

Ph.D. értekezés tézisei

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

Telek Elek

2021

Témavezetők: Dr. Lukács András

Dr. Bugyi Beáta

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola (D93)

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Sümegi Balázs<sup>†</sup>, Ifj. Prof. Dr. Gallyas Ferenc

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

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós



**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**  

---

**ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR**

## BEVEZETÉS

A miozin motorfehérjék képesek az ATP kémiai energiáját átalakítani mechanikai erő kifejtésé az aktin filamentumokon történő elmozdulás érdekében [1]. Patel és munkatársai 2001-ben egy új, nem-konvencionális motorfehérjét fedeztek fel, amelyet egy új miozin osztályba soroltak: miozin XVI osztály néven [2]. Két miozin 16 (Myo16) izoforma különböztethető meg: a Myo16a a rövidebb, citoplazmatikus, és a hosszabb, predomináns Myo16b izoforma. A nem-konvencionális Myo16 tartalmaz egy N-terminális pre-motor extenziót, amely egy nyolc ankyrin ismétlődésből álló ankyrin domén (Myo16Ank), egy konzervált motor domént, egy IQ motívumot és egy egyedi C-terminális extenziót a Myo16b izoforma esetében (Myo16Tail).

A C-terminális farok 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  $\alpha$ -helikális motívumokból elősegítve a miozinok dimerizálódását és polimerizációját. Másrészt léteznek olyan miozinok is, amelyek nem képesek dimerizálódni. A C-terminális régiók 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 [3–5]. Ez a szerkezeti diverzitás számos intracelluláris funkcióhoz vezethet, úgy mint vezikuláris transzport, dimerizáció, celluláris lokalizáció, horgonyzás, fehérje-fehérje interakció, kináz aktivitás és autoreguláció [6–9].

Az emlősökben expresszálandó Myo16 főként embrionális és felnőtt patkány agy fejlődési időszakának első két hetében mutat jelentős termelődést, kisebb mennyiségben néhány perifériás szövetben is megtalálható. A Myo16 jelenléte egybeesik a neuronális sejtmigrációval, az axonális növekedéssel és a dendritek kialakulásával [2]. Az N-terminális Myo16Ank kötődik a protein foszfatáz 1 katalitikus alegységével (PP1c) és szabályozza annak foszfatáz aktivitását [10]. A PP1c szerepet játszik a szinaptikus plaszticitás kontrollálásában, a tanulás mechanizmusában és a memória képességének fejlődésében [11]. A Myo16 eszenciális a neuronális foszfoinozid 3-kináz (PI3K) jelátvitelben, ahol az Src tirozin kináz családba tartozó Fyn fehérje által foszforilálódik a C-terminális Myo16Tail régió keresztül [12]. A foszforilált Myo16Tail ezt követően egyidejűleg kötődik a PI3K-val és a WAVE1 regulatórikus komplexel (WRC). Ezáltal a Myo16 közvetítő funkciót lát el és képes a WRC–Arp2/3 komplexen keresztül szabályozni az aktin citoskeleton átrendeződését [12]. Ezzel párhuzamosan a Myo16 lassítja az aktin polimerizáció dinamikáját a Purkinje sejtek dendritikus tüskéinek poszt-szinaptikus oldalán. Továbbá a Myo16 szerepet játszik az idegrostok axon terminálisainak preszinaptikus szerveződésében is [13,14]. Tehát a Myo16

fontos szerepet tölt be az idegrostok és Purkinje sejtek szinapszisainak morfológiai és funkcionális szabályozásában. A Myo16b sejtmagi lokalizációját figyelték meg egér kisagyban (P23, 31) *in vivo* körülmények között [2,15], amely a Myo16Tail funkciójának tulajdonítható, annak ellenére, hogy nem található tipikus nuklárius lokalizációs szekvencia (NLS) motívum a Myo16Tail szekvenciában. A Myo16 motor domén funkciója még nem ismert. A fent említett irodalmi adatok alapján a Myo16 fontos szerepet tölt be a neuronális funkciók különféle fázisaiban. Ezen felül a Myo16 genetikai mutációi összefüggésbe hozhatók neurodegeneratív megbetegedésekkel, úgy mint a skizofrénia, autizmus spektrum zavar (ASD), bipoláris II. típusú zavar és major depresszió [16–18].

A Myo16Tail egy sokoldalú C-terminális extenzió, amely tartalmaz egy WAVE1 interakciós régiót (WIR), egy neuronális tirozin-foszforilált adaptor homológia motívumot (NHM) a foszfoinozítid 3-kináz számára (NYAP) [12], egy prolin-gazdag régiót és egy disztális C-terminális szekvencia motívumot, mely feltehetően szerepet játszik a Myo16b sejtmagba juttatásában [15]. A funkcionális diverzitás mellett a Myo16Tail rendezetlen szerkezettel rendelkezhet natív állapotban [19]. A rendezetlen fehérjék (intrinsically disordered proteins – IDP) és rendezetlen fehérje régiók (intrinsically disordered proteins – IDR) nem képesek másodlagos és harmadlagos szerkezetet felvenni [20–22]. A rendezetlen fehérjék a rendezetlenség mértéke alapján különböző osztályokba sorolhatóak, úgy mint az olvadt gombolyag különféle állapotai (molten globule, pre-molten globule) és a “random coil” [20]. A rendezetlen fehérjéket és fehérje régiókat irreguláris aminosav összetétel jellemzi, amely magas nettó töltést eredményez az elektrosztatikus taszítóerők végett. Továbbá alacsony a hidrofobicitásuk, ami a globuláris szerkezet feltekeredését akadályozza meg [23].

