vizsgálva látható, hogy az élettartam meredeken csökken 4,1-3,12 ns között 0,26 M akrilamid hozzáadására. Magasabb akrilamid koncentráción

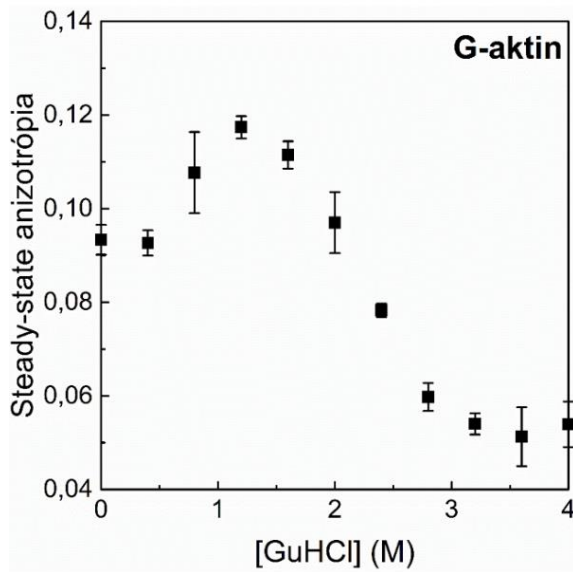
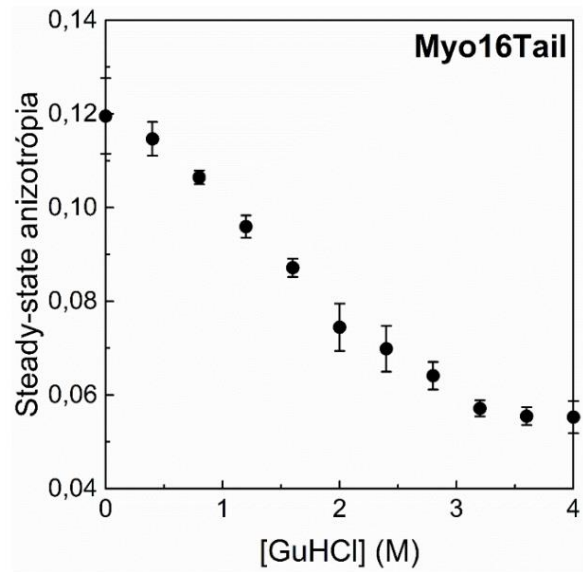
(0,48-1,09 M) viszont az átlagos triptofán fluoreszcencia élettartam csak kis mértékben változik (~2,8 ns) (**4. táblázat**).

Tehát az időkorrelált triptofán fluoreszcencia kioltás mérések során a növekvő akrilamid koncentráció hatására csökkenő Myo16Tail triptofán fluoreszcencia intenzitást eredményezett, amely arra utal, hogy 0,5 M akrilamid koncentráció felett a triptofánok „sötét komplexet” alkotnak a kioltó molekulákkal. A kioltásos kísérletek arra engednek következtetni, hogy a Myo16Tail szerkezetében található triptofánok jelentős mértékben hozzáférhetőek az oldat és az akrilamid számára.

4.3.3 Myo16Tail szerkezeti kooperativitása

Tovább vizsgálva a Myo16Tail konformációs tulajdonságait steady-state triptofán anizotrópia, időkorrelált triptofán élettartam, valamint anizotrópia lecsengés méréseket végeztünk GuHCl hozzáadásával. Először steady-state triptofán fluoreszcencia anizotrópia kísérletekben hasonlítottuk össze a kontroll G-aktin és a Myo16Tail anizotrópia sajátságait növekvő GuHCl koncentráció függvényében (**21. A, B ábra**). A kontroll esetben kétlépcsős triptofán anizotrópia változás figyelhető meg a GuHCl függvényében. Az első fázisban, alacsony GuHCl koncentráción az anizotrópia növekszik, ami a G-aktin natív szerkezetből inaktív állapotba történő konformációs átmenetét jelzi. Ezt követően egy meredek anizotrópia csökkenés következik be, amikor az inaktív G-aktin denaturálódik, utalva a fehérje kitekeredés kooperatív jellegére (**21. A ábra**). A G-aktin triptofán fluoreszcencia anizotrópia kísérleteink összhangban vannak korábban leírt eredményekkel [200].

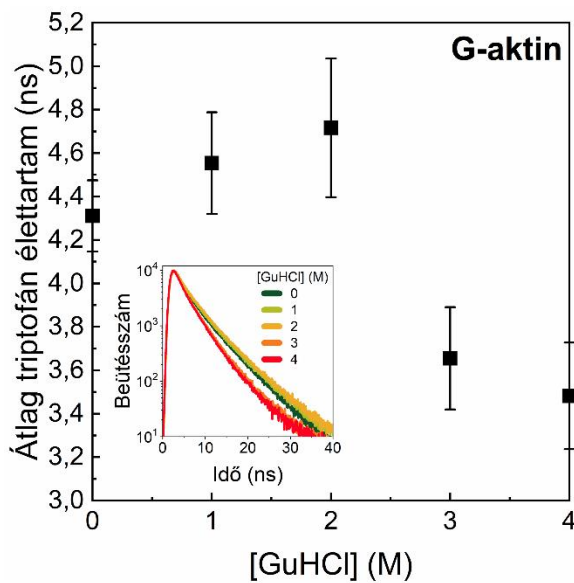
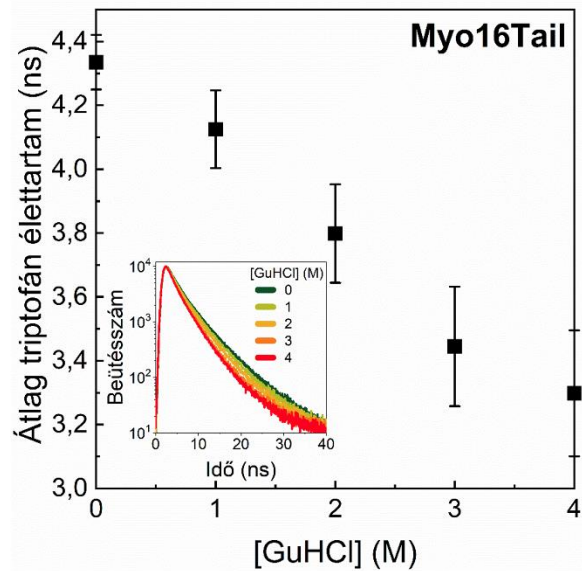
A Myo16Tail triptofán fluoreszcencia anizotrópia egyfázisú, monoton csökkenést mutatott a GuHCl koncentráció függvényében, hasonlóan a fluoreszcencia emissziós eredményekhez (**16. A, B; 17. ábra**). Az gyengén kooperatív denaturációra utaló tendencia [204], ami a maximum hullámhossz és az anizotrópia eredményeknél is megfigyelhető tovább erősíti a Myo16Tail feltételezett rendezetlen szerkezeti sajátságaira vonatkozó elképzeléseinket.

A**B**

21. ábra. Konformációs átmenetek vizsgálata steady-state anizotrópiával. (A) Kontroll G-aktin és **(B)** Myo16Tail triptofán anizotrópia növekvő GuHCl koncentráció függvényében. A triptofán gerjesztés 295 nm-en, míg az emisszió detektálás 350 nm-en történt. A mérések során az adatokat átlagoltuk ($n=3$, átlag \pm SD).

4.3.4 Myo16Tail konformációs dinamikája

A továbbiakban időkorrelált egyfoton számlálás módszerével vizsgáltuk a fehérjék konformációs dinamikáját triptofán élettartam és anizotrópia lecsengés kísérleteken keresztül növekvő GuHCl koncentráció függvényében. Az átlag triptofán fluoreszcencia élettartamot ábrázolva hasonló kétfázisú tendenciát kaptunk a kontroll G-aktin esetében, valamint fokozatos egyfázisú csökkenés figyelhető meg a Myo16Tail adatokban a GuHCl denaturáció hatására (**22. A, B ábra; 5. táblázat**), úgy mint a steady-state anizotrópia méréseknél (**21. A, B ábra**).

A**B**

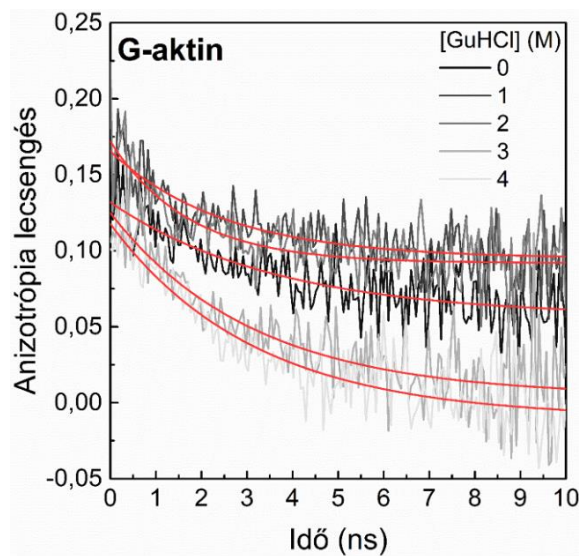
22. ábra. Konformációs átmenetek vizsgálata triptofán élettartam mérésekkel időkorrelált egy foton számlálás módszerével. (A) Kontroll G-aktin és **(B)** Myo16Tail triptofán fluoreszcencia élettartam növekvő GuHCl koncentráció függvényében. Az időfüggő nyers élettartam lecsengési adatokat a beillesztett ábrák mutatják. A triptofán aminosavak gerjesztése 295 nm-en, míg a fluoreszcencia jel detektálása 350 nm-en történt. A kísérletek során három mérést végeztünk és ezeket átlagoltuk ($n=3$, átlag \pm SD).

Időfüggő triptofán anizotrópia lecsengés kísérletekkel tovább vizsgáltuk a Myo16Tail konformációs dinamikai jellegzetességeit. A 42 kDa molekula tömegű kontroll G-aktin triptofán rotációs korrelációs idők változása hasonló tendenciát mutatott a triptofán élettartam mérésekben megfigyeltekhez, amit magyarázhat a fehérje két, egymást követő konformációs átmenete a denaturáció során (**23. A ábra; 5. táblázat**). A kontroll mérés során kapott G-aktin triptofán rotációs korrelációs idők összhangban vannak a korábban leírt eredményekkel [205]. A G-aktin triptofán rotációs korrelációs idő ~ 26 ns volt a denaturáló ágens hiányában, amely a GuHCl hozzáadásra csökkenő tendenciát mutatott (**23. A ábra; 5. táblázat**). A rotációs korrelációs idők a fehérje egészének mozgását reprezentálják. A csökkenő rotációs korrelációs idők a megnövekedett triptofán mobilitásra utalnak az adott fehérje szegmensben, ami a fehérje denaturáció következménye (**5. táblázat**).

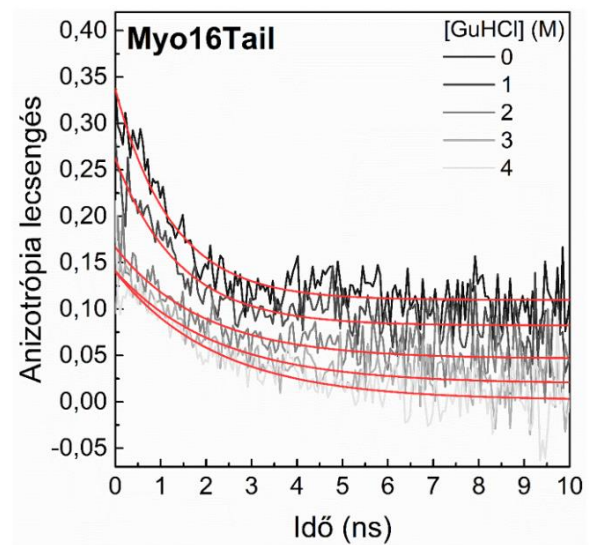
A Myo16Tail anizotrópia lecsengése különbözik a kontroll mérésektől. Az adatokra két exponenciális függvényt illesztve két komponens figyelhető meg a triptofánok forgásában. A GuHCl hiányában egy gyors ~ 1 ns és egy lassú ~ 33 ns rotációs korrelációs komponens

határoztunk meg (**23. B ábra; 5. táblázat**). A gyors komponens a triptofán aminosavak saját forgására utal és nem jelenik meg a G-aktin esetében, mivel a triptofánok a globuláris fehérje szerkezetben együtt forognak a fehérjével. A Myo16Tail esetén mért lassabb kezdeti ([GuHCl] = 0 M) rotációs korrelációs idő (~33 ns) gyakorlatilag egyenlő a molekulatömeg (86,47 kDa) és a kísérletes úton származtatott képlet ($\Phi_{prot} = \eta \frac{V}{k \cdot T} = M(\mathcal{U} + h) \frac{\eta}{R \cdot T}$) alapján számított triptofán rotációs korrelációs idővel [206]. A GuHCl koncentrációt növelve lassú csökkenés figyelhető meg a Myo16Tail triptofánok két komponensének forgásában, ami a fokozott rotációs dinamikára utal. A Myo16Tail mérés során kapott eredmények arra utalnak, hogy a triptofánok legalább egy része hozzáférhetőbb az oldat számára, szemben a G-aktinban található triptofánokkal. Továbbá az eredmények korrelálnak a triptofán aminosavak lokalizációjával (**15. ábra**), miszerint a triptofánok egy része a rendezett Myo16Tail fehérje régiókban található, míg másik része inkább a rendezetlen szegmensekben.

A



B



23. ábra. Időkorrelált egyfoton számlálás módszerével végzett triptofán anizotrópia lecsengés mérések eredményei. (A) Kontroll G-aktin és (B) Myo16Tail triptofán anizotrópia lecsengés növekvő GuHCl koncentráció függvényében. A gerjesztés 295 nm-en történt, az anizotrópia lecsengés detektálása pedig 350 nm-en. A kísérletek során három mérést végeztünk (n=3).

GuHCl		G-aktin				Myo16Tail				
c (M)	τ (ns)	\pm SD	θ (ns)	\pm SD	τ (ns)	\pm SD	θ_1 (ns)	\pm SD	θ_2 (ns)	\pm SD
0	4,3	0,16	25,9	1	4,3	0,08	1,2	0,2	33	1
1	4,5	0,23	32,7	1	4,1	0,19	1	0,4	31	3,5
2	4,7	0,31	30,4	2	3,7	0,15	0,9	0,4	41,7	10
3	3,6	0,23	19,4	1	3,4	0,18	0,7	0,4	25,1	4
4	3,4	0,23	15,8	1	3,2	0,12	1	0,3	22,4	3,6

5. táblázat. Az időkorrelált egyfoton számlálás módszerével végzett kísérleti eredmények összefoglalása. Az eredmények három mérés átlagát mutatják (n=3).

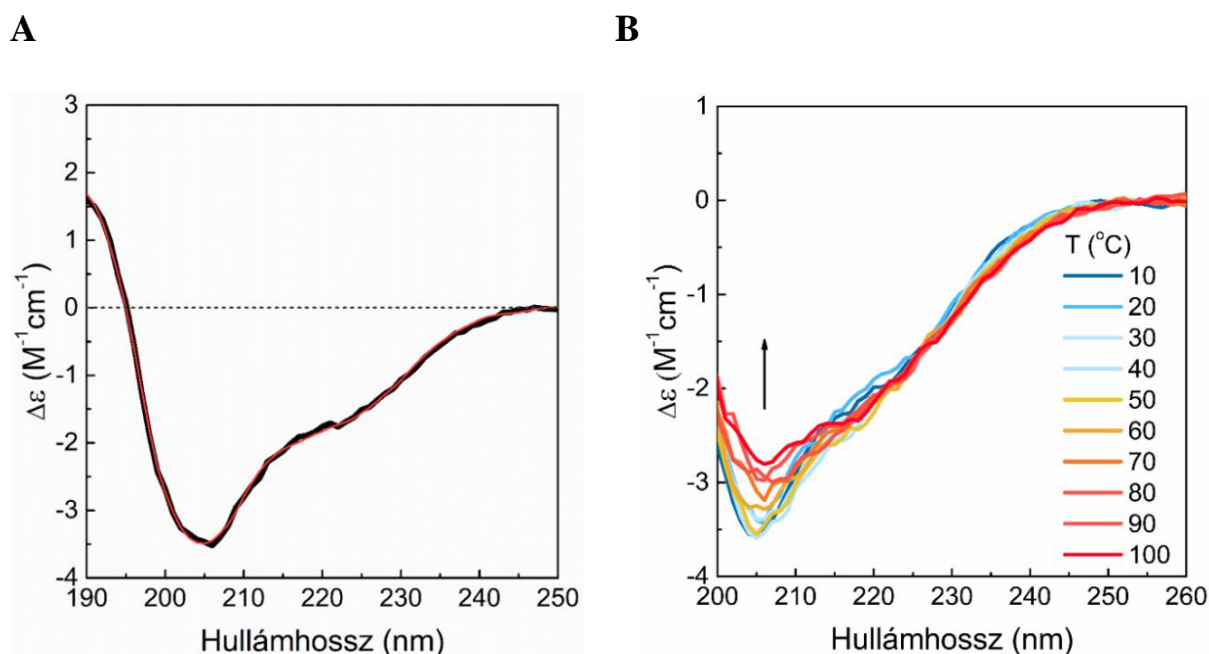
Tehát a steady-state és időfüggő triptofán fluoreszcencia denaturációs kísérletek csekély, de dinamikus Myo16Tail konformáció változásra utalnak. Továbbá ezek alapján feltételezhetjük, hogy a rendezetlen régiók mellett másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemek is jelen vannak a Myo16Tail szerkezetében, valamint lehetséges, hogy a Myo16Tail biológiai funkció során (fehérje interakciók) kontextus függő konformáció változásokon mehet keresztül.

4.3.5 Myo16Tail másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata

A Myo16Tail szerkezetének részletesebb megismerése érdekében Cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópiai méréseket végeztünk. A távoli ultraibolya (190-250 nm) tartományban mért CD spektrum elemzéséből információt nyerhetünk a fehérjék másodlagos szerkezetéről, illetve a strukturális elemek arányáról [207].

A Myo16Tail CD spektruma tartalmaz egy negatív minimum (205 nm), egy pozitív maximum csúcsot (190 nm), valamint egy jellegzetes hullámhossz tartományt 215-225 nm között. Ezek a hullámhossz értékek és tartományok az α -hélix és β -lemez másodlagos szerkezeti elemekre jellemzőek. Továbbá a viszonylag nagy negatív minimum (205 nm) és a gyenge pozitív maximum (190 nm) a CD spektrumon a rendezetlen szerkezet jelenlétére is utal (**24. A ábra**). A Myo16Tail másodlagos szerkezet analíziséhez a dekonvolúciós algoritmusra épülő BestSel programot használtuk [182,208,209]. A BestSel egy új módszer, amelynek segítségével az α -helikális és β -lemez szerkezeti elemek típusa és aránya meghatározható, úgy mint, például paralell és antiparalell β -lemez szerkezeti elemek. Az antiparalell β -lemez szerkezet 3 típusát lehet elkülöníteni, anti 1 (balra csavart), anti 2 (relaxált) és anti 3 (jobbra

csavart) β -komponens. A Myo16Tail CD spektrum analízise 19,5% α -hélix és 21,3% β -lemez másodlagos szerkezeti elemet mutatott ki. Habár a rekombináns Myo16Tail tartalmazza az IQ motívumot, mely főként α -hélix másodlagos szerkezeti elemeket tartalmaz [184] nem valószínű, hogy hozzájárul a 19,5%-os hélix tartalomhoz. Az IQ mindössze 3,9%-át teszi ki a teljes Myo16Tail szekvenciának, ezért a helikális szerkezeti elemek a fark régióban vannak túlsúlyban. További szerkezeti elemek jelenléte szintén fontos a fehérje szerkezet karakterizálásában. Az úgynevezett fordulat (turn) 15,2%-ban és a rendezetlen szerkezeti elemek 44%-ban találhatóak meg a Myo16Tail-ben, melyek aránya jelentős, összesen 59,2%-ot tesz ki. A nagymértékű Myo16Tail rendezetlenség a CD spektroszkópiai alapján egybevágó eredményt mutat az aminosav szekvencia alapján végzett bioinformatikai analízissel (**2. táblázat**). A szerkezeti elemek megoszlását a **6. táblázat** foglalja össze. Továbbá említésre méltó, hogy a másodlagos szerkezeti elemek jelenléte megerősíti a rekombináns Myo16Tail megfelelő renaturációját a tisztítási procedúra során. A BestSel analízisnek van egy hátránya, miszerint a nagymértékben rendezetlen fehérjék rendezetlen régióit bizonyos esetekben anti β -lemez komponensekként osztályozza [209], ami a jelenlegi esetben azt is jelentheti, hogy a Myo16Tail rendezetlensége feltehetően még jelentősebb. Eredményeinket hasonló szakirodalmi adatok is megerősítik [210].



24. ábra. Másodlagos szerkezet vizsgálat CD spektroszkópia segítségével. A CD spektrumok felvétele a távoli UV hullámhossz tartományban történt. A spektrumokon a hullámhosszt ábrázoltuk az ellipticitás függvényében. **(A)** Myo16Tail (1,1 mg/ml) CD spektruma (fekete) és az illesztés ábrázolása (piros) BestSel webszerver segítségével történt. **(B)** A hődenaturációs CD spektroszkópiai mérések

során 10 °C-os lépésekben regisztráltuk a spektrumokat 10 és 100 °C között. A Myo16Tail koncentrációja a fehérje aggregáció elkerülése érdekében 0,1 mg/ml volt. A nyíl a változás irányát mutatja. A kísérletek során három mérést végeztünk (n=3).

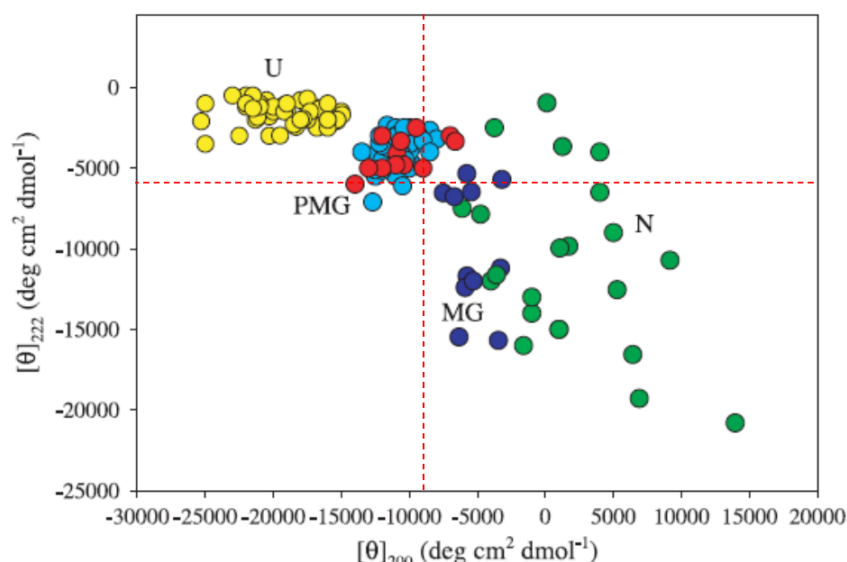
Másodlagos szerkezeti elemek (%)

Helix 1 (szabályos)	12,4
Helix 2 (torzult)	7,1
Anti 1 (balra csavart)	0
Anti 2 (relaxált)	5,4
Anti 3 (jobbra csavart)	15,9
Fordulat (turn)	15,2
Rendezetlen	44

6. táblázat. Myo16Tail másodlagos szerkezeti elemek összefoglalása. A táblázatban a BestSel program által számított másodlagos és rendezetlen szerkezeti elemek %-os arányai láthatóak.

A másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata után hődenaturációs CD spektroszkópiai méréseket végeztünk. A kísérletek során a Myo16Tail fehérje mintát 10 és 100 °C között felfűtöttük, 10 °C-os lépésekben regisztrálva a CD spektrumokat (**24. B ábra**). A Myo16Tail a hődenaturáció hatására fokozatos, de csekély mértékű spektrális változást mutatott, ami szintén az alacsony kooperatív denaturációt támasztja alá és a kompakt fehérjeszerkezet hiányát. A BestSel elemzés ~7% α -hélix tartalom csökkenést és ~5% rendezetlenség emelkedést mutatott ki. A β -lemez szerkezeti elemek aránya szintén emelkedett ~4%-al, viszont ez feltehetően a magas hőmérsékleten végbemenő részleges fehérje aggregációnak köszönhető.

A Myo16Tail CD adatok alapján (**24. A ábra**) kiszámoltuk az egy aminosavra vonatkozó moláris ellipticitás (θ) értékeket a 8. egyenlet segítségével, 222 és 220 nm-en ($[\theta]_{222} = -5813 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ és $[\theta]_{200} = -8865 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). A moláris ellipticitás értékeket egy kettős hullámhossz ábrára vetítettük rá (piros szaggatott vonal), ahol fehérjék különböző mértékű rendezetlen konformációs állapotainak populációi kerültek csoportosításra moláris ellipticitás alapján Uversky és Fink által [181]. A módosított ábrán a Myo16Tail konformációja (piros szaggatott vonal metszéspont) a molten globula (MG) és a pre-molten globula (PMG) populációk közé esik (**25. ábra**).



25. ábra. Myo16Tail rendezetlenség karakterizálása moláris ellipticitás alapján. A Myo16Tail távoli-UV CD adatok származtatott moláris ellipticitás értékeinek ábrázolása 222 nm-en és 220 nm-en $[\theta]_{222} = -5813 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ és $[\theta]_{220} = -8865 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$. Az ábra Uversky és Fink alapján módosítva [181], ahol a piros szaggatott vonalak metszéspontja jelzi a Myo16Tail konformációs állapotát. Az ábrán a színes körök különböző fehérjék rendezetlen konformációs állapotainak csoportosítását mutatja be a rendezett állapottól kezdve a rendezetlen fehérje szerkezetig az alábbiak szerint: natív (zöld-N), molten globula (sötét kék-MG), pre-molten globula (ciánkék-PMG), amiloid intermedierek (piros) a PMG csoporttal átfedve és rendezetlen konformáció (sárga-U).

Tehát a CD spektroszkópiai mérési eredmények alapján a Myo16Tail rendezett és rendezetlen fehérje régiókat is tartalmaz, valamint molten globula konformációval rendelkezhet, alátámasztva ezzel a triptofán és ANS fluoreszcencia spektroszkópiai kísérleti eredményeinket. Továbbá a CD spektroszkópiai eredmények összhangban vannak a Myo16Tail háromdimenziós szerkezeti modellel, miszerint tartalmaz másodlagos szerkezeti elemeket és számottevő arányban rendezetlen fehérje régiókat is (**13. ábra**).

4.3.6 Myo16Tail termodinamikai stabilitásának karakterizálása

A differenciális pásztázó kalorimetria (DSC) egy széles körben alkalmazott szerkezetvizsgáló módszer, ami a fehérjék termodinamikai stabilitásáról ad információt [211]. Nem csak a globuláris fehérjék szerkezetvizsgálatára alkalmas, hanem a rendezetlen fehérjék szerkezeti állapotairól is nyerhetünk adatokat [212]. A rendezetlen fehérjék nem rendelkeznek kompakt, harmadlagos szerkezettel, ezért nem figyelhető meg valós endoterm kooperatív denaturáció a kalorimetriai mérések során. Továbbá a rendezetlen fehérjék oldatnak kitett

hidrofób csoportjai miatt könnyen kialakulhat oligomerizáció és/vagy aggregáció. Az oligomerizáció és/vagy aggregáció másodlagos szerkezeti elemek kialakulását, szerkezet felvételét segítheti elő a rendezetlen fehérjékben, ezért exoterm folyamatként jellemezhető [212]. Ez az exoterm folyamat kooperatív termikus feltekeredésben nyilvánulhat meg [213], feltehetően a hőmérséklet növekedése miatt bekövetkező hidrofób kölcsönhatások erősödésének köszönhetően [214].

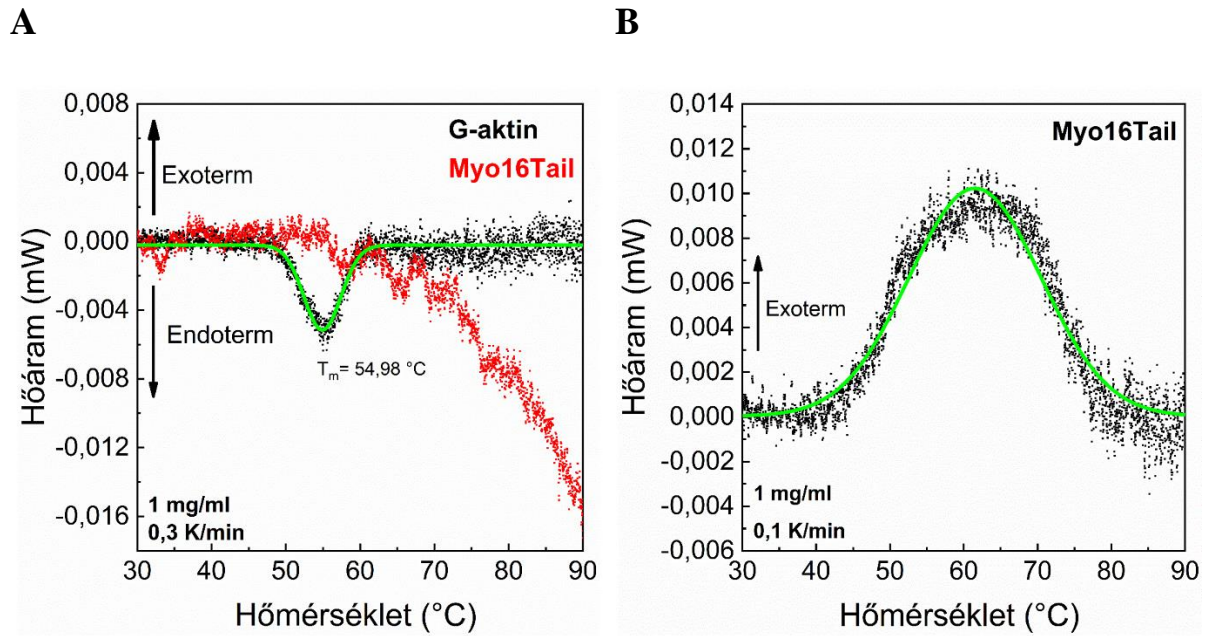
DSC kísérleteink első fázisában 0,3 K/perc felfűtési sebességgel denaturáltuk a kontroll G-aktin és Myo16Tail fehérje mintákat 20-100 °C között. A G-aktin a globuláris szerkezetből adódóan kooperatív denaturációval jellemezhető 50-60 °C-os tartományban, ahol az olvadási hőmérséklete 54,98 °C (T_m , az olvadási hőmérséklet, ahol a felfűtött minta 50%-ban denaturált állapotban van) (**26. A ábra**). A G-aktin olvadási hőmérséklete konzekvens az irodalmi adatokkal [215].

