

**Dziedzina: Nauki ścisłe i przyrodnicze**

Dyscyplina: Nauki chemiczne



Politechnika  
Wrocławska

## **ROZPRAWA DOKTORSKA**

# **Analiza zależności pomiędzy strukturą i funkcją produktów proteolitycznego procesowania Nukleobindyny-2**

**mgr inż. Rafał Lenda**

*Promotor:*

**prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar**

*Promotor pomocniczy:*

**dr inż. Dominika Bystranowska**

**Słowa kluczowe:** *Homo sapiens, Gallus gallus, Nukleobindyna-2, nesfatyna-1, nesfatyna-2, nesfatyna-1/2, hormon peptydowy, jony cynku.*

WROCŁAW, 2024



*Pragnę serdecznie podziękować*

***prof. dr hab. inż. Andrzejowi Ożyharowi**, mojemu Promotorowi, za umożliwienie mi realizacji badań w Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej, zaangażowanie w ich realizację, cenne wskazówki i liczne dyskusje, pomoc w przygotowaniu rozprawy, oraz przede wszystkim za wyrozumiałość i cierpliwość.*

***dr inż. Dominice Bystranowskiej**, mojej Promotor Pomocniczej, za wprowadzenie mnie w badania dotyczące nesfatyn na etapie studiów magisterskich oraz bycie pierwszym mentorem, który zaszczepił we mnie pasję do pracy naukowej, za pomoc w realizacji badań, współpracę, życzliwość i przyjaźń.*

***Kolegom i Koleżankom z Laboratorium Biochemii i Biotechnologii**, za wsparcie, wspaniałą atmosferę, liczne uwagi i dyskusje, a w szczególności: Klaudii Bielak, Karolinie Partyk, Nikoli Sozańskiej i Annie Skorupskiej za okazaną przyjaźń.*

***Kolegom i Koleżankom ze Szkoły Doktorskiej Politechniki Wrocławskiej**, w szczególności: Agnieszce Ciesiolkiewicz, Kindze Halickiej-Stępień, Ewelinie Waglewskiej oraz Marcinowi Sojce za wiele wspaniałych chwil i wspomnień, dyskusji i długoletnią przyjaźń*

***Moim najbliższym**, Jolancie i Wiesławowi Lenda, Agnieszce Stopyra i Marzenie Lenda-Petrykowskiej, Alanowi An Jung Wei, za bezwarunkowe wsparcie, cierpliwość i motywację.*



# Spis treści

<i>Spis treści</i>	<i>I</i>
<i>Streszczenie</i>	<i>VII</i>
<i>Summary</i>	<i>XI</i>
<i>Wykaz skrótów</i>	<i>1</i>
<b>1 Wprowadzenie</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Właściwości białek inherentnie nieuporządkowanych</b>	<b>5</b>
1.1.1.1 Stany konformacyjne oraz klasyfikacja IDPs	6
1.1.1.2 Nieuporządkowanie zapisane w sekwencji aminokwasowej	8
1.1.1.3 Metody detekcji, opisu i analizy strukturalnej IDPs	8
<b>1.2 Właściwości nukleobindyn i ich pochodnych</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1 Budowa i geneza nukleobindyn oraz ich pochodnych</b>	<b>10</b>
<b>1.2.2 Właściwości domen paralogów nukleobindyn</b>	<b>13</b>
1.2.2.1 Modyfikacje potranslacyjne Nukleobindyn	16
<b>1.2.3 Dystrybucja i aktywność biologiczna Nucb1</b>	<b>17</b>
1.2.3.1 Nucb1 oddziałuje z białkami G	18
1.2.3.2 NLP wykazuje aktywność biologiczną	20
<b>1.2.4 Dystrybucja, aktywność biologiczna i właściwości Nucb2/N1</b>	<b>22</b>
1.2.4.1 Regulacja łąknięcia przez anoreksygenne działanie leptyny oraz Nucb2/N1	25
1.2.4.2 Udział Nucb2/N1 w zaburzeniach psychologiczno-neuronalnych	29
1.2.4.3 Inne właściwości biologiczne Nucb2/N1	32
1.2.4.4 Budowa Nucb2/N1	33
1.2.4.5 Wiązanie dwuwartościowych jonów metali wpływa na strukturę Nucb2/N3	34
<b>2 Cel pracy</b>	<b>41</b>
<b>3 Materiały i metody</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Materiały</b>	<b>43</b>
<b>3.1.1 Odczynniki</b>	<b>43</b>
<b>3.1.2 Oligonukleotydy i plazmidy</b>	<b>44</b>
3.1.2.1 Oligonukleotydy	44
3.1.2.2 Plazmidy	45
<b>3.1.3 Szczepy bakteryjne</b>	<b>46</b>

<b>3.1.4</b>	<b>Bufory, roztwory i podłoża hodowlane</b>	<b>46</b>
3.1.4.1	Bufory do pracy z DNA	46
3.1.4.2	Odczynniki do elektroforezy w żelu agarozowym	46
3.1.4.3	Podłoża mikrobiologiczne i antybiotyki	46
3.1.4.4	Bufory i roztwory do preparacji nesfatyn	47
3.1.4.5	Roztwory i bufory do elektroforezy w żelu poliakryloamidowym	47
3.1.4.6	Roztwory i bufory do Western-blot	48
3.1.4.7	Standardy DNA i białkowe	49
3.1.4.8	Roztwory i bufory do wymiany izotopowej proton-deuter	49
<b>3.2</b>	<b>Metody</b>	<b>50</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Techniki pracy z DNA</b>	<b>50</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Preparacja konstruktów cDNA</b>	<b>50</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Ekspresja i oczyszczanie nesfatyn</b>	<b>52</b>
3.2.3.1	Ekspresja nesfatyn	52
3.2.3.2	Oczyszczanie nesfatyn	52
<b>3.2.4</b>	<b>Identyfikacja nesfatyn</b>	<b>54</b>
3.2.4.1	Pomiar stężenia białka podstawowego	54
3.2.4.2	Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	54
3.2.4.3	Analiza Western-blot	55
3.2.4.4	Widma masowe nesfatyn	55
<b>3.2.5</b>	<b>Analizy bioinformatyczne</b>	<b>56</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Spektroskopia dichroizmu kołowego</b>	<b>56</b>
3.2.6.1	Podstawowe pomiary CD nesfatyn	56
3.2.6.2	Pomiary CD w funkcji temperatury	58
<b>3.2.7</b>	<b>Ultrawiórowanie analityczne</b>	<b>58</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Izotermiczna kalorymetria miareczkowa</b>	<b>59</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Ograniczona proteoliza nesfatyn</b>	<b>59</b>
<b>3.2.10</b>	<b>Spektroskopia absorpcyjna</b>	<b>60</b>
<b>3.2.11</b>	<b>Spektroskopia fluorescencyjna</b>	<b>61</b>
3.2.11.1	Pomiary fluorescencji kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego w obecności nesfatyn	61
3.2.11.2	Pomiary fluorescencji tioflawiny T w obecności nesfatyn	61
<b>3.2.12</b>	<b>Wymiana izotopowa proton-deuter</b>	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>Wyniki</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Otrzymywanie konstruktów cDNA</b>	<b>65</b>
<b>4.2</b>	<b>Otrzymywanie i oczyszczanie rekombinowanych nesfatyn</b>	<b>66</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Oczyszczanie ludzkich i kurzych homologów N1 i N2</b>	<b>67</b>
4.2.1.1	Oczyszczanie hN1 i gN1	67
4.2.1.2	Oczyszczanie hN2	70
<b>4.2.2</b>	<b>Oczyszczanie ludzkich i kurzych homologów N1/2</b>	<b>71</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Identyfikacja nesfatyn</b>	<b>74</b>
4.2.3.1	Identyfikacja nesfatyn techniką Western-blot	74
4.2.3.2	Wyznaczanie mas cząsteczkowych nesfatyn	74
<b>4.3</b>	<b>Analizy in silico</b>	<b>75</b>

---

<b>4.3.1</b>	<b>Przewidywania IDRs neszfatyn</b>	<b>76</b>
4.3.1.1	Przewidywania IDRs w obrębie ludzkich neszfatyn	76
4.3.1.2	Przewidywania IDRs kurzych neszfatyn	78
<b>4.3.2</b>	<b>Przewidywania struktury trzeciorzędowej neszfatyn</b>	<b>80</b>
<b>4.4</b>	<b>Spektroskopia dichroizmu kołowego</b>	<b>86</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Analiza struktury drugorzędowej neszfatyn w warunkach natywnych</b>	<b>86</b>
4.4.1.1	Analiza struktury drugorzędowej neszfatyn w nieobecności jonów metali dwuwartościowych	86
4.4.1.2	Analiza zmian struktury drugorzędowej neszfatyn pod wpływem jonów metali	89
<b>4.4.2</b>	<b>Analiza wpływu jonów Zn(II) na stabilność termiczną neszfatyn</b>	<b>92</b>
<b>4.5</b>	<b>Ultrawiórowanie analityczne</b>	<b>94</b>
<b>4.5.1</b>	<b>SV-AUC ludzkich neszfatyn</b>	<b>95</b>
<b>4.5.2</b>	<b>SV-AUC kurzych neszfatyn</b>	<b>98</b>
<b>4.6</b>	<b>Ograniczona proteoliza neszfatyn</b>	<b>101</b>
<b>4.7</b>	<b>ITC ludzkich neszfatyn</b>	<b>104</b>
<b>4.8</b>	<b>Spektroskopia absorpcyjna</b>	<b>107</b>
<b>4.9</b>	<b>Spektroskopia fluorescencyjna</b>	<b>108</b>
4.9.1	Pomiary fluorescencji ANS w obecności neszfatyn	108
4.9.2	Pomiary fluorescencji ThT w obecności neszfatyn	110
<b>4.10</b>	<b>HDX-MS ludzkich i kurzych neszfatyn</b>	<b>112</b>
<b>5</b>	<b>Dyskusja</b>	<b>117</b>
<b>5.1</b>	<b>Otrzymywanie ludzkich i kurzych neszfatyn</b>	<b>118</b>
<b>5.2</b>	<b>Analizy strukturalne in silico</b>	<b>120</b>
<b>5.3</b>	<b>Analiza właściwości molekularnych neszfatyn</b>	<b>121</b>
5.3.1	Proteolityczne procesowanie Nucleo2 prowadzi do powstania inherentnie nieuporządkowanej struktury N1	122
5.3.2	Jony Zn(II) indukują silne zmiany konformacyjne neszfatyn i zmiany w ich stanie oligomerycznym	124
5.3.2.1	Wpływ jonów Zn(II) na strukturę drugorzędową neszfatyn	125
5.3.2.2	Jony Zn(II) wpływają na stan oligomeryczny neszfatyn	126
5.3.2.3	Różnice w oddziaływaniu jonów Zn(II) z ludzką i kurzą N1 oraz N1/2	127
5.3.2.4	Ludzkie i kurcze homologe N1 oraz N1/2 zawierają motywy amyloidowe	129
5.3.2.5	Janusowy wpływ jonów Zn(II) na ludzką i kurzą N1 oraz N1/2	130
<b>6</b>	<b>Podsumowanie i dalsze badania</b>	<b>133</b>
<b>Załącznik</b>		<b>136</b>

---

Sekwencje rekombinowanych nesfatyn .....	136
Materiały dodatkowe .....	137
<b><i>Spis rysunków i tabel</i></b> .....	<b>150</b>
Spis rysunków .....	150
Spis tabel .....	152
<b><i>Dorobek naukowy i pozanaukowy</i></b> .....	<b>153</b>
Publikacje i konferencje naukowe .....	153
Inne osiągnięcia/aktywność .....	154
<b><i>Literatura</i></b> .....	<b>155</b>







# Streszczenie

Nesfatyna-1 (N1), -2 (N2) i -1/2 (N1/2) są produktami proteolitycznego procesowania końca N Nukleobindyny-2 (Nucb2) przez konwertazy prohormonów (PCs, ang. *prohormone convertases*). Nucb2 i/lub N1 (Nucb2/N1) są białkami zaangażowanymi w szereg istotnych funkcji biologicznych, takich jak: regulacja homeostazy energetycznej [1]; odpowiedź na bodźce stresowe [2]; karcynogeneza [3,4]; patogeneza chorób psychiczno-neuronalnych [5,6]; czy regulacja ciśnienia osmotycznego krwi [7]. Rola pozostałych nesfatyn pozostaje nieznana. Relacja pomiędzy strukturą i funkcją nesfatyn wciąż jest zagadnieniem praktycznie nie podejmowanym w literaturze. W związku z tym mając na uwadze wielofunkcyjność Nucb2/nesfatyn, ich powszechną ekspresję i potencjał zastosowań medycznych badania relacji struktura-funkcja zasługują na szczególną uwagę.

W ramach poniższego projektu otrzymano 5 homologów nesfatyn z dwóch gatunków, tj. ludzką N1, N2, N1/2 oraz kurzą N1 i N1/2. Powyższe białka poddano następnie wnikliwej analizie strukturalnej i porównawczej. Warto podkreślić, iż jest to pierwsza i jedyna jak dotąd tego typu analiza.

Uzyskane wyniki wskazują na zachowaną w toku ewolucji silnie nieuporządkowaną strukturę ludzkich i kurzych homologów apo-N1, które wykazywały silnie wydłużoną i cylindryczną budowę. Natomiast strukturę homologów apo-N1/2 można określić jako mozaikową z przeplatającymi się regionami uporządkowanymi i IDRs o kształcie wydłużonej elipsoidy. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano strukturalną rolę N2, która nadaje N1 w jej kontekście (N1/2) odmienne właściwości. Przy czym N1/2, okazała się nie wykazywać właściwości będących prostą sumą efektów obserwowanych dla izolowanych fragmentów. W związku z powyższym proteolityczne procesowanie Nucb2/N1/2 może być elementem aktywnym prowadzącym do uwolnienia silnie nieuporządkowanego charakteru homologów N1 i ich oddziaływania z wieloma partnerami białkowymi.

Jony Zn(II) wywoływały silne zmiany we właściwościach i konformacji nesfatyn. W przypadku ludzkich i kurzych homologów holo-N1 obserwowano silne przejście nieuporządkowanie-uporządkowanie indukowane jonami Zn(II), które wiązało się z dramatycznym zmniejszeniem objętości hydrodynamicznej homologów holo-N1 i protekcją szkieletu głównego regionu M30 przed wymianą H/D. Ponadto wiązanie powyższych jonów skutkowało również dimeryzacją neuropeptydów. Kurza holo-N1 cechowała się dodatkowo tendencją do agregacji, czego nie obserwowano dla homologu ludzkiego. Strukturyzacja i zmiana stanu oligomerycznego holo-N1 wydaje się uniwersalna przez co mogłaby umożliwiać oddziaływanie z inną pulą partnerów białkowych. Dodatkowo, mniejsza dostępność anoreksygenicznego rdzenia homologów N1 może mieć istotny wpływ na działanie neuropeptydu. Z drugiej strony wiązanie jonów Zn(II) przez homologi holo-N1 cechowało się również powstaniem motywu amyloidowego, co wskazuje na możliwość zaangażowania holo-N1 w procesach neurodegeneracyjnych. Wiązanie jonów Zn(II) przez hN2 oraz ludzkie i kurcze homologi N1/2 związane było z kolei z silną destabilizacją białek. Kurczy homolog N1/2 wykazywał większą tendencję do zmiany oligomeryzacji i agregacji pod wpływem jonów Zn(II) oraz cechował się odmiennym sposobem oddziaływania z nimi. Co interesujące, pod wpływem jonów Zn(II) obserwowano silną ekspozycję szkieletu głównego trzech regionów homologów holo-N1/2, zwłaszcza w rejonie M30 oraz zawierającym miejsce rozpoznawane przez PCs. Możliwe zatem, iż proteolityczna obróbka białek prekursorowych N1, ich aktywność biologiczna i lokalizacja jest zależna od jonów Zn(II).

Przeprowadzone analizy strukturalne przyczyniły się zatem do głębszego zrozumienia relacji pomiędzy strukturą oraz funkcją ludzkich i kurzych nesfatyn, a także stanowią podstawę do realizacji dalszych badań tego zagadnienia.





# Summary

Nesfatin-1 (N1), -2 (N2), and -1/2 (N1/2) are products of the proteolytical processing of the N-terminus of Nucleobindin-2 by prohormone convertases (PCs). Nucb2 and/or N1 (Nucb2/N1) are proteins in vivo engaged in the myriad of functions, which include: regulation of energy homeostasis [1], responses to stress [2], carcinogenesis [3,4], pathogenesis of psycho-neuronal disorders [5,6], and blood pressure regulation [7]. On the other hand, there are a few reports about the relationship between the structure and function of Nucb2/N1 as well as about the purpose of the remaining nesfatins. Hence, those studies deserve special attention considering the multi-functional mode of action of Nucb2/nesfatins, their ubiquitous expression throughout the body, and high potential of their medical applications. Additionally, probing the structural differences between the homologs of nesfatins and in their interactions with ligands might shed a new light on the species-specific functions of the peptides. In total, five nesfatin homologs from two species were purified here including human N1, N2, N1/2, and chicken N1, and N1/2. Next, comprehensive structural analysis of nesfatins as well as effects of their interactions with divalent metal cations were undertaken during the project. It is worth noting that so far this is the first and only analysis of this type available in the literature.

The results showed conservation of the highly disordered structure between the human and chicken homologs of apo-N1, both displaying elongated and cylindrical shape. In turn, the structure of the homologs of apo-N1/2 was revealed as mosaic with intertwined ordered and disordered regions and extended shape. Structural role of the N2 fragment was suggested based on the obtained data. Moreover, N2 fragment in the context of the N1 fragment (N1/2) seemed to induce different molecular properties of the latter, which in turn were not a simple sum of the effects observed for the isolated fragments. Thus, it is possible that the proteolytical processing of Nucb2/N1/2 can act as an activation mechanism that through the release of the disordered character of N1 enables its interaction with multiple proteins.

Zn(II) had a strong effect both on the observed properties and conformation of nesfatins. Human and chicken homologs of holo-N1 were characterized by a disorder-to-order transition induced by Zn(II), which was associated with a strong decrease in the hydrodynamic volume of the peptides and a strong protection of their backbone against H/D exchange in the M30 region. Moreover, dimerization of the peptides under Zn(II) treatment was also observed for holo-N1 homologs. In contrast to the human homolog, chicken holo-N1 was also more prone to aggregation. Thus, structurization and change in the oligomeric state of holo-N1 might be universal and could facilitate interactions with a different set of the binding partners *in vivo*. Furthermore, concealment of the anorexigenic core of neuropeptides might affect their function. Interestingly, binding of Zn(II) by human and chicken holo-N1 homologs was also associated with a formation of the amyloid motif, which might indicate their involvement in the neurodegeneration processes. In turn, Zn(II)-binding by hN2 as well as by human and chicken homologs of N1/2 resulted in a strong destabilization of the proteins. Chicken N1/2 was showed to be more susceptible to oligomerization and aggregation under Zn(II) treatment. Additionally, the interaction mode of chicken N1/2 with Zn(II) and its effect seemed to be different than for the human homolog. Interestingly, Zn(II) induced strong exposition of the backbone of human and chicken N1/2 homologs. Particularly, the backbone exposition was the most visible in the M30 and PCs-recognition regions of N1/2 homologs. Thus, it is possible that the proteolytical processing of the N1 precursors, their biological activity, and localization is Zn(II)-dependent.

The in-depth structural analysis of human and chicken homologs of nesfatins described here shed new light on the relationship between their structure and function. Furthermore, the presented data also created a basis for the subsequent studies of this subject.







# Wykaz skrótów

Skrót	Objaśnienie
<b>A</b>	
A220	absorbancja mierzona przy długości fali $\lambda = 220$ nm
A260	absorbancja mierzona przy długości fali $\lambda = 260$ nm
A280	absorbancja mierzona przy długości fali $\lambda = 280$ nm
AC	ang. <i>adenylate cyclase</i> , cyklaza adenylanowa
AD	ang. <i>Alzheimer's disease</i> , choroba Alzheimerera
AgRP	ang. <i>Agouti-related peptide</i> , peptyd Agouti
AmG	ang. <i>amygdala</i> , ciało migdałowe
ANS	ang. <i>8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid</i> , kwas 8-anilino-1-naftalenosulfonowy
ARC	ang. <i>arcuate nucleus</i> , jądro łukowate
AU	ang. <i>arbitrary units</i> , jednostki arbitralne
AUN	autonomiczny układ nerwowy
<b>C</b>	
CART	ang. <i>cocaine and amphetamine regulated transcript</i> , transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą
CCK	ang. <i>cholecystokinin</i> , cholecystokinina
CD	ang. <i>circular dichroism</i> , dichroizm kołowy
CR2	ang. <i>corticotropin releasing hormone receptor 2</i> , receptor 2 kortykotropiny
CRH	ang. <i>corticotropin releasing hormone</i> , hormon uwalniający kortykotropinę
CUN	centralny układ nerwowy
<b>D</b>	
Da	ang. <i>Dalton</i> , atomowa jednostka masy
DBD	ang. <i>DNA-binding domain</i> , domena wiążąca DNA
DMH	ang. <i>dorsomedial hypothalamus</i> , jądro grzbietowo-przyśrodkowe
<b>E</b>	
EDTA	ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , kwas etylenodiaminotetraoctowy
EF	ang. <i>EF-hand</i> , motyw dłoni EF
ERm	ang. <i>endoplasmic reticulum</i> , retikulum endoplazmatyczne
<b>F</b>	
FI	ang. <i>fluorescence intensity</i> , intensywność fluorescencji
<b>G</b>	
GA	ang. <i>Golgi apparatus</i> , aparat Golgiego

<b>GDI</b> s	ang. <i>guanine dissociation inhibitors</i> , inhibitory dysocjacji nukleotydu guaninowego
<b>GEFs</b>	ang. <i>guanine nucleotide exchange factors</i> , czynniki wymieniające nukleotyd guaninowy
<b>GPCRs</b>	ang. <i>G-protein-coupled receptors</i> , receptory sprzężone z białkami G
<b>GRE</b>	ang. <i>ghrelin</i> , grelina
<b>H</b>	
<b>HDX-MS</b>	ang. <i>H/D exchange coupled with mass spectrometry</i> , wymiana izotopowa proton-deuter monitorowana spektrometrią mas
<b>HIP</b>	ang. <i>hippocampus</i> , hipokamp
<b>HPA</b>	ang. <i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> , oś podwzgórze-przysadka-nadnercza
<b>HPG</b>	ang. <i>hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i> , oś podwzgórze-przysadka-gonady
<b>HRV3C</b>	ang. <i>human rhinovirus 3C</i> , ludzki rinowirus 3C
<b>HYP</b>	ang. <i>hypothalamus</i> , podwzgórze
<b>I</b>	
<b>IDPs</b>	ang. <i>intrinsically disordered proteins</i> , białka inherentnie nieuporządkowane
<b>IDRs</b>	ang. <i>intrinsically disordered regions</i> , regiony inherentnie nieuporządkowane
<b>K</b>	
<b>K<sub>ATP</sub></b>	ang. <i>ATP-sensitive potassium channel</i> , ATP-zależne kanały potasowe
<b>K<sub>d</sub></b>	ang. <i>dissociation constant</i> , stała dysocjacji kompleksu
<b>L</b>	
<b>LEP</b>	ang. <i>leptin</i> , leptyna
<b>LEPR</b>	ang. <i>leptin receptor</i> , receptor leptyny
<b>M</b>	
<b>MC3/4R</b>	ang. <i>melanocortin-3/4 receptor</i> , receptor 3 i/lub 4 melanokortyny
<b>MRE</b>	ang. <i>mean residue ellipticity</i> , średnia resztowa eliptyczność molowa
<b>MS</b>	ang. <i>mass spectrometry</i> , spektrometria mas
<b>α-MSH</b>	ang. <i>α-melanocyte stimulating hormone</i> , α-melanotropina
<b>MW</b>	ang. <i>molecular weight</i> , masa cząsteczkowa
<b>N</b>	
<b>N1</b>	ang. <i>nesfatin-1</i> , nesfatyna-1
<b>N1/2</b>	ang. <i>nesfatin-1/2</i> , polipeptyd składający się z nesfatyny-1 i -2
<b>N2</b>	ang. <i>nesfatin-2</i> , nesfatyna-2
<b>NFU</b>	ang. <i>normalized fluorescence unit</i> , znormalizowana jednostka fluorescencji
<b>NLP</b>	ang. <i>nesfatin-like peptide</i> , peptyd podobny do nesfatyny-1
<b>NPY</b>	ang. <i>neuropeptide Y</i> , neuropeptyd Y
<b>NTS</b>	ang. <i>nucleus of the solitary tract</i> , jądro pasma samotnego
<b>Nucb1</b>	ang. <i>Nucleobindin-1</i> , Nukleobindyna-1
<b>Nucb2</b>	ang. <i>Nucleobindin-2</i> , Nukleobindyna-2
<b>O</b>	
<b>obr./min</b>	liczba obrotów na minutę, jednostka prędkości obrotowej rotora
<b>OD600</b>	ang. <i>optical density</i> , absorbancja mierzona przy długości fali λ = 600 nm
<b>OXT</b>	ang. <i>oxytocin</i> , oksytocyna
<b>P</b>	
<b>PC-1/3</b>	ang. <i>prohormone convertase-1/3</i> , konwertaza prohormonów-1/3

<b>PC-2</b>	ang. <i>prohormone convertase-2</i> , konwertaza prohormonów-2
<b>PCR</b>	ang. <i>polymerase chain reaction</i> , reakcja łańcuchowa polimerazy
<b>PCs</b>	ang. <i>prohormone convertases</i> , konwertazy prohormonów
<b>POMC</b>	ang. <i>proopiomelanocortin</i> , proopiomelanokortyna
<b>PVN</b>	ang. <i>paraventricular nucleus</i> , jądro przykomorowe
<b>PYY</b>	ang. <i>peptide YY</i> , peptyd YY
<b>R</b>	
<b>RFU</b>	ang. <i>raw fluorescence unit</i> , jednostka fluorescencji
<b>R<sub>g</sub></b>	ang. <i>gyration radius</i> , promień żyracji
<b>R<sub>h</sub></b>	ang. <i>hydrodynamic radius</i> , promień hydrodynamiczny
<b>rmsd</b>	ang. <i>root mean square deviation</i> , odchylenie średnie kwadratowe
<b>S</b>	
<b>SD</b>	ang. <i>standard deviation</i> , odchylenie standardowe
<b>SEC</b>	ang. <i>size-exclusion chromatography</i> , analityczne sączenie molekularne
<b>SON</b>	ang. <i>supraoptic nucleus</i> , jądro nadwzrokowe
<b>SV-AUC</b>	ang. <i>sedimentation velocity analytical ultracentrifugation</i> , ultrawierowanie analityczne typu prędkości sedymentacji
<b>T</b>	
<b>TH</b>	ang. <i>thalamus</i> , wzgórze
<b>ThT</b>	ang. <i>thioflavin T</i> , tioflawina T
<b>TRH</b>	ang. <i>thyrotropin-releasing hormone</i> , tioflawina T
<b>V</b>	
<b>V<sub>e</sub></b>	ang. <i>elution volume</i> , objętość elucji
<b>VMH</b>	ang. <i>ventromedial hypothalamus</i> , jądro brzuszno-przyśrodkowe
<b>W</b>	
<b>WAT</b>	ang. <i>white adipose tissue</i> , biała tkanka tłuszczowa
<b>Z</b>	
<b>ZI</b>	Zincon
<b>ZIP</b>	ang. <i>leucine zipper</i> , motyw zamka leucynowego



# 1.

## Wprowadzenie

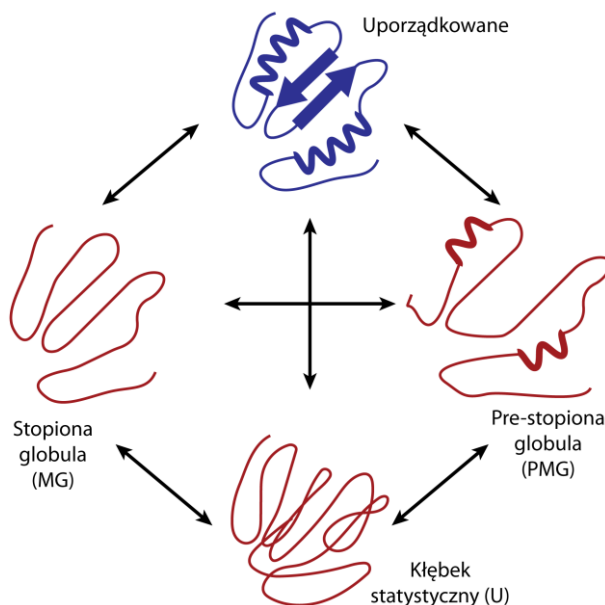
Kaskady sygnałowe umożliwiają komórkom komunikację z otoczeniem oraz w wyrafinowany sposób kontrolują każdym aspektem ich istnienia; poczynając od regulacji cyklu komórkowego [8], przez ich różnicowanie [9], transport wewnątrzkomórkowy [10] i poruszanie się [11] a kończąc na ich indukowanej śmierci [12]. Typowa kaskada sygnałowa złożona jest przynajmniej z trzech elementów: zewnętrznej stymulacji, transduktora i propagacji sygnału wewnątrz komórki [13]. Jednym z typów takich zewnętrznych stymulatorów są hormony, które są cząsteczkami wydzielanymi do krwioobiegu przez wyspecjalizowane komórki endokryne i oddziałujące na oddalone komórki docelowe [14]. Ze względu na zasięg oddziaływania danych stymulatorów można je podzielić, obok przytoczonego już typu endokrynnego, na: parakryne, tj. działające na sąsiadujące komórki i autokryne, które oddziałują na komórkę produkującą dany stymulator [14,15]. Jednym z ostatnio opisanych hormonów biorących udział w regulacji homeostazy energetycznej jest nesfatyna-1 (N1), będąca produktem proteolitycznego procesowania nukleobindyny-2 (Nucb2, ang. *nucleobindin-2*) [16]. Do białek uczestniczących w regulacji szlaków sygnałowych (oraz wielu innych procesów biologicznych) zaliczyć można białka inherentnie nieuporządkowane i zawierające regiony inherentnie nieuporządkowane. Ich krótką charakterystykę przedstawiono w kolejnym rozdziale.



### 1.1 WŁAŚCIWOŚCI BIAŁEK INHERENTNIE NIEUPORZĄDKOWANYCH

Paradygmat stanowiący, iż dla pełnienia funkcji przez białko konieczne jest przyjęcie przez nie stabilnej struktury determinowanej przez sekwencję aminokwasową było powszechnie akceptowane w środowisku naukowym nawet tuż przed rozwiązaniem pierwszej struktury krystalicznej białka [17,18]. Doniesienia literaturowe ostatnich lat wskazują jednak na bardzo istotne znaczenie zmienności konformacyjnej cząsteczek białkowych oraz ich dynamiki molekularnej w pełnionej przez nie funkcji. Do białek cechujących się nadzwyczajną zmiennością konformacyjną należą białka zawierające regiony inherentnie nieuporządkowane (IDRs, ang.

*intrinsically disordered regions*), takie jak obecne w apo-Nucb2 na końcu C (**Rozdział 1.2.2**) i N (**Rozdział 1.2.4.5**) oraz białka inherentnie nieuporządkowane (IDPs, ang. *intrinsically disordered proteins*), które nie wykazują żadnej zdefiniowanej struktury trzeciorzędowej. Zarówno białka zawierające IDRs jak i IDPs są jednak zdolne do pełnienia (często wielu) funkcji biologicznych [19]. Co więcej, możliwe jest istnienie kilku IDRs o zróżnicowanym stopniu nieuporządkowania w jednej cząsteczce białka. W konsekwencji IDPs mogą występować w postaci dynamicznych zespołów konformacyjnych o różnych lokalnych minimach energetycznych, które mogą je predestynować do pełnienia danej funkcji [20]. IDPs oraz białka zawierające IDRs są białkami powszechnie występującymi u organizmów jedno- i wielokomórkowych. Badania bioinformatyczne wskazują, że aż 25–30% białek eukariotycznych może należeć do rodziny IDPs a ponad 50% zawierać IDRs [21]. Wysoka częstość występowania IDRs w strukturze białek ma swoje odbicie w rozpiętości pełnionych przez nie funkcji. Białka należące do rodziny IDPs uczestniczą bowiem w regulacji, m.in.: transkrypcji, cyklu komórkowego, apoptozy, czy różnicowania komórek [22]. Ponadto, IDPs przez swoje zaangażowanie w patogenezie wielu chorób stały się w ostatnich latach atrakcyjnym potencjalnym celem terapeutycznym. Przykładowo, wiele IDPs uczestniczy w procesie agregacji białek, który jest przyczyną chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera (AD, ang. *Alzheimer's disease*) czy Parkinsona (PD, ang. *Parkinson's disease*) [23].



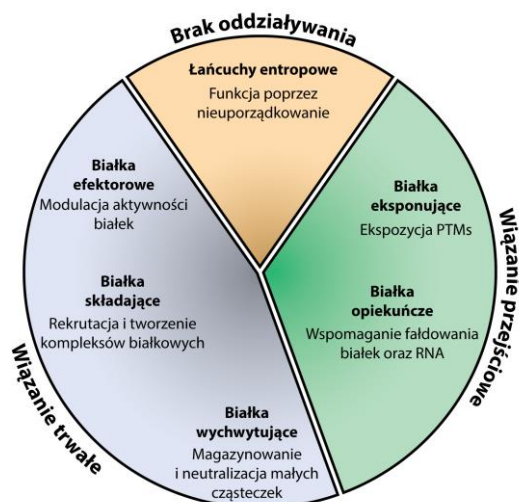
**Rys. 1.1** Stany konformacyjne białek

Kwartet konformacji białek. Według tego modelu funkcja (lub brak funkcji) białka jest konsekwencją przyjęcia jednej z czterech konformacji oznaczonych w panelu oraz wynikiem przejść pomiędzy nimi. Na podstawie [161].

### 1.1.1.1 Stany konformacyjne oraz klasyfikacja IDPs

Wyróżniono trzy stany nieuporządkowania IDPs/IDRs (**Rys. 1.1**): typ nieustrukturyzowany (U, ang. *unstructured*); stopionej globuli (MG, ang. *molten globule-like*) oraz stan pośredni pomiędzy U i MG, który nazwano pre-stopioną globulą (PMG, ang. *pre-molten globule-like*) [24]. W stanie U struktura białka podobna jest do kłębka statystycznego brak jest natomiast struktury drugorzędowej (**Rys. 1.1**). Stan PMG cechuje obecność szczytkowych struktur drugorzędowych opowiadająca struktura jest jednak mniej upakowana w porównaniu do stanu MG (**Rys.**





**Rys. 1.2** Podział IDPs ze względu na funkcję.

Funkcjonalność IDPs może wynikać bezpośrednio z ich nieuporządkowanego charakteru, bądź ze zdolności do wiązania ligandów. Wiązanie to może być przejściowe jak w przypadku białek ekspozujących oraz opiekuńczych lub trwałe, jak w przypadku białek efektorowych, składających, wychwytyjących. Na podstawie [161.]

1.1) [24]. Powyższa nomenklatura wywodzi się z badań nad procesem fałdowania białek globularnych [25]. IDPs wykazują jednak aktywność w każdym z powyższych stanów nieuporządkowania oraz uporządkowania indukowanego przez zmiany otoczenia i/lub wiązanie ligandu, co jest niemożliwe w przypadku białek globularnych [24–26]. Ze względu na funkcje pełnione przez IDPs można je zakwalifikować do następujących klas (**Rys. 1.2**): łańcuchy entropowe (ang. *entropic chains*); białka/regiony ekspozujące (ang. *display sites*); efektorowe (ang. *effectors*); wychwytyjące (ang. *scavengers*); składające (ang. *assemblers*); czaperoninowe/opiekuńcze (ang. *chaperones*) [27].

Warto zaznaczyć, iż w sekwencji IDPs może

być obecnych kilka różnych IDRs, przez co białka te mogą pełnić wiele funkcji. Powyższe klasy można ponadto zakwalifikować na podstawie typu wiązania do trzech klas, co przedstawiono na **Rys. 1.2** [24]. Do grupy nie wykazującej wiązania należą łańcuchy entropowe. Spełniają one swoją funkcję pozostając w stanie całkowitego nieuporządkowania, co umożliwia np. relatywne zmiany położenia domen połączonych takim elastycznym łańcuchem [24]. Do drugiej grupy należą IDPs cechujące się przejściowym wiązaniem. Wśród nich białka ekspozujące umożliwiają korzystną termodynamicznie ekspozycję i oddziaływanie regionów PTMs z białkami efektorowymi oraz miejsc rozpoznawanych przez proteazy [24]. Kolejnym członkiem tej grupy są białka czaperoninowe uczestniczące w procesie fałdowania innych białek lub cząsteczek RNA. Do trzeciej grupy należą białka wykazujące trwałe wiązanie. Do tej grupy należą białka/regiony efektorowe, które oddziałują z innymi białkami lub wewnątrzcząsteczkowo modulują ich/swoją aktywność. Białka składające posiadają charakterystyczne motywy w swojej sekwencji aminokwasowej takie jak elementy rozpoznawania molekularnego (MoRFs, ang. *molecular recognition features*) oraz krótkie motywy liniowe (SLiMs, ang. *short linear peptide motifs*), które umożliwiają rekrutacje wielu partnerów białkowych oraz tworzenie kompleksów białkowych. Ostatnią grupą są białka wychwytyjące, które magazynują lub neutralizują małe ligandy.

### 1.1.1.2 Nieuporządkowanie zapisane w sekwencji aminokwasowej

Skład aminokwasowy IDPs oraz IDRs różni się od białek globularnych wysokim wzbogaceniem w reszty naładowanych, polarnych aminokwasów promujących nieuporządkowanie (Ala, Arg, Gly, Ser, Pro, Asp, Gln) oraz niską zawartością reszt hydrofobowych (Trp, Phe, Leu, Ile, Val, Tyr, Met). Pomimo braku tendencji regionów IDRs do spontanicznego przyjęcia określonej struktury wciąż możliwe jest wyróżnienie odmiennych konformacji i/lub funkcji dla danego składu aminokwasowego IDRs. Powyższe zależności są podstawą różnorodnych algorytmów przewidujących IDRs w białkach [28].

Struktura białek globularnych, stabilizowana przez liczne oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe, van der Waalsa jest często silnie podatna na wpływ czynników denaturujących, takich jak: wysoka temperatura; pH; związków denaturujących (mocznik; chlorowodorek guanidyny). Proces ich rozfałdowywania jest wysoce kooperatywny a krzywe go opisujące cechują się silnie sigmoidalnym przebiegiem. IDPs ze względu na ich szczególny skład aminokwasowy pod wpływem powyższych czynników denaturujących wykazują nietypowe właściwości w porównaniu do białek globularnych, jak np. częściowe fałdowanie pod wpływem temperatury, skrajnych wartości pH. Co więcej, krzywa denaturacyjna IDPs typu MG pod wpływem związków chemicznych wykazuje bardzo słabo zaznaczony punkt przejścia, podczas gdy krzywe IDPs typu U/PMG w ogóle go nie wykazują [26]. Niska stabilność konformacyjna IDPs objawiająca się wyżej wymienionymi właściwościami jest ponadto widoczna w wyjątkowej ich podatności na proteolizę. Pomimo tego, w przeciwieństwie do białek globularnych, IDPs zachowują funkcję nawet w skrajnych warunkach otoczenia oraz cechują się mniejszą podatnością do agregacji/precypitacji pod wpływem temperaturowych i chemicznych czynników denaturujących [29].

### 1.1.1.3 Metody detekcji, opisu i analizy strukturalnej IDPs

IDPs występują w roztworze jako dynamiczne, wzajemnie przekształcające się w siebie zespoły konformerów. W związku z tym wiele metod rutynowo stosowanych w badaniach i analizie białek globularnych, które wykazują stabilną strukturę drugo- i trzeciorzędową, jest nieodpowiednich do strukturalnego opisu IDPs. Podstawowe techniki badawcze stosowane podczas oczyszczania białek, takie jak analiza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, ang. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) i chromatografia wykluczania; filtracja żelowa (SEC, ang. *size-exclusion chromatography*; *gel filtration*) mogą wykazać obecność IDPs/IDRs w preparacie. IDPs ze względu na wysoką zawartość naładowanych reszt aminokwasowych wykazują zmniejszone (w porównaniu do białek

globularnych) wiązanie SDS. Konsekwencją słabego wiązania SDS jest zwiększona retencja w żelu poliakryloamidowym, przez co pozorna masa cząsteczkowa ( $MW_{app}$ ) IDPs wyznaczona tą metodą jest zawyżona w stosunku do wyników uzyskanych za pomocą spektrometrii mas o około 1,2–1,8 razy. Podobnie podczas SEC, ze względu na wysoką wartość promienia hydrodynamicznego, IDPs są eluowane z kolumny wolniej w porównaniu do białek globularnych o tej samej masie [26]. Bezpośrednie metody wykorzystywane w badaniach IDPs to m. in.; spektroskopia dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*); ultrawierowanie analityczne typu szybkościowego (SV-AUC, ang. *sedimentation-velocity analytical ultracentrifugation*); fluorymetria; rozpraszanie promieni rentgenowskich (XRD, ang. *X-ray diffraction*); małokątowe rozpraszanie promieni rentgenowskich (SAXS, ang. *small angle X-ray diffraction*); spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, ang. *nuclear magnetic resonance*); kriomikroskopia elektronowa (cryo-EM, ang. *cryo-electron microscopy*); czy spektrometria masowa (MS, ang. *mass spectrometry*) [26].

Spektroskopia CD umożliwia ocenę zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych w białku, co umożliwia szybką identyfikację IDPs w preparacie [30]. Określenie obecności IDRs staje się jednak bardziej skomplikowane jeśli w białku obecne są regiony uporządkowane obok IDRs. Dodatkowo, pomiary CD pozwalają jedynie na uśredniony opis struktury białka, co w przypadku tak dynamicznych obiektów badawczych jak IDPs prowadzi do utraty części informacji. Niemniej jednak spektroskopia CD może być wykorzystywana z powodzeniem do śledzenia zmian strukturalnych, takich jak przejście nieuporządkowanie-uporządkowanie pod wpływem wiązania ligandu przez IDPs. Pomiary CD w funkcji temperatury przy obecności czynników denaturujących mogą ponadto dostarczyć istotnych informacji o stabilności białka w (nie)obecności ligandów [31]. Spektroskopia fluorescencyjna z wykorzystaniem wewnętrznych i zewnętrznych chromoforów białkowych oraz rezonansowe przeniesienie energii również mogą dać istotny wgląd w mikrootoczenie fluoroforów, stopień upakowania cząsteczki oraz odległości wewnątrzcząsteczkowe [32]. Brakujące obszary w mapach gęstości elektronowej uzyskanych przy pomocy XRD mogą również silnie wskazywać na obecność IDRs w białku. MS sprzężona z wymianą proton deuter (HDX, ang. *hydrogen-deuterium exchange*; HDX-MS) pozwala na określenie ekspozycji reszt aminokwasowych do rozpuszczalnika, i może być stosowana do lokalizacji regionów IDRs oraz regionów potencjalnie oddziałujących z danym partnerem [33]. Z kolei wielowymiarowe, heterojądrowe eksperymenty NMR są bardzo użyteczne w opisie struktury przestrzennej, oddziaływań i dynamiki białek takich jak IDPs. Eksperymenty SV-AUC oraz SAXS mogą z kolei dostarczyć informacji o stopniu upakowaniu cząsteczki i jej właściwościach hydrodynamicznych, takich jak znaczne

zwiększenie promienia hydrodynamicznego IDPs w stosunku do białek globularnych. Co więcej, na podstawie danych SAXS i modelowania za pomocą optymalizacji dopasowania (EOM, ang. *ensemble optimization method*) możliwe jest wygenerowanie zbioru modeli najlepiej opisujących dane eksperymentalne [34].



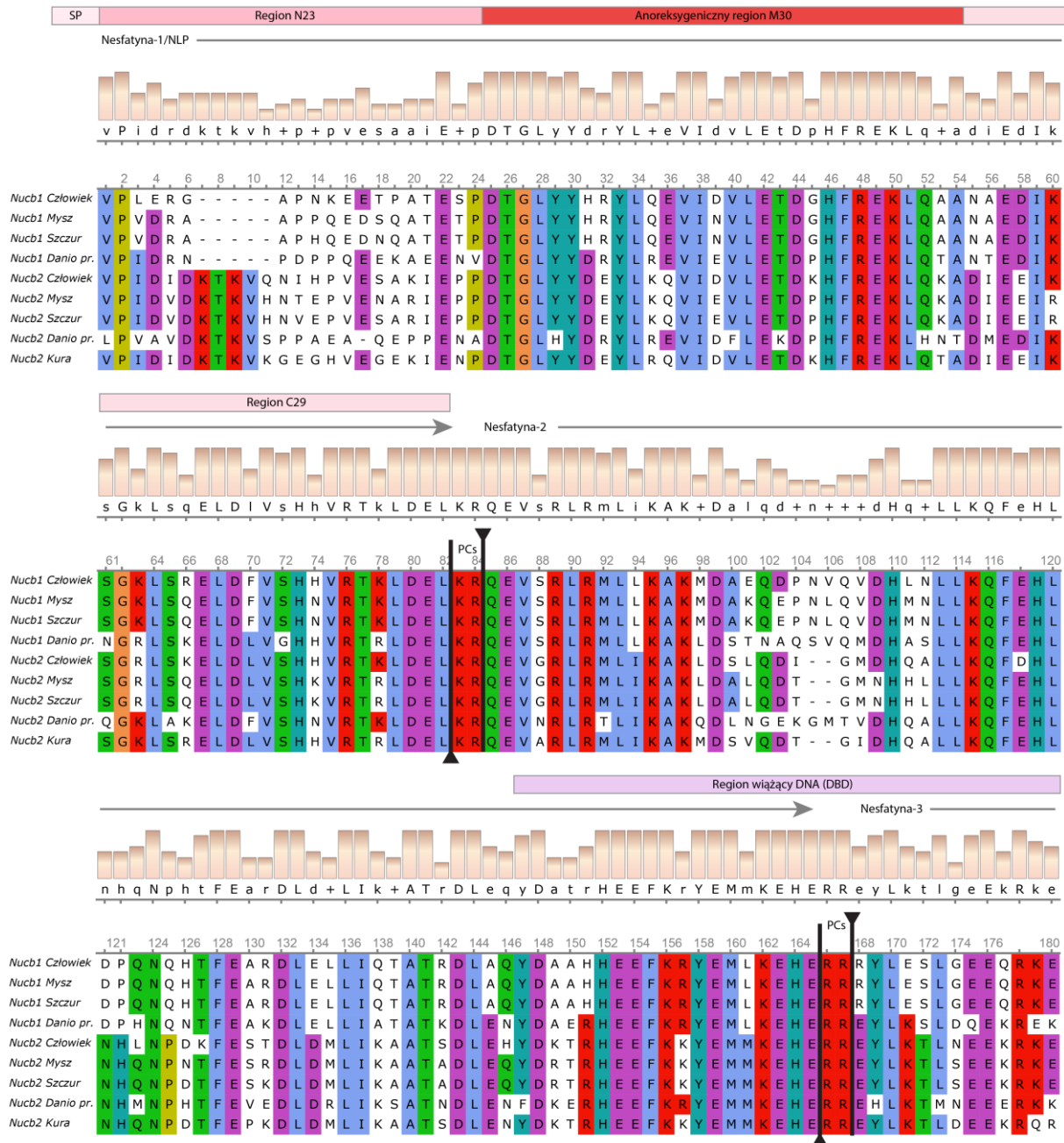
## 1.2 WŁAŚCIWOŚCI NUKLEOBINDYN I ICH POCHODNYCH

Nesfatyna-1 (N1, ang. *nesfatin-1*) została po raz pierwszy odkryta przez Oh-I i wsp. w roku 2006 podczas poszukiwania nowych cząsteczek regulujących apetyt w komórkach linii SQ-5 stymulowanych troglitazonem [16]. Peptyd ten wraz z nesfatyną-2 (N2) oraz nesfatyną-3 (N3) są produktami proteolitycznego procesowania białka prekursorowego – Nukleobindyny-2 (Nucb2, ang. *Nucleobindin-2*). Nucb2 wraz z jej paralogiem – Nukleobindyną-1 (Nucb1, ang. *Nucleobindin-1*) należą do wysoce zachowanej w toku ewolucji rodziny Nukleobindyn i cechują się wielodomenową budową [35] opisaną szerzej w kolejnym rozdziale.