A rendezetlen fehérjék sajátossága, hogy a poszttranszlációs módosulási helyek kifejezetten a rendezetlen régiókban fordulnak elő, amely a fehérjék felszínének hozzáférhetőségével függ össze [24]. A szerkezeti rendezetlenségnek funkcionális előnyei vannak, ami a szerkezet flexibilitásában és partnerfehérje kötődésében (nagy specificitás, alacsony affinitás), valamint környezeti tényezők hatására bekövetkező plasztikus konformációváltozásban nyilvánul meg [20,25–28]. Néhány hasonló funkciót már leírtak a Myo16b esetében [12,15].

Kutatásaink során a C-terminális Myo16Tail konformációs dinamikai, szerkezeti és a funkcionális karakterizálását tűztük ki célul bioinformatika analízisek, fluoreszcencia-, cirkuláris dikroizmus spektroszkópiái, valamint kalorimetriás módszerek segítségével.

## CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a nem-konvencionális miozin XVI osztályba tartozó miozin 16b (Myo16b) izoforma C-terminális (Myo16Tail) szerkezeti és funkcionális tulajdonságait vizsgáltuk. A szekvencia összetétel alapján a 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?

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### Bioinformatika

A patkány Myo16Tail aminosav összetétele alapján rendezetlen szerkezetet feltételezünk, melyet különböző rendezetlenséget valószínűsítő programok kombinációjával vizsgáltunk: VLXT [29], VL3-BA [30], VLS2b [31], Ronn [32] és IUPred [33]. A fehérje szerkezet flexibilitását DynaMine programmal analizáltuk [34]. Foszforilációs helyek előfordulásának valószínűségét PhosphositePlus program segítségével végeztük [35]. A Myo16Tail szekvenciát különböző gerinces osztályok képviselőinek Myo16 C-terminális szekvenciáival hasonlítottuk össze és vizsgáltuk a konzerváltságot Clustal-X program segítségével [36]. A Myo16Tail lehetséges három dimenziós szerkezetét az aminosav szekvencia alapján I-TASSER webszerver segítségével modelleztük [37].

### Fehéjék expresszálása és tisztítása

A rekombináns patkány Myo16Tail (1146-1912 aminosav) és Myo16Tail (-IQ) (1176-1912) DNS szekvenciákat pFastBac plazmidba klónoztuk (ThermoFisher Scientific), amely tartalmaz egy 6 hisztidinből álló affinitás motívumot (His<sub>6</sub>) a konstrukciók N-terminális oldalán. A rekombináns His<sub>6</sub>-Myo16Tail konstrukciókat Bakulovírus/Sf9 expressziós rendszerben állítottuk elő és denaturáló körülmények között tisztítottuk. A fehérjék tisztítása nikkell affinitás gyöngyök segítségével történtek, végül a denaturáló szert elvonva renaturáltuk a rekombináns fehérjéket. Az előállított és tisztított rekombináns Myo16Tail fragmentumokat Western blot segítségével is ellenőriztük. Az N-terminális miozin 16 ankyrin domén (Myo16Ank) *E. coli* (ER 25.66) expressziós rendszerben került előállításra és tisztítása GST affinitás oszlop segítségével történt [10]. Az aktin fehérjét acetonnal szárított, szkeletális izomforgácsból nyertük ki és tisztítottuk [38]. A Myo16IQ (1146-1175) motívumot szintetizáltattuk (Genscript, Piscataway, NJ, US). A rekombináns egér profilin 1 (profilin) fehérjét egy korábban leírt módszerrel tisztítottuk [39]. A Myo16Ank, Myo16IQ és profilin fluoreszcens jelölését Alexa Fluor® C5 568 maleimid (Alexa568, Invitrogen), valamint a G-aktin jelölését pirén (Sigma-Aldrich) fluoreszcens festékekkel végeztük.

### Fluoreszcens spektroszkópiai kísérletek

**Steady-state fluoreszcencia emisszió** során triptofán és 1-anilino-8-naftalin szulfonát (ANS) fluoreszcencia emissziós méréseket Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spektrofluoriméteren végeztük, 20 °C-on. A kontroll G-aktin és Myo16Tail mintákban található triptofán aminosavakat 295 nm-en gerjesztettük, majd a steady-state fluoreszcencia intenzitást 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

intenzitást 400-650 nm között detektáltuk szintén növekvő GuHCl koncentráció mellett. A GuHCl háttérintenzitását kivonva korigáltuk a mért adatokat. A triptofán fluoreszcencia mérések esetében gerjesztési és emissziós rések távolsága 2,5 nm volt, míg az ANS mérések esetében 5 nm. A mérések során 5-5  $\mu\text{M}$  fehérje mintát használtunk. Három mérés eredményét átlagoltuk és az eredményeket Origin 2020 szoftver segítségével értékeltük ki.

**Fluoreszcencia kioltás kísérletek** triptofán fluoreszcencia vizsgálatán keresztül zajlottak. Kísérleteinket a kontroll G-aktin és Myo16Tail fehérjéken végeztük akrilamid kioltó segítségével. A fluoreszcencia intenzitás kioltás méréseket Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spektrofluoriméterrel, míg a kioltás során mért élettartam kísérleteket Horiba Jobin Yvon Nanolog készülékkel 20 °C-on végeztük. A kioltásos kísérlet során a gerjesztési és emissziós paraméterek a következők voltak:  $\lambda_{\text{ex}}=295$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=350$  nm. A kísérletek során 5  $\mu\text{M}$  fehérje mintát használtunk. Az akrilamid koncentrációját 0-1,2 M között fokozatosan növeltük. A kapott adatokat korigáltuk a „belső szűrő” effektusra és a klasszikus Stern-Volmer egyenlet felhasználásával értékeltük ki Origin 2020 szoftver segítségével.