A kontroll mérésekkel szemben a Myo16Tail nem mutatja egyértelmű jelét endoterm, kooperatív denaturációnak, habár kismértékű endoterm hőáram változások megfigyelhetők 55-70 °C-os tartományban, ami utalhat a másodlagos szerkezeti elemek kitekeredésére. A Myo16Tail rendezetlen szerkezetéből adódóan sokkal inkább gyors aggregáció kialakulása, majd az aggregátumok lassú denaturációja, olvadása dominál 50 °C felett, ami a hőáram folyamatos negatív irányú viszonylag nagymértékű endoterm csökkenését eredményezheti (**26. A ábra**). A feltételezett aggregáció miatt exoterm irányú hőáram változást várnánk, ez a 0,3 K/min felfűtési sebesség esetén lezajlott eredményekben nem tükröződik. Feltehetően a 0,3 K/min felfűtési sebesség gyors aggregációt okozhat az érzékeny, rendezetlen fehérjék esetében és ezért már csak a Myo16Tail aggregátumok olvadása, endoterm denaturációja figyelhető meg. Az alkalmazott fehérje koncentráció limitáló tényező lehet a kalorimetriás mérésekben, mivel a rendezetlen fehérjék magasabb koncentráción hajlamosabbak az aggregációra, viszont a microDSC készülék limitációja 1 mg/ml-es fehérje koncentráció.

A feltételezett aggregáció megerősítése érdekében alacsonyabb felfűtési sebességen is végeztünk méréseket (0,1 K/min). A lassabb felfűtési sebesség esetén széles hőmérsékleti tartományban tapasztaltunk exoterm kooperatív hőáram változást (45-80 °C), ami aggregációra utalhat (**26. B ábra**). A rendezetlen Myo16Tail exoterm termikus feltekeredésen mehet keresztül a hidrofób kölcsönhatások erősségének növekedése miatt, amit a lassabb hőmérsékletnövekedés okozhat.

A Myo16Tail kalorimetriás mérések alapján alacsony termodinamikai stabilitás és a fehérjefragmentum kooperatív denaturációjának hiánya figyelhető meg magasabb felfűtésen

(0,3 K/min), ami gyors fehérje aggregációval és ezek olvadásával párosulhat, de az aggregátumok olvadása miatt endoterm folyamatként láthatjuk. Alacsonyabb felfűtési sebesség mellett (0,1 K/min) exoterm kooperativitást detektáltunk, ami valószínűleg a hidrofób kölcsönhatások növekedéséből származó exoterm termikus szerkezeti feltekeredésnek köszönhető.



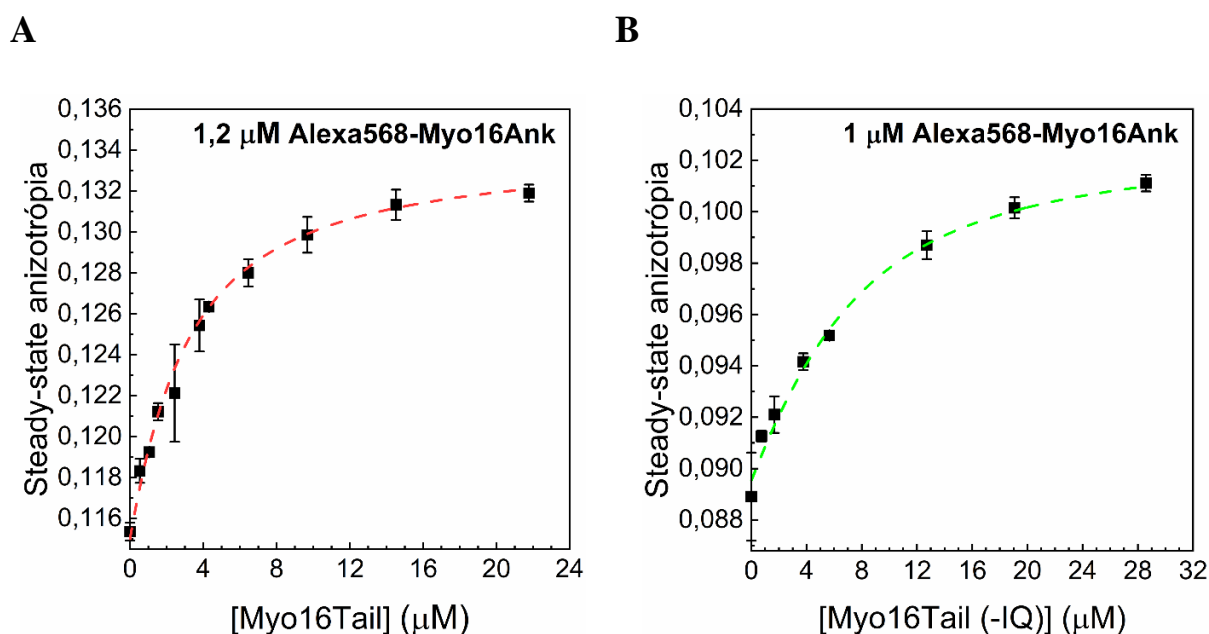
26. ábra. A Myo16Tail termodinamikai stabilitásának jellemzése. (A) A kontroll G-aktin endoterm kooperatív denaturációt mutat ($T_m=54,98$ °C). A Myo16Tail esetében nem tapasztalható kooperativitás a szerkezet kitekeredésben 0,3 K/min felfűtési sebesség mellett. Sokkal inkább fehérje aggregációra utaló nem-kooperatív negatív hőáram növekedés figyelhető meg (endoterm). **(B)** Lassabb felfűtési sebesség (0,1 K/min) esetén is megvizsgáltuk a Myo16Tail hődenaturációját, amely egyértelmű aggregáció jeleit mutatta (exoterm). A G-aktin (0,3 K/min) és Myo16Tail (0,1 K/min) hőáram adatokra Gauss illesztést alkalmaztunk (zöld vonal). A nyilak a pozitív irányú exoterm és a negatív irányú endoterm folyamatokat mutatják. A kísérletek során három mérést végeztünk ($n=3$).

4.4 MYO16TAIL FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA

4.4.1 Myo16Tail funkcionálisan aktív és kölcsönhat a Myo16Ank doménnel

A renaturált Myo16Tail aktivitásának tesztelése érdekében steady-state anizotrópia segítségével vizsgáltuk a rekombináns fehérje fragmentum lehetséges interakciós tulajdonságait. Számos miozin C-terminális farok régió esetében ismert, hogy képes intramolekuláris kölcsönhatás révén kötődni a polipeptidlánc N-terminális végéhez egyfajta visszacsatoló mechanizmussal (miozin IIA, V, VI, VII, X) [39,41,42,216,217]. Ez az

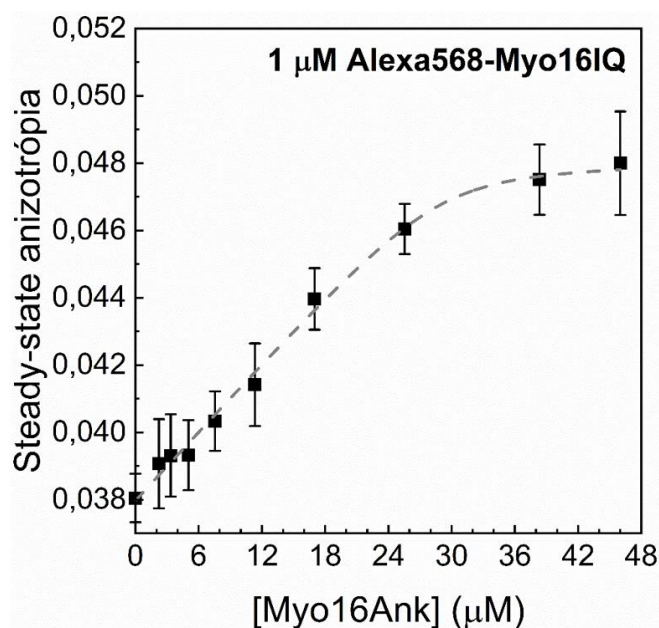
autoregulációs interakció általában negatívan befolyásolja a miozin motor domén enzimátikus aktivitását [30]. Korábban Kengyel és munkatársai vizsgálták az N-terminális Myo16Ank lehetséges intramolekuláris hatását a modellként használt nyúl vázizom nehéz meromiozin II (skHMM) és a nem-izom miozin IIB motor aktivitásra koszedimentációs és felületi plazmon rezonancia kísérletekben. Eredményeik alapján a Myo16Ank kötődik a skHMM-hez mikromoláris affinitással és megnöveli a motor domén aktin-aktivált Mg^{2+} -ATPáz aktivitását [43]. A fent említett irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a C-terminális Myo16Tail kötődhet az N-terminális Myo16Ank doménhez és ezáltal indirekt módon szabályozhatja a Myo16motor domén aktivitását a Myo16Ank:Myo16motor komplexen keresztül. Ezért steady-state fluoreszcencia anizotrópia kísérleteket végeztünk a Myo16Tail és Myo16Ank domén között feltételezett interakció vizsgálatára (27. ábra).



27. ábra. A C-terminális Myo16Tail kötődik az N-terminális Myo16Ank doménhez. (A) A steady-state anizotrópia kísérletekben 1,2 μ M Alexa568-jelölt Myo16Ank anizotrópiáját vizsgáltuk növekvő Myo16Tail koncentráció függvényében. A disszociációs egyensúlyi állandó (K_D) értéke $2,5 \mu\text{M} \pm 0,2 \mu\text{M}$ -nak adódott. **(B)** 1 μ M Alexa568-jelölt Myo16Ank steady-state anizotrópia vizsgálata IQ motívumot nem tartalmazó Myo16Tail (-IQ) emelkedő koncentrációjának jelenlétében. AZ IQ motívum hiányában a K_D értéke $5,6 \pm 0,02 \mu\text{M}$ -nak adódott. A szaggatott vonalak a kvadratikus kötési egyenlet alapján történt illesztést mutatják (5. egyenlet). A kísérletek során három mérést végeztünk és ezek átlagát ábrázoltuk ($n=3$, átlag \pm SD).

A mérések során az Alexa568-jelölt Myo16Ank steady-state anizotrópia változását vizsgáltuk a két rekombináns Myo16Tail növekvő koncentrációban történő hozzáadásával.

A kísérletek első felében az IQ motívumot is tartalmazó Myo16Tail emelkedő koncentráció jelenlétében megnövekedett Alexa568–Myo16Ank anizotrópiát tapasztaltunk. A kvadratikus egyenlet (**5. egyenlet**) segítségével számolt Myo16Ank:Myo16Tail disszociációs egyensúlyi állandó (K_D) értéke $\sim 2,5 \mu\text{M}$ volt (**27. A ábra**). Az anizotrópia mérések második felében az IQ motívumot nem tartalmazó Myo16Tail (-IQ) növekvő koncentráció jelenlétében hasonlóan növekvő Alexa568–Myo16Ank anizotrópia változást mértünk. A kvadratikus illesztés alapján a Myo16Ank:Myo16Tail (-IQ) disszociációs egyensúlyi konstans (K_D) értéke $\sim 5,6 \mu\text{M}$ volt (**27. B ábra**).



28. ábra. A Myo16IQ gyengén kötődik az N-terminális Myo16Ank doménhez. A steady-state anizotrópia kísérletekben $1 \mu\text{M}$ Alexa568-jelölt szintetizált Myo16IQ anizotrópia változását vizsgáltuk növekvő Myo16Ank koncentráció függvényében. A Myo16IQ:Myo16Ank komplex disszociációs egyensúlyi állandójának (K_D) az illesztés alapján meghatározott értéke $16,04 \pm 2,9 \mu\text{M}$ volt. A szaggatott vonal a kvadratikus kötési egyenlet alapján történt illesztést mutatja (5. egyenlet). A kísérleti eredményeket három mérést átlagolva ábrázoltuk ($n=3$, átlag \pm SD).

Továbbá kíváncsiak voltunk arra, hogy önmagában a Myo16IQ motívum milyen mértékben befolyásolja a Myo16Tail kötődését a Myo16Ank-hoz. Ezért szintetizált Myo16IQ motívumot Alexa568 fluoreszcens festékkel jelöltünk és steady-state anizotrópia kísérletek során növekvő koncentrációban jelöletlen Myo16Ank-ot adtunk $1 \mu\text{M}$ Alexa568–Myo16IQ-hoz. Az eredmények alapján a Myo16IQ:Myo16Ank komplex disszociációs egyensúlyi állandójának (K_D) értéke $\sim 16 \mu\text{M}$ -nak adódott (**28. ábra**).

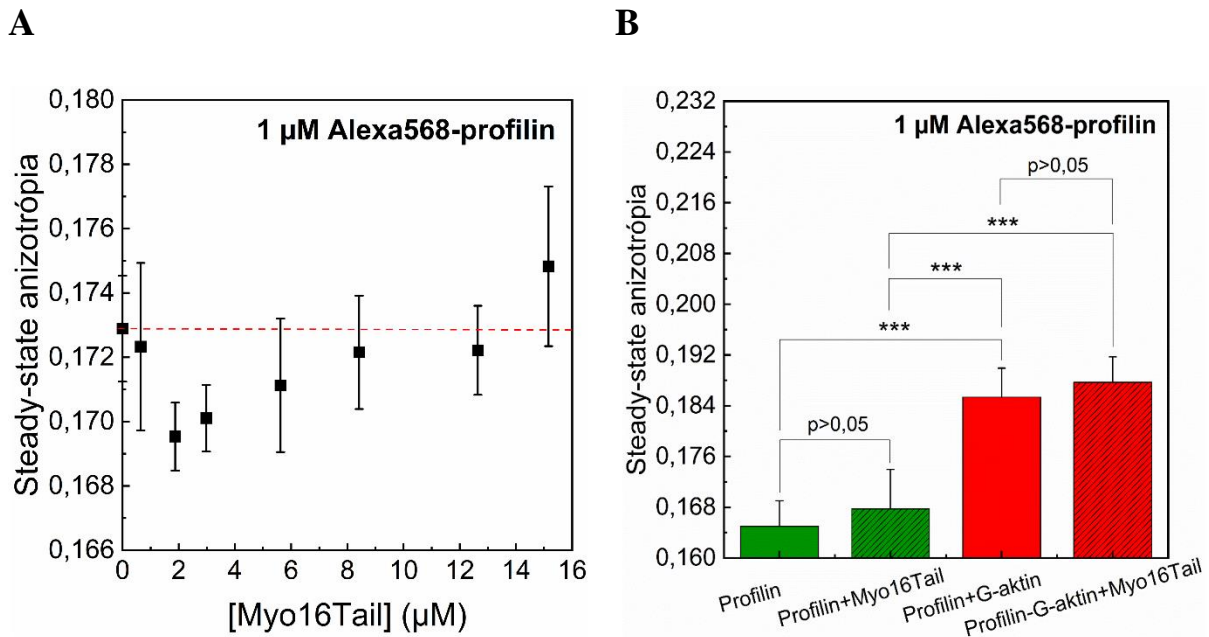
A steady-state anizotrópia eredmények alapján a Myo16Tail hasonló, viszonylag gyenge (μM) affinitással kötődik a Myo16Ank-hoz az IQ jelenlétében vagy hiányában is, viszont az IQ befolyásolhatja ezt a kötődést. Ez a viszonylag gyenge affinitás gyakori a szabályozási funkciót ellátó rendezetlen szerkezetű fehérjék között [143]. Az anizotrópia eredményeink egyrészt igazolják, hogy a rekombináns Myo16Tail aktív, legalább is a Myo16Ank kölcsönhatás tekintetében, másrészt a Myo16Tail egy új funkciójára derült fény a Myo16Ank interakción keresztül. A kötődés affinitás tartománya konzisztens a Myo16Tail feltételezett szerepével, miszerint egy multifunkcionális interakciós felszín biztosíthat a PI3K jelátviteli folyamatok résztvevői számára: PI3K, WRC [53] és a Myo16Ank kötésen keresztül feltehetően befolyásolhatja a Myo16 motor domén funkcióját is.

4.4.2 Myo16Tail nem befolyásolja az aktin polimerizáció dinamikáját

Korábban Cameron és munkatársai kolokalizációt mutattak ki COS7 sejtekbe transzfektált GFP-Myo16Tail és nukleáris aktin filamentumok, valamint profilin-asszociált struktúrák között [36]. Továbbá ismert, hogy a Myo16 szerepet játszik az aktin citoskeleton átrendeződésében [53,57]. A Myo16Tail prolinban gazdag, ezért a profilin fehérje potenciális interakciós partnere lehet a Myo16 közvetítette molekuláris folyamatokban. Alternatív útvonalként a profilin kötésen keresztül befolyásolhatja az aktin sejtvezeték dinamikáját.

A Myo16Tail prolin-gazdag régió feltételezett szerepét célzó kísérletek első felében steady-state fluoreszcencia anizotrópiával vizsgáltuk az Alexa568-jelölt profilin 1 izoforma (PFN1) anizotrópia változását növekvő Myo16Tail hozzáadásra. Az eredmények alapján az Alexa568–profilin anizotrópia változása nem mutatott szignifikáns különbséget és konzekvens növekedést Myo16Tail emelkedő koncentráció hozzáadására sem (**29. A ábra**). További kísérletekben vizsgáltuk, hogy a profilin–G-aktin komplex befolyásolja-e a feltételezett Myo16Tail affinitást a profilinhez. A kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy ha a profilin komplexet alkot a G-aktinnal, akkor a profilin felvesz-e egy, a Myo16Tail kötés számára kedvezőbb konformációt vagy sem. A kontroll mérések során a Myo16Tail ($15 \mu\text{M}$) hozzáadására (profilin+Myo16Tail) nem tapasztaltunk szignifikáns anizotrópia változást ($p > 0,05$). A G-aktin ($5 \mu\text{M}$) hozzáadására az Alexa568–profilin anizotrópia jelentős növekedést ($p \leq 0,001$) mutatott, ami utal a kötésre és a komplex kialakulására (profilin+Gaktin). A kísérletek utolsó fázisában a profilin–G-aktin komplexhez Myo16Tail-t adtunk maximális koncentrációban ($15 \mu\text{M}$), aminek hatására nem emelkedett meg az Alexa568–profilin anizotrópia ($p > 0,05$). Ebből arra

következtethetünk, hogy a Myo16Tail nem képes kötődni a profilin–G-aktin komplexhez sem (29. B ábra).

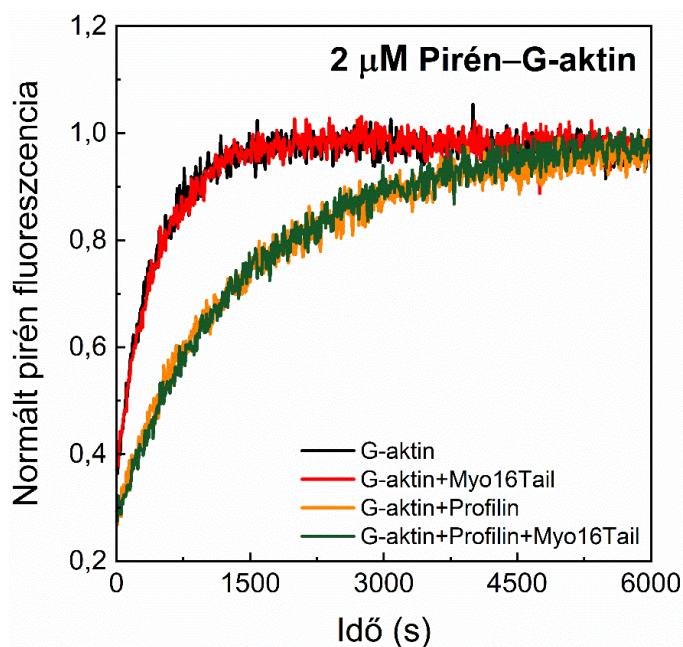


29. ábra. A Myo16Tail nem kötődik a profilinhez és a profilin–G-aktin komplexhez. (A) Steady-state anizotrópia kísérletekben vizsgáltuk az 1 μM Alexa568-jelölt profilin 1 izoforma (PFN1) anizotrópia változását növekvő Myo16Tail koncentráció függvényében. A piros szaggatott vonal a kontroll Alexa568-profilin anizotrópiát mutatja Myo16Tail hiányában **(B)** Myo16Tail affinitás vizsgálata Alexa568–profilin–G-aktin komplex esetén steady-state anizotrópiával. A statisztikai analízist kétmintás t próbával végeztük. A szignifikancia jelölése: szignifikáns (***, $p \leq 0,001$), nem szignifikáns különbség ($p > 0,05$). A kísérletek során három mérés átlagát határoztuk meg ($n=3$, átlag \pm SD).

A továbbiakban pirén-jelölt G-aktin (2 μM) fluoreszcencia emisszióján keresztül vizsgáltuk az aktin polimerizáció dinamikáját Myo16Tail és profilin jelenlétében és hiányában (30. ábra). A kísérletek első fázisában azt vizsgáltuk, hogy a Myo16Tail képes-e direkt módon befolyásolni az aktin polimerizációt. Az eredmények alapján a Myo16Tail nem képes kölcsönhatni az G-aktinnal és jelenléte nem befolyásolja a pirén–aktin polimerizációt (piros) összehasonlítva a kontrol aktin polimerizációs görbével (fekete). Ezt követően profilin hozzáadásával folytattuk a kísérleteket. A profilin fehérjéről ismert, hogy lassítja az aktin polimerizációt [218], melyet saját méréseink során is sikerült reprodukálni (narancssárga). A mérések utolsó felében a komplexben lévő aktin–profilin elegyhez adtuk a Myo16Tail-t, viszont ebben az esetben sem tapasztaltunk változást (oliva zöld), ami arra utal, hogy a Myo16Tail nem kötődik a G-aktinhoz profilin jelenlétében sem és nem befolyásolja az aktin

polimerizáció dinamikáját (**30. ábra**). Az eredmények kvantitatív megerősítése érdekében a normált polimerizációs görbék kezdeti szakaszára (0-500 s) egyenest illesztettünk és a meredekségből meghatároztuk a polimerizáció sebességét kvantitatívan jellemző paramétert (**7. táblázat**).

Tehát az Alexa568-jelölt profilin steady-state fluoreszcencia anizotrópia eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a profilin önmagában és a G-aktinnal komplexet alkotva sem képes kölcsönhatni a Myo16Tail fehérjével annak prolin-gazdag régióján keresztül. Továbbá a pirén fluoreszcencián alapuló polimerizációs kísérleteink alapján a Myo16Tail nem képes kötődni a G-aktinhoz és nem befolyásolja az aktin polimerizáció dinamikáját profilin hiányában és jelenlétében sem.



30. ábra. A Myo16Tail nem játszik szerepet az aktin polimerizáció dinamikájának szabályozásában. 2 μM Pirén-G-aktin (2% pirén-jelölt) fluoreszcencia emissziójának időbeli változása Myo16Tail és/vagy profilin hiányában és jelenlétében. $[\text{Myo16Tail}] = 10,5 \mu\text{M}$, $[\text{profilin}] = 6,9 \mu\text{M}$. A kísérletek során három mérést végeztünk ($n=3$).

	$v (\times 10^{-3} \text{s}^{-1})$	$\pm \text{SD}$
Aktin	0,87	0,023
Myo16Tail	0,81	0,021
Profilin	0,46	0,016
Profilin+Myo16Tail	0,43	0,012

7. Táblázat. Aktin polimerizáció sebességét jellemző paraméter.

Az eredmények három mérés átlagát mutatják (n=3).

A Myo16Tail-ban található prolin-gazdag régió már a gerinces osztályok képviselőinek bioinformatikai elemzése során sem mutatott szekvencia azonosságot és konzerváltságot (**12. ábra**). A profilin-kötő fehérjék tartalmaznak egy XP⁵ (X = G, L, I, S vagy A) profilin felismerő helyet (PRM1), melyek előfordulhatnak egyedüli motívumként vagy tandem ismétlődésként [106]. A Myo16Tail prolin-gazdag régió nem felel meg az XP⁵ motívum feltételeinek, viszont a prolin-gazdag régió mellett eső C-terminális szegmense tartalmaz egy AP⁵ szekvencia motívumot. A szekvencia elemzés és az Alexa568-jelölt profilin steady-state anizotrópia, valamint a polimerizációs tesztek eredményei alapján nem találtunk kölcsönhatásra utaló jelet a rekombináns Myo16Tail és a profilin (PFN1) között. Az eredmények alapján feltételezzük, hogy gyenge profilin kölcsönhatás kialakulhat, ami a kísérleti elrendezésünkben nem eredményezett detektálható változást, vagy izoforma-specifikus interakció is elképzelhető, ami a profilin 2 (PFN2) izoforma specifikusan neurális előfordulásával magyarázható [219].

Ezenkívül a foszforilációs folyamatoknak is szerepe lehet a profilin kölcsönhatás kialakításában. A RhoA-asszociált fehérje kináz (ROCK1) foszforilálja a PFN1-et szerin aminosavon keresztül (S¹³⁷) *in vivo* körülmények között, ami egy konzervált poszttranszlációs módosulás a PFN1 és a PFN2 izoformák esetében [220]. A ROCK1 által végzett foszforiláció szabályozza a PFN1:ligand kölcsönhatást, megnövelve a profilin affinitását a poliprolin motívumot tartalmazó ligandhoz és az aktinhez [221]. A defoszforilációs mechanizmusban a protein foszfatáz 1 katalitikus alegység fehérjét (PP1c) azonosították, ami defoszforilálja a PFN1-et ugyanazon a szerin aminosavon keresztül (S¹³⁷) [222]. *In vitro* körülmények között a PP1c nem közvetlenül kötődik a PFN1-hez, egy még nem ismert PP1c-kötő mediátor fehérje szerepet játszhat a PFN1 megfelelő közelségbe juttatásához a PP1c defoszforiláció számára. Habár a PFN1-et szabályozó PP1c regulatórikus alegységek még nem ismertek. Ismert ugyanakkor, hogy a Myo16Ank *in vitro* kísérletekben kötődik a PP1c α és PP1c σ izoformákhoz szubmikromoláris affinitással [43], ezáltal feltehetően megfelelő közelségbe hozva a PP1c-t a profilin számára.

Az irodalmi adatok alapján a profilin izoforma-specifikus interakció lehetősége és a profilin foszforiláció/defoszforiláció által történő szabályozás még nyitott kérdéseket hagy maga után, melyek tisztázása további vizsgálatokat igényel.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A nem-konvencionális miozin XVI osztály predomináns Myo16b izoformája tartalmaz egy funkcionális motívumokat magába foglaló egyedülálló C-terminális farok régiót (Myo16Tail), mely szerkezete feltehetően rendezetlen az aminosav szekvencia alapján. Mivel a Myo16Tail szerkezetéről még nem áll rendelkezésre információ, valamint funkciói sem teljesen tisztázottak, ezért kísérleteinkben a Myo16Tail szerkezetének, konformációjának és funkciójának biokémiai karakterizálását tűztük ki célul. Kísérleteink során patkány (*Rattus norvegicus*) Myo16b C-terminális farok régiójának (Myo16Tail) konformációs és funkcionális tulajdonságait vizsgáltuk bioinformatikai, fluoreszcencia-, CD spektroszkópiái, valamint kalorimetriás módszerek segítségével.

5.1 MYO16TAIL BIOINFORMATIKA ANALÍZISE

A bioinformatikai analízis első lépéseként vizsgáltuk a Myo16Tail aminosav szekvenciaösszetételét és csoportosítottuk a szerkezeti rendezettség és rendezetlenség kialakításában szerepet játszó aminosavakat. Az analízis alapján a szerkezeti rendezetlenség kialakításáért felelős aminosavak aránya a Myo16Tail szekvenciájában 68%-nak adódott, míg a rendezettségért felelős aminosavak jóval kisebb arányban képviselik magukat (32%). A prolin aminosavról ismert, hogy az alfa-hélix szerkezetet megtöri és gátolja a rendezett konformáció kialakítását [183]. Ennek fényében nem meglepő, hogy a prolin számottevő arányban megtalálható a Myo16Tail szekvenciában (15%) (**2. táblázat**).

A Myo16Tail szerkezeti rendezetlenség analízisét különböző predikciós algoritmus kombinációival vizsgáltuk: VLXT, VL3-BA, VSL2b, Ronn és IUPred. Az analízis alapján a Myo16Tail, ezen belül az NHM és a prolin-gazdag régió is rendezetlenséget mutat (rendezetlenség valószínűsége $>0,5$) (**9. A ábra**). Különböző gerinces osztályok képviselőinek Myo16Tail szekvencia összehasonlítása során az IUPred által jóslt rendezetlenségi valószínűség nagyfokú átfedést mutatott, ami alapján arra következtethetünk, hogy a Myo16Tail feltehetően rendezetlen szerkezete konzerválódott az evolúció során (**9. B ábra**). A Myo16Tail szekvencia szerkezeti flexibilitását DynaMine programmal vizsgáltuk, amely 70%-os szerkezeti flexibilitást prediktált ($S^2 <0,7$), míg a rigid szerkezet előfordulásának valószínűsége mindössze 20% ($S^2 >0,7$). Továbbá a DynaMine analízis alapján a Myo16Tail 10%-ban kontextusfüggő konformáció változásokon is átmehet ($S^2 0,7-0,8$).