### 1.2.1 Budowa i geneza nukleobindyn oraz ich pochodnych

Nukleobindyny są białkami wiążącymi między innymi jony Ca(II) oraz DNA, stąd też wcześniej Nucb1 znano także pod nazwą CALNUC [36]. Pierwsze doniesienia w literaturze dotyczące Nucb1 i Nucb2 pochodzą odpowiednio z roku 1992 [37] i 1994 [38]. Na podstawie analiz filogenetycznych można przypuszczać, iż Nucb1 oraz Nucb2 ewoluowały od wspólnego przodka zawierającego cztery motywy dłoni EF [39]. Sekwencja Nukleobindyn cechuje się obecnością sześciu charakterystycznych elementów (**Rys. 1.3**) [38]: krótkiego peptydu sygnałowego na końcu N; regionu bogatego w reszty Leu/Ile; regionu wiążącego DNA (DBD, ang. *DNA binding domain*); dwóch motywów dłoni EF flankujących region bogaty w aminokwasy kwaśne oraz zamka leucynowego (ZIP, ang. *leucine zipper*). Na końcu C, po ZIP, jak się przypuszcza obecny jest również region inherentnie nieuporządkowany (IDR, ang. *intrinsically disordered region*) [40]. Sekwencja aminokwasowa obu paralogów jest, jak już wspomniano, silnie zachowana w toku ewolucji. Nucb1 oraz Nucb2 posiadają dodatkowo zachowane w toku ewolucji miejsca zawierające reszty KR oraz RR (**Rys. 1.3**), które *in vivo* są prawdopodobnie rozpoznawane przez konwertazę prohormonów-1/3 (PC-1/3, ang. *prohormone convertase-1/3*) oraz -2 (PC-2, ang. *prohormone convertase-2*). W wyniku działania konwertaz prohormonów (PCs, ang. *prohormone convertases*) na Nucb1 powstaje peptyd podobny do nesfatyny-1 (NLP, ang. *nesfatin-1-like peptide*). Z kolei procesowanie Nucb2 przez PCs skutkuje powstaniem: N1,

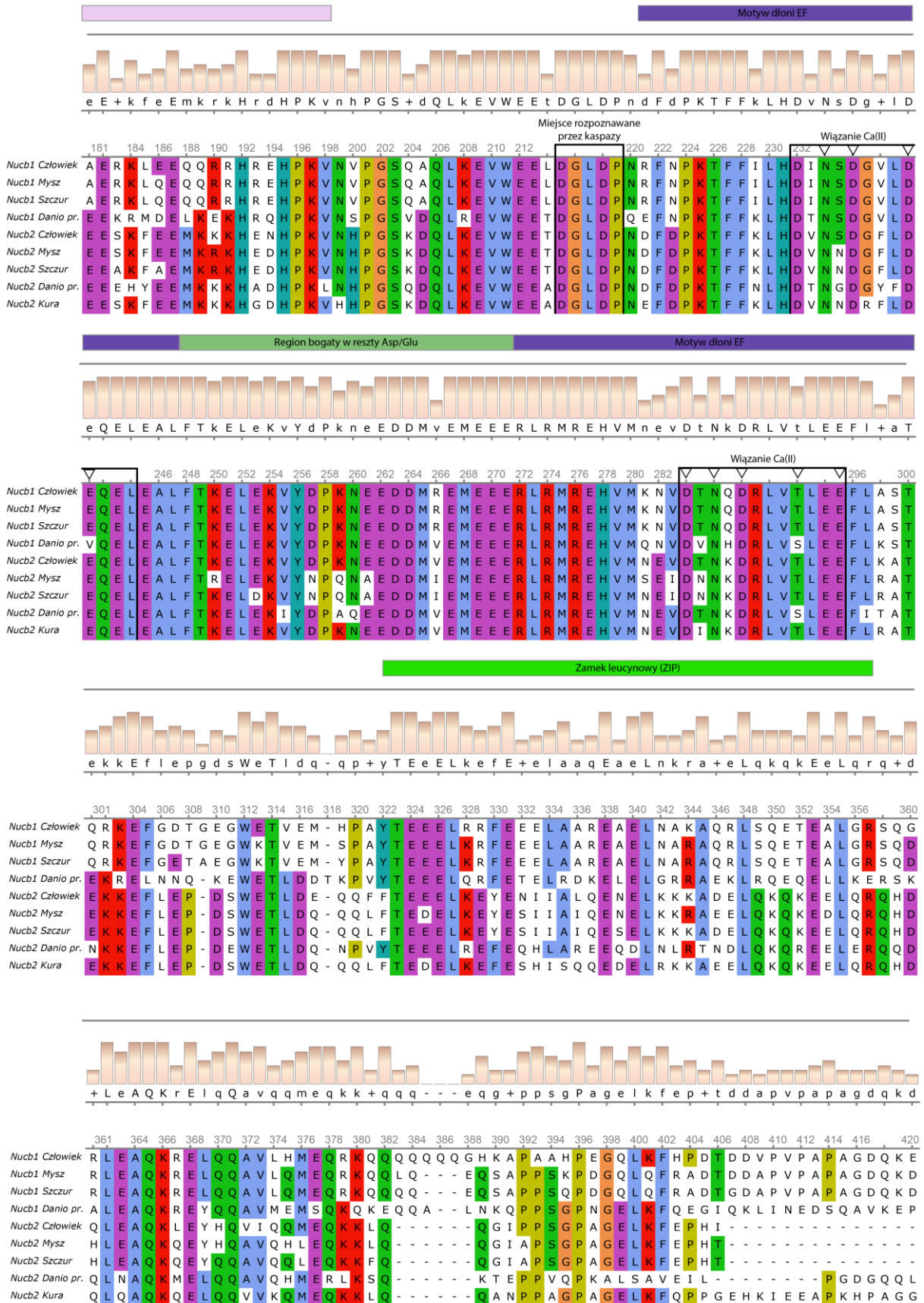
N2 oraz N3 (Rys. 1.3). W budowie N1 wyróżnia się trzy fragmenty: koniec N (N23), region środkowy (M30) oraz koniec C (C29). Ludzkie, mysie, szczurze oraz kurcze [41] paralogi Nukleobindyn wykazują pomiędzy sobą ponad 50% podobieństwa sekwencji aminokwasowej oraz ponad 80% pomiędzy odpowiednimi homologami (Rys. 1.3). Stopień zachowania



Rys. 1.3 Zachowanie w toku ewolucji sekwencji Nukleobindyn

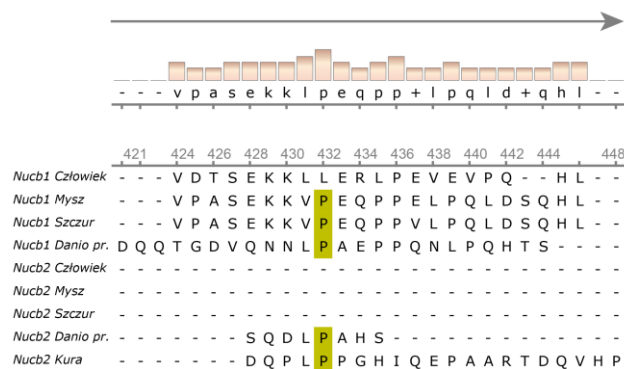
Przyrównanie wybranych sekwencji Nukleobindyn z bazy danych NCBI (identyfikatory sekwencji zaczynając od góry przyrównywania: AAH02356.1; NP\_001157134.1; AAI00644.1; XP\_005164008.1; KAI4070260.1; NP\_001123951.1; NP\_067695.1; AAH47852.1; NP\_001006468.2) w programie Unipro UGENE algorytmem ClustalΩ. Schemat kolorystyczny wg ClustalX i stopnia podobieństwa reszt aa. U góry każdego wiersza dodatkowo zamieszczono sekwencję konsensową, stopień zachowania, motywy i domeny obecne w sekwencji, a także regiony sekwencji obejmujące NLP oraz nesfatyny. Plusy wskazują na wymianę na podobne aminokwasy. Ponadto zaznaczono również reszty uczestniczące w wiązaniu jonów Ca(II). Rysunek na podstawie [34].

# I. Wprowadzenie



Rys. 1.3 cd.

sekwencji aminokwasowej nukleobindyn w toku ewolucji jest znaczący nawet pomiędzy



Rys. 1.3 cd.

organizmami bardziej odległymi od siebie ewolucyjnie. Przykładowo, stopień zachowania sekwencji aminokwasowej pomiędzy homologami ludzkiej Nucb1 i Nucb2 a dania pręgowanego (łac. *Danio rerio*) wynosi ponad 60% (Rys. 1.3).

## 1.2.2 Właściwości domen paralogów nukleobindyn

Peptyd sygnałowy, odpowiada za początkową translokację dojrzewającej Nucb1 do retikulum endoplazmatycznego (ERm, ang. *endoplasmic reticulum*) [42]. Następnie, w wyniku proteolitycznego usunięcia peptydu sygnałowego w ERm, Nucb1 ulega eksportowi do aparatu Golgiego (GA, ang. *Golgi apparatus*). Istotny w tym procesie jest region bogaty w reszty Leu/Ile, który został zidentyfikowany jako nowy motyw retencji w GA [43]. Pomimo braku analogicznych badań dotyczących eksportu Nucb2 z GA do ER na podstawie znaczącej homologii sekwencji końca N pomiędzy Nucb1 oraz Nucb2 zasadne wydaje się przekonanie o początkowym procesowaniu Nucb2 w podobny sposób. Istotnie, zespół Nesselhut i wsp. wykazał, iż utrata końca N Nucb2 prowadzi do translokacji rekombinowanego białka z GA do cytoplazmy [43]. Ponadto, krytyczna w eksporcie z ERm do GA jest obecność wysoce zachowanej w toku ewolucji Pro2 (Rys. 1.3), której mutacja prowadzi do retencji Nucb1 w ERm [42]. Co ciekawe, Nucb1 w komórkach linii AtT20 podlega eksportowi zewnątrzkomórkowemu z GA szlakiem konstytutywnym, jednak w sposób zdecydowanie wolniejszy w porównaniu do innych białek eksportowanych tym szlakiem [44]. Nucb2 obecna jest również w jądrze komórkowym [40,45]. Istnieją zatem cztery subkomórkowe pule Nucb1/Nucb2: cytozolowa, zewnątrzkomórkowa, pula obecna w GA i/lub ERm a także pula obecna w jądrze komórkowym. Region bogaty w reszty Ile/Leu bierze również udział w wiązaniu jonów Zn(II) [46]. Oba paralogi zawierają jedno lub dwa przewidziane miejsca wiążące Zn(II), które są zbliżone do motywu wiążącego jon Zn(II) obecnego w karboksypeptydazie A, tj. HFREX<sub>n</sub>H i HFTEX<sub>n</sub>H obecne odpowiednio pomiędzy: 46–74 i 126–152 resztą aminokwasową (Rys. 1.3) [47].

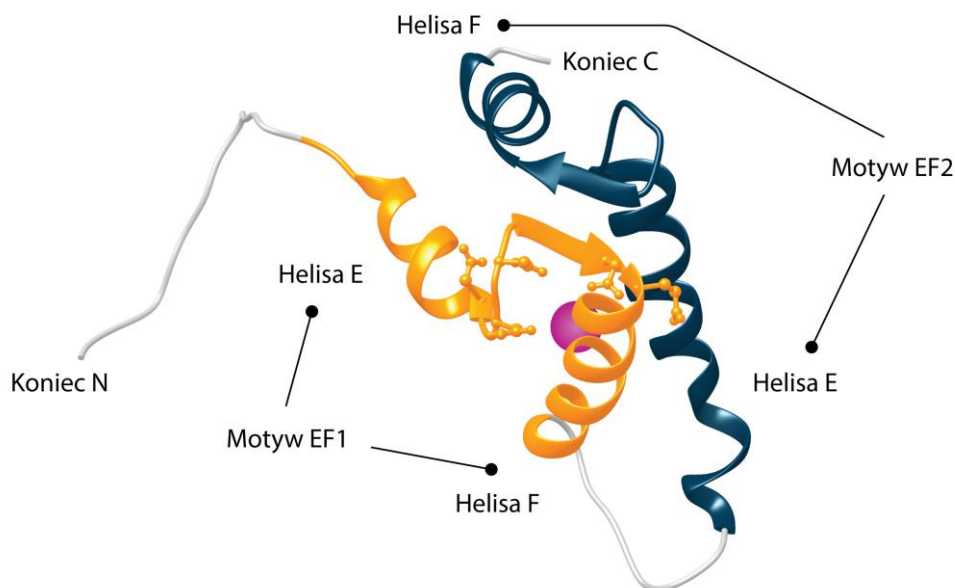
Eksperymenty kalorymetryczne potwierdzają istnienie dwóch równocennych miejsc w ludzkiej Nucb1 (hNucb1) wiążących jony Zn(II) i o stałej dysocjacji tego kompleksu ( $K_d$ ) równej 32 nM [47]. Z drugiej strony w ludzkiej (hNucb2) i kurzej Nucb2 (gNucb2) również wykazano obecność dwóch miejsc wiążących Zn(II), jednak o różnym powinowactwie i  $K_d$  równej odpowiednio: 24 i 14  $\mu$ M (hNucb2) oraz 188 i 34  $\mu$ M (gNucb2) [46]. Istnieją zatem różnice w powinowactwie miejsc wiążących do jonów Zn(II) w tym samym białku oraz różnice w wiązaniu powyższych jonów pomiędzy homologami oraz paralogami, co w konsekwencji może mieć implikacje fizjologiczne, specyficzne dla danego organizmu.

Zasadowe domeny DBD paralogów Nukleobindyn najprawdopodobniej wykazują różnice pomiędzy sobą w specyficzności rozpoznawanych sekwencji. DBD obecna w sekwencji aminokwasowej Nucb1 rozpoznaje kanoniczną kasetę E (ang. *E-box*) o sekwencji uzgodnionej 5'-CANNTG-3' [48]. Kluczowy region DBD wydaje się rozciągać pomiędzy Tyr146 a Leu162 (**Rys. 1.3**), przy czym substytucje reszt hydrofobowych w sekwencji aminokwasowej DBD Nucb2 mogą stać za jej niezdefiniowaną jak dotąd specyficznością wiązanej sekwencji DNA [48]. Dodatkowo w sekwencji aminokwasowej DBD paralogów Nukleobindyn przewiduje się obecność sekwencji lokalizacji jądrowej (NLS, ang. *nuclear localization sequence*) [49].

Tuż przed pierwszym motywem dłoni EF w sekwencji paralogów Nukleobindyn obecna jest wysoce zachowana w toku ewolucji sekwencja DXXD (reszty aminokwasowe 215–219; **Rys. 1.3**) rozpoznawana *in vivo* przez kaspazę 3 (Cas3, ang. *caspase-3*), Cas6 i Cas8 [49]. W związku z powyższym progresja apoptozy i/lub procesów zapalnych może prowadzić do rozdzielenia domen Nukleobindyn i zmian w funkcjach paralogów. Niemniej jednak dokładne poznanie udziału Nukleobindyn w powyższych procesach wymaga dalszych badań.

Motyw dłoni EF zawierający charakterystyczną strukturę helisa-pętla-helisa (HLH, ang. *helix-loop-helix*) występuje powszechnie w białkach wiążących jony Ca(II) i kanonicznie składa się z 29 reszt aminokwasowych tworzących: helisę I (helisa E), pętlę wokół jonu Ca(II) i helisę II (helisa F) [50]. Typowo w sekwencji białek wiążących jony Ca(II) obecne są co najmniej dwa motywy dłoni EF, które mogą wykazywać odstępstwa od budowy kanonicznej oraz być oddalone względem siebie w różnym stopniu [51]. Jak już wspomniano Nukleobindyny zawierają dwa wysoce zachowane w toku ewolucji motywy dłoni EF (**Rys. 1.3**); pierwszy z nich (EF1) wykazuje budowę kanoniczną natomiast drugi (EF2) niekanoniczną z substytucją Gly/Arg w pozycji 6 pętli złożonej z 12 reszt aminokwasowych. Koniec C hNucb1 [52] oraz hNucb2 i gNucb2 [41] podczas nieobecności jonów Ca(II) jest inherentnie nieuporządkowany, natomiast formy holo- cechują się pojawieniem struktur uporządkowanych w rejonach dłoni





**Rys. 1.4** Struktura krystaliczna regionu wiążącego jony Ca(II) hNucb1

Struktura krystaliczna regionu hNucb1 zawartego pomiędzy 205-305 resztą aa. (numeracja zgodna z **Rys. 1.3**). Na rysunku zaznaczono: motyw dłoni EF1 (kolor pomarańczowy; 223-254 reszta aa.) i EF2 (kolor granatowy; 263-303 reszta aa.). Reszty aa. uczestniczące w wiązaniu jonów Ca(II) (purpurowa sfera) przedstawiono za pomocą modelu kulkowego. Model wykonano na podstawie [54] w programie UCSF Chimera.

EF [41,52]. Jest to właściwość dość zaskakująca biorąc po uwagę, iż większość białek zawierających motyw EF (poza białkami z motywem EF w których Ca(II) spełnia rolę strukturalną, np. sarkoplazmatyczne białko wiążące Ca(II) [53]) występuje w ustrukturyzowanej konformacji, która pod wpływem wiązania jonów przechodzi z konformacji zamkniętej do otwartej [54]. Struktura trzeciorzędowa regionu wiążącego jony Ca(II) hNucb1 (**Rys. 1.4**) wskazuje, iż oba motywy dłoni EF przyjmują otwartą konformację, jak wiele innych białek EF, przy czym te obecne w izolowanym fragmencie końca C Nucb1 cechują się większą elastycznością [55]. Może to wynikać częściowo z mniejszej stabilności tego fragmentu niepołączonego z sekwencją końca N. Wyniki eksperymentów kalorymetrycznych również wskazują na dwa miejsca wiążące jony Ca(II) w przypadku hNucb1 o  $K_d$  równej 6,3 i 73,5  $\mu\text{M}$ . Podobnie w przypadku hNucb2 i gNucb2 wykazano istnienie dwóch miejsc wiążących jony Ca(II) o  $K_d$  16,8 i 19,8  $\mu\text{M}$  (hNucb2) oraz 61 i 303  $\mu\text{M}$  (gNucb2) [46]. Ponadto w nieobecności jonów Ca(II) wszystkie domeny Nucb1 wydają się być niezależne od siebie, dopiero podczas wiązania jonów Ca(II) dochodzi do oddziaływania domen końca N z domenami obecnymi na końcu C [56]. W regionie obejmującym drugi motyw dłoni EF obu paralogów pomiędzy resztami aminokwasowymi 284–303 (**Rys. 1.3**) znajduje się również zachowane w toku ewolucji miejsce wiążące podjednostkę  $G\alpha_i \times \text{GDP}$ , a oba paralogi wykazują aktywność czynników wpływających na szybkość wymiany nukleotydu guaninowego (**Rozdział 1.2.3.1**) [57]. W wiązaniu podjednostki  $G\alpha_i$

szczególnie istotne są reszty Leu293, Phe296 i Leu297 Nucb1 oraz Nucb2 [57]. W związku z powyższym oba paralogi są zaangażowane w regulację kaskad sygnałowych receptorów sprzężonych z białkami G (GPCRs, ang. *G-protein-coupled receptors*).

Wykazano, iż hNucb1 wykazuje aktywność proteazy serynowej, a jej triada katalityczna może być złożona z reszt Asp307, His319 oraz Ser358 (**Rys. 1.3**) [47]. Aktywność proteolityczna hNucb1 jest z kolei hamowana przez wiązanie jonów Zn(II) oraz podjednostki  $G\alpha_{i1}$  [47]. Jest zatem możliwe, iż *in vivo* w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne aktywność enzymatyczna Nucb1 może być regulowana czasoprzestrzennie. Niestety brak jest w literaturze doniesień o podobnej aktywności Nucb2, która dodatkowo wykazuje zmienność reszt aminokwasowych w rejonie miejsca aktywnego w stosunku do hNucb1.

ZIP składa się zwykle z pięciu występujących po sobie heptad reszt aminokwasowych, w których każdą 7 resztę aminokwasową stanowi reszta Leu [58]. Zasadowy ZIP (bZIP, ang. *basic ZIP*), złożony z zasadowego regionu na końcu N odpowiedzialnego za wiązanie DNA i ZIP na końcu C odpowiedzialnego za dimeryzację stanowi element strukturalny wielu czynników transkrypcyjnych, takich jak Fos, Myc, czy Jun [59]. Zarówno Nucb1 jak i Nucb2 wykazują duże i nietypowe rozdzielenie regionów zasadowego i ZIP oraz obecność więcej niż jednego motywu HLH, który jednocześnie stanowi element dłoni EF. Dlatego też postuluje się, iż obecny w sekwencji obu paralogów motyw: region zasadowy/HLH/region kwaśny/HLH/ZIP, może być motywem charakteryzującym nową klasę czynników transkrypcyjnych [38]. Dodatkowo, wykazano, iż ZIP jest kluczowy dla dimeryzacji hNucb1 a na podstawie badań przeprowadzonych w ramach tej pracy oraz przez Skorupską-Stasiak i wsp. uzasadnione wydaje się być stwierdzenie, że jest on niezbędny również w przypadku Nucb2/N3 [60].

### 1.2.2.1 Modyfikacje potranslacyjne Nukleobindyn

Modyfikacje potranslacyjne (PTMs, ang. *posttranslational modifications*) białek polegają na ich kowalencyjnej modyfikacji poprzez specyficzne proteolityczne odcięcie części sekwencji białka lub dodaniu grup funkcyjnych do wybranych reszt aminokwasowych takich jak: acetylowa, fosforanowa, glikozyłowa, czy metylowa [61]. W konsekwencji PTMs mają krytyczne znaczenie z punktu widzenia wielu procesów biologicznych i w znaczny sposób wpływają na właściwości molekularne białek [62]. Na podstawie wyników (pochodzących z wysokoprzepustowej tandemowej spektrometrii mas) dostępnych w bazie PhosphoSitePlus można zauważyć, iż PTMs pomiędzy paralogami Nukleobindyn poza fosforylacją reszt aminokwasowych S61 oraz S65 (**Tab. 1.1**) nie wykazują wysokiego stopnia zachowania [63]. Pomimo tego, oba paralogi wykazują obecność fosforylacji reszt aminokwasowych w rejonie motywów dłoni

EF (**Tab. 1.1**). W związku z powyższym PTMs w obrębie regionów anoreksygenicznego oraz wiążącego jony Ca(II) może znacząco wpływać na właściwości i funkcje obu paralogów. Inne PTMs wykryte w badaniach proteomicznych wykazały ubikwitynację oraz acetylację obu paralogów.

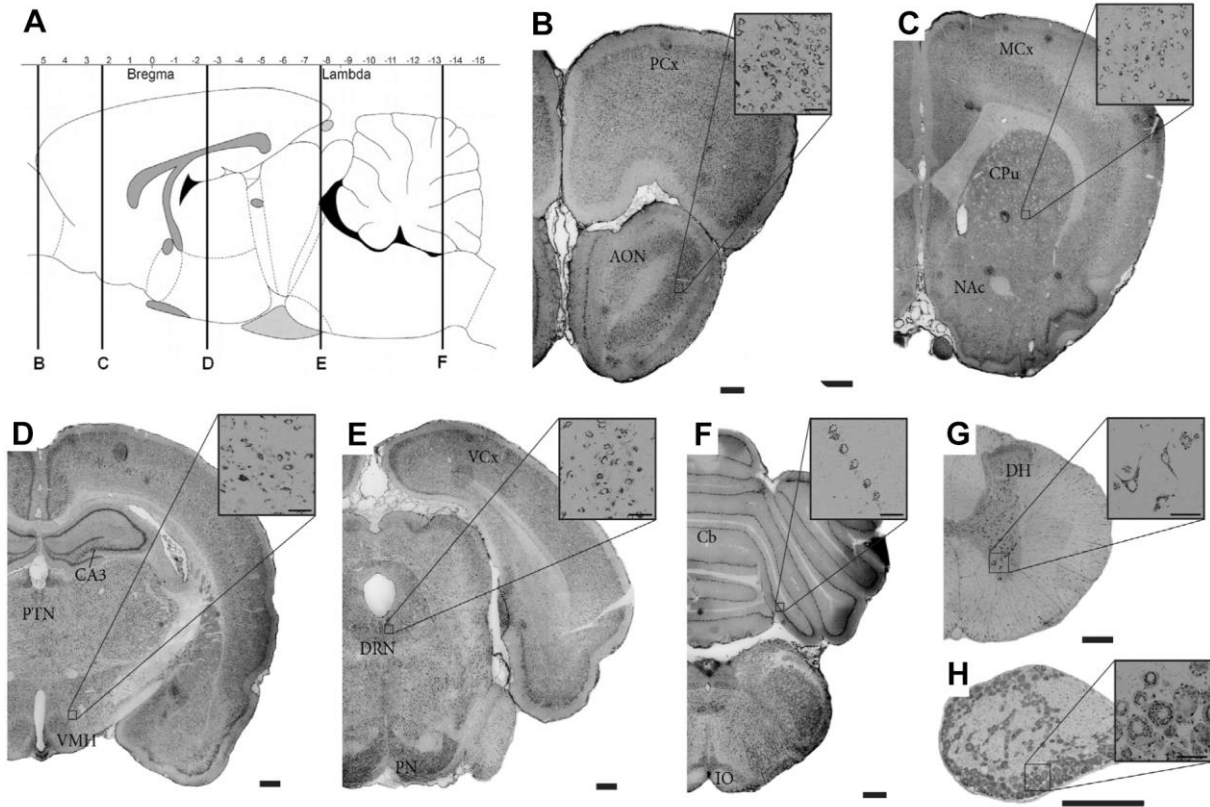
**Tab. 1.1** Profil PTMs paralogów Nukleobindyn

Nucb1	Typ modyfikacji	Nucb2	Typ modyfikacji
S61	P	S17	P
S65	P	Y29	P
T127	P	K60	Ub
K156	Ac	S61	P
Y158	P	S65	P
Y169	P	S100	P
S203	P	Y147	P
K281	Ub	S235	P
S348	P	S310	P
T352	P	Y369	P

Przedstawiono PTMs z bazy danych PhosphoSitePlus o częstotliwości występowania większej niż 2 w wysoko-przepustowych badaniach proteomicznych. Numeracja reszt aa. według **Rys. 1.3**. Typy PTMs: P – fosforylacja; Ub – ubikwitynacja; Ac – acetylacja.

### 1.2.3 Dystrybucja i aktywność biologiczna Nucb1

Ludzka, mysia i kurza Nucb1 są białkami o masie około 55 kDa. Gen *hNucb1* jest zlokalizowany na chromosomie 19 i zawiera 13 egzonów [39]. W rejonie promotorowym genu zlokalizowane są elementy charakterystyczne dla genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), takie jak: obecność kasety CCAAT i brak kasety TATA; obecność miejsca rozpoznawanego przez czynnik transkrypcyjny Sp1 oraz kilku miejsc inicjacji translacji [64]. Struktura krystaliczna Nucb1, poza fragmentem wiążącym jony Ca(II) (**Rys. 1.4**), oraz produktów jej proteolitycznego procesowania pozostaje niezbadana. Nucb1 jest białkiem obecnym we wszystkich głównych ośrodkach centralnego układu nerwowego (CUN), w tym w (**Rys. 1.5**) [65]: korze mózgowej; jądrze węchowym; prążkowie; wzgórzu (TH, ang. *thalamus*); podwzgórzu (HYP, ang. *hypothalamus*); hipokampie (HIP, ang. *hippocampus*); mózdzku; pniu mózgu [65]. Nucb1 jest również ekspresjonowana w komórkach [66]: tarczycy i przytarczycy; trzustce; żołądku; dwunastnicy; jelicie czczym; okrężnicy; nadnerczach; jądrach; jajnikach. Warto również podkreślić, iż pomimo wysokiej homologii sekwencji aminokwasowej pomiędzy Nucb1 oraz Nucb2 ich subkomórkowa lokalizacja pozostaje bez wyraźnej korelacji pomiędzy paralogami [65,66]. Niemniej, odkrycie molekularnych podstaw tego stanu rzeczy jest istotne dla głębszego poznania funkcji obu białek. Nucb1 została początkowo zidentyfikowana



**Rys. 1.5** Dystrybucja Nucb1 w CUN

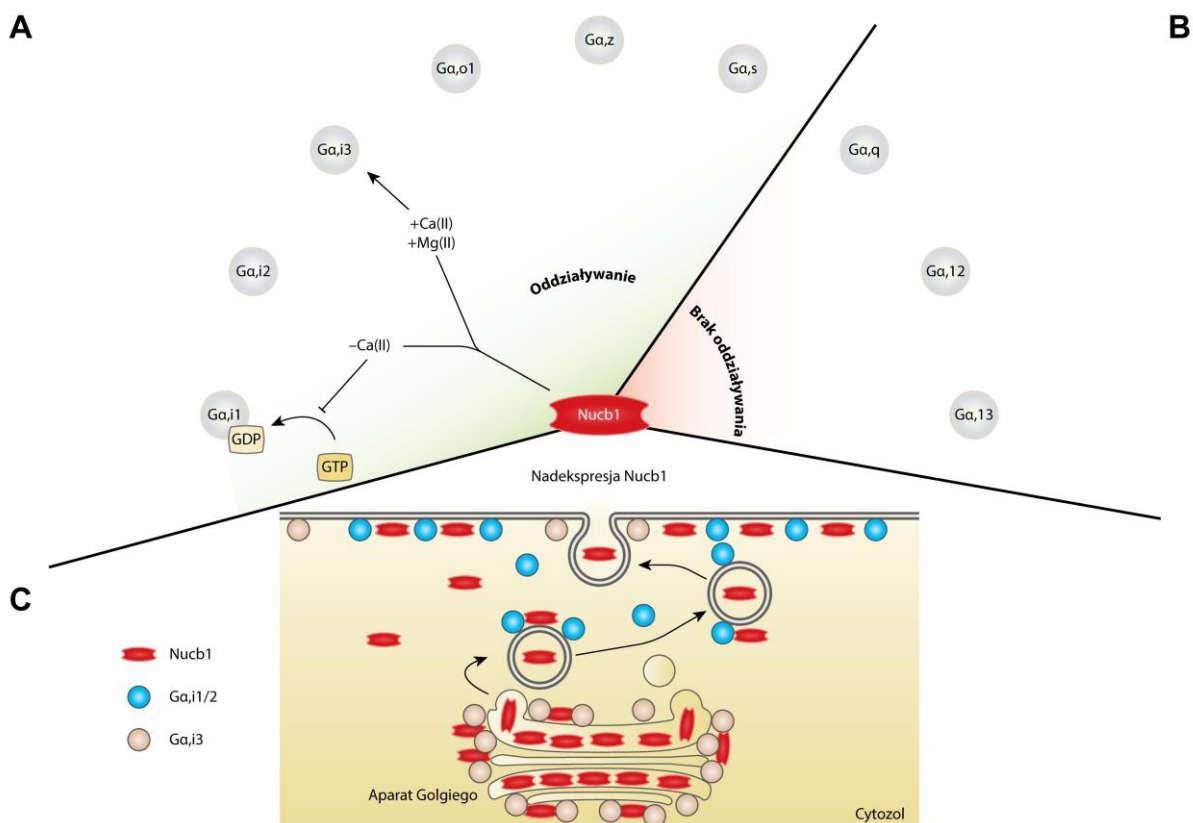
Mikrofotografie fluorescencyjne szczurzego mózgu obrazujące immunoreaktywność wobec Nucb1. (A) Sekcje mózgu odpowiadające panelom (B-F) i cechujące się rozległą dystrybucją Nucb1, która dodatkowo obecna jest również w rdzeniu kręgowym (G) oraz korzeniu grzbietowym (H). AON – jądro węchowe przednie; CA3 – region CA3 hipokampu; Cb – mózdzek; CPu – skorupa; DH – róg grzbietowy; DRN – jądro grzbietowe szwu; IO – jądro oliwkowe dolne; MCx – kora ruchowa; NAc – jądro półleżące; PCx – kora przedczołowa; PN – jądro mostu; PTN – jądro przykomorowe wzgórza; VCx – kora wzrokowa; VMH – jądro brzuszno-przyśrodkowe. Skala: 500  $\mu\text{m}$  (B-F); 250  $\mu\text{m}$  (G, H); 50  $\mu\text{m}$  (wstawki). Zmodyfikowano z [64].

jako białko zaangażowane w procesy autoimmunologiczne oraz apoptozę [39]. Nucb1 uczestniczy jednak również w regulacji innych procesów, wśród których można wymienić: udział w utrzymywaniu homeostazy jonów  $\text{Ca}(\text{II})$  [36]; regulacji szlaków przekazywania sygnałów z udziałem receptorów sprzężonych z białkami G (GPCRs, ang. *G-protein-coupled receptors*) [52,67]; regulacji odpowiedzi na białka niesfałdowane (UPR, ang. *unfolded protein response*) [68]; udział w procesie mineralizacji kości [69]; czy karcynogenezie [70].

### 1.2.3.1 Nucb1 oddziałuje z białkami G

Białka G stanowią rodzinę białek adaptorowych dla receptorów GPCR i są zaangażowane w przekazywanie sygnału do wnętrza komórki w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Białka G są heterotrimerami złożonymi z podjednostek  $G\alpha$ ,  $G\beta$  oraz  $G\gamma$  [71]. Istnieje wiele izoform tych podjednostek, które mogą asocjować ze sobą, co jednocześnie ukierunkowuje ich specyficzność [72]. Wiązanie ligandu przez GPCR skutkuje dysocjacją trimeru na podjednostki

$G\alpha$  oraz  $G\beta\gamma$ . Dysocjacja kompleksu  $G\alpha\beta\gamma$  jest wynikiem wymiany difosforanu guanozyny (GDP, ang. *guanosine diphosphate*) związanego z podjednostką  $G\alpha$  na trifosforan guanozyny (GTP, ang. *guanosine triphosphate*) w odpowiedzi na aktywację receptora. Powolna hydroliza związanego GTP do GDP wywołuje z kolei odtworzenie heterotrimeru [71,72]. W związku z tym białka te przechodzą cyklicznie pomiędzy stanem aktywnym i nieaktywnym, funkcjonując jako swoiste przełączniki molekularne. Aktywność podjednostki  $G\alpha$  jest dodatkowo modulowana przez czynniki wymieniające nukleotyd guaninowy (GEFs, ang. *guanine nucleotide exchange factors*), inhibitory dysocjacji nukleotydu guaninowego (GDIs, ang. *guanine dissociation inhibitors*) oraz białka aktywujące GTPazę (GAPs, ang. *GTPase-activating proteins*). GEFs ułatwiają wymianę GDP na GTP, GDIs ją hamują a GAPs stymulują z kolei aktywność GTPazy podjednostki  $G\alpha$  [73]. Wyróżnić można cztery główne podrodziny podjednostek  $G\alpha$ :  $G_s$ ;  $G_{i/o}$ ;  $G_q$ ;  $G_{12/13}$ . Odpowiednie podrodziny podjednostek  $G\alpha$  oddziałują ze specyficznym efektem, np. z cyklazą adenylanową (AC, ang. *adenylate cyclase*), czy fosfolipazą C.



**Rys. 1.6** Oddziaływanie Nucb1 z białkami G

(A) Białka G oddziałujące i (B) nieoddziałujące z Nucb1. (C) Nucb1 wpływa na redystrybucję podjednostek  $G\alpha_{i/2}$  do cytozolu oraz  $G\alpha_{i3}$  do granul RSG. Nucb1 obecna w cytozolu oddziałuje z podjednostkami  $G\alpha_i$  obecnymi na GA oraz na powierzchni pęcherzyków uwolnionych z GA. Nucb1 obecna w cysternach GA, po kilkugodzinnej retencji w GA, ulega eksportowi szlakiem konstytutywnym na zewnątrz komórki. Rysunek wykonano na podstawie [73].

Konsekwencją stymulacji efektorów jest powstanie wtórych cząsteczek sygnałowych takich jak: cykliczny nukleotyd adenylowy (cAMP, ang. *cyclic adenosine monophosphate*); jony Ca(II); 1,4,5-trifosforan inozytolu, które stymulują dalszą propagację sygnału wewnątrz komórki [71–73].

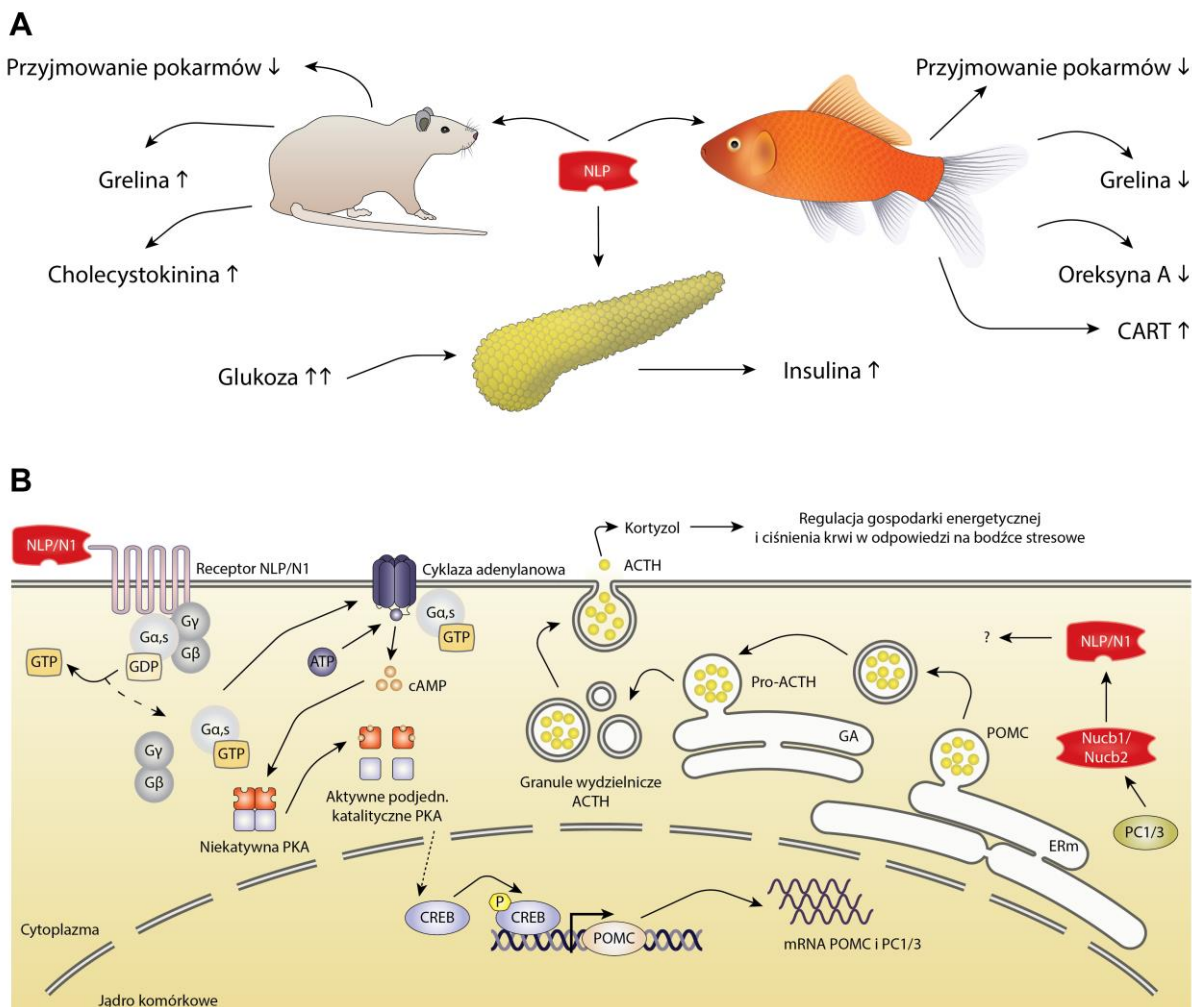
Oddziaływanie Nucb1 z członkami podrodziny  $G\alpha,i$  ( $G\alpha,i1$ ;  $G\alpha,i2$ ;  $G\alpha,i3$ ;  $G\alpha,o1$ ;  $G\alpha,z$ ) oraz podrodziny  $G\alpha,s$  zostało wykazane przez Lin i wsp. w roku 1998 (**Rys. 1.6**), przy czym największe powinowactwo Nucb1 obserwowano do podjednostek  $G\alpha,i1$  oraz  $G\alpha,i3$  [36]. W powyższej pracy wykazano także brak oddziaływania Nucb1 z podjednostkami:  $G\alpha,q$ ;  $G\alpha,12$  oraz  $G\alpha,13$  (**Rys. 1.6**) [36]. W późniejszej pracy opublikowanej przez Lin i wsp. wykazano z kolei, iż Nucb1 oddziałuje specyficznie z helisą  $\alpha 5$  podjednostki  $G\alpha,i3$  w sposób zależny od jonów Ca(II) oraz Mg(II) [74]. W warunkach braku jonów metali dwuwartościowych nie obserwowano jednak oddziaływań pomiędzy białkami. W kolejnej pracy Lin i wsp. wykazali, iż nadekspresja Nucb1 wpływa na redystrybucję podjednostek  $G\alpha,i1/2$  do błon cytoplazmatycznych oraz podjednostek  $G\alpha,i3$  (**Rys. 1.6**) do granul wydzielniczych szlaku niekonstytutywnego (RSG, ang. *regulatory secretory granules*) [75]. Mimo to, Nucb1 nie wpływała na subkomórkową lokalizację podjednostek  $G\beta\gamma$ . Co ciekawe, wiązanie  $G\alpha,i3$  przez Nucb1 nie miało także wpływu na szybkość wymiany nukleotydu guaninowego, co zaprzecza jej funkcji GEF/GDI dla tej podjednostki [75]. Badania wykonane przez zespół Kapoor i wsp. wskazują jednak na rolę GDI Nucb1 podczas jej oddziaływania z podjednostką  $G\alpha,i1$  w nieobecności jonów Ca(II) [52]. Właściwość GDI Nucb1 dla podjednostki  $G\alpha,i1$  została również potwierdzona *in vivo* w komórkach linii HEK293 [52]. Oddziaływanie Nucb1 z białkami  $G\alpha,i$  może być zatem regulowane obecnością jonów Ca(II) i modulować aktywność szlaków sygnalizacyjnych, w których biorą udział.

### 1.2.3.2 NLP wykazuje aktywność biologiczną

Peptyd podobny do nesfatyny-1 (NLP, ang. *nesfatin-1-like peptide*), podobnie jak N1 (**Rozdział 1.2.4.1**), jest agonistą nieznanego dotąd receptora i jest on prawdopodobnie zaangażowany w regulację homeostazy energetycznej, co wykazano u szczurów oraz u karasia złocistego (łac. *Carassius auratus*) [76,77]. Zarówno u szczurów oraz karasia złocistego kilkudniowe, dootrzewnowe podawanie NLP skutkowało zmniejszeniem ilości przyjmowanego pożywienia [76,77]. Co więcej, wpływało ono także na ekspresję pozostałych hormonów wywołując: zwiększenie ekspresji greliny (GRE, ang. *ghrelin*) oraz cholecystokininy (CCK, ang. *cholecystokinin*) u szczurów [76]; zmniejszenie ekspresji GRE i oreksyny A u karasia złocistego

przy jednoczesnym zwiększeniu ekspresji transkryptu regulowanego przez kokainę i amfetaminę (**Rys. 1.7**; CART, ang. *cocaine and amphetamine regulated transcript*) [77].

NLP (wraz z N1) wpływa również na poziom proopiomelanokortyny (POMC, ang. *pro-opiomelanocortin*) będącej prekursorem wielu istotnych hormonów (**Rys. 1.7**), w tym:  $\beta$ -endorfiny; hormonu adrenokortykotropowego (ACTH, ang. *adrenocorticotropic hormone*) regulującego odpowiedź na bodźce stresowe;  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -melanotropiny ( $\gamma$ -MSH, ang.  *$\gamma$ -melanocyte stimulating hormone*) [78,79]. W komórkach linii AtT-20 wykazano, iż ich stymulacja za



**Rys. 1.7** Wpływ NLP na poziom wybranych hormonów

(A) Kilkudniowe dootrzewnowe podawanie NLP wpływa na zwiększenie/zmniejszenie poziomu hormonów uczestniczących w regulacji homeostazy energetycznej u szczura oraz karasia złocistego. NLP zwiększa również poziom insuliny przy wysokim stężeniu glukozy. (B) Wpływ NLP/N1 na syntezę POMC. NLP/N1 aktywując specyficzny GPCR wywołują wymianę GDP związanego z podjednostką  $G\alpha,s$  na GTP i jej dysocjację od  $G\beta\gamma$ . W konsekwencji  $G\alpha,s$  stymuluje cyklazę adenylanową i konwersję ATP do cAMP z jej udziałem. Następnie cAMP wiąże się do regulatorowych podjednostek PKA, co wywołuje dysocjację i uwolnienie katalitycznych podjednostek PKA. Aktywna katalitycznie podjednostka PKA fosforyluje następnie CREB, który z kolei promuje transkrypcję genów POMC. Ponadto, zwiększonej ekspresji podlega również PC1/3, która uczestniczy w procesowaniu POMC oraz Nucb1/Nucb2. Znaczenie procesowania Nucb1/Nucb2 na sekrecję ACTH jest jak dotąd nieznane. Rysunek na podstawie [75-77].

pomocą NLP wywołuje wzrost ekspresji POMC wraz ze zwiększeniem poziomu ufosforylowanej (p-) kinazy białkowej A (PKA, ang. *protein kinase A*; p-PKA) oraz czynnika transkrypcyjnego aktywowanego w odpowiedzi na cAMP (CREB, ang. *cAMP response-element binding protein*) [78]. W związku z tym indukcja ekspresji POMC przez NLP wydaje się być regulowana szlakiem cAMP/PKA/CREB (**Rys. 1.7**). Ponadto, stymulacja komórek linii AtT-20 przez NLP/N1 skutkuje dodatkowo zwiększoną ekspresją PC1/3, będącej kluczowym enzymem w procesowaniu POMC do ACTH oraz Nucleobin1/Nucleobin2 do NLP/N1 [78]. Biorąc zatem pod uwagę kolokację Nucleobin2/N1 z PC1/3 w cytoplazmie stymulacja produkcji POMC przez NLP/N1 może wpływać dodatkowo (na zasadzie sprzężenia zwrotnego) na procesowanie ich form prekursorowych [78,80]. Niemniej jednak potencjalny wpływ tego procesu na sekrecję ACTH wymaga dalszych badań. ACTH stymuluje produkcję kortyzolu, który wpływa na regulację gospodarki energetycznej organizmu oraz ciśnienia krwi w odpowiedzi na bodźce stresowe. Co ciekawe, ekspresja Nucleobin1/NLP ma miejsce również w kardiomiocytach przedsionka oraz komórek serca. Wykazano, iż dootrzewnowe podawanie NLP u *D. rerio* oraz *C. auratus* wywołuje zależne od stężenia zmniejszenie wydolności serca poprzez: zmniejszenie objętości końcoworozkurczowej, końcowoskurczowej, wyrzutowej i zmniejszenie tętna [81]. Ponadto, stymulacja za pomocą NLP wpływała również na zmniejszenie ekspresji sarko-/endoplazmatycznej pompy Ca(II) (SERCA, ang. *sarco-/endoplasmic reticulum Ca(II)-ATPase*) oraz receptorów rianodynowych – białek kluczowych dla regulacji procesu skurczu mięśnia [81]. Jest zatem możliwe, iż stymulacja produkcji ACTH przez NLP wraz z pobudzeniem przez nią współczulnego układu nerwowego może regulować ciśnienie krwi. Nucleobin1/NLP stymuluje ponadto sekrecję insuliny przez komórki  $\beta$  trzustki w warunkach hiperglikemicznych (**Rys. 1.7**) [82]. Komórki  $\beta$  trzustki (w przeciwieństwie do komórek  $\alpha$ ) cechują się wysoką ekspresją Nucleobin1/NLP i ich kolokacją z insuliną, co wskazuje na ich endokrynną rolę [82].

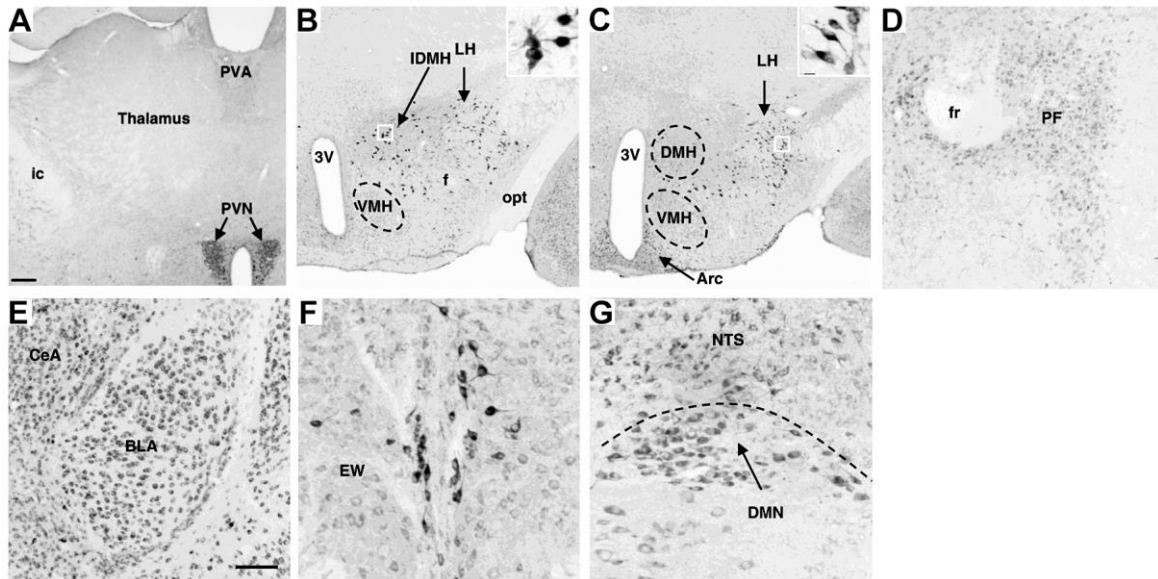
### 1.2.4 Dystrybucja, aktywność biologiczna i właściwości Nucleobin2/N1

Nucleobin2 jest białkiem o masie około 50 kDa u ssaków, które po raz pierwszy zidentyfikowano w linii komórkowej KM3 ostrej białaczki limfoblastycznej [38]. Gen kodujący hNucleobin2 jest zlokalizowany na 11 chromosomie. Składa się on z 14 eksonów oraz 13 intronów [83]. Nucleobin2/N1<sup>1</sup> są białkami powszechnie występującymi w organizmie. Nucleobin2/N1 są obecne w międzymózgowiu (**Rys. 1.8**) w jądrach [16]: przykomorowym (PVN, ang. *paraventricular*

---

<sup>1</sup> Nucleobin2 i/lub N1; przeciwciała komercyjne stosowane w badaniach immunohistochemicznych są specyficzne zarówno wobec Nucleobin2 jak i N1





**Rys. 1.8** Dystrybucja Nucb2/N1 w CUN

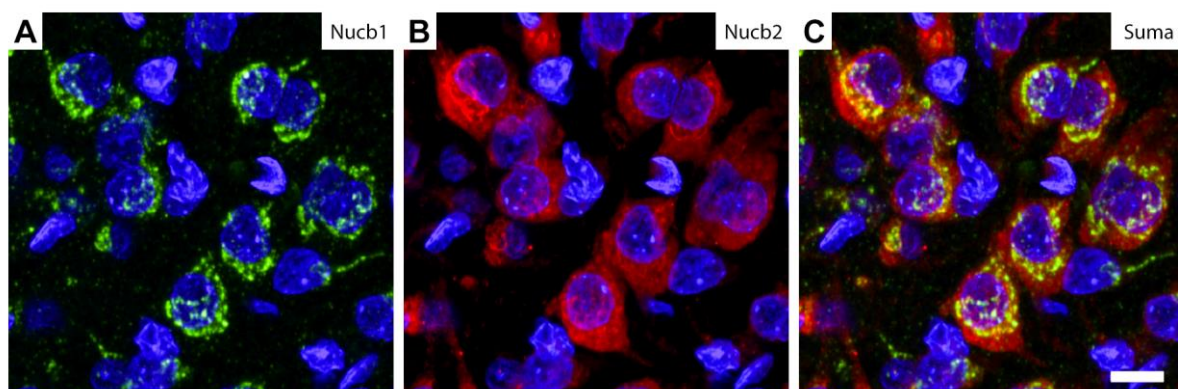
Dystrybucja Nucb2/N1 w międzymózgowiu: (A) w jądrze przykomorowym (PVN); (B, C, D) oraz w innych ośrodkach podwzgórza w jądrze brzuszno-przyśrodkowym (VMH), bocznym podwzgórzu (LH), jądrze grzbietowo-przyśrodkowym (DMH), łukowatym (Arc) i przypęczkowym (PF); (E) w kresomózgowiu w jądrze podstawnym ciała migdałowatego (BLA); (E) w śródmózgowiu w jądrze Edingera-Westphala (EW); (F) w tyłomózgowiu w jądrze pasma samotnego (NTS) i brzusznej części jądra ruchowego (DMN). Zmodyfikowano z [84].