**Steady-state fluoreszcencia anizotrópia** kísérletek során triptofán fluoreszcencián keresztül vizsgáltuk az anizotrópia változást. A kontroll G-aktin és Myo16Tail fehérje mintákat növekvő GuHCl koncentráció hozzáadás mellett gerjesztettük 295 nm-en majd detektáltuk a fluoreszcencia intenzitást 350 nm-en. A kötésen alapuló fluoreszcencia anizotrópia kísérletek során 1-1,2  $\mu\text{M}$  Alexa568-jelölt Myo16Ank fehérjét és 1  $\mu\text{M}$  Alexa568-jelölt Myo16IQ peptidet használtunk ( $\lambda_{\text{ex}}=578$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=601$  nm). Az Alexa568–Myo16Ank-hoz Myo16Tail és Myo16Tail (-IQ) fehérjét, míg az Alexa568–Myo16IQ-hoz Myo16Ank fehérjét adtunk növekvő koncentrációban és vizsgáltuk az anizotrópia változást. Az Alexa568–Myo16Ank:Myo16Tail és Alexa568–Myo16Ank:Myo16Tail (-IQ), valamint az Alexa568–Myo16IQ:Myo16Ank komplex disszociációs egyensúlyi állandó értékeket ( $K_D$ ) kvadratus egyenlet alapján határoztuk meg. A triptofán és az Alexa568-jelölt fluoreszcencia anizotrópia kísérletek során a gerjesztési és emissziós rések távolsága 2,5 nm volt egyaránt és az anizotrópiát 10 percen át mértük. A kísérletekhez Horiba Jobin Yvon Fluorolog 3.22 spektrofluorimétert használtunk és a mérések 20 °C-on zajlottak. Az eredményeket Origin 2020 szoftver segítségével értékeltük ki.

**Időkorrelált egyfoton számlálás (TCSPC)** módszerével 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  $\mu\text{M}$  volt. Az egyes mérésekhez növekvő koncentrációban GuHCl oldatot

adtunk. A kísérletek során a réstávolság élettartam mérések esetén 3 nm, míg anizotrópia lecsengés esetén 10 nm volt. Az időkorrelált élettartam és anizotrópia lecsengés adatokra két exponenciális függvényt illesztettünk Origin 2020 program segítségével, majd meghatároztuk a triptofán fluoreszcencia élettartamokat és a fehérjék rotációs korrelációs ( $\theta$ ) paramétereit.

### **Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia**

A Myo16Tail másodlagos szerkezetét 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  $\mu$ M (1,1 mg/ml) volt a mérések során. A kísérleti paraméterek a következők: 0,01 cm úthossz, sáv szélesség 1 nm, scannelési sebesség 20 nm/min, válaszütem 4 másodperc. Továbbá a CD adatok segítségével kiszámoltuk az egy aminosavra eső moláris ellipticitás ( $\theta$ ) értékeket 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 [40]. A hőmérséklet felfűtési CD spektroszkópiai kísérletek során a Myo16Tail koncentrációja 1,15  $\mu$ M (0,1 mg/ml) volt és a mérések során 1 mm úthosszúságú cellát használtunk. A CD spektrumokat 10-100 °C között mértük 1 °C/min felfűtési sebességgel. A felfűtés során több mérést átlagoltunk és az adatokat BestSel programmal értékeltük ki.

### **Differenciális pásztázó kalorimetria (DSC)**

A kalorimetriás méréseket Setaram Micro DSC-III készülékkel végeztük. A kontroll G-aktin és Myo16Tail fehérje mintákat 20 °C-ról 100 °C-ra fűtöttük fel 0,3 és 0,1 K/min felfűtési sebességgel. A referencia mérések során a fehérjék saját pufferét használtuk. A G-aktin és a Myo16Tail koncentrációja 1 mg/ml volt a mérések során. Minden esetben a minta kétszer került felfűtésre az adott hőmérséklet tartományban. A második felfűtés igazolja, hogy a fehérjék az első felfűtés alatt már irreverzibilis módon denaturálódtak. Az eredményeket Origin 2020 program segítségével értékeltük ki.

### **Polimerizációs kinetikai mérések**

A polimerizációs kísérleteket pirén-jelölt aktin fehérjével végeztük (2  $\mu$ M, 2% jelölt). A polimerizációt 100 mM KCl és 2 mM MgCl<sub>2</sub> hozzáadásával indítottuk. 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 polimerizáció kezdeti, tranziens szakaszára (0 – 500 s) Origin 2020 program segítségével.

## EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

### Myo16Tail in silico bioinformatikai szekvencia analízis

Kísérleteink első fázisában *in silico* bioinformatikai módszerekkel vizsgáltuk a patkány Myo16Tail (tartalmazva az IQ motívumot) aminosav szekvenciát. A szekvencia alapján magas a rendezetlen szerkezetet elősegítő aminosavak aránya (68%), míg a másodlagos és harmadlagos szerkezet kialakulásáért felelős aminosavak 32%-ban képviseltetik magukat.