Az irodalmi adatok alapján a rendezetlen fehérjékben magasabb a posztranszlációs módosulási helyek aránya [186]. PhosphositePlus program segítségével vizsgáltuk a

Myo16Tail szekvenciában feltehetően előforduló poszttranszlációs módosulási helyeket. Az analízis alapján a Myo16Tail 17 foszforilációs helyet tartalmazhat (10 Ser, 4 Thr és 3 Tyr) (**11. ábra**). Ezen felül tovább vizsgáltuk a Myo16Tail szekvencia és poszttranszlációs módosulási helyek konzerváltságát különböző gerinces fajok Myo16Tail szekvenciáival összehasonlítva Clustal-X program segítségével. Az analízis teljes homológiát mutatott 47%-ban a gerinces fajok Myo16Tail szekvenciái között. Továbbá a szekvencia konzerváltság szintjei a következők voltak: teljes konzerváltság 26,5% (100%-os egyezés – fekete (*)), erős hasonlóság 12,9% (80%-os egyezés – sötétszürke (:)) és gyenge hasonlóság 7,8% (60%-os egyezés – világosszürke (.)). Ezen felül az ismert motívumok (IQ – 86% és NHM – 49%) szekvenciái is jelentős egyezést mutattak, míg a prolin-gazdag szekvencia nem konzervált (**12. ábra; 3. táblázat**). A PhosphositePlus analízisből (**11. ábra**) származó adatok alapján elemeztük a prediktált poszttranszlációs módosulási helyek konzerváltságát is a Clustal-X szekvencia elemzés segítségével. A foszforilációs helyek jelentős része a rendezetlen régiókban található, valamint 13 prediktált foszforilációs hely mutatott teljes konzerváltságot (100%-os egyezés) és 2 foszforilációs hely pedig gyenge hasonlóságot (60%-os egyezés) a 17 foszforilációs helyből összesen a gerinces fajok Myo16Tail szekvenciáiban (**12. ábra**). A foszforilációs helyek evolúciós konzerváltsága alátámasztja, hogy a poszttranszlációs módosulás ezen formája meghatározó lehet a rendezetlen fehérjék, ez esetben a Myo16b fehérje funkciójában a C-terminális farok régió keresztül. Az NHM motívumban található teljes konzerváltságot mutató két tirozin (Y¹⁴¹⁶ és Y¹⁴⁴¹) Fyn kináz által történő foszforilációjának szerepét a PI3K jelátvitelben már korábban leírták [53]. A további teljes konzerváltságot mutató foszforilációs helyek szerepe még nem ismert a Myo16Tail szekvenciában.

A bioinformatikai analízis lezárásaként szerkezet modellezéssel vizsgáltuk a Myo16Tail lehetséges konformációját I-TASSER program segítségével. A szerkezeti modell alapján a Myo16Tail tartalmaz α -helikális (piros) és β -lemez (ciánkék) másodlagos szerkezeti elemeket, valamint fordulat (zöld) és tekintélyes mennyiségű rendezetlen szerkezeti elemeket (szürke). A nagyfokú rendezetlenségből adódóan a Myo16Tail egy kevésbé kompakt, flexibilis, molten globula [190] konformációval rendelkezhet a szerkezeti modell alapján (**13. ábra**).

5.2 MYO16TAIL KONFORMÁCIÓ VIZSGÁLATA

A rekombináns Myo16Tail konstrukciók előállítása során futatott SDS-poliakrilamid gélen a Myo16Tail a várttól eltérő elektroforetikus migrációt mutatott, ami látszólagos, nagyobb molekulatömeg magasságban történő megjelenést eredményezett (~120 kDa) a valós molekulatömeghez képest ($MW_{Myo16Tail} = 86,46$ kDa és $MW_{Myo16Tail(-IQ)} = 81,99$ kDa) (**14. B, C**

ábra). Az aminosav összetételből eredeztethető abnormális elektroforetikus migráció a rendezetlen fehérjékre jellemző [137,164].

A triptofán fluoreszcencia spektroszkópiai kísérletek könnyebb interpretációja érdekében IUPred rendezetlenségi predikció analízissel vizsgáltuk a triptofán aminosavak előfordulási arányát a rendezett (<0,5) vagy rendezetlen (>0,5) Myo16Tail szekvencia régiókban. Az analízis alapján a Myo16Tail triptofán aminosavak 50-50%-ban találhatóak a feltételezett a rendezett és rendezetlen szerkezetben (**15. ábra**).

A triptofán fluoreszcencia emissziós kísérletek során kimutattuk, hogy a Myo16Tail mindössze 9 nm spektrális eltolódást mutat a vörös irányban a növekvő GuHCl koncentráció hatására (351-360 nm), szemben a 25 nm-es vörös eltolódással, amit a globuláris aktin esetében figyeltünk meg (**16. A, B ábra**). Ábrázolva a maximális triptofán fluoreszcencia emisszióhoz tartozó hullámhossz értékeket a GuHCl koncentráció függvényében azt tapasztaltuk, hogy a Myo16Tail enyhe kooperatív kitekeredésen megy keresztül a kémiai denaturáció során, azaz csekély konformáció változás figyelhető meg, összehasonlítva a G-aktin viszonylag nagyfokú kooperatív szerkezeti átrendeződésével (**17. ábra**).

Az ANS fluoreszcencia kísérletekben az ANS intenzitás mértékéből, pontosabban annak maximális értékéből következtethetünk a molten globula konformációs állapot jelenlétére [199]. Az ANS emissziós kísérletek során a Myo16Tail GuHCl hiányában eredményezte a legmagasabb ANS intenzitást, szemben a G-aktin kontroll mérésekkel (**18. A, B ábra**). A maximális ANS fluoreszcencia emisszióhoz tartozó hullámhossz értékek ábrázolása jól szemlélteti a fehérje kitekeredés kooperativitását és a konformációs állapotok viszonyait. A G-aktin kitekeredés során mért ANS intenzitás maximuma 1-2 M GuHCl koncentráció tartományban figyelhető meg 480 nm-en. Ez az a tartomány, ahol a G-aktin natív rendezett és rendezetlen szerkezeti állapotok közötti molten globula átmeneti konformációs állapota jellemző. A Myo16Tail ANS intenzitás maximumát viszont már GuHCl hiányában detektáltuk 480 nm-es hullámhosszon, ami megfelel a molten globula konformációs állapotnak. Ezt követően enyhe kooperatív kitekeredés figyelhető meg növekvő GuHCl koncentráció hozzáadására (**19. ábra**).

Steady-state triptofán fluoreszcencia kioltással tanulmányoztuk a triptofánok hozzáférhetőségét akrilamid kioltó segítségével. A kontroll G-aktin mérések során kisebb Stern-Volmer együtthatót kaptunk ($K_{sv}=1,98 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}$), míg a Myo16Tail magasabb Stern-Volmer értéke ($K_{sv}=2,59 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}$) a hozzáférhetőbb triptofán aminosavakról ad információt (**20. A ábra**). Ugyanakkor a Myo16Tail esetében az enyhén felfelé ívelő Stern-Volmer illesztés a dinamikus mellett a statikus kioltási komponens jelenlétére is utal, ami szintén a triptofánok

nagyobb hozzáférhetőségét magyarázza. Az időkorrelált triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás során azt tapasztaltuk, hogy a kontroll G-aktin esetén az élettartam az akrilamid koncentráció emelkedése során csökken és a τ_0/τ adatokra egyenes illeszthető (**20. B ábra, 4. táblázat**). A Myo16Tail esetén az élettartam csekély mértékben csökkent a növekvő akrilamid koncentráció jelenlétében, a τ_0/τ Stern-Volmer ábrázolás vízszinteshez közeli, enyhén emelkedő tendenciát mutatott (**20. B ábra, 4. táblázat**). Az élettartam kioltás mérések megerősítik a statikus komponens jelenlétét a Myo16Tail esetén.

A steady-state triptofán anizotrópia mérések során GuHCl koncentráció függvényében tovább vizsgáltuk a fehérje szerkezet kitekeredésének kooperativitást. Az eredmények alapján a Myo16Tail enyhe kooperatív anizotrópia csökkenést mutatott. Ezzel szemben a kontroll G-aktin anizotrópiában meredek, kétfázisú csökkenés látható (**21. A, B ábra**). A steady-state anizotrópia megfigyelések megerősítik a korábbi Myo16Tail denaturáns indukálta kitekeredési eredményeit (**16, 17, 18 és 19. ábra**).

Az időkorrelált triptofán fluoreszcencia kísérletek során a Myo16Tail konformációs dinamikáját tanulmányoztuk. A triptofán élettartam mérések emelkedő GuHCl koncentráció függvényében zajlottak, ahol a Myo16Tail átlagos triptofán élettartam graduális csökkenést eredményezett, szemben a kétfázisú G-aktin triptofán élettartam változással (**22. A, B ábra; 5. táblázat**). Az időkorrelált Myo16Tail anizotrópia lecsengés mérések során két rotációs korrelációs komponens figyelhető meg a triptofánok forgásában. A GuHCl hiányában egy gyors ($\theta_1 = \sim 1$ ns) és egy lassú ($\theta_2 = \sim 33$ ns) komponens kaptunk az illesztés során. A gyors rotációs korrelációs komponens a növekvő GuHCl koncentráció jelenlétében is megfigyelhető, ami arra utal, hogy a Myo16Tail-ben található triptofánok egy része legalább az oldat számára hozzáférhetőbb már natív állapotban. Ezáltal a triptofánok egy része a rendezetlen szerkezetben dinamikusabb rotációs mozgással jellemezhető. A Myo16Tail lassú komponense viszont a teljes fehérje fragmentum forgására utal. A kontroll G-aktinnal végzett mérésekben a rövidebb komponens nem jelent, csak a fehérje forgását jellemző lassabb komponens csökkenése volt megfigyelhető a denaturáció hatására (**23. A, B ábra; 5. táblázat**). Ezek az időkorrelált fluoreszcencia spektroszkópiai eredményeink összhangban vannak a Myo16Tail triptofánok lehetséges eloszlásával és a szerkezeti rendezetlenség predikcióval (**15. ábrán**).

A CD spektroszkópiai eredmények BestSel analízise által részletes információt nyertünk a Myo16Tail-ben található másodlagos szerkezeti elemek és a rendezetlenség jelenlétéről. A Myo16Tail CD analízise során 19,5% α -hélix és 21,3% β -lemez másodlagos szerkezeti elemet mutattunk ki. Továbbá a fordulat (turn) elemek 15,2%-ban és a rendezetlen szerkezeti elemek

viszonylag nagy mennyiségben, 44%-ban képviseltetik magukat a Myo16Tail szerkezetben (**24. A ábra; 6. táblázat**). A hődenaturációs CD mérések során csekély, nem kooperatív spektrális változás volt megfigyelhető a Myo16Tail szerkezetének kitekeredésekor. A hődenaturáció hatására a BestSel CD adatok ~7% α -hélix tartalom csökkenést és ~5% rendezetlenség emelkedést mutattak. Ugyanakkor, a β -lemez szerkezeti elemek aránya szintén emelkedett ~4%-al, ami feltehetően a magas hőmérsékleten végbemenő részleges fehérje aggregációnak köszönhető (**24. B ábra**). A CD adatok alapján (**24. A ábra**) meghatároztuk az egy aminosavra eső moláris ellipticitást (θ) 222 és 220 nm-en ($[\theta]_{222} = -5813 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$ és $[\theta]_{200} = -8865 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$). A Myo16Tail moláris ellipticitás értékeket ábráztuk az Uversky & Fink [181] által leírt kettős hullámhossz grafikonon, ahol a különböző konformációval rendelkező rendezetlen szerkezetű fehérje populációk moláris ellipticitás eloszlása látható. A Myo16Tail a moláris ellipticitás metszéspont alapján (piros szaggatott vonal) a pre-molten globula és a molten globula szerkezeti populációk közé sorolható (**25. ábra**). A korábbi triptofán-, ANS fluoreszcencia és a hődenaturációs CD kísérletek alapján a Myo16Tail szerkezete közelebb állhat a molten globula konformációs állapothoz, mivel a pre-molten globula konformáció jelenléte esetén a kooperativitás teljes hiányát látnánk a fehérje kitekeredési kísérletek során [204]. Ezzel szemben enyhe kooperatív denaturáció figyelhető meg, ami a molten globula konformációs állapotra jellemző.

A Myo16Tail termodinamikai stabilitását vizsgálva DSC méréseket végeztünk. A kalorimetriás kísérletek 0,3 K/min felfűtési sebesség mellett azt mutatták, hogy a Myo16Tail feltehetően aggregációra hajlamos, majd az aggregátumok olvadásából adódik, hogy magasabb hőmérsékleten fokozatosan nő a hőáram változás endoterm (negatív hőáram) irányban. A kontroll G-aktin kalorimetriás mérés jól reprezentálja egy rendezett szerkezeti elemekben gazdag fehérje kooperatív kitekeredését (**26. A ábra**). A fehérje aggregátumok exoterm reakció során jönnek létre [212]. Annak érdekében, hogy a Myo16Tail aggregációt nyomon tudjuk követni további méréseket végeztünk alacsonyabb felfűtési sebesség mellett (0,1 K/min). Az eredmények alapján a Myo16Tail pozitív irányú hőáram változást mutatott (**26. B ábra**), ami az aggregálódásnak, a hidrofób kölcsönhatások növekedéséből származó kooperatív exoterm termikus szerkezeti feltekeredésnek lehet a következménye [213]. A kalorimetriás mérések alapján a Myo16Tail termodinamikailag instabil és hajlamos az aggregációra, a kooperatív exoterm termikus feltekeredésre. A Myo16Tail feltételezett aggregációját a hődenaturációs CD méréseink is megerősítik.

5.3 MYO16TAIL BIOKÉMIAI KARAKTERIZÁLÁSA

A Myo16Tail eddig még nem tisztázott funkcióinak vizsgálata érdekében steady-state anizotrópia és aktin polimerizációs kísérleteket végeztünk. A szakirodalomból ismert, hogy számos miozin C-terminális képes intramolekuláris kölcsönhatás révén kötődni a fehérje N-terminális végéhez [39,41,42,216,217]. Anizotrópia kísérleteinkben a Myo16Tail mérsékelt affinitással kötődött az Alexa568-jelölt Myo16Ank-hoz ($K_D = 2,5 \mu\text{M} \pm 0,2 \mu\text{M}$) (**27. A ábra**). Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy az IQ motívum befolyásolja-e a Myo16Tail:Myo16Ank komplex kialakulását, affinitását. Ehhez a továbbiakban az IQ motívumot nem tartalmazó rekombináns Myo16Tail (-IQ) kötési tulajdonságait vizsgáltuk. Az anizotrópia mérések során a Myo16Tail (-IQ) szintén képes volt kötődni az Alexa568-jelölt Myo16Ank-hoz, de az affinitás gyengébb volt ($K_D = 5,6 \mu\text{M} \pm 0,02 \mu\text{M}$) (**27. B ábra**). Végül a szintetizált Alexa568-jelölt Myo16IQ anizotrópiáját vizsgáltuk Myo16Ank jelenlétében. Az anizotrópia mérések azt mutatták, hogy a Myo16IQ önmagában is kötődhet a Myo16Ank-hoz azonban a lényegesen kisebb affinitással ($K_D = 16,04 \mu\text{M} \pm 2,9 \mu\text{M}$) (**28. ábra**), mint a Myo16 C-terminális tail jelenlétében. A steady-state anizotrópia méréseink alapján a C-terminális Myo16Tail kötődik az N-terminális Myo16Ank-hez, a Myo16IQ jelenléte minden bizonnyal befolyásolja ezt az intramolekuláris kölcsönhatást.

Korábbi kísérletek kolokalizációt mutattak ki COS7 sejtekbe transzfektált GFP-jelölt Myo16Tail és nukleáris aktin filamentumok, valamint profilin-hez kapcsolódó struktúrák között [36]. További steady-state anizotrópia kísérletekkel vizsgáltuk, hogy a Myo16Tail képes-e kötődni az Alexa568-jelölt profilin 1 fehérjéhez (PFN1). Myo16Tail-lel titrálva az Alexa568–profilin-t nem tapasztaltunk szignifikáns változást az anizotrópiában, ami arra utal, hogy a Myo16Tail nem kötődik a profilin fehérjéhez (**29. A ábra**). A profilin kötődés lehetőségét Alexa568-jelölt profilin–G-aktin komplexen keresztül is tanulmányoztuk. Feltételezéseink szerint a profilin konformációja a G-aktinnal komplexet alkotva kedvező irányban változhat a Myo16Tail kötődés számára. Az anizotrópia eredmények nem mutattak szignifikáns változást a kontroll profilin–G-aktin komplex és profilin–G-aktin+Myo16Tail között ($p > 0,05$) (**29. B ábra**). Ez arra enged következtetni, hogy a Myo16Tail nem kötődik a profilinhez G-aktin hiányában és jelenlétében sem.

Pirén-jelölt G-aktin polimerizációs kísérletekkel vizsgáltuk a Myo16Tail hatását a polimerizáció dinamikájára. Eredményeink alapján a Myo16Tail nem kötődik a pirén-jelölt G-aktin monomerekhez és nem befolyásolja a polimerizáció sebességét profilin hiányában és jelenlétében sem (**30. ábra; 7. táblázat**).

6. KONKLÚZIÓ

A Myo16 C-terminális fark (Myo16Tail) flexibilis, rendezetlen szerkezetű régiókat tartalmazó molten globula konformációs állapota számos funkcionális előnyt biztosíthat a Myo16 számára. A Myo16Tail molten globula konformációja segíthet megérteni a mérsékelt affinitású, nagy specificitású interakciók jelentőségét partner fehérjék jelenlétében, úgy mint szignál transzdukciós folyamatokban (PI3K, WAVE1), illetve a konformációs állapot evolúciós előnyeit foszforilációs folyamatokban (Fyn kináz foszforilált Myo16Tail) [53].

A Myo16Tail molten globula konformációja ugyancsak kedvező lehet az általunk leírt lehetséges szabályozási aspektusban, miszerint a Myo16Tail feltehetően flexibilis módon, visszahajolva kötődik az N-terminális Myo16Ank-hoz. Kengyel és munkatársai leírták, hogy a Myo16Ank megnöveli a modell rendszerként használt miozin II motor domén ATPáz aktivitását [43]. A miozinok körében a visszahajló autoregulációs mechanizmusok általában funkciók gátlásában nyilvánulnak meg [30]. Ennél fogva, a Myo16Tail egy lehetséges funkciója a motor domén ATPáz aktivitásának negatív szabályozása a Myo16Ank interakción keresztül.

További funkcionális eredményeink azt mutatták, hogy a Myo16Tail nem kötődik a profilin 1 izoformához (PFN1) és nem képes befolyásolni az aktin polimerizáció dinamikáját profilin hiányában és jelenlétében sem. Ezeket az eredményeket alátámasztja a Clustal-X által végzett gerinces fajok Myo16Tail szekvenciáinak összehasonlító analízise, miszerint a funkcionális motívumok közül a prolin-gazdag régió egyáltalán nem mutat konzerváltságot a Myo16Tail szekvenciákban. Továbbá a Myo16Tail prolin-gazdag régióban található profilin kötő szekvencia motívum sem felel meg a PRM1 profilin kötő motívumnak. Mindazonáltal érdekes felvetés, hogy a ROCK1 kináz által foszforilált profilin 1 [220] képes lehet-e kötődni a Myo16Tail-hez, vagy az idegrendszer specifikus profilin 2 izoforma (PFN2) lehet a feltételezett kötőpartner a Myo16Tail számára.

Összefoglalva az eredményeinket, a Myo16Tail natív molten globula konformációban bemutatóhelyként funkcionálhat, melynek szerepe lehet jelátviteli, poszttranszlációs módosulási folyamatokban, valamint autoregulációs szabályozásban. Ugyanakkor a Myo16Tail részben rendezetlen szerkezete fontos szerepet tölthet be a rendezetlen szerkezet-asszociált neurodegeneratív megbetegedések kialakulásában [223].

7. A TÉMÁBAN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK

A nem-konvencionális miozin XVI C-terminális (Myo16Tail) jelentős része tartalmaz rendezetlen fehérje régiókat a másodlagos szerkezeti elemek mellett. A fehérje konformáció és szerkezetvizsgálat során feltételezéseink szerint a Myo16Tail flexibilis, molten globula sajátságokkal rendelkezik.

- A Myo1Tail szekvencia és szerkezeti rendezetlenség predikciók nagyfokú rendezetlenséget mutatnak (~68%).
- A My16Tail szerkezeti rendezetlenségének összehasonlítása gerinces osztályok képviselőinek szekvenciáival nagyfokú konzerváltságot feltételez az evolúció során.
- A Myo16Tail szekvencia alapján a szerkezet nagymértékben flexibilis (~70%), a merev szerkezeti elemek aránya 20%, ugyanakkor részben kontextus-függő konformáció változás is valószínűsíthető (10%).
- A Myo16Tail számos prediktált foszforilációs helyet tartalmaz, melyek jelentős része konzervált a gerinces Myo16Tail szekvenciák között.
- A Myo16Tail szerkezeti modellje alátámasztja a bioinformatikai eredményeket, miszerint jelentős része rendezetlen és flexibilis szerkezeti sajátságokkal rendelkezik.
- A Myo16Tail enyhe kooperatív denaturációt és csekély spektrális eltolódást mutat.
- A Myo16Tail szerkezet hozzáférhetőbb ($K_{SV}=2,59 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}$) a kioltó számára a Stern-Volmer együtthatók alapján összehasonlítva a kontroll G-aktinével ($K_{SV}=1,98 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}$), valamint a Myo16Tail kioltás esetén a statikus kioltás dominál a dinamikkal szemben.
- A Myo16Tail esetén denaturáló szer hiányában és jelenlétében is rendezetlenségre utaló gyors, kétfázisú konformációs dinamika figyelhető meg. A gyors komponens utal a triptofánok rotációjára, míg a lassabb komponens a Myo16Tail rotációs dinamikáját jellemzi.
- A Myo16Tail nagyfokú rendezetlenséget mutat CD-spektroszkópiai mérések alapján (44%), emellett a fordulat elemek aránya 15,2%, amivel összesen 59,2%-nak tekinthető a rendezetlen szerkezeti elemek aránya. A hődenaturációs CD eredmények szintén az alacsony kooperatív denaturációt támasztják alá.

- A Myo16Tail termodinamikai instabilitást mutat, valamint hajlamos aggregációra és az ebből következő exoterm kooperatív termikus feltekeredésre, ami szintén a rendezetlen szerkezetre utalhat.

A nem-konvencionális miozin XVI C-terminális (Myo16Tail) funkcionális vizsgálatai kimutattuk, hogy kölcsönhat az N-terminális ankyrin doménnel (Myo16Ank) ezáltal szabályozhatja a fehérje funkcióját. A Myo16Tail nem kötődik a profilinhez és nem képes befolyásolni az aktin polimerizáció kinetikáját.

- A Myo16Tail képes kötődni az N-terminális Myo16Ank-hoz ($K_D = \sim 2,5 \mu\text{M}$), ami egy autoregulációs intramolekuláris interakcióra alapját jelentheti. Az IQ motívumot nem tartalmazó rekombináns Myo16Tail (-IQ) szintén képes kötődni a Myo16Ank-hoz gyengébb affinitással ($K_D = \sim 5,6 \mu\text{M}$). A szintetizált izolált Myo16IQ gyenge affinitást mutat a Myo16Ank-hoz ($K_D = \sim 16 \mu\text{M}$) ami révén a Myo16IQ befolyásolhatja a C-terminális Myo16Tail kötődését a Myo16Ank-hoz.
- A profilin nem képes kölcsönhatni a Myo16Tail prolin-gazdag régiójával, valamint a profilin-G-aktin komplex kialakulását követően sem jön létre a profilin számára kedvezőbb konformáció, ami által képes lenne kötődni.
- A Myo16Tail nem kötődik a profilinhez és az aktinhoz, valamint nem befolyásolja az aktin polimerizációs dinamikát profilin hiányában és jelenlétében.

8. RÖVIDÍTÉSEK

ANS	1-anilino-8-naftalin szulfonát
Arp2/3	actin related protein 2/3
ASD	autism spectrum disorder
BME	β -merkaptoetanol
DNS	dezoxiribonukleinsav
DSC	differential scanning calorimetry
DTT	ditiotritol, 1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol
CaM	kalmodulin
EGTA	etilén glikol tetraecetsav
ELC	esszenciális könnyű lánc
F-aktin	filamentális aktin
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching
G-aktin	globuláris aktin
5hmC	5-hidroximetil citozin
HRP	horseradish peroxidase
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
IRF	impulzus válasz függvény – instrument response function
LB	Luria broth
5mc	5-metil citozin
MG	molten globula
MOPS	3-morfolinopropán-1szulfonil sav
MoRE	molecular recognition element
Myo16	miozin 16
Myo16Ank	miozin 16 ankyrin domén

Myo16Tail	miozin 16 C-terminális farok domén
MyPhoNE	miozin foszfatáz N-terminális elem
MYPT	miozin foszfatáz célzó alegység
mRNS	messenger ribonukleinsav
NES	nukleáris export szignál
NLS	nukleáris lokalizációs szignál
NHM	NYAP homológia motívum
NYAP	neuronal tyrosine-phosphorylated adaptor for the PI3K
IDP	intrinsically disordered protein
IDR	intrinsically disordered region
PMG	pre-molten globula
PCNA	proliferáló sejt nukleáris antigén
PCR	polymerase chain reaction
PCS	performed structural element
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid
PI3K	foszfoinozid 3-kináz
PP1c	protein foszfatáz 1 katalitikus alegység
PPII	poliprolin II
PRM	proline-rich motif
RLC	regulatórikus könnyűlánc
SDS	nátrium-dodecilszulfát
skHMM	skeletal heavy meromyosin
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TBST	Tris-buffered Saline with Tween-20
WIR	Wave interacting region
WRC	Wave regulatory complex

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik hozzájárultak a tudományos pályán elért eredményeimhez és szakmai fejlődésemhez.

*Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Nyitrai Miklósnak**, a Biofizikai Intézet igazgatójának, a PTE ÁOK dékánjának, hogy lehetőséget biztosított számomra a tudományos pályám elkezdéséhez a Biofizikai Intézetben, valamint a sok, hasznos szakmai tanácsáért.*

*Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Kengyel Andrásnak**, aki segített elindulni a kutatói pályán és szakmai tanácsaival rengeteg segítséget nyújtott a labormunka kezdeti nehézségeiben.*

*Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek **Dr. Lukács Andrásnak**, a Biofizikai Intézet igazgatóhelyettesének, és **Dr. Bugyi Beátának**, a Biofizikai Intézet egyetemi docensének, akik témérdek szakmai tanácsot és iránymutatást adtak, hogyan válhatok jobb kutatóvá. Számos helyzetben példát mutattak, hogy miként gondolkodik egy jó kutató. Pozitív kritikai észrevételeikből sokat tanulhattam, ami nagyban hozzájárult szakmai fejlődésemhez.*

*Köszönettel tartozom **Dr. Ujfalusi Zoltánnak** a hétköznapi nyújtott baráti légkörért és szakmai tanácsokért, valamint **Dr. Fekete Zsuzsannának**, **Karádi Kristófnak** és **minden kollégámnak**, akik tanácsokkal és a laboratóriumban segítették munkámat.*

*Továbbá szeretném megköszönni a Biofizikai Intézet dolgozóinak a mindennapi munka során nyújtott önzetlen segítségüket és baráti légkört, különös tekintettel a laboratóriumok vezetőinek: **Brunner Jánosnének** „Ilike”, **Hoffmanné Simon Évának**, **Heppné Konrád Ildikónak** és **Garajszkyné Papp Erzsébetnek** „Zsóka”.*

*Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Kardos Józsefnek** (ELTE, TTK Biokémiai tanszék) a gyümölcsöző együttműködésért.*

Végül, de nem utolsó sorban, hálás köszönettel tartozom menyasszonyomnak, **Dr. Németh Gittának** a türelméért és lelki támogatásáért a mindennapokban.