*nucleus*); łukowatym (ARC, ang. *arcuate nucleus*); nadwzrokowym (SON, ang. *supraoptic nucleus*); bocznym podwzgórzu (LHA, ang. *lateral hypothalamic area*) oraz w pniu mózgu w [84]: jądrach szwu i jądrze nerwu błędnego (NTS, ang. *nucleus of the solitary tract*); miejscu sinawym; jądrze oliwkowym dolnym. Dodatkowo wykazano immunoreaktywność wobec Nucb2/N1 w przodomózgowiu (Rys. 1.8) [84,85]: w jądrze półleżącym (NAc, ang. *nucleus accumbens*) i przednim jądrze węchowym; ciele migdałowatym (AmG, ang. *amygdala*); oraz rdzeniu kręgowym. Co ciekawe, podobnie jak Nucb1/NLP, Nucb2/N1 są obecne głównie w ciele komórki nerwowej a nie w pobliżu zakończeń synaptycznych (Rys. 1.9) [65]. Warto również podkreślić, iż subkomórkowa dystrybucja Nucb2/N1 w komórkach nerwowych rozciąga się w cytozolu w porównaniu do zlokalizowanych głównie w okolicy GA Nucb1/NLP (Rys. 1.9). W związku z powyższym sekrecja Nucb2/N1 (oraz Nucb1/NLP) najprawdopodobniej odbywa się z dendrytów komórki nerwowej, tak jak ma to miejsce w przypadku oksytocyny (OXT, ang. *oxytocin*) i wazopresyny [86,87]. W konsekwencji działanie Nucb2/N1 w CUN może być auto- i parakryjne. Warto jednak dodać, iż neuropeptydy podlegające sekrecji z dendrytów cechują się wysokim czasem półtrwania w mózgu i często mogą dyfundować do dalej położonych ośrodków [88]. Wykazano, iż N1 jest również wysoce stabilna nie tylko w mózgu, ale również we krwi oraz swobodnie pokonuje barierę krew-mózg nie osiągając przy tym stanu wysycenia [89]. Dodatkowo, zewnątrzkomórkowo neuropeptyd w sposób

autokryny może mobilizować pęcherzyki wydzielnicze i potęgować swoje wydzielanie, przekładając się na długotrwałe działanie, jak ma to miejsce w przypadku OXT [86,87]. Sekrecja neuropeptydów z dendrytów może ponadto odbywać się w sposób niezależny od sekrecji aksonalnej, co pozwala na wyrafinowaną i czasoprzestrzenną kontrolę ich działania [86–88].

Poza CUN, wykazano obecność Nucb2/N1 w licznych tkankach obwodowych, w tym w: tkance tłuszczowej [90]; sercu [91]; płucach [92]; żołądku [91,92]; dwunastnicy, jelicie cienkim i grubym [93]; trzustce i wątrobie [94]; jądrach [92] i jajnikach [92]. Co ciekawe, Stengel i wsp. wykazali, iż ekspresja Nucb2/N1 jest nawet szesnaście razy większa w błonie śluzowej żołądka w odniesieniu do ich poziomu w mózgowiu u szczurów [91]. Z drugiej strony Kim i wsp. wykazali wysoki poziom mRNA Nucb2/N1 w (kolejność według zmniejszającego się poziomu): przysadce mózgowej, gonadach, płucach i żołądku myszy [92]. Zróżnicowany poziom tkankowej i surowiczej Nucb2/N1 wykazano również, poza gryzoniami, u zwierząt domowych (psów, kotów, koni, owiec, świń, kur) [95] oraz ryb (danio pręgowanego, bassa wielkogębowego [96], karasia złocistego [97]). Poziom ekspresji wydaje się zatem wahać w zależności od tkanki i organizmu. Jest zatem możliwe, iż część funkcji Nucb2/N1 może być specyficzna dla danego organizmu.

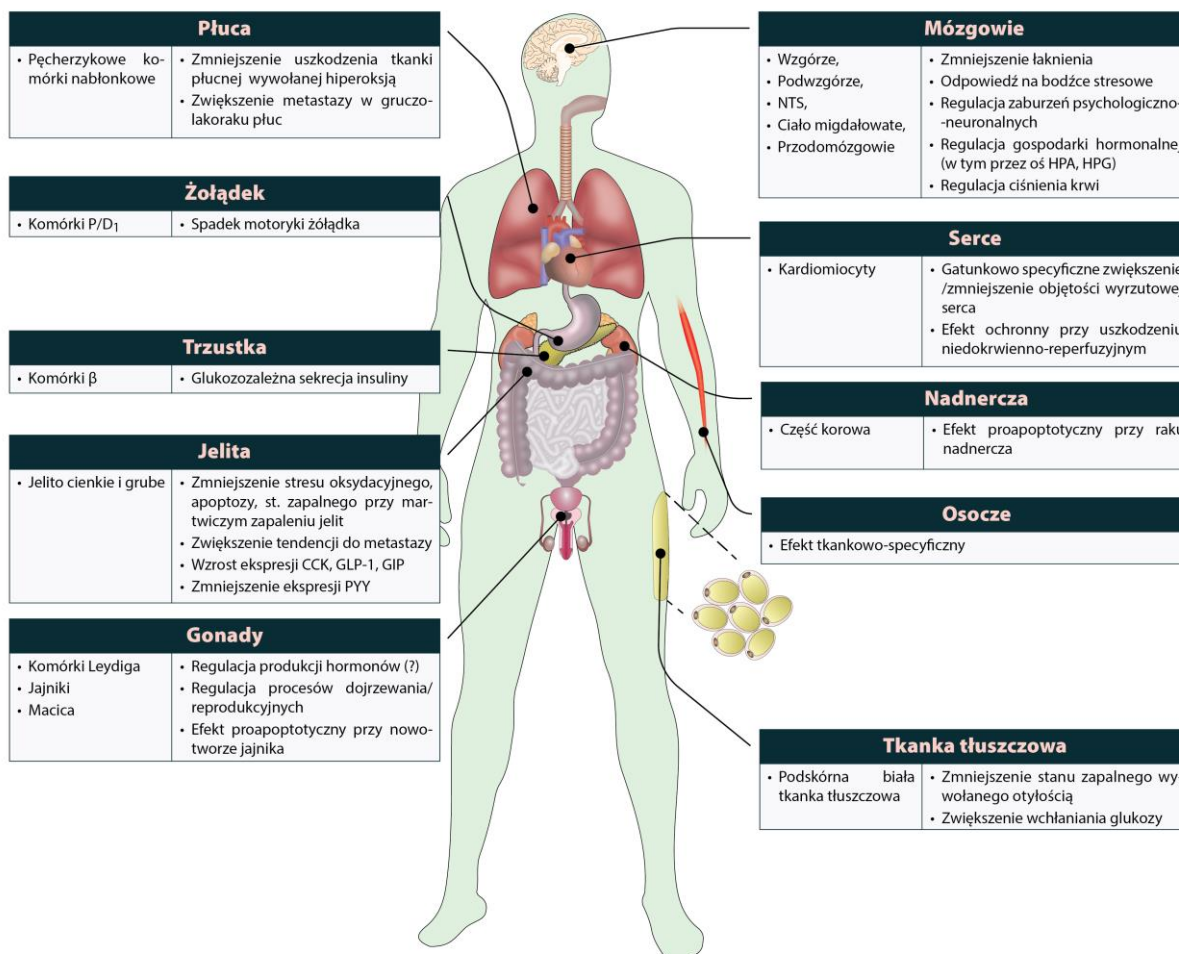
Wielodomenowa budowa w połączeniu z rozległą dystrybucją tkankową Nucb2/N1 ma swoje odbicie w szerokim spektrum pełnionych przez nie funkcji fizjologicznych (**Rys. 1.10**). Wśród nich wymienić można m. in. udział w: regulacji homeostazy energetycznej organizmu [98]; zależnej od stężenia glukozy sekrecji insuliny [99]; regulacji motoryki żołądka; odpowiedzi na bodźce stresowe [5]; zaburzeniach psychologiczno-neuronalnych [5,6]; regulacji rytmu dobowego [100], ciśnienia krwi i czynności serca [101,102], procesów zapalnych [103];



**Rys. 1.9** Subkomórkowa dystrybucja Nucb1/NLP i Nucb2/N1

Mikrofotografia immunofluorescencyjna PVN przedstawiająca subkomórkową lokalizację: (A) Nucb1/NLP; (B) Nucb2/N1; (C) Nucb1/NLP i Nucb2/N1 w wyniku połączenia mikrofotografii z paneli (A, B). Zmodyfikowano z [64].

termogenezie [104]; karcynogenezie [3,4]; procesach reprodukcyjnych [105,106]. Wybrane z nich zostały przedstawione szczegółowiej w dalszej części tej pracy.



**Rys. 1.10** Dystrybucja i działanie Nucb2/N1

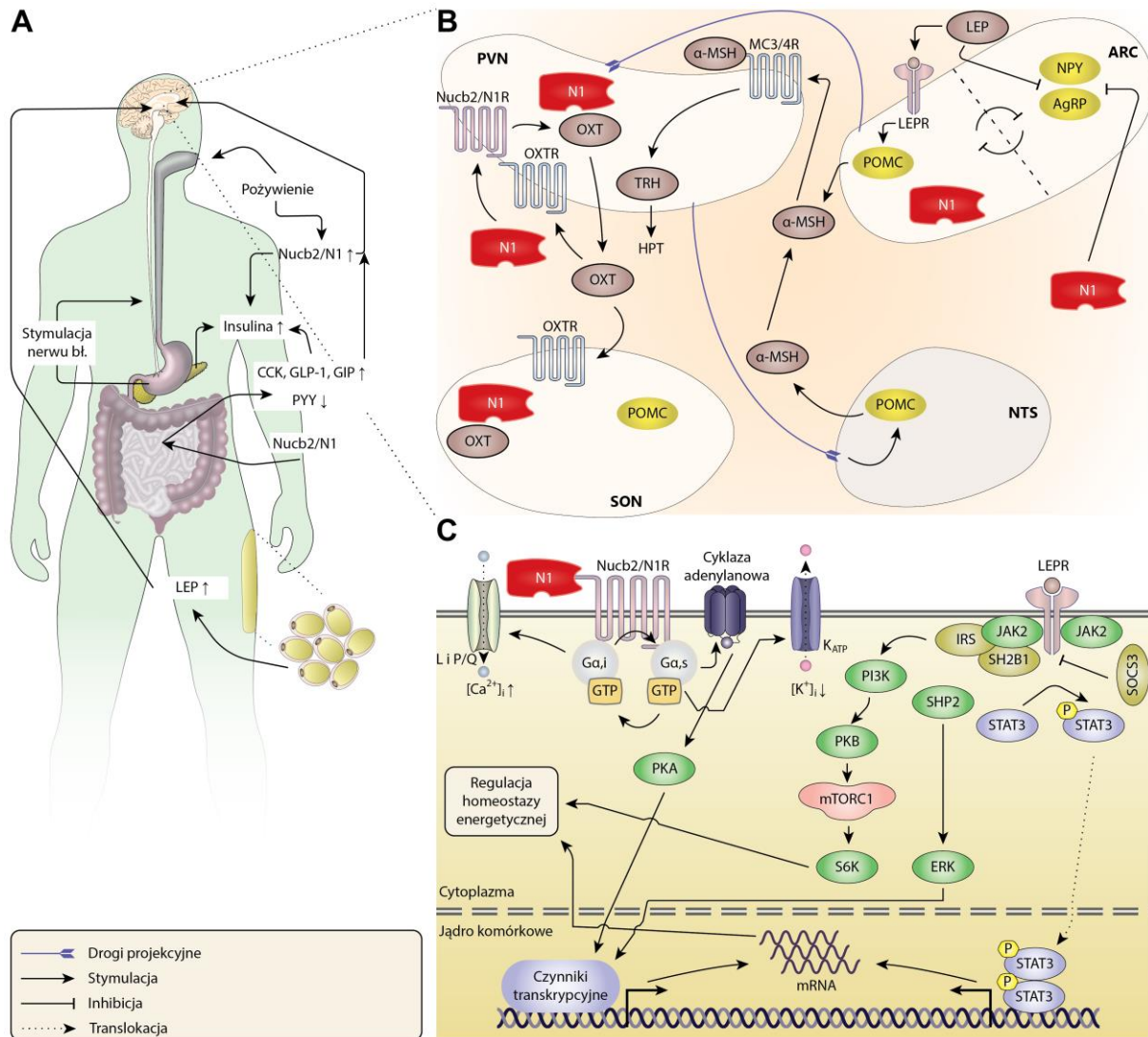
Skróty: NTS – jądro pasma samotnego; HPA – oś podwzgórze-przysadka-nadnercza; HPG – oś podwzgórze-przysadka-gonady.

#### 1.2.4.1 Regulacja łaknienia przez anoreksygenne działanie leptyny oraz Nucb2/N1

Przyjmowanie pokarmów (**Rys. 1.11A**) jest regulowane statusem energetycznym organizmu przez kluczowe ośrodki głodu/sytości w mózgowiu, takie jak obecne w HYP: ARC; PVN; SON (**Rys. 1.11B**). W ARC wyróżnić można dwie populacje neuronów cechujące się ekspresją hormonów o przeciwstawnym działaniu – anoreksygennych: POMC i CART oraz oreksygennych: peptydu Agouti (AgRP, ang. *Agouti-related peptide*) i neuropeptydu Y (NPY, ang. *neuropeptide Y*) [107]. ARC cechuje się ponadto wysoką wrażliwością na obwodowe cząsteczki regulujące łaknienie takie jak: adipokiny; CCK; GRE; peptyd YY (PYY, ang. *peptide YY*) [108]. Jednym z kluczowych hormonów regulujących łaknienie i oddziałujących na powyższe ośrodki jest leptyna (LEP, ang. *leptin*). Hormon ten u ssaków jest wydzielany głównie

z komórek białej tkanki tłuszczowej (WAT, ang. *white adipose tissue*) [109]. Obwodowy poziom LEP jest z kolei proporcjonalny do ilości tkanki tłuszczowej [110]. Ekspresja LEP jest dodatkowo regulowana przez: insulinę; glukokortykoidy [111]; przez samą siebie na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego [112] oraz przez status energetyczny organizmu (zmniejszenie poziomu LEP w okresie postu) [113]. LEP przekracza barierę krew-mózg w sposób wysycający [114], gdzie oddziałuje m.in. na neurony: ARC; PVN, LHA (**Rys. 1.11B**). Leptyna, wiążąc się do swojego receptora (LEPR), stymuluje ekspresję POMC i w konsekwencji sekrecję  $\alpha$ -MSH [115]. Ponadto LEP wywołuje również inhibicję neuronów AgRP/NPY. Neurony obecne w ARC odpowiadają za odbieranie pierwotnych sygnałów sytości. Z drugiej strony drogi projekcyjne z ARC sięgają do: PVN; jądra grzbietowo-przyśrodkowego (DMH, ang. *dorsomedial hypothalamus*) oraz brzuszno-przyśrodkowego (VMH, ang. *ventromedial hypothalamus*). Z kolei drogi projekcyjne z PVN unerwiają NTS [116]. Połączenia te tworzą wielopoziomową sieć regulującą homeostazę energetyczną (**Rys. 1.11B**).

LEPR należy do rodziny receptorów cytokin typu interleukiny-6 [117]. Związanie LEP przez ten dimeryczny receptor aktywuje kinazę Janusową 2 (JAK2, ang. *Janus kinase 2*) i wywołuje jej autofosforylację. Dodatkowo fosforylacji podlegają trzy reszty Tyr (985; 1077; 1138) obecne w LEPR, do których rekrutowane są białka zawierające domenę homologiczną src (SH2, ang. *src homology domain*; **Rys. 1.11C**). Do reszty p-Tyr1138 wiąże się przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3 (STAT3, ang. *signal transducer and activator of transcription 3*). STAT3 ulega fosforylacji z udziałem JAK2, po czym po translokacji do jądra ulega on dimeryzacji. W tej formie odpowiada za inicjację transkrypcji wielu genów, w tym białka regulatorowego SOCS3 (ang. *suppressor of cytokine signaling*) oraz neuropeptydów [118]. Reszta p-Tyr985 oddziałuje z kolei z domeną SH2 białkowej fosfatazy tyrozynowej 2 (SHP2, ang. *SH2 domain containing protein phosphatase 2*), która aktywuje szlak kinazy regulowanej przez sygnały zewnątrzkomórkowe (ERK, ang. *extracellular regulated kinase*) [119]. SOCS3 wiążąc się do pTyr985 hamuje aktywność szlaku JAK2/STAT3 [120]. Dla osiągnięcia anoreksygenego efektu przez LEP wymagana jest również aktywacja szlaku substrat receptora insulinoowego (IRS, ang. *insulin receptor substrate*)/kinaza-3 fosfatydyloinozytolu (PI3K, ang. *phosphoinositide 3-kinase*)/kinaza białkowa B (PKB, ang. *protein kinase B*)/saczy cel rapamycyny (mTORC, ang. *mammalian target of rapamycin*) przez LEPR [121]. Jest to osiągane przy pomocy białka adaptorowego 1 wiążącego domenę SH2 (SH2B1, ang. *SH2 domain binding adapter protein 1*). SHB1 aktywuje szlak PI3K wiążąc się jednocześnie do STAT3 oraz IRS (**Rys. 1.11C**) [122].



**Rys. 1.11** Anoreksygenne działanie N1 oraz LEP

(A) Treść pokarmowa pobudza produkcję Nucb2/N1 oraz leptyny (LEP), które stymulują ośrodki sytości w CUN. Dodatkowo Nucb2/N1 potęguje sekrecję insuliny oraz inkretyn: cholecystokiny (CCK); peptydu podobnego do glukagonu (GLP-1); glukozależnego peptydu insulinotropowego (GIP), a także zmniejszenie wydzielania peptydu YY (PYY). Inkretyny dodatkowo stymulują produkcję insuliny przez komórki  $\beta$  trzustki oraz stymulują ośrodki sytości w CUN. Powiększenie objętości żołądka pod wpływem treści pokarmowej wywołuje uczucie sytości przez pobudzenie nerwu błędnego. (B) W CUN N1 oraz LEP wywołują inhibicję neuronów wydzielających peptyd Agouti oraz neuropeptyd Y (AgRP/NPY) w jądrze łukowatym (ARC). Nucb2/N1 stymuluje produkcję oksytocyny (OXT) w jądrze przykomorowym (PVN) przez pobudzenie receptorów Nucb2/N1R. Pobudzenie PVN przez Nucb2/N1 zwiększa ekspresję proopiomelanokortyny/melanotropiny (POMC/ $\alpha$ -MSH) w jądrze pasma samotnego (NTS) poprzez drogi projekcyjne. Zaznaczono również wewnątrzkomórkową kolokację Nucb2/N1 z OXT. LEP stymuluje sekrecję  $\alpha$ -MSH z ARC, która pobudza receptory melanokortyny3/4 (MC3/4) i produkcję tyreoliberyny (TRH). TRH pobudza następnie oś podwzgórze-przysadka-tarczyca (HPT) i promuje wydatek energetyczny. (C) Nucb2/N1R może współdziałać z podjednostkami  $G\alpha_s$  oraz  $G\alpha_i$  i stymulować kanały  $K_{ATP}$  oraz kanały wapniowe L i P/Q. Aktywacja kaskady PKA stymuluje ekspresję genów zaangażowanych w regulację homeostazy energetycznej. Regulacja tego procesu z udziałem LEPR obejmuje aktywację kaskad JAK2/STAT3, PI3K/mTORC oraz ERK, które stymulują odpowiednie czynniki transkrypcyjne.

Związanie  $\alpha$ -MSH do receptorów melanokortynowych-3 (MC3R, ang. *melanocortin-3 receptor*) i/lub -4 (MC4R) obecnych w PVN skutkuje ich aktywacją i w konsekwencji sekrecją

tyreoliberyny (TRH, ang. *thyrotropin-releasing hormone*) oraz aktywacji osi podwzgórze-przysadka-tarczyca (HPT, ang. *hypothalamus-pituitary-thyroid*; **Rys. 1.11B**). Pobudzenie osi HPT wiąże się natomiast ze zwiększeniem szybkości przemian metabolicznych [116]. Wpływ na uczucie sytości mają również bodźce z innych organów układu trawiennego. W przypadku żołądka jego mechaniczne powiększenie pod wpływem treści pokarmowej wywołuje uczucie sytości przez pobudzenie nerwu błędnego (**Rys. 1.11A**) [123]. Ponadto treść pokarmowa pobudza również jelita do produkcji cząsteczek sytości, z których wiele wpływa na zmniejszenie motoryki żołądka i przedłużenie mechanistycznego efektu sytości (**Rys. 1.11A**). Cząsteczki sytości wydzielane w proksymalnym odcinku jelita, to CCK, podczas gdy w dystalnym jego odcinku wydzielany jest peptyd podobny do glukagonu (GLP-1, ang. *glucagon-like peptide-1*), PYY.

Obecność Nucleob2/N1 w ARC wykazano głównie w neuronach POMC/CART, przy czym niewielka subpopulacja neuronów Nucleob2/N1-pozytywnych została wykazana również w neuronach AgRP/NPY [124]. Dokomorowe [7,16] oraz dootrzewnowe [125] podanie N1 wywołuje silne zahamowanie łaknienia (**Rys. 1.10**). Poziom Nucleob2/N1 zwiększa się w okresie sytości oraz spada w okresie postu. Uważa się, iż anoreksygenne działanie Nucleob2/N1 może być wywoływane w dwojaki sposób. Pierwszy związany jest z bezpośrednią hiperpolaryzacją neuronów AgRP/NPY przez zewnątrzkomórkową N1 (**Rys. 1.11B**). Inhibicja tej populacji neuronów jest osiągnięta przez aktywację ATP-zależnych kanałów potasowych  $K_{ATP}$  [126]. Kanały te są regulowane głównie przez stosunek komórkowego stężenia ATP/ADP. Dodatkowo mogą być aktywowane w wyniku fosforylacji przez PKA [127]. W związku z tym ich aktywność może być modulowana w wyniku aktywacji potencjalnego receptora Nucleob2/N1 (Nucleob2/N1R) oraz inicjacji kaskady sygnałowej AC/PKA przez podjednostkę  $G_{\alpha,s}$  (**Rys. 1.11C**). Efekt ten jest z kolei znoszony przez glibenclamid, będący antagonistą kanałów  $K_{ATP}$  [126]. Dodatkowo, Nucleob2/N1 wpływa na wewnątrzkomórkowe stężenie jonów Ca(II). W tym przypadku aktywacja GPCR związanych z podjednostkami  $G_i/o$  prowadzi do otwarcia kanałów typu L oraz P/Q (**Rys. 1.11C**) [124]. Co ciekawe, anoreksygenne działanie Nucleob2/N1 jest znoszone przez KT5720 – selektywny inhibitor PKA, co wskazuje na udział podjednostek  $G_{\alpha,s}$  w szlakach sygnalizacyjnych aktywowanych przez te białka. Jest to dość zaskakujące biorąc pod uwagę, iż podjednostka  $G_i/o$  jest inhibitorem cykazy adenylanowej z definicji. W konsekwencji Nucleob2/N1R wydaje się należeć do rodziny GPCR i wykazywać zdolność rekrutacji różnych podjednostek białek G oraz aktywować różne szlaki sygnalizacyjne. Niestety, Nucleob2/N1R nie został do tej pory zidentyfikowany. Anoreksygenna aktywność Nucleob2/N1 jest również modulowana przez inne układy regulujące apetyt. W tym przez receptory: MC3/4R [128]; hormonu uwalniającego kortykosteron (CR2, ang. *corticotropin releasing hormone receptor 2*) [129];

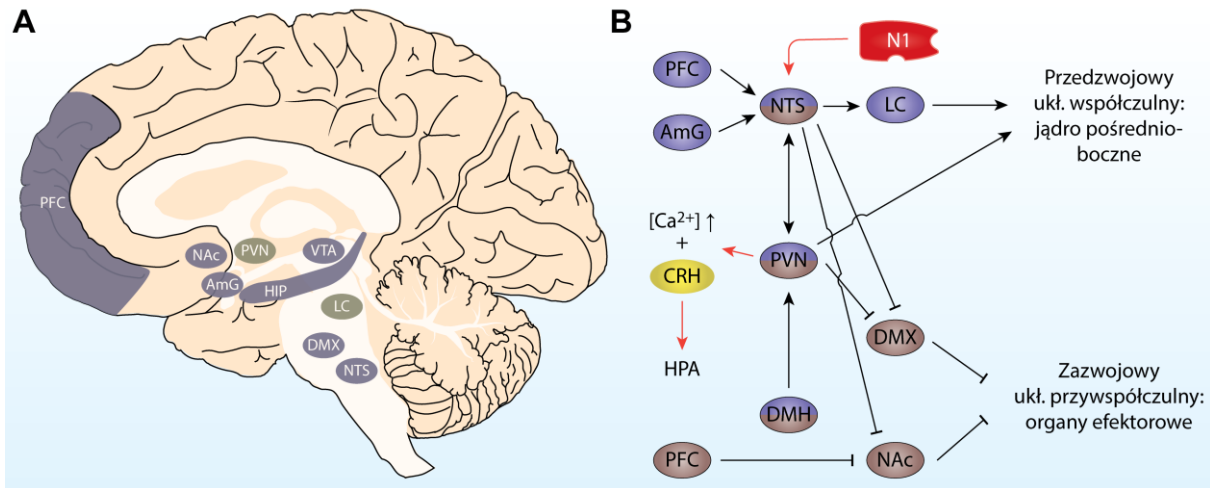
oksytocyny (OXTR) [7], co wykazano przez zahamowanie/zmniejszenie anoreksygennego efektu Nucleob2/N1 w obecności antagonistów powyższych receptorów [7,128,129]. Dodatkowo Nucleob2/N1 stymuluje produkcję POMC/CART w NTS (**Rys. 1.11B**) [125]. Nucleob2/N1 wykazuje kolokację z OXT w SON oraz PVN i aktywuje układ OXT w PVN (**Rys. 1.11B**) [130]. Nucleob2/N1 wywołuje zahamowanie łaknienia u myszy opornych na LEP, co wskazuje na niezależny od tego hormonu efekt anoreksygeny [125]. Co więcej, Nucleob2/N1 ulegające ekspresji w CUN są kluczowe dla wywołania anoreksygennego efektu przez LEP [131]. Mimo to kluczowym elementem w regulacji homeostazy energetycznej dla obu hormonów jest szlak melatoninowy.

N1 podana dokomorowo wywołuje ponadto zmniejszenie motoryki żołądka [129]. Obwodowa CCK pobudza natomiast neurony Nucleob2/N1-pozytywne w PVN oraz NTS [129]. Nucleob2/N1 stymuluje ekspresję i sekrecję CCK, GLP-1 oraz glukozozależnego peptydu insulinotropowego (GIP, ang. *glucose-dependent insulinotropic polypeptide*), a także zmniejszenie ekspresji PYY (**Rys. 1.10**) [132,133]. CCK, GLP-1 oraz GIP wpływają na zmniejszenie motoryki żołądka i zwiększenie wydzielania insuliny, podczas gdy PYY je zmniejsza (**Rys. 1.11A**) [132–134]. W związku z tym efekt anoreksygeny Nucleob2/N1 wydaje się działać w połączeniu z inkretynami, uczestnicząc w pozytywnym efekcie zwrotnym. Ponadto, w trzustce Nucleob2/N1 znajduje się głównie w komórkach  $\beta$  w kolokacji z PC1/3 [80] a w warunkach hiperglikemicznych Nucleob2/N1 wydaje się stymulować sekrecję insuliny (**Rys. 1.11A**) [135]. Nucleob2/N1 stymuluje również wchłanianie glukozy przez tkankę tłuszczową poprzez translokację transportera GLUT4 [136]. Na podstawie zebranych informacji silnie rysuje się zatem potencjał Nucleob2/N1 w leczeniu otyłości.

#### **1.2.4.2** *Udział Nucleob2/N1 w zaburzeniach psychologiczno-neuralnych*

Wraz z identyfikacją Nucleob2/N1 jako cząsteczek anoreksygennych równolegle zauważono ich potencjalne zaangażowanie w regulację odpowiedzi na bodźce stresowe (**Rys. 1.10**) [2]. Ponadto obecność Nucleob2/N1 wykazano we wszystkich poniżej wymienionych ośrodkach regulujących odpowiedź na bodźce stresowe z wyłączeniem VTA [85].

W odpowiedzi na bodźce stresowe uczestniczą wysokowydajne i ewolucyjnie zachowane ośrodki (**Rys. 1.12**). Po rozpoznaniu bodźca stresowego w zależności czy jest on o podłożu fizjologicznym czy psychologicznym jest on procesowany przez różne sieci neuronalne. Stresory fizyczne są procesowane głównie przez ośrodki zlokalizowane w pniu mózgu oraz podwzgórzu i wymagają natychmiastowej (odruchowej) odpowiedzi [137]. W związku z tym pierwsza, początkowa jej faza obejmuje pobudzenie układu współczulnego (SNS, ang.



**Rys. 1.12** Regulacja odpowiedzi na stres

(A) Ośrodki zaangażowane w przetwarzanie bodźców stresowych. PVN oraz LC jako główne ośrodki przetwarzające odpowiedź na stres i aktywujące odpowiednio HPA oraz SAM zaznaczono na czerwono. (B) Ośrodki regulujące odpowiedź AUN. Kolorem niebieskim oznaczono ośrodki regulujące odpowiedź SNS, czerwonym PSN, oboma regulujące oba układy. PVN posiada rozbudowaną sieć dróg projekcyjnych do SNS i PSN, w tym do: NTS; jądra ruchowego nerwu błędnego (DMX, ang. *dorsal motor nucleus of the vagus nerve*); jądra pośrednio-bocznego i LC (dwóch ostatnich nie zaznaczono ze względu na czytelność). PVN i LC unerwiają jądro pośrednio-boczne inicjując odpowiedź SNS. NTS jest unerwione przez PFC, AmG oraz PVN. Sygnały PSN są przekazywane i integrowane głównie przez DMX oraz NAc. Liczne skrzyżowania dróg SNS i PNS podkreślają złożoność odpowiedzi AUN. Szlak aktywowany przez N1 zaznaczono na czerwono. N1 (pośrednio i/lub bezpośrednio) pobudza PVN do produkcji CRH, co aktywuje oś HPA. Na podstawie [136,142].

*sympathetic nervous system*) i rdzenia nadnerczy (SAM, ang. *sympathetic-adrenomedullary*), co z kolei zwiększa koncentrację i czujność umożliwiając podjęcie decyzji pomiędzy walką a ucieczką. Druga faza przebiega przez aktywację osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA, ang. *hypothalamus-pituitary-adrenal axis*). Rozpoznanie bodźca (ból; stan zapalny) aktywuje neurony: pnia mózgu; przedwzwojowe i w PVN, co wywołuje natychmiastową odpowiedź ze strony autonomicznego układu nerwowego (AUN) oraz HPA (**Rys. 1.12A**). Odpowiedź AUN jest również regulowana przez NTS i DMH, które posiadają drogi projekcyjne zarówno do współczulnego oraz przywspółczulnego (PSN, ang. *parasympathetic nervous system*) układu nerwowego (**Rys. 1.12B**). Położenie NTS jest szczególnie istotne, gdyż odpowiada ono za przekazywanie informacji sensorycznych, somatycznych oraz wewnątrzotrzewnowych a ponadto bierze udział w regulacji układu sercowo-naczyniowego i oddechowego [137]. Ponadto, NTS moduluje aktywność HPA poprzez drogi projekcyjne do PVN. Dodatkowo, w przetwarzaniu fizycznych stresorów zaangażowane są również ośrodki przedomózgowia: AmG, HIP, kora przedczołowa (PFC, ang. *prefrontal cortex*) [137]. Podczas gdy stresory fizyczne wywołują odpowiedź AUN, stresory psychologiczne wywołują odpowiedź zarówno fizjologiczną oraz kognitywną. W odpowiedzi tej uczestniczą ośrodki układu limbicznego: PFC; AmG; HIP;



PVN; DMH; pole brzuszne nakrywki (VTA, ang. *ventral tegmental area*); NAc (**Rys. 1.12B**) [138]. Produkcja katecholamin takich jak adrenalina i noradrenalina w warstwie pasmowatej kory nadnerczy regulowana przez powyższe ośrodki umożliwia adaptację do warunków stresowych i przygotowanie organizmu do walki/ucieczki [137,138]. Pobudzenie PVN skutkuje z kolei sekrecją kortykotropiny (CRH, ang. *corticotropin releasing factor*), która następnie pobudza przysadkę do produkcji ACTH. ACTH po dotarciu do nadnerczy stymuluje syntezę glukokortykoidów takich jak kortyzol w warstwie pasmowatej. Kortyzol po dotarciu do CUN reguluje aktywność osi HPA oraz wiążąc się do receptorów mineralo- i glukokortykoidów stymuluje ekspresję genów wiążąc się do elementów odpowiedzi na glukokortykoidy [139]. Hormony stresowe wpływają również na regulację homeostazy energetycznej i to w sposób zależny od siły bodźca stresowego [140]. Wykazano także, iż CRH hamuje łaknienie, podczas gdy kortyzol je zwiększa [141].

Już w 2008 roku wykazano, iż dokomorowe podanie N1 wpływa na zmniejszenie odkrywczego zachowania u szczurów oraz zmniejszenie hedonistycznego odżywiania się po wystawieniu na stres związany z nowym otoczeniem [2]. U szczurów linii Sprague-Dawley skutkiem stresu unieruchomienia jest zwiększenie ekspresji czynnika transkrypcyjnego c-Fos (markera silnego pobudzenia neuronalnego) w neuronach Nucb2/N1-pozytywnych w: SON; PVN; miejscu sinawym (LC, ang. *locus coeruleus*); jądrze szwowym bladym (ang. *raphe pallidus*) oraz NTS [142]. Dokomorowe podanie N1 zwiększa również poziom surowiczego CRH oraz ACTH u szczurów, co wskazuje na aktywację HPA przez ten neuropeptyd [143]. Co więcej, obustronna adrenalectomia wpływa na wzrost ekspresji Nucb2 w PVN, co z kolei wskazuje iż jest ona modulowana przez HPA [143]. Dokomorowe podanie N1 pobudza adrenergiczne neurony NTS i serotonergiczne neurony jąder szwu. Aktywuje to neurony CRH w PVN zwiększając komórkowe stężenie jonów Ca(II) i podnosząc tym samym poziom ACTH i glukokortykoidów (**Rys. 1.12B**) [144]. Dokomorowe podanie N1 wpływa również na pobudzenie SAM podnosząc ciśnienie krwi [145]. Wykazano, iż poziom Nucb2/N1 u człowieka koreluje z zaburzeniami psychologiczno-neuronalnymi. Obniżony poziom surowiczej Nucb2/N1 obserwowano u mężczyzn z zespołem lęku uogólnionego (ang. *generalized anxiety disorder*) [146]. Z drugiej strony zwiększony poziom Nucb2/N1 wykazano u osób obu płci z zespołem lęku napadowego (ang. *panic disorder*), który dodatkowo pozostawał w korelacji z jego ostrością [147]. Wzrost surowiczej Nucb2/N1 obserwowano również u obu płci z zaburzeniami obsesyjno-kompulsywnymi (ang. *obsessive compulsive disorder*) [148]. Zaburzenia lękowe często współwystępują wraz z depresją, stąd zbadany został również wpływ Nucb2/N1 na jej patogenezę. Wykazano, iż poziom surowiczej Nucb2/N1 jest dwukrotnie większy u pacjentów

z depresją kliniczną (ang. *major depressive disorder*) [149]. Co więcej, wykazano dodatnią korelację poziomu surowiczej Nucleob2/N1 z jej ostrością [150]. N1 wpływa również na pobudliwość neuronalną [151,152]. Z tego powodu zbadano również jej udział w epilepsji. Aydin i wsp. wykazali, iż u pacjentów z padaczką uogólnioną poziom Nucleob2/N1 w ślinie i osoczu jest podwyższony [6]. W związku tym istnieje potencjał zastosowania Nucleob2/N1 jako markera epizodów epileptycznych [153].

### 1.2.4.3 Inne właściwości biologiczne Nucleob2/N1

Jak wspomniano wcześniej N1 podana dokomorowo wpływa na zwiększenie ciśnienia tętniczego (**Rozdział 1.2.4.2**). Wydaje się, iż jest to skutkiem pobudzenia AUN z wykorzystaniem kaskady CFR-OXT-MC3/4R [128]. Podobny efekt N1 wykazuje po podaniu dootrzewnowym u gryzoni [154]. Podana tą drogą N1 aktywuje kaskady PI3K/PKB/mTOR oraz JAK2/STAT3 stymulując: ekspresję metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej 2 (MMP-2, ang. *matrix metalloproteinase 2*) i 9 (MMP-9); proliferację; migrację i zmianę fenotypu komórek miocytów naczyń krwionośnych [155,156]. Ponadto N1 bezpośrednio wpływa na akcję serca i to w sposób specyficzny dla danego gatunku (**Rys. 1.10**). Przykładowo, u szczurów N1 wpływa na zmniejszenie kurczliwości i zmniejszenie objętości wyrzutowej [102], podczas gdy u *C. auratus* zwiększa ona objętość wyrzutową [157]. Ponadto N1 wykazuje właściwości ochronne po uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym [102].

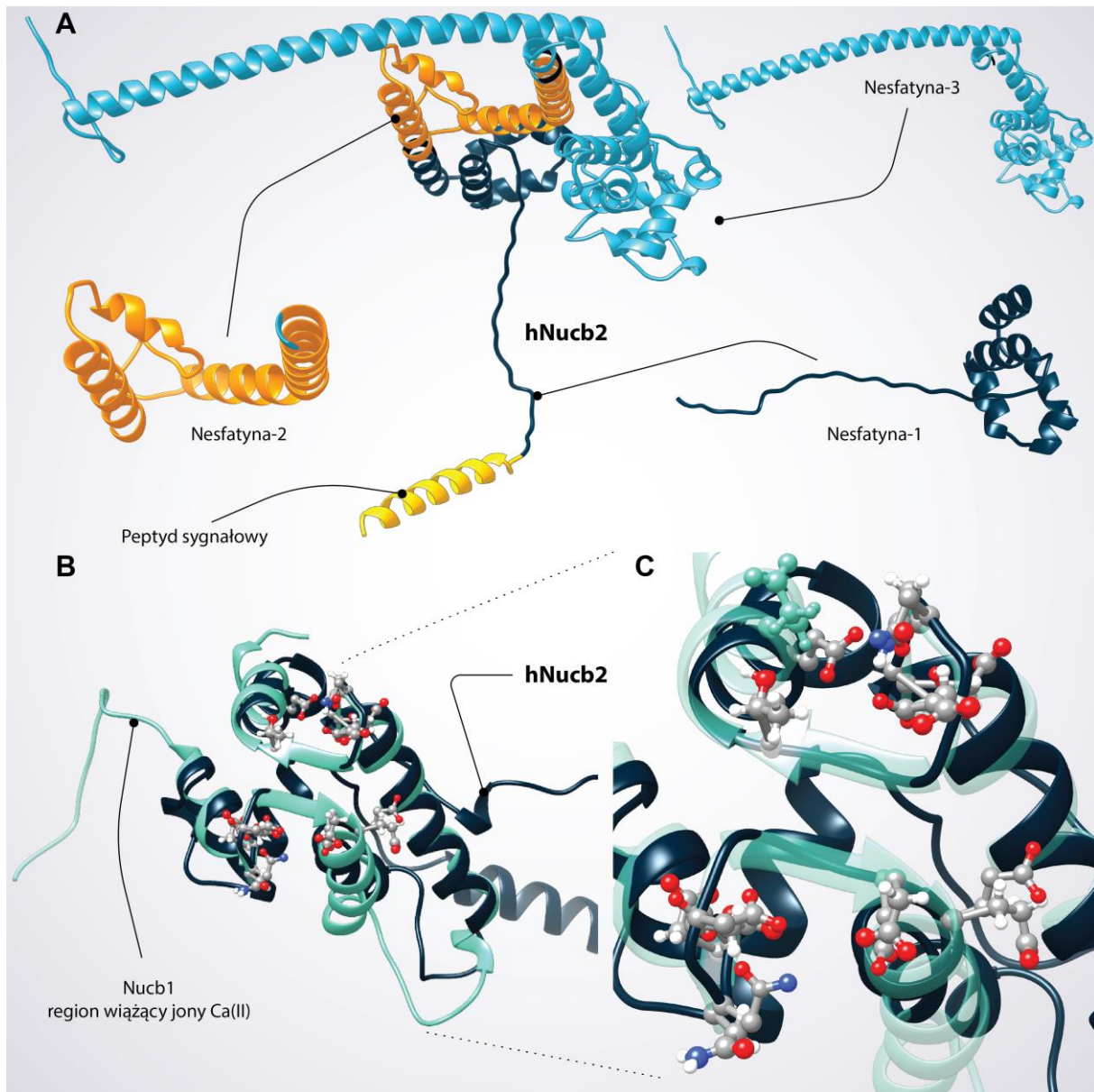
Nucleob2/N1 są ponadto zaangażowane w proces karcynogenezy, gdzie wpływają na jego tkankowo-specyficzne zaostrenie/złagodzenie (**Rys. 1.10**). Badania wykazały, iż Nucleob2/N1 pełnią kluczową rolę w progresji m.in. raka: nadnercza [158]; piersi [159]; jajników [160]; prostaty [161]; płuc [162]. Co więcej Nucleob2/N1 często spełniają rolę niezależnego markera progresji nowotworu, co przekłada się na potencjał ich wykorzystania w monitorowaniu i diagnozie [159,161,163]. Nucleob2/N1 promują progresję raka płuc [162], piersi [163], raka jelita [164]. Z drugiej strony wykazano proapoptotyczne działanie Nucleob2/N1 na komórki rakowe jajnika [160] oraz nadnerczy [158]. Bardziej wnikliwy opis wpływu Nucleob2/N1 na procesy neoplastyczne (które nie będą przedmiotem tego wprowadzenia) można znaleźć w: [165,166].

Nucleob2/N1 wydają się być również zaangażowane w procesy reprodukcyjne (**Rys. 1.10**). U samicy szczura Nucleob2/N1 są krytyczne dla dojrzewania płciowego [105]. Co więcej, dokomorowe podanie N1 wywołuje zwiększenie poziomu gonadotropin u pokwitających osobników, jednak nie u dorosłych [105]. Co ciekawe, u dorosłych samców dokomorowe podanie N1 w większej dawce wywołuje zwiększenie poziomu hormonu luteinizującego oraz folikulotropowego [167]. Uzasadniona wydaje się zatem być hipoteza o udziale Nucleob2/N1 w regulacji

aktywności osi podwzgórze-przysadka-gonady (HPG, ang. *hypothalamus-pituitary-gonads*) i produkcji gonadotropin.

#### 1.2.4.4 Budowa Nucb2/N1

Podobnie jak w przypadku Nucb1 (**Rozdział 1.2.3**), struktura krystaliczna Nucb2 i jej pochodnych pozostaje nieznana. W związku z tym w celu zgłębienia zależności pomiędzy ich strukturą i funkcją istotne znaczenie mają metody modelowania *in silico*. Niestety, w bazie



**Rys. 1.13** Model struktury krystalicznej Nucb2 wygenerowany przez AlphaFold

(A) Model hNucb2 [168] z zaznaczonym peptydem sygnałowym i nesfatynami. Dodatkowo oznaczono w panelu odpowiednie fragmenty nesfatyn pochodzące z modelu hNucb2. (B) Nałożenie struktury krystalicznej motywu EF hNucb1 [36] na strukturę modelu Nucb2. (C) Powiększenie na reszty wiążące jony Ca(II) z panelu (B). Dopasowanie modeli prowadzono metodą najmniejszych kwadratów względem reszt wiążących jony Ca(II). Modele wykonano w programie UCSF Chimera.

PDB brak jest białek o zadowalającym poziomie homologii i pokrycia sekwencji w stosunku do Nucb2/nesfatyn. W konsekwencji modelowanie struktury Nucb2/nesfatyn oparte o homologię jest wysoce utrudnione, przez co metody *ab initio* lub łączone stają się preferowane. Powstanie serwerów opartych o sieci neuronalne takich jak AlphaFold [168] niewątpliwie zrewolucjonizowało ten proces, poprzez generację modeli o wysokim podobieństwie do struktury natywnej [168,169]. Model hNucb2 otrzymany przez AlphaFold przedstawiono na **Rys. 1.13**. Koniec N modelu zawiera helikalny peptyd sygnałowy, po którym widoczna jest długa bardzo silnie wydłużona pętla będąca częścią hN1 (**Rys. 1.13A**). Przy końcu C hN1 obecna jest natomiast niewielka ilość helis. Część modelu zawierająca hN2 jest silnie helikalna i najbardziej globularna w stosunku do pozostałych fragmentów (**Rys. 1.13A**). Część modelu obejmująca hN3 również jest głównie helikalna, jednak przy końcu C obecna jest silnie wydłużona helisa. Zarówno koniec N jak i C modelu zawiera IDRs, co wykazano w ramach tej pracy, Skorupską i wsp. [41] oraz Bystranowską i wsp. [46]. Fragmenty modeli AlphaFold zawierające IDRs (tak jak w przypadku hNucb2) często cechują się niską ufnością [170]. W związku z powyższym otrzymany model niewątpliwie wymaga dalszego udoskonalania. Nałożenie regionów wiążących jony Ca(II) modelu hNucb2 oraz struktury krystalicznej fragmentu hNucb1 (**Rys. 1.13B**) wskazuje na dobre zachowanie tego motywu. RMSD po dopasowaniu łańcucha głównego reszt biorących udział w wiązaniu jonów Ca(II) (**Rys. 1.13C**) wynosi 1,4 Å. W dobrym stopniu zachowane jest zatem ułożenie helis i  $\beta$ -kartek tworzących motyw EF1 i EF2 pomiędzy paralogami. Najbardziej odmienne jest natomiast przestrzenne rozmieszczenie pętli.

### 1.2.4.5 Wiązanie dwuwartościowych jonów metali wpływa na strukturę Nucb2/N3

Początkowo, doniesienia literaturowe dotyczące Nucb2/N1 obejmowały głównie badania funkcjonalne [125,171]. Biofizyczne analizy hNucb2/N3 i gNucb2/N3 przeprowadzone przez Skorupską [41,60] oraz Bystranowską i wsp. [46] nad zależnością wpływu jonów metali dwuwartościowych na strukturę hNucb2 oraz gNucb2 wniosły istotny wkład w poznanie relacji pomiędzy strukturą a funkcją obu homologów. Wyniki tych badań zostaną przedstawione w tym rozdziale.