A Myo16Tail szerkezetét különböző rendezetlenséget előrejelző program kombinációjával tanulmányoztuk: VLXT, VL3-BA, VSL2b, Ronn és IUPred. A Myo16Tail C-terminális további része viszont nagymértékű rendezetlenséget mutat.

Tovább vizsgáltuk a patkány Myo16Tail feltételezett szerkezeti rendezetlenségét különböző gerinces osztályok képviselőinek Myo16Tail szekvenciáival összehasonlítva (*Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Rattus norvegicus* (Rn), *Gallus gallus* (Gg), *Xenopus tropicalis* (Xt), *Danio rerio* (Dr)) IUPred webszerver segítségével. Az analízis alapján a Myo16Tail szerkezeti rendezetlenség valószínűségek között jelentős átfedés mutatkozik. A funkcionális fehérje régiók közül az IQ motívum esetében rendezettségre utaló szerkezet valószínűsíthető, míg az NHM és a prolin-gazdag régió minden vizsgált gerinces faj szekvenciájában nagymértékű rendezetlenséget feltételez. Mindezek arra utalnak, hogy a Myo16Tail rendezetlen fehérje régiók konzerválódtak az evolúció során és fontos szerepet játszhatnak a humán Myo16 funkciójában.

A Myo16Tail szekvenciát tovább vizsgáltuk fehérje szerkezeti flexibilitását prediktáló DynaMine program segítségével. A predikció alapján a Myo16Tail 70%-a flexibilisnek tekinthető ( $S^2$  érték  $<0,7$ ), míg a merev 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 konformációváltozásra utalhat (10%), pl. partner fehérje kötődésekor a rendezetlen fehérje fel vehet egy rendezettebb szerkezetet [41].

A szakirodalom alapján a rendezetlen fehérjék gazdagabbak poszttranszlációs módosulási helyekben, mint a rendezett szerkezetű társaik [24]. A Myo16Tail szekvenciát tovább vizsgáltuk PhosphositePlus programmal lehetséges poszttranszlációs módosulási helyeket keresve [35]. A referencia alapú predikció szerint a Myo16Tail 17 foszforilációs helyet tartalmazhat (10 Ser, 4 Thr és 3 Tyr foszforilációs hely). Prediktált foszforilációs helyek találhatóak az NHM motívumban, melyek közül két aminosav foszforilációjának ( $Y^{1416}$  és  $Y^{1441}$ ) szerepét már korábban leírták [12], továbbá jelentős mennyiségben előfordulhatnak foszforilációs helyek a rendezetlen régiókban. A Clustal-X szekvencia analízis során a prediktált foszforilációs helyek szintén nagyfokú konzerváltságot mutattak. Az analízis biológiai relevanciáját tekintve, a konzervált foszforilációs



helyek alapján feltételezhetjük, hogy a Myo16Tail rendezetlen régióinak foszforilációja fontos szerepet játszhatott a Myo16 fehérje evolúciójában.

A bioinformatikai eredmények szerint a Myo16Tail szerkezete nagyfokú rendezetlenséget mutat, habár szerkezeti adatok nem állnak még rendelkezésünkre. Ezért I-TASSER [37] programmal modelleztük a Myo16Tail lehetséges szerkezetét. A modell alapján a Myo16Tail tartalmaz lehetséges  $\alpha$ -helikális és  $\beta$ -lemez másodlagos szerkezeti elemeket, valamint nagy mennyiségben rendezetlen szerkezetű régiókat. A Myo16Tail szerkezete leginkább az olvadt gombolyag (molten globule), részben rendezetlen szerkezeti állapotnak felel meg. A molten globula fehérje szerkezet egy kevésbé kompakt, sokkal inkább flexibilis és dinamikus fehérje konformációnak felel meg [42].

### **Myo16Tail alacsony kooperatív denaturációt mutat**

A bioinformatikai szekvencia analízisek megerősítéséhez kísérleteink során steady-state triptofán és ANS, valamint időkorrelált triptofán fluoreszcencia spektroszkópai mérésekkel vizsgáltuk a Myo16Tail konformációs tulajdonságait. A rekombináns Myo16Tail hat triptofán aminosavat tartalmaz. Ezek közül három a rendezett régiókban található, míg további három triptofán a rendezetlen régiókban a rendezetlenségi valószínűségi analízis alapján. A triptofán aminosavak, mint belső fluorofórok érzékenyek a lokális környezeti változásokra [43]. Ha a triptofánok flexibilis fehérje régiókban találhatóak és az oldat számára hozzáférhetőek, akkor a fluoreszcencia intenzitás maximális hullámhossza 350-360 nm között detektálható [44]. A kísérletek során először a Myo16Tail triptofán fluoreszcencia intenzitás változását tanulmányoztuk növekvő GuHCl koncentráció jelenlétében.

A Myo16Tail triptofán fluoreszcencia intenzitás maximális hullámhossza a mérés során denaturáló ágens hiányában ~351 nm volt, valamint a fluoreszcencia intenzitás csökkenése is kevésbé volt kifejezett a G-aktin kontrollhoz képest. A GuHCl koncentráció növelésével a Myo16Tail konformáció kis mértékben változott, 9 nm vörös spektrális eltolódás volt megfigyelhető 351-360 nm között, összehasonlítva a kontroll G-aktin mérésekkel (335-359 nm vörös eltolódás). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a triptofánok hozzáférhetőek és legalább részben a kevésbé strukturált, rendezetlen fehérje szerkezetben találhatóak. A maximális hullámhossz GuHCl koncentráció függése tovább erősíti ezt a feltételezést. A G-aktin denaturáció során a maximális hullámhossz változás szigmoid tendenciát mutat, ami utal a kooperatív konformációváltozására. Ezzel szemben a Myo16Tail konformációváltozásában a kooperativitás hiánya figyelhető meg és csak enyhe szigmoid változást láthatunk a maximális hullámhossz értékekben. A nagymértékű kooperativitás utal a globuláris, rendezett fehérje szerkezetre, míg az alacsony kooperativitás rendezetlen, flexibilis szerkezetet feltételez [45].