*A kutatás az **OTKA K112794**, **ÚNKP 17-3-1**, és **EFOP-3.6.1-16-2016-00004** pályázatok támogatásával valósult meg.*

10. REFERENCIÁK

1. Kühne, W. *Untersuchungen über das Protoplasma und die Contractilität*; W. Engelmann, Ed.; Leipzig, 1864;
2. Engelhardt, W.A.; Lyubimova, M.N. Myosin and adenosine triphosphatase. *Nature* **1939**, *144*, 668–669.
3. Szent-Györgyi, A.; Banga, I. Adenosinetriphosphatase. *Science (80-.)*. **1941**, *93*, 158.
4. Bugyi, B.; Kellermayer, M. The discovery of actin: “to see what everyone else has seen, and to think what nobody has thought”*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **2020**, *41*, 3–9.
5. Bugyi, B. Actin and actin binding proteins. In *Muscle contraction: a Hungarian perspective*; M.S. Kellermayer, Ed.; Semmelweis Publishers: Budapest, 2018.
6. Straub, B.F. Actin. In Szent-Györgyi A, editor. *Studies from the Institute of Medical Chemistry University of Szeged.* **1942**, 3–15.
7. Richards, T.A.; Cavalier-Smith, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* **2005**, *436*, 1113–1118.
8. Foth, B.J.; Goedecke, M.C.; Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *PNAS* **2006**, *103*, 3681–3686.
9. Thompson, R.F.; Langford, G.M. Myosin superfamily evolutionary history. *Anat. Rec.* **2002**, *268*, 276–289.
10. Redowicz, M., J. Unconventional myosins in muscle. *Eur. J. Cell Biol.* **2007**, *86*, 549–558.
11. Berg, J.S.; Powell, B.C.; Cheney, R.E. A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 780–94.
12. Valerie, M., Penny, L. P., M.S.M. Unconventional Myosins in Cell Movement , Membrane Traffic , and Signal Transduction. **2016**, *279*, 527–533.
13. Schliwa, M., W.G. Molecular motors. *Nature* **2003**, *422*, 759–765.
14. Coluccio, L.M. *Myosins, A Superfamily of Molecular Motors. Series: Advances in Experimental Medicine and Biology.*; 2nd ed.; Springer International Publishing, Switzerland, 2020;
15. Odronitz, F.; Kollmar, M. Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol.* **2007**, *8*, 1–23.
16. Sebé-Pedrós, A.; Grau-Bové, X.; Richards, T.A.; Ruiz-Trillo, I. Evolution and classification of myosins, a paneukaryotic whole-genome approach. *Genome Biol. Evol.* **2014**, *6*, 290–305.
17. Bähler, M.; Rhoads, A. Calmodulin signaling via the IQ motif. *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 107–113.
18. Krendel, M.; Mooseker, M.S.; Physiol, A.J.; Physiol, C. Myosins : Tails (and Heads) of Myosin Superfamily : Diversity of. *Physiology* **2005**, *20*, 239–251.
19. Sellers, J.R. Myosins: A diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*

- 2000**, 1496, 3–22.
20. Sellers, J.R. *Myosins*; 2nd ed.; Oxford University Press, 1999;
 21. Billington, N.; Beach, J.R.; Heissler, S.M.; Remmert, K.; Guzik-Lendrum, S.; Nagy, A.; Takagi, Y.; Shao, L.; Li, D.; Yang, Y.; et al. Myosin 18A coassembles with nonmuscle myosin 2 to form mixed bipolar filaments. *Curr. Biol.* **2015**.
 22. Billington, N.; Heissler, S.; Guzik-Lendrum, S.; Sellers, J. Interaction of myosin 18A with nonmuscle myosin 2. *Mol. Biol. Cell* **2013**, 24.
 23. Taft, M.; Latham, S. Myosin XVIII. In *Series: Advances in Experimental Medicine and Biology. Myosins, A Superfamily of Molecular Motors*; Lynne, M.C., Ed.; Springer International Publishing, Switzerland, 2020; pp. 421–438.
 24. Chantler, P.D.; Wylie, S.R.; Wheeler-Jones, C.P.; McGonnell, I.M. Conventional myosins - unconventional functions. *Biophys. Rev.* 2010, 2, 67–82.
 25. Ushakov, D.S. Structure and function of the essential light chain of myosin. *Biophysics (Oxf)*. **2008**, 53, 505–509.
 26. Pollard, L.W.; Lord, M. Getting myosin-V on the right track: Tropomyosin sorts transport in yeast. *Bioarchitecture* **2014**, 4, 35–38.
 27. Buss, F.; Spudich, G.; Kendrick-Jones, J. MYOSIN VI: Cellular Functions and Motor Properties. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2004**, 20, 649–676.
 28. Akhmanova, A.; Hammer, J.A. Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, 22, 479–487.
 29. Hartman, M.A.; Spudich, J.A. The myosin superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 2012, 125, 1627–1632.
 30. Batters, C.; Veigel, C. Mechanics and Activation of Unconventional Myosins. *Traffic* **2016**, 17, 860–871.
 31. Hartman, M.A.; Finan, D.; Sivaramakrishnan, S.; Spudich, J.A. Principles of Unconventional Myosin Function and Targeting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2016**, 27, 133–155.
 32. Krendel, M.; Mooseker, M.S. Myosins : Tails (and Heads) of Myosin Superfamily : Diversity of. **2018**, 239–251.
 33. Mitsuo Ikebe, Akira Inoue, So Nishikawa, Kazuaki Homma, Hiroto Tanaka, Atsuko Hikikoshi Iwane, Eisaku Katayama, Reiko Ikebe, and T.Y. Motor Function of Unconventional Myosin. In *Sugi H. (eds) Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction. Advances in Experimental Medicine and Biology.vol 538.*; Springer: Boston, MA, 2003; pp. 143–157.
 34. Patel, K.G.; Liu, C.; Cameron, P.L.; Cameron, R.S. Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1alpha and 1gamma1. *J. Neurosci.* **2001**, 21, 7954–7968.
 35. Hodge, T.; Cope, M.J.T.V. A myosin family tree. *J. Cell Sci.* **2000**, 113, 3353–3354.
 36. Cameron, R.S.; Liu, C.; Mixon, A.S.; Pihkala, J.P.S.; Rahn, R.J.; Cameron, P.L. Myosin16b: The COOH-tail region directs localization to the nucleus and

- overexpression delays S-phase progression. *Cell Motil. Cytoskeleton* **2007**, *64*, 19–48.
37. Akhmanova, A.; Hammer, J.A. Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2010, *22*, 479–487.
 38. Foth, B.J.; Goedecke, M.C.; Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *PNAS* **2006**, *103*, 3681–6.
 39. Milton, D.L.; Schneck, A.N.; Ziech, D.A.; Ba, M.; Facemyer, K.C.; Halayko, A.J.; Baker, J.E.; Gerthoffer, W.T.; Cremo, C.R. Direct evidence for functional smooth muscle myosin II in the 10S self-inhibited monomeric conformation in airway smooth muscle cells. *PNAS* **2011**, *108*, 1421–1426.
 40. Umeki, N.; Jung, H.S.; Sakai, T.; Sato, O.; Ikebe, R.; Ikebe, M. Phospholipid-dependent regulation of the motor activity of myosin X. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 783–788.
 41. Wang, F.; Thirumurugan, K.; Stafford, W.F.; Hammer, J.A.; Knight, P.J.; Sellers, J.R. Regulated Conformation of Myosin V. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2333–2336.
 42. Yang, Y.; Baboolal, T.G.; Siththanandan, V.; Chen, M.; Walker, M.L.; Knight, P.J.; Peckham, M.; Sellers, J.R. A FERM domain autoregulates Drosophila myosin 7a activity. *PNAS* **2009**, *106*, 4189–4194.
 43. Kengyel, A.; Bécsi, B.; Kónya, Z.; Sellers, J.R.; Erdódi, F.; Nyitrai, M. Ankyrin domain of myosin 16 influences motor function and decreases protein phosphatase catalytic activity. *Eur. Biophys. J.* **2015**, *44*, 207–218.
 44. Bennett, V.; Stenbuck, P.J. Identification and partial purification of ankyrin, the high affinity membrane attachment site for human erythrocyte spectrin. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 2533–2541.
 45. Sedgwick, S.G.; Smerdon, S.J. The ankyrin repeat: a diversity of interaction on a common structural framework. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *4*, 311–316.
 46. Li, J.; Mahajan, A.; Tsai, M.D. Ankyrin repeat: A unique motif mediating protein-protein interactions. *Biochemistry* **2006**, *45*, 15168–15178.
 47. Mosavi, L.; Cammett, T. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 1435–1448.
 48. Hartshorne, D.J.; Ito, M.; Erdódi, F. Myosin light chain phosphatase: Subunit composition, interactions and regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1998**, *19*, 325–341.
 49. Bement, W.M.; Hasson, T.; Wirtht, J.A.; Cheney, R.E.; Mooseker, M.S. *Identification and overlapping expression of multiple unconventional myosin genes in vertebrate cell types myosin II" paradigm for actin-based movement in the typical eukaryotic cell. MATERIALS AND METHODS PCR Amplification of Myosins, Sequencing, and Library;* 1994; Vol. 91;.
 50. Heissler, S.M.; Sellers, J.R. Myosin light chains: Teaching old dogs new tricks. *Bioarchitecture.* **2014**, *4*, 169–188.
 51. Heissler, S.; Billington, N.; Sellers, J. Myosin-3B and its Light Chains. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 178a.
 52. McDonnell, A. V.; Jiang, T.; Keating, A.E.; Berger, B. Paircoil2: Improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics* **2006**, *22*, 356–358.

53. Yokoyama, K.; Tezuka, T.; Kotani, M.; Nakazawa, T.; Hoshina, N.; Shimoda, Y.; Kakuta, S.; Sudo, K.; Watanabe, K.; Iwakura, Y.; et al. NYAP: a phosphoprotein family that links PI3K to WAVE1 signalling in neurons. *EMBO J.* **2011**, *30*, 4739–4754.
54. Consler, T.G.; Kaback, H.R.; Tsolas, O.; Tsolas, O. Role of Proline Residues in the Structure and Function of a Membrane Transport Protein. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1291–1298.
55. Semple, B.D.; Blomgren, K.; Gimlin, K.; Ferriero, D.M.; Noble-Haeusslein, L.J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* **2013**, *106–107*, 1–16.
56. Cameron, R.S.; Liu, C.; Pihkala, J.P.S. Myosin 16 levels fluctuate during the cell cycle and are downregulated in response to DNA replication stress. *Cytoskeleton* **2013**, *70*, 328–348.
57. Roesler, M.K.; Lombino, F.L.; Freitag, S.; Schweizer, M.; Hermans-Borgmeyer, I.; Schwarz, J.R.; Kneussel, M.; Wagner, W. Myosin XVI Regulates Actin Cytoskeleton Dynamics in Dendritic Spines of Purkinje Cells and Affects Presynaptic Organization. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*.
58. Makoto, F., Shiro, A., Takahiro, N., Makoto, A., Minoru, Y., Mitsuhiko, Y., Eisuke, N. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Lett. to Nat.* **1997**, *390*, 308–311.
59. Lischka, P.; Rosorius, O.; Trommer, E.; Stamminger, T. A novel transferable nuclear export signal mediates CRM1-independent. *EMBO J.* **2001**, *20*, 7271–7283.
60. Hartshorne, D.J.; Ito, M.; Erdödi, F. Myosin light chain phosphatase: Subunit composition, interactions and regulation. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **1998**, *19*, 325–341.
61. Rebelo, S.; Santos, M.; Martins, F.; da Cruz e Silva, E.F.; da Cruz e Silva, O.A.B. Protein phosphatase 1 is a key player in nuclear events. *Cell. Signal.* **2015**, *27*, 2589–2598.
62. Bordelon, J.R.; Smith, Y.; Nairn, A.C.; Colbran, R.J.; Greengard, P.; Muly, E.C. Differential localization of protein phosphatase-1 α , β and γ 1 isoforms in primate prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* **2005**, *15*, 1928–1937.
63. Gao, J.; Hu, X.D.; Yang, H.; Xia, H. Distinct Roles of Protein Phosphatase 1 Bound on Neurabin and Spinophilin and Its Regulation in AMPA Receptor Trafficking and LTD Induction. *Mol. Neurobiol.* **2018**, *55*, 7179–7186.
64. Roesler, M.K.; Lombino, F.L.; Freitag, S.; Schweizer, M.; Hermans-Borgmeyer, I.; Schwarz, J.R.; Kneussel, M.; Wagner, W. Myosin XVI Regulates Actin Cytoskeleton Dynamics in Dendritic Spines of Purkinje Cells and Affects Presynaptic Organization. *Front. Cell. Neurosci.* **2019**, *13*, 330.
65. Geeves, M.A.; Holmes, K.C. STRUCTURAL MECHANISM OF MUSCLE CONTRACTION. **1999**, *68*, 687–728.
66. Bugyi, B., Kengyel, A. Myosin XVI. In *Series: Advances in Experimental Medicine and Biology. Myosins, A Superfamily of Molecular Motors*; Springer International Publishing, Switzerland, 2020; pp. 405–419.
67. Shimada, T.; Sasaki, N.; Ohkura, R.; Sutoh, K. Alanine scanning mutagenesis of the switch I region in the ATPase site of Dictyostelium discoideum myosin II. *Biochemistry*

- 1997**, *36*, 14037–14043.
68. Onishi, H.; Ohki, T.; Mochizuki, N.; Morales, M.F. Early stages of energy transduction by myosin: Roles of Arg in switch I, of Glu in switch II, and of the salt-bridge between them. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15339–15344.
 69. Heissler, S.M.; Sellers, J.R. Various Themes of Myosin Regulation. *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 1927–1946.
 70. Fili, N.; Toseland, C.P. Unconventional myosins: How regulation meets function. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 67.
 71. Bement, W.M.; Mooseker, M.S. TEDS Rule: A Molecular Rationale for Differential Regulation of Myosins by Phosphorylation of the Heavy Chain Head. *Cell Motil. Cytoskeleton* **1995**, *31*, 87–92.
 72. Brzeska, H.; Knaus, U.G.; Wang, Z.-Y.; Bokoch † ‡, G.M.; Korn, E.D. p21-activated kinase has substrate specificity similar to *Acanthamoeba* myosin I heavy chain kinase and activates *Acanthamoeba* myosin I. *PNAS Biochem.* **1997**, *94*, 1092–1095.
 73. Brzeska, H.; Lynch, T.J.; Martin, B.; Korn, E.D. The Localization and Sequence of the Phosphorylation Sites of *Acanthamoeba* Myosins I. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19340–19348.
 74. Dürrwang, U.; Fujita-Becker, S.; Erent, M.; Kull, F.J.; Tsiavaliaris, G.; Geeves, M.A.; Manstein, D.J. Dictyostelium myosin-IE is a fast molecular motor involved in phagocytosis. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 550–558.
 75. Attanapola, S.L.; Alexander, C.J.; Mulvihill, D.P. Ste20-kinase-dependent TEDS-site phosphorylation modulates the dynamic localisation and endocytic function of the fission yeast class I myosin, Myo1. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 3856–3861.
 76. Liu, X.; Lee, D.Y.; Cai, S.; Yu, S.; Shu, S.; Levine, R.L.; Korn, E.D. Regulation of the actin-activated MgATPase activity of *Acanthamoeba* myosin II by phosphorylation of serine 639 in motor domain loop 2. *PNAS* **2012**, *110*, E23–E32.
 77. Komaba, S.; Inoue, A.; Maruta, S.; Hosoya, H.; Ikebe, M. Determination of human myosin III as a motor protein having a protein kinase activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21352–21360.
 78. Quintero, O.A.; Unrath, W.C.; Stevens, S.M.; Manor, U.; Kachar, B.; Yengo, C.M. Myosin 3A kinase activity is regulated by phosphorylation of the kinase domain activation loop. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 37126–37137.
 79. Kambara, T.; Komaba, S.; Ikebe, M. Human myosin III is a motor having an extremely high affinity for actin. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37291–37301.
 80. Yoshimura, M.; Homma, K.; Saito, J.; Inoue, A.; Ikebe, R.; Ikebe, M. Dual Regulation of Mammalian Myosin VI Motor Function. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39600–39607.
 81. Hornbeck, P.; Zhang, B.; Murray, B.; M Kornhauser, J.; Latham, V.; Skrzypek, E. PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *43*, 512–520.
 82. Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; Mcgettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947–2948.

83. Collins, G.A., Goldberg, A.L. The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* **2017**, *169*, 792–806.
84. Johnson, D.F.; Moorhead, G.; Caudwell, F.B.; Cohen, P.; Chen, Y.H.; Chen, M.X.; Cohen, P.T.W. Identification of protein-phosphatase-1-binding domains on the glycogen and myofibrillar targeting subunits. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *239*, 317–325.
85. Ohno, K.; Hirose, F.; Sakaguchi, K.; Nishida, Y.; Matsukage, A. Transcriptional regulation of the drosophila CycA gene by the DNA replication-related element (DRE) and DRE binding factor (DREF). *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 3942–3946.
86. Rodgers, E.E.; Theibert, A.B. Functions of PI 3-kinase in development of the nervous system. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2002**, *20*, 187–197.
87. Shi, S.H.; Jan, L.Y.; Jan, Y.N. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* **2003**, *112*, 63–75.
88. Jaworski, J.; Spangler, S.; Seeburg, D.P.; Hoogenraad, C.C.; Sheng, M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase- Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 11300–11312.
89. Kumar, V.; Zhang, M.X.; Swank, M.W.; Kunz, J.; Wu, G.Y. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 11288–11299.
90. Mercati, O.; Danckaert, A.; André-Leroux, G.; Bellinzoni, M.; Gouder, L.; Watanabe, K.; Shimoda, Y.; Grailhe, R.; De Chaumont, F.; Bourgeron, T.; et al. Contactin 4, -5 and -6 differentially regulate neuritogenesis while they display identical PTPRG binding sites. *Biol. Open* **2013**, *2*, 324–334.
91. Tettamanti, G.; Kasahara, K.; Watanabe, K.; Kozutsumi, Y.; Oohira, A.; Yamamoto, T.; Sanai, Y. Association of GPI-Anchored Protein TAG-1 with Src-Family Kinase Lyn in Lipid Rafts of Cerebellar Granule Cells. *Neurochem. Res.* **2002**, *27*, 823–829.
92. Zeng, L.; D'alessandri, L.; Kalousek, M.B.; Vaughan, L.; Pallen, C.J. Protein Tyrosine Phosphatase (PTP) and Contactin Form a Novel Neuronal Receptor Complex Linked to the Intracellular Tyrosine Kinase fyn. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 707–713.
93. Salter, M.W.; Kalia, L. V. SRC kinases: A hub for NMDA receptor regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 317–328.
94. Bugyi, B.; Carlier, M.-F. Control of Actin Filament Treadmilling in Cell Motility. *Annu. Rev. Biophys.* **2010**, *39*, 449–470.
95. Carver, R.J.; Chen, B.; Chou, H.-T.; Brautigam, C.A.; Xing, W.; Yang, S.; Henry, L.; Doolittle, L.K.; Walz, T.; Rosen, M.K. Rac1 GTPase activates the WAVE regulatory complex through two distinct binding sites. *Elife* **2017**, *6*, e29795.
96. Koberstein, J.N.; Poplawski, S.G.; Wimmer, M.E.; Porcari, G.; Kao, C.; Gomes, B.; Risso, D.; Hakonarson, H.; Zhang, N.R.; Schultz, R.T.; et al. Learning-dependent chromatin remodeling highlights noncoding regulatory regions linked to autism. *Sci. Signal.* **2018**, *11*, eaan6500.
97. Telek, E.; Kengyel, A.; Bugyi, B. Myosin XVI in the Nervous System. *Cells* **2020**, *9*, 1903.
98. Kay, B.K.; Williamson, M.P.; Sudol, M. The importance of being proline: the interaction

- of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **2000**, *14*, 231–241.
99. Adam, L.R.; Trevor, P.C. Polyproline II helical structure in protein unfolded states: Lysine peptides revisited. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 980–985.
 100. Steven, L.P.; Jasbinder, S.S. Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 233–238.
 101. Florian, P.; James, A.B. Serine and Threonine Phosphorylation. In *Basic Neurochemistry, American Society for Neurochemistry*; Elsevier Inc., 2012; pp. 467–492.
 102. Iakoucheva, L.M.; Radivojac, P.; Brown, C.J.; O'Connor, T.R.; Sikes, J.G.; Obradovic, Z.; Dunker, A.K. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1037–1049.
 103. Stapley, B.J.; Creamer, T.P. A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 587–595.
 104. Alexei, A.A.; Michael, J.E.S. Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J. Mol. Biol.* **1993**, *229*, 472–493.
 105. Williamson, M.P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem. J* **1994**, *297*, 249–260.
 106. Holt, M.R.; Koffer, A. Cell motility: Proline-rich proteins promote protrusions. *Trends Cell Biol.* **2001**, *11*, 38–46.
 107. Ball, L.J.; Kühne, R.; Schneider-Mergener, J.; Oschkinat, H. Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44*, 2852–2869.
 108. Perelroizen, I.; Marchand, J.B.; Blanchoin, L.; Didry, D.; Carlier, M.F. Interaction of Profilin with G-Actin and Poly(l-proline). *Biochemistry* **1994**, *33*, 8472–8478.
 109. Vig, A.T.; Földi, I.; Szikora, S.; Migh, E.; Gombos, R.; Tóth, M.Á.; Huber, T.; Pintér, R.; Talián, G.C.; Mihály, J.; et al. The activities of the C-terminal regions of the formin protein Disheveled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 13566–13583.
 110. Michaelsen, K.; Murk, K.; Zagrebelsky, M.; Dreznjak, A.; Jockusch, B.M.; Rothkegel, M.; Korte, M. Fine-tuning of neuronal architecture requires two profilin isoforms. *PNAS* **2010**, *107*, 15780–15785.
 111. Pinto-Costa, R.; Sousa, S.C.; Leite, S.C.; Nogueira-Rodrigues, J.; da Silva, T.F.; Machado, D.; Marques, J.; Costa, A.C.; Liz, M.A.; Bartolini, F.; et al. Profilin 1 delivery tunes cytoskeletal dynamics toward CNS axon regeneration. *J. Clin. Invest.* **2020**, *130*, 2024–2040.
 112. Gerbec, Z.J.; Thakar, M.S.; Malarkannan, S. The Fyn-ADAP axis: Cytotoxicity versus cytokine production in killer cells. *Front. Immunol.* **2015**, *6*:472.
 113. Saksela, K.; Permi, P. SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 2609–2614.
 114. Yadav, S.S.; Miller, W.T. Cooperative activation of Src family kinases by SH3 and SH2

- ligands. *Cancer Lett.* **2007**, *257*, 116–123.
115. Rodriguez-Murillo, L.; Xu, B.; Roos, J.L.; Abecasis, G.R.; Gogos, J.A.; Karayiorgou, M. Fine mapping on chromosome 13q32-34 and brain expression analysis implicates MYO16 in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **2014**, *39*, 934–943.
 116. Twyman, R.M. Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. In *Encyclopedia of Neuroscience*; 2009 ISBN 9780080450469.
 117. Nakayama, M.; Kikuno, R.; Ohara, O. Protein-protein interactions between large proteins: Two-hybrid screening using a functionally classified library composed of long cDNAs. *Genome Res.* **2002**, *12*, 1773–1784.
 118. Patel, S.; Roncaglia, P.; Lovering, R.C. Using Gene Ontology to describe the role of the neurexin-neurologin-SHANK complex in human, mouse and rat and its relevance to autism. *BMC Bioinformatics* **2015**, *16*:186.
 119. Bhalla, K.; Luo, Y.; Buchan, T.; Beachem, M.A.; Guzauskas, G.F.; Ladd, S.; Bratcher, S.J.; Schroer, R.J.; Balsamo, J.; DuPont, B.R.; et al. Alterations in CDH15 and KIRREL3 in Patients with Mild to Severe Intellectual Disability. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *83*, 703–713.
 120. Liu, Y.F.; Sowell, S.M.; Luo, Y.; Chaubey, A.; Cameron, R.S.; Kim, H.G.; Srivastava, A.K. Autism and intellectual disability-associated KIRREL3 interacts with neuronal proteins MAP1B and MYO16 with potential roles in neurodevelopment. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–18.
 121. Gross, J.A.; Pacis, A.; Chen, G.G.; Drupals, M.; Lutz, P.-E.; Barreiro, L.B.; Turecki, G. Gene-body 5-hydroxymethylation is associated with gene expression changes in the prefrontal cortex of depressed individuals. *Transl. Psychiatry* **2017**, *7*, e1119.
 122. Kao, C.; Chen, H.; Chen, H.; Yang, J.; Huang, M.; Chiu, Y.; Lin, S.; Lee, Y.; Liu, C.; Chuang, L.; et al. Identification of Susceptible Loci and Enriched Pathways for Bipolar II Disorder Using Genome-Wide Association Studies. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2016**, *19*, 1–11.
 123. Konopaske, G.T.; Lange, N.; Coyle, J.T.; Benes, F.M. Prefrontal cortical dendritic spine pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *JAMA Psychiatry* **2014**, *71*, 1323–1331.
 124. Redfern, O.C.; Dessailly, B.; Orengo, C.A. Exploring the structure and function paradigm. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 394–402.
 125. Dunker, A.K.; Lawson, J.D.; Brown, C.J.; Williams, R.M.; Romero, P.; Oh, J.S.; Oldfield, C.J.; Campen, A.M.; Ratliff, C.M.; Hipps, K.W.; et al. Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* **2001**, *19*, 26–59.
 126. Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 527–533.
 127. Dyson, H.J.; Wright, P.E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 197.
 128. Turoverov, K.K.; Kuznetsova, I.M.; Uversky, V.N. The protein kingdom extended: Ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2010**, *102*, 73–84.
 129. Brown, C.J.; Takayama, S.; Campen, A.M.; Vise, P.; Marshall, T.W.; Oldfield, C.J.; Williams, C.J.; Keith Dunker, A. Evolutionary rate heterogeneity in proteins with long

- disordered regions. *J. Mol. Evol.* **2002**, *55*, 104–110.
130. Xue, B.; Brown, C.J.; Dunker, A.K.; Uversky, V.N. Intrinsically disordered regions of p53 family are highly diversified in evolution. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 725–738.
 131. Brown, C.J.; Johnson, A.K.; Dunker, A.K.; Daughdrill, G.W. Evolution and disorder. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2011, *21*, 441–446.
 132. Parker, J. Amino Acid Substitution. *Encycl. Genet.* **2001**, 57–58.
 133. Dunker, A. Keith, Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E. C., Brown, C.J. Intrinsic protein disorder in complete genomes. In Proceedings of the Genome Inform Ser Workshop Genome Inform.; 2000; pp. 161–171.
 134. Tompa, P.; Dosztányi, Z.; Simon, I. Prevalent structural disorder in *E. coli* and *S. cerevisiae* proteomes. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1996–2000.
 135. Ward, J.J.; Sodhi, J.S.; McGuffin, L.J.; Buxton, B.F.; Jones, D.T. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *J. Mol. Biol.* **2004**, *337*, 635–645.
 136. Wright, P.E.; Dyson, H.J. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 321–331.
 137. Uversky, V.; R. Gillespie, J.; L. Fink, A. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2000**, *41*, 415–427.
 138. Uversky, V.N. What does it mean to be natively unfolded? - Uversky - 2003 - European Journal of Biochemistry - Wiley Online Library. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *12*, 2–12.
 139. Jeng, M.; Englander, S.W. Stable Submolecular Folding Units in a Non-compact Form of Cytochrome c. *J. Mol. Biol* **1991**, *221*, 1045–1061.
 140. Staby, L.; O’Shea, C.; Willemoës, M.; Theisen, F.; Kragelund, B.B.; Skriver, K. Eukaryotic transcription factors: paradigms of protein intrinsic disorder. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 2509–2532.
 141. Fuxreiter, M.; Simon, I.; Friedrich, P.; Tompa, P. Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J. Mol. Biol.* **2004**, *338*, 1015–1026.
 142. Oldfield, C.J.; Cheng, Y.; Cortese, M.S.; Romero, P.; Uversky, V.N.; Dunker, A.K. Coupled Folding and Binding with α -Helix-Forming Molecular Recognition Elements. *Biochemistry* **2005**, *44*, 12454–12470.
 143. Tompa Péter Rendezetlen fehérjék, amelyek új megvilágításba helyezik a szerkezet-funkció-összefüggést. *Magy. Tudományos Akadémia folyóirata.* **2009**.
 144. Lee, R. Van Der; Buljan, M.; Lang, B.; Weatheritt, R.J.; Daughdrill, G.W.; Dunker, a K.; Fuxreiter, M.; Gough, J.; Gsponer, J.; Jones, D.T.; et al. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6589–6631.
 145. Darling, A.L.; Uversky, V.N. Intrinsic disorder and posttranslational modifications: The darker side of the biological dark matter. *Front. Genet.* 2018, *9*.

146. DeForte, S.; Uversky, V.N. Order, disorder, and everything in between. *Molecules* **2016**, *21*, 1090.
147. Tompa, P.; Szász, C.; Buday, L. Structural disorder throws new light on moonlighting. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 484–489.
148. Pancsa, R.; Fuxreiter, M. Interactions via intrinsically disordered regions: What kind of motifs? *IUBMB Life* **2012**, *64*, 513–520.
149. Vacic, V.; Iakoucheva, L.M. Disease mutations in disordered regions - Exception to the rule? *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 27–32.
150. Pajkos, M.; Mészáros, B.; Simon, I.; Dosztányi, Z. Is there a biological cost of protein disorder? Analysis of cancer-associated mutations. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 296–307.
151. Minde, D.P.; Anvarian, Z.; Rüdiger, S.G.D.; Maurice, M.M. Messing up disorder: How do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol. Cancer* **2011**, *10*.
152. Uversky, V.N.; Oldfield, C.J.; Dunker, A.K. Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D 2 Concept . *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 215–246.
153. Uversky, V.N. Intrinsically disordered proteins and their (disordered) proteomes in neurodegenerative disorders. *Front. Aging Neurosci.* **2015**, *7*.
154. Oldfield, C.J.; Meng, J.; Yang, J.Y.; Qu, M.Q.; Uversky, V.N.; Dunker, A.K. Flexible nets: Disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics* **2008**, *9*.
155. Uversky, V.N.; Dunker, a. K. Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, *1804*, 1231–1264.
156. Cozzetto, D.; Jones, D.T. The contribution of intrinsic disorder prediction to the elucidation of protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 467–472.
157. Collins, M.O.; Yu, L.; Campuzano, I.; Grant, S.G.N.; Choudhary, J.S. Phosphoproteomic analysis of the mouse brain cytosol reveals a predominance of protein phosphorylation in regions of intrinsic sequence diorder. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1331–1348.
158. Pejaver, V.; Hsu, W.L.; Xin, F.; Dunker, A.K.; Uversky, V.N.; Radivojac, P. The structural and functional signatures of proteins that undergo multiple events of post-translational modification. *Protein Sci.* **2014**, *23*, 1077–1093.
159. Dosztányi, Z.; Chen, J.; Dunker, A.K.; Simon, I.; Tompa, P. Disorder and Sequence Repeats in Hub Proteins and Their Implications for Network Evolution. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2985–2995.
160. Hsu, W.L.; Oldfield, C.J.; Xue, B.; Meng, J.; Huang, F.; Romero, P.; Uversky, V.N.; Dunker, A.K. Exploring the binding diversity of intrinsically disordered proteins involved in one-to-many binding. *Protein Sci.* **2013**, *22*, 258–273.
161. Yadava, A.; Ockenhouse, C.F. Effect of codon optimization on expression levels of a functionally folded malaria vaccine candidate in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 4961–4969.
162. Smialowski, P.; Doose, G.; Torkler, P.; Kaufmann, S.; Frishman, D. PROSO II - A new method for protein solubility prediction. *FEBS J.* **2012**, *279*, 2192–2200.

163. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*; 2005 ISBN 978-1-58829-343-5.
164. Romero, P.; Obradovic, Z.; Li, X.; Garner, E.C.; Brown, C.J.; Dunker, A.K. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2000**, *42*, 38–48.
165. Obradovic, Z.; Peng, K.; Vucetic, S.; Radivojac, P.; Brown, C.J.; Dunker, A.K. Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2003**, *53*, 566–572.
166. Peng, K.; Vucetic, S.; Radivojac, P.; Brown, C.J.; Dunker, A.K.; Obradovic, Z. Optimizing Long Intrinsic Disorder Predictors With Protein Evolutionary Information. *J. Bioinform. Comput. Biol.* **2005**, *3*, 35–60.
167. Obradovic, Z.; Peng, K.; Vucetic, S.; Radivojac, P.; Dunker, A.K. Exploiting heterogeneous sequence properties improves prediction of protein disorder. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2005**, *61*, 176–182.
168. Yang, Z.R.; Thomson, R.; McNeil, P.; Esnouf, R.M. RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3369–3376.
169. Dosztányi, Z.; Csizmok, V.; Tompa, P.; Simon, I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **2005**, *21*, 3433–3434.
170. Dosztányi, Z. Prediction of protein disorder based on IUPred. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 331–340.
171. Mészáros, B.; Erdős, G.; Dosztányi, Z. IUPred2A: Context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 329–337.
172. Cilia, E.; Pancsa, R.; Tompa, P.; Lenaerts, T.; Vranken, W.F. The DynaMine webserver: Predicting protein dynamics from sequence. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 264–270.
173. Cilia, E.; Pancsa, R.; Tompa, P.; Lenaerts, T.; Vranken, W.F. From protein sequence to dynamics and disorder with DynaMine. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2741.
174. Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **2014**, *12*, 7–8.
175. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer 2.0, San Diego: Dassault Systèmes, 2007.
176. Gomori, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In *Methods in Enzymology*; 1955; Vol. 1, pp. 138–146 ISBN 0076-6879.
177. Spudich, J.; Susm WATT, A. The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction. *J. Biol. Chem* **1971**, *246*, 4866–4871.
178. feuer G., M.F. Studies on the composition and polymerization of actin. *Hung. Acta Physiol.* **1948**, *1*, 150–163.
179. Niesen, F.H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2212–

2221.

180. Lucas, T.G.; Gomes, C.M.; Henriques, B.J. Thermal shift and stability assays of disease-related misfolded proteins using differential scanning fluorimetry. In *Protein Misfolding Diseases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*; Springer Science+Business Media, Berlin, Germany, 2019; Vol. 1873, pp. 255–264.
181. Uversky, V.N.; Fink, A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: The importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2004**, *1698*, 131–153.
182. Micsonai, A.; Bulyáki, É.; Kardos, J. BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. In *Structural Genomics: General Applications, Methods in Molecular Biology*; Yiu, Yo Wai Chen, C.-P.B., Ed.; Humana Press Inc., 2021; Vol. 2199, pp. 175–189.
183. Consler, T.G.; Kaback, H.R.; Tsolas, O.; Tsolas, O. Role of Proline Residues in the Structure and Function of a Membrane Transport Protein. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1291–1298.
184. Xie, X.; Harrison, D.H.; Schlichting, I.; Sweet, R.M.; Kalabokis, V.N.; Szent-Györgyi, A.G.; Cohen, C. Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution. *Nature* **1994**, *368*, 306–312.
185. Dyson, H. J., Peter, E.W. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 54–60.
186. Iakoucheva, L.M.; Radivojac, P.; Brown, C.J.; O'Connor, T.R.; Sikes, J.G.; Obradovic, Z.; Dunker, A.K. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1037–1049.
187. Gross, J.A.; Pacis, A.; Chen, G.G.; Drupals, M.; Lutz, P.E.; Barreiro, L.B.; Turecki, G. Gene-body 5-hydroxymethylation is associated with gene expression changes in the prefrontal cortex of depressed individuals. *Transl. Psychiatry* **2017**, *7*.
188. Chang, S.C.; Pauls, D.L.; Lange, C.; Sasanfar, R.; Santangelo, S.L. Sex-specific association of a common variant of the XG gene with autism spectrum disorders. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **2013**, *162*, 742–750.
189. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 725–738.
190. Dijkstra, M.J.J.; Fokkink, W.J.; Heringa, J.; van Dijk, E.; Abeln, S. The characteristics of molten globule states and folding pathways strongly depend on the sequence of a protein. *Mol. Phys.* **2018**, *116*, 3173–3180.
191. Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Proteomics Protoc. Handb.* **2005**, 571–607.
192. Alexander, R., William, R. L., Madeline, A.S. Intrinsic Fluorescence in Protein Structure Analysis. In *Methods in Protein Structure and Stability Analysis*; Nova Science Publishers, New York, 2007; pp. 55–72 ISBN ISBN: 1-60021-404-5.
193. Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer, New York, 2006; ISBN 978-0-387-31278-1 (Print) 978-0-387-46312-4 (Online).

194. Bortolotti, A.; Wong, Y.H.; Korsholm, S.S.; Bahring, N.H.B.; Bobone, S.; Tayyab, S.; Van De Weert, M.; Stella, L. On the purported “backbone fluorescence” in protein three-dimensional fluorescence spectra. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 112870–112876.
195. Kabsch, W.; Mannherz, H.G.; Suck, D.; Pai, E.F.; Holmes, K.C. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **1990**, *347*, 37–44.
196. Hild, G.; Bugyi, B.; Nyitrai, M. Conformational dynamics of actin: Effectors and implications for biological function. *Cytoskeleton* **2010**, *67*, 609–629.
197. Ptitsyn, O.B.; Uversky, V.N. The molten globule is a third thermodynamical state of protein molecules. *FEBS Lett.* **1994**, *341*, 15–18.
198. Uversky, V.N.; Ptitsyn, O.B. All-or-none solvent-induced transitions between native, molten globule and unfolded states in globular proteins. *Fold. Des.* **1996**, *1*, 117–122.
199. Semisotnov, G. V; Rodionova, N.A.; Uversky, V.N.; Cripas, A.F. Study of the “Molten Globule” Intermediate State in Protein Folding by a Hydrophobic Fluorescent Probe. *Biopolymers* **1991**, *31*, 119–128.
200. Turoverov, K.K.; Kuznetsova, I.M. Intrinsic Fluorescence of Actin. *J. Fluoresc.* **2003**, *13*, 41–57.
201. Béla S., Miklós Ny., G.H. No Title. In *Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Luminescence Spectroscopy and Circular Dichroism*; V. Uversky and E. Permyakov, Ed.; Nova Science Publishers, New York, 2007; pp. 153–185 ISBN 1-60021-404-5.
202. Eftink, M. Protein Fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Joseph R. Lakowicz, Ed.; Springer, 2006 ISBN ISBN-10: 0-387-31278-1.
203. Mátyus, L.; Szöllosi, J.; Jenei, A. Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2006**, *83*, 223–236.
204. Neyroz, P.; Ciurli, S.; Uversky, V.N. Denaturant-induced conformational transitions in intrinsically disordered proteins. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *896*, 197–213.
205. Nyitrai, M.; Hild, G.; Belágyi, J.; Somogyi, B. Spectroscopic study of conformational changes in subdomain 1 of G- actin: Influence of divalent cations. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2023–2032.
206. Dijkstra, D.S.; Broos, J.; Visser, A.J.W.G.; Van Hoek, A.; Robillard, G.T. Dynamic fluorescence spectroscopy on single tryptophan mutants of EII(mtl) in detergent micelles. Effects of substrate binding and phosphorylation on the fluorescence and anisotropy decay. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4860–4866.
207. Rodger, A. Far UV Protein Circular Dichroism. In *Encyclopedia of Biophysics*; Roberts, G.C.K., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 726–730 ISBN 978-3-642-16712-6.
208. Micsonai, A.; Wien, F.; Kernya, L.; Lee, Y.-H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *PNAS* **2015**, *112*, 3095–3103.
209. Micsonai, A.; Wien, F.; Bulyáki, É.; Kun, J.; Moussong, É.; Lee, Y.H.; Goto, Y.; Réfrégiers, M.; Kardos, J. BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure

- prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 315–322.
210. Mendes, L.F.S.; Garcia, A.F.; Kumagai, P.S.; De Moraes, F.R.; Melo, F.A.; Kmetzsch, L.; Vainstein, M.H.; Rodrigues, M.L.; Costa-Filho, A.J. New structural insights into Golgi Reassembly and Stacking Protein (GRASP) in solution. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–14.
 211. Sanchez-Ruiz, J.. Differential Scanning Calorimetry of Proteins. In *Proteins: Structure, Function and Engineering. Subcellular Biochemistry, vol 24.*; Biswas, B.B., Roy, S., Ed.; Springer, Boston, MA, 1995.
 212. Permyakov, S.E. Differential Scanning Microcalorimetry of Intrinsically Disordered Proteins. In *Intrinsically Disordered Protein Analysis*; V. Uversky and E. Permyakov, Ed.; 2012; Vol. 896, pp. 283–296 ISBN 978-1-4614-3703-1.
 213. Dzwolak, W.; Ravindra, R.; Lendermann, J.; Winter, R. Aggregation of bovine insulin probed by DSC/PPC calorimetry and FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11347–11355.
 214. Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* **2005**, *437*, 640–647.
 215. Kardos, R.; Nevalainen, E.; Nyitrai, M.; Hild, G. The effect of ADF/cofilin and profilin on the dynamics of monomeric actin. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2013**, *1834*, 2010–2019.
 216. Batters, C.; Brack, D.; Ellrich, H.; Averbeck, B.; Veigel, C. Calcium can mobilize and activate myosin-VI. *PNAS* **2016**, E1162-1169.
 217. Umeki, N.; Jung, H.S.; Sakai, T.; Sato, O.; Ikebe, R.; Ikebe, M. Phospholipid-dependent regulation of the motor activity of myosin X. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 783–788.
 218. Korenbaum, E.; Nordberg, P.; Björkegren-Sjögren, C.; Schutt, C.E.; Lindberg, U.; Karlsson, R. The Role of Profilin in Actin Polymerization and Nucleotide Exchange †. *Biochemistry* **1998**, *37*, 9274–9283.
 219. Neidt, E.M.; Scott, B.J.; Kovar, D.R. Formin differentially utilizes profilin isoforms to rapidly assemble actin filaments. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 673–684.
 220. Shao, J.; Welch, W.J.; Diprospero, N.A.; Diamond, M.I. Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 5196–5208.
 221. Sathish, K.; Padma, B.; Munugalavadla, V.; Bhargavi, V.; Radhika, K.V.N.; Wasia, R.; Sairam, M.; Singh, S.S. Phosphorylation of profilin regulates its interaction with actin and poly (L-proline). *Cell. Signal.* **2004**, *16*, 589–596.
 222. Shao, J.; Diamond, M.I. Protein phosphatase 1 dephosphorylates profilin-1 at ser-137. *PLoS One* **2012**, *7*, e32802.
 223. Uversky, V.N.; Oldfield, C.J.; Dunker, A.K. Intrinsically Disordered Proteins in Human Diseases: Introducing the D2 Concept. *Annu. Rev. Biophys.* **2008**, *37*, 215–246.

11. PUBLIKÁCIÓS LISTA

11.1 AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Telek Elek, Karádi Kristóf, Kardos József, Kengyel András, Fekete Zsuzsanna, Halász Henriett, Nyitrai Miklós, Bugyi Beáta, Lukács András. The C-terminal tail extension of myosin 16 acts as a molten globule, including intrinsically disordered regions, and interacts with the N-terminal ankyrin. *Journal of Biological Chemistry*. 297(1), 100716 (2021), **IF: 5,157**, Q1/D1

11.2 AZ ÉRTEKEZÉSHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Telek Elek, Kengyel András, Bugyi Beáta. Review: Myosin XVI in the Nervous System. *Cells*. 9, E1903. (2020), **IF: 4,366**, Q2/D2

11.3 AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEIT BEMUTATÓ ELŐADÁSOK

1. Telek Elek, Karádi Kristóf, Kardos József, Kengyel András, Nyitrai Miklós, Bugyi Beáta, Lukács András. A miozin 16 C-terminális szerkezetének karakterizálása spektroszkópiai módszerekkel. *MBTF Molekuláris Biofizika Szekció ülés*, miniszimpózium, Pécs, Hungary, 2020. 01. 28.
2. Telek Elek, Kengyel András, Nyitrai Miklós. A miozin 16 C-terminális domén biokémiai karakterizálása. *Emberi Erőforrások Minisztériuma, Új Nemzeti Kiválóság Program konferencia 2017*, Pécs, Hungary, 2018. 05. 25.
3. Telek Elek, Holló Alexandra, Bécsi Bálint, Kengyel András, Erdődi Ferenc, Nyitrai Miklós. Binding Properties of the Disordered Myosin 16 Tail Domain. *7th Interdisciplinary Doctoral Conference*. ISBN 978-963-429-210-4, Pécs, Hungary, 2018. 05. 17-19.
4. Telek Elek, Kengyel András, Nyitrai Miklós. A miozin 16 C-terminális domén interakciói és funkciói. *Magyar Biofizikai Társaság XXVI. Kongresszusa*, Szeged, Hungary, 2017. 08. 22-25.
5. Telek Elek, Kengyel András, Nyitra Miklós. Biochemical Characterization of Myosin 16 Tail domain. *5th Interdisciplinary Doctoral Conference*, Pécs, Hungary, 2016. 05. 27-29.

11.4 AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEIT BEMUTATÓ POSZTEREK

1. Telek Elek, Karádi Kristóf, Kengyel András, Kardos József, Beáta Bugyi, Nyitrai Miklós, Lukács András. A rendezetlen szerkezetű miozin 16 C-terminális szerkezeti karakterizálása. *Magyar Biofizikai Társaság XXVII. Kongresszusa*, Debrecen, Hungary, 2019. 08. 26-29.
2. Telek Elek, Kengyel András, Holló Alexandra, Kónya Zoltán, Erdődi Ferenc, Nyitrai Miklós. Functional characterization of the disordered myosin 16 tail domain. *Current Trend sin Biomedicine: Actin-based Mechanosensation and Force Generation in Health and Disease workshop*, Baeza, Spain, 2019. 11. 11-13.
3. Kengyel András, Telek Elek, Holló Alexandra, Nyitrai Miklós. Autoregulatory functions of myosin 16 domains. *47th European Muscle Conference*, Budapest, Hungary, 2018. 08. 30 - 09. 03.
4. Telek Elek, Holló Alexandra, Bécsi Bálint, Kengyel András, Erdődi Ferenc, Nyitrai Miklós. A rendezetlen szerkezetű miozin 16 C-terminális domén interakciói. *48. Membrán-Transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary, 2018. 05. 15-18.
5. Telek Elek, Holló Alexandra, Bécsi Bálint, Kengyel András, Erdődi Ferenc, Nyitrai Miklós. Binding Properties of the Disordered Myosin 16 Tail domain. *62nd Annual Meeting of the Biophysical Society*. San Francisco, CA, USA, 2018. 02. 17-21.
6. Kengyel András, Telek Elek, Kónya Zoltán, Bécsi Bálint, Erdődi Ferenc, Nyitrai Miklós. Biochemical Characterization of Myosin 16 Domains. *Hungarian Molecular Life Sciences*, Eger, Hungary, 2017. 03. 30. - 04. 02.
7. Kengyel András, Telek Elek, Kónya Zoltán, Bécsi Bálint, Erdődi Ferenc, Nyitrai Miklós. Interactions and Functions of Myosin 16 Domains. *61st Annual Meeting of the Biophysical Society*. New Orleans, LA, USA, 2017. 02. 11-15.
8. Kengyel András, Telek Elek, Nyitrai Miklós. Biochemical Characterization of Myosin 16 Domains. *15th Alpbach Motors Workshop*, Myosin and Muscle, and other Motors, 2016. 03. 12-18.

11.5 AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Telek Elek. A *Maculinea arion* előfordulása a Zselicben (Lepidoptera: Lycaenidae). *FOLIA HISTORICO NATURALIA MUSEI MATRAENSIS*. 2011, 35: 123-124.
2. Telek Elek, Vadkerti Edit, Kisbenedek Tibor. Distribution and importance in natural conservation of brachypter Orthoptera species in Hungary. X. *Carpathian-basin Environmental science conference*, Conference volume, ISSN 1842-9815
3. Bodó Kornélia, Yuya Hayashi, Gerencsér Gellért, László Zoltán, Kéri Albert, Galbács Gábor, Telek Elek, Mészáros Mária, Maria Deli, Bohdana Kokhanyuk, Németh Péter Engelmann Péter. Species-specific sensitivity of *Eisenia* earthworms towards noble metal nanoparticles: a multiparametric in vitro study. *Environmental Science: Nano*. DOI:10.1039/C9EN01405E. (2020), **IF: 7,683**, Q1/D1

11.6 IDÉZHETŐ ABSZTRAKTOK

1. Kengyel András, Elek Telek, Zoltán Kónya, Bálint Bécsi, Ferenc Erdődi, Miklós Nyitrai. Interactions and Functions of Myosin 16 Domains. *Biophysical Journal*, Vol: 112, Issue 3, p267a
2. Gabor Hild, Elek Telek, Zoltan Ujfalusi. The Effects of X-Ray Contrast Media on Actin. *Biophysical Journal*, Vol: 118 (3) pp: 437a

11.7 AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK

1. Telek Elek. Brachypter egyenesszárnyú (Orthoptera) taxonok előfordulása és természetvédelmi jelentősége Magyarországon. PTE TTK Tudományos Diákköri Konferencia, Pécs, Hungary, 2012. 05. 12.
2. Telek Elek. Az I-BAR domén szerepe a sejtnyúlványok létrehozásában, *PTE ÁOK Tudományos Diákköri Konferencia*, (2. helyezés) 2014. 04. 3-4.
3. Telek Elek. Az I-BAR domén szerepe a sejtnyúlványok létrehozásába, *Országos Tudományos Diákköri Konferencia*, (különdíj), Budapest, Hungary, 2015. 04. 02.

11.8 AZ ÉRTEKEZÉSHEZ NEM KAPCSOLÓDÓ POSZTEREK

1. Bohdana Kokhanyuk, Bodó Kornélia, Gerencsér Gellért, Telek Elek, Németh Péter, Engelmann Péter. Uncovering the intricate interactions of metal nanoparticles and *Eisenia andrei* immune cells. *Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences*. Pécs, Hungary, 2018. 10. 27.
2. Bodó Kornélia, Gerencsér Gellért, Kéri Albert, Galbács Gábor, Telek Elek, Mészáros Mária, Tolnai Gréta, Bohdana Kokhanyuk, Németh Péter, Engelmann Péter. Unravelling the hazards of metal nanomaterials: Comparative observations on invertebrate phagocytes. *Magyar Immunológiai Társaság 47. Vándorgyűlése*, Bükkfűdő, Hungary. 2018. 10. 17-19.
3. Bodó Kornélia, Tolnai Gréta, Bohdana Kokhanyuk, Gerencsér Gellért, Telek Elek, Mészáros Mária, Németh Péter, Engelmann Péter. Unravelling the hazards of metal nanoparticles: an in vitro approach, *8th Szeged International Workshop on Advances in Nanoscience*, Szeged, Hungary, 2018. 10. 7-10.
4. Bodó Kornélia, Gerencsér Gellért, Telek Elek, Mészáros Mária, Németh Péter, Engelmann Péter. Fém nanopartikulumok sejtkárosító hatása *Eisenia Andrei* és *Eisenia Fetida* immun sejteken. *48. Membrán-Transzport Konferencia*, Sümeg, Hungary, 2018. 05. 15-18.
5. Madarász Tamás, Brunner Brigitta, Futó Kinga, Telek Elek, Matkó János, Nyitrai Miklós, Szabó-Meleg Edina. Az IRSp53 fehérje szerepe a membrán nanocsövek kialakulásának mechanizmusában. *5th Interdisciplinary Doctoral Conference*, Pécs, Hungary, 2016. 05. 27-29.
6. Szabó-Meleg Edina, Madarász Tamás, Telek Elek, Brunner Brigitta, Halász Henriett, Futó Kinga, Matkó János, Nyitrai Miklós. In the footsteps of “intercellular highways”-formation and function of membrane nanotubes. *16th International ELMI meeting*, Debrecen, Hungary, 2016. 05. 24-27.
7. Szabó-Meleg Edina, Futó Kinga, Madarász Tamás, Telek Elek, Visegrády Balázs, Matkó János, Nyitrai Miklós. The role of IRSp53 protein in the formation of membrane nanotubes. *30th European cytoskeleton Forum Meeting*, Postojna, Slovenia, 2015. 08. 30.-09.04.

8. Szabó-Meleg Edina, Futó Kinga, Madarász Tamás, Telek Elek, Visegrády Balázs, Matkó János, Nyitrai Miklós. Az IRSp53 fehérje szerepe a membrán nanocsövek kialakulásában. *45. Membrán-Transzport konferencia*, Sümeg, Hungary, 2015. 05. 19-22.
9. Futó Kinga, Telek Elek, Nyitrai Miklós, Machesky Laura M., Visegrády Balázs. Az I-BAR domén szerepe a filopodiumok létrehozásában. *44. Membrán-Transzport konferencia*, Sümeg, Hungary, 2014. 05. 20-23.
10. Telek Elek, Futó Kinga, Visegrády Balázs. Az I-BAR domén szerepe a sejtnyúlványok létrehozásában. *XI. Jedlik Ányos Szakma Napok konferencia*, Veszprém, Hungary, 2014. 04. 10-12.
11. Telek Elek, Futó Kinga, Visegrády Balázs. Kontroll mechanizmusok a filopodium formálódásban. *XIX. Bolyai konferencia*, Budapest, Hungary, 2014. 03. 22-23.
12. Telek Elek, Kinga Futó, Balázs Visegrády: Control mechanisms in filopodia formation, *10th János Szentágothai Transdisciplinary Conference and Student Competition*, Pécs, Hungary, 2013. 11. 4-5.

Kumulatív impakt faktor: 17,206

Nyilvános idézők száma: 5

Független idézők száma: 0



The C-terminal tail extension of myosin 16 acts as a molten globule, including intrinsically disordered regions, and interacts with the N-terminal ankyrin

Received for publication, August 26, 2020, and in revised form, April 19, 2021. Published, Papers in Press, April 28, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100716>

Elek Telek^{1,2}, Kristóf Karádi^{1,3}, József Kardos⁴, András Kengyel^{1,2,3}, Zsuzsanna Fekete¹, Henriett Halász^{1,2}, Miklós Nyitrai^{1,2,3}, Beáta Bugyi^{1,3,*}, and András Lukács^{1,2,3,*}

From the ¹Department of Biophysics, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary; ²MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Interactions Research Group, Pécs, Hungary; ³Szentágotthai Research Center, Pécs, Hungary; and ⁴Department of Biochemistry, Institute of Biology, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

Edited by Enrique De La Cruz

The lesser-known unconventional myosin 16 protein is essential in proper neuronal functioning and has been implicated in cell cycle regulation. Its longer Myo16b isoform contains a C-terminal tail extension (Myo16Tail), which has been shown to play a role in the neuronal phosphoinositide 3-kinase signaling pathway. Myo16Tail mediates the actin cytoskeleton remodeling, downregulates the actin dynamics at the post-synaptic site of dendritic spines, and is involved in the organization of the presynaptic axon terminals. However, the functional and structural features of this C-terminal tail extension are not well known. Here, we report the purification and biophysical characterization of the Myo16Tail by bioinformatics, fluorescence spectroscopy, and CD. Our results revealed that the Myo16Tail is functionally active and interacts with the N-terminal ankyrin domain of myosin 16, suggesting an intramolecular binding between the C and N termini of Myo16 as an autoregulatory mechanism involving backfolding of the motor domain. In addition, the Myo16Tail possesses high structural flexibility and a solvent-exposed hydrophobic core, indicating the largely unstructured, intrinsically disordered nature of this protein region. Some secondary structure elements were also observed, indicating that the Myo16Tail likely adopts a molten globule-like structure. These structural features imply that the Myo16Tail may function as a flexible display site particularly relevant in post-translational modifications, regulatory functions such as backfolding, and phosphoinositide 3-kinase signaling.

Myosins form a large and versatile superfamily of actin-based motor proteins that convert the chemical energy of ATP hydrolysis into mechanical force required for motion along actin filaments (1). They are expressed in all eukaryotic organisms (2) and play essential roles in a variety of cellular processes, including organelle trafficking, cytokinesis, cell shape maintenance, or muscle contraction (3–7). A novel unconventional myosin was described in 2001 by Patel *et al.*

(8), which was originally named as myr8 (eighth unconventional myosin from rats) but later was designated as a new class: myosin XVI. Two myosin 16 (Myo16) splice variants have evolved: Myo16a, the shorter, cytoplasmic isoform and Myo16b, the predominant, longer isoform having an additional 590 amino acid extension on its C terminus. The unconventional Myo16 has an N-terminal premotor extension called the ankyrin domain composed of eight ankyrin repeats (Myo16Ank), followed by a conserved motor domain, an IQ motif in the neck region and a unique C-terminal tail extension in the Myo16b isoform (Myo16Tail) (Fig. 1).

The tail extensions are highly diverse among myosin classes both from structural and functional aspects. Some myosin tails contain α -helical regions and can form coiled-coil structure, allowing the myosin to dimerize (9), whereas other myosins are monomers containing functional domains, for example, Src homology 3, GTPase-activating protein, four-point-one, ezrin, radixin, moesin, or pleckstrin homology domains on their tail (10). This structural diversity can lead to numerous intracellular activities and functions, such as cargo binding, dimerization, cellular localization, anchoring-tethering, protein–protein interaction, kinase activity, or autoregulation (11–14).

In mammals, Myo16 is expressed predominantly in the embryonic and adult brain peaking during the 1 to 2 postnatal weeks in rats, and in a lesser amount, it can be found in some peripheral tissues. The expression of Myo16 coincides with neuronal cell migration, axonal extension, and dendritic elaboration (8). The N-terminal Myo16Ank interacts with the protein phosphatase 1 catalytic subunit and regulates its phosphatase activity (15). The protein phosphatase 1 catalytic subunit is involved in the control of synaptic plasticity, the mechanism of learning and memory (16). Myo16 is a component of the neuronal phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling pathway, in which it is phosphorylated by the Src family of tyrosine kinase Fyn at its C-terminal tail (17). Phosphorylated Myo16Tail interacts with PI3K and the WAVE1 regulatory complex (WRC) simultaneously. Thereby, Myo16 can mediate actin cytoskeleton remodeling through the WRC–actin-related protein 2/3 complex (17). In line with this,

* For correspondence: András Lukács, andras.lukacs@aok.pte.hu; Beáta Bugyi, beata.bugyi@aok.pte.hu.

Disordered Myo16Tail behaves as molten globule

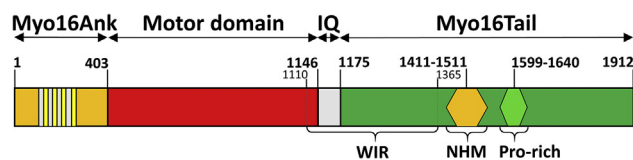


Figure 1. Domain organization of Myo16b. The numbers indicate the amino acid positions corresponding to the rat Myo16 (*Rattus norvegicus*, accession number: Q9ERC1). Myo16b (1912 aa, 210.56 kDa) is composed of an ankyrin repeat domain (Myo16Ank), a conserved motor domain followed by a single IQ motif and a C-terminal tail extension (Myo16Tail) containing a WAVE1 interacting region (WIR), a neuronal tyrosine-phosphorylated adaptor for phosphoinositide 3-kinase (NYAP) homology motif (NHM) and a proline-rich region. Myo16, myosin 16.

Myo16 downregulates actin dynamics at the postsynaptic side of dendritic spines of Purkinje cells. In addition, Myo16 is also implicated in the organization of presynaptic axon terminals of parallel fibers (18, 19). Comprehensively, Myo16 seems to be important in the regulation of the morphological and functional features of parallel fiber-Purkinje cell synapses. Nuclear localization of Myo16b was observed in the mouse cerebellum (P23, 31) *in vivo* (8, 20), which is attributed to the C-terminal tail, although this extension does not contain any typical nuclear localization sequence. Overexpression of Myo16 in COS7 cells delays the progression through the S phase, suggesting its role in cell cycle regulation (20). The motor domain function of Myo16 has not been described yet. The above findings suggest that Myo16 has a crucial role in different aspects of neuronal functioning. In addition, genetic alterations of *MYO16* were found to be involved in neurodegenerative disorders, including schizophrenia, autism spectrum disorder, bipolar disorder subtype II, and major depressive disorder (21–23), which underlines its important role in the proper functioning of the nervous system.

Myo16b has a multifaceted C-terminal extension consisting of a WAVE1 interacting region, a neuronal tyrosine-phosphorylated adaptor for PI3K homology motif (NHM) (17), a proline-rich (Pro-rich) region, and a distal C-terminal sequence element, which is presumed to be responsible for the nuclear localization of the protein through an atypical way (20) (Fig. 1). Besides the diversity in functional motifs, the C terminus of Myo16 is supposed to have a disordered structure (24). Disordered proteins and disordered regions lack a unique 3D structure in their native, functional state (25–27); therefore, these proteins or regions were named as intrinsically disordered proteins (IDPs) or intrinsically disordered regions (IDRs), respectively (27). IDPs can be classified by the level of the structural disorder, such as molten globules, pre-molten globules, and random coils (25). The main attributions of IDPs and IDRs are the irregular amino acid composition (high content of disorder-promoting and low content of order-promoting residues) resulting in a high net charge accompanied by electrostatic repulsion and low hydrophobicity, which precludes the formation of globular structure (28). The propensity of post-translational modifications (PTMs) is an important property of IDPs, which requires site accessibility; therefore, PTM sites are located particularly in disordered regions, providing a relatively large surface on the protein.

IDPs have been suggested to be enriched in phosphorylation sites (29). These structural properties have functional advantages in IDPs and IDRs, attributing structural flexibility and thus plasticity to adapt to contextual changes provided by low affinity and high specificity of binding as well as interaction with extended partners or environmental factors (25, 30–33). IDPs and IDRs are involved in an extended range of biological processes, such as cell cycle regulation, recognition, signal transduction, scaffolding, transcription, or chaperoning (26, 34–37). Some of these functions have been already described in connection to Myo16b (17, 20).

Here, we focused on the Myo16Tail to characterize its conformational dynamics and structural properties with the combination of sequence-based prediction, fluorescence, and CD spectroscopic approaches. For the first time, we described the expression and purification of Myo16Tail. *In silico* bioinformatic analysis was performed to investigate the structural behavior of Myo16Tail at the level of the primary amino acid sequence. The *in silico* findings were further addressed and confirmed experimentally.