W powyższych pracach wykazano, iż udział  $\alpha$ -helis w strukturze drugorzędowej ludzkiej i kurzej apo-Nucb2 wynosi około 45%, przy czym istotny jest również udział IDRs i zwołów, których udział wynosił odpowiednio około 28% i 20–25%. Pomimo podobieństw w strukturze drugorzędowej formy apo- obu homologów wykazywały różnice w strukturze czwartorzędowej. W warunkach eksperymentów ultrawirowania analitycznego (AUC, ang. *analytical ultracentrifugation*) apo-hNucb2 ulegała sedymentacji w roztworze głównie w formie dimeru

Tab. 1.2 Parametry hydrodynamiczne ludzkich i kurzych homologów Nucb2 oraz N3

Odczynnik	Parametr	hNucb2	gNucb2	hN3	gN3
EDTA	f/f <sub>0</sub>	1,8	1,8	2,2–2,4	2,1–2,3
	R <sub>h</sub> [nm]	5,4 <sup>D</sup>	4,3 <sup>M</sup> –5,8 <sup>D</sup>	—	—
	R <sub>g</sub> [nm]	6,8 ± 0,2	6,6 ± 0,2	—	—
Ca(II)	f/f <sub>0</sub>	1,6	—	1,8–1,9	1,7–1,8
	R <sub>h</sub> [nm]	4,2 <sup>D</sup> –4,6 <sup>D</sup>	3,9 <sup>M</sup> –4,7 <sup>D</sup>	—	—
	R <sub>g</sub> [nm]	5,6 ± 0,1	6,0 ± 0,2	—	—
Zn(II)	f/f <sub>0</sub>	1,2–1,6	—	1,4–1,6	1,5–1,7
	R <sub>h</sub> [nm]	3,1 <sup>M</sup> –5,4 <sup>D</sup>	2,8 <sup>M</sup> –4,1 <sup>D</sup>	—	—
	R <sub>g</sub> [nm]	6,2 ± 0,1	5,5 ± 0,2	—	—
Mg(II)	f/f <sub>0</sub>	1,7–1,9	1,8	2,2	1,9
	R <sub>h</sub> [nm]	4,2 <sup>M</sup> –5,43 <sup>D</sup>	4,2 <sup>M</sup> –4,7 <sup>M</sup>	—	—
	R <sub>g</sub> [nm]	5,9 ± 0,2	6,0 ± 0,2	—	—

Oznaczenia: <sup>M</sup> – monomer; <sup>D</sup> – dimer. Dane hydrodynamiczne na podstawie [40,45,59].

podczas gdy apo-gNucb2 występowała w roztworze głównie w formie dwóch populacji monomerów pozostających w dynamicznej równowadze. Ponadto wartość współczynnika tarcia f/f<sub>0</sub> dla obu homologów oraz ich promienia hydrodynamicznego (R<sub>h</sub>) wskazuje na ich silnie wydłużony kształt (Tab. 1.2). Podobny wniosek nasuwa wartość promienia żyracji (R<sub>g</sub>) hNucb2 i gNucb2 (Tab. 1.2). Na podstawie wyników eksperymentów wymiany izotopowej proton/deuter sprzężonej ze spektrometrią mas (HDX-MS, ang. *hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*) wykazano ponadto mozaikową strukturę końca N hNucb2 oraz gNucb2, w której naprzemiennie występują regiony uporządkowane oraz IDRs (Rys. 1.14A). Dodatkowo, wykazano iż koniec C jest całkowicie nieuporządkowany w stanie apo [46].

Obecność jonów metali dwuwartościowych wpływa w znaczny sposób na strukturę i właściwości obu homologów. Związywanie jonów Ca(II) przez hNucb2 i gNucb2 skutkuje zwiększeniem zawartości  $\alpha$ -helis kosztem udziału IDRs w strukturze drugorzędowej. Jony Ca(II) promują ponadto dimeryzację gNucb2 (Rys. 1.14B). Równolegle dochodzi także do znacznego zwiększenia stopnia upakowania struktury hNucb2 i gNucb2, co objawia się zmniejszeniem wartości ich R<sub>h</sub> oraz R<sub>g</sub> (Tab. 1.2). Eksperymenty HDX-MS wskazywały na znaczną strukturyzację regionów zawierających motyw dłoni EF (reszty aminokwasowe 241–260 oraz 285–360) obu homologów przy jednocześnie niewielkich zmianach w profilach wymiany izotopowej na końcu N. W przypadku hNucb2 proces wiązania jonów Ca(II) przez dimer jest egzotermiczny i sterowany entalpowo w przypadku obu miejsc wiążących (Tab. 1.3). Wyznaczone K<sub>d</sub> wyniosły odpowiednio około 16,8  $\mu$ M i 19,8  $\mu$ M (Tab. 1.3). W przypadku hNucb2 oba miejsca wiążące Ca(II) są zatem równocenne. W przypadku gNucb2 proces wiązania jest

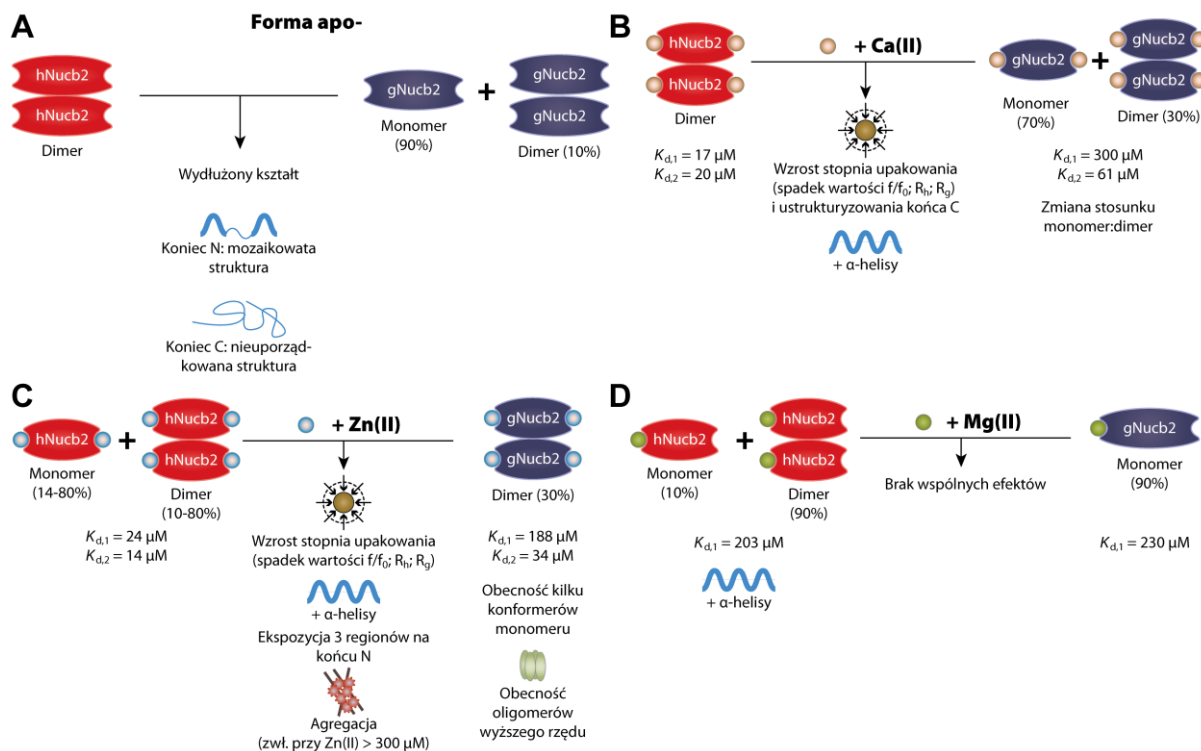
**Tab. 1.3** Termodynamiczne parametry wiązania jonów metali dwuwartościowych przez hNucb2 i gNucb2

Jon	Parametr	hNucb2	gNucb2
Ca(II)	$K_{d,1}$ ( $\mu\text{M}$ )	$16,8 \pm 0,2$	$302,8 \pm 0,9$
	$\Delta H_1$ (kcal/mol)	$-9,1 \pm 0,2$	$-1,7 \pm 0,1$
	$T\Delta S_1$ (kcal/mol)	-2,61	3,11
	$K_{d,2}$ ( $\mu\text{M}$ )	$19,8 \pm 0,2$	$60,6 \pm 0,4$
	$\Delta H_2$ (kcal/mol)	$-10,4 \pm 0,3$	$-9,6 \pm 0,8$
	$T\Delta S_2$ (kcal/mol)	-3,98	-3,85
Zn(II)	$K_{d,1}$ ( $\mu\text{M}$ )	$23,9 \pm 0,2$	$188 \pm 3$
	$\Delta H_1$ (kcal/mol)	$-11,0 \pm 0,3$	$-10 \pm 1$
	$T\Delta S_1$ (kcal/mol)	-6,04	-4,92
	$K_{d,2}$ ( $\mu\text{M}$ )	$14,3 \pm 0,7$	$34,38 \pm 1,87$
	$\Delta H_2$ (kcal/mol)	$-8,4 \pm 0,6$	$1,16 \pm 0,48$
	$T\Delta S_2$ (kcal/mol)	-1,76	7,25
Mg(II)	$K_{d,1}$ ( $\mu\text{M}$ )	$203,21 \pm 0,01$	$230 \pm 32$
	$\Delta H_1$ (kcal/mol)	$-0,85 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,11$
	$T\Delta S_1$ (kcal/mol)	4,19	5,05

Wyniki eksperymentów ITC pochodzą z [45].

również egzotermiczny jednak na początku miareczkowania układ znajduje się w dynamicznej równowadze monomer/dimer, co sprawia iż wiązanie Ca(II) przez gNucb2 jest procesem bardziej skomplikowanym termodynamicznie. Otrzymane  $K_d$  wyniosły około 303  $\mu\text{M}$  i 61  $\mu\text{M}$  (Tab. 1.3), co uwidacznia nierównocенność miejsc wiążących oraz znacząco odbiega od wartości otrzymanych dla homologu ludzkiego, wskazując na gatunkowe różnice w powinowactwie Nucb2 do jonów Ca(II) [41].

W obecności jonów Zn(II) oba homology wykazywały zależne od stężenia zwiększenie zawartości  $\alpha$ -helis (Rys. 1.14C). Przy stężeniu Zn(II) równym 300  $\mu\text{M}$  obserwowano natomiast silną destabilizację gNucb2, ale nie hNucb2. Dodatkowo jony Zn(II) silnie wpływały również na strukturę trzecio- i czwartorzędową obu homologów. W obecności Zn(II) podczas analizy danych AUC hNucb2 obserwowano: pojawienie się populacji mieszaniny monomerów; zmniejszenie  $R_h$ ; pojawienie się niewielkiej populacji agregatów (2–3%) oraz silny spadek wartości parametru  $f/f_0$  (Tab. 1.3). Ponadto wiązaniu Zn(II) towarzyszyło także zmniejszenie wartości  $R_g$  (Tab. 1.3). Wiązanie dwóch jonów Zn(II) przez cząsteczkę hNucb2 jest procesem egzotermicznym (Tab. 1.3). Wiązaniu jonów Zn(II) towarzyszyła również silna ekspozycja regionów obejmujących reszty aminokwasowe 33–55, 71–94 i 129–138 do rozpuszczalnika. Niemniej jednak na podstawie eksperymentów opartych o pomiar fluorescencji reszt Trp (Trp211, Trp312 – Rys. 1.3) pokazano, iż wiązanie Zn(II) wpływa na zwiększenie hydrofobowości



**Rys. 1.14** Wpływ jonów metali dwuwartościowych na hNucb2 i gNucb2

Właściwości hNucb2 i gNucb2 w (A) nieobecności oraz obecności jonów: (B) Ca(II); (C) Zn(II); (D) Mg(II).

otoczenia tych reszt. Niewykluczone, iż może dochodzić do kooperatywnego oddziaływania domen końca N oraz C tak jak w przypadku hNucb1 [56], ta hipoteza wymaga jednak dalszych badań. Analiza danych z AUC gNucb2 wykazała oligomeryzację białka indukowaną stężeniem jonów Zn(II), głównie w kierunku dimeru, choć obecne były również populacje oligomerów o wyższej masie cząsteczkowej. Przy stężeniu Zn(II) równym 300  $\mu\text{M}$  obserwowano silnie zaznaczoną obecność agregatów. Wiązaniu jonów Zn(II) towarzyszyło ponadto bardzo silne zmniejszenie  $R_h$  monomeru (Tab. 1.3). Jony Zn(II) wydają się zatem zwiększać różnorodność konformacyjną gNucb2 silniej w porównaniu do homologu ludzkiego. Ponadto ich wiązanie jest bardziej złożone z termodynamicznego punktu widzenia (w porównaniu do hNucb2) i przebiega na drodze egzo- i endotermicznej (Tab. 1.3) [46].

Jony Mg(II) wpływają na zwiększenie udziału  $\alpha$ -helis w strukturze drugorzędowej hNucb2 (Rys. 1.14D), lecz nie gNucb2 dla której nie obserwowano zmian w widmie CD w obecności jonów Mg(II). Dla obu homologów nie obserwowano również zmian w widmach emisji reszt Trp. Co ciekawe, obserwowano jednak subtelne zmiany w dystrybucji sedymentujących cząstek podczas AUC. Największe dotyczyły hNucb2, gdzie podobnie jak w przypadku obecności jonów Zn(II) obserwowano pojawienie się niewielkiej populacji monomeru i związane z tym nieznaczne zmniejszenie wartości współczynnika  $f/f_0$  (Tab. 1.3). Z kolei

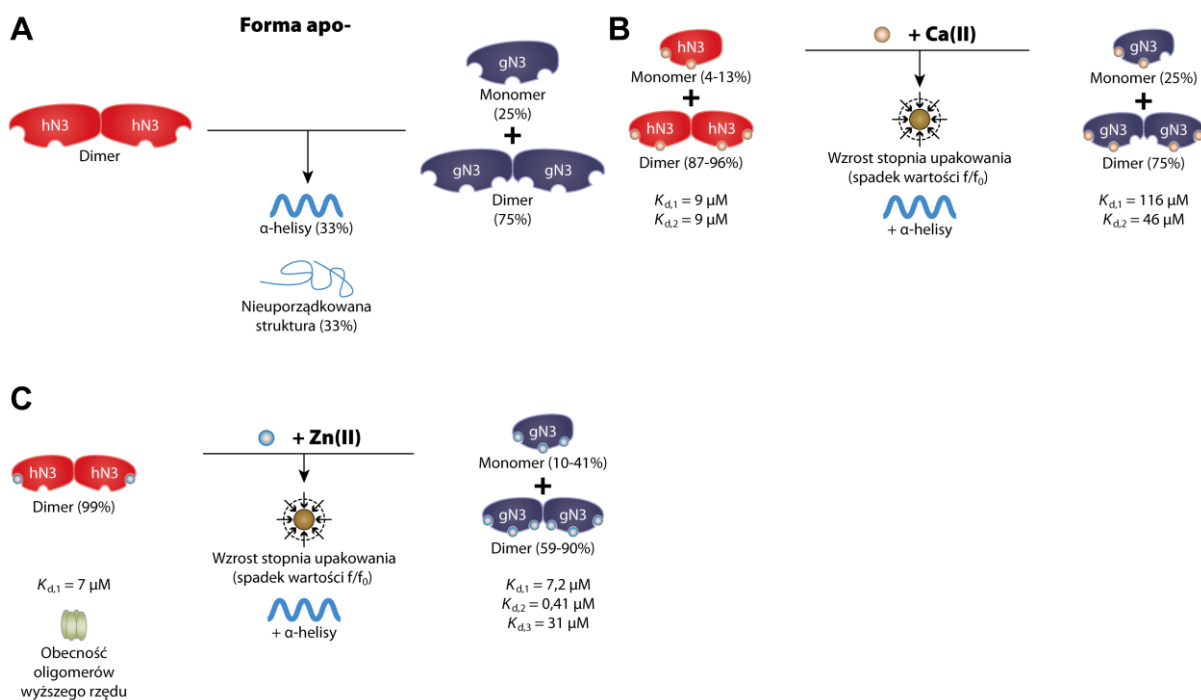
w przypadku gNucb2 obserwowano natomiast zmiany w równowadze konformacyjnej monomerów oraz pojawienie się niewielkiej ilości oligomerów wyższego rzędu (7%; MW 139–145 kDa). Eksperymenty HDX-MS wskazywały na nieznaczne zwiększenie szybkości wymiany na końcu N obu homologów (reszty aminokwasowe 33–49, 71–94 oraz 129–138). Dla obu homologów wykazano ponadto zmniejszenie ich  $R_g$  (**Tab. 1.3**). Stechiometria wiązania jonów Mg(II) wyniosła 1:1. Wyznaczone  $K_d$  wyniosły około 200  $\mu\text{M}$  dla obu homologów (**Tab. 1.3**), co w odniesieniu do komórkowego stężenia Mg(II), będącego w zakresie 0,5–1 mM [172], można uznać za dość wysokie powinowactwo [46].

Analiza molekularna izolowanych fragmentów ludzkich i kurzych homologów N3 wykazała, iż podczas nieobecności jonów metali dwuwartościowych istotną część ich struktury drugorzędowej stanowią  $\alpha$ -helisy oraz IDRs (około 33% każda; **Rys. 1.15A**). Apo-hN3 istnieje w roztworze jako obligatoryjny dimer, podobnie jak białko pełnej długości. Z drugiej strony cząsteczki apo-gN3 podczas AUC funkcjonują w roztworze zarówno w formie dimeru (około 75%) jak i monomeru (około 25%) pozostających w dynamicznej równowadze. Izolowana gN3 cechuje się wobec tego większą tendencją do oligomeryzacji w porównaniu do gNucb2. Eksperymenty z wykorzystaniem fluorescencji reszt Trp wykazały, iż reszty te są silnie ekspozowane do rozpuszczalnika [60].

W obecności jonów Ca(II) ponownie obserwowano silne zmiany w strukturze obu paralogów N3. Jony te indukowały silne, zależne od stężenia zwiększenie zawartości  $\alpha$ -helis, które jednocześnie było najbardziej widoczne dla hN3. Podczas wiązania jonów Ca(II) obserwowano zwiększenie intensywności fluorescencji reszt Trp dla obu homologów, lecz nie przesunięcia położenia maksimum ich emisji, wskazując pozostającą ekspozycję tych reszt aminokwasowych do rozpuszczalnika. Jony Ca(II) wpłynęły również na pojawienie się niewielkiej populacji monomeru (4–13%) podczas AUC hN3, podobnie jak w przypadku hNucb2. Ponadto, pod ich wpływem obserwowano również zwiększenie stopnia upakowania obu homologów N3. Proces wiązania jonów Ca(II) jest egzotermiczny w przypadku obu homologów. Przy czym w przypadku hN3 wiązanie dwóch jonów Ca(II) następuje do dwóch równocennych miejsc o  $K_d$  równych 9  $\mu\text{M}$ . Natomiast w przypadku gN3 wiązanie dwóch jonów ma miejsce do nierównocennych miejsc o  $K_d$  równych 116  $\mu\text{M}$  i 46  $\mu\text{M}$ .



Co zaskakujące, w przeciwieństwie do białka pełnej długości, oba izolowane homologi N3 były zdolne do wiązania jonów Zn(II). Proteolityczne procesowanie Nucb2 i w konsekwencji aktywacja miejsc wiążących Zn(II) obecnych w N3 może mieć zatem istotny wpływ na funkcjonowanie tego fragmentu *in vivo*. W obecności Zn(II) obserwowano największy wzrost udziału  $\alpha$ -helis w strukturze drugorzędowej obu paralogów. Ponadto, przy stężeniu Zn(II) powyżej 400  $\mu\text{M}$  obserwowano zmniejszenie intensywności sygnału CD bez widocznej precypitacji obu białek. Niemniej jednak zmiany w proporcji maksimum ujemnych przy 208 i 222 nm mogą sugerować dalsze zmiany konformacyjne. Co więcej, hipsochromowe przesunięcie maksimum emisji fluorescencji reszt Trp hN3 oraz gN3 wraz ze zwiększeniem ich intensywności zależnym od stężenia Zn(II) wskazuje na znaczną zmianę struktury trzeciorzędowej obu białek w mikrootoczeniu powyższych reszt. Zmiany te widoczne były również dla obu homologów podczas AUC jako wzrost wartości współczynnika sedymentacji przy jednoczesnym spadku  $f/f_0$  (Tab. 1.3), sugerując wzrost upakowania cząstek. Co ciekawe, wiązanie jonów Zn(II) przez oba homologi jest termodynamiczne bardzo odmienne. W przypadku hN3 proces wiązania jonów Zn(II) jest początkowo egzotermiczny, jednak po przekroczeniu stosunku hN3:Zn(II) 1:1 dominuje proces endotermiczny. Wiązanie jednego jonu Zn(II) na cząsteczkę hN3 jest sterowane entalpowo a  $K_d$  równa jest 7  $\mu\text{M}$ . Wiązaniu jonów Zn(II) przez gN3 nie towarzyszyły



**Rys. 1.15** Wpływ jonów metali dwuwartościowych na hN3 oraz gN3

Właściwości hNucb2 i gNucb2 w (A) nieobecności oraz obecności jonów: (B) Ca(II); (C) Zn(II).

efekty endotermiczne, ale cechowało się ono znacznie większą złożonością w porównaniu do hN3. W pierwszej kolejności obsadzone wydaje się być miejsce o  $K_{d,1}$  równej 7,2 nM. Następnie jon Zn(II) jest wiązany przez pozostałe dwa miejsca wiążące o  $K_{d,2}$  i  $K_{d,3}$  równych odpowiednio 0,42  $\mu$ M i 31  $\mu$ M.

Różnice w sposobie wiązania jonów metali dwuwartościowych przez ludzkie i kurcze homologi Nucb2/N3 silnie wskazują na potencjalne gatunkowo-specyficzne różnice w ich efekcie. Niemniej jednak czasoprzestrzenna modulacja struktury Nucb2 i nesfatyn przez fluktuacje jonów metali dwuwartościowych w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne może być kluczowym elementem regulującym ich szeroką gamę aktywności biologicznej.

## 2.

## Cel pracy

Celem pracy była próba przeprowadzenia charakterystyki molekularnej ludzkiej i kurzej N1, N2, N1/2 oraz określenie wpływu potencjalnych ligandów – jonów metali dwuwartościowych na powyższą zależność. Zrozumienie różnic strukturalnych pomiędzy białkiem pełnej długości, N1, N2 oraz hipotetycznym produktem pośrednim procesowania Nucb2 – N1/2 może mieć kluczowe znaczenie dla poznania mechanizmu plejotropowego działania Nucb2/N1 opisanego w zarysie w **Rozdziale 1** oraz wskazania funkcji i znaczenia biologicznego N2 i/lub N1/2. Realizacja powyższych badań była szczególnie istotna, ze względu iż w momencie ich rozpoczęcia większość doniesień literaturowych dotyczących badań nad właściwościami Nucb2/N1 miała charakter wyłącznie funkcjonalny.

W związku z powyższym cele szczegółowe badań obejmowały:

- ❖ Otrzymanie konstruktów DNA umożliwiających wydajną ekspresję ludzkiej i kurzej nesfatyny-1, -2, -1/2
- ❖ Opracowanie i optymalizację protokołów oczyszczania powyższych białek w bakteryjnym systemie ekspresyjnym
- ❖ Analizę struktury drugorzędowej przy pomocy spektroskopii CD w (nie)obecności jonów metali oraz stabilności temperaturowej białek
- ❖ Analizę struktury trzecio- i/lub czwartorzędowej oraz określenie parametrów hydrodynamicznych nesfatyn w (nie)obecności jonów metali przy pomocy SV-AUC
- ❖ Wyznaczenie stałych dysocjacji kompleksu dla wiązanych jonów metodami spektrofotometrycznymi oraz kalorymetrycznymi
- ❖ Analizę stopnia ekspozycji regionów hydrofobowych białek w (nie)obecności jonów przy pomocy sondy ANS
- ❖ Analizę zdolności wiązania tioflawiny T – sondy specyficznej wobec fibryli amyloidowych – przez nesfatyny w (nie)obecności jonów metali
- ❖ Analizę profili wymiany izotopowej H/D łańcucha głównego ludzkiej i kurzej N1 oraz N1/2 w (nie)obecności jonów metali



# 3.

## Materiały i metody



### 3.1 MATERIAŁY

#### 3.1.1 Odczynniki

Wszystkie odczynniki podane w **Tab. 3.1** wykorzystane w toku badań cechowały się stopniem czystości cz.d.a. lub większym. Wszystkie buforory sporządzone zostały z wykorzystaniem wody ultraczystej Milli-Q-Plus (Millipore).

**Tab. 3.1** Wykaz odczynników używanych w pracy

Odczynnik	Producent
Agar	Invitrogen
Agaroza	ROTH
Akryloamid Mix	ROTH
Błękit bromofenolowy	ROTH
Chloramfenikol	Sigma
Chlorek cynku (ZnCl <sub>2</sub> )	Sigma
Chlorek magnezu (MgCl <sub>2</sub> )	Merck
Chlorek sodu (NaCl)	Merck
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	POCH S.A.
DNaza I	Sigma
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	ROTH
EDTA	ROTH
Endonukleaza restrykcyjna BamHI	Thermo Scientific
Endonukleaza restrykcyjna HindIII	Thermo Scientific
Etanol (96%)	POCH
Glicerol	ROTH
Glicyna	ROTH
Imidazol	Sigma
Izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	ROTH
Karbenicylina	ROTH
Kwas 2-(N-morfolino)-etanosulfonowy (MES)	Sigma

Odczynnik	Producent
Kwas borowy (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	ROTH
Kwas octowy (CH <sub>3</sub> COOH)	Chempur
Kwas solny (HCl)	Stanlab
Ligaza T4	Thermo Scientific
Luria Broth Base	Invitrogen
Metanol (CH <sub>3</sub> OH)	POCH S. A.
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma
Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Sigma
Polimeraza Phusion® High-Fidelity	Thermo Scientific
Proteaza ludzkiego rinowirusa 3C (HRV3C)	Sino Biological
Przeciwciała Anty-His	Clontech
Przeciwciała HAMPO	Vector Laboratories
RNaza A	Sigma
TEMED	Sigma
Terrific Broth (TB)	Merck
Tris(hydroksymetylo)aminometan (Tris)	ROTH
Trypsyna	Sigma
Wodorofosforan sodu (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O)	ROTH
Wodorotlenek sodu (NaOH)	POCH S. A.
β-merkaptoetanol	ROTH
PCR Mix Plus (2×)	A&A Biotechnology
DNA Gel Loading Dye (6×)	Roth
Simply Safe™	Eurx Ltd.
Tween-20	Sigma
Kwas 8-anilino-1-naftalenosulfonowy (ANS)	Sigma
Zincon	Sigma

### 3.1.2 Oligonukleotydy i plazmidy

#### 3.1.2.1 Oligonukleotydy

Wykorzystywane oligonukleotydy zostały zakupione w firmie Genomed S.A. (Polska). Wszystkie zostały oczyszczone przez producenta za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) a następnie poddane ocenie jakości za pomocą spektrometrii mas. **Tab. 3.2** przedstawia oligonukleotydy użyte do przygotowania białek hN1 (N1\_F, hN1\_R), hN2 (hN2\_F, N2\_R), hN1/2 (N1\_F, N2\_R), gN1 (N1\_F, gN1\_R), gN2 (gN2\_F, N2\_R) oraz gN1/2 (N1\_F, N2\_R). Do przeprowadzenia kolonijnego PCR wykorzystano następujące oligonukleotydy: pQE-80L\_F oraz pQE-80L\_R.

**Tab. 3.2** Oligonukleotydy wykorzystywane podczas realizacji badań.

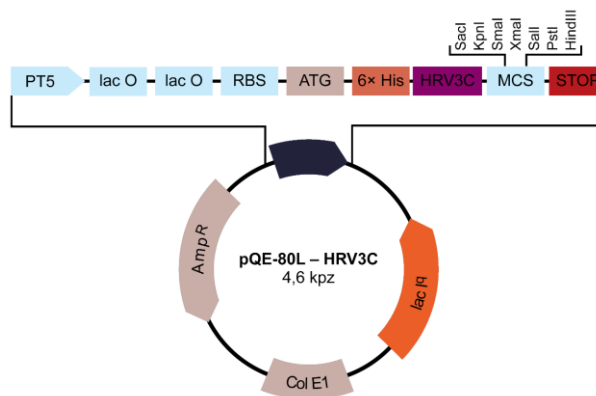
Oligonukleotydy	Sekwencja	Zastosowanie
N1_F	GCGCGAGCT <sup>▼</sup> CGTGCCGATTGATATCGATAAA	PCR
hN1_R	GCGCA <sup>▼</sup> AGCTTCTACAGTTCATCCAGTTTGGTAC	PCR

gN1_R	GCGCA <sup>▼</sup> AGCTTCTACAGTTCATCCAGACGGGTA	PCR
hN2_F	GCGCGAGCT <sup>▼</sup> CCAAGAAGTTGGTCGTCTGC	PCR
gN2_F	GCGCGAGCT <sup>▼</sup> CCAAGAAGTTCACGTCTGC	PCR
N2_R	GCGCA <sup>▼</sup> AGCTTCTACTCGTGTCTTTTCATCATTTT	PCR
pQE-80L_F	CGGATAACAATTTACACAG	PCR kolonijny
pQE-80L_R	GTTCTGAGGTCATTACTGG	PCR kolonijny

Kolorem niebieskim oznaczono miejsca restrykcyjne SacI (GAGCTC) oraz HindIII (GAGCTC). Dodatkowo symbolem ▼ zaznaczono miejsce cięcia. Kolorem czerwonym oznaczono kodon terminacyjny. Kolorem czarnym zaznaczono sekwencję komplementarną do cDNA nesfatyn.

### 3.1.2.2 Plazmidy

Plazmid pQE-80L-HRV3C oraz ten sam plazmid zawierający dodatkowo cDNA hNucb2 oraz gNucb2 uzyskano dzięki uprzejmości dr inż. Dominiki Bystranowskiej oraz mgr inż. Anny Skorupskiej. Plazmid pQE-80L-HRV3C jest zmodyfikowaną wersją wektora pQE-80L (Qiagen), który został otrzymany w naszym laboratorium przez mgr inż. Annę Skorupską. Modyfikacja pozwoliła na wprowadzenie w ramce odczytu (tuż przed sekwencją białka) miejsca rozpoznawanego przez proteazę ludzkiego rinowirusa 3C (HRV3C, ang. *human rhinovirus 3C*). Wektor pQE-80L-HRV3C, którego mapa została przedstawiona na **Rys. 3.1**, umożliwia ekspresję białka docelowego pod kontrolą promotora faga T5. Dodatkowo obecne są geny: zduplikowanego operonu laktozowego (*lacO*) oraz jego represora (*lacI*) pozwalające na wydajną kontrolę ekspresji.



**Rys. 3.1** Mapa wektora pQE-80L-HRV3C

Schemat przedstawia budowę wektora użytego do ekspresji ludzkich i kurzych homologów nesfatyn. Wyjaśnienie poszczególnych skrótów: PT5 – promotor faga T5; lacO – gen kodujący element operatorowy operonu laktozowego; RBS – miejsce wiązania rybosomów; ATG – kodon START; 6× His – znacznik histydylowy; HRV3C – miejsce rozpoznawane przez proteazę HRV3C; MCS – miejsce wielokrotnego klonowania z podanymi miejscami restrykcyjnymi; STOP – miejsce zawierające kodony STOP zatrzymujące translację ze wszystkich ramek odczytu; lac I<sup>a</sup> – gen kodujący represor operonu laktozowego; Col E1 – miejsce startu replikacji; Amp<sup>R</sup> – gen oporności na antybiotyki β-laktamowe.

Wektor pQE-80L-HRV3C został wykorzystany również jako wektor ekspresyjny. W tym celu wprowadzono do niego cDNA ludzkich (hN1, hN2, hN1/2) i kurzych (gN1, gN2, gN1/2) homologów nesfatyn z użyciem miejsc restrykcyjnych SacI oraz HindIII. W ten sposób

sekwencje otrzymywanych białek (**Załącznik**) zawierały na końcu aminowym metkę 6-histydylową oraz miejsce rozpoznawane przez proteazę HRV3C. Łącznie 25 reszt aminokwasowych pochodziło z wektora. Po odcięciu znacznika były to 4 reszty aminokwasowe.

### 3.1.3 Szczepy bakteryjne

W trakcie prowadzonych badań wykorzystano szczepy bakteryjne *E. coli* podane w **Tab. 3.3**.

**Tab. 3.3** Szczepy bakteryjne

Szczep	Genotyp	Producent
OneShot™ TOP10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Thermo Scientific
BI21 (DE3) pLysS	<i>E. coli</i> F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (CamR)	Novagen

### 3.1.4 Bufory, roztwory i podłoża hodowlane

Wszystkie roztwory i bufory zostały przygotowane według zaleceń producenta i miareczkowane w temperaturze pokojowej do uzyskania zadanego pH a następnie filtrowane na sączku 0,22 μm (Millipore). Bufory używane podczas chromatografii wykluczania poddane były dodatkowo odgazowaniu.

#### 3.1.4.1 Bufory do pracy z DNA

##### **Bufor TBE (10×)**

Tris-HCl	890 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	890 mM
EDTA	20 mM
pH	8,3

#### 3.1.4.2 Odczynniki do elektroforezy w żelu agarozowym

##### **Żel agarozowy (2%)**

Agaroza	1 g
Bufor TBE (1×)	100 ml
Simply Safe™	5 μl

##### **Bufor 6× obciążający do próbek (6× LD)**

Tris – HCl	10 mM
Ksylenocjanol FF	0,03% (w/v)
Błękit bromofenolowy	0,03% (w/v)
EDTA	60 mM

Glicerol 60% (v/v)

#### 3.1.4.3 Podłoża mikrobiologiczne i antybiotyki

##### **Podłoże płynne LB (Invitrogen)**

Ekstrakt drożdżowy	10,0 g/l
Hydrolizat kazeinowy	5,0 g/l
NaCl	10,0 g/l

##### **Podłoże płynne TB (Merck)**

Trypton	12,0 g/l
Ekstrakt drożdżowy	24,0 g/l
Glicerol	5,0 g/
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O	2,3 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12,5 g/l

##### **Antybiotyki**

Karbenicylina (R)	100 mg/ml
Chloramfenikol (C)	70 mg/ml
Roztwory antybiotyków dodawano do podłoży stałych i płynnych w objętości	



potrzebnej do osiągnięcia stężenia końcowego 50 µg/ml oraz 35 µg/ml dla odpowiednio R i C. Do podłoża stałego agar-LB antybiotyki dodawano po autoklawowaniu i ostudzeniu podłoża do 50 °C a następnie wlewano na szalki Petriego (Ø 90 mm)

#### 3.1.4.4 Bufory i roztwory do preparacji nesfaryn

##### **Bufor A**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
pH	7,0

##### **Bufor B**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
Imidazol	200 mM
NaCl	300 mM
pH	7,0

##### **Bufor C**

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
pH	7,5

#### 3.1.4.5 Roztwory i bufory do elektroforezy w żelu poliakryloamidowym

Rozdział elektroforetyczny prowadzono według Lammliego [173]. Skład żeli poliakryloamidowych przedstawiono w **Tab.**

**3.4.** Całkowite stężenie monomeru (T) oraz monomeru sieciującego (C) liczono według poniższych wzorów:

$$T [\%] = \frac{m_A + m_B}{V_{\text{tot}}} \cdot 100\% \quad 3.1$$

$$C [\%] = \frac{m_B}{m_A + m_B} \cdot 100\% \quad 3.2$$

gdzie:

$m_A$  – masa akryloamidu

$m_B$  – masa bisakryloamidu

$V_{\text{tot}}$  – objętość całkowita

Żele z liniowym gradientem poliakryloamidu w żelu rozdzielającym o składzie zamieszczonym w **Tab. 3.4** przygotowywano według protokołu Millera i wsp. [174].

##### **Bufor do SDS-PAGE (10×)**

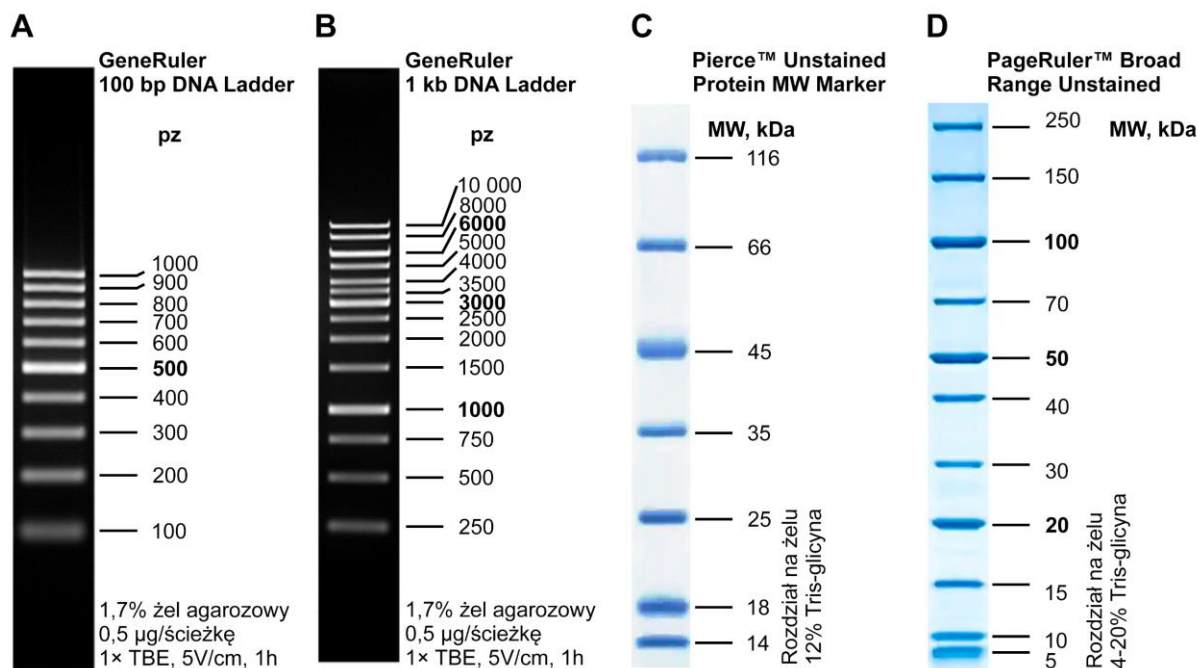
Tris-HCl	250 mM
Glicyna	1,92 M
SDS	0,1% (w/v)
pH	6,8

##### **Bufor obciążający (4×)**

Tris-HCl	250 mM
SDS	8% (w/v)
Glicerol	40% (v/v)
Błękit bromofenolowy	0,01% (w/v)
β-merkaptioetanol	20% (w/v)

**Tab. 3.4** Skład żeli akryloamidowych

Roztwór	Żel rozdzielający (8%/12%/15%/20% T; 2,67% C)	Żel zagęszczający (4% T; 2,67% C)
Mix akryloamid	0,27%/0,4%/0,5%/0,67% (v/v)	0,133% (v/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	—	0,125 M
Tris-HCl (pH 8,8)	0,375 M	—
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
APS	0,05% (w/v)	0,05% (w/v)
TEMED	1% (v/v)	1% (v/v)



**Rys. 3.2** Standardy DNA i białkowe

Rozdział standardów DNA (A) GeneRuler 100 bp; (B) GeneRuler 1 kb; (C) Pierce™ Unstained Protein MW Marker; (D) PageRuler™ Broad Range Unstained według producenta. Rysunek wykonano modyfikując dokumentację producenta.

$\beta$ -merkaptoetanol był dodawany bezpośrednio przed użyciem.

NaCl 750 mM  
pH 7,5

#### Roztwór do barwienia żeli

Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% (w/v)  
Metanol 40% (v/v)  
Kwas octowy 10% (v/v)

#### Roztwór do barwienia Ponceau

Barwnik Ponceau S 0,1 % (w/v)  
Kwas octowy 5% (v/v)

#### Roztwór do odbarwiania żeli

Metanol 40% (v/v)  
Kwas octowy 10% (v/v)

#### Roztwór mleka (1%)

Mleko w proszku 1 g  
Bufor TN (1×) 100 ml

#### **3.1.4.6** Roztwory i bufor do Western-blot

##### Bufor do transferu (10×)

Tris-HCl 50 mM  
Glicyna 380 mM  
pH 8,3

#### Przeciwciała pierwszorzędowe

6×His Monoclonal Antibody (Clontech). Myśie przeciwciała monoklonalne IgG2a. Skierowane przeciwko znacznikowi 6× histydylowemu. Stężenie 0,5 mg/ml. Rozcieńczane przed użyciem 10 000× roztworem mleka z dodatkiem 0,1% Tween-20.

##### Bufor TN (10×)

Tris-HCl 50 mM

#### Przeciwciała drugorzędowe

Peroxidase Anti-Mouse IgG (Vector Laboratories). Końskie przeciwciała IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową. Specyficzne wobec mysich przeciwciał IgG. Stężenie 1 mg/ml. Rozcieńczane przed użyciem 10 000× roztworem mleka z dodatkiem 0,1% Tween-20.

#### **Substrat peroksydazy**

Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

#### ***3.1.4.7 Standardy DNA i białkowe***

W celu estymacji długości fragmentów DNA wykorzystano następujące standardy białkowe: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) oraz GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Rozdział powyższych standardów przedstawiono na **Rys. 3.2**.

Standardy białkowe użyte do określenia przybliżonej masy białek w żelu poliakryloamidowym: Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific) oraz PageRuler™ Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific). Rozdział powyższych standardów według producenta przedstawiono na **Rys. 3.2**. Dodatkowo stosowano standard białkowy PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

#### ***3.1.4.8 Roztwory i bufony do wymiany izotopowej proton-deuter***

#### **Woda deuterowa**

Tlenek deuteru (D<sub>2</sub>O). Roth. Zawartość deuteru 99,9%

#### **Chlorek deuteru**

Chlorek deuteru (DCl; 38%) w D<sub>2</sub>O. Roth. Zawartość deuteru 99,5%.

#### **Bufor C1**

Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
pH/pD*	7,0

\* dla buforu przygotowanego na bazie D<sub>2</sub>O i miareczkowanego DCl.

#### **Bufor STOP**

Glicyna	2 M
pH	2,5



## 3.2 METODY

### 3.2.1 Techniki pracy z DNA

Podczas realizacji projektu stosowano standardowe techniki pracy z DNA opisane w literaturze oraz używano protokołów dostarczonych przez producentów odczynników zgodnie z **Tab. 3.5**.

**Tab. 3.5** Wykaz metod standardowych stosowanych podczas realizacji badań

Eksperyment	Metoda
Amplifikacja cDNA nesfatyn metodą PCR	[175] oraz zgodnie z protokołem producenta odczynników
PCR kolonijny	[175]
Trawienie restrykcyjne, ligacja i defosforylacja	[175] oraz zgodnie z protokołem producenta odczynników
Przygotowanie i transformacja komórek kompetentnych	[175]
Izolacja DNA z żelu agarozowego	Zestaw Gel-out (A&A Biotechnology)
Oczyszczanie DNA	Zestaw Clean-up (A&A Biotechnology)
Izolacja plazmidowego DNA	Zestaw Nucleobond® PC100 (Macherey-Nagel)
Wyznaczenie stężenia i czystości DNA (pomiar A280 i A260)	[175]

### 3.2.2 Preparacja konstruktów cDNA

Amplifikację cDNA ludzkich (hN1, hN2, hN1/2) i kurzych (gN1, gN2, gN1/2) homologów nesfatyn prowadzono metodą PCR. W tym celu wykorzystane zostały odpowiednie pary starterów podane w **Rozdziale 3.1.2.1** oraz wektor pQE-80L-HRV3C zawierający cDNA białek pełnej długości (**Rozdział 3.1.2.2**) jako matryca. Startery przednie wprowadzały miejsce

**Tab. 3.6** Program PCR dla amplifikacji ludzkich nesfatyn

Krok	Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykli
Wstępna denaturacja	98,0	30,0	1
Denaturacja	98,0	10,0	
Hybrydyzacja starterów	56,0	20,0	30
Elongacja	72,0	5,0*/8,0**	
Zakończenie	72,0	180,0	1
	4,0	∞	

\* – czas elongacji dla homologów N1; \*\* – czas elongacji dla homologów N1/2.

Tab. 3.7 Warunki kolonijnej PCR

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Cykli
Wstępna denaturacja	95	300	1
Denaturacja	95	30	
Hybrydyzacja starterów	59	30	29
Elongacja	72	60	
Zakończenie	72	240	1
	12	∞	

rozpoznawane przez endonukleazę restrykcyjną *SacI* a wsteczne przez *HindIII* oraz dodatkowo kodon stop. PCR prowadzono w objętości 50  $\mu$ l buforu dla polimerazy Phusion™, w obecności 0,5  $\mu$ M starterów, 1 mM każdego z dNTP, 5 ng matrycowego DNA. PCR prowadzono w termocyklerze C1000 (BioRad). Po wstępnej denaturacji do reakcji dodawano polimerazę i prowadzono PCR według warunków przedstawionych w **Tab. 3.6**. Produkty PCR oczyszczano za pomocą zestawu Clean-up i analizowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym (**Tab. 3.5**). Następnie inserty poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi *SacI* oraz *HindIII* (37 °C; 3 h; 300 obr./min) i ponownie oczyszczano insert przy pomocy zestawu Clean-up (**Tab. 3.5**).

Otrzymane fragmenty zawierające cDNA nesfatyn ligowano (**Tab. 3.5**) ze zlinearyzowanym wektorem pQE-80L-HRV3C (**Rozdział 3.1.2.2**), trawionym uprzednio tymi samymi endonukleazami restrykcyjnymi oraz posiadającym defosforylowane końce. Podczas ligacji zastosowano trzykrotny nadmiar molowy insertu nad wektorem.

Mieszaniną po ligacji transformowano (**Tab. 3.5**) komórki kompetentne *E. coli* OneShot™ TOP10 (**Tab. 3.3**). Komórki następnie wysiewano na szalki Petriego z podłożem agar-LB (wzbogaconym o karbenicylinę, R; **Rozdział 3.1.4.3**) i inkubowano przez 12 h w 37 °C. Po tym czasie końcówką do pipety pobierano wybrane klony, przenoszono na płytkę z repliką i tą samą końcówką umieszczano w 15  $\mu$ l wody milliQ i inkubowano (95 °C; 300 obr./min; 3 min). Tak przygotowaną matrycę wykorzystano do kolonijnej PCR (**Tab. 3.5**). W tym celu do 12,5  $\mu$ l PCR Mix Plus (**Tab. 3.1**) dodawano 10,5  $\mu$ l matrycowego DNA oraz po 1  $\mu$ M odpowiedniej pary starterów (**Tab. 3.2**). Reakcję prowadzono według warunków zamieszczonych w **Tab. 3.7**. Otrzymane produkty poddawano elektroforezie w żelu agarozowym, co umożliwiło identyfikację klonów zawierających pożądane cDNA. Następnie wybranymi klonami zaszczepiono 100 ml podłoża płynnego LB(R) (**Rozdział 3.1.4.3**) i z powyższej hodowli izolowano plazmidowe DNA przy użyciu zestawu NucleoBond® PC 100 według protokołu producenta (**Tab. 3.5**). Zgodność sekwencji otrzymanych konstruktów DNA została potwierdzona przez sekwencjonowanie metodą Sangera (Genomed, Polska).

### 3.2.3 Ekspresja i oczyszczanie nesfatyn

---

#### 3.2.3.1 Ekspresja nesfatyn

W celu nadekspresji nesfatyn wykorzystano komórki kompetentne szczepu *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (**Tab. 3.3**). Powyższe komórki transformowano otrzymanymi wcześniej konstrukcjami, zawierającymi cDNA nesfatyn (**Rozdział 3.2.2**) w ilości 2 ng. Komórki po transformacji wysiewano na szalki Petriego ( $\emptyset$  90 mm) z podłożem stałym wzbogaconym o R i chloramfenikol (C) – agar-LB(R+C) (**Rozdział 3.1.4.3**) a następnie inkubowano (37 °C, 12 h). Po zakończeniu inkubacji wybierano pojedynczą kolonię i zaszczipiano nią pożywkę płynną TB(R+C) o objętości 500 ml. Tak przygotowaną hodowlę wstępną prowadzono w inkubatorze Multitron Pro (INFORS HT; 37 °C, 200 obr./min, 8 h). Następnie hodowlą wstępną zaszczipiano hodowlę właściwą o objętości 0,5 l tak by stanowiła ona 6% (v/v) objętości całkowitej. Hodowlę właściwą inkubowano (29 °C, 200 obr./min) do momentu osiągnięcia gęstości optycznej przy długości fali 600 nm (OD600) równej 0,7–0,8. Wówczas do hodowli właściwej dodawano IPTG w stężeniu końcowym wynoszącym 0,25 mM, po czym kontynuowano hodowlę przez kolejne 3 h. Po tym czasie zawiesinę komórek bakteryjnych odwirowano w wirówce Beckman Coulter Avanti J30I (4 °C, 5500  $\times$ g, 8 min). Otrzymany osad z 1 l hodowli zawieszano w 12 ml buforu A (**Rozdział 3.1.4.4**), po czym otrzymane zawiesiny z 6,5 l hodowli łączono, porcjowano po 35 ml i przechowywano w -80 °C.

#### 3.2.3.2 Oczyszczanie nesfatyn

Zarówno kurze jak i ludzkie homologi nesfatyn były oczyszczane wykorzystując trzyetapową procedurę. Początkowo, białka poddawano wstępnemu oczyszczeniu za pomocą chromatografii metalopowinowactwa (IMAC, ang. *immobilized metal affinity chromatography*) na złożu Ni-NTA His•Bind<sup>®</sup> Resin (Qiagen) wykorzystując znacznik 6-histydylowy na końcu aminowym białek (**Rozdział 3.1.2.2**). Następnie usuwano znacznik histydylowy za pomocą proteazy HRV3C i obecności specyficznego wobec niej miejsca położonego za znacznikiem histydylowym w sekwencji białka (**Rozdział 3.1.2.2**). Kolejno oddzielano znacznik od białka podstawowego poprzez IMAC. W ostatnim etapie nesfatyny doczyszczano metodą SEC. Na każdym etapie preparacji białek pobierano próbki, które analizowano za pomocą SDS-PAGE. Bardziej wnikliwy opis poszczególnych etapów został zamieszczony poniżej.

*Liza ekstraktów komórkowych:* Ekstrakty komórkowe z 1 l lub 3,25 l rozmrażano na lodzie.