A Myo16Tail konformációt 1-anilino-naftalin-8 szulfonsav (ANS) fluoreszcencia emissziós kísérletekkel is vizsgáltuk. Az ANS eltérő affinitással képes kötődni a fehérjék különböző konformációihoz [46]. Az ANS fluoreszcencia intenzitás változása és a spektrális eltolódás növekvő GuHCl hozzáadására tükrözi a fehérje konformáció mikrokörnyezetének változását (rendezett szerkezet – hidrofób, rendezetlen – poláros környezet). Ugyanakkor az ANS nem egyenesen arányosan kötődik a kitekeredő fehérjéhez, hanem maximális fluoreszcencia intenzitása kifejezetten a molten globula konformációs állapotra jellemző. Az alacsony ANS intenzitás pedig a rendezett vagy a teljesen kitekeredett fehérje szerkezetet reprezentálja [46].

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. 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.

A triptofán hozzáférhetőség vizsgálatához fluoreszcencia kioltás kísérleteket végeztünk. A kontroll G-aktin és Myo16Tail steady-state triptofán fluoreszcencia intenzitás kioltását akrilamid segítségével végeztük. A Stern-Volmer egyenlet alapján 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 mértékű triptofán hozzáférhetőségre. A Myo16Tail esetében a Stern-Volmer féle ábrázolás eltér a lineáristól és felfelé mutató tendenciát figyelhetünk meg a kioltásban. A Myo16Tail fluoreszcencia kioltás lineáris tendenciától való eltérése arra utal, hogy nem csak dinamikus, hanem statikus kioltás is jelen volt. A statikus komponens során „sötét komplexek” nem gerjeszthetők, mivel a fluorofórok gyors hozzáférhetősége miatt még a gerjesztés előtt megtörténik a kioltás, így a „sötét komplexek” nem járulnak hozzá a triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás eredményekhez.

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” formálódás – történik a  $\tau_0/\tau$  Stern-Volmer ábrázolás lapos, egyenes vonal lenne. 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 ábrázolása lineáris, ami dinamikus kioltásra utal. A kontroll G-aktin triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás esetében az átlagos triptofán fluoreszcencia élettartam szignifikáns csökkenést mutat a növekvő akrilamid koncentráció függvényében. A Myo16Tail triptofán fluoreszcencia kioltás élettartam Stern-Volmer ábrázolása enyhe emelkedést mutat 0,5 M akrilamid koncentrációig, ezt követően viszont ellaposodó tendenciát figyelhetünk meg. Az átlagos triptofán fluoreszcencia 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 alig változik (~2,8 ns).

Tehát az időkorrelált triptofán fluoreszcencia élettartam kioltás 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 dinamikus kioltás mellett a statikus komponens jelentős mértékben hozzájárul a Myo16Tail triptofán fluoreszcencia kioltáshoz és triptofánok jelentős mértékben hozzáférhetőek az oldat és az akrilamid számára.

### **Myo16Tail konformációs dinamika karakterizálása**

Steady-state triptofán fluoreszcencia anizotrópia kísérletekkel vizsgáltuk a fehérje konformáció sajátosságait növekvő GuHCl koncentráció függvényében.

A kontroll G-aktin anizotrópia szintén kétfázisú konformációs átmenet jeleit mutatja. A Myo16Tail anizotrópia fokozatosan csökkenő változást mutatott, hasonlóan a triptofán fluoreszcencia emissziós eredményekhez. Az alacsony kooperatív denaturáció és a meredek szigmoid változás hiánya [47] az anizotrópia eredményekben is megfigyelhető volt, ami tovább erősíti a Myo16Tail rendezetlen szerkezetének elméletét.

Időkorrelált triptofán anizotrópia lecsengés kísérletekkel 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. A kontroll mérés során kapott G-aktin triptofán rotációs korrelációs idők összhangban vannak a korábban leírt eredményekkel [205]. A G-aktin triptofánok rotációs korrelációs ideje ~26 ns volt a denaturáló ágens hiányában, amely a GuHCl hozzáadásra csökkenő tendenciát mutatott. 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.

A Myo16Tail anizotrópia lecsengése különbözik a kontroll mérésektől. Az adatokra két exponenciális függvényt illesztve két komponens figyelhető meg a triptofánok forgásában. GuHCl hiányában egy gyors ~1 ns és egy lassú ~33 ns rotációs korrelációs idő komponens határoztunk meg. 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 során mért lassú komponensű kezdeti rotációs korrelációs idő (~33 ns) gyakorlatilag egyenlő a molekula tömeg (86,5 kDa) és a kísérletes úton származtatott képlet alapján számított triptofán rotációs korrelációs idővel [49]. A GuHCl koncentrációt növelve lassú csökkenés figyelhető meg a Myo16Tail triptofánok lassú komponensének forgásában, míg a gyors komponens szinte alig csökkent. A Myo16Tail mérés során kapott eredmények jól szemléltik, hogy a triptofánok legalább egy része hozzáférhetőbb az oldat számára.