Results

Sequence-based *in silico* analysis of Myo16Tail predicts disordered regions

Myo16Tail (1146–1912 amino acids, *Rattus norvegicus*, UniProt: Q9ERC1) consists of the 30 amino acids of an IQ motif, an NHM which is important in the neuronal PI3K signaling pathway, a Pro-rich region, and a very C-terminal sequence element (Fig. 1). To begin the characterization of the conformational properties of Myo16Tail, its primary sequence was analyzed. The analysis revealed that the sequence is dominated by disorder-promoting amino acids (A, G, R, D, H, Q, K, S, E, P) contributing about 68% to the total number of residues, whereas the order-promoting amino acids (W, F, Y, I, M, L, V, N, C, T) are present at only around 32%. It is noteworthy that the proportion of the well-known α -helical structure-breaker proline (38) is 15% of the total amino acid content; moreover, in the Pro-rich motif, it is as high as 30.7%.

Disorder prediction of rat Myo16Tail was performed with the combination of disorder predictors, including VLXT (39, 40), VL3-BA (41), VSL2b (42), Ronn (43), and IUPred (44–46) (Fig. 2A). Only the IQ motif was found to be relatively well ordered as expected (47); in contrast, the C-terminally located regions are characterized by a relatively high disorder probability. This analysis indicates that Myo16Tail is enriched in IDP regions. For additional confirmation, we analyzed the disorder probability of sequences of different vertebrate representatives of Myo16Tail using IUPred: *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *R. norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio*. Based on the IUPred prediction, the sequences of representatives display similarly high disorder probability, suggesting that the intrinsically disordered structure is conserved in Myo16Tail (Fig. 2B). In line with this, we analyzed the conservation of the Myo16Tail sequence from different vertebrate classes in multiple sequence alignment by using Clustal X (48) (Fig. S1). The analyses showed substantial

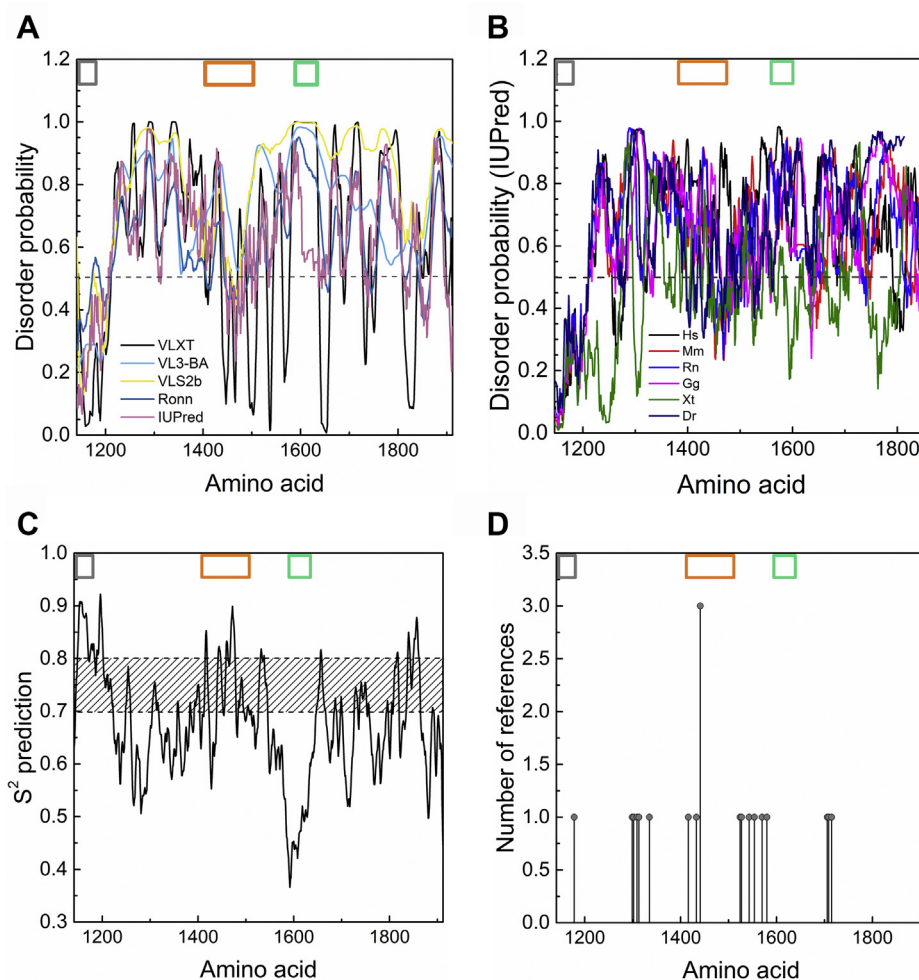


Figure 2. Secondary structure prediction and dynamic propensity analysis of Myo16Tail. The known regions of Myo16Tail are shown in gray (IQ), orange (NHM), and green (proline-rich) boxes. *A*, disorder prediction of Myo16Tail using the combination of VLXT (black), VL3-BA (light blue), VLS2b (yellow), RONN (dark blue), and IUPred (pink) servers. The horizontal dashed black line indicates the threshold at 0.5 value of disorder probability, above which the residue has more than 50% probability of being disordered. *B*, disorder conservation prediction of vertebrate class representatives of Myo16Tail by using IUPred. The following species sequences were used: *Homo sapiens* (Hs): Q9Y6X6, *Mus musculus* (Mm): Q5DU14, *Rattus norvegicus* (Rn): Q9ERC1, *Gallus gallus* (Gg): XP_416950.3, *Xenopus tropicalis* (Xt): A0A5G3JUG7, and *Danio rerio* (Dr): F1QE80. *C*, analysis of the dynamic characteristics of Myo16Tail using DynaMine. Low S^2_{pred} values (<0.7) indicate backbone flexibility, and high S^2_{pred} values (>0.8) suggest a rigid protein structure. The transient range (diagonally striped) indicates that in this zone, proteins have context-dependent dynamics. *D*, post-translational modification site prediction of Myo16Tail using PhosphoSitePlus. The prediction is based on the number of references. Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail; NHM, neuronal tyrosine-phosphorylated adaptor for PI3K homology motif.

amount of conservation of Myo16Tail in the IQ and NHM motifs but not in the Pro-rich region. In addition, other regions also display a considerable number of conservations, which suppose that the predicted disordered segments are mostly conserved, suggesting that the intrinsically disordered nature of Myo16Tail is conserved through the evolution (Fig. S1). Because Myo16Tail might be involved in neurodegenerative disorders (21–23), the conserved nature of the Myo16Tail structure can have significance in the functioning of the human Myo16.

The Myo16Tail sequence was further assessed with DynaMine (49, 50) to characterize the protein backbone flexibility (Fig. 2C). According to the DynaMine prediction, ~70% of Myo16Tail shows high backbone flexibility (S^2 values <0.7) and only ~20% of Myo16Tail has a rigid structure (S^2 values >0.8). There is a context-dependent range (10%) where the

protein of interest might be able to switch between conformational states or folding can occur toward a more ordered structure upon binding to a partner molecule (49, 50).

As IDRs are enriched in PTM sites, the PTMs of Myo16Tail were analyzed using PhosphoSitePlus (51) (Fig. 2D). The prediction showed that several phosphorylation sites might occur in Myo16Tail based on references (11 Ser, 4 Thr, 3 Tyr phosphorylation sites). To assess the relevance of these PTMs, the conservation of predicted Myo16Tail phosphosites was analyzed in the aforementioned multiple sequence alignment (Fig. S1). Three of the predicted phosphorylation sites are located in the NHM motif and shown to be fully conserved from fish to human. Two of them (Tyr¹⁴¹⁶ and Tyr¹⁴⁴¹) were identified to be phosphorylated by Fyn kinase that eventuates the recruitment of the p85 subunit of the PI3K and the activation of the PI3K signaling pathway (17). The rest of

Disordered Myo16Tail behaves as molten globule

phosphosites can be found particularly in the disordered regions, notably 10 of 14 phosphosites are fully conserved, and one of them is weakly similar (Fig. S1). The conservation of phosphosites suggests that phosphorylations in the disordered regions of Myo16Tail might have particular importance in the evolution of vertebrate Myo16.

Comprehensively, the sequence-based analysis suggests that Myo16Tail is characterized by an intrinsically disordered structure; however, structural data have not been available yet. For this reason, we created a 3D structural model of Myo16Tail by using Iterative Threading Assembly Refinement (I-TASSER) (52, 53) (Fig. 3). I-TASSER utilizes the Protein Data Bank to identify structural templates by multiple threading approaches. The 3D model of Myo16Tail predicts α -helical, β -sheet, and turn components besides the considerable amount of disordered structural elements. The confidence of the structural model was evaluated by the C-score (confidence-score), which is -1.95 in our model. C-score measures the quality of predicted models in the range of (-5, +2), where the higher the C-score, the more reliable the structural model. The model shows a mixture of secondary structural elements and a significant number of disordered segments, supposing a molten globule-like behavior of Myo16Tail. The molten globule state of a protein is less compact and more flexible and dynamic than a globular fold (54).

Expression and purification of Myo16Tail

To address experimentally the conformational characteristics of Myo16Tail, we successfully cloned and expressed it in Sf9/baculovirus system (Fig. 4). Because Myo16Tail showed low solubility under native protein preparation conditions, which might be caused by inclusion body formation, a denaturing buffer environment (6 M guanidine hydrochloride [GuHCl], 8 M urea pH 7, 6, and 4) was applied. The denatured, soluble Myo16Tail was purified via a His₆ affinity tag and renatured by gradually eliminating the denaturant during

dialysis. The concentration of routinely purified Myo16Tail was found to be ~1.7 mg/ml. The solubility of Myo16Tail was assessed by Protein Solubility evaluator II that predicted a value of 0.732, which classifies Myo16Tail as a rather soluble protein (55). The expression and purification results were analyzed and confirmed by SDS-PAGE and Anti-His Western blot (Fig. 4, B and C). We noted that Myo16Tail showed an anomalous electrophoretic migration (Fig. 4, B and C). The apparent molecular weight of Myo16Tail seemed to be ~120 kDa in SDS-PAGE, which is higher than that calculated based on its amino acid sequence (86.47 kDa, ProtParam) (56). This abnormal electrophoretic mobility is a characteristic feature of IDPs, which could result from poor interaction with SDS molecules because of their irregular amino acid composition (28, 39).

Myo16Tail is functionally active and interacts with Myo16Ank

To study the functional activity of the renatured Myo16Tail, we aimed to characterize its possible binding properties. Backfolding is an intramolecular interaction between the C-terminal tail and the N terminus of myosins that have been described in several classes (myosin IIa, V, VI, VII, X) (57–61). In general, this mode of autoregulation has a negative impact on the enzymatic activity of the myosin motor. For this reason, we performed a binding assay using steady-state fluorescence anisotropy measurements to test the interaction between Myo16Tails with the N-terminal Myo16Ank region. Anisotropy is a powerful method to investigate the size, shape, dynamics, conformation, and interactions of proteins (62) and was used successfully to monitor protein binding (63–67). The steady-state anisotropy of fluorescently labeled Alexa568–Myo16Ank (1.2 μ M) increased by the addition of an increasing concentration of Myo16Tail as expected for binding interaction. The analysis revealed that the affinity (K_D) of Myo16Tail to Myo16Ank is ~2.5 μ M according to Equation 1 (Fig. 5A).

To characterize the binding properties of the tail of Myo16 in more detail, we measured the steady-state anisotropy of Alexa568–Myo16Ank (1 μ M) in the presence of an increasing concentration of a new recombinant Myo16Tail without the IQ motif, Myo16Tail (-IQ). The fit to the anisotropy data resulted in weaker affinity with ~5.6 μ M dissociation equilibrium constant according to Equation 1 (Fig. 5B). Moreover, to investigate the binding contribution of unoccupied IQ motif to Myo16Ank, we measured the steady-state anisotropy of Alexa568-labeled, synthesized rat Myo16IQ in the presence of an increasing concentration of Myo16Ank. Because Myo16IQ is a small peptide (3.6385 kDa) and its motion is probably fast, first we performed time-resolved lifetime measurements with free Alexa568 in the buffer solution and Alexa568–Myo16IQ to confirm the labeling reaction. The average lifetime of free Alexa568 was 2.84 ns, whereas that of Alexa568–Myo16IQ increased to 3.66 ns (Fig. S2). In addition, steady-state fluorescence emission measurements of free Alexa568 dye and Alexa568–Myo16IQ were carried out for further confirmation of the labeling. The maximum wavelength plot showed

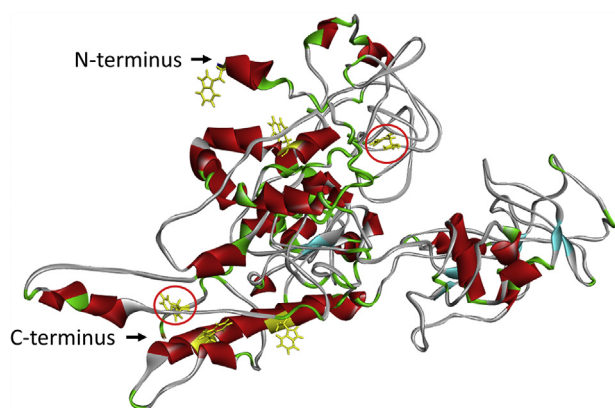


Figure 3. Myo16Tail displays a molten globule-like structure. Predicted structural model of Myo16Tail using I-TASSER. Structural elements are represented by different colors: α -helix (red), β -sheet (cyanic blue), turn (green), and disordered structural elements (gray). The location of the tryptophan residues is highlighted with yellow to visualize their position for the fluorescence spectroscopic assays. Moreover, tryptophans in the predicted disordered segments are featured with red circles. Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail; I-TASSER, Iterative Threading Assembly Refinement.

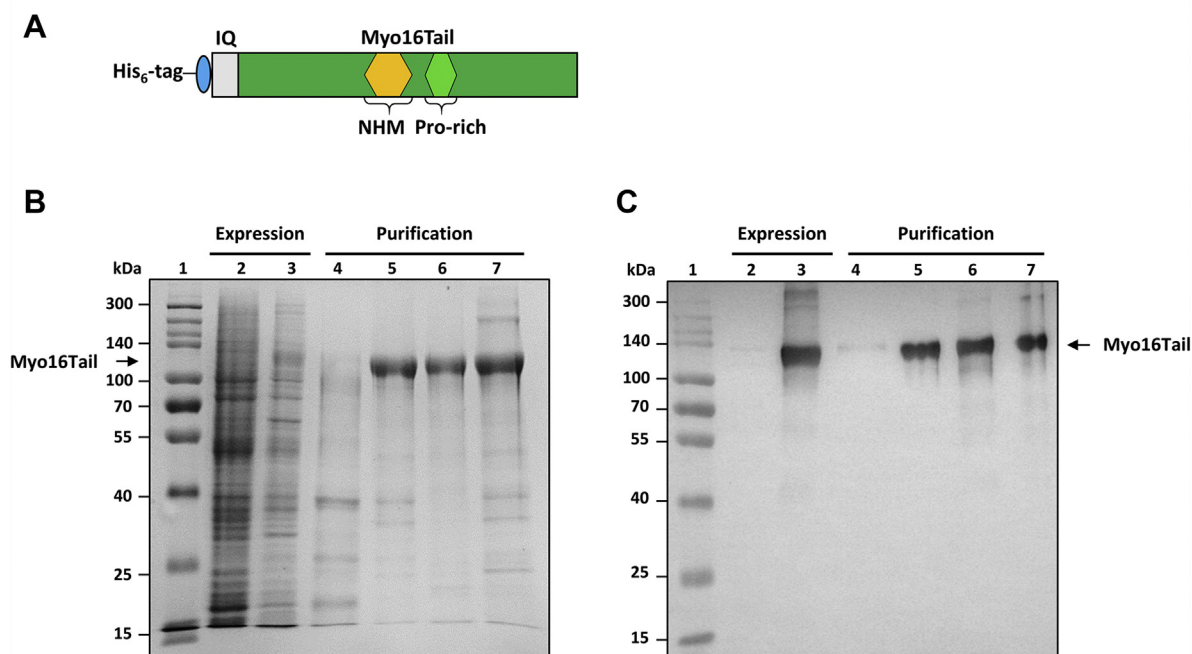


Figure 4. SDS-PAGE of expressed and purified Myo16Tail. *A*, schematic structure of the His₆-tagged Myo16Tail construct used in our study. *B*, expression and purification of Myo16Tail. The protein weight standard marker (ProSieve, QuadColor) was applied in lane 1. Total lysate of Sf9 cells as negative control (lane 2) and total lysate of Sf9 cells expressing Myo16Tail (lane 3). Myo16Tail was purified under denaturing conditions using 6 M GuHCl and eluted from the Ni-NTA resin by 8 M urea and decreasing pH; pH 7 is for washing (lane 4), and pH 6 (lane 5) and pH 4 (lane 6) are for elution. At the end of the purification process, Myo16Tail was pooled and concentrated (lane 7). *C*, the presence of Myo16Tail in the expression and purification samples was confirmed by anti-His Western blot analysis. The elution samples of Myo16Tail (pH 6, pH 4, and pooled Myo16Tail) were 5-fold diluted for Western blot to avoid overexposure of chemiluminescence. The membrane was recorded before (molecular weight marker appears) and after developing chemiluminescence. The merged image was used to display the expression and purification of His₆-Myo16Tail. The samples were derived from the same experiments, and the gel and blot were processed in parallel. GuHCl, guanidine hydrochloride; Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid.

spectral shift from 596 nm (free Alexa568) to 599 nm (Alexa568–Myo16IQ), which also verifies the labeling of Myo16IQ (Fig. S3). The steady-state anisotropy of Alexa568–Myo16IQ revealed that Myo16Ank is able to interact with Myo16IQ, albeit with much weaker affinity ($K_D = \sim 16 \mu\text{M}$)

according to Equation 1 (Fig. 5C) to that of both Myo16Ank–Myo16Tail and Myo16Ank–Myo16Tail (–IQ) complexes.

Altogether, on the one hand, our results can confirm the functional activity of the recombinantly produced Myo16Tail and Myo16Tail (–IQ). On the other hand, our anisotropy

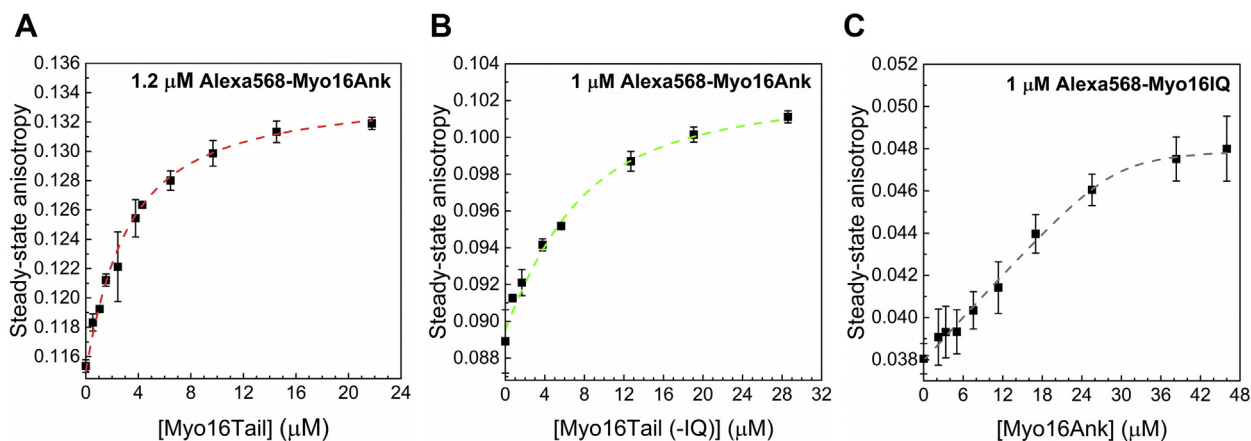


Figure 5. Myo16Tail interacts with the N-terminal ankyrin domain (Myo16Ank). *A*, steady-state anisotropy of Alexa568–Myo16Ank (1.2 μM) in the absence and presence of an increasing concentration of Myo16Tail. The dashed line shows the fit to the data according to Equation 1. The fit of the quadratic binding equation gave a dissociation equilibrium constant of $K_D = 2.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for the Myo16Ank–Tail complex. Mean \pm SD ($n = 3$). *B*, steady-state anisotropy of Alexa568–Myo16Ank (1 μM) in the absence and presence of Myo16Tail (–IQ). The dashed line indicates the fit to the data according to Equation 1. The dissociation equilibrium constant resulted in $K_D = 5.6 \pm 0.02 \mu\text{M}$ for the Myo16Ank–Tail (–IQ) complex. Mean \pm SD ($n = 3$). *C*, steady-state anisotropy of Alexa568–Myo16IQ in the absence and presence of an increasing concentration of Myo16Ank. The dashed line shows the fit to the anisotropy data according to Equation 1, resulting in a dissociation equilibrium constant of $K_D = 16.04 \pm 2.9 \mu\text{M}$ for the Myo16IQ–Ank complex. Mean \pm SD ($n = 3$). Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail; Myo16Tail (–IQ), Myo16Tail without the IQ motif.

Disordered Myo16Tail behaves as molten globule

findings revealed that the tail of Myo16 is dominant in the binding of Myo16Ank; however, the presence of Myo16IQ seems to influence the strength of this interaction. This moderate strength of the interaction of Myo16Tail is relatively common in regulatory functions and consistent with its possible role as a multiple interaction site for PI3K, WRC (17), and Myo16Ank.

Myo16Tail shows low cooperativity of unfolding

Based on the amino acid composition, bioinformatic predictions and structural modeling, we hypothesized the intrinsically disordered nature of Myo16Tail (Figs. 2 and 3). To investigate the structural properties of Myo16Tail experimentally, we performed steady-state fluorescence measurements by using its tryptophan residues as intrinsic probes and ANS fluorescence assays. Myo16Tail contains six tryptophan

residues; three of them are located in more ordered segments, whereas the other three are in the predicted disordered regions (Fig. 6A). Only one tryptophan residue can be found in the close vicinity of the IQ motif, and the rest of tryptophans are not related to known domains (Fig. 6A). In line with this, the position of tryptophan residues in Myo16Tail structural model shows similar distribution (Fig. 3). Tryptophans, as intrinsic fluorophores, are highly sensitive to their local environment (68). According to Reshetnyak et al, tryptophan residues are classified in different classes based on their accessibility (69). The fluorescence emission of tryptophans located in the hydrophobic core of a protein (class S) is characterized by a wavelength corresponding to the maximum fluorescence emission (emission maximum wavelength, λ_{max}) of around 320 to 330 nm. The emission maximum of class S tryptophans was at 322.5 ± 4.6 nm (69). Partially buried tryptophans have maximum fluorescence emission at ~ 330 to 340 nm

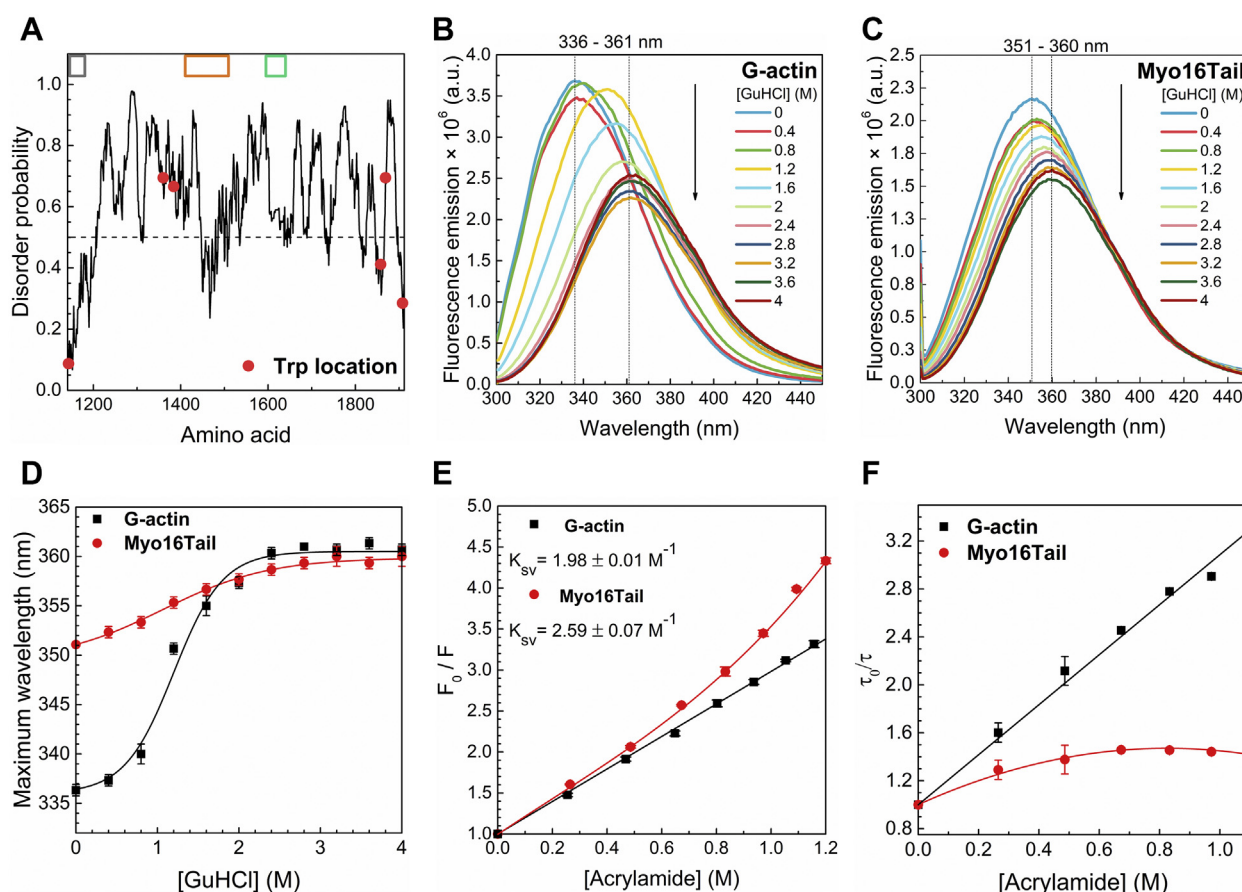


Figure 6. Conformational transitions followed by intrinsic tryptophan fluorescence emission and tryptophan fluorescence quenching. Fluorescence emission of tryptophan residues upon the addition of an increasing concentration of the denaturing agent (GuHCl). Tryptophan amino acids were excited at 295 nm, and the emission was recorded between 300 and 450 nm. A, the location of tryptophan residues in Myo16Tail. Known regions of Myo16Tail are shown in gray (IQ), orange (NHM), and green (proline-rich) boxes. The fluorescence emission of (B) G-actin (control) showed a 25-nm red shift in the wavelength corresponding to the emission maximum from 336 to 361 nm, while (C) fluorescence emission of Myo16Tail revealed a less-significant red shift of 9 nm from 351 to 360 nm. The arrows indicate the increasing GuHCl concentration. D, conformational transitions followed by unfolding; emission maximum wavelength (λ_{max}) plotted as a function of GuHCl concentration. The sigmoidal fits to the data calculated by using Equation 2 are shown in the corresponding colors. Mean \pm SD (n = 3). E, the classical Stern–Volmer plot of steady-state fluorescence emission of tryptophans quenched by acrylamide. The fits to the fluorescence quenching data calculated with Equation 4 are shown in the corresponding colors. The data are plotted as the mean \pm SD (n = 3), and the K_{sv} values are indicated as the mean \pm SD. F, the lifetime of tryptophans upon acrylamide quenching using Equation 5. The downward curvature of Myo16Tail indicates the presence of the predominant static component. Fluorescence lifetime values derived from quenching experiments are summarized in Table S1. Mean \pm SD (n = 3). G-actin, globular actin; GuHCl, guanidine hydrochloride; Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail; NHM, neuronal tyrosine-phosphorylated adaptor for PI3K homology motif.

characterized by classes I and II, and the average values of tryptophan emission maxima were found to be at 331.0 ± 4.8 and 342.3 ± 3.3 nm, respectively (69). In contrast to class S, when tryptophans are exposed to the solvent, the maximum wavelength is around 350 nm (70), and class III of tryptophan residues was found to have maximum emission at 347.0 ± 3.1 (69) or even can be further red-shifted toward 360 nm (62). To test the results of bioinformatic analysis at first, the tryptophan fluorescence emission of Myo16Tail was measured to reveal the unfolding properties in the presence of increasing concentrations of GuHCl as a denaturing agent. Our presumption was that unfolding of the protein (thus the local environment of tryptophans) should result in a red shift.

Globular actin (G-actin) containing four tryptophans was used as a control, as it has well-defined secondary (71) and tertiary structures (formed by two large domains) (72). The experiments performed on G-actin revealed that in the presence of an increasing amount of GuHCl, the fluorescence emission of tryptophans decreased and the maximum wavelength was red-shifted (25 nm) from 336 to 361 nm (Fig. 6, B and D). These spectral changes reflect the denaturation of G-actin: as the protein unfolds, the tryptophan side chains are more accessible to the solvent than in the native globular protein structure.

Myo16Tail exhibited a red-shifted maximum wavelength around 350 nm, even in the absence of a denaturant, suggesting that tryptophan side chains are already solvent accessible in the native molecule (Fig. 6, C and D). The decrease of fluorescence intensity of Myo16Tail upon titration by GuHCl was smaller than that observed for G-actin, as well as the observed red-shift was less pronounced, from 351 to 360 nm (Fig. 6, C and D). These observations indicate that tryptophans of Myo16Tail are highly accessible, suggesting that they are located in a less-structured, disordered protein matrix. The GuHCl concentration dependence of the maximum wavelength further supported the different conformational characteristics of the two proteins (Fig. 6D). The pronounced and steep sigmoid tendency observed for G-actin is indicative of cooperative conformational transitions upon unfolding. In contrast, the trend detected for Myo16Tail suggests modest or the lack of cooperativity (Fig. 6D). Cooperativity of protein folding/unfolding denotes the changes of secondary and tertiary interactions, that is, high cooperativity correlates with ordered, globular fold, whereas low cooperativity indicates a disordered structure (73, 74).