Następnie do zawiesiny dodawano PMSF w stężeniu końcowym 20  $\mu$ g/ml a także DNazę I i RNazę A w stężeniu końcowym 10  $\mu$ g/ml. Dalej komórki poddawano lizie

ultradźwiękowej, potęgowanej dodatkowo przez lizozym faga T7 uwalniany dzięki obecności odpowiedniego wektora w komórkach szczepu pLysS [176]. Powstały roztwór inkubowano na wytrząsarce wertykalnej (4 °C, 10 obr./min, 1 h) w celu całkowitej degradacji kwasów nukleinowych. Uzyskaną zawiesinę odwirowywano (4 °C, 18 000 ×g, 1 h) po czym pobierano próbkę osadu i cieczy z nad osadu do analizy SDS-PAGE (**Rozdział 3.2.4.2**), do oczyszczania niefatyn przeznaczano ciecz z nad osadu.

*Chromatografia powinowactwa:* Ekstrakt z 3,25 l hodowli poddawano lizie zgodnie z procedurą opisaną powyżej, po czym dodawano do niego 2 ml (100% v/v) złoża Ni-NTA His•Bind<sup>®</sup> Resin i inkubowano (4 °C, 10 obr./min, 30 min). Następnie uzyskaną zawiesinę nanoszono na kolumnę Tricorn<sup>™</sup> 5/100 (GE Healthcare), którą po upakowaniu i pobraniu próbki przesącza podłączano do systemu FPLC Äkta Explorer wyrównoważonego buforem A. Tak przygotowaną kolumnę płukano buforem A w objętości 20 ml w celu zwolnienia z kolumny białek niespecyficznie związanych ze złożem. Następnie kolumnę płukano 10% (homologi N2 oraz N1/2) lub 17,5% (homologi N1) buforu B<sup>2</sup> (**Rozdział 3.1.4.4**) w ilości odpowiadającej 10-krotnej objętości kolumny w celu zwolnienia ze złoża białek słabo z nim oddziałujących. Elucję niefatyn prowadzono wykorzystując 100% buforu B w objętości 20 ml. Rozdział chromatograficzny monitorowano poprzez pomiar absorbancji A280 przy przepływie wynoszącym 2 ml/min w temperaturze pokojowej. Objętość zbieranych frakcji wynosiła 2 ml. Wybrane frakcje łączono i odsalano do buforu A na kolumnach PD10 (GE Healthcare) zgodnie z protokołem producenta. Uzyskany preparat odwirowywano (4°, 18 000 ×g, 10 min), po czym określano jego stężenie na podstawie pomiaru A280. Na każdym etapie IMAC pobierano próbki do analizy SDS-PAGE (**Rozdział 3.2.4.2**).

*Usuwanie znacznika histydylowego:* do eluatu po IMAC dodawano proteazę HRV3C w stosunku 1:1 000 (w/w), po czym roztwór inkubowano przez noc (4°C, 10 obr./min). Po tym czasie dodawano 150 µl (100% v/v) wyrównoważonego złoża Ni-NTA His•Bind<sup>®</sup> Resin i inkubowano (4 °C, 10 obr./min, 30 min). Następnie zawiesinę nakładano na pustą kolumnę PD10, po czym złoże po uprzednim upakowaniu płukano 200 µl buforu A zbierając eluat za każdym razem. Uzyskany preparat wirowano (4°C, 18 000 ×g, 5 min) i zagęszczano do objętości 1 ml na koncentratorze Amicon Ultra-4 o molekularnej granicy odcięcia (MWCO, ang. *molecular weight cut-off*) 3 kDa (Millipore). Na każdym etapie określano stężenie na podstawie pomiaru A280 i pobierano próbki do analizy SDS-PAGE.

<sup>2</sup> Optymalna procentowość buforu B w buforze płuczającym była uprzednio optymalizowana przy użyciu ekstraktu z 1 l hodowli oraz wykorzystując grawitacyjną metodę oczyszczania.

**Sączenie molekularne:** Składniki zagęszczonych próbek rozdzielano za pomocą chromatografii wykluczania na kolumnie Superdex 75 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) wyrównowanej uprzednio buforem C (**Rozdział 3.1.4.4**) i podłączonej do systemu FPLC Äkta Explorer. Rozdział monitorowano przez pomiar absorbancji przy 220 nm (A220) oraz A280. Zbierano frakcje o objętości 0,5 ml przy przepływie wynoszącym 0,5 ml/min. Wybrane z nich zawierające nesfatyny łączono, wirowano (4 °C, 20 000 ×g, 5 min) i dzielono po 200 µl, po czym przechowywano w -80 °C.

### 3.2.4 Identyfikacja nesfatyn

#### 3.2.4.1 Pomiar stężenia białka podstawowego

Stężenia białek po SEC wyznaczano za pomocą pomiaru absorbancji A280 na spektrofotometrze NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). W tym celu wykorzystano odpowiednie współczynniki absorpcji podane w **Tab. 3.8**, które zostały otrzymane za pomocą narzędzia ProtParam (**Rozdział 3.2.5**) [177]. W **Tab. 3.8** podano również pozostałe wybrane parametry fizykochemiczne nesfatyn otrzymane przy użyciu wyżej wymienionego narzędzia bioinformatycznego.

#### 3.2.4.2 Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Analizę SDS-PAGE prowadzono w układzie nieciągłym według Laemmliego [173], stosując 4% żel zagęszczający oraz 12% (homologi N1/2)/15% (homologi N1 i N2) żel rozdzielający (**Rozdział 3.1.4.5**). W tym celu próbki standaryzowano na 5 µg białka i odpowiednią objętość dodawano do buforu 4× SB (**Rozdział 3.1.4.5**). Następnie próbki nanoszono na żel i poddawano rozdzielaniu w aparacie MiniProtean® 3 przy stałym natężeniu prądu równym 0,2 mA/żel do czasu uzyskania pożądanego rozdzielania. Następnie żele utrwalały w roztworze

**Tab. 3.8** Parametry fizykochemiczne nesfatyn

Białko	$\epsilon_{280}$ [1/(M × cm)]	$A_{280}^{0,1\%}$ [ml × 1/(mg × cm)]	pI	MW [kDa]
hN1	4470	0,449	4,9	9,948
gN1		0,450	4,6	9,941
hN2	2980	0,303	5,5	9,836
gN2			5,2	9,840
hN1/2	7450	0,379	5,8	19,654
gN1/2			5,2	19,651

$\epsilon_{280}$  – molowy współczynnik absorpcji wyznaczony na podstawie sekwencji aminokwasowej;  $A_{280}^{0,1\%}$  – masowy współczynnik absorpcji wyznaczony na podstawie sekwencji aminokwasowej; pI – teoretyczny punkt izoelektryczny; MW – masa cząsteczkowa białka.



do odbarwiania (5 min), po czym barwiono roztworem Coomassie Brilliant Blue R-250 (1 h; **Rozdział 3.1.4.5**).

#### 3.2.4.3 Analiza Western-blot

Białka ulegające nadekspresji z wektora pQE-80L-HRV3C zawierały na końcu N znacznik 6-histydylowy (**Rozdział 3.1.2.2**), przez co możliwa była ich detekcja techniką Western-blot (WB) [178], przy użyciu przeciwciał Anty-His (**Rozdział 3.1.4.6**) [178]. W tym celu prowadzono rozdzielanie elektroforetyczne wybranych próbek zgodnie z procedurą opisaną w **Rozdziale 3.2.4.2**. Następnie białka poddawano transferowi w polu elektrycznym na błonę nitrocelulozową w aparacie MiniProtean<sup>®</sup> 3 przy stałym napięciu 150 V przez 35 min w buforze do transferu (**Rozdział 3.1.4.6**). Następnie błonę umieszczano w roztworze barwnika Ponceau S (**Rozdział 3.1.4.6**), po czym zaznaczano pasma obecne w standardzie białkowym. Dalej, błonę przepłukiwano wodą milliQ i inkubowano w 1% roztworze mleka (**Rozdział 3.1.4.6**) przez 1 h na wytrząsarce. Po tym czasie błonę płukano trzy razy buforem TN (**Rozdział 3.1.4.6**) w czasie 15 min a następnie inkubowano przez noc w 4 °C w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych Anty-His na wytrząsarce (JWElectronics). Następnego dnia błonę ponownie płukano trzy razy buforem TN (**Rozdział 3.1.2.2**) w czasie 15 min, po czym inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi HAMPO (**Rozdział 3.1.4.6**) przez 1 h na wytrząsarce w temperaturze pokojowej. Po tym czasie, błonę przepłukiwano buforem TN trzy razy w czasie 15 min, po czym inkubowano ją z substratem peroksydazy (**Rozdział 3.1.4.6**) przez 10 min stosując się do zaleceń producenta. Następnie błonę analizowano w aparacie FujiFilm FLA-3000 wzbudzając fluorescencję próbek przy 473 nm. Uzyskane dane dalej analizowano przy pomocy oprogramowania Image Analyzer (Raytest Istopenmeßgeräte GmbH).

#### 3.2.4.4 Widma masowe nesfatyn

Próbki oczyszczonych białek poddawano liofilizacji po czym wysyłano je do Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (IBB PAN, Warszawa, Polska) gdzie wykonywany był pomiar masy molekularnej nesfatyn przy pomocy spektrometrii mas (MS, ang. *mass spectrometry*). Pomiar prowadzono na aparacie QTOF Premier (Waters).

### 3.2.5 Analizy bioinformatyczne

---

Przewidywanie regionów nieuporządkowanych wykonano na podstawie sekwencji aminokwasowej nesfatyn oraz narzędzi PONDR VL-XT ([www.pondr.com](http://www.pondr.com)) [179,180] i DynaMine (<http://bio2byte.be/dynamine>) [181,182]. Wykresy Uversky’ego zostały wykonane na podstawie danych wygenerowanych przez algorytm PONDR. Wykorzystując narzędzie ProtParam obliczone zostały następujące parametry fizykochemiczne nesfatyn: współczynnik absorpcji, punkt izoelektryczny (pI), teoretyczna masa cząsteczkowa [177]. Przewidywanie struktury przestrzennej białek zostało przeprowadzone przy pomocy narzędzi I-TASSER (<http://seq2fun.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>) [183–185], ColabFold [186] oraz Modeller [187]. Matryce użyte do modelowania struktury trzeciorzędowej ludzkich nesfatyn w programie Modeller wyłoniono przy pomocy narzędzia DichroMatch [188], dopasowując widma dichroizmu kołowego nesfatyn (**Rozdział 4.4**) do widm dostępnych w bazie metodą najmniejszych kwadratów. Po wygenerowaniu wstępnego modelu holo-hN1 dodatkowo modelowano jej miejsce wiązania jonów Zn(II) na podstawie motywu karboksypeptydazy A1 zawartego pomiędzy 69-78 resztą aminokwasową [189]. Następnie generowano zbiór modeli modelując pętle i testując różne kombinacje ograniczeń odległości międzyatomowych oraz zawartości struktury drugorzędowej, sugerując się dodatkowo wynikami wymiany proton/deuter (**Rozdział 4.10**). Przewidywania widm dichroizmu kołowego na podstawie otrzymanych modeli prowadzono z wykorzystaniem algorytmu SESCO i bazy DS6-1 [190]. Modele wykazujące najmniejszą wartość znormalizowanego rmsd względem widma eksperymentalnego wyłanianiano jako najlepiej opisujące dany układ. Wybrane modele nesfatyn zostały następnie zwizualizowane w programie UCSF Chimera [191].

### 3.2.6 Spektroskopia dichroizmu kołowego

---

Wszystkie pomiary spektroskopowe dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) wykonywano na spektropolarymetrze Jasco J-715 (Jasco Inc.) z dołączonym urządzeniem kontrolującym temperaturę Jasco Peltier CDF 426S/15 w kuwecie kwarcowej 100QS (Hellma).

#### 3.2.6.1 Podstawowe pomiary CD nesfatyn

Widma CD nesfatyn rejestrowano w stałej temperaturze 20 °C i przy zastosowaniu następujących parametrów spektralnych: zakres długości fal 195–260 nm; rozdzielczość 0,5 nm; czas integracji (D.I.T, ang. *digital integration time*) 1 s; szybkość skanowania 50 nm/min; szerokość pasma 1 nm; trzy akumulacje. Stężenie nesfatyn wykorzystywane podczas pomiarów

wynosiło 0,15 mg/ml. Białka zawieszono w buforze C (**Rozdział 3.1.4.4**) lub buforze C suplementowanym EDTA (5 mM)/CaCl<sub>2</sub> (10 mM). Próbkę przed pomiarem inkubowano przez 30 min w 4 °C. Wszystkie pomiary wykonywano w trzech powtórzeniach a od otrzymanych widm białek odejmowano widma odpowiednich buforów. Zebrane dane uśredniano i następnie wygładzono algorytmem Savitzky-Golay (15 punktów; rząd wielomianu 3) w programie OriginPro2018 w celu prezentacji danych. Dane wyrażone w [mdeg] następnie przeliczono na średnią resztową eliptyczność molową (MRE, ang. *mean residue ellipticity*) [192] wyrażoną w [deg×cm<sup>2</sup>×dmol<sup>-1</sup>]. Wartości MRE pochodzące z pojedynczych pomiarów następnie wykorzystywano w celu estymacji zawartości struktur drugorzędowych pakietem CDPPro. W tym celu zaimplementowane zostały algorytmy CDSSTR oraz CONTINLL i bazy SDP48 (homologi N1) oraz SP43 (homologi N2 oraz N1/2) [193–195]. Obie powyższe bazy zawierają 43 białka rozpuszczalne a baza SDP48 dodatkowo 5 białek zdenaturowanych. Na podstawie uzyskanych wyników obliczano średnią zawartość struktur drugorzędowych oraz ich odchylenie standardowe (SD, ang. *standard deviation*).

Widma CD nesfatyn w obecności ZnCl<sub>2</sub> (50–500 μM) rejestrowano w jednym powtórzeniu postępując analogicznie do protokołu przedstawionego powyżej. Ułamek wysycenia białek jonami Zn(II) oraz stężenie wolnych jonów Zn(II) obliczono na podstawie odpowiednio wzorów 3.3 oraz 3.4.

$$r = \frac{\theta_{i,208/222} - \theta_{\min}}{|\theta_{\max} - \theta_{\min}|} \quad 3.3$$

gdzie:

$\theta_{i,208/222}$  – MRE przy 208/222 nm zarejestrowana przy i-tym stężeniu jonów Zn(II)

$\theta_{\min}$  – minimalna obserwowana wartość MRE przy 208/222 nm

$\theta_{\max}$  – maksymalna obserwowana wartość MRE przy 208/222 nm

$$[\text{Zn II}]_f = [\text{Zn II}]_t - r \times [\text{P}]_t \quad 3.4$$

gdzie:

$[\text{Zn II}]_t$  – całkowite stężenie jonów Zn(II)

$r$  – ułamek wysycenia

$[\text{P}]_t$  – całkowite stężenie białka

Dane uzyskane na podstawie powyższych wzorów zostały następnie dopasowane do modelu Hilla podanego poniżej (wzór 3.5) w programie OriginPro 2018.

$$r = r_{\min} + \frac{r_{\max} - r_{\min} \times [\text{Zn II}]_f^n}{K_D^n + [\text{Zn II}]_f^n} \quad 3.5$$

gdzie:

$r_{\min}$  – minimalna obliczona wartość  $r$

$r_{\max}$  – maksymalna obliczona wartość  $r$

$K_D$  – pozorna stała dysocjacji

$n$  – współczynnik Hilla

#### 3.2.6.2 Pomiary CD w funkcji temperatury

Widma temperaturowe nesfatyn rejestrowano w zakresie 20–90 °C z prędkością 2 °C/min, co 2 °C przy długości fali 208 nm i 222 nm oraz D.I.T wynoszącym 2 s. Próbkę białek o stężeniu 0,25 mg/ml każda były zawieszane w buforze C suplementowanym EDTA (5 mM) lub ZnCl<sub>2</sub> (50–500 μM). Przed pomiarem próbki inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej. Otrzymane dane były następnie dopasowywane do modelu Boltzmann lub dwuprzejściowego modelu dawka-odpowiedź w programie OriginPro 2018 a temperatura przejścia ( $T_m$ ) była interpretowana jako punkt przegięcia.

#### 3.2.7 Ultrawierowanie analityczne

Ultrawierowanie analityczne typu szybkościowego (SV-AUC, ang. *sedimentation-velocity analytical ultracentrifugation*) prowadzono korzystając z ultrawirówki Beckman Coulter Proteome Lab XL-I (Beckman Coulter Inc.) oraz rotora An-60Ti. Próbkę wirowano przez noc w 20 °C z prędkością 50 000 obr./min (około 200 000 ×g) w kuwetach dwukanałowych z wypełniaczem węglowym Epon<sup>®</sup>. Próbkę nesfatyn o objętości 400 μl przygotowano w dwóch zestawach stężeń: 1,3; 1,0; 0,7 mg/ml (homologi N1) oraz 1,85; 1,32; 0,92 mg/ml (homologi N2 i N1/2). Białka zawieszane były w buforze C suplementowanym: EDTA (5 mM); CaCl<sub>2</sub> (10 mM); ZnCl<sub>2</sub> (50–500 μM). Sedymentację śledzono przez pomiar absorbancji A280 w trybie ciągłym z rozdzielczością równą 0,3 mm. Częstkowe objętości właściwe białek (hN1: 0,745; gN1:0,738; hN2: 0,733; hN1/2: 0,739; gN1/2: 0,734, każda w ml/g), gęstość (1,0059 i 1,006 g/ml dla buforu C suplementowanego odpowiednio: EDTA i CaCl<sub>2</sub>/ZnCl<sub>2</sub>) i lepkość dynamiczna (1,0265 i 1,0228 mPa ×S dla buforu C suplementowanego odpowiednio: EDTA i CaCl<sub>2</sub>/ZnCl<sub>2</sub>) buforów obliczane były przy pomocy SEDNTERP [196]. Współczynnik sedymentacji, współczynnik sedymentacji ( $s$ ) uwzględniający gęstość i lepkość wody ( $s_{20,w}$ ), współczynnik tarcia ( $f/f_0$ , ang. *frictional ratio*), pozorną masę cząsteczkową ( $MW_{app}$ , ang. *apparent molecular mass*) oraz promień hydrodynamiczny ( $R_h$ ) obliczano na podstawie danych skorygowanych o czas w programie SEDFIT w oparciu o model ciągłego rozkładu współczynnika sedymentacji  $c(s)$  [197]. W trakcie analizy danych stosowano przedział ufności maksymalnej

regularyzacji entropii równy  $p=0,68$ . Jakość uzyskanych wyników była oceniana na podstawie wartości rmsd [197,198].

W celu detekcji zmian struktury trzecio- i/lub czwartorzędowej w wyniku oddziaływania pomiędzy hN1 i hN2 wykonano analizę SV-AUC mieszanin powyższych białek w stosunku masowym 1:1, 1:2 i 1:4 (hN2:hN1) w obecności EDTA (5mM) lub  $ZnCl_2$  (50  $\mu$ M) zgodnie z protokołem przedstawionym powyżej.

Wszystkie eksperymenty SV-AUC wykonywano we współpracy z dr inż. Dominiką Bystranowską z Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej Politechniki Wrocławskiej.

### 3.2.8 Izotermiczna kalorymetria miareczkowa

Pomiary izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC, ang. *isothermal titration calorimetry*) wykonano we współpracy z mgr inż. Michałem Padjaskiem z Wydziału Chemii Biologicznej Uniwersytetu Wrocławskiego. Pomiary prowadzono wykorzystując kalorymetr Nano-ITC (Waters, USA) w 25 °C i komory pomiarowej o objętości 1 ml. Wszystkie białka zawieszane były w buforze C. Stężenie analitu (hN1; hN1/2) wynosiło 0,1 mM. Stężenie titranta wynosiło 7 mM podczas miareczkowania hN1 lub 0,5 mM podczas miareczkowania hN1/2. Stężenia titranta oraz analitu było wcześniej optymalizowane w celu uzyskania najlepszej izotermy do analizy. Po wyrównaniu temperatur w układzie do komory pomiarowej dodawano po 5,22  $\mu$ l titranta co 300 s przy szybkości mieszania równej 200 obr./min. Dodatkowo wykonano eksperymenty kontrolne dodając jednakowe porcje titranta do buforu C w celu wyznaczenia ciepła jego rozcieńczenia podczas nieobecności analitu.

Otrzymane dane poddawano wstępnej analizie przy użyciu programu NanoAnalyze, dedykowanemu do kalorymetru Nano-ITC. Następnie dane poddawano całkowaniu oraz korekcje o linię bazową przy użyciu programu NITPIC [199]. Krzywoliniowe dopasowywanie danych prowadzono w programie SEDPHAT [200] wykorzystując model z jednym miejscem wiążącym:  $A + B \rightleftharpoons AB$ . Dane dopasowywano do powyższego modelu w programie SEDPHAT dodatkowo ograniczając je danymi ze wstępnego dopasowania w programie NanoAnalyze. Wartości błędów zostały obliczone metodą Monte Carlo dla każdego eksperymentu w 500 iteracjach i przedziałem ufności równym 0,9.

### 3.2.9 Ograniczona proteoliza nesfatyn

Nesfatyny oraz hNucb2 (0,56 mg/ml każda) poddawano proteolizie z udziałem trypsyny (**Rozdział 3.1.1**) w stosunku enzym:białko równym 1:5000 (w/w) oraz dodatkowo w stosunku

równym 1:1000 w przypadku homologów N1. Próbki inkubowano przez 3,5 h w 20 °C z prędkością wytrząsania próbek równą 300 obr./min. Reakcje prowadzono w buforze C suplementowanym EDTA (5 mM; dla każdej nesyfatywy i hNucb2) lub ZnCl<sub>2</sub> (50 μM dla hN1/2 i gN1/2; 300 μM dla hNucb2; 500 μM dla hN1 i gN1). Po dodaniu trypsyny do mieszaniny z reakcji pobierano w zadanych interwałach czasowych próbki o objętości 9 μl, które zawieszano w 3 μl buforu 4× SB (**Rozdział 3.1.4.5**) i tym samym zatrzymywano reakcję. Dodatkowo przygotowano również próbki kontrolne niezawierające trypsyny, które miały na celu ocenę stabilności białek w warunkach eksperymentu. Próbki kontrolne pobierano na początku i końcu reakcji. Produkty proteolizy następnie analizowano techniką SDS-PAGE przez ich rozdzielanie na przygotowanym żelu z liniowym gradientem polikaryloamidu w zakresie 8–20% (**Rozdział 3.1.4.5**) według Laemmliego [173]. Dodatkowo w celu analizy efektów długotrwałej proteolizy gN1 przygotowano dodatkowe zestawy próbek. Pierwszy z nich inkubowano przed reakcją 24 h w 20 °C w obecności EDTA (5 mM) lub ZnCl<sub>2</sub> (500 μM) a drugi przygotowywano bezpośrednio przed reakcją. Następnie do obu zestawów próbek dodawano proteazy w stosunku wagowym enzym:białko równym 1:1000. Próbki do analizy SDS-PAGE o objętości 9 μl pobierano co 24 h.

#### 3.2.10 Spektroskopia absorpcyjna

---

Wyjściowy roztwór Zincon (1 mM; ZI; **Rozdział 3.1.1**) przygotowano przez rozpuszczenie chromoforu w DMSO. Następnie wyznaczono stałą dysocjacji kompleksu ZI z jonami Zn(II) przez miareczkowanie chromoforu o końcowym stężeniu 50 μM roztworem ZnCl<sub>2</sub> w buforze C. Pomiar prowadzono na spektrofotometrze Jasco V-630 w kuwecie kwarcowej QS100 (Hellma) o długości drogi optycznej równej 1 cm. Widma rejestrowano w trzech akumulacjach w zakresie 300–650 nm z szybkością 1000 nm/min i rozdzielczością 1 nm. Zanik absorbancji przy 469 nm normalizowano analogicznie do wzoru 3.3 a następnie dane dopasowywano do równania kwadratowego zgodnie ze wzorem 3.6.

$$r = \frac{[\text{Zn(II)}]_t + [\text{ZI}]_t + K_{D, \text{ZI}} - \sqrt{([\text{Zn(II)}]_t + [\text{ZI}]_t + K_{D, \text{ZI}})^2 - 4 \cdot [\text{Zn(II)}]_t \cdot [\text{ZI}]_t}}{2 \cdot [\text{ZI}]_t} \quad 3.6$$

gdzie:

[Zn(II)]<sub>t</sub> – całkowite stężenie jonów Zn(II)

[ZI]<sub>t</sub> – całkowite stężenie chromoforu

K<sub>D, ZI</sub> – stała dysocjacji kompleksu ZI z jonami Zn(II)

Dalsze badania konkurencji nesfatyn o jony Zn(II) z ZI prowadzono na czytniku płytek Clariostar<sup>®</sup> Plus. W tym celu do próbek ZI (50  $\mu\text{M}$ ) wysyconych  $\text{ZnCl}_2$  (50  $\mu\text{M}$ ) i zawieszonych w buforze C w płytce 384-dołkowej (Greiner) dodawano nesfatyny w zmiennym stężeniu. Próbki o objętości końcowej 100  $\mu\text{l}$  inkubowano następnie w temperaturze pokojowej przez 20 min jednocześnie wytrząsając płytkę. Następnie płytkę wirowano (1000  $\times\text{g}$ ; 2 min; 20  $^\circ\text{C}$ ). Widma rejestrowano w zakresie 300–650 nm z rozdzielczością 1 nm. Pozorną stałą dysocjacji obliczano następnie zgodnie z protokołem opublikowanym przez Kocylę i wsp. [201].

### 3.2.11 Spektroskopia fluorescencyjna

#### 3.2.11.1 Pomiary fluorescencji kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego w obecności nesfatyn

Wyjściowy roztwór kwasu 8-anilino-1-naftalenosulfonowego (ANS, ang. *8-aniline-1-naphthalenesulfonic acid*; **Rozdział 3.1.1**) został przygotowany przez jego rozpuszczenie w dimetylosulfotlenku (DMSO, ang. *dimethyl sulfoxide*; **Rozdział 3.1.1**). Stężenie fluoroforu wyznaczano następnie przez pomiar absorpcji przy długości fali 376 nm, wykorzystując molowy współczynnik absorpcji równy 9140 [ $1/(\text{M}\times\text{cm})$ ] [202]. Próbki o objętości 50  $\mu\text{l}$  zawierające ANS (50  $\mu\text{M}$ ) i nesfatyny (10  $\mu\text{M}$  każda) zawieszono w buforze C suplementowanym  $\text{ZnCl}_2$  (0–500  $\mu\text{M}$ ) inkubowano przez 20 min w 20  $^\circ\text{C}$  w czarnej płytce 384-dołkowej (Greiner). Po tym czasie płytkę wirowano (1000  $\times\text{g}$ ; 2 min; 20  $^\circ\text{C}$ ). Każdą próbkę przygotowano w trzech powtórzeniach. Następnie płytkę skanowano w czytniku Clariostar<sup>®</sup> Plus (BMG, Niemcy) w trybie intensywności fluorescencji. ANS wzbudzano przy  $350 \pm 10$  nm (20 naświetleń/dołek) i skanowano emisję fluorescencji w zakresie 375–650 nm. Otrzymane widma wygładzono metodą Savitzky-Golay w programie OriginPro 2018 w celu prezentacji wyników. Niezmodyfikowane wartości intensywności fluorescencji (RFU, ang. *raw fluorescence unit*) przy 468 nm w funkcji stężenia jonów Zn(II) były następnie dopasowywane do modelu Hilla (analogicznie do wzoru 3.5) z parametrem Hilla pozostawionym bez ograniczeń.

#### 3.2.11.2 Pomiary fluorescencji tioflawiny T w obecności nesfatyn

Kinetyczne pomiary fluorescencji tioflawiny T (ThT, ang. *thioflavin T*) w obecności nesfatyn-1 prowadzono na czytniku płytek Clariostar<sup>®</sup> Plus. W tym celu gN1 oraz hN1 (30  $\mu\text{M}$  każda) inkubowano w buforze C suplementowanym EDTA (5 mM) lub  $\text{ZnCl}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ) w (nie)obecności trypsyny (**Rozdział 3.1.1**) w stosunku wagowym 1:1000 przez 48 h. Próbki o objętości 50  $\mu\text{l}$  przygotowano w trzech powtórzeniach w czarnej płytce 384-dołkowej (Greiner). Tuż przed pomiarem dodawano proteazę a płytkę wirowano (1000  $\times\text{g}$ ; 2 min; 20  $^\circ\text{C}$ ). Następnie emisję fluorescencji wzbudzano przy  $418 \pm 10$  nm (20 naświetleń/dołek), co 10 min

i odczytując emisję fluorescencji przy  $490 \pm 10$  nm. RFU próbek następnie normalizowano względem uśrednionej RFU buforu i wyrażano jako krotność zmiany fluorescencji (FFC, ang. *fluorescence fold change*).

Postęp wiązania tioflawiny T ( $5 \mu\text{M}$ ) do nesfatyn ( $10 \mu\text{M}$  każda) w stanie ustalonym również monitorowano przy użyciu czytnika płytek Clariostar<sup>®</sup> Plus. W tym celu wzbudzano fluorofor przy  $418 \pm 9$  nm (20 naświetleń/dołek), po czym skanowano emisję fluorescencji w zakresie 440–600 nm. Każdą próbkę o objętości 50  $\mu\text{l}$  przygotowano w trzech powtórzeniach w czarnej płytce 384-dołkowej, którą odwirowano odwirowano ( $1000 \times\text{g}$ ; 2 min;  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Następnie otrzymane widma wygładzano metodą Savitzky-Golay (15 punktów; rząd wielomianu 3). Otrzymane wartości następnie uśredniano a błąd wyrażano jako odchylenie standardowe (SD, ang. *standard deviation*). Wartości RFU przy 483 nm lub 476 nm w funkcji stężenia  $\text{ZnCl}_2$  były następnie dopasowywane do modelu Hilla (analogicznie do wzoru 3.5) w programie OriginPro 2018.

#### 3.2.12 Wymiana izotopowa proton-deuter

Eksperymenty wymiany izotopowej proton-deuter sprzężonej ze spektrometrią mas (HDX, ang. *hydrogen-deuterium exchange mass spectroscopy*) prowadzono we współpracy z dr Lilią Żukową ze Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (IBB PAN, Warszawa, Polska). Eksperymenty prowadzono wykorzystując chromatograf cieczowy UPLC nanoACQUITY (Waters) z dołączonym kontrolerem HDX sprzężonym ze spektrometrem SYNAPT<sup>®</sup>2 HDMS (Waters).

Roztwory wyjściowe homologów N1 oraz N1/2 o stężeniu 50/100  $\mu\text{M}$  przygotowano w buforze C1 suplementowanym (lub nie)  $\text{ZnCl}_2$  w stężeniu końcowym 50  $\mu\text{M}$  (homologi N1/2) lub 500  $\mu\text{M}$  (homologi N1). Powyższe roztwory inkubowano przez 30 min w  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Próbkę niedeuterowaną przygotowano przez dodanie 5  $\mu\text{l}$  wyjściowego roztworu białka (100  $\mu\text{M}$ ) do 45  $\mu\text{l}$  buforu C1 (**Rozdział 3.1.4.8**) suplementowanego (lub nie)  $\text{ZnCl}_2$  w odpowiednim stężeniu. Następnie całą próbkę przenoszono do buforu STOP (**Rozdział 3.1.4.8**) o temperaturze  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  i natychmiast zamrażano ją przez zatopienie w ciekłym azocie. Bezpośrednio przed pomiarem próbkę rozmrażano i trawiono na kolumnie z immobilizowaną pepsyną (Poroszyme<sup>™</sup>, Thermo Scientific) dołączonej do systemu w  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  przez 1,5 min. Następnie otrzymane peptydy eluowano 0,07% (v/v) kwasem mrówkowym przy przepływie 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  na kolumnę ACQUITY BEH C18 VanGuard (Waters). Następnie peptydy kierowano na kolumnę ACQUITY UPLC BEH C18 column (Waters) skąd były zwalniane gradientem 10–35%



acetonitrylu w 0,01% kwasie mrówkowym przy przepływie 90  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Cały system, z wyjątkiem kolumny do trawienia, utrzymywany był w stałej temperaturze 0,5  $^{\circ}\text{C}$ . Peptydy poddawano jonizacji metodą elektrorozpylania (ESI, ang. *electrospray ionization*) a widma rejestrowano wykorzystując następujące parametry spektralne: tryb jonów dodatnich; napięcie przyłożone do kapilary 3 kV; napięcie na stożku próbkującym 35 V; napięcie na soczewce ekstrakcyjnej 3 V; temperatura źródła 80  $^{\circ}\text{C}$ ; temperatura desolwatacji 175  $^{\circ}\text{C}$ ; natężenie przepływu gazu do desolwatacji 800 l/h. Peptydy identyfikowano przy użyciu oprogramowania ProteinLynx Global Server Software (Waters).

Próbki deuterowane poddawano wymianie w pięciu interwałach czasowych (10s ; 1 min; 5 min; 30 min; 2,5 h) wykorzystując: roztwór wyjściowy białek o stężeniu 50  $\mu\text{M}$  i deuterowane buforu postępując jak w przypadku próbek niedeuterowanych. Wszystkie pomiary wykonano w trzech powtórzeniach. Dodatkowo w celu zbadania minimalnej wymiany izotopowej 5  $\mu\text{l}$  białka (50  $\mu\text{M}$ ) dodawano do 55  $\mu\text{l}$  mieszaniny (o temperaturze 4  $^{\circ}\text{C}$ ) deuterowanego buforu C1 suplementowanego (lub nie)  $\text{ZnCl}_2$  w odpowiednim stężeniu oraz deuterowanego buforu STOP. Następnie próbkę natychmiast zamrażano przez zanurzenie w ciekłym azocie. Próbki reprezentujące całkowitą wymianę izotopową były przygotowywane jak próbki deuterowane, przy czym czas inkubacji w buforze deuterowanym wynosił 24 h.

Lista peptydów otrzymana dla próbek niedeuterowanych posłużyła do identyfikacji peptydów po wymianie izotopowej w programie DynamX 3.0 (Waters). W tym celu lista peptydów była filtrowana według następujących kryteriów: minimalna intensywność 3000; minimalna ilość produktów na resztę aminokwasową 0,3. Wszystkie obwiednie izotopowe przyporządkowane automatycznie przez oprogramowanie poddano manualnej ocenie i korekcji jeśli ta była konieczna. Następnie eksportowano mapy cieplne obrazujące różnicę w wymianie izotopowej pomiędzy stanami dla poszczególnych białek. Dalszą analizę danych prowadzono przy użyciu oprogramowania HaDeX [203].



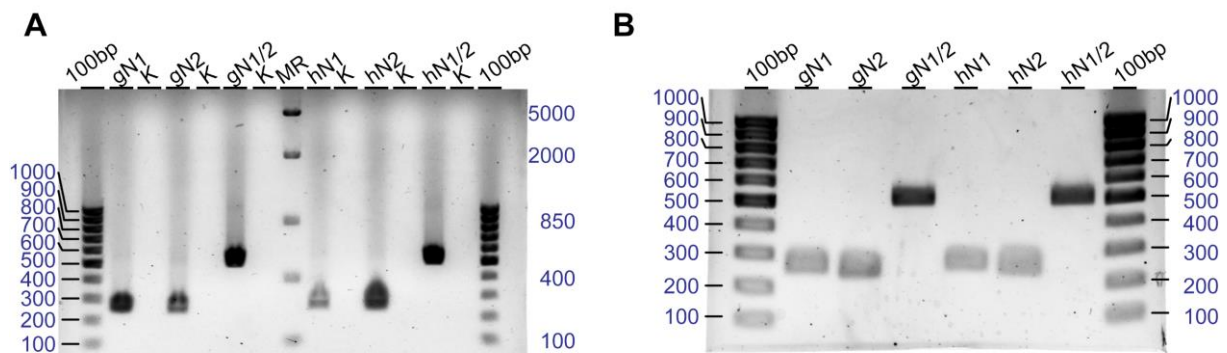
# 4.

## Wyniki



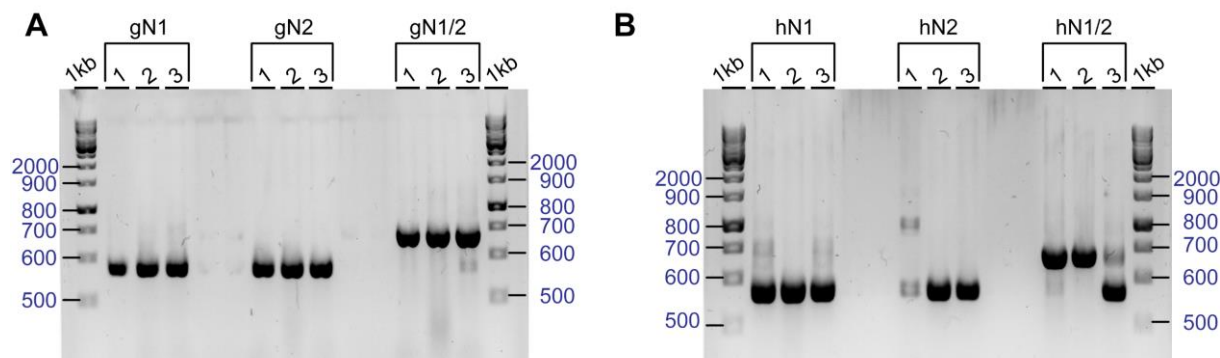
### 4.1 OTRZYMYWANIE KONSTRUKTÓW cDNA

Pierwszym etapem w przygotowaniu konstruktyw była amplifikacja insertów zawierających cDNA nesfatyn. W tym celu jako matrycę wykorzystano wektor pQE-80L-HRV3C zawierający cDNA białek pełnej długości, tj. hNucb2 i gNucb2 (**Rozdział 3.1.2.2**). Powyższe wektory zostały otrzymane dzięki uprzejmości dr inż. Dominiki Bystranowskiej oraz mgr inż. Anny Skorupskiej. PCR (**Rozdział 3.2.2**) prowadzono wykorzystując oligonukleotydy wprowadzające miejsca restrykcyjne SacI oraz HindIII oraz kodon STOP (**Rozdział 3.1.2.1**). Otrzymane produkty po amplifikacji oczyszczano następnie za pomocą zestawu Clean-up (**Rozdział 3.2.2**). Długość produktów PCR analizowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym (**Rozdział 3.1.4.2**), której wyniki przedstawiono na **Rys. 4.1A**. Przybliżona długość otrzymanych produktów wynosiła: 259 pz (gN1); 258 pz (gN2); 524 pz (gN1/2); 277 pz (hN1); 279 pz (hN2); 520 pz (hN1/2). Następnie inserty poddawano trawieniu endonukleazami restrykcyjnymi SacI oraz HindIII (**Rozdział 3.2.2**), po czym ponownie oczyszczano je zestawem Clean-up. Długość



**Rys. 4.1** Analiza elektroforetyczna produktów PCR i trawienia insertów

(A) Rozdział elektroforetyczny produktów PCR po amplifikacji cDNA nesfatyn. (B) Rozdział elektroforetyczny produktów trawienia insertów endonukleazami restrykcyjnymi. Oznaczenia poszczególnych ścieżek: 100bp – standard DNA GeneRuler 100bp (**Rozdział 3.1.4.7**); MR – standard DNA Fast Ruler Middle Range (**Rozdział 3.1.4.7**); K – reakcje kontrolne.



**Rys. 4.2** Analiza elektroforetyczna produktów PCR kolonijnej

Rozdziały elektroforetyczne próbek po PCR kolonijnej (**A**) ludzkich homologów i (**B**) kurzych homologów nesfatyn. Oznaczenia poszczególnych ścieżek: 1kb – standard DNA GeneRuler 1kb (*Rozdział 3.1.4.7*); 1-3 numery kolonii bakteryjnych wykorzystanych do PCR.

produktów po trawieniu endonukleazami analizowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, której wyniki przedstawiono na **Rys. 4.1B**. Estymowana długość fragmentów po trawieniu wynosiła: 232 pz (gN1); 213 pz (gN2); 468 pz (gN1/2); 229 pz (hN1); 217 pz (hN2); 471 pz (hN1/2). Następnie inserty po trawieniu ligowano ze zlinearyzowanym wektorem pQE-80L-HRV3C z trzykrotnym nadmiarem molowym insertu nad wektorem (**Rozdział 3.2.2**). Mieszaniną po ligacji transformowano komórki kompetentne *E. coli* szczepu OneShot™ TOP10 (**Rozdział 3.2.2**). Kolonie zawierające pożądaną insert identyfikowano metodą kolonijnej PCR (**Rozdział 3.2.2**). Długości produktów po PCR kolonijnym analizowano przez elektroforezę w żelu agarozowym, której wyniki przedstawiono na **Rys. 4.2**. Estymowana długość produktów PCR kolonijnej wynosiła około: 392 pz (gN1); 371 pz (gN2); 574 pz (gN1/2); 371 pz (hN1); 390 pz (hN2); 618 pz (hN1/2). Na podstawie wyników elektroforezy do zaszczepienia 100 ml podłoża płynnego TB wybrano kolonie nr 2 dla wszystkich homologów nesfatyn (**Rozdział 3.2.2**). Następnie z otrzymanych hodowli izolowano plazmidowe DNA przy użyciu zestawu NucleoBond® (**Rozdział 3.2.2**). Zgodność sekwencji potwierdzano następnie poprzez sekwencjonowanie metodą Sanger (Genomed, Polska; **Rozdział 3.2.2**).



## 4.2 OTRZYMYWANIE I OCZYSZCZANIE REKOMBINOWANYCH NESFATYN

Otrzymanymi konstruktami pQE-80L-HRV3C zawierającymi cDNA nesfatyn (**Rozdział 4.1**) transformowano komórki *E. coli* szczepu B121(DE3) plysS (**Rozdział 3.2.3.1**). Analiza rozpuszczalności rekombinowanych homologów kurzej i ludzkiej N1/2 została wykonana w ramach pracy magisterskiej autora [204] oraz mgr inż. Karoliny Błaszczak [205]. Oba homologi N1/2 zostały zidentyfikowane jako białka rozpuszczalne [204,205]. Ekstrakty bakteryjne przygotowywano do oczyszczania zgodnie z procedurą opisaną w **Rozdziale 3.2.3.2**.

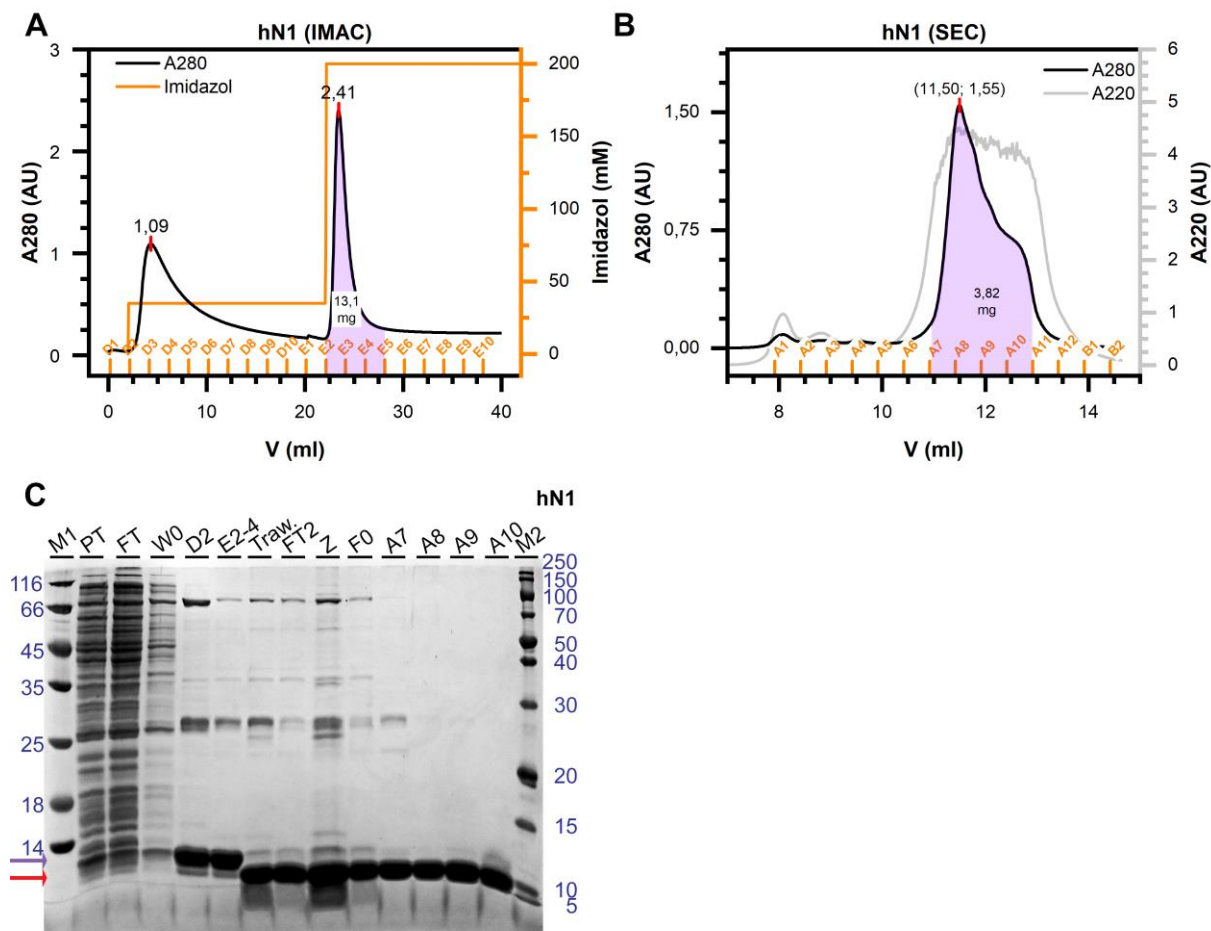
Wszystkie rekombinowane białka po ekspresji zawierały w swojej sekwencji znacznik 6-histydylowy oraz miejsce rozpoznawane przez proteazę HRV3C, które umożliwiało usunięcie znacznika na późniejszym etapie oczyszczania (**Rozdział 3.2.3.2**). W przypadku homologów N2 oraz N1/2 stosowano stężenie imidazolu w buforze płuczającym równe 20 mM jak w przypadku rekombinowanych homologów N1/2 ekspresjonowanych z niezmodyfikowanego wektora pQE-80L [204,205].

#### 4.2.1 Oczyszczanie ludzkich i kurzych homologów N1 i N2

Pierwszym etapem procedury oczyszczania niesfatyn metodą chromatografii metalopowinowactwa (IMAC, ang. *immobilized metal affinity chromatography*). W przypadku ludzkich i kurzych homologów N1 stężenie imidazolu w buforze płuczającym było optymalizowane metodą grawitacyjną dla ekstraktu przygotowanego z 1 l hodowli (**Rozdział 3.2.3.2**). Analiza uzyskanych profili elucji (**Rys. S1**) oraz SDS-PAGE (wyniki nie pokazane) wykazały, iż zastosowanie imidazolu w stężeniu 35 mM daje największą intensywność A280 w szczycie we frakcjach po elucji oraz skutkuje najmniejszymi stratami białka podstawowego podczas zwalniania cząsteczek niespecyficznie związanych ze złożem.