Tehát a steady-state és időkorrelált denaturációs kísérletek dinamikus Myo16Tail konformáció változásra utalnak. Továbbá feltételezhetjük, hogy a rendezetlen régiók mellett másodlagos és harmadlagos szerkezeti elemek is jelen vannak a Myo16Tail szerkezetében.

### **Myo16Tail tartalmaz másodlagos szerkezeti elemeket és rendezetlen régiókat**

A Myo16Tail távoli ultraibolya (19-250 nm) tartományban mért CD spektrum elemzéséből információt nyerhetünk a fehérje fragmentum másodlagos szerkezetéről, illetve a strukturális elemek arányáról [50]. 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. Továbbá a nagy negatív minimum (205 nm) és a gyenge pozitív maximum (190 nm) a rendezetlen szerkezet jelenlétére is utal a CD spektrumon. A Myo16Tail másodlagos szerkezet kiértékeléséhez BestSel programot használtuk [51,52]. Az analízis 19,5%  $\alpha$ -hélix és 21,3%  $\beta$ -lemez másodlagos szerkezeti elemet mutatott ki. A fordulat (turn) 15,2%-ban és a rendezetlen szerkezeti elemek 44%-ban találhatóak meg a Myo16Tail szerkezetében, melyek aránya jelentős, összesen 59,2%-ot tesz ki. A nagymértékű Myo16Tail rendezetlenség a CD spektroszkópia alapján egybevágó eredményt mutat a szekvencia alapú bioinformatikai eredményekkel. Továbbá a Myo16Tail CD adatok alapján kiszámoltuk az egy aminosavra vonatkozó moláris ellipticitás ( $\theta$ ) értékeket, 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, ahol fehérjék különböző mértékű rendezetlen konformációs állapotainak populációi kerültek csoportosításra Uversky és Fink által [40]. A módosított ábrán a Myo16Tail konformációja a molten globula és a pre-molten globula populációk közé esik.

A másodlagos szerkezeti elemek vizsgálata után hődenaturációs CD spektroszkópai méréseket végeztünk. A kísérletek során a Myo16Tail fehérje mintát 10 és 100 °C között felfűtöttük, majd 10 °C-os lépésekben regisztráltunk egy újabb CD spektrumot. A Myo16Tail a hődenaturáció hatására fokozatos, de csekély mértékű spektrális változást mutatott, ami szintén az alacsony kooperatív denaturációt és a kompakt fehérje szerkezet hiányát támasztja alá. A BestSel elemzés ~7%  $\alpha$ -hélix tartalom csökkenést és ~5% rendezetlenség emelkedést mutatott ki. A  $\beta$ -lemez szerkezeti elemek aránya emelkedett ~4%-al, viszont ez feltehetően a magas hőmérsékleten végbemenő részleges fehérje aggregációnak köszönhető.

### **Myo16Tail termodinamikai instabilitást mutat**

A Myo16Tail termodinamikai stabilitását kalorimetriás (DSC) mérésekkel vizsgáltuk. A rendezetlen fehérjékre jellemző az oligomerizáció és aggregáció, ami úgynevezett exoterm kooperatív feltekeredésben nyilvánulhat meg a hidrofób kölcsönhatások erősödése miatt [53]. A kísérletek során először 0,3 K/perc felfűtési sebességgel denaturáltuk a Myo16Tail fehérjét 20-100 °C között. A Myo16Tail nem mutatta egyértelmű jelét kooperatív endoterm denaturációnak, csak kismértékű endoterm átalakulás volt megfigyelhető, ami utalhat a másodlagos szerkezeti elemek kitekeredésére. Ugyanakkor további jelentős nem kooperatív, fokozatos endoterm csökkenés volt megfigyelhető. Feltehetően a 0,3 K/min felfűtés mellett elkezdődik a Myo16Tail aggregálódása, ezért már csak az aggregátumok denaturálódása figyelhető meg (endoterm folyamat). Az aggregáció jelenségének megerősítése érdekében alacsonyabb felfűtési sebességen is végeztünk méréseket (0,1 K/min) 20-100 °C között. A lassabb felfűtési sebesség esetén pozitív irányú kooperatív, exoterm hőáram változást (45-80 °C) detektáltunk, ami aggregációra és/vagy exoterm kooperatív feltekeredésre utalhat.

Tehát a Myo16Tail alacsony termodinamikai stabilitása és a fehérje fragmentum kooperatív denaturációjának hiánya figyelhető meg 0,3 K/min felfűtésen. Alacsonyabb felfűtési sebesség mellett (0,1 K/min) exoterm kooperatív változást láthatunk, ami valószínűleg az aggregálódás és/vagy hidrofób kölcsönhatások erősségének növekedéséből származó exoterm, termikus szerkezeti feltekeredésnek köszönhető.

### **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. A mérések során az Alexa568-jelölt Myo16Ank 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 quadratikusan egyenlet segítségével számolt Myo16Ank:Myo16Tail disszociációs egyensúlyi állandó ( $K_D$ ) értéke  $\sim 2,5 \mu\text{M}$  volt. Az anizotrópia mérések második felében az IQ motívumot nem tartalmazó Myo16Tail (-IQ) növekvő koncentráció jelenlétében hasonlóan emelkedő Alexa568–Myo16Ank anizotrópia változást mértünk. A quadratikusan illesztés alapján a Myo16Ank:Myo16Tail (-IQ) disszociációs egyensúlyi állandó ( $K_D$ ) értéke  $\sim 5,6 \mu\text{M}$  volt.