To corroborate the above conclusions, tryptophan fluorescence quenching was performed, which is a powerful method to investigate the structural and dynamic properties of proteins (75, 76). Quenching of tryptophan residues of Myo16Tail and G-actin by acrylamide as a neutral quencher was monitored in steady-state fluorescence emission measurements (Fig. 6E). The classical Stern–Volmer plot of steady-state fluorescence quenching of tryptophans showed increased K_{sv} values for Myo16Tail ($K_{sv} = 2.59 \pm 0.07 \text{ M}^{-1}$) as compared with that characteristic to G-actin ($K_{sv} = 1.98 \pm 0.01 \text{ M}^{-1}$), suggesting higher tryptophan accessibility and conformational dynamics of Myo16Tail (Fig. 6E). As one can observe, the Stern–Volmer

plot of Myo16Tail deviates from linear tendency, and a better fit is obtained if we use a quadratic polynomial. This suggests that the quenching mechanism cannot be described only by collisional quenching. An upward curvature was observed in those cases when the fluorophores form a so-called dark complex with the quencher and thus static quenching takes place (77). As the dark complexes cannot be excited, they will not contribute to the measured fluorescence lifetime in the time-resolved measurements. In the case of fluorescence quenching measurements observed by measuring the fluorescence lifetime, the formation of dark complexes will have no effect on the fluorescence lifetime. If only static quenching—and dark complex formation—happens, the τ_0/τ Stern–Volmer plot will be a flat line. To check the contribution of static quenching, we performed acrylamide quenching experiments by measuring the fluorescence lifetimes using time-correlated single-photon counting (TCSPC) (Fig. 6F). As one can see in Figure 6F, the Stern–Volmer plot of G-actin is linear, and we can conclude that the quenching is collisional. Contrary to the quenching measurements on G-actin, the Stern–Volmer plot of measurements on Myo16Tail shows a moderate increase until the addition of 0.5 M acrylamide; after that, it is relatively flat (Fig. 6F). This suggests that in the case of Myo16Tail, there is a significant static quenching part aside from the collisional quenching. Observing the average fluorescence lifetime of tryptophans of Myo16Tail, one can see that the lifetime drops significantly—from 4.1 ns to 3.0 ns—by adding ~ 0.5 M acrylamide. Above this concentration, the increasing amount of acrylamide has only a minor effect on the average lifetime, which levels of around 2.8 ns. In comparison, the quencher has a stronger effect in the case of G-actin: as one can observe, the average lifetime of tryptophans decreases linearly with an increasing quencher concentration (Table S1). In the time-resolved quenching measurements, the increasing quencher concentration results in decreasing fluorescence lifetime of Myo16Tail, which means that above ~ 0.5 M, the acrylamide forms a dark complex with the tryptophans. The possible explanation of this finding is that the solvent-exposed tryptophans are quenched efficiently by acrylamide.

To study the structural behavior of Myo16Tail in more detail, 1-anilino-naphthalene-8 sulfonic acid (ANS) fluorescence measurements were performed. ANS is a hydrophobic fluorescent probe that is used to reveal the hydrophobic sites and characterize the molten globule conformation of proteins (78). The change of fluorescence intensity and spectral distribution by increasing GuHCl concentration reflects alterations in the microenvironment of ANS from a hydrophobic (well-structured) to a polar environment (solvent-exposed—less structured). ANS does not bind to well-ordered proteins, or to totally unfolded ones, but it displays maximum intensity when molten globule conformation can occur (78).

In the case of G-actin (control) in the absence of GuHCl, the ANS fluorescence intensity was relatively low, which constantly increased and reached a maximum between 1 and 2 M GuHCl, suggesting partial denaturation and molten globule transition of G-actin (Fig. 7A). Above this range of GuHCl concentration, the fluorescence intensity decreased

Disordered Myo16Tail behaves as molten globule

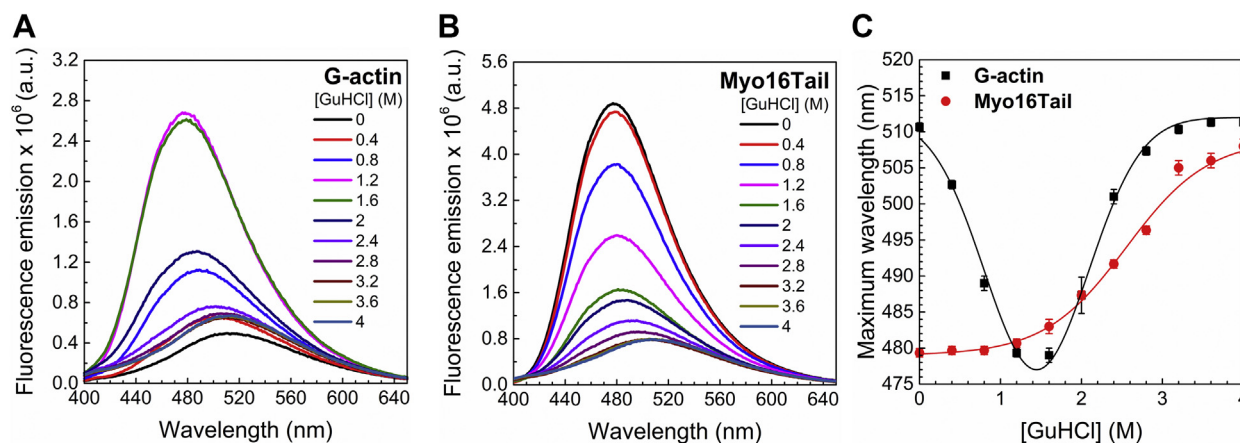


Figure 7. Hydrophobic core accessibility monitored by ANS fluorescence upon GuHCl unfolding. ANS was excited at 360 nm, and the emission was recorded between 400 and 650 nm. *A*, ANS fluorescence of G-actin (control) revealed the highest ANS intensity between 1 and 2 M GuHCl concentration, which is indicative of hydrophobic (nonpolar) to solvent-exposed (polar) microenvironment change. *B*, ANS fluorescence of Myo16Tail showed the maximal ANS fluorescence intensity in the absence of GuHCl and constantly decreased upon unfolding. *C*, conformational transitions of the emission maximum wavelength of ANS fluorescence as a function of GuHCl concentration. G-actin showed cooperative unfolding by using Gaussian fit to the data (Equation 3), whereas Myo16Tail resulted in low cooperative unfolding process. The sigmoidal fit to the data of Myo16Tail was derived by using Equation 2. Mean \pm SD ($n = 3$). ANS, 1-anilino-naphthalene-8 sulfonic acid; G-actin, globular actin; GuHCl, guanidine hydrochloride; Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail.

toward the initial fluorescence emission values showing a cooperative unfolding of G-actin (Fig. 7C).

Myo16Tail showed a relatively high ANS fluorescence intensity already in the absence of GuHCl that decreased upon GuHCl addition in a sigmoidal manner with a fewer steep transitions than that observed for G-actin (Fig. 7, B and C). Importantly, the highest intensity and wavelength maximum of ANS fluorescence of Myo16Tail at low GuHCl (~ 480 nm) is in accordance with the maximum values of G-actin in the range of 1 to 2 M GuHCl (~ 480 nm), when the latter one is in molten globule conformation (Fig. 7C). Our ANS fluorescence results corroborate that Myo16Tail might have molten globule conformation under native conditions.

Conformation dynamics of Myo16Tail

To further assess the conformational properties of Myo16-Tail, steady-state and time-resolved anisotropy measurements were carried out (Fig. 8). At first, the steady-state tryptophan fluorescence anisotropy of G-actin and Myo16Tail was compared upon chemical denaturation induced by GuHCl (Fig. 8, A and B). In the case of G-actin (control), a two-step process could be observed, in agreement with previous reports (79). First, at low GuHCl concentrations, the transition of G-actin from native to inactivated state can be revealed by the increase in fluorescence anisotropy. Subsequently, a steep decrease occurs indicating the transformation of inactivated G-actin into an unfolded state (79) (Fig. 8A). A less-complex response was detected for Myo16Tail upon addition of GuHCl; also, the low steepness of the transition curve suggests low cooperativity in unfolding (80) (Fig. 8B), in agreement with the fluorescence emission measurements and with the ANS fluorescence findings (Fig. 6, B–D, Fig. 7, B and C).

TCSPC data showed that the decrease in tryptophan lifetime correlates upon denaturation by an increasing concentration of GuHCl (1, 2, 3, 4 M) (Fig. 8, C and D). The average lifetime

of tryptophan residues of G-actin as a function of the denaturant concentration (Fig. 8C; Table S2) showed similar tendency to that of steady-state anisotropy data (Fig. 8A). For Myo16Tail, the average lifetime of tryptophans (Fig. 8D) revealed a similar, slightly sigmoidal decline upon chemical denaturation as we observed in steady-state anisotropy measurements (Fig. 8B).

The anisotropy decay of G-actin with a molecular mass of 42 kDa showed similar tendency in tryptophan rotation to that of the lifetime decay (Fig. 8E; Table S2). The tendency in the change of G-actin lifetime and anisotropy decay can be explained by the two consecutive conformational transitions during unfolding (79). The anisotropy decay data measured in the case of G-actin are in correspondence with previously described findings (81), starting with a rotational correlation time of ~ 26 ns and decreasing with increasing GuHCl concentrations. The reported values show the rotation of the whole protein (Table S2). Decreasing rotational correlation times reflect the increased mobility of the segments having the tryptophans, meaning that upon denaturation, these parts of the protein became more solvent-exposed, therefore more mobile. In the case of Myo16Tail in the absence of GuHCl, one can observe a very different anisotropy decay that can be fit with two exponentials, a faster ~ 1 ns and a longer ~ 33 ns phase (Fig. 8F; Table S2). The fast phase does not appear in the case of G-actin, and it can be assigned as the standalone rotation of tryptophan residues. The longer phase detected for Myo16Tail is practically equal to the expected value for a protein using the experimental formula by Visser (82) with the corresponding molecular weight (~ 86.5 kDa). This result shows that in Myo16Tail, there is an ensemble of tryptophans, which are at least partially unburied and they are more solvent exposed than in the case of G-actin. The rotation of these solvent-exposed tryptophans is less restricted, which is the reason of the presence of the ~ 1 ns component in the rotational correlation times.

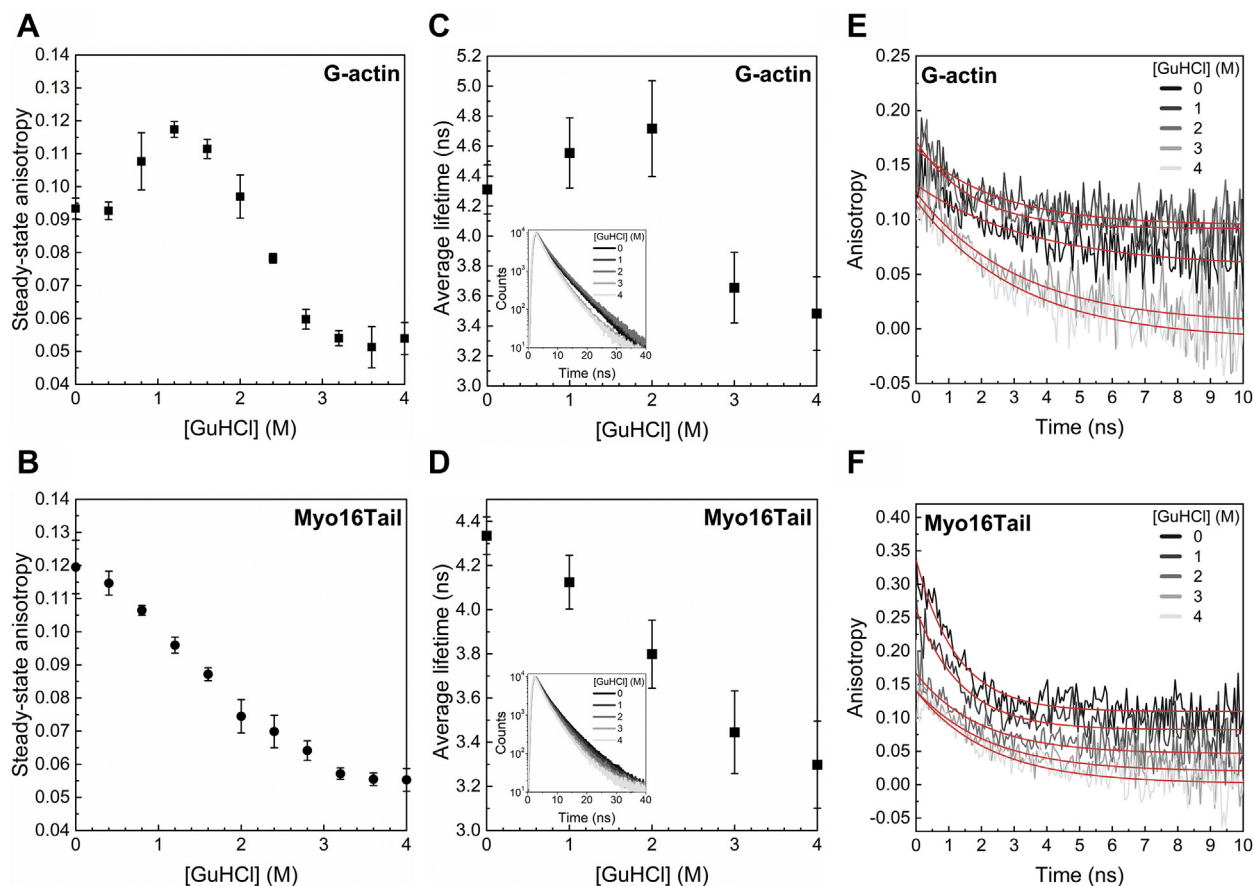


Figure 8. Structural dynamic measurements using tryptophan fluorescence anisotropy. Steady-state anisotropy of (A) G-actin (control) and (B) Myo16Tail as a function of GuHCl concentration. Mean \pm SD ($n = 3$). Time-correlated single-photon counting of tryptophan residues by adding GuHCl. The excitation wavelength was 295 nm, and the emission was monitored at 350 nm, using slits of 5 to 5 nm. Time-resolved lifetime plot of unfolding of (C) G-actin (control) and (D) Myo16Tail; the raw lifetime decays are indicated as insets. The lifetime data (mean \pm SD, $n = 3$) were derived according to Equation 6 and shown in Table S2. Anisotropy decay of G-actin (control) (E) and Myo16Tail (F) upon denaturation. The red lines show the fit to the data according to Equation 7. The derived rotational correlation (θ) data (mean \pm SD, $n = 3$) are shown in Table S2. G-actin, globular actin; Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail; GuHCl, guanidine hydrochloride.

These findings agree with the correlation between the locations of tryptophan residues in the predicted structural model (Fig. 3) and the disorder probability of the corresponding regions (Fig. 6A). When titrating Myo16Tail by increasing the GuHCl concentration, one can observe a slight decrease of both components, suggesting that the segments having the tryptophans became more mobile upon denaturation; the increase in the mobility however is not as obvious as in the case of G-actin. Altogether, both the steady-state and time-correlated fluorescence results indicate that Myo16Tail can undergo slight conformational transitions upon unfolding, suggesting that the disordered regions are associated with some ordered structural elements.

Secondary structure analysis of Myo16Tail by CD spectroscopy reveals structured regions

To study the secondary structure of Myo16Tail, CD spectroscopy measurements were performed, which is a widely used method for structural characterization of proteins in solutions (83) (Fig. 9). The CD spectrum of Myo16Tail in the far-UV region revealed the minimum at 205 nm, the positive

maximum at 190 nm, and a significant signal in a wide, 215 to 225 nm region (Fig. 9A). This suggests that the protein contains both α -helical and β -structured elements. On the other hand, the large minimum at 205 nm and the relatively weak positive maximum around 190 nm indicate the presence of a significant amount of disordered structure as well. The CD spectroscopic analysis of G-actin (control) that was described and published earlier revealed two major negative minima in the far-UV region at 211 nm and 221 nm, suggesting a significantly higher amount of α -helical and β -structured elements than what we detected in Myo16Tail (84).

To evaluate the secondary structure content of Myo16Tail, Beta Structure Selection (BeStSel) method (85, 86) was used as a deconvolution algorithm to assess CD data. BeStSel is a novel method to distinguish between the α -helical content and β -sheet structural elements and also to differentiate parallel and antiparallel β -sheets, providing an improved secondary structure estimation for a wide range of proteins. Antiparallel β -sheets can be divided into subclasses such as anti1 (left-twisted), anti2 (relaxed), and anti3 (right-twisted) β elements.

BeStSel analysis showed that the secondary structure content of Myo16Tail appeared to be due to 19.5% α -helix

Disordered Myo16Tail behaves as molten globule

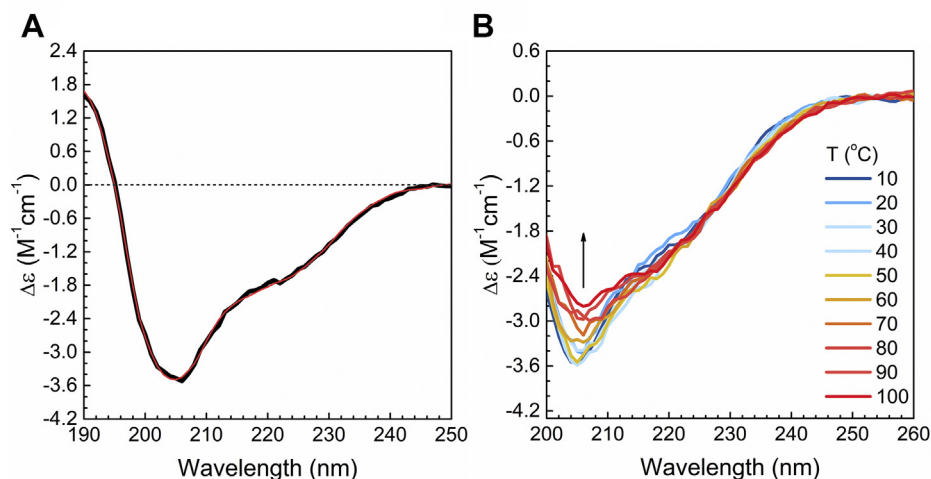


Figure 9. Secondary structure analysis of Myo16Tail using CD spectroscopy. A, far-UV CD spectrum of Myo16Tail (12.7 μM (1.1 mg/ml)) in the solution (black) and fit using the BeStSel method (85, 86) (red). B, thermal denaturation of Myo16Tail (1.15 μM (0.1 mg/ml)). The CD spectra were recorded at 10 $^{\circ}\text{C}$ steps in the 10 to 100 $^{\circ}\text{C}$ range. The arrow indicates the direction of changes. BeStSel, Beta Structure Selection; Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail.

and 21.3% β -sheet, where the contributions of antiparallel β subclasses are 0.0% anti1 (left-twisted), 5.4% anti2 (relaxed), and 15.9% anti3 (right-twisted). Further structures in form of 15.2% turn and 44.0% “others” are present, the latter accounts mainly for the disordered content. Of note, besides our functional analysis, the secondary structure results also confirm the appropriate renaturation of Myo16Tail during protein purification. CD spectroscopy results revealed that Myo16Tail contains ordered secondary structure elements. We hypothesize that the helical polyproline II type recognition motifs in the C-terminal and Pro-rich regions (87) are also formed. These findings are in line with the disorder prediction, in which some segments are predicted to be ordered (Fig. 2A). However, the sequence of IQ motif predicted to be ordered accounts for only 3.8% of the sequence of the whole construct, suggesting that IQ might have only minor contribution to the secondary structure components and helical and sheet structural elements predominantly account for the C-terminal part of Myo16Tail. Moreover, it is important to emphasize the presence of a high number of disordered regions. Altogether, the turn and disordered structure make up at least 60% in Myo16Tail, which is consistent with the primary amino acid sequence-based bioinformatic findings. It is important to note that in highly disordered proteins, some part of the disordered content might be counted as anti3 component by BeStSel (86), which is the case here, suggesting an even higher level of disorder. Similar trend in CD spectroscopy data was observed for Golgi Reassembly and Stacking Proteins, suggesting a natively unstructured, molten globule-like behavior (88). The mean residue ellipticity of far-UV CD signals of Myo16Tail was analyzed on a double-wavelength plot, $[\theta]_{222}$ against $[\theta]_{200}$, provided by Uversky and Fink (89) to classify Myo16Tail as a molten globule or pre-molten globule conformation (Fig. S4). Based on the plot, Myo16Tail can be found between the molten and pre-molten globule populations.

To further study the structural properties of Myo16Tail by CD, thermal denaturation experiments were carried out by heating up the protein from 10 $^{\circ}\text{C}$ to 100 $^{\circ}\text{C}$ and recording the spectra at 10 $^{\circ}\text{C}$ steps (Fig. 9B). The CD spectra gradually changed upon increasing the temperature, although Myo16Tail showed only minor spectral changes without a well-defined unfolding transition. At higher temperatures, some precipitation of the protein was observable; however, even with precipitation, there were only minor spectral changes. The secondary structure analysis showed a $\sim 7\%$ decrease in the α -helix content and $\sim 5\%$ increase in the disordered content. The β -structure content is increased by $\sim 4\%$, which could be the result of partial aggregation of the protein at high temperatures. The thermal behavior of Myo16Tail showing low cooperativity detected by CD measurements supports the idea of lacking a stable globular fold and is characteristic of a molten globule-like state (90). In conclusion, CD spectroscopy analysis indicates the presence of both disordered and structured regions in Myo16Tail, supporting our conclusions from fluorescence spectroscopic measurements according to which the tail of Myo16 might be in a molten globule-like conformation.

Discussion

The unconventional Myo16 is a relatively poorly characterized member of the myosin superfamily. The tail in Myo16b isoform is a unique extension involved in the neuronal PI3K signaling pathway (8, 17) and supposed to have intrinsically disordered structure (15). However, its detailed biological functions and structural features remained unclear. Here, a combination of bioinformatic and spectroscopic methods was used to investigate the functional activity, structural properties, and behavior of Myo16Tail. The bioinformatic analysis showed that Myo16Tail has a considerable number of disordered regions in its structure. The experimental data by tryptophan and ANS fluorescence emission, steady-state and time-resolved anisotropy, and CD confirmed the bioinformatic

predictions and provided insights into the structural characteristics of Myo16Tail.

Myo16Tail was assessed by five disorder predictors and by DynaMine protein flexibility tool (Fig. 2). The NHM, the Pro-rich motif, and the C terminus overall appear to be disordered in all predictions, and only the IQ motif has ordered structure as we expected (47). Moreover, certain parts of the NHM motif and the C terminus of Myo16Tail are predicted to be close to the ordered–disordered threshold, suggesting that these regions might be able to fold into more ordered structure, for example, upon binding to partner proteins (Fig. 2A). The disorder predictions correlate well with the DynaMine results (Fig. 2C). The IQ motif displays a rigid protein backbone related to its ordered secondary structure content. In contrast, the NHM, the Pro-rich motif, and the C terminus are predicted to fall mainly in the flexible range associated with disorder. Some portions of these regions are in the context-dependent range in agreement with the disorder prediction, suggesting contextual folding. Intrinsic disorder is associated with conformational flexibility, which correlates with PTMs, such as phosphorylation. Myo16Tail is regulated by phosphorylation in the neuronal PI3K signaling pathway (17). Myo16Tail sequence assessment by PhosphoSitePlus predicts conserved phosphorylation sites in the NHM and the disordered regions, which is consistent with the abundance of phosphosites in disordered and flexible protein structure (Fig. 2D). The multiple sequence alignment analysis suggests high conservation of the disordered segments between Myo16Tail amino acid sequences from different vertebrate species (Fig. S1), indicating that our observations on rat Myo16Tail can have relevance, particularly in human Myo16 associated with neurodegenerative diseases (21–23). The structural model supports the intrinsically disordered nature of Myo16Tail (Fig. 3).

The first experimental indication of the disordered structural characteristics of Myo16Tail is its anomalous migration showing higher apparent molecular mass as revealed by SDS-PAGE, which was confirmed by anti-His Western blot (Fig. 4, B and C). The unusual SDS-PAGE mobility as a characteristic feature of IDPs (28, 39) supports that Myo16Tail or parts of it are intrinsically disordered. Steady-state fluorescence anisotropy revealed that both Myo16Tail and Myo16Tail (–IQ) bind the N-terminal Myo16Ank with a K_D of $\sim 2.5 \mu\text{M}$ and $\sim 5.6 \mu\text{M}$ in a similarly moderate range of affinity, respectively (Fig. 5, A and B), confirming the functional activity and a possible role of Myo16Tail. In our assumption, Myo16Tail may play a role in regulation by backfolding to the N terminus of Myo16. In addition, GuHCl denaturation of Myo16Tail followed by tryptophan fluorescence emission revealed that it lacks the globular fold of well-structured proteins. The relatively small shift in the tryptophan emission spectrum toward red wavelengths correlates with the solvent-exposed environment of tryptophans, suggesting low conformational complexity (Fig. 6C). Moreover, the emission maximum wavelength profile of Myo16Tail clearly showed a shallow sigmoidal transition, implying the presence of ordered protein segments (Fig. 6D). Fluorescence quenching results support that

tryptophans of Myo16Tail are highly accessible, which is indicative of a dynamic and flexible structural behavior (Fig. 6, E and F). ANS fluorescence measurements corroborate that the hydrophobic core of Myo16Tail is solvent-exposed, having the highest intensity in the absence of a denaturant (Fig. 7B). Furthermore, the wavelength maxima of ANS emission change in a poorly cooperative way, suggesting molten globule conformation of Myo16Tail (Fig. 7C). The steady-state and time-correlated fluorescence anisotropy results agree well with the dual structural nature of Myo16Tail (Fig. 8). Furthermore, CD revealed α - β -type secondary structural elements besides the considerable amount of disordered content in Myo16Tail (Fig. 9A). The analysis of the mean residue ellipticity of Myo16Tail CD signals on the double-wavelength ($[\theta]_{222}$ against $[\theta]_{200}$) plot (89) showed the location between the population of molten globule and pre-molten globule conformations (Fig. S4). Moreover, thermal denaturation experiments indicate minor conformational changes and the lack of cooperative unfolding behavior, supporting the dominantly unstructured nature of Myo16Tail (Fig. 9B).

Altogether, our results suggest that Myo16Tail might possess a high number of IDRs besides ordered structural elements. Moreover, the shallow, sigmoid cooperative unfolding of Myo16Tail indicates molten globule–like behavior (Figs. 6D, 7C, and 8, B and C) rather than pre-molten globule conformation because denaturant-induced unfolding of pre-molten globules or natively unfolded coils shows noncooperative and unfeatured linear changes (80), which was not observed in our experiments. In line with this, the structural model of Myo16Tail corroborates our experimental findings.

Therefore, we propose that Myo16Tail might act as a less compact, dynamic molten globule (54), rather than a pre-molten globule, and may function as a flexible display site (91). Proving the presence of IDRs may help explain how Myo16 behaves during interactions with binding partners (Myo16Tail interacts with PI3K and WAVE1, Myo16Ank), in phosphorylation process (Myo16Tail phosphorylated by Fyn) or signaling pathways playing crucial role in regulation (17). The plasticity of disordered proteins is an evolutionary advantage as a response to contextual change due to binding and environmental fluctuations (33). These disorder-associated functions are hypothesized to be evolutionary directed and crucial for certain functions (36, 37). As examples, both regulation by signaling and neurodegenerative diseases are associated with proteins possessing intrinsically disordered structure (92). From this aspect, it is of note that the genetic alterations of *MYO16* are implicated in neurodegenerative disorders (21–23).

Experimental procedures

Bioinformatics

Disordered probability prediction for Myo16Tail was performed using VLXT (39, 40), VL3-BA (41), VSL2b (42), RONN (43), and IUPred servers (44–46). Structural flexibility was analyzed by DynaMine server (49, 50). Phosphorylation site prediction was assessed using PhosphoSitePlus (51). The

Disordered Myo16Tail behaves as molten globule

physical and chemical parameters of Myo16Tail were calculated using ExPASy ProtParam tool (56), and the protein solubility was evaluated with Protein Solubility evaluator II tool (55). Multiple sequence alignment of Myo16Tail was performed by using Clustal X (48). The 3D structural model was created by using I-TASSER (52, 53).