##### 4.2.1.1 Oczyszczanie hN1 i gN1

Typowy profil elucji hN1 i gN1 ze złoża Ni-NTA po optymalizacji i zwiększeniu skali oczyszczania (**Rozdział 3.2.3.2**) przedstawiono na **Rys. 4.3A** oraz **Rys. 4.4A**. Widoczne są na nim dwa szczyty. Pierwszy odpowiada białkom zwolnionym ze złoża po przepłukaniu go buforem zawierającym imidazol w stężeniu 35 mM. Drugi szczyt cechuje się znacznie większą symetrią i absorbancją w szczycie równą 2,41. Estymowana (przez scałkowanie powierzchni pod szczytem i podzielenie przez masowy współczynnik absorpcji) zawartość białek we frakcjach po elucji wynosi ok. 13,1 mg dla hN1; 34,6 dla gN1. Frakcje E2–5 łączono i odsalano na kolumnie PD10 według zaleceń producenta (**Rozdział 3.2.3.2**). Następnie usuwano znacznik histydylowy przy pomocy proteazy HRV3C. (**Rozdział 3.2.3.2**). Znacznik oddzielano od białka podstawowego za pomocą drugiej IMAC, po czym roztwór białka zagęszczano do objętości 1 ml (**Rozdział 3.2.3.2**). Następnie preparat nakładano na kolumnę Superdex 75 Increase 10/300 GL (**Rozdział 3.2.3.2**). Typowe profile elucji hN1 i gN1 po SEC przedstawiono na **Rys. 4.3B** i **Rys. 4.4B**. W przypadku hN1 widoczny jest na nim jeden asymetryczny i nieregularny szczyt o objętości elucji ( $V_e$ ) 11,50 ml oraz maksymalnej absorpcji A280 w szczycie równej 1,55. Estymowana zawartość hN1 we frakcjach A7–10 wyniosła 3,8 mg. Profil elucji gN1

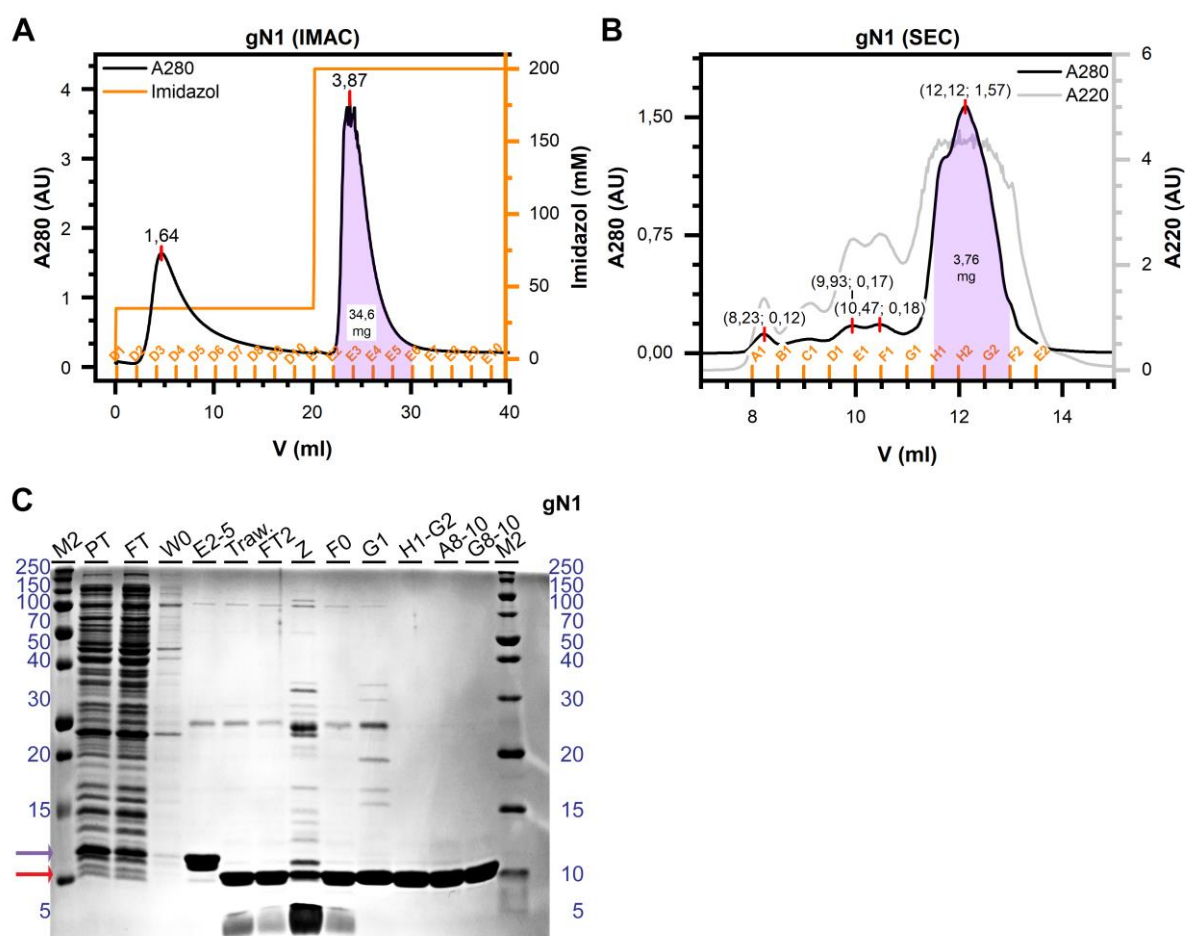


**Rys. 4.3** Oczyszczanie hN1

(A) Profil elucji hN1 podczas IMAC. D1-D10 – frakcje zwolnione ze złoża buforem zawierającym 35 mM imidazol, E1-E10 – frakcje zwolnione ze złoża pod wpływem buforu z 200 mM imidazolem. Kolorem purpurowym zaznaczono połączone frakcje; (B) Profil elucji hN1 podczas SEC. Podano wartości  $V_e$  i A280 wybranych szczytów; (C) Analiza SDS-PAGE oczyszczania hN1. M1, M2 – standardy białkowe odpowiednio: Pierce™ Unstained Protein MW Marker oraz PageRuler® Broad Range; PT – próbka cieczy przed IMAC; FT – próbka przesączu po związaniu białek do złoża Ni-NTA, W0 – próbka przesączu po płukaniu złoża buforem A; D2 – próbka po płukaniu złoża buforem z 35 mM imidazolem; E2-4 – połączone frakcje po elucji ze złoża buforem z 200 mM imidazolem; FT2 – przesącz po drugiej IMAC; Z – białka związane do złoża po drugiej IMAC; F0 – próbka przed SEC; A7-A10 – frakcje po SEC. Próbkę standaryzowano na 5  $\mu$ g hN1.

zawiera natomiast cztery szczyty. Pierwsze trzy cechują się znikomą absorbancją A280. Czwarty szczyt o  $V_e$  równej 12,12 ml wykazuje maksymalną wartość A280 równą 1,57. Estymowana zawartość gN1 w połączonych frakcjach (H1-G2) wynosiła 3,8 mg. Co ciekawe, profil elucji hN1 podczas SEC cechował się znacznie większą symetrią podczas nałożenia na kolumnę mniejszych ilości białka oraz  $V_e$  równą 11,92 ml (**Rys. S2A**). Podobnie, profil elucji gN1 przy mniejszym stężeniu białka na kolumnie (dane niepokazane) również cechował się znacznie większą symetrią i  $V_e$  równą 11,88 ml. Analiza SDS-PAGE próbek po oczyszczeniu widocznie wskazuje obecność hN1 (**Rys. 4.3C**) i gN1 (**Rys. 4.4C**) w ekstrakcie komórkowym

(ślady PT). Wyrażna jest również redukcja intensywności prążka pochodzącego od hN1 po związaniu do złoża w przesączu (ślady FT). Podczas płukania (ślad D2) część zanieczyszczeń została zwolniona ze złoża jednak widoczne były również straty hN1. Po trawieniu (ślady Traw.) widoczne było zwiększenie ruchliwości elektroforetycznej pasma odpowiadającego hN1 oraz gN1 i jednocześnie całkowite usunięcie znacznika histydylowego którego rozmyty prążek również był obserwowany w żelu przy około 5 kDa (ślad Traw.). Druga IMAC (**Rozdział 3.2.3.2**) pozwoliła na oddzielenie większości znacznika od hN1 i gN1 (ślady FT2) oraz proteazy HRV3C, która również zawierała znacznik histydylowy. Dodatkowo usunięto również część innych zanieczyszczeń, które pozostały związane do złoża (porównaj ślady FT2 i Z).



**Rys. 4.4** Oczyszczanie gN1

(A) Profil elucji gN1 podczas IMAC. D1–D10 – frakcje zwolnione ze złoża buforem zawierającym 35 mM imidazol, E1–E10 – frakcje zwolnione ze złoża pod wpływem buforu z 200 mM imidazolem. Kolorem purpurowym zaznaczono połączone frakcje; (B) Profil elucji gN1 podczas SEC. Podano wartości  $V_e$  i A280 wybranych szczytów; (C) Analiza SDS-PAGE oczyszczania gN1. M2 – standardy białkowy PageRuler® Broad Range; PT – próbka cieczy przed IMAC; FT – próbka przesączu po związaniu białek do złoża Ni-NTA; W0 – próbka przesączu po płukaniu złoża buforem A; E2–4 – połączone frakcje po elucji ze złoża buforem z 200 mM imidazolem; FT2 – przesącz po drugiej IMAC; Z – białka związane do złoża po drugiej IMAC; F0 – próbka przed SEC; G1, H1–G2, A8–A10, G8–10 – połączone frakcje po SEC. Próbkę standaryzowano na 5  $\mu$ g gN1.

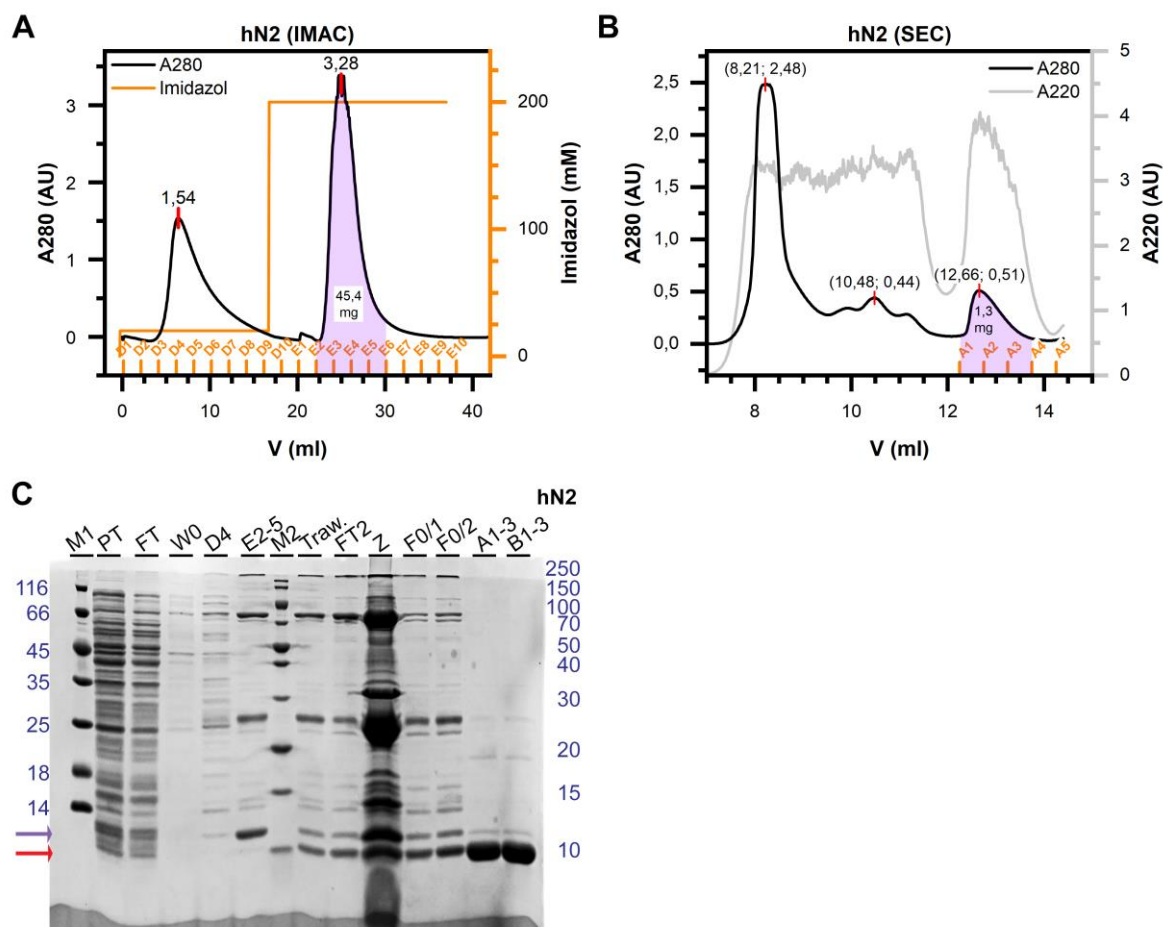
Niewielka ilość zanieczyszczeń obecna była jednak w próbkach po SEC gN1 pochodzących z ramienia wstępującego. Pozostałe próbki hN1 po SEC (ślady A7–A10) oraz gN1 (ślady H1–G2, A8–10, G8–10) charakteryzowały się  $MW_{app}$  zbliżoną do teoretycznej (**Tab. 3.8**) i stopniem czystości wynoszącym 96–98% na podstawie analizy SDS-PAGE, odpowiednim do dalszych badań.

Podczas jednej preparacji hN1 i gN1 wykonywano od 2–3 rozdzielów metodą SEC ostatecznie osiągając wydajność na poziomie 1,3–2,5 mg białka z litra hodowli i stopniu czystości 96–98%.

#### 4.2.1.2 *Oczyszczanie hN2*

Podobnie postępowano w przypadku hN2, przy czym podczas IMAC stosowano stężenie imidazolu równe 20 mM w buforze A1 (**Rozdział 3.2.3.2**). Typowy profil elucji hN2 podczas IMAC przedstawiono na **Rys. 4.5A**. Estymowana zawartość hN2 we frakcjach E2–5 połączonych po IMAC wyniosła 45,4 mg. Profil elucji hN2 po SEC przedstawiono na **Rys. 4.5B**. Widoczne są na nim trzy szczyty. Pierwszy wykazuje największą wartość A280 w szczycie równą 2,48 i  $V_e$  równą 8,21 ml, co kontrastuje z wynikami uzyskanymi dla hN1 i gN1. Drugi szczyt o  $V_e$  równej 10,48 ml wykazuje nieregularny rozkład. Trzeci cechuje  $V_e$  równa 12,66 ml i A280 równa 0,51. Przybliżona zawartość hN2 w połączonych frakcjach A1–3 wyniosła 1,3 mg. Analiza SDS-PAGE przedstawiona na **Rys. 4.5C** wskazuje, na zmniejszoną intensywność prążka odpowiadającemu hN2 w próbce przed oczyszczaniem w stosunku do pozostałych homologów nesfatyn (porównaj ślady PT na **Rys. 4.3C–Rys. 4.7C**). Widoczny jest zanik powyższego pasma po związaniu do złoża (ślad FT). Analiza SDS-PAGE ujawniła, iż niewielka ilość białka podstawowego po inkubacji z proteazą zatrzymuje znacznik histydylowy (ślad Traw.), co również jest właściwością obserwowaną jedynie dla hN2. Znacznik jest oddzielany od białka podstawowego po drugiej IMAC (ślad FT2), przy czym obecne są straty ze względu na wiązanie się hN2 zarówno ze znacznikiem jak i bez do złoża (ślad Z). Połączone próbki po SEC (ślad A1–3) cechują się  $MW_{app}$  zbliżoną do teoretycznej (**Tab. 3.8**) oraz stopniem czystości na poziomie 96%, odpowiednim do dalszych badań. Ekspresja hN2 cechowała się najmniejszą wydajnością na poziomie 0,4 mg z litra hodowli.



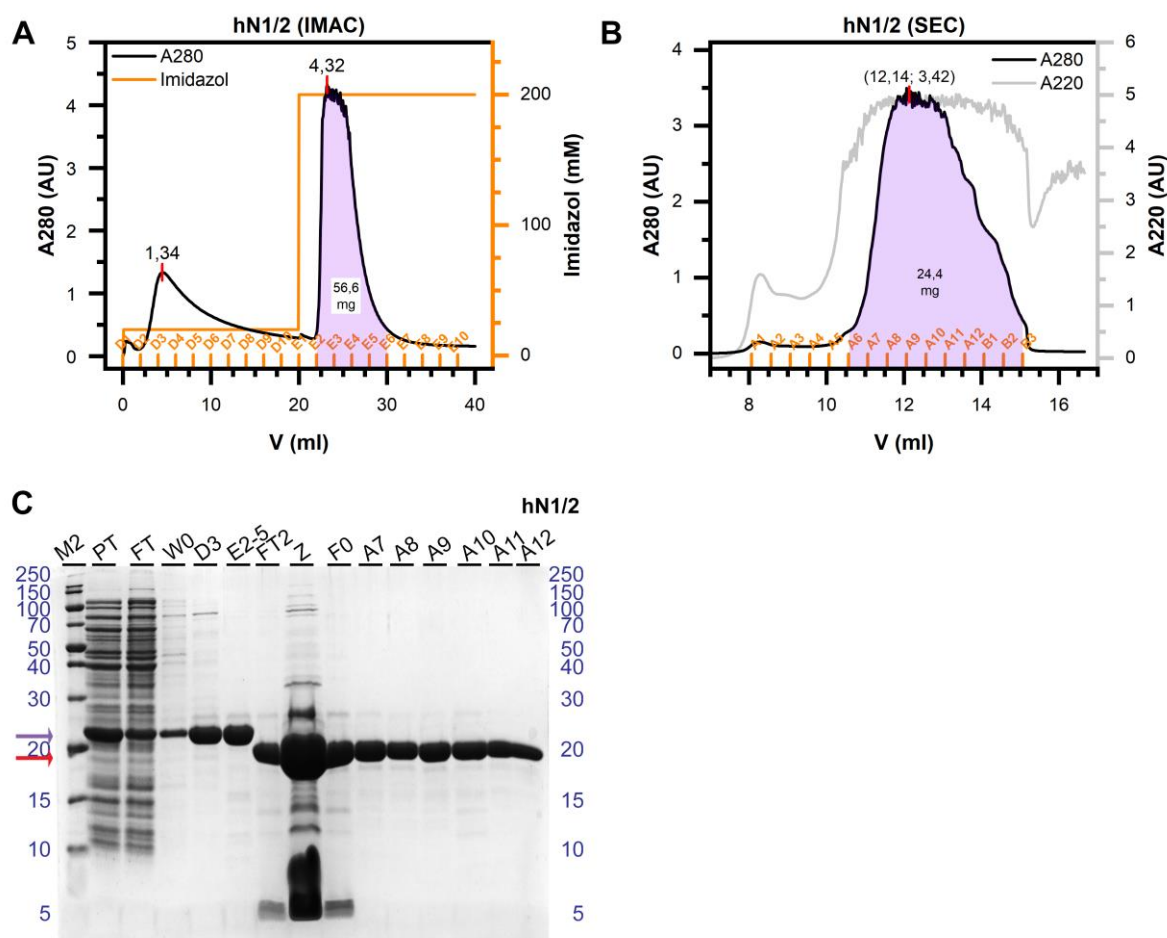


**Rys. 4.5** Oczyszczanie hN2

(A) Profil elucji hN2 podczas IMAC. D1–D10 – frakcje zwolnione ze złoża buforem zawierającym 20 mM imidazol, E1–E10 – frakcje zwolnione ze złoża pod wpływem buforu z 200 mM imidazolem. Kolorem purpurowym zaznaczono połączone frakcje; (B) Profil elucji hN2 podczas SEC. Podano wartości  $V_e$  i A280 wybranych szczytów; (C) Analiza SDS-PAGE oczyszczania hN2. M1, M2 – standardy białkowe odpowiednio: Pierce™ Unstained Protein MW Marker oraz PageRuler® Broad Range; PT – próbka cieczy przed IMAC; FT – próbka przesączu po związaniu białek do złoża Ni-NTA; W0 – próbka przesączu po płukaniu złoża buforem A; D4 – próbka po płukaniu złoża buforem z 20 mM imidazolem; E2–4 – połączone frakcje po elucji ze złoża buforem z 200 mM imidazolem; FT2 – przesącz po drugiej IMAC; Z – białka związane do złoża po drugiej IMAC; F0/1, F0/2 – próbki przed SEC; A1–3, B1–3 – połączone frakcje po SEC. Próbkki standaryzowano na 5  $\mu$ g hN2.

## 4.2.2 Oczyszczanie ludzkich i kurzych homologów N1/2

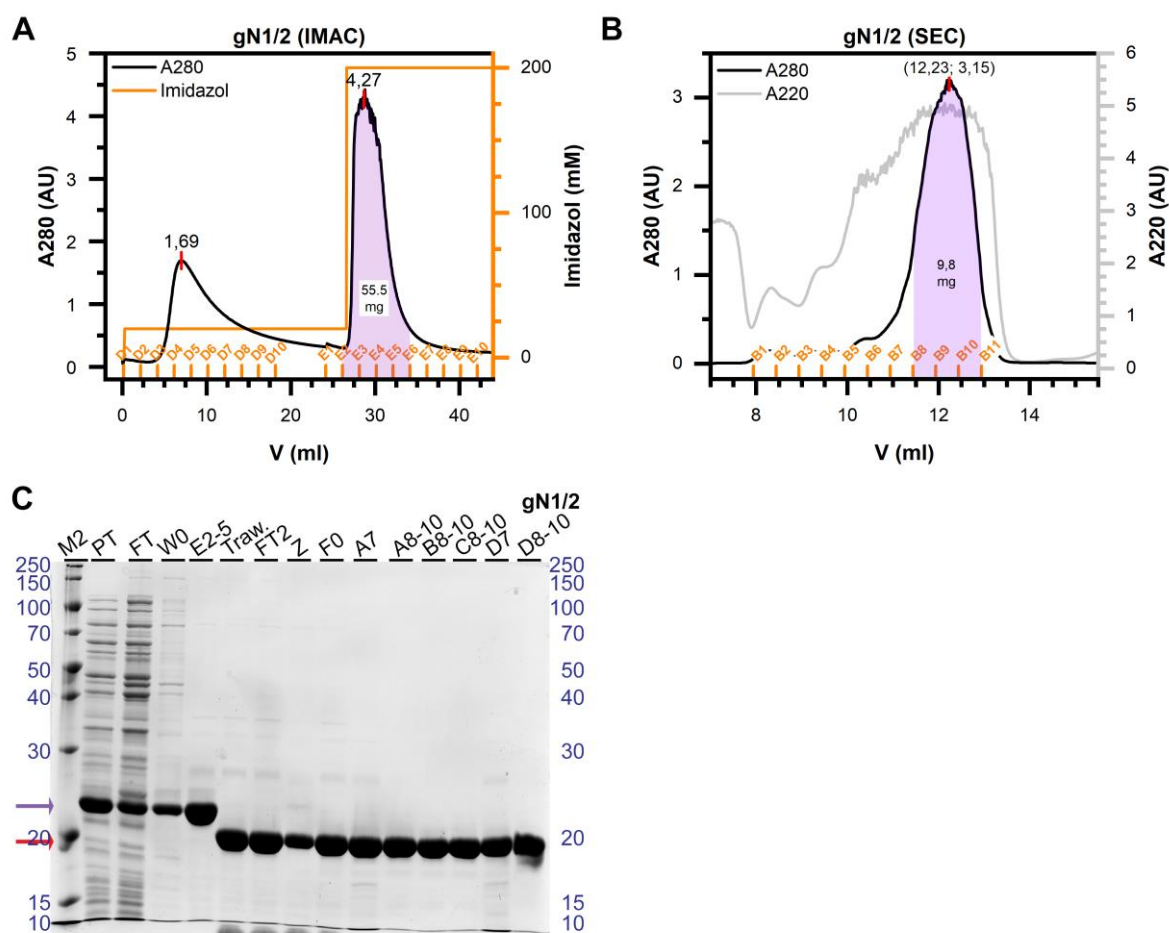
Reprezentatywny profil elucji podczas IMAC hN1/2 i gN1/2 przedstawiono odpowiednio na **Rys. 4.6A** i **Rys. 4.7A**. Widoczne są na nich dwa szczyty. Estymowana zawartość białka w połączonych frakcjach wyniosła 56,5 mg dla hN1/2 i 55,5 mg dla gN1/2. Typowe profile elucji hN1/2 i gN1/2 na kolumnie Superdex 75 Increase 10/300 GL przedstawiono na **Rys. 4.6B** oraz **Rys. 4.7B**. Widoczny jest na nich jeden szeroki i nieregularny szczyt o  $V_e$  równej odpowiednio 12,14 ml i 12,23 ml. Estymowana zawartość hN1/2 i gN1/2 we frakcjach po elucji wynosiła 24,4 mg dla hN1/2 oraz 9,8 mg dla gN1/2. Profil elucji hN1/2 po SEC



**Rys. 4.6** Oczyszczanie hN1/2

(A) Profil elucji hN1/2 podczas IMAC. D1-D10 – frakcje zwolnione ze złoża buforem zawierającym 20 mM imidazol, E1-E10 – frakcje zwolnione ze złoża pod wpływem buforu z 200 mM imidazolem. Kolorem purpurowym zaznaczono połączone frakcje; (B) Profil elucji hN1/2 podczas SEC; (C) Analiza SDS-PAGE oczyszczania hN1/2. M2 – standard białkowy PageRuler® Broad Range; PT – próbka cieczy przed IMAC; FT – próbka przesączu po związaniu białek do złoża Ni-NTA; W0 – próbka przesączu po płukaniu złoża buforem A; D3 – próbka po płukaniu złoża buforem z 20 mM imidazolem; E2-5 – połączone frakcje po elucji ze złoża buforem z 200 mM imidazolem; FT2 – przesącz po drugiej IMAC; Z – białka związane do złoża po drugiej IMAC; F0 – próbka przed SEC; A7-12 frakcje po SEC. Próbkę standaryzowano na 5  $\mu$ g hN1/2.

charakteryzował się znacznie większą symetrią przy niższym stężeniu białka na kolumnie oraz  $V_e$  równą 11,48 ml (**Rys. S2B**). Analiza SDS-PAGE (**Rys. 4.6C** i **Rys. 4.7C**) wykazała dużą zawartość hN1/2 i gN1/2 w ekstrakcie komórkowym (ślady PT) oraz wysoki stopień ich związania do złoża (ślady FT). Płukanie złoża buforem z imidazolem w stężeniu 20 mM pozwoliło na usunięcie części zanieczyszczeń (ślad D3, **Rys. 4.6C**). Połączone frakcje po IMAC (ślady E2–5) wykazywały bardzo duży stopień zagęszczenia i oczyszczenia białek. Druga IMAC pozwoliła na oddzielenie znacznika od obu białek (ślady FT2), przy czym hN1/2 oraz gN1/2 nawet bez znacznika wykazywały powinowactwo do złoża Ni-NTA (ślady Z). Frakcje po SEC (ślad A7-A12, **Rys. 4.6C**; ślady A8-10, B8-10, C8-10, D8-10, **Rys. 4.7C**) cechowały się  $MW_{app}$



**Rys. 4.7** Oczyszczanie gN1/2

(A) Profil elucji gN1/2 podczas IMAC. D1-D10 – frakcje zwolnione ze złoża buforem zawierającym 20 mM imidazol, E1-E10 – frakcje zwolnione ze złoża pod wpływem buforu z 200 mM imidazolem. Kolorem purpurowym zaznaczono połączone frakcje; (B) Profil elucji gN1/2 podczas SEC; (C) Analiza SDS-PAGE oczyszczania gN1/2. M2 – standard białkowy PageRuler® Broad Range; PT – próbka cieczy przed IMAC; FT – próbka przesączu po związaniu białek do złoża Ni-NTA; W0 – próbka przesączu po płukaniu złoża buforem A; D3 – próbka po płukaniu złoża buforem z 20 mM imidazolem; E2-5 – połączone frakcje po elucji ze złoża buforem z 200 mM imidazolem; FT2 – przesącz po drugiej IMAC; Z – białka związane do złoża po drugiej IMAC; F0 – próbka przed SEC; A7, A8-10, B8-10, C8-10, D7, D8-10 frakcje po SEC. Próbkę standaryzowano na 5 µg gN1/2.

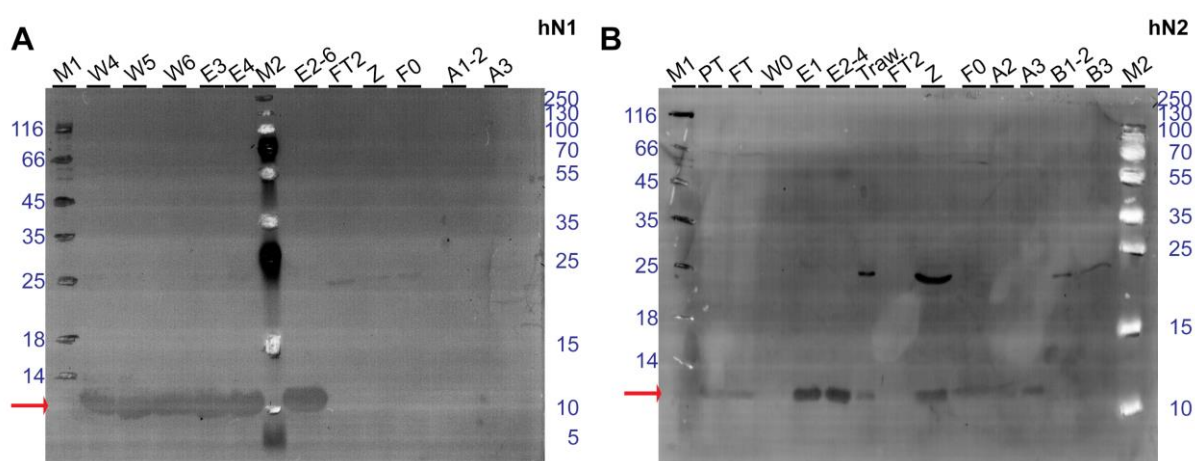
zbliżoną do teoretycznej (**Tab. 3.8**) i stopniem oczyszczenia na poziomie 96–98%, odpowiednim do dalszych badań.

Podczas oczyszczania hN1/2 oraz gN1/2 wykonywano 3–4 rozdziały SEC i tym samym uzyskano wydajności preparacji obu białek na poziomie 8–10 mg z litra hodowli.

### 4.2.3 Identyfikacja nesfatyn

#### 4.2.3.1 Identyfikacja nesfatyn techniką Western-blot

Wyniki identyfikacji hN1 oraz hN2 techniką Western-blot przedstawiono na **Rys. 4.8**. W przypadku obu homologów obserwowano silny i specyficzny sygnał we frakcjach przed trawieniem. Po usunięciu znacznika przy pomocy proteazy HRV3C nie obserwowano sygnału pochodzącego od obu białek. Obecny był natomiast sygnał przy ok 24 kDa odpowiadający proteazie, która również zawierała znacznik histydylowy na końcu N. Otrzymane wyniki potwierdzają zatem obecność hN1 oraz hN2 we frakcjach po indukcji (śląd PT) oraz we frakcjach FT, W4-W6, E1, E2-4, E2-6, jak i skuteczne usunięcie znacznika histydylowego z końcowego preparatu.



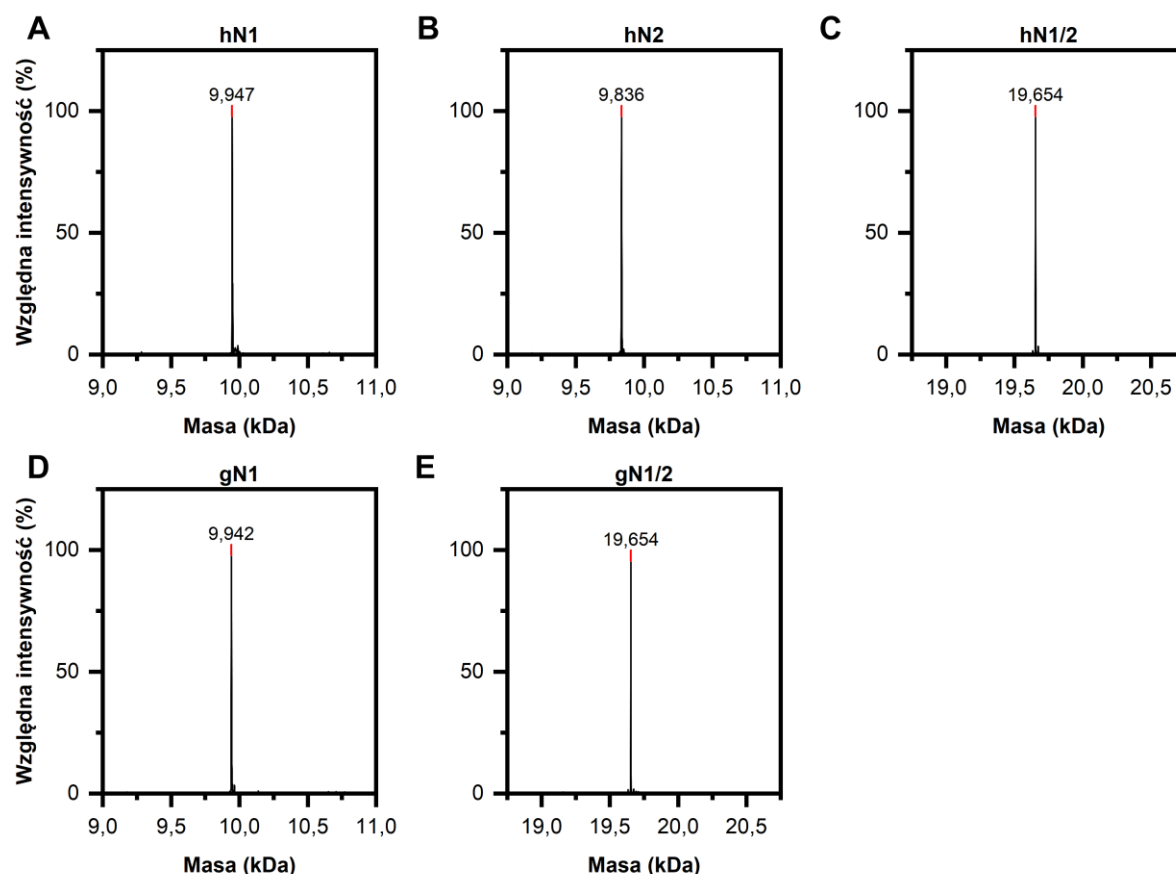
**Rys. 4.8** Identyfikacja ludzkich nesfatyn techniką Western-blot

Wyniki analizy Western-blot (A) hN1 oraz (B) hN2. M1, M2 – standardy białkowe odpowiednio: Pierce™ Unstained Protein MW Marker oraz PageRuler® Broad Range Prestained; PT – próbka przed IMAC; FT – próbka przesącza; W0 – próbka przesącza po płukaniu złoża buforem A; W4-6 – próbka po płukaniu złoża buforem z 20 mM imidazolem; E1-4 – próbka po elucji ze złoża buforem z 200 mM imidazolem. FT2 – próbka przesącza po drugiej IMAC; Z – białka związane do złoża po drugiej IMAC; F0 – próbka przed SEC; A1-3, B1-3 – próbki po SEC.

#### 4.2.3.2 Wyznaczanie mas cząsteczkowych nesfatyn

Wyznaczenie mas cząsteczkowych nesfatyn (**Rozdział 3.2.4.4**) zlecono Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (IBB PAN, Warszawa, Polska). Wyniki pomiarów masy cząsteczkowej przedstawione zostały na **Rys. 4.9**. Wyznaczone masy cząsteczkowe wynoszą odpowiednio: 9,947 kDa (hN1); 9,836 kDa (hN2); 19,654 kDa (hN1/2); 9,942 kDa (gN1) oraz 19,654 kDa (gN1/2). Wyznaczone masy cząsteczkowe wykazują bardzo dobrą zgodność z masami teoretycznymi podanymi w **Tab. 3.8** i różnią się od nich o 1 lub 3 Da. Nie zaobserwowane również sygnały przy mniejszych masach

cząsteczkowych wskazujących na obecność fragmentów białka. Nie obserwowano także sygnałów przy wyższych masach molekularnych wskazujących na obecność zanieczyszczeń (nie pokazano). Uzyskane wyniki potwierdzają zatem tożsamość i stabilność otrzymanych białek. Ze względu na umiarkowaną wydajność preparacji gN2 (podobnie jak w przypadku hN2) niemożliwe było otrzymanie gN2 w ilości pozwalającej na przeprowadzenie wszystkich badań analogicznych jak dla homologu ludzkiego (w tym wyznaczenia masy cząsteczkowej) przy jednoczesnym zachowaniu założonych ram czasowych projektu.



Rys. 4.9 Widma masowe nesfatyn

Widmo masowe (A) hN1; (B) hN2; (C) hN1/2; (D) gN1; (E) gN1/2.



### 4.3 ANALIZY IN SILICO

Analizę *in silico* IDRs ludzkich i kurzych homologów nesfatyn prowadzono przy użyciu algorytmu PONDR-VLXT (**Rozdział 3.2.5**). Przewiduje on nieuporządkowanie wykorzystując sieci neuronalne, które porównują sekwencję aminokwasową danego białka do zbioru danych otrzymanych na podstawie regionów białek referencyjnych, których brakowało w ich mapach gęstości elektronowej [180]. Jako metodę komplementarną do algorytmu PONDR zastosowano

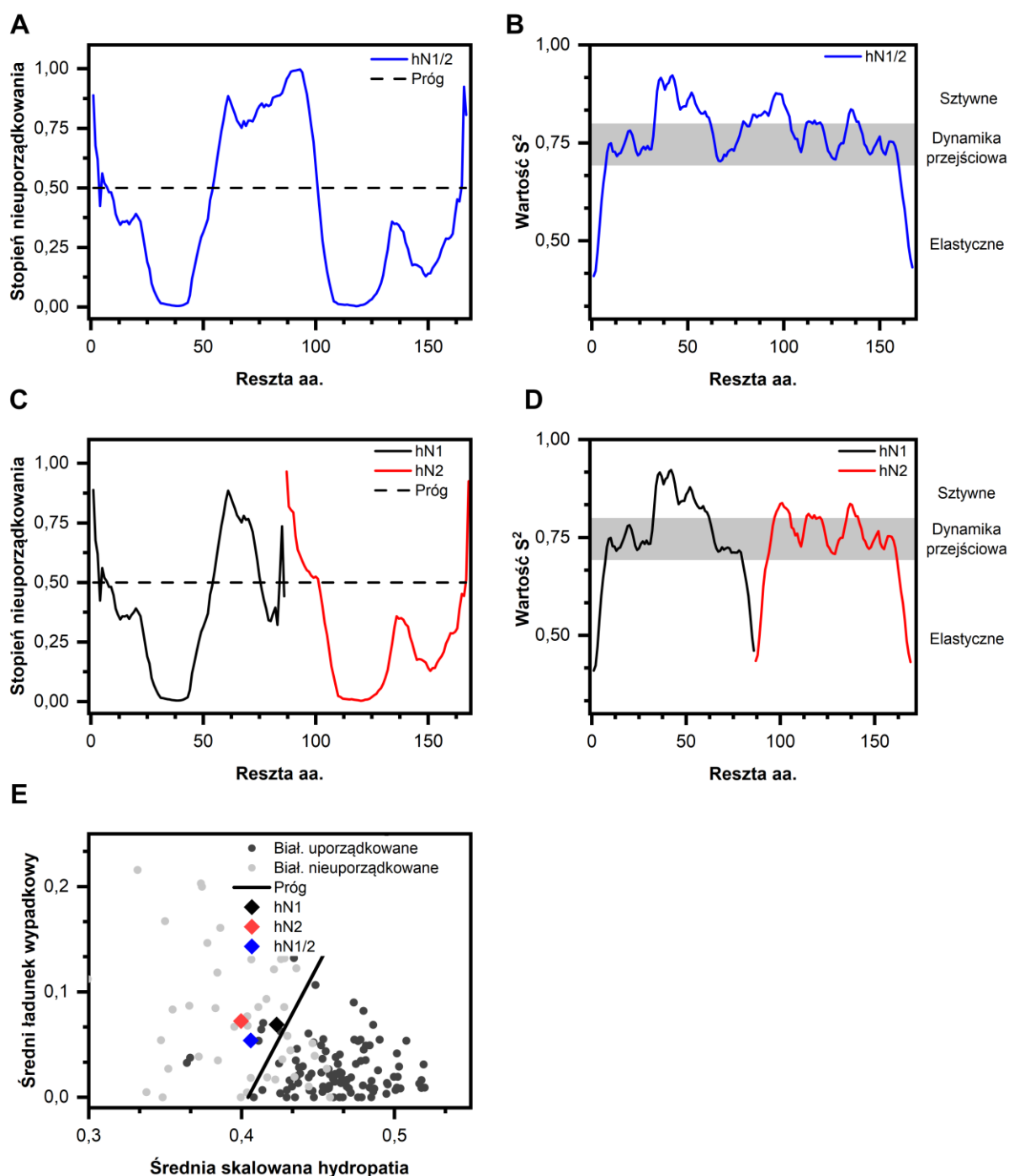
algorytm DynaMine (**Rozdział 3.2.5**), przewidujący dynamikę szkieletu głównego białek na podstawie parametru  $S^2$ , który obliczany jest na podstawie bazy danych przesunięć chemicznych białek z badań NMR [181]. Parametr  $S^2$  jest zależny od sekwencji i jest on miarą swobody rotacyjnej wektora wiązania N-H. Jego wartości powyżej 0,8 wskazują na region o stabilnej (uporządkowanej) strukturze podczas gdy wartości poniżej 0,69 wskazują na obecność regionu o wysokiej elastyczności, charakterystycznej dla IDRs. Wartości  $S^2$  w zakresie 0,69–0,8 można rozpatrywać jako region o przejściowej dynamice [182].

### 4.3.1 Przewidywania IDRs nesfatyn

---

#### 4.3.1.1 Przewidywania IDRs w obrębie ludzkich nesfatyn

Wyniki analizy *in silico* ludzkich nesfatyn przedstawione zostały na **Rys. 4.10**. Analiza sekwencji hN1/2 algorytmem PONDR (**Rys. 4.10A**) wykazała istnienie trzech regionów o charakterze IDRs powyżej progowej wartości (0,5) stopnia nieuporządkowania dla reszt aminokwasowych: 1–6; 55–100 i 165–167. Odpowiada to zawartości struktur nieuporządkowanych na poziomie 33%. Struktura hN1/2 pomiędzy 7–54 i 101–164 resztą aminokwasową została natomiast scharakteryzowana jako uporządkowane. W związku z powyższym struktura hN1/2 jest przewidywana jako „mozaikowata” według algorytmu PONDR. Algorytm DynaMine wskazał dwa krótkie regiony na obu końcach hN1/2 (**Rys. 4.10B**) jako IDRs. Struktura uporządkowana została przewidziana w sekwencji pomiędzy resztami aminokwasowymi 33–61 oraz 83–103. Cała pozostała sekwencja znajduje się głównie w rejonie odpowiadającym strukturze o dynamice przejściowej. Podobnie jak w przypadku przewidywań opisanych dla hN1/2, trzy regiony w sekwencji hN1 (**Rys. 4.10C**) zostały wyróżnione jako IDRs przez algorytm PONDR. Mianowicie były to regiony pomiędzy resztami aminokwasowymi: 1–7; 55–75 i 84–85. Odpowiada to udziałowi IDRs w strukturze hN1 na poziomie 35%. Struktura hN1 pomiędzy resztami aminokwasowymi 8–54 oraz 76–73 została przewidziana jako uporządkowana. Z drugiej strony algorytm DynaMine ponownie wyróżnił jedynie krótkie fragmenty na obu końcach hN1 jako IDRs. Struktura uporządkowana została przypisana sekwencji pomiędzy 33–62 resztą aminokwasową. Pozostała część sekwencji znajduje się w rejonie odpowiadającej dynamice przejściowej. Z kolei w strukturze hN2 (**Rys. 4.10C**) dwa regiony pomiędzy resztami aminokwasowymi: 1–16 i 81–83 zostały przewidziane jako IDRs przy pomocy algorytmu PONDR. Odpowiada to zawartości IDRs w strukturze hN2 na poziomie 23%. Przewidywania wykonane algorytmem DynaMine (**Rys. 4.10D**) ponownie wskazują krótkie regiony obu końców hN2 jako IDRs. Sekwencja pomiędzy 11–19 oraz 50–55 resztą aminokwasową została przyporządkowana do regionu o strukturze uporządkowanej. Pozostała część sekwencji aminokwasowej hN2



**Rys. 4.10** Przewidywania IDRs ludzkich nesfatyn

(A) Wyniki przewidywania regionów IDRs w hN1 (czarna linia) oraz hN2 (czerwona linia) algorytmem PONDNR na podstawie ich struktury pierwszorzędowej. (B) Przewidywanie dynamiki łańcucha głównego hN1 (czarna linia) oraz hN2 (czerwona linia) przy pomocy algorytmu DynaMine. (C) Przewidywanie IDRs hN1/2 algorytmem PONDNR. (D) Przewidywanie dynamiki łańcucha głównego hN1/2 algorytmem DynaMine. (E) Wykres Uversky'ego sporządzonych przy pomocy bazy białek uporządkowanych (ciemnoszare punkty) oraz nieuporządkowanych (jasnoszare punkty). Czarną linią oznaczono granicę pomiędzy dwoma formami białek. Nesfatyny przedstawiono jako romby w kolorze: czarnym (hN1); czerwonym (hN2); niebieskim (hN1/2).

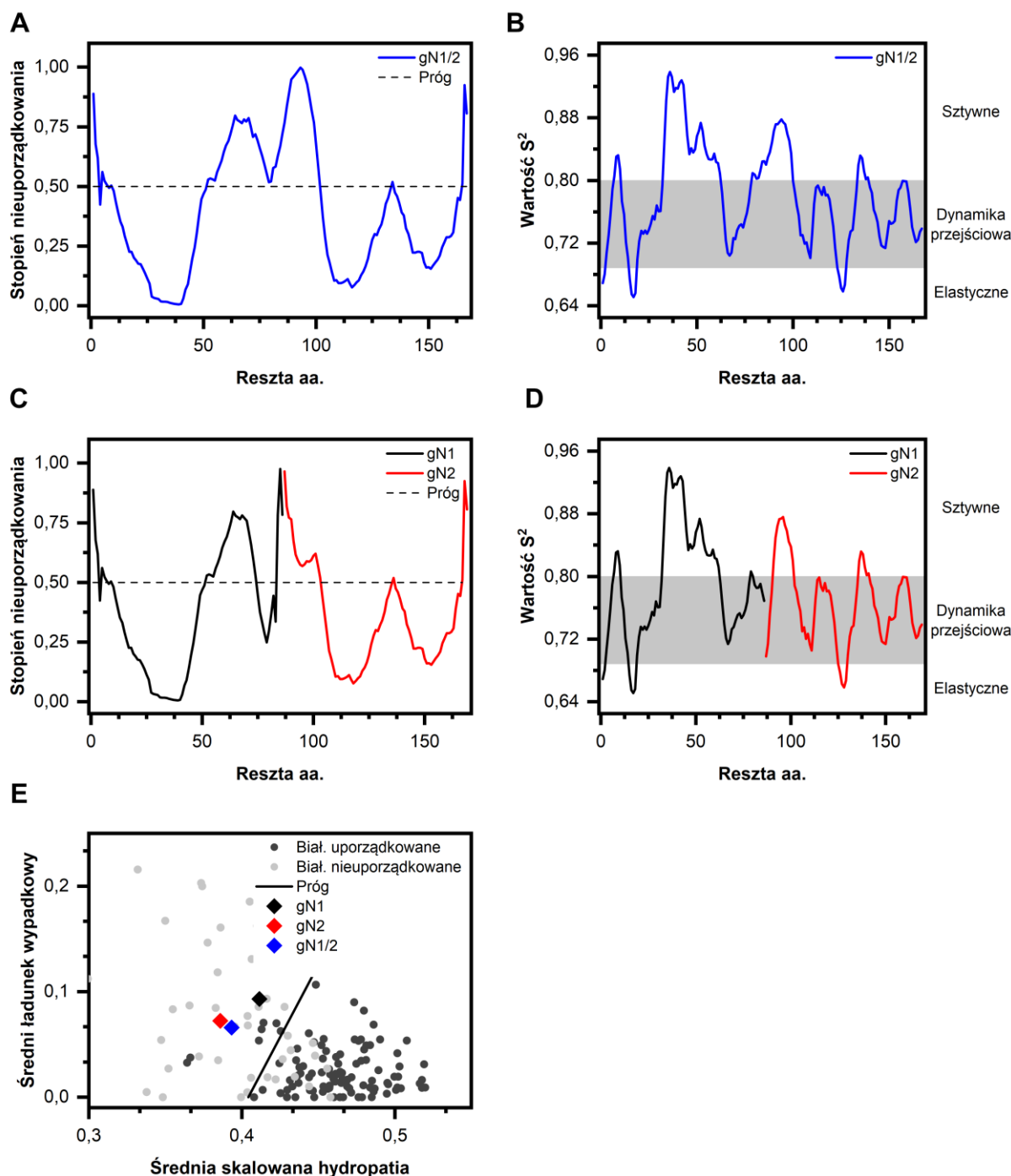
znajduje się w rejonie o dynamice przejściowej. Z kolei według wykresu Uversky'ego wszystkie ludzkie nesfatyny znalazły po stronie IPDs, co jednak warto podkreślić są one

zlokalizowane w pobliżu granicy rozdzielającej IDPs oraz białka globularne (**Rys. 4.10E**). W zawiązku z tym pomimo, iż analiza wykresu Uversky'ego wskazuje na przynależność ludzkich nesfatyn do rodziny IDPs, podczas gdy wyniki predykcji algorytmów PONDR i DynaMine przeciwnie, wszystkie wyniki zdają się wskazywać na mocną zależność struktury białek od ich mikrootoczenia. W istocie była to cecha obserwowana w wynikach wszystkich przeprowadzonych eksperymentów.

##### 4.3.1.2 Przewidywania IDRs kurzych nesfatyn

Wyniki analizy *in silico* kurzych nesfatyn zostały przedstawione na **Rys. 4.11**. Podobnie jak w przypadku hN1/2 (**Rozdział 4.3.1.1**), w sekwencji gN1/2 zidentyfikowane zostały 3 regiony jako potencjalne IDRs (**Rys. 4.11A**) przez algorytm PONDR pomiędzy: 1–9; 52–101 i 165–167 resztą aminokwasową. W sumie, 36% struktury gN1/2 przewidywane jest jako IDRs. Regiony przewidziane jako ustrukturyzowane obejmowały reszty aminokwasowe 10–51 i 102–164. Wyniki przewidywań DynaMine (**Rys. 4.11B**) wskazują dwa regiony jako ustrukturyzowane, tj. 33–62 i 79–99. Pozostała część sekwencji leży w rejonie dynamiki przejściowej. W przypadku gN1 algorytm PONDR wyróżnił trzy regiony pomiędzy resztami aminokwasowymi 1–9, 52–74, 84–86 jako potencjalne IDRs (**Rys. 4.11C**). Zatem łącznie 41% struktury gN1 jest przewidywane jako IDRs. Regiony ustrukturyzowane obejmują natomiast sekwencje pomiędzy 10–51 i 75–83 resztą aminokwasową. Algorytm DynaMine wskazuje natomiast rejon pomiędzy 7–10 i 33–62 resztą aminokwasową jako uporządkowany (**Rys. 4.11D**). Pozostała część sekwencji gN1 leży w rejonie o dynamice przejściowej. Z kolei w sekwencji hN2 algorytm PONDR wyróżnił trzy regiony jako potencjalne IDRs, tj. pomiędzy 1–17, 81–83 resztą aminokwasową (**Rys. 4.11C**). Łącznie, 25% struktury hN2 jest przewidywane jako nieustrukturyzowane. Z kolei dwa regiony zostały zakwalifikowane na podstawie wartości parametru  $S^2$  jako uporządkowane, tj. pomiędzy 5–15 i 50–55 resztą aminokwasową (**Rys. 4.11D**). Reszta sekwencji znajduje się w regionie przejściowej dynamiki strukturalnej. Kurze nesfatyny (podobnie jak homologi ludzkie) znajdują się po stronie IDPs na wykresie Uversky'ego blisko linii granicznej (**Rys. 4.11E**). Wyniki przewidywań, choć ponownie pozornie sprzeczne, zdawały się wskazywać na wysoką zależność struktury białek od ich mikrootoczenia



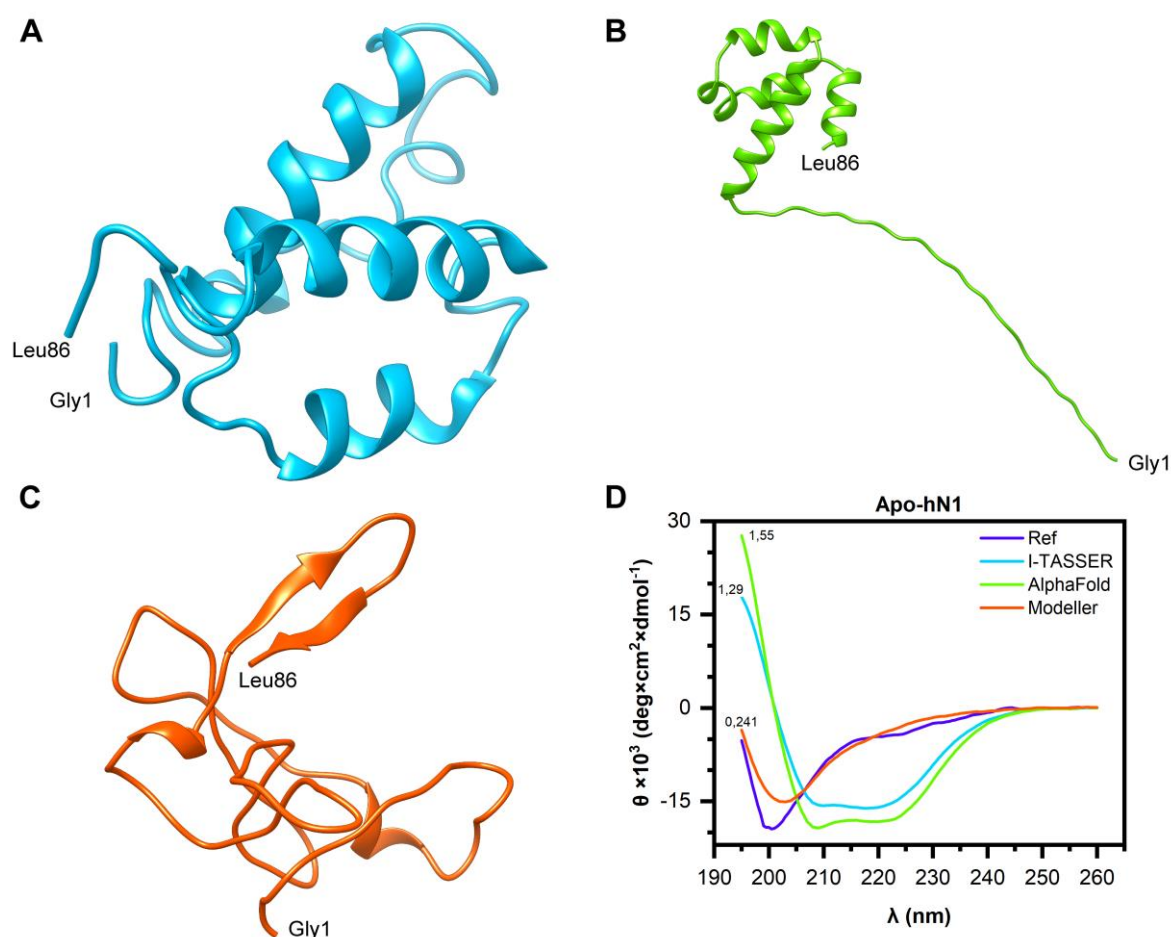


Rys. 4.11 Przewidywania IDRs kurzych nesfatyn

(A) Wyniki przewidywania regionów IDRs w gN1 (czarna linia) oraz gN2 (czerwona linia) algorytmem PONDR na podstawie ich struktury pierwszorzędowej. (B) Przewidywanie dynamiki łańcucha głównego gN1 (czarna linia) oraz gN2 (czerwona linia) przy pomocy algorytmu DynaMine. (C) Przewidywanie IDRs hN1/2 algorytmem PONDR. (D) Przewidywanie dynamiki łańcucha głównego gN1/2 algorytmem DynaMine. (E) Wykres Uversky'ego sporządzonych przy pomocy bazy białek uporządkowanych (ciemnoszare punkty) oraz nieuporządkowanych (jasnoszare punkty). Czarną linią oznaczono granicę pomiędzy dwoma formami białek. Nesfatyny przedstawiono jako romby w kolorze: czarnym (gN1); czerwonym (gN2); niebieskim (gN1/2).

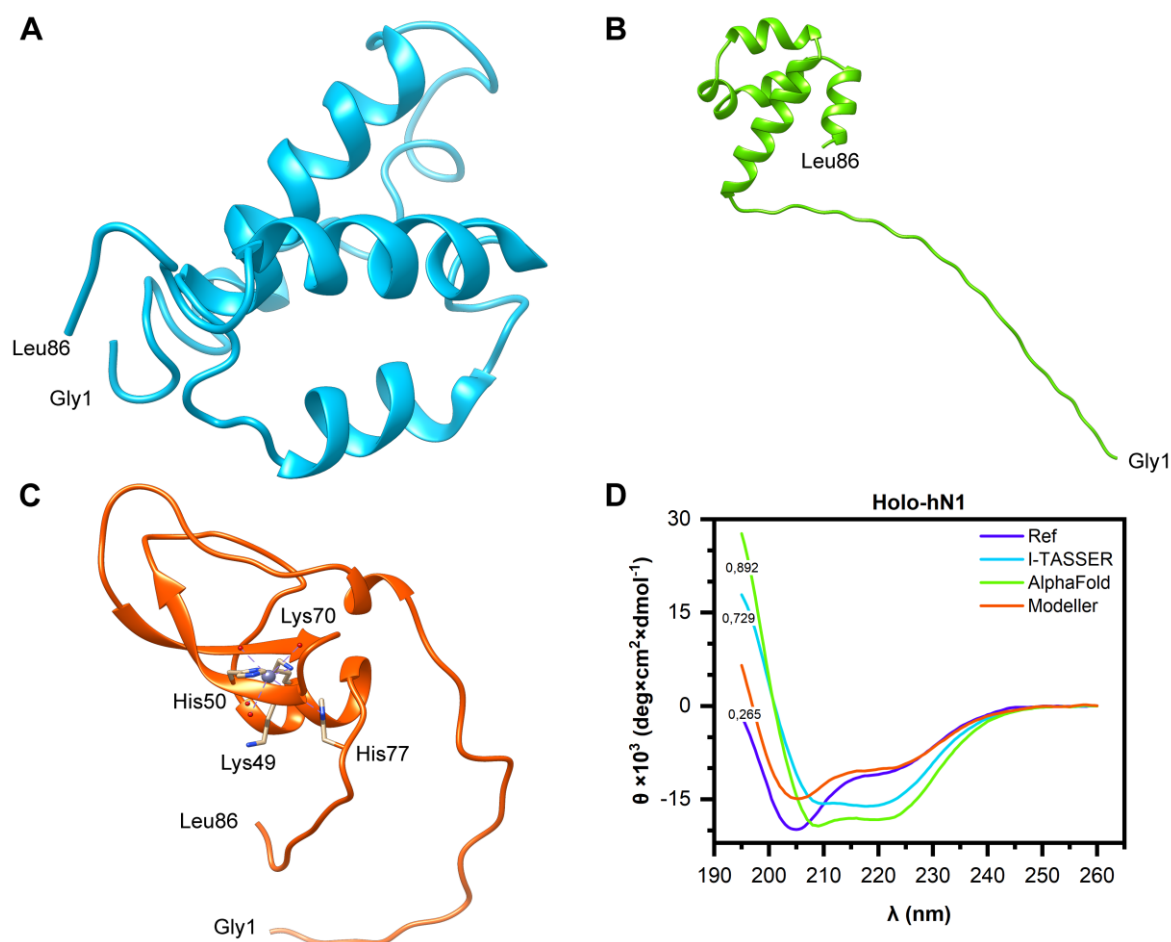
### 4.3.2 Przewidywania struktury trzeciorzędowej nesfatyn

Wyniki przewidywań i modelowania struktury trzeciorzędowej ludzkich nesfatyn za pomocą programów I-TASSER [184], AlphaFold [186] oraz Modeller [187] (**Rozdział 3.2.5**) zostały przedstawione na **Rys. 4.12**, **Rys. 4.13**, **Rys. 4.14**, **Rys. 4.15**. Otrzymany przy pomocy I-TASSER model strukturalny hN1 (**Rys. 4.12A**, **Rys. 4.13A**) cechuje się dużą zawartością  $\alpha$ -helis (pomiędzy 9–12, 29–42, 49–58 i 65–79 resztą aminokwasową) o łącznej zawartości bliskiej 50%. Dodatkowo obecne są liczne pętle/zwroty. Model hN1 wygenerowany przy pomocy AlphaFold (**Rys. 4.12B**, **Rys. 4.13B**) zawiera 58%  $\alpha$ -helis (pomiędzy 31–47, 49–57, 60–74, 77–85 resztą aminokwasową). Dodatkowo obecna jest silnie wydłużona pętla pomiędzy 1–30 resztą aminokwasową, która powinna zostać poddana relaksacji. Co ciekawe, takie pętle w modelach AlphaFold o niskiej wartości parametru pLDDT często wskazują na obecność regionów IDRs [206]. Z kolei model apo-hN1 wykonany w programie Modeller (**Rys. 4.12C**) zawiera



**Rys. 4.12** Modele strukturalne apo-hN1

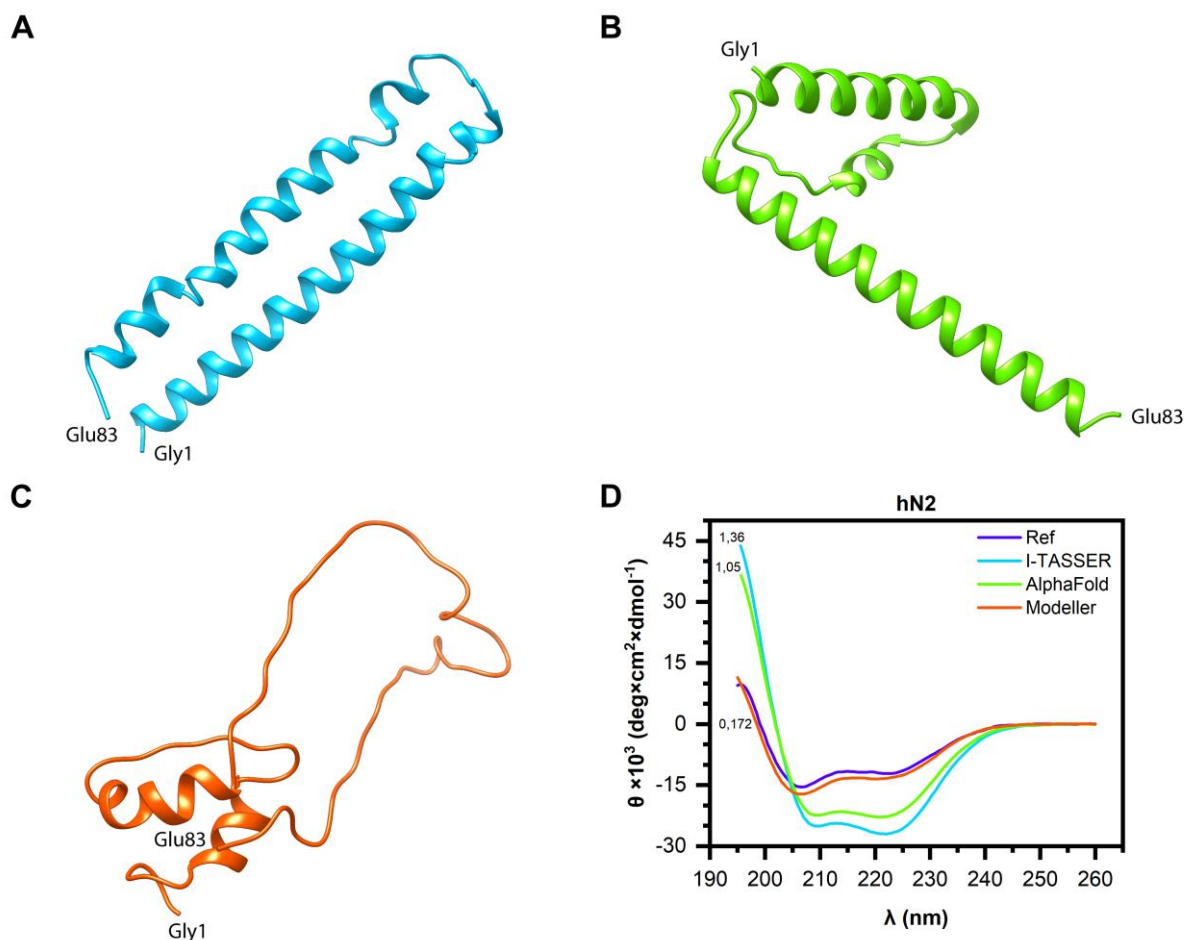
Model strukturalny apo-hN1 wygenerowany przy pomocy (A) I-TASSER; (B) AlphaFold; (C) Modeller. (D) Widma CD wygenerowane na podstawie przedstawionych modeli wraz z ich NRMSD względem widma eksperymentalnego (kolor niebieski). Białka były modelowane wraz z aminokwasami pochodzącymi z wektora.



**Rys. 4.13** Modele strukturalne holo-hN1

Model strukturalny holo-hN1 wygenerowany przy pomocy (A) I-TASSER; (B) AlphaFold; (C) Modeller. (D) Widma CD wygenerowane na podstawie przedstawionych modeli wraz z ich NRMSD względem widma eksperymentalnego (kolor niebieski). Białka były modelowane wraz z aminokwasami pochodzącymi z wektora.

głównie pętle oraz szczytkowe ilości nici  $\beta$  (zawartość około 9%, pomiędzy 73–76, 82–85 resztą aminokwasową, tworzącymi zakręt  $\beta$ ) i krótkie  $\alpha$ -helisy (zawartość około 8%, pomiędzy 18–21, 68–70 resztą aminokwasową). Model holo-hN1 wykonany w programie Modeller (**Rys. 4.13C**) zawiera natomiast dwie nici  $\beta$  (zawartość około 14%, pomiędzy 37–43, 48–54 resztą aminokwasową) tworzące prawostronnie zgiętą harmonijkę  $\beta$ . Ze względu na obecność tej struktury w przewidzianym motywie wiążącym HFREX<sub>n</sub>H i przestrzenne oddalenie reszty Glu53, miejsce wiążące Zn(II) tworzone jest przez reszty: His50, Lys70, His77 oraz cząsteczki wody. Kompleks ma geometrię pryzmy trygonalnej. W strukturze obecne są dodatkowo  $\alpha$ -helisy (zawartość 14%, pomiędzy 22–25 i 67–74 resztą aminokwasową). Resztę struktury tworzą liczne pętle. Wygenerowane przy pomocy algorytmu SESCO (**Rozdział 3.2.5**) widma dichroizmu kołowego powyższych modeli w porównaniu do widm eksperymentalnych stanów apo- i holo-hN1 przedstawiono na **Rys. 4.12D** oraz **Rys. 4.13D**. Wygenerowane *in silico* na podstawie



**Rys. 4.14** Modele strukturalne hN2

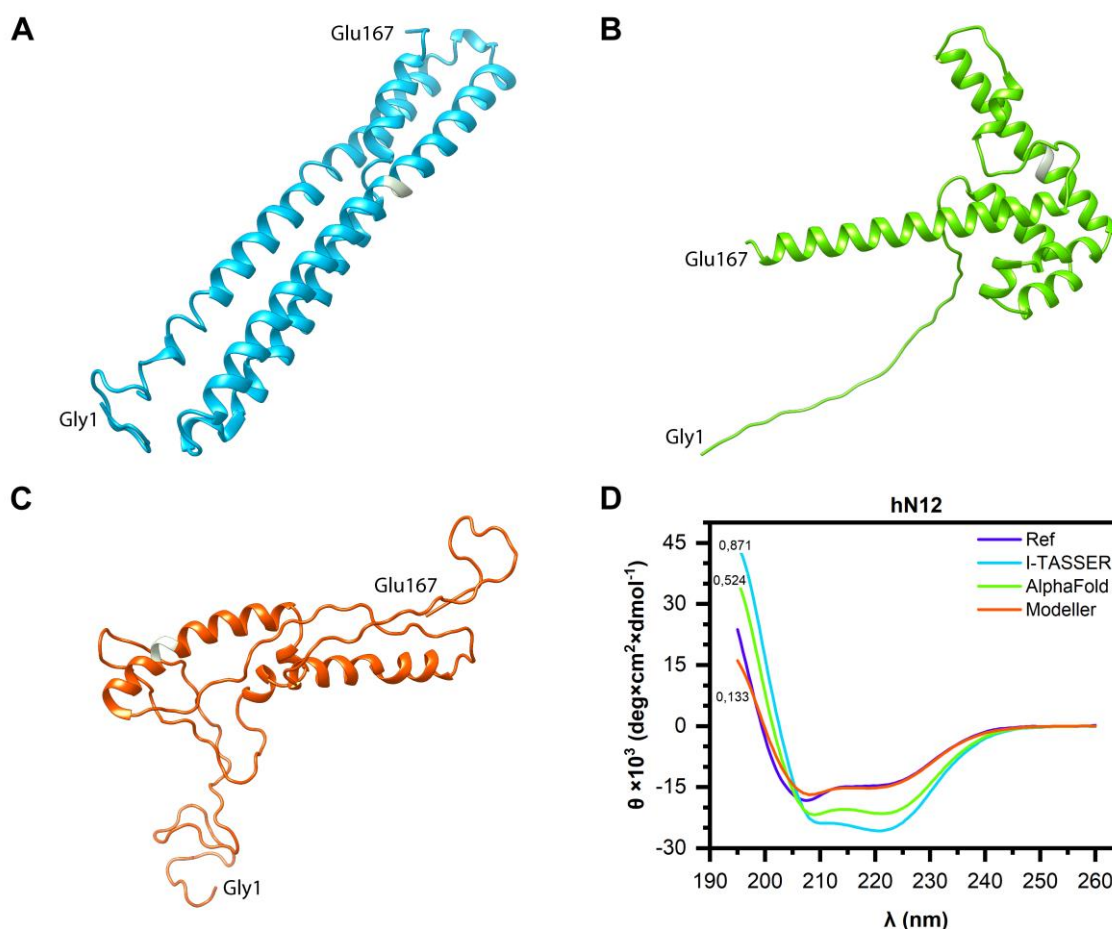
Model strukturalny hN2 wygenerowany przy pomocy (A) I-TASSER; (B) AlphaFold; (C) Modeller. (D) Widma CD wygenerowane na podstawie przedstawionych modeli wraz z ich NRMSD względem widma eksperymentalnego (kolor niebieski). Białka były modelowane wraz z aminokwasami pochodzącymi z wektora.

modeli I-TASSER oraz AlphaFold widma dichroizmu kołowego wykazują NRMSD w stosunku do eksperymentalnego widma stanu apo- równe 1,55 i 1,29, podczas gdy w porównaniu do stanu holo- wynosi ono 0,892 i 0,729. Wydaje się to wskazywać na znaczne odstępstwa tych struktur od rzeczywistego układu. Z drugiej strony NRMSD struktur wykonanych w programie Modeller wynosi 0,241 dla stanu apo oraz 0,265 dla stanu holo. Powyższe wyniki sugerują, iż struktury te najlepiej opisują dany układ spośród wygenerowanych modeli. Warto jednak zaznaczyć, iż możliwe jest istnienie kilku topologii dających podobne widmo dichroizmu kołowego.

Struktura trzeciorzędowa hN2 wygenerowana przez I-TASSER (**Rys. 4.14A**) wykazuje cylindryczny i wydłużony kształt. Obecne są  $\alpha$ -helisy pomiędzy 2–35, 37–40, 47–50, 55–70 i 73–80 resztą aminokwasową, co przekłada się na ich zawartość równą 80%. Podobne wyniki uzyskano przy pomocy AlphaFold (**Rys. 4.14B**). W tym wypadku zawartość  $\alpha$ -helis wyniosła

78% (które zlokalizowane są pomiędzy 2–24, 28–35, 48–81 resztą aminokwasową). Z kolei model hN2 wygenerowany przy pomocy programu Modeller (**Rys. 4.14C**) zawiera znacznie mniej  $\alpha$ -helis, około 23% (pomiędzy 9–16, 28–38 resztą aminokwasową). Obecne są również pętle, z których najdłuższa (pomiędzy 39–83 resztą aminokwasową) jest mocno wysunięta w stosunku do  $\alpha$ -helis. Porównanie widm wygenerowanych *in silico* na podstawie powyższych modeli do widma eksperymentalnego hN2 wskazuje, iż najmniejsze NRMSD otrzymano dla modelu otrzymanego przez program Modeller (0,172). Duże wartości NRMSD odnotowano natomiast dla modeli hN2 otrzymanych przy pomocy I-TASSER (1,36) oraz AlphaFold (1,05). Ponownie zatem to model otrzymany przy pomocy programu Modeller wydaje się najlepiej opisywać strukturę hN2.

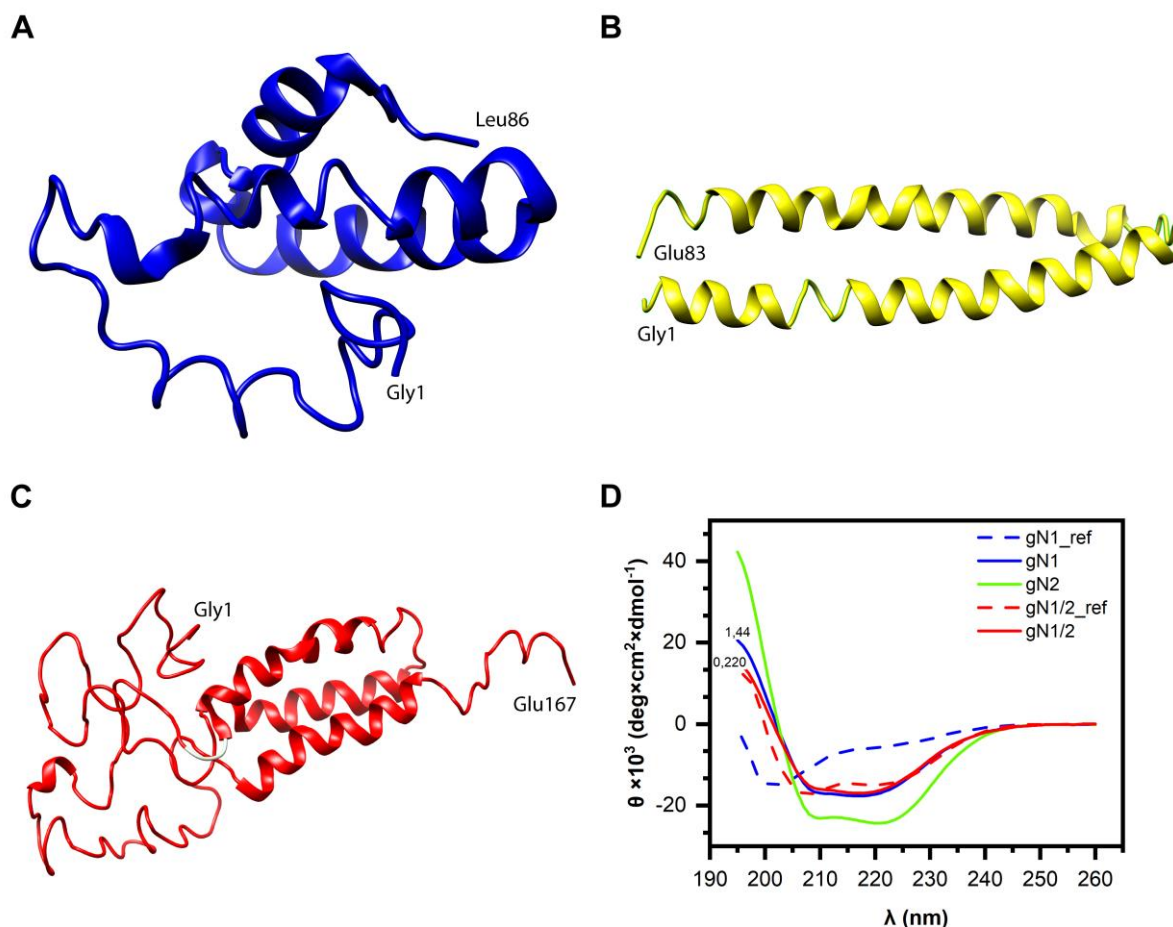
Model hN1/2 wygenerowany przy pomocy I-TASSER przedstawiono na **Rys. 4.15A**. Wykazuje on cylindryczną budowę, podobną do włókien kolagenowych [207]. W związku z tym główny element struktury drugorzędowej modelu stanowią  $\alpha$ -helisy, które znajdują się pomiędzy 18–20, 26–41, 46–61, 64–66, 68–116, 121–124, 126–129, 131–150 i 154–163 resztą aminokwasową. Odpowiada to zawartości  $\alpha$ -helis na poziomie 69%. Model hN1/2 wygenerowany przy pomocy AlphaFold (**Rys. 4.15B**) również cechuje się wysokim udziałem  $\alpha$ -helis (62%; pomiędzy 35–47, 49–57, 60–65, 68–74, 77–104, 112–118, 132–165 resztą aminokwasową). Ponadto, wydaje się on być złożeniem struktur izolowanych hN1 (**Rys. 4.12B**) oraz hN2 (**Rys. 4.14B**). Model hN1/2 otrzymany przy pomocy programu Modeller (**Rys. 4.15C**) zawiera z kolei 29%  $\alpha$ -helis (pomiędzy 62–65, 68–70, 73–96, 121–141 resztą aminokwasową). Jego struktura przypomina pre-stopioną globulę z przeplatającymi się fragmentami IDR oraz uporządkowanymi. W odniesieniu do eksperymentalnego widma dichroizmu kołowego widmo hN1/2 otrzymane na podstawie modelu wygenerowanego przy pomocy programu Modeller ponownie cechuje się najmniejszą wartością NRMSD (0,133; **Rys. 4.15D**). Widma modeli otrzymanych przy pomocy I-TASSER oraz AlphaFold wykazują znacznie większe wartości NRMSD wynoszące odpowiednio 0,871 oraz 0,524 (**Rys. 4.15D**).



**Rys. 4.15** Model struktury trzeciorzędowej hN1/2

Model strukturalny hN1/2 wygenerowany przy pomocy (A) I-TASSER; (B) AlphaFold; (C) Modeller. (D) Widma CD wygenerowane na podstawie przedstawionych modeli wraz z ich NRMSD względem widma eksperymentalnego (kolor niebieski). Kolorem żółto-zielonym oznaczono miejsce rozpoznawane przez PCs. Białka były modelowane wraz z aminokwasami pochodzącymi z wektora.

Ze względu na wysoką homologię sekwencji kurczych i ludzkich nesfatyn (a co za tym idzie i generowanych na podstawie ich sekwencji struktur) na **Rys. 4.16** przedstawiono modele strukturalne kurczych nesfatyn wygenerowane przy pomocy programu I-TASSER, w których występują subtelne różnice. Podobnie jak w przypadku ludzkiego homologu, model gN1 (**Rys. 4.16A**) również cechuje się wysoką zawartością  $\alpha$ -helis pomiędzy 28–30, 34–36, 40–47, 49–64, 67–69, 71–81 resztą aminokwasową. Zawartość tych struktur wynosi 51%. Model strukturalny gN2 (**Rys. 4.16B**) wykazuje z kolei wydłużoną i cylindryczną budowę. Obecne są trzy regiony zawierające  $\alpha$ -helisy pomiędzy 3–11, 17–40 i 46–77 resztą aminokwasową. Udział  $\alpha$ -helis w strukturze gN2 wynosi 78%. Otrzymany model gN1/2 (**Rys. 4.16C**) również wykazuje wydłużoną i cylindryczną budowę, jednak w mniejszym stopniu przypominającą włókna kolagenowe (**Rys. 4.15A**) a bardziej model hN1/2 otrzymany przy pomocy programu Modeller (**Rys. 4.15C**). Model gN1/2 w mniejszym stopniu przypomina też wynik prostego złożenia



**Rys. 4.16** Modele struktury trzeciorzędowej kurzych nesfatyn

Model (A) gN1; (B) gN2; (C) gN1/2 wygenerowane przy pomocy I-TASSER. (D) Widma CD wygenerowane na podstawie przedstawionych modeli wraz z ich NRMSD względem widma eksperymentalnego (linia przerywana).

struktur gN1 i gN2. W modelu obecne są natomiast  $\alpha$ -helisy pomiędzy 42–60, 69–86, 101–103 i 136–153 resztą aminokwasową. Zatem w sumie 35% struktury drugorzędowej gN1/2 w modelu występuje jako  $\alpha$ -helisy. Porównanie wygenerowanych *in silico* widm dichroizmu kołowego do eksperymentalnych wskazuje, iż największe NRMSD cechuje widmo otrzymane na podstawie modelu gN1 (1,44; **Rys. 4.16D**). Z drugiej strony widmo otrzymane na podstawie modelu gN1/2 cechuje się najmniejszym NRMSD (0,220; **Rys. 4.16D**). Dodatkowo warto również zaznaczyć, iż jest to najmniejsza ogółem wartość NRMSD dla widma otrzymanego na podstawie modeli wygenerowanych przez I-TASSER. W celu dalszego zmniejszenia NRMSD i lepszego opisu struktury gN1/2 otrzymany model należałoby poddać dalszemu doskonaleniu.

Otrzymane modele wydają się po części tłumaczyć uzyskane w dalszej części pracy wyniki eksperymentalne, tj.: nieuporządkowaną strukturę N1, która pod wpływem jonów Zn(II) ulega ustrukturyzowaniu; mozaikową strukturę hN2; oraz N1/2 której struktura i właściwości nie są prostą sumą właściwości odnotowanych dla N1 oraz N2.



## 4.4 SPEKTROSKOPIA DICHROIZMU KOŁOWEGO

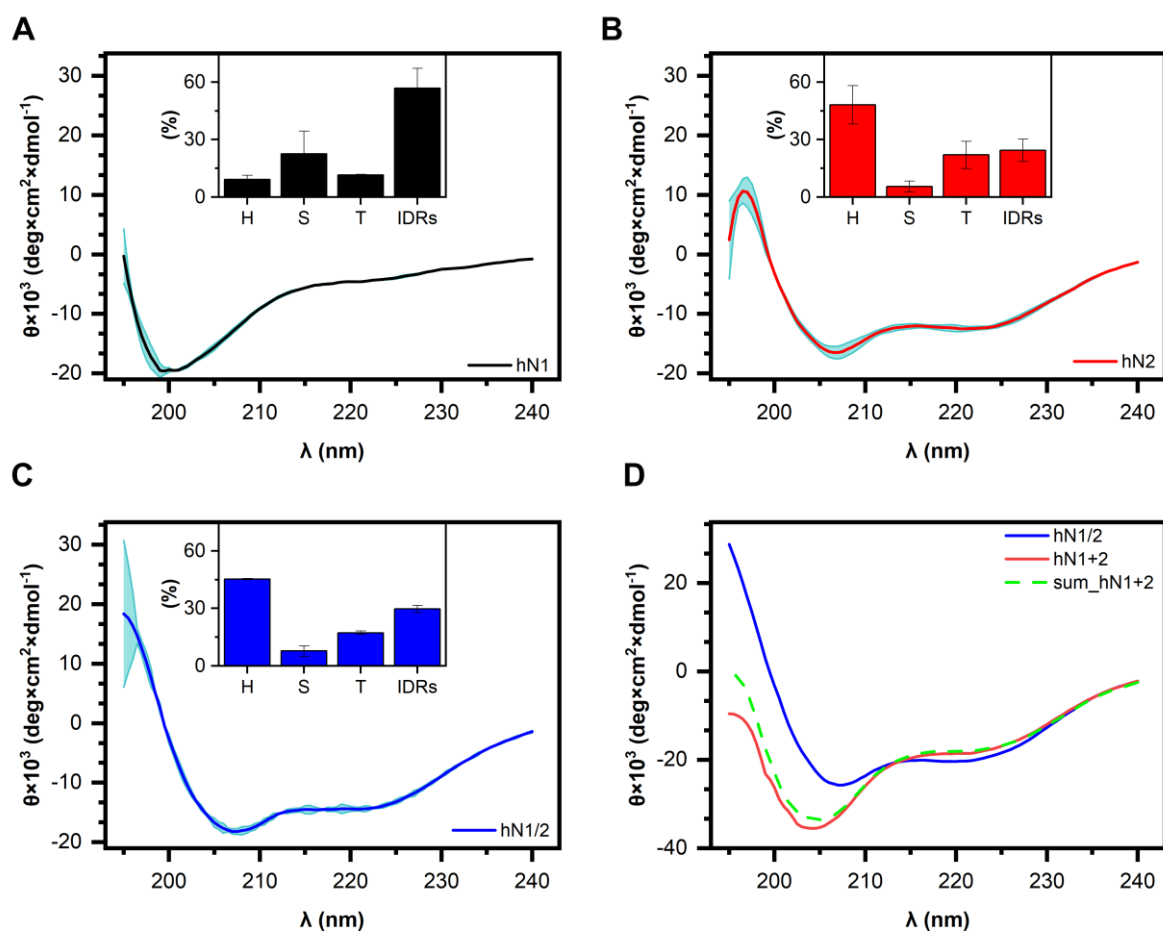
W zależności od udziału poszczególnych struktur drugorzędowych w strukturze białka obserwuje się charakterystyczny przebieg widm dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*). I tak jeśli białko cechuje wysoki udział  $\alpha$ -helis w strukturze wówczas typowo obserwuje się obecność dwóch maksimum ujemnych przy 208 nm i 222 nm oraz obecność maksimum dodatniego przy 193 nm. W przypadku dużego udziału antyrównoległych  $\beta$ -kartek w strukturze białka widmo CD cechuje obecność jednego maksimum ujemnego przy 218 nm i jednego dodatniego maksimum przy 195 nm. Wreszcie widma CD białek inherentnie nieuporządkowanych wykazują obecność jednego maksimum ujemnego przy około 195 nm i szczytkowy sygnał powyżej 210 nm [192,208]. Z tego powodu na podstawie widma CD danego białka możliwe jest określenie udziału poszczególnych form struktury drugorzędowej. W związku z tym zjawisko CD jest powszechnie wykorzystywane w badaniach strukturalnych białek [30,192,208]. Dodatkowo technika ta umożliwia wykonanie pomiarów w roztworze w warunkach zbliżonych do natywnych.

### 4.4.1 Analiza struktury drugorzędowej nesfatyn w warunkach natywnych

#### 4.4.1.1 Analiza struktury drugorzędowej nesfatyn w nieobecności jonów metali dwuwartościowych

Widma CD nesfatyn w nieobecności jonów metali (**Rozdział 3.2.6.1**) były rejestrowane w celu estymacji udziału poszczególnych struktur drugorzędowych oraz odniesieniu tych wyników do wykonanych przewidywań *in silico* (**Rozdział 4.3**). Otrzymane widma ludzkich nesfatyn przedstawiono na **Rys. 4.17**. W widmie CD hN1 (**Rys. 4.17A**) wyróżnić można jedno silne maksimum ujemne przy 200 nm, charakterystyczne dla białek o dużej zawartości IDRs [30]. Dekonwolucja widm CD (**Tab. 4.1**) przy pomocy programu CDPro również na to wskazuje. Estymowana zawartość IDRs w strukturze hN1 wyniosła  $57\% \pm 10\%$ . Wysoka była również zawartość  $\beta$ -kartek, która wyniosła  $23\% \pm 12\%$ . Widma hN2 (**Rys. 4.17B**) oraz hN1/2 (**Rys. 4.17C**) cechowały się natomiast zupełnie odmiennym przebiegiem. Widma obu białek wykazują obecność dwóch maksimum ujemnych; przy 208 nm i mniej intensywnym przy 222 nm. Obecność powyższych maksimum ujemnych jest cechą charakterystyczną białek o wysokiej zawartości  $\alpha$ -helis [30]. Potwierdzają to dodatkowo wyniki dekonwolucji widm programem CDPro. Zarówno hN2 jak i hN1/2 cechował wysoki udział  $\alpha$ -helis na poziomie  $48\% \pm 10\%$  oraz  $45,2\% \pm 0,4\%$ . Istotny udział w strukturze drugorzędowej hN2 i hN1/2 miały również





**Rys. 4.17** Widma CD ludzkich nesfatyn

Widmo CD (A) hN1; (B) hN2; (C) hN1/2; (D) równomolowej mieszaniny hN1 i hN2 (czerwona linia), algebraicznej sumy widm izolowanych hN1 i hN2 (zielona przerywana linia), hN1/2 (niebieska linia). Wstawki u góry paneli (A)-(C) przedstawiają średnią procentową zawartość  $\alpha$ -helisy (H),  $\beta$ -kartek (S), zwrotów (T) i IDRs wraz z SD, które zostały obliczone dla trzech pomiarów przy pomocy programu CDPPro. Widma w panelach (A)-(C) przedstawiają uśrednione widma z 3 pomiarów wraz z SD oznaczonym szarym kolorem.

IDRs, których udział wyniósł  $24\% \pm 6\%$  (hN2) i  $30\% \pm 2\%$  (hN1/2) oraz zwroty, których udział wyniósł  $22\% \pm 7\%$  (hN2) i  $17\% \pm 1\%$  (hN1/2).

W celu detekcji zmian w widmie CD pod wpływem oddziaływań hN1 i hN1/2 rejestrowano widma równomolowej mieszaniny hN1 i hN2 ( $7,5 \mu\text{M}$  każda; hN1+2; **Rys. 4.17D**). Widmo to było niemal tożsame z widmem algebraicznej sumy widm izolowanych peptydów. Z

**Tab. 4.1** Wyniki dekonwolucji widm CD ludzkich i kurzych nesfatyn.

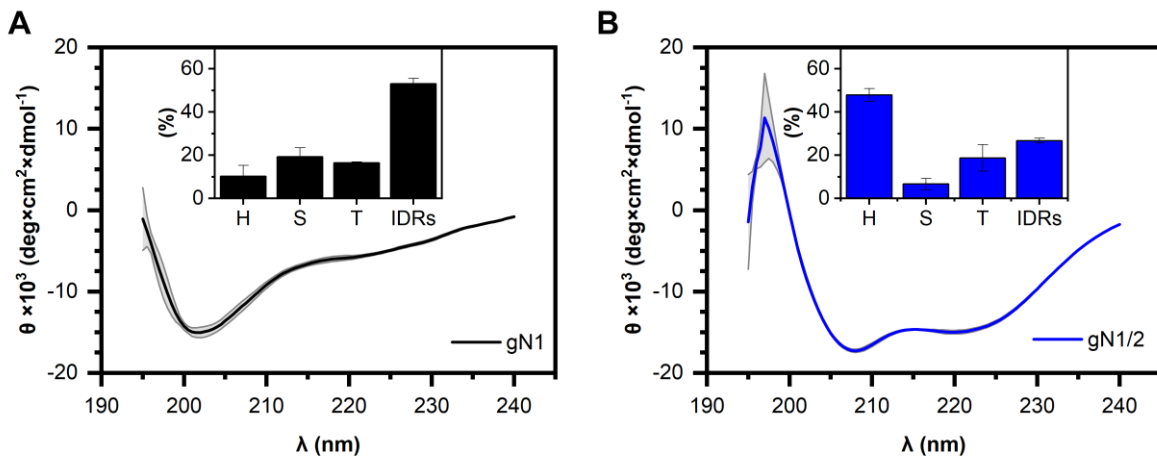
Białko	$\alpha$ -helisy (%)	$\beta$ -kartki (%)	Zwroty (%)	IDRs (%)
hN1	$9 \pm 2$	$23 \pm 12$	$11,4 \pm 0,4$	$57 \pm 10$
hN2	$48 \pm 10$	$6 \pm 3$	$22 \pm 7$	$24 \pm 6$
hN1/2	$45,2 \pm 0,4$	$8 \pm 3$	$17 \pm 1$	$30 \pm 2$
gN1	$10 \pm 5$	$19 \pm 4$	$16,5 \pm 0,4$	$53 \pm 3$
gN1/2	$48 \pm 3$	$7 \pm 3$	$19 \pm 6$	$27 \pm 1$

Wyniki przedstawiono jako uśredniony (z trzech pomiarów) udział struktur  $\pm$  SD.

drugiej strony, oba powyższe widma nie pokrywały się z widmem hN1/2 o tym samym stężeniu molowym. Wykazano zatem, iż izolowane hN1 i hN2 nie są zdolne do odtworzenia struktury drugorzędowej hN1/2.

Widma kurzych homologów nesfatyn przedstawiono na **Rys. 4.18**. Podobnie jak w przypadku ludzkiego homologu, widmo gN1 wykazuje obecność jednego intensywnego maksimum ujemnego przy ok. 200 nm (**Rys. 4.18A**). Jego analiza programem CDPro (**Tab. 4.1**) wykazała wysoki udział IDRs w strukturze gN1 na poziomie  $53\% \pm 3\%$ . Istotny był również udział  $\beta$ -katek w strukturze gN1, który wyniósł  $19\% \pm 4\%$  oraz zwrotów wynoszący  $16,5\% \pm 0,4\%$ . Widmo gN1/2 (**Rys. 4.18B**) zawierało z kolei dwa maksima ujemne przy 208 nm i 222 nm. Dekonwolucja widma ponownie wskazała na wysoki udział  $\alpha$ -helis w strukturze gN1/2, który wyniósł  $48\% \pm 3\%$ . Wysoki udział w strukturze gN1/2 miały również IDRs, których zawartość wyniosła  $27\% \pm 1\%$  oraz zwrotów równa  $19\% \pm 6\%$ . Jak wspomniano w **Rozdz. 4.2.3.2** ze względu na niską wydajność preparacji gN2 dla tego białka nie podjęto badań analogicznych jak dla homologu ludzkiego.

Uzyskane wyniki wskazują na silnie nieuporządkowaną strukturę hN1 oraz gN1. Z kolei struktura drugorzędowa hN2, hN1/2 oraz gN1/2 wydają się cechować znaczenie większym udziałem (ponad 4,5-krotnym) struktur helikalnych. Co więcej, wykazano również, iż widmo hN1/2 nie jest prostą sumą izolowanych hN1 oraz hN2.

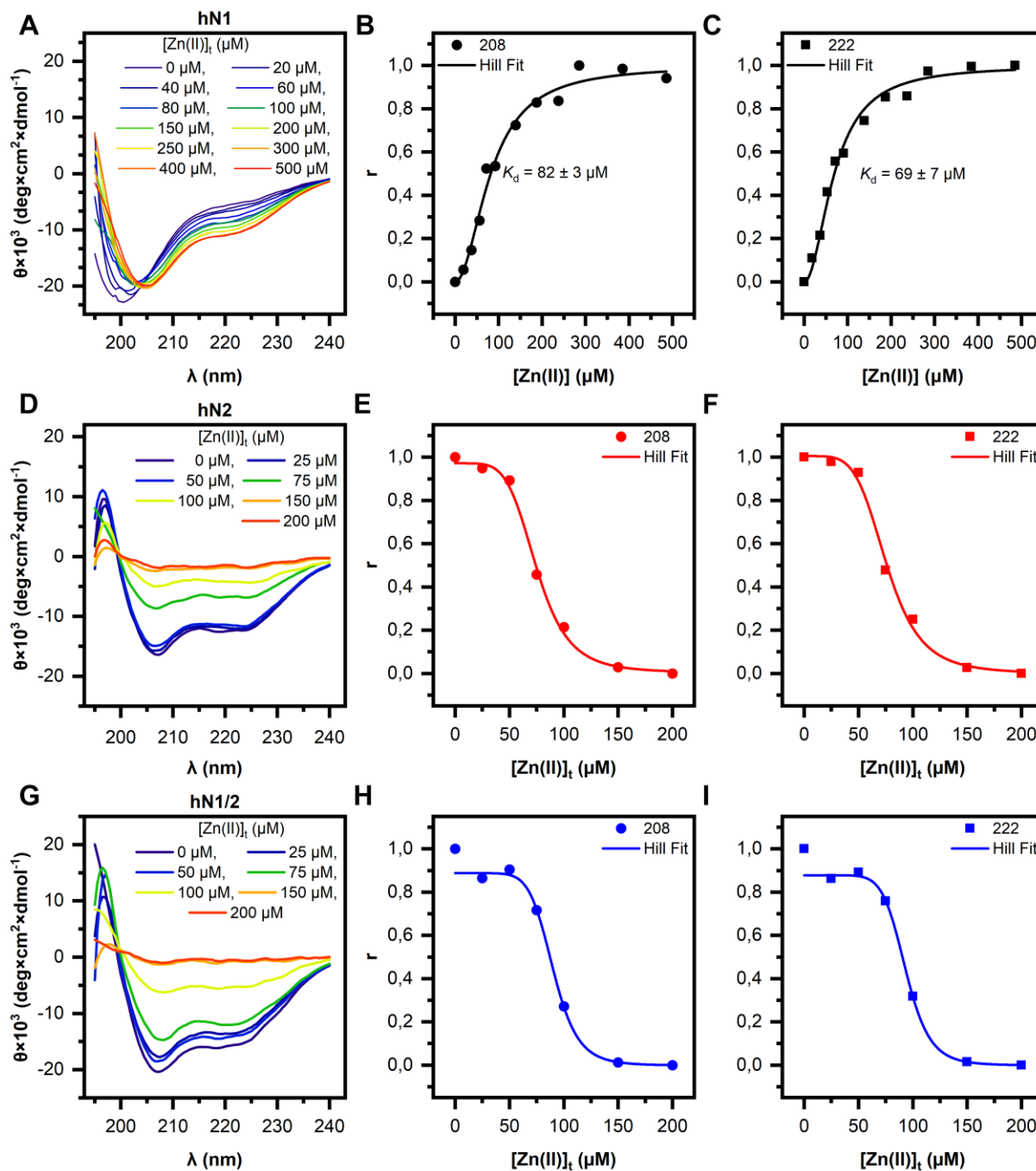


**Rys. 4.18** Widma CD kurzych nesfatyn

Widmo CD (**A**) gN1; (**B**) gN2; (**C**) gN1/2. Wstawki u góry paneli (**A**)-(b) przedstawiają średnią procentową zawartość  $\alpha$ -helis (H),  $\beta$ -katek (S), zwrotów (T) i IDRs wraz z SD, które zostały obliczone dla trzech pomiarów przy pomocy programu CDPro. Widma w panelach (**A**)-(b) przedstawiają uśrednione widma z 3 pomiarów wraz z SD oznaczonym szarym kolorem.

## 4.4.1.2 Analiza zmian struktury drugorzędowej nesfatyn pod wpływem jonów metali

Dotychczas miejsce wiązania jonów Zn(II) na końcu N (w obrębie 29-136 reszty aminokwasowej; Rys. 1.3) i jonów Ca(II) na końcu C (w obrębie 235-306 reszty aminokwasowej; Rys. 1.3) ludzkich i kurzych homologów Nucb2 zostało wykazane przez Skorupską i wsp. [41]



Rys. 4.19 Widma CD ludzkich nesfatyn w obecności jonów Zn(II)

Widma CD (A) hN1; (D) hN2; (G) hN1/2 w obecności zmiennego stężenia jonów Zn(II). (B), (C) Ułamek wysycenia ( $r$ ) hN1 jonami Zn(II) oraz dopasowanie modelu Hilla do danych. Ułamek wysycenia został obliczony na podstawie wartości MRE przy 208 nm (okręgi) i 222 nm (kwadraty).  $[Zn(II)]$  – stężenie wolnych jonów Zn(II). (E), (F) Względna zawartość hN2 w roztworze i dopasowanie modelu Hilla do danych.  $[Zn(II)]_t$  – całkowite stężenie jonów Zn(II) (H), (J) Względna zawartość hN1/2 w roztworze oraz dopasowanie modelu Hilla do danych.

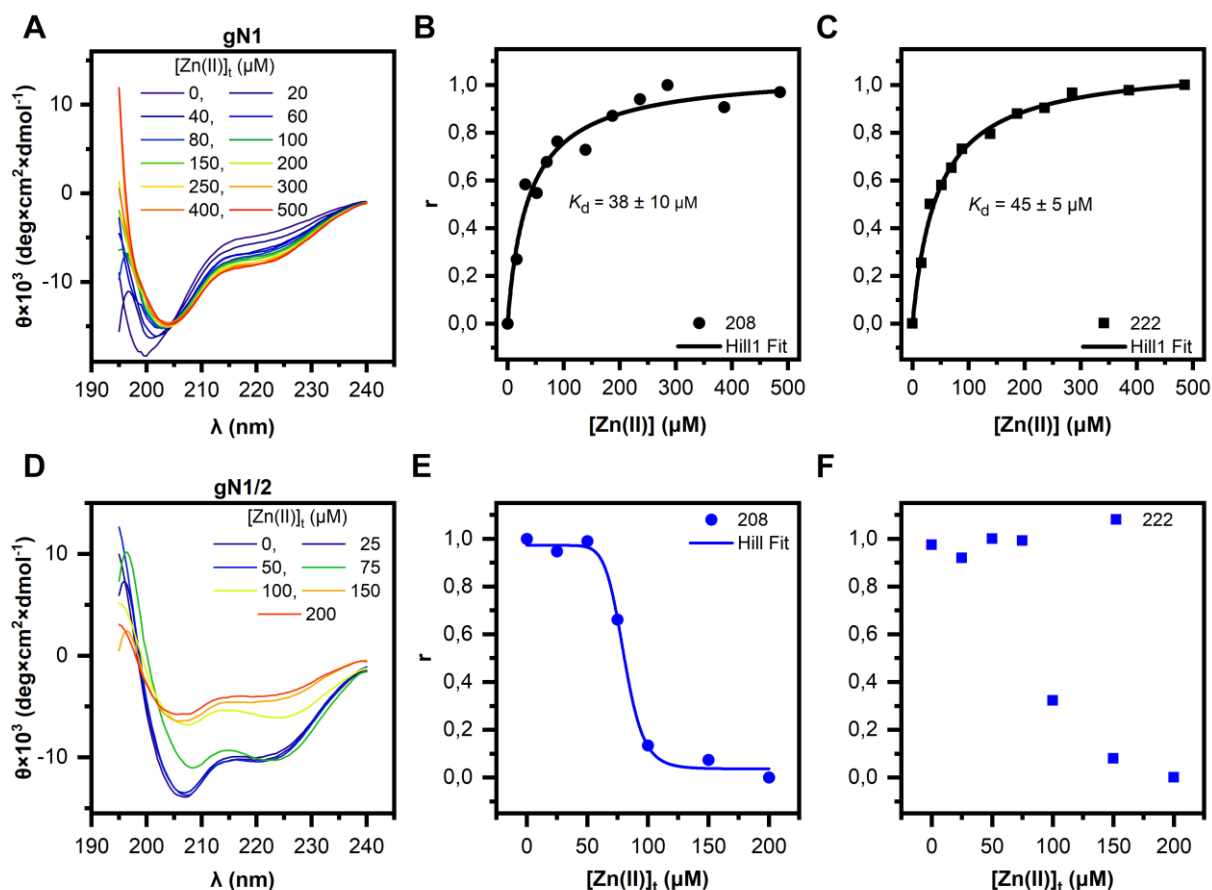
oraz Bystranowską i wsp. [46]. Z tego względu badano zachowanie zdolności i/lub zmiany w wiązaniu jonów Zn(II) w produktach proteolitycznego procesowania końca N ludzkich i kurzych homologów białka pełnej długości. Dodatkowo oceniano zdolność nesfatyn do oddziaływania z jonami Ca(II) w celu potwierdzenia ich specyficznego wiązania wyłącznie na końcu C homologów Nucb2/nesfatyn.

Otrzymane widma CD kurzych i ludzkich homologów nesfatyn w obecności jonów Ca(II) są identyczne z ich widmami w obecności EDTA (**Rys. S4**). W związku z tym, jeśli jony Ca(II) są wiązane przez powyższe białka, wówczas proces ten przebiega bez zmian w strukturze drugorzędowej.

Widma CD nesfatyn w obecności jonów Zn(II) cechowały się natomiast silnymi zmianami w ich przebiegu w porównaniu do widm zarejestrowanych dla stanów apo. Zarówno w widmach hN1 (**Rys. 4.19A**) jak i gN1 (**Rys. 4.20A**) miareczkowanych jonami Zn(II) nastąpiło silne, zależne od stężenia jonów Zn(II), przesunięcie maksimum ujemnego przy 200 nm do 208 nm. Równoległe postępowano mocne pogłębienie się maksimum ujemnego przy 222 nm. Obecny był jeden punkt izozbestyczny przy około 204 nm. Dekonwolucja widm programem CDPro wykazała, iż w wyniku przesunięcia batochromowego nastąpiło silne zmniejszenie IDRs (**Tab. 4.2**) z 73% do 41% dla hN1 i z 67% do 44% dla gN1, przy jednoczesnym zwiększeniu się zawartości  $\alpha$ -helis z 10% do 31% dla hN1 i z 9% do 23% dla gN1. Obserwowane zmiany były zatem związane z przejściem struktury nieuporządkowanej w uporządkowaną w sposób zależny od stężenia jonów Zn(II). Wartości MRE otrzymane przy 208 nm i 222 nm dla hN1 i gN1 zostały następnie wykorzystane do obliczenia ułamka wysycenia białek jonami

**Tab. 4.2** Zmiany struktury drugorzędowej ludzkich i kurzych homologów N1 w obecności jonów Zn(II)

[Zn(II)] ( $\mu$ M)	$\alpha$ -helisy (%)		$\beta$ -kartki (%)		Zwroty (%)		IDRs (%)	
	hN1	gN1	hN1	gN1	hN1	gN1	hN1	gN1
0	10	9	10	14	7	10	73	67
20	17	5	25	5	16	12	42	79
40	19	17	14	15	13	13	55	54
60	22	18	21	17	18	14	38	51
80	25	17	16	8	16	13	42	62
100	23	18	7	12	14	14	56	56
150	28	20	11	15	17	15	44	49
200	32	22	13	20	16	15	38	43
250	32	22	12	14	17	15	39	49
300	32	23	10	19	17	15	41	44
400	35	23	12	17	18	16	34	45
500	31	23	9	18	19	15	41	44



**Rys. 4.20** Widma CD kurzych nesfatyn w obecności jonów Zn(II)

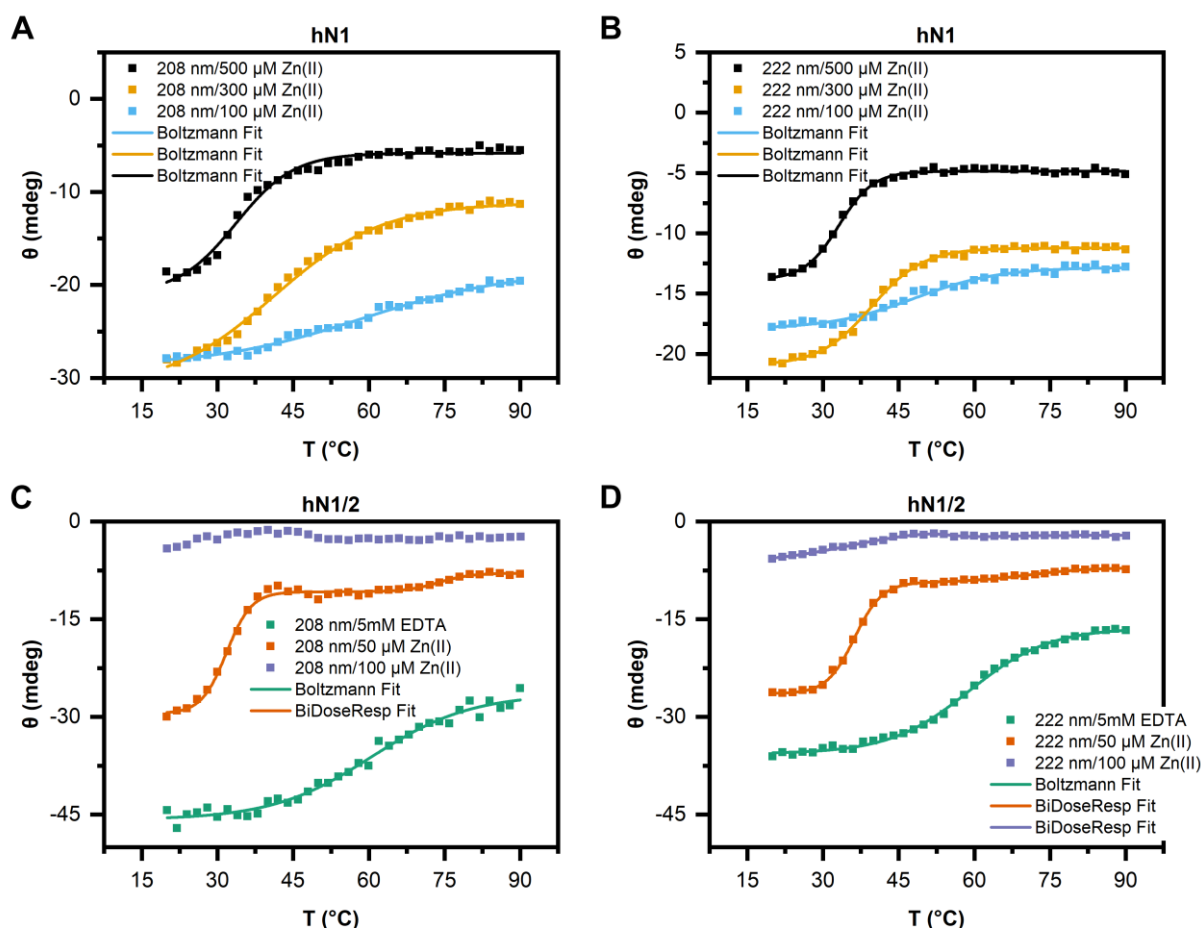
Widma CD (A) gN1; (D) gN1/2 w obecności zmiennego stężenia jonów Zn(II). (B), (C) Ułamek wysycenia ( $r$ ) gN1 jonami Zn(II) oraz dopasowanie modelu Hilla do danych. Ułamek wysycenia został obliczony na podstawie wartości MRE przy 208 nm (okręgi) i 222 nm (kwadraty).  $[Zn(II)]$  – stężenie wolnych jonów Zn(II). (E), (F) Względna zawartość gN1/2 w roztworze i dopasowanie modelu Hilla do danych.  $[Zn(II)]_t$  – całkowite stężenie jonów Zn(II).

Zn(II) i przedstawione w funkcji ich stężenia (**Rozdział 3.2.6.1**). Dopasowanie krzywoliniowe danych do modelu Hilla dla hN1 (**Rys. 4.19B**, **Rys. 4.19C**) umożliwiło estymację pozornej stałej dysocjacji wiązania jonów Zn(II) pomiędzy  $69 \mu\text{M} \pm 7 \mu\text{M}$  i  $82 \pm 3 \mu\text{M}$ . Z kolei dla gN1 wyznaczona pozorna stała dysocjacji znajdowała się pomiędzy  $38 \mu\text{M} \pm 10 \mu\text{M}$  (**Rys. 4.20B**) i  $45 \mu\text{M} \pm 5 \mu\text{M}$  (**Rys. 4.20C**). Z drugiej strony wyniki uzyskane dla hN2, hN1/2, gN1/2 znacząco różniły się od tych otrzymanych dla homologów N1. W widmach hN2 (**Rys. 4.19D**), hN1/2 (**Rys. 4.19G**) i gN1/2 (**Rys. 4.20D**) widoczne było silne zmniejszenie intensywności w całym zakresie widma, które było zależne od stężenia jonów Zn(II). Co ciekawe, w widmie gN1/2 przy stężeniu jonów Zn(II) równym  $75 \mu\text{M}$  i  $100 \mu\text{M}$  dochodzi do wyrównania się wartości maksimów ujemnych przy 208 nm i 222 nm, czego nie obserwowano w przypadku hN1/2. Wartości MRE przy 208 nm i 222 nm zostały zatem wyrażone jako względna zawartość białek w roztworze, które następnie dopasowywano do modelu Hilla. W ten sposób otrzymano

stężenie jonów Zn(II) przy którym dochodzi do utraty połowy wartości widma CD przy 208 nm i/lub 222 nm. Wyniosło ono odpowiednio:  $75 \mu\text{M} \pm 3 \mu\text{M}$  dla hN2 (**Rys. 4.19E, Rys. 4.19F**);  $90 \mu\text{M} \pm 4 \mu\text{M}$  dla hN1/2 (**Rys. 4.19H, Rys. 4.19I**);  $81 \mu\text{M} \pm 2 \mu\text{M}$  dla gN1/2 (**Rys. 4.20E**). W związku z tym do dalszych eksperymentów stosowano stężenie jonów Zn(II) równe  $50 \mu\text{M}$  i odpowiadające względnej zawartości neszfatyn w roztworze na poziomie 80%. Warto nadmienić, iż ze względu na odmienny przebieg danych przy 222 nm (w porównaniu do tych uzyskanych przy 208 nm) dla gN1/2 nie wykazywały one tendencji odpowiedniej do dopasowania do modelu Hilla (**Rys. 4.20F**).

#### 4.4.2 Analiza wpływu jonów Zn(II) na stabilność termiczną neszfatyn

Wyniki pomiarów CD neszfatyn wykazały silny wpływ jonów Zn(II) na strukturę drugorzędową. W celu oceny wpływu powyższych jonów na stabilność termiczną neszfatyn wykonano pomiary spektroskopowe CD białek w funkcji temperatury (**Rozdział 3.2.6.2**).



**Rys. 4.21** Profile topnienia ludzkich neszfatyn

Profile topnienia hN1 (**A, B**) i hN1/2 (**C, D**) mierzone przy pomocy CD i rejestrowane przy 208 nm (**A, C**) i 222 nm (**B, D**). Neszfatyny poddawano denaturacji cieplnej w obecności EDTA lub Zn(II) w stężeniu opisanym w legendzie każdego panelu.

Profile topnienia apo-hN1 oraz apo-gN1 nie wykazywały istnienia temperatury przejścia ( $T_m$ ), (dane niepokazane). Natomiast profile topnienia uzyskane dla form holo- obu homologów N1 cechowały się silnymi zmianami w  $T_m$ , które najprawdopodobniej są wynikiem przejścia nieuporządkowanie-uporządkowanie obserwowanego pod wpływem jonów Zn(II) (**Rozdział 4.4.1.2**). Krzywe denaturacji Zn(II)-hN1 rejestrowane przy 208 nm (**Rys. 4.22A**) i 222 nm (**Rys. 4.22B**) cechowały się sigmoidalnym przebiegiem oraz spadkiem wartości  $T_m$  z 59 °C do 33 °C (**Tab. 4.3**) w sposób zależy od stężenia jonów Zn(II).

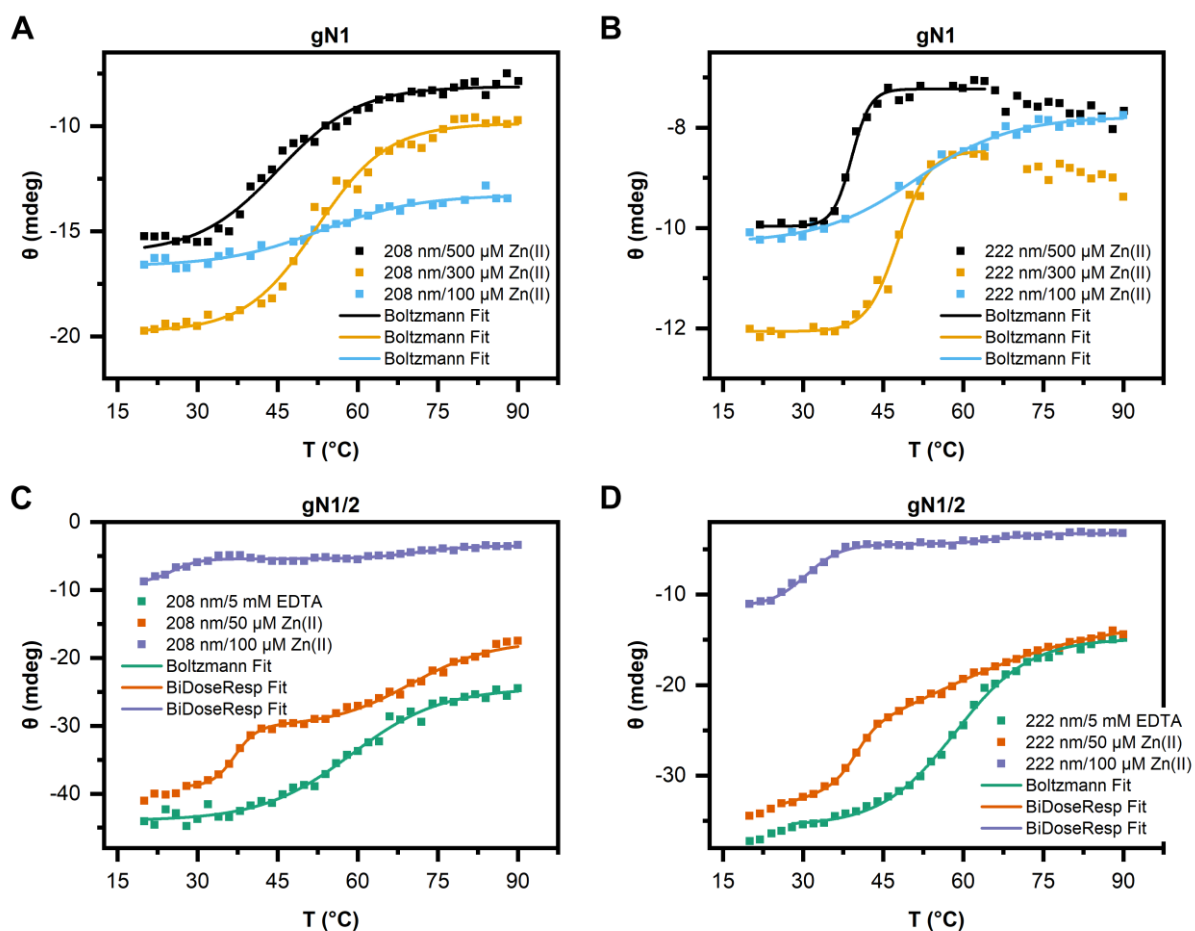
**Tab. 4.3** Stabilność temperaturowa ludzkich i kurzych homologów nesfatyn w obecności jonów Zn(II)

Białko	Związek	$T_m$ przy 208 nm [°C]†	$T_m$ przy 222 nm [°C]†
hN1	(100 μM) Zn(II)	59 ± 1	48,1 ± 0,9
	(300 μM) Zn(II)	41,2 ± 0,9	39,6 ± 0,2
	(500 μM) Zn(II)	33,6 ± 0,8	33,1 ± 0,2
hN1/2	(5 mM EDTA)	61 ± 1	59,0 ± 0,3
	(50 μM) Zn(II)	31,8 ± 0,2	36,2 ± 0,1
	(100 μM) Zn(II)	74 ± 2	71 ± 2
gN1	(100 μM) Zn(II)	–	35 ± 2
	(50 μM) Zn(II)	–	55 ± 0,9
	(100 μM) Zn(II)	–	–
gN1/2	(100 μM) Zn(II)	53 ± 1	51 ± 1
	(300 μM) Zn(II)	52,3 ± 0,6	47,7 ± 0,4
	(500 μM) Zn(II)	45,1 ± 0,9	39,1 ± 0,3
gN1/2	(5 mM EDTA)	58,8 ± 0,7	58,0 ± 0,4
	(50 μM) Zn(II)	37,0 ± 0,4	39,8 ± 0,3
	(100 μM) Zn(II)	69,9 ± 0,7	53 ± 4
gN1/2	(100 μM) Zn(II)	25 ± 1	30,5 ± 0,3
	(100 μM) Zn(II)	71 ± 2	66 ± 2

† Wartości wyznaczone jako punkt przegięcia krzywych dopasowanych do danych przy odpowiednich długościach fal (Rozdział 3.2.6.2).

Podobnie w przypadku gN1 (**Rys. 4.22A**, **Rys. 4.22B**) obserwowano spadek wartości  $T_m$  z 53 °C do 45–39 °C (**Tab. 4.3**; zakres wyznaczony na podstawie wartości  $T_m$  otrzymanych przez dopasowanie krzywoliniowe profili topnienia przy 208 nm oraz 222 nm). Wyniki otrzymane dla homologów N1/2 charakteryzował jeszcze większy spadek wartości  $T_m$  w porównaniu do homologów N1 (**Tab. 4.3**). Otrzymane profile denaturacji homologów N1/2 w nieobecności jonów (5 mM EDTA) cechował sigmoidalny przebieg oraz pojedynczy punkt przejścia temperaturowego, który wyniósł odpowiednio: 59–61 °C dla hN1/2 (**Rys. 4.22C**, **Rys. 4.22D**) oraz 58 °C dla gN1/2 (**Rys. 4.22C**, **Rys. 4.22D**). Przebieg profili denaturacji homologów holo-N1/2 znacząco odbiegał od wyników uzyskanych dla form apo-. Obecne były dwa punkty przejścia temperaturowego: pierwszy wykazujący spadek względem stanu apo- do wartości 32–36 °C w przypadku hN1/2 i do 25–29 °C dla gN1/2, drugi punkt  $T_m$  cechowała natomiast

stabilniejsza wartość  $T_m$  w zakresie stosowanego zakresu stężeń jonów  $Zn(II)$ , która oscylowała wokół  $70\text{ }^\circ\text{C}$ .



**Rys. 4.22** Profile topnienia kurzych nesfatyn

Profile topnienia gN1 (A, B) i gN1/2 (C, D) mierzone przy pomocy CD i rejestrowane przy 208 nm (A, C) i 222 nm (B, D). Nesfatyny poddawano denaturacji cieplnej w obecności EDTA lub  $Zn(II)$  w stężeniu opisanym w legendzie każdego panelu.



## 4.5 ULTRAWIROWANIE ANALITYCZNE

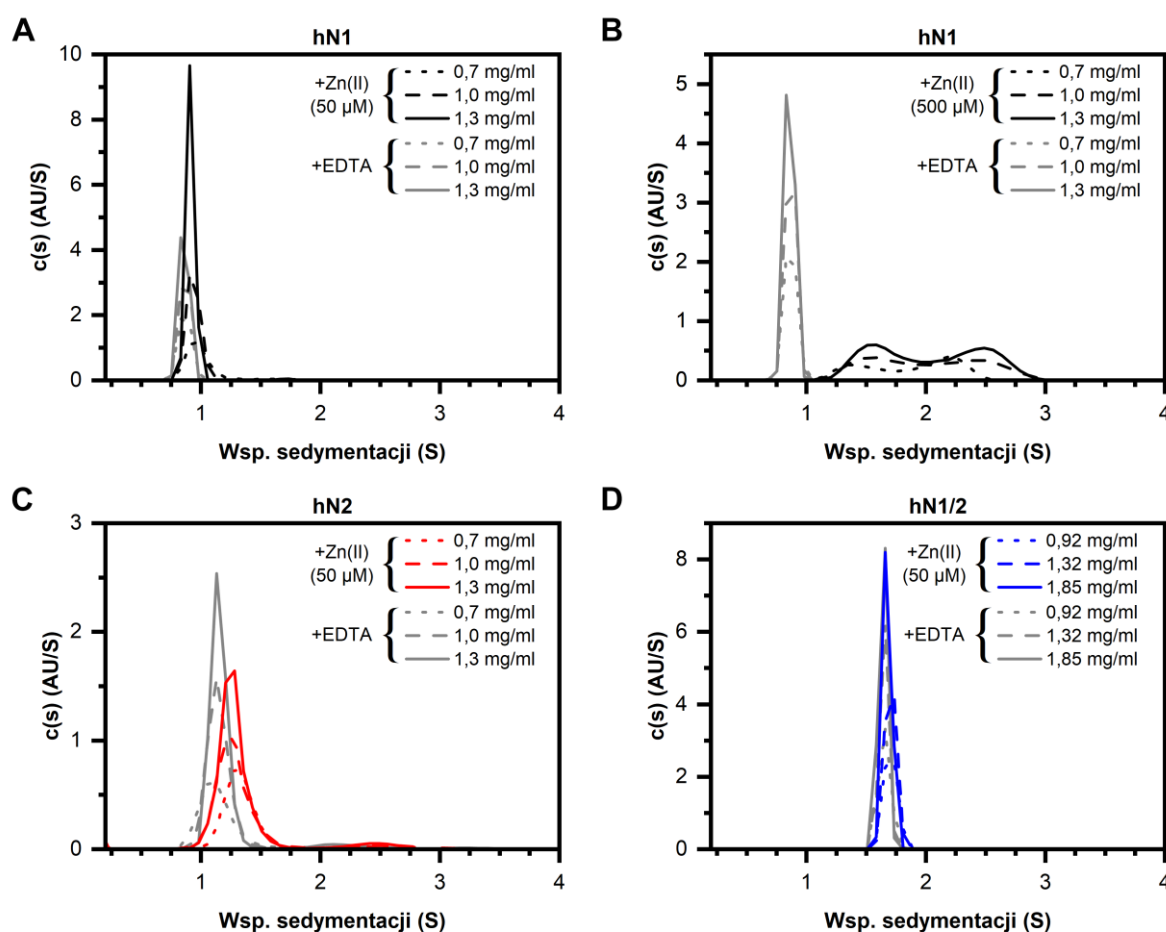
Spektroskopia CD (Rozdział 4.4) wykazała znaczące zmiany w strukturze drugorzędowej nesfatyn pod wpływem jonów  $Zn(II)$  podczas gdy w obecności jonów  $Ca(II)$  ich nie obserwowano. W celu ustalenia czy powyższe obserwacje są związane ze zmianami struktury trzeciorzędowej i ewentualnie czwartorzędowej ludzkich i kurzych homologów nesfatyn, przeprowadzono eksperymenty SV-AUC (Rozdział 3.2.7). Ultrawirowanie analityczne (AUC, ang. *analytical ultracentrifugation*) jest uniwersalną techniką umożliwiającą wyznaczenie mas



cząsteczkowych i parametrów hydrodynamicznych makrocząsteczek. AUC pozwala również na analizę i identyfikację IDPs, które ze względu na ich duży stosunek objętości hydrodynamicznej do masy cząsteczkowej wykazują wysoką wartość współczynnika tarcia  $f/f_0$  [209].

#### 4.5.1 SV-AUC ludzkich nesfatyn

Dane otrzymane po SV-AUC ludzkich nesfatyn w nieobecności EDTA wykazywały dla hN1 (Rys. 4.23A, Rys. 4.23B), hN2 (Rys. 4.23C) i hN1/2 (Rys. 4.23D) jeden szczyt o dobrze zdefiniowanej dystrybucji współczynnika sedymtacji  $c(s)$ . Szczyty te cechowały się bowiem intensywnością jak również bardzo wąskim przedziałem  $s_{(20,w)}$ . Wartości parametru  $s_{(20,w)}$  dla powyższych białek (Tab. 4.4) w tych warunkach eksperymentalnych oscylowały wokół: 0,91 S (hN1); 1,2 S (hN2); 1,73 S (hN1/2). Wyznaczone pozorne masy cząsteczkowe ( $MW_{app}$ ) wynosiły około (Rys. 4.23C): 10,9 kDa (hN1, hN2) i 21 kDa (hN1/2). Wyniki te wykazywały zatem wysoką zgodność z teoretycznymi masami cząsteczkowymi (Tab. 3.8) jak również



Rys. 4.23 SV-AUC ludzkich nesfatyn w obecności jonów Zn(II)

Eksperymenty SV-AUC prowadzono w obecności 50/500  $\mu\text{M}$  Zn(II) lub 5 mM EDTA (szare linie). Dystrybucja współczynnika sedymtacji  $c(s)$  dla białka: hN1 (A, B); hN2 (C); hN1/2 (D).

z wyznaczonymi techniką SDS-PAGE (**Rozdział 4.2**) oraz przy pomocy MS (**Rozdział 4.2.3.2**). SV-AUC ludzkich nesfatyn w obecności EDTA wskazywało na obecność jedynie form monomerycznych białek, niemniej jednak dystrybucja współczynnika sedymentacji  $c(s)$  hN2 zawierała dodatkowy szczyt o niskiej intensywności, szerokim rozkładzie współczynnika  $s_{(20,w)}$  i  $MW_{app}$  równej około 33 kDa. W związku z powyższym może to wskazywać na obecność

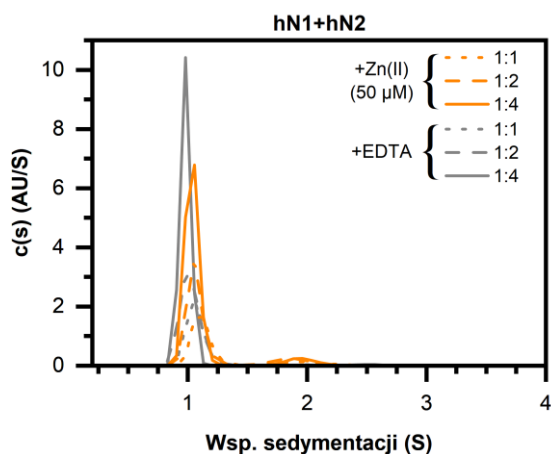
**Tab. 4.4** Parametry hydrodynamiczne ludzkich nesfatyn

Białko	Związek	$c$ [mg/ml]	RMSD $\times 10^3$	$s_{(20,w)}$ [S]	$f/f_0$	$R_h$ [nm]	$MW_{app}$ [kDa]
hN1	(5 mM) EDTA	0,7	6,13	0,91	1,82	2,69	10,8 (100%)
		1,0	6,34	0,91	1,84	2,72	11,0 (100%)
		1,3	6,57	0,90	1,84	2,72	10,9 (100%)
	(50 $\mu$ M) ZnCl <sub>2</sub>	0,7	8,03	1,03	1,67	2,50	11,4 (96%)
				1,68		3,21	24,0 (4%)
		1,0	8,70	0,98	1,69	2,50	10,9 (98%)
				1,76		3,35	26,2 (2%)
		1,3	9,59	0,95	1,71	2,51	10,6 (99%)
				1,78		3,43	27,1 (1%)
	(500 $\mu$ M) ZnCl <sub>2</sub>	0,7	8,39	1,53	1,23	1,93	13,0 (42%)
				2,22		2,33	23,0 (58%)
		1,0	9,24	1,73	1,22	2,02	15,5 (55%)
				2,53		2,45	27,5 (45%)
		1,3	10,13	1,70	1,24	1,99	14,5 (49%)
				2,51		2,42	26,0 (51%)
hN2	(5 mM) EDTA	0,7	5,97	1,19	1,54	2,31	11,7 (92%)
				2,52		3,37	36 (8%)
		1,0	6,11	1,20	1,46	2,14	10,9 (93%)
				2,56		3,13	34,1 (7%)
		1,3	6,33	1,20	1,44	2,10	10,8 (95%)
				2,30		2,90	28,3 (5%)
	(50 $\mu$ M) ZnCl <sub>2</sub>	0,7	6,53	1,38	1,42	2,20	12,9 (92%)
				2,72		3,09	35,6 (8%)
		1,0	6,63	1,33	1,43	2,19	12,3 (92%)
				2,74		3,14	36,5 (8%)
		1,3	7,02	1,32	1,42	2,16	12,1 (93%)
				2,59		3,02	33,1 (7%)
hN1/2	(5 mM) EDTA	0,92	6,64	1,73	1,52	2,78	21 (100%)
		1,32	7,04	1,73	1,53	2,80	21 (100%)
		1,85	7,51	1,72	1,54	2,82	21 (100%)
	(50 $\mu$ M) ZnCl <sub>2</sub>	0,92	6,47	1,78	1,49	2,74	21 (100%)
		1,32	7,11	1,78	1,50	2,77	21 (100%)
		1,85	7,53	1,75	1,52	2,79	21 (100%)

Wartości w nawiasach wyrażają udział poszczególnych subpopulacji sedymentujących cząstek w odniesieniu do udziału dwóch głównych subpopulacji.

trimeru i/lub na agregację białka. Z kolei otrzymane wartości współczynnika  $f/f_0$  wynosiły odpowiednio: 1,8 (hN1) i 1,5 (hN2, hN1/2). Wysoka wartość współczynnika  $f/f_0$  dla hN1 wyraźnie wskazywała zatem na wydłużony i elipsoidalny kształt białka. Natomiast wartości parametru  $f/f_0$  dla hN2 i hN1/2 sugerowały bardziej globularny charakter obu białek.

W obecności jonów Ca(II) nie zaobserwowano znaczących zmian w dystrybucji współczynnika sedymentacji  $c(s)$  (Rys. S5). Jednakowoż, w obecności 50  $\mu\text{M}$  Zn(II) obserwowano nieznaczne zmiany w dystrybucji sedymentujących cząstek w stosunku do warunków z EDTA. Obserwowano nieznaczną zmianę współczynnika  $s_{(20,w)}$  do wartości 0,99 S oraz pojawienie się bardzo niewielkiej ilości nowej populacji sedymentujących cząstek przy około 1,74 S i  $MW_{app}$  równej 25,8 kDa dla hN1 w obecności 50  $\mu\text{M}$  Zn(II) (Rys. 4.23A). W przypadku hN2 zaobserwowano wzrost  $s_{(20,w)}$  do 1,34 S (Rys. 4.23C) oraz brak zmian wartości współczynnika  $s_{(20,w)}$  dla hN1/2 w obecności 50  $\mu\text{M}$  Zn(II) (Rys. 4.23D). Wynik ten sugeruje większą wrażliwość wolnego fragmentu hN2 na jony Zn(II) w porównaniu do hN1/2. Największe zmiany w dystrybucji współczynnika sedymentacji  $c(s)$  zaobserwowano natomiast dla hN1 w obecności 300  $\mu\text{M}$  (Rys. S6) i 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) (Rys. 4.23B). W powyższych warunkach pojawiły się dwie nowe populacje sedymentujących cząstek, które w sposób zależny od stężenia jonów Zn(II) wykazywały przesunięcie  $s_{(20,w)}$  do wartości 1,4 S/1,53 S i 2,1 S/2,4 S (Tab. S1 i Tab. 4.4 dla warunków



Rys. 4.24 SV-AUC mieszaniny hN1 i hN2

Wyniki SV-AUC mieszaniny hN1 i hN2 w obecności 5 mM EDTA (szare linie) lub 50  $\mu\text{M}$  Zn(II) (pomarańczowe linie) w stosunku masowym 1:1; 1:2 i 1:4 (hN2:hN1).

ni hN1 Zn(II), co wskazuje na dynamiczną równowagę pomiędzy stanem monomer-dimer. Co więcej, stan holo-hN1 wykazuje silne zmniejszenie współczynnika  $f/f_0$  z 1,83 do wartości 1,23. Wskazuje to na silną redukcję objętości hydrodynamicznej białka najprawdopodobniej

w obecności odpowiednio 300  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  Zn(II)). Zmianom wartości współczynnika sedymentacji towarzyszyły również zmiany  $MW_{app}$  z 10,9 kDa do 14,3 kDa i 25 kDa dla drugiego szczytu, który wskazuje na powstawanie dimeru w sposób zależny od stężenia jonów Zn(II). Co ciekawe, podczas zwiększenia stężenia jonów Zn(II) dochodzi do wyrównania się intensywności szczytów dystrybucji  $c(s)$  zawierających monomer i dimer do stosunku 1:1 dla 500  $\mu\text{M}$  Zn(II). Warto również zauważyć nachodzenie się na siebie dystrybucji  $c(s)$  przy pełnym wysyceniu

w skutek przyjęcia bardziej globularnego kształtu, co jednocześnie pozostaje w dobrej zgodności z wynikami spektroskopii CD.

Wyniki SV-AUC dla mieszaniny izolowanych hN1 i hN2 (hN1+2; **Rys. 4.24**) zmieszanych w różnych stosunkach masowych (**Rozdział 3.2.7**) w (nie)obecności jonów Zn(II) nie ujawniły zamian dystrybucji współczynnika sedymentacji  $c(s)$  wskazujących na zmiany struktury trzecio- i czwartorzędowej, które mogłyby być wynikiem oddziaływania obu białek. Otrzymane wartości  $c(s)$  hN1+2 były natomiast zgodne z wynikami uzyskanymi dla izolowanych fragmentów.

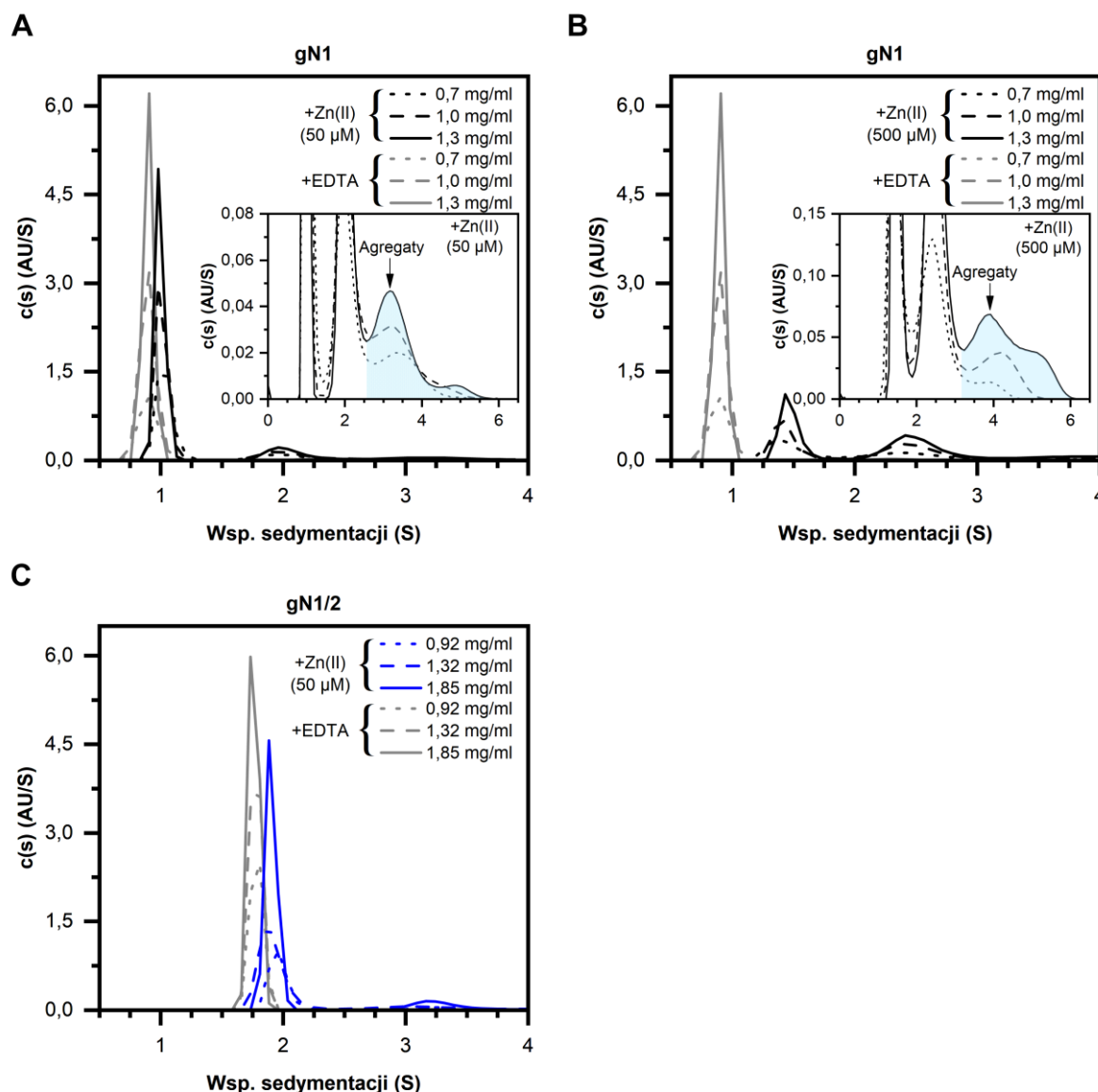
Podsumowując, powyższe wyniki wskazują na występowanie apo-hN1 wyłącznie w formie monomerycznej, podczas gdy holo-hN1 wykazuje tendencję do dimeryzacji w wyniku przejścia nieuporządkowanie-uporządkowanie indukowanego jonami Zn(II).

#### 4.5.2 SV-AUC kurzych nesfatyn

---

Wyniki SV-AUC gN1 (**Rys. 4.25A**, **Rys. 4.25B**) i gN1/2 (**Rys. 4.25C**) w obecności 5 mM EDTA wykazywały bardzo dobrze zdefiniowaną dystrybucję współczynnika sedymentacji  $c(s)$  z obecnym jednym, wąskim szczytem. W powyższych warunkach wartość współczynnika  $s_{(20,w)}$  oscylowała wokół 0,94 S i 1,86 S dla odpowiednio gN1 i gN1/2 (**Tab. 4.5**). Otrzymane wartości  $s_{(20,w)}$  jak i rozkład  $c(s)$  wykazują wysokie podobieństwo do wyników otrzymanych w obecności EDTA dla ludzkich homologów. Wyznaczone  $MW_{app}$  wynosiły odpowiednio około 10 kDa dla gN1 i 21 kDa dla gN1/2. Powyższe masy cząsteczkowe wykazują wysoką zgodność z teoretyczną (**Tab. 3.8**) jak i z tymi wyznaczonymi przy pomocy SDS-PAGE (**Rozdział 4.2**) oraz MS (**Rozdział 4.2.3.2**). Współczynnik tarcia dla gN1 i gN1/2 w obecności 5 mM EDTA wyniósł odpowiednio 1,8 oraz 1,5. Wskazuje to ponownie to na nieuporządkowany charakter gN1 jak i globularny gN1/2. Eksperymentów SV-AUC nie przeprowadzono dla gN2 m. in. ze względu na niską wydajność preparacji, o której wspomniano już w **Rozdziale 4.2.3.1**

W obecności jonów Zn(II) ponownie obserwowano istotne zmiany w dystrybucji  $c(s)$  w porównaniu do warunków z EDTA. Fakt ten podkreśla zachowanie w toku ewolucji zdolności do oddziaływania z jonami Zn(II) pomiędzy ludzkimi i kurzymi homologami nesfatyn. Obserwowano zależne od stężenia jonów Zn(II) przesunięcie współczynnika  $s_{(20,w)}$  z 0,94 S do 1,08 S dla gN1 (**Rys. 4.25A**, **Rys. 4.25B**). Wraz ze wzrostem stężenia jonów Zn(II) pojawiała się nowa subpopulacja sedymentujących cząstek przy 2,16 S i 2,6 S oraz  $MW_{app}$  równym 33 kDa i 28 kDa dla warunków odpowiednio z 50  $\mu$ M i 500  $\mu$ M Zn(II) (**Tab. 4.5**). Powyższymi zmianom dodatkowo towarzyszyło silne zmniejszenie wartości współczynnika  $f/f_0$  z 1,8 do 1,2,



**Rys. 4.25** SV-AUC gN1 i gN1/2 w obecności jonów Zn(II)

Eksperymenty SV-AUC prowadzono w obecności 50/500  $\mu\text{M}$  Zn(II) lub 5 mM EDTA (szare linie). Dystrybucja współczynnika sedymentacji  $c(s)$  dla białka: gN1 (A, B); gN1/2 (C).

co ponownie wskazuje na silne zmniejszenie objętości hydrodynamicznej neuropeptydu. Jednak w przeciwieństwie do wyników uzyskanych dla hN1 w przypadku krótkiego białka obserwowano agregację skutkującą pojawieniem się trzeciej bardzo szerokiej dystrybucji  $c(s)$  o niskiej intensywności i szczycie przy 3,5 oraz 4–4,5 S w obecności odpowiednio 50  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$  Zn(II). Zmianie uległ również stosunek pól powierzchni szczytów odpowiadających stanom monomer-dimer do około 2:1. Co więcej, nie dochodzi do ich nakładania jak miało to miejsce w przypadku hN1. Zmiany dystrybucji  $c(s)$  pojawiły się również w przypadku gN1/2 (Rys. 4.25C). W obecności 50  $\mu\text{M}$  Zn(II) obserwowano przesunięcie wartości parametru  $s_{(20,w)}$  z 1,86 S do 2,05 S i dodatkowo obserwowano pojawienie się nowej subpopulacji

Tab. 4.5 Parametry hydrodynamiczne kurzych nesfatyn

Białko	Związek	c [mg/ml]	rmsd $\times 10^3$	$s_{(20,w)}$ [S]	f/f <sub>0</sub>	R <sub>h</sub> [nm]	MW <sub>app</sub> [kDa]
gN1	5 mM) EDTA	0,7	7,97	0,94	1,75	2,53	10,3 (100%)
		1,0	9,10	0,94	1,75	2,53	10,2 (100%)
		1,3	9,39	0,94	1,75	2,52	10,2 (100%)
	(50 $\mu$ M) ZnCl <sub>2</sub>	0,7	8,14	1,08	1,61	2,38	11,1 (83%)
				2,16		3,37	31,4 (17%)
		1,0	8,76	1,05	1,68	2,51	11,4 (83%)
				2,18		3,62	33,9 (17%)
		1,3	9,24	1,04	1,68	2,49	11,2 (86%)
				2,14		3,58	33,1 (14%)
	(500 $\mu$ M) ZnCl <sub>2</sub>	0,7	8,16	1,52	1,22	1,88	12,3 (56%)
				2,60		2,46	27,6 (44%)
		1,0	8,75	1,50	1,25	1,92	12,4 (49%)
				2,59		2,52	28,1 (51%)
		1,3	9,42	1,54	1,21	1,86	12,4 (49%)
				2,63		2,43	27,6 (51%)
gN1/2	(5 mM) EDTA	0,92	8,24	1,87	1,47	2,70	21 (100%)
		1,32	8,94	1,86	1,45	2,65	21 (100%)
		1,85	9,89	1,85	1,45	2,65	21 (100%)
	(50 $\mu$ M) ZnCl <sub>2</sub>	0,92	7,92	2,05	1,24	2,20	19 (87%)
				3,49		2,87	43 (13%)
		1,32	8,36	2,00	1,31	2,35	20 (85%)
				3,64		3,05	44 (15%)
		1,85	8,98	2,00	1,30	2,32	20 (87%)
				3,43		3,04	44 (13%)

Wartości w nawiasach wyrażają udział poszczególnych subpopulacji sedymentujących cząstek w odniesieniu do udziału dwóch głównych subpopulacji.

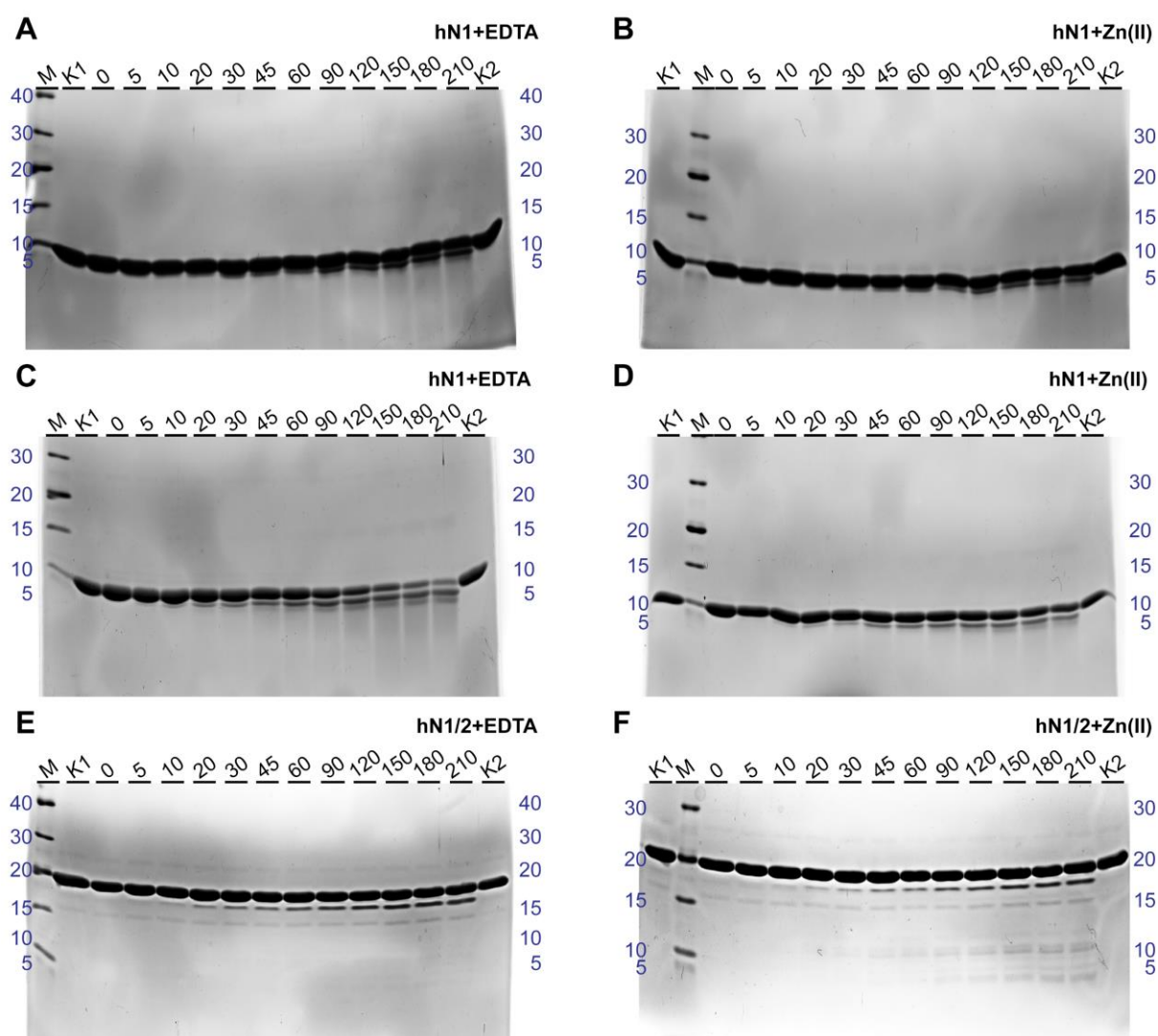
sedymentujących cząstek o szerokiej dystrybucji  $c(s)$  oraz MW<sub>app</sub> równej 44 kDa (Tab. 4.5). Powyższe obserwacje wskazują zatem na obecność dimeru.

Podsumowując – wykazano zachowanie w toku ewolucji zdolności kurzych nesfatyn do oddziaływania z jonami Zn(II). Jednakowoż, pomimo wysokiej homologii sekwencji ludzkich i kurzych nesfatyn obserwowano większą skłonność kurzych homologów do agregacji, co może być skutkiem różnic w mechanizmie interakcji homologów z jonami Zn(II).



## 4.6 OGRANICZONA PROTEOLIZA NESFATYN

W celu dalszego zbadania zmian strukturalnych wywołanych wiązaniem jonów Zn(II) przeprowadzono ograniczoną proteolizę ludzkich i kurzych homologów nesfatyn (**Rozdział 3.2.9**). Wszystkie reakcje prowadzono w obecności EDTA lub jonów Zn(II) z wykorzystaniem trypsyny, która preferencyjnie hydrolizuje wiązanie peptydowe przy końcu C Arg oraz Lys [210]. Domeny globularne białek niechętnie ulegają proteolizie w przeciwieństwie