Továbbá kíváncsiak voltunk arra, hogy önmagában a Myo16IQ motívum hatással van-e a Myo16Ank:Myo16Tail kötődésére. 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 állandó ( $K_D$ ) értéke  $\sim 16 \mu\text{M}$ -nak adódott.

A steady-state anizotrópia eredmények alapján a Myo16Tail kötődése dominál a Myo16Ank-hoz IQ motívum jelenlétében vagy hiányában is, viszont az IQ befolyásolhatja ezt a kötődést. Az anizotrópia eredményeink egyrészt igazolják a rekombináns Myo16Tail aktivitását, legalábbis a Myo16Ank kölcsönhatás tekintetében, másrészt a Myo16Tail egy új funkciójára derült fény a Myo16Ank interakción keresztül.

### **Myo16Tail nem befolyásolja az aktin polimerizáció dinamikáját**

A Myo16Tail prolin-gazdag régió feltételezett szerepét célzó kísérletek elő felében steady-state fluoreszcencia anizotrópiával vizsgáltuk az Alexa568-jelölt profilin anizotrópia változását növekvő Myo16Tail hozzáadásra. Az eredmények alapján az Alexa568–profilin anizotrópia változása nem mutatott szignifikáns különbséget emelkedő Myo16Tail koncentráció függvényében. További kísérletekben vizsgáltuk, hogy a profilin–G-aktin komplex befolyásolja-e a feltételezett Myo16Tail affinitást a profilinhez. Ezért 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.

Ezt követően pirén-jelölt G-aktin ( $2 \mu\text{M}$ ) fluoreszcencia emisszió keresztül vizsgáltuk az aktin polimerizáció dinamikáját Myo16Tail és profilin jelenlétében és hiányában. Az eredmények kvantitatív kiértékelése érdekében a normált polimerizációs görbék kezdeti szakaszára (0-500 s) egyenest illesztettünk és a meredekségből meghatároztuk a polimerizáció sebességi együtthatóit. Az adatok alapján a Myo16Tail nem képes befolyásolni aktin polimerizáció sebességét profilin hiányában és jelenlétében sem.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A Myo16Tail fontos szerepet tölthet be a PI3K jelátvitelben és feltehetően rendezetlen szerkezetű az aminosav szekvencia alapján. Habár a Myo16Tail szerkezetéről még nem áll rendelkezésre információ, valamint funkciói sem teljesen tisztázottak, ezért kísérleteinkben a Myo16Tail szerkezeti, konformációs és funkcionális vizsgálatát bioinformatikai, fluoreszcens-, CD spektroszkópiái, valamint kalorimetriás módszerek segítségével végeztük.

- A Myo16Tail szerkezeti rendezetlenség valószínűségi analízisek jelentős szerkezeti flexibilitást és rendezetlenséget mutatnak.
- A Myo16Tail rendezetlensége és a prediktált foszforilációs helyek jelentős része konzervált a gerinces Myo16Tail szekvenciák között.
- A Myo16Tail szerkezeti modell alátámasztja a natív rendezetlen szerkezetet.
- A Myo16Tail enyhe kooperatív denaturációt 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 G-aktin kioltással ( $K_{SV}=1,98 \pm 0,01 \text{ M}^{-1}$ ), valamint a Myo16Tail-ben a statikus kioltás dominál a dinamikussal szemben.
- A Myo16Tail denaturáns hiányában és jelenlétében is rendezetlenségre utaló konformációs dinamikát mutat, a gyors komponens a triptofánok rotációját (~1 ns), míg a lassúbb a Myo16Tail teljes rotációját (~33 ns) jellemzi.
- A Myo16Tail nagymértékű rendezetlenséget mutat a CD-spektroszkópia alapján (44%) a másodlagos szerkezeti elemek jelenléte mellett.
- A Myo16Tail termodinamikailag instabil, valamint hajlamos aggregációra, exoterm kooperatív feltekeredésre.
- A Myo16Tail ( $K_D= \sim 2,5 \mu\text{M}$ ) és Myo16Tail (-IQ) ( $K_D= \sim 5,6 \mu\text{M}$ ) kötődik az N-terminális Myo16Ank-hoz mikromoláris affinitással.
- A Myo16Tail nem kötődik a profilinhez és a profilin-G-aktin komplexhez, valamint nem befolyásolja az aktin polimerizáció dinamikáját profilin hiányában és jelenlétében.

A Myo16Tail natív molten globula konformációban bemutatóhelyként funkcionálhat [54], melynek szerepe lehet jelátviteli, poszttranszlációs módosulási folyamatokban [12], valamint autoregulációs szabályozásban. Ugyanakkor a Myo16Tail részben rendezetlen szerkezete fontos szerepet tölthet be a rendezetlen szerkezet-asszociált neurodegeneratív megbetegedések kialakulásában [55].

## PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Ph.D. munkámhoz kapcsolódó publikációk

1. Elek Telek, Kristóf Karádi, József Kardos, András Kengyel, Zsuzsanna Fekete, Henriett Halász, Miklós Nyitrai, Beáta Bugyi, András Lukács. 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
2. Elek Telek, András Kengyel, Beáta Bugyi. Myosin XVI in the nervous system. *Cells* (review), 9, E1903. (2020), IF: 4,366

Nyilvános idézők összesen : 3, független: -

### Ph.D. munkámhoz kapcsolódó konferencia előadások

1. Telek Elek, Karádi Kristóf, Kardos József, Kengyel András, Nyitrai Miklós, Bugyi Beáta, Lukács András. A miozin 16 C-terminális szerkezetének karakterizálása spektroszkópai módszerekkel. *MBTF Molekuláris Biofizika szekció ülés, miniszimpózium, Pécs, 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, Pécs, 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. *7<sup>th</sup> Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, 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, 2017. 08. 22-25.*
5. Telek Elek, Kengyel András, Nyitra Miklós. Biochemical Characterization of Myosin 16 Tail domain. *5<sup>th</sup> Interdisciplinary Doctoral Conference, Pécs, 2016. 05. 27-29.*

### Ph.D. munkámhoz kapcsolódó konferencia posztterek

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, 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. *47<sup>th</sup> European Muscle Conference*, Budapest, 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, 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. *62<sup>nd</sup> 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, 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. *61<sup>st</sup> 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. *15<sup>th</sup> Alpbach Motors Workshop, Myosin and Muscle, and other Motors*, Alpbach, Austria, 2016. 03. 12-18

## REFERENCIÁK

1. Coluccio, L.M. *Myosins, A Superfamily of Molecular Motors. Series: Advances in Experimental Medicine and Biology.*; 2nd ed.; Springer International Publishing, Switzerland, 2020;
2. 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.
3. Krendel, M.; Mooseker, M.S.; Physiol, A.J.; Physiol, C. Myosins : Tails ( and Heads ) of Myosin Superfamily : Diversity of. *Physiology* **2005**, *20*, 239–251.
4. Sellers, J.R. Myosins: A diverse superfamily. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2000**, *1496*, 3–22.
5. Sellers, J.R. *Myosins*; 2nd ed.; Oxford University Press, 1999;
6. 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.
7. Krendel, M., Mooseker, M.S. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology* **2005**, *20*, 239–251.
8. Foth, B.J.; Goedecke, M.C.; Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. *PNAS* **2006**, *103*, 3681–3686.
9. Batters, C.; Veigel, C. Mechanics and Activation of Unconventional Myosins. *Traffic* **2016**, *17*, 860–871.
10. Kengyel, A., Bécsi, B., Kónya, Z., Sellers, J.R., Erdődi, F., Nyitrai, M. Ankyrin domain of myosin 16 influences motor function and decreases protein phosphatase catalytic activity. *Eur. Biophys. J.* **2015**, *44*, 207–218.
11. Munton, R.P.; Vizi, S.; Mansuy, I.M. The role of protein phosphatase-1 in the modulation of synaptic and structural plasticity. *FEBS Lett.* **2004**, *567*, 121–128.
12. 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.
13. 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.
14. Telek, E.; Kengyel, A.; Bugyi, B. Myosin XVI in the Nervous System. *Cells* **2020**, *9*, 1903.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. Dyson, H.J.; Wright, P.E. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 197.
  22. Tompa, P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 527–533.
  23. 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.
  24. 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.
  25. Schulz, G.E. Nucleotide binding proteins. In *Molecular mechanism of biological recognition*; Balaban, M., Ed.; Elsevier/North-Holland Biomedical Press: New York, 1979; pp. 79–94.
  26. Kriwacki, R.W.; Hengst, L.; Tennant, L.; Reed, S.I.; Wright, P.E. 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.* **1996**, *93*, 11504–11509.
  27. Dunker, A.K.; Garner, E.; Guillot, S.; Romero, P.; Albrecht, K.; Hart, J.; Obradovic, Z.; Kissinger, C.; Villafranca, J.E. Protein disorder and the evolution of molecular recognition: theory, predictions and observations. *Pacific Symp. Biocomput.* **1998**, 473–484.
  28. DeForte, S.; Uversky, V.N. Order, disorder, and everything in between. *Molecules* **2016**, *21*, 1090.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 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.
  32. 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.
  33. Dosztányi, Z. Prediction of protein disorder based on IUPred. *Protein Sci.* **2018**, *27*, 331–340.
  34. 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.
  35. 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.
  36. 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.
  37. 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.
  38. Tóth, M.Á.; Majoros, A.K.; Vig, A.T.; Migh, E.; Nyitrai, M.; Mihály, J.; Bugyi, B. Biochemical activities of the Wiskott-Aldrich syndrome homology region 2 domains of sarcomere length short (SALS) protein. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 667–680.
  39. Perelroizen, I.; Marchand, J.-B.; Blanchoin, L.; Didry, D.; Carlier, M.-F.; Lindberg, & *Interaction of Profilin with G-Actin and Poly( L-proline)*; 1994; Vol. 33;.
  40. 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.

41. Dyson, H. J., Peter, E.W. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 54–60.
42. Dijkstra, M.J.J.; Fokink, 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.
43. 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.
44. 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).
45. Ptitsyna, O.B.; Uversky, V.N. *The molten globule is a third thermodynamical state of protein molecules*; 1994; Vol. 341;.
46. 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.
47. Neyroz, P.; Ciurli, S.; Uversky, V.N. Denaturant-induced conformational transitions in intrinsically disordered proteins. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *896*, 197–213.
48. Turoverov, K.K.; Kuznetsova, I.M. Intrinsic Fluorescence of Actin. *J. Fluoresc.* **2003**, *13*, 41–57.
49. Dijkstra, D.S.; Broos, J.; Visser, A.J.W.G.; Van Hoek, A.; Robillard, G.T. Dynamic fluorescence spectroscopy on single tryptophan mutants of E11(mtl) in detergent micelles. Effects of substrate binding and phosphorylation on the fluorescence and anisotropy decay. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4860–4866.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. Chandler, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. *Nature* **2005**, *437*, 640–647.
54. 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.
55. 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.