Protein expression and purification

The DNA sequence of Myo16Tail (Gene Bank accession number: 192253, *R. norvegicus*, amino acid residues: 1146–1912) (Figs. 1 and 4A) containing the IQ motif was optimized by GenScript for baculovirus/Sf9 system. Myo16Tail was cloned into pFastBac plasmid (Thermo Fisher Scientific) containing a His₆ affinity tag at the N terminus of the construct. Recombinant His₆-Myo16Tail was expressed in Insectagro Sf9, Serum-Free/Protein-Free 1× medium (Corning) containing 100 µg/ml antibiotics-antimycotics (Biowest). After 2 days of expression, Sf9 cells were harvested and the cell pellet was frozen in liquid nitrogen for further utilization. All steps of Myo16Tail purification were performed in sodium phosphate (Na₃PO₄) buffer (an appropriate mixture of 0.2 M Na₂HPO₄ and 0.2 M NaH₂PO₄) (93) at 4 °C. The cell pellet was extracted in Na₃PO₄ lysis buffer (50 mM Na₃PO₄ (pH 8.0), 500 mM NaCl, 10 mM β-mercaptoethanol [BME], 0.2 mM PMSF, 1% Triton X-100). After mechanical homogenization and sonication (BANDELIN SONOPULS GM 3100; MS 73 Titanium microtip, 4 × 1 min, rest 1 min, amplitude 80%, frequency 0.4 s) of the cell lysate, 20 µg/ml DNase (PanReac, AppliChem) and Protein Inhibitor Cocktail (P8465, Sigma-Aldrich) were added and the solution was stirred for 1 h. After ultracentrifugation of the cell lysate (Hitachi; 20,000g, 20 min, 4 °C) Myo16Tail sedimented in the pellet. To keep Myo16Tail in a soluble form, 6 M GuHCl was added and the pellet was dissolved using mechanical homogenization. The second ultracentrifugation (Hitachi, 20,000g, 20 min, 4 °C) was followed by the addition of 20 µg/ml RNase A (Thermo Fisher Scientific) to the supernatant for eliminating free RNA. Afterward, the His₆-Myo16Tail was incubated overnight with Ni-NTA resin (Protino Ni-NTA Agarose) in the presence of 10 mM BME. The resin was loaded into the column, and it was washed with the washing buffer (8 M urea, 50 mM Na₃PO₄, 500 mM NaCl, 10 mM BME) at pH 7. His₆-Myo16Tail was eluted with the elution buffer (8 M urea, 50 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM BME) at pH 6 and pH 4, and the eluted fractions were collected. The samples were run by SDS-PAGE, the peak fractions were pooled and dialyzed first against Na₃PO₄ buffer (50 mM Na₃PO₄ (pH 8.0), 200 mM NaCl, 5 mM BME) containing 4 M urea and afterward against 50 mM Na₃PO₄ buffer containing 100 mM NaCl, 2.5% glycerol, 1% sucrose, and 5 mM BME, and finally against 50 mM Na₃PO₄ buffer containing 100 mM NaCl and 5 mM BME. Myo16Tail was concentrated (Amicon Ultra 50-kDa cutoff, Sigma-Aldrich), and after a clarifying centrifugation (Beckman; 1000g, 2 min, 4 °C), was stored on ice until use. For the binding assays, an additional recombinant Myo16Tail was generated. The tail of Myo16 was cloned into the pFastBac

vector without the IQ motif (Myo16Tail (-IQ), 1176–1912 amino acids) and expressed in the baculovirus/Sf9 system. The recombinant His₆-Myo16Tail (-IQ) was successfully purified by the abovementioned denaturing procedure. The absorbance of Myo16Tail and Myo16Tail (-IQ) samples were determined at 280 nm by using the Jasco V-660 UV-VIS spectrophotometer (JASCO), and the protein concentrations were calculated using the molar extinction coefficients ($\epsilon = 58.330 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $52.830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectively. The N-terminal ankyrin domain of Myo16 (Myo16Ank) was purified as described earlier (15). Actin was purified according to standard protocols and stored in G-buffer (4 mM Tris-HCl [pH 7.8], 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM BME) on ice (66). Myo16IQ (*R. norvegicus*, amino acid residues: 1146–1175, MW: 3.6385 kDa, determined by mass spectrometry) was synthesized by the company (GenScript) in a final concentration of 4.9 mg/ml. The lyophilized Myo16IQ was dissolved first in 1 ml of ultrapure water, and then, the solution composition was readjusted with the concentrated buffer to get the final buffer conditions in 50 mM Na₃PO₄ buffer containing 100 mM NaCl and 5 mM BME.

Western blot analysis

Samples were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel and then transferred to a nitrocellulose membrane with Trans-blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Nonspecific binding sites were blocked with 3% nonfat milk in Tris buffered saline containing 0.5% Tween-20. During immunodetection, the membrane was incubated with anti-His antibody (Sigma-Aldrich mouse monoclonal IgG SAB1305538, dilution 1:3000) for 1.5 h followed by horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (Millipore AP160P, dilution 1:10,000) for 45 min. The immunoreactive bands were detected by Luminata Crescendo Western HRP Substrate (Merck) and imaged with the Multi-Genius Bio imaging System (Syngene).

Protein labeling

Myo16Ank and Myo16IQ were labeled by Alexa Fluor C5 568 maleimide (Alexa568, Invitrogen) according to the following protocol. Alexa568 was added at 10-fold molar excess to the protein solution while stirring in the BME-free buffer (50 mM Na₃PO₄ buffer containing 100 mM NaCl). The sample was incubated overnight at 4 °C, and the reaction was terminated by adding 10 mM BME. The solution was dialyzed against BME containing the buffer overnight at 4 °C to remove the unbound dye. The protein sample concentration was corrected with the absorption of the dye at 280 nm.

Steady-state fluorescence anisotropy

The steady-state anisotropy of Alexa568-Myo16Ank (1 µM and 1.2 µM) and Alexa568-Myo16IQ (1 µM) was measured to study the interaction of Myo16Tail and Myo16Tail (-IQ) with Myo16Ank and Myo16Ank with Myo16IQ. The fluorescence anisotropy measurements of tryptophan side chains were performed on the samples by adding the aforementioned series

of GuHCl concentration. The measurements were performed using HORIBA Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spectrofluorometer (HORIBA Scientific) (tryptophan, $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 350$ nm; Alexa568–Myo16Ank and Alexa568–Myo16IQ, $\lambda_{\text{ex}} = 578$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 601$ nm). We analyzed the data with Origin 2020 software (OriginLab). The anisotropy data were evaluated with the quadratic binding equation (by using Equation 1), where A_0 and T_0 are the total Myo16Ank, Myo16IQ and Myo16Tail, Myo16Ank concentrations, respectively, r_A is the steady-state anisotropy of Alexa568–Myo16Ank or Alexa568–Myo16IQ, r_{AT} is the steady-state anisotropy of Alexa568–Myo16Ank or Alexa568–Myo16IQ at a saturating amount of Myo16Tail or Myo16Ank concentration, respectively, and K_D is the dissociation equilibrium constant of the Myo16Ank–Tail or Myo16IQ–Ank complex:

$$\frac{r-r_A}{r_{AT}-r_A} = \frac{A_0+T_0+K_D - \sqrt{(A_0+T_0+K_D)^2 - 4 \cdot A_0 \cdot T_0}}{2} \quad (1)$$

Steady-state fluorescence emission measurements

Fluorescence emission of tryptophan side-chains and ANS was monitored by HORIBA Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spectrofluorometer using 5 to 5 μM of G-actin and Myo16Tail. Tryptophans were excited at 295 nm, and the emission spectra were recorded between 300 and 450 nm, while ANS (250 μM) was excited at 360 nm, and the emission was monitored from 400 to 650 nm using 2.5 to 2.5 nm slit in the absence and presence of increasing concentrations of GuHCl (0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6, 4 M) at 20 °C. The tryptophan fluorescence emission spectra of proteins were corrected by subtracting the GuHCl background intensity. To evaluate the cooperativity of unfolding, we used Origin 2020 software and applied a sigmoidal function (by using Equation 2) (94, 95) to fit the maximum wavelength data of tryptophan fluorescence emission (Fig. 6D), where λ_N and λ_U are the maximum wavelength values of the native and unfolded protein, respectively, D is the concentration of the denaturant, and a is inversely proportional to the slope of the transition curve at D .

$$\lambda = \lambda_N + \frac{(\lambda_U - \lambda_N)}{1 + \exp\left(\frac{D-x}{a}\right)} \quad (2)$$

In the case of the ANS fluorescence of G-actin control, the Gaussian function was fitted by using Equation 3 (Fig. 7C), where A is the area, y_0 is the base, and X_c is the center of the Gaussian fit, respectively, while w is the value of the full width at half maximum, describing the difference between the two values of an independent variable, where the dependent variable is equal to the half of its maximum.

$$y = y_0 + \frac{A e^{-4 \ln(2) \frac{(x-x_c)^2}{w^2}}}{w \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln(2)}}} \quad (3)$$

Fluorescence quenching measurements

Fluorescence quenching of the tryptophans of G-actin and Myo16Tail was measured by using acrylamide as a quencher. The steady-state fluorescence quenching was obtained using HORIBA Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spectrofluorometer. The fluorescence lifetime quenching was measured with HORIBA Jobin Yvon Nanolog spectrofluorometer (HORIBA Scientific). The fluorescence intensities of tryptophans were determined at 350 nm for the Stern–Volmer analysis. Data were corrected with the inner filter effect during the analysis. Origin 2020 software was used for data evaluation using the Stern–Volmer model for steady-state fluorescence quenching and for lifetime quenching according to Equation 4 and Equation 5, respectively (62), where F_0 and F are the fluorescence intensities or τ_0 and τ are the fluorescence lifetimes of tryptophans in the absence and presence of the quencher, respectively; K_{SV} is the Stern–Volmer quenching constant and $[Q]$ denotes the quencher concentration.

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

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

TCSPC

Fluorescence lifetime and anisotropy of tryptophan residues were measured by the means of TCSPC using a HORIBA Jobin Yvon Nanolog spectrofluorometer. The excitation was performed by a 295-nm NanoLED as the light source (HORIBA Scientific), and the fluorescence emission was measured at 350 nm. Further experimental parameters are as follows: channel width 0.055 ns/channel, slit 10 nm for anisotropy decay and 3 nm for lifetime measurement, detector voltage 950V, measurement range 200 ns, repetition rate 1 MHz, pulse duration <1 ns, and sync delay 50 ns. Time-resolved lifetime and anisotropy decay measurements were performed with 5 to 5 μM of G-actin and Myo16Tail by adding GuHCl (1, 2, 3, 4 M). Time-resolved fluorescence lifetimes (τ) were calculated according to Equation 6, where $I(t)$ is time-dependent intensity, IRF is instrument response function, A_i amplitude of the i -th component at time zero, and τ_i denotes for lifetime of the i -th component. Data were analyzed with exponential model (reconvolution) by FluoFit software (PicoQuant, Berlin, Germany).

$$I(t) = \int_{-\infty}^t \text{IRF}(t') \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt' \quad (6)$$

Time-resolved anisotropy data were fitted by Origin 2020 software using two-exponential fit, and rotational correlation (θ) values were derived from Equation 7, where $r(t)$ is time-dependent anisotropy, r_∞ is anisotropy at $t = \infty$ (limiting anisotropy), A_i is the pre-exponential factor of the i -th component, and θ_i indicates the rotational correlation time of

Disordered Myo16Tail behaves as molten globule

the *i*-th component.

$$r(t) = r_{\infty} + \sum_{i=1}^n A_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (7)$$

CD spectroscopy

Far-UV (190–250 nm) CD spectrum of Myo16Tail was recorded in 50 mM Na₃PO₄ buffer (pH 8.0) containing 100 mM NaCl at 25 °C using a Jasco J-810 spectropolarimeter (JASCO) equipped with a Peltier-type temperature control. The applied concentration of Myo16Tail was 12.7 μM (1.1 mg/ml), which was measured by the absorbance at 280 nm. The experimental parameters were as follows: path length 0.01 cm, bandwidth 1 nm, scanning speed 20 nm/min, and response time 4 s; six scans were accumulated. The far-UV CD spectrum was corrected for the baseline by subtracting the CD spectrum of the buffer measured under the same conditions. The CD spectra were analyzed by the BeStSel (85, 86) web-server (<http://bestsel.elte.hu>) for secondary structure composition. Thermal denaturation experiments were carried out at a concentration of 1.15 μM (0.1 mg/ml) in 50 mM Na₃PO₄ (pH 8.0) containing 20 mM NaCl in a 1-mm cell. Spectra were recorded in the temperature range of 10 to 100 °C with 10 °C steps accumulating three scans and using a heating rate of 1 °C/min between temperature points of spectrum collection. The final CD spectra were plotted by using Origin 2020 software.

Data availability

Data are available in the [supporting information](#). All remaining data are contained in the article.

Supporting information—This article contains [supporting information](#) (89).

Acknowledgments—The authors offer special thanks to Réka Pintér and Zoltán Ujjfalusi for providing G-actin for the measurements. The authors are grateful to László Grama from University of Pécs, Medical School, Department of Biophysics, for reading and editing the manuscript. This work was supported by OTKA grant, K 112794, “Molecular Mechanisms Underlying the Function of Myosin 16b” from the Hungarian Scientific Research Fund, the ÚNKP-17-3-1 New National Excellence Program of the Ministry of Human Capacities, and the EFOP 3.6.2-16-2017-00005, EFOP 3.6.2-16-2017-00005, and EFOP 3.6.1-16-2016-00004 grants from the European Union, European Social Fund.

Author contributions—E. T. and B. B. conceptualization, E. T., A. K., A. L., and M. Ny. methodology, E. T., A. K., Zs. F., K. K., and J. K. investigation, E. T., B. B., Zs. F., A. L., K. K., H. H., and J. K. formal analysis, E. T. writing—original draft; B. B., A. K., Zs. F., A. L., M. Ny., and J. K. writing—review and editing.

Funding and additional information—J. K. was supported by OTKA K 120391 and KH 125597.

Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: ANS, 1-anilino-naphthalene-8 sulfonic acid; BeStSel, Beta Structure Selection; BME, β-mercaptoethanol; G-actin, globular actin; GuHCl, guanidine hydrochloride; IDP, intrinsically disordered protein; IDR, intrinsically disordered region; I-TASSER, Iterative Threading Assembly Refinement; Myo16, myosin 16; Myo16Ank, myosin 16 ankyrin domain; Myo16IQ, myosin 16 IQ motif; Myo16Tail (–IQ), Myo16Tail without the IQ motif; Myo16Tail, myosin 16 C-terminal tail; NHM, neuronal tyrosine-phosphorylated adaptor for PI3K homology motif; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; Pro-rich, proline-rich; PTMs, post-translational modifications; TCSPC, time-correlated single-photon counting; WRC, WAVE1 regulatory complex.

References

- Coluccio, L. M. (2020) *Myosins, A Superfamily of Molecular Motors. Series: Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2nd Ed., Springer International Publishing, Switzerland
- Berg, J. S., Powell, B. C., and Cheney, R. E. (2001) A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* **12**, 780–794
- Vale, R. D. (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467–480
- Scholey, J. M., Brust-Mascher, I., and Mogilner, A. (2003) Cell division. *Nature* **422**, 746–752
- Yumura, S., and Uyeda, T. Q. P. (2003) Myosins and cell dynamics in cellular slime molds. *Int. Rev. Cytol* **224**, 173–225
- Geeves, M. A., and Holmes, K. C. (2005) The molecular mechanism of muscle contraction. *Adv. Protein Chem.* **71**, 161–193
- Odrionitz, F., and Kollmar, M. (2007) Drawing the tree of eukaryotic life based on the analysis of 2,269 manually annotated myosins from 328 species. *Genome Biol.* **8**, 1–23
- Patel, K. G., Liu, C., Cameron, P. L., and Cameron, R. S. (2001) Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits Iα and Iγ. *J. Neurosci.* **21**, 7954–7968
- Harrington, W. F., and Rodgers, M. E. (1984) Myosin. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 35–73
- Sellers, J. R. (2000) Myosins: A diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1496**, 3–22
- Hartman, M. A., Finan, D., Sivaramakrishnan, S., and Spudich, J. A. (2016) Principles of unconventional myosin function and targeting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 133–155
- Krendel, M., and Mooseker, M. S. (2005) Myosins: Tails (and heads) of functional diversity. *Physiology* **20**, 239–251
- Foth, B. J., Goedecke, M. C., and Soldati, D. (2006) New insights into myosin evolution and classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3681–3686
- Batters, C., and Veigel, C. (2016) Mechanics and activation of unconventional myosins. *Traffic* **17**, 860–871
- Kengyel, A., Bécsi, B., Kónya, Z., Sellers, J. R., Erdődi, F., and Nyitrai, M. (2015) Ankyrin domain of myosin 16 influences motor function and decreases protein phosphatase catalytic activity. *Eur. Biophys. J.* **44**, 207–218
- Munton, R. P., Vizi, S., and Mansuy, I. M. (2004) The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett.* **567**, 121–128
- Yokoyama, K., Tezuka, T., Kotani, M., Nakazawa, T., Hoshina, N., Shimoda, Y., Kakuta, S., Sudo, K., Watanabe, K., Iwakura, Y., and Yamamoto, T. (2011) NYAP: A phosphoprotein family that links PI3K to WAVE1 signalling in neurons. *EMBO J.* **30**, 4739–4754
- Roesler, M. K., Lombino, F. L., Freitag, S., Schweizer, M., Hermans-Borgmeyer, I., Schwarz, J. R., Kneussel, M., and Wagner, W. (2019) Myosin XVI regulates actin cytoskeleton dynamics in dendritic spines of Purkinje cells and affects presynaptic organization. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, 330

19. Telek, E., Kengyel, A., and Bugyi, B. (2020) Myosin XVI in the nervous system. *Cells* **9**, 1903
20. Cameron, R. S., Liu, C., Mixon, A. S., Pihkala, J. P. S., Rahn, R. J., and Cameron, P. L. (2007) Myosin16b: The COOH-tail region directs localization to the nucleus and overexpression delays S-phase progression. *Cell Motil. Cytoskeleton* **64**, 19–48
21. Rodriguez-Murillo, L., Xu, B., Roos, J. L., Abecasis, G. R., Gogos, J. A., and Karayiorgou, M. (2014) Fine mapping on chromosome 13q32-34 and brain expression analysis implicates MYO16 in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **39**, 934–943
22. Liu, Y. F., Sowell, S. M., Luo, Y., Chaubey, A., Cameron, R. S., Kim, H. G., and Srivastava, A. K. (2015) Autism and intellectual disability-associated KIRREL3 interacts with neuronal proteins MAP1B and MYO16 with potential roles in neurodevelopment. *PLoS One* **10**, 1–18
23. Kao, C., Chen, H., Chen, H., Yang, J., Huang, M., Chiu, Y., Lin, S., Lee, Y., Liu, C., Chuang, L., Chen, C., Wu, J., Lu, R., and Kuo, P. (2016) Identification of susceptible loci and enriched pathways for bipolar II disorder using genome-wide association studies. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**, 1–11
24. Bugyi, B., and Kengyel, A. (2020) Myosin XVI. In *Series: Advances in Experimental Medicine and Biology. Myosins, A Superfamily of Molecular Motors*, 2nd Ed., Springer International Publishing, Switzerland: 405–419
25. Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hippos, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C., Kissinger, C. R., et al. (2001) Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* **19**, 26–59
26. Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 197
27. Tompa, P. (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 527–533
28. Uversky, V., Gillespie, J. R., and Fink, A. L. (2000) Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins Struct. Funct. Genet.* **41**, 415–427
29. Iakoucheva, L. M., Radivojac, P., Brown, C. J., O’Connor, T. R., Sikes, J. G., Obradovic, Z., and Dunker, A. K. (2004) The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1037–1049
30. Schulz, G. E. (1979) Nucleotide binding proteins. In: Balaban, M., ed. *Molecular Mechanism of Biological Recognition*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, NY: 79–94
31. Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S. I., and Wright, P. E. (1996) Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: Conformational disorder mediates binding diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 11504–11509
32. Dunker, A. K., Garner, E., Guillot, S., Romero, P., Albrecht, K., Hart, J., Obradovic, Z., Kissinger, C., and Villafraña, J. E. (1998) Protein disorder and the evolution of molecular recognition: Theory, predictions and observations. *Pac. Symp. Biocomput.* 473–484
33. DeForte, S., and Uversky, V. N. (2016) Order, disorder, and everything in between. *Molecules* **21**, 1090
34. Dunker, A. K., Brown, C. J., and Obradovic, Z. (2002) Identification and functions of usefully disordered proteins. *Adv. Protein Chem.* **62**, 25–49
35. Radivojac, P., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Obradovic, Z., Uversky, V. N., and Dunker, A. K. (2007) Intrinsic disorder and functional proteomics. *Biophys. J.* **92**, 1439–1456
36. Vucetic, S., Xie, H., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., Obradovic, Z., and Uversky, V. N. (2007) Functional anthology of intrinsic disorder. 2. cellular components, domains, technical terms, developmental processes, and coding sequence diversities correlated with long disordered regions. *J. Proteome Res.* **6**, 1899–1916
37. Xie, H., Vucetic, S., Iakoucheva, L. M., Oldfield, C. J., Dunker, A. K., Obradovic, Z., and Uversky, V. N. (2007) Functional anthology of intrinsic disorder. 3. Ligands, post-translational modifications, and diseases associated with intrinsically disordered proteins. *J. Proteome Res.* **6**, 1917–1932
38. Conser, T. G., Kaback, H. R., Tsolas, O., and Tsolas, O. (1991) Role of proline residues in the structure and function of a membrane transport protein. *Biochemistry* **30**, 1291–1298
39. Romero, P., Obradovic, Z., Li, X., Garner, E. C., Brown, C. J., and Dunker, A. K. (2000) Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**, 38–48
40. Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., Brown, C. J., and Dunker, A. K. (2003) Predicting intrinsic disorder from amino acid sequence. *Proteins* **53**, 566–572
41. Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., Brown, C., Dunker, A. K., and Obradovic, Z. (2005) Optimizing long intrinsic disorder predictors with protein evolutionary information. *J. Bioinform. Comput. Biol.* **3**, 35–60
42. Obradovic, Z., Peng, K., Vucetic, S., Radivojac, P., and Dunker, A. K. (2005) Exploiting heterogeneous sequence properties improves prediction of protein disorder. *Proteins* **61**, 176–182
43. Yang, Z. R., Thomson, R., McNeil, P., and Esnouf, R. M. (2005) RONN: The bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics* **21**, 3369–3376
44. Dosztányi, Z., Csizmok, V., Tompa, P., and Simon, I. (2005) IUPred: Web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **21**, 3433–3434
45. Dosztányi, Z. (2018) Prediction of protein disorder based on IUPred. *Protein Sci.* **27**, 331–340
46. Mészáros, B., Erdős, G., and Dosztányi, Z. (2018) IUPred2A: Context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Res.* **46**, 329–337
47. Xie, X., Harrison, D. H., Schlichting, I., Sweet, R. M., Kalabokis, V. N., Szent-Györgyi, A. G., and Cohen, C. (1994) Structure of the regulatory domain of scallop myosin at 2.8 Å resolution. *Nature* **368**, 306–312
48. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948
49. Cilia, E., Pancsa, R., Tompa, P., Lenaerts, T., and Vranken, W. F. (2013) From protein sequence to dynamics and disorder with DynaMine. *Nat. Commun.* **4**, 2741
50. Cilia, E., Pancsa, R., Tompa, P., Lenaerts, T., and Vranken, W. F. (2014) The DynaMine webserver: Predicting protein dynamics from sequence. *Nucleic Acids Res.* **42**, 264–270
51. Hornbeck, P., Zhang, B., Murray, B., Kornhauser, J. M., Latham, V., and Skrzypek, E. (2014) PhosphoSitePlus, 2014: Mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* **43**, 512–520
52. Roy, A., Kucukural, A., and Zhang, Y. (2010) I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**, 725–738
53. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., and Zhang, Y. (2014) The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7–8
54. Dijkstra, M. J. J., Fokink, W. J., Heringa, J., van Dijk, E., and Abeln, S. (2018) The characteristics of molten globule states and folding pathways strongly depend on the sequence of a protein. *Mol. Phys.* **116**, 3173–3180
55. Smialowski, P., Doose, G., Torkler, P., Kaufmann, S., and Frishman, D. (2012) Proso II - a new method for protein solubility prediction. *FEBS J.* **279**, 2192–2200
56. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker, J. M., ed. *The Proteomics Protocols Handbook*, Springer Protocols Handbooks, Humana Press, Totowa, NJ: 571–607
57. Milton, D. L., Schneck, A. N., Ziech, D. A., Ba, M., Facemyer, K. C., Halayko, A. J., Baker, J. E., Gerthoffer, W. T., and Cremonese, C. R. (2011) Direct evidence for functional smooth muscle myosin II in the 10S self-inhibited monomeric conformation in airway smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1421–1426
58. Wang, F., Thirumurugan, K., Stafford, W. F., Hammer, J. A., Knight, P. J., and Sellers, J. R. (2004) Regulated conformation of myosin V. *J. Biol. Chem.* **279**, 2333–2336
59. Batters, C., Brack, D., Ellrich, H., Averbeck, B., and Veigel, C. (2016) Calcium can mobilize and activate myosin-VI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E1162–E1169

Disordered Myo16Tail behaves as molten globule

60. Yang, Y., Baboolal, T. G., Siththanandan, V., Chen, M., Walker, M. L., Knight, P. J., Peckham, M., and Sellers, J. R. (2009) A FERM domain autoregulates *Drosophila* myosin 7a activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4189–4194
61. Umeki, N., Jung, H. S., Sakai, T., Sato, O., Ikebe, R., and Ikebe, M. (2011) Phospholipid-dependent regulation of the motor activity of myosin X. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 783–788
62. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd Ed., Springer, New York, NY
63. Heyduk, T., Lee, J. C., and Doisy, E. A. (1990) Application of fluorescence energy transfer and polarization to monitor *Escherichia coli* cAMP receptor protein and lac promoter interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1744–1748
64. Lobato, L., Bouzahir-Sima, L., Yamashita, T., Wilson, M. T., Vos, M. H., and Lieb, U. (2014) Dynamics of the heme-binding bacterial gas-sensing dissimilative Nitrate Respiration Regulator (DNR) and activation barriers for ligand binding and escape. *J. Biol. Chem.* **289**, 26514–26524
65. Pintér, R., Huber, T., Bukovics, P., Gaszler, P., Vig, A. T., Tóth, M.Á., Gazsó-Gerhát, G., Farkas, D., Migh, E., Mihály, J., and Bugyi, B. (2020) The activities of the Gelsolin homology domains of flightless-1 in actin dynamics. *Front. Mol. Biosci.* **7**, 575077
66. Tóth, M.Á., Majoros, A. K., Vig, A. T., Migh, E., Nyitrai, M., Mihály, J., and Bugyi, B. (2016) Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of sarcomere length short (SALS) protein. *J. Biol. Chem.* **291**, 667–680
67. Vig, A. T., Földi, I., Szikora, S., Migh, E., Gombos, R., Tóth, M.Á., Huber, T., Pintér, R., Talián, G. C., Mihály, J., and Bugyi, B. (2017) The activities of the C-terminal regions of the formin protein Disheveled-associated activator of morphogenesis (DAAM) in actin dynamics. *J. Biol. Chem.* **292**, 13566–13583
68. Alexander, R., William, R. L., and Madeline, A. S. (2007) Intrinsic fluorescence in protein structure analysis. In *Methods in Protein Structure and Stability Analysis*, Nova Science Publishers, New York, NY: 55–72
69. Reshetnyak, Y. K., Koshevnik, Y., and Burstein, E. A. (2001) Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. III. Correlation between fluorescence and microenvironment parameters of individual tryptophan residues. *Biophys. J.* **81**, 1735–1758
70. Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., and Ivkova, M. N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.* **18**, 263–279
71. Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. (1990) Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **347**, 37–44
72. Hild, G., Bugyi, B., and Nyitrai, M. (2010) Conformational dynamics of actin: Effectors and implications for biological function. *Cytoskeleton* **67**, 609–629
73. Ptitsyn, O. B., and Uversky, V. N. (1994) The molten globule is a third thermodynamical state of protein molecules. *FEBS Lett.* **341**, 15–18
74. Uversky, V. N., and Ptitsyn, O. B. (1996) All-or-none solvent-induced transitions between native, molten globule and unfolded states in globular proteins. *Fold. Des.* **1**, 117–122
75. Somogyi, B., Nyitrai, M., and Hild, G. (2007) Steady-state quenching of fluorescence to study protein structure and dynamics. In *Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Luminescence Spectroscopy and Circular Dichroism*, Nova Science Publishers, New York, NY: 153–185
76. Bódis, E., Raics, K., Nyitrai, M., Majer, Z., and Lukács, A. (2013) Fluorescence lifetime distributions report on protein destabilisation in quenching experiments. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **129**, 108–114
77. Mátyus, L., Szöllösi, J., and Jenei, A. (2006) Steady-state fluorescence quenching applications for studying protein structure and dynamics. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **83**, 223–236
78. Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Uversky, V. N., and Cripas, A. F. (1991) Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* **31**, 119–128
79. Turoverov, K. K., and Kuznetsova, I. M. (2003) Intrinsic fluorescence of actin. *J. Fluoresc.* **13**, 41–57
80. Neyroz, P., Ciurli, S., and Uversky, V. N. (2012) Denaturant-induced conformational transitions in intrinsically disordered proteins. *Methods Mol. Biol.* **896**, 197–213
81. Nyitrai, M., Hild, G., Belágyi, J., and Somogyi, B. (1997) Spectroscopic study of conformational changes in subdomain 1 of G-actin: Influence of divalent cations. *Biophys. J.* **73**, 2023–2032
82. Dijkstra, D. S., Broos, J., Visser, A. J. W. G., Van Hoek, A., and Robillard, G. T. (1997) Dynamic fluorescence spectroscopy on single tryptophan mutants of EII(ntl) in detergent micelles. Effects of substrate binding and phosphorylation on the fluorescence and anisotropy decay. *Biochemistry* **36**, 4860–4866
83. Greenfield, N. J. (2007) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* **1**, 2876–2890
84. Nagy, B., and Strzelecka-Golaszewska, H. (1972) Optical rotatory dispersion and circular dichroic spectra of G-actin. *Arch. Biochem. Biophys.* **150**, 428–435
85. Micsónai, A., Wien, F., Kernya, L., Lee, Y.-H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2015) Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 3095–3103
86. Micsónai, A., Wien, F., Bulyáki, É., Kun, J., Moussong, É., Lee, Y. H., Goto, Y., Réfrégiers, M., and Kardos, J. (2018) BeStSel: A web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra. *Nucleic Acids Res.* **46**, 315–322
87. Ball, L. J., Kühne, R., Schneider-Mergener, J., and Oschkinat, H. (2005) Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew. Chem.* **44**, 2852–2869
88. Mendes, L. F. S., Garcia, A. F., Kumagai, P. S., De Moraes, F. R., Melo, F. A., Kmetzsch, L., Vainstein, M. H., Rodrigues, M. L., and Costa-Filho, A. J. (2016) New structural insights into Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in solution. *Sci. Rep.* **6**, 1–14
89. Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: The importance of being unfolded. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1698**, 131–153
90. Judy, E., and Kishore, N. (2019) A look back at the molten globule state of proteins: Thermodynamic aspects. *Biophys. Rev.* **11**, 365–375
91. Lee, R. V. D., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R. J., Daughdrill, G. W., Dunker, A. K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D. T., Kim, P. M., Kriwacki, R. W., Old, C. J., Pappu, R. V., Tompa, P., et al. (2014) Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589–6631
92. Uversky, V. N., Oldfield, C. J., and Dunker, A. K. (2008) Intrinsically disordered proteins in human diseases: Introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 215–246
93. Gomori, G. (1955) Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods Enzymol.* **1**, 138–146
94. Niesen, F. H., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* **2**, 2212–2221
95. Lucas, T. G., Gomes, C. M., and Henriques, B. J. (2019) Thermal shift and stability assays of disease-related misfolded proteins using differential scanning fluorimetry. *Methods Mol. Biol.* **1873**, 255–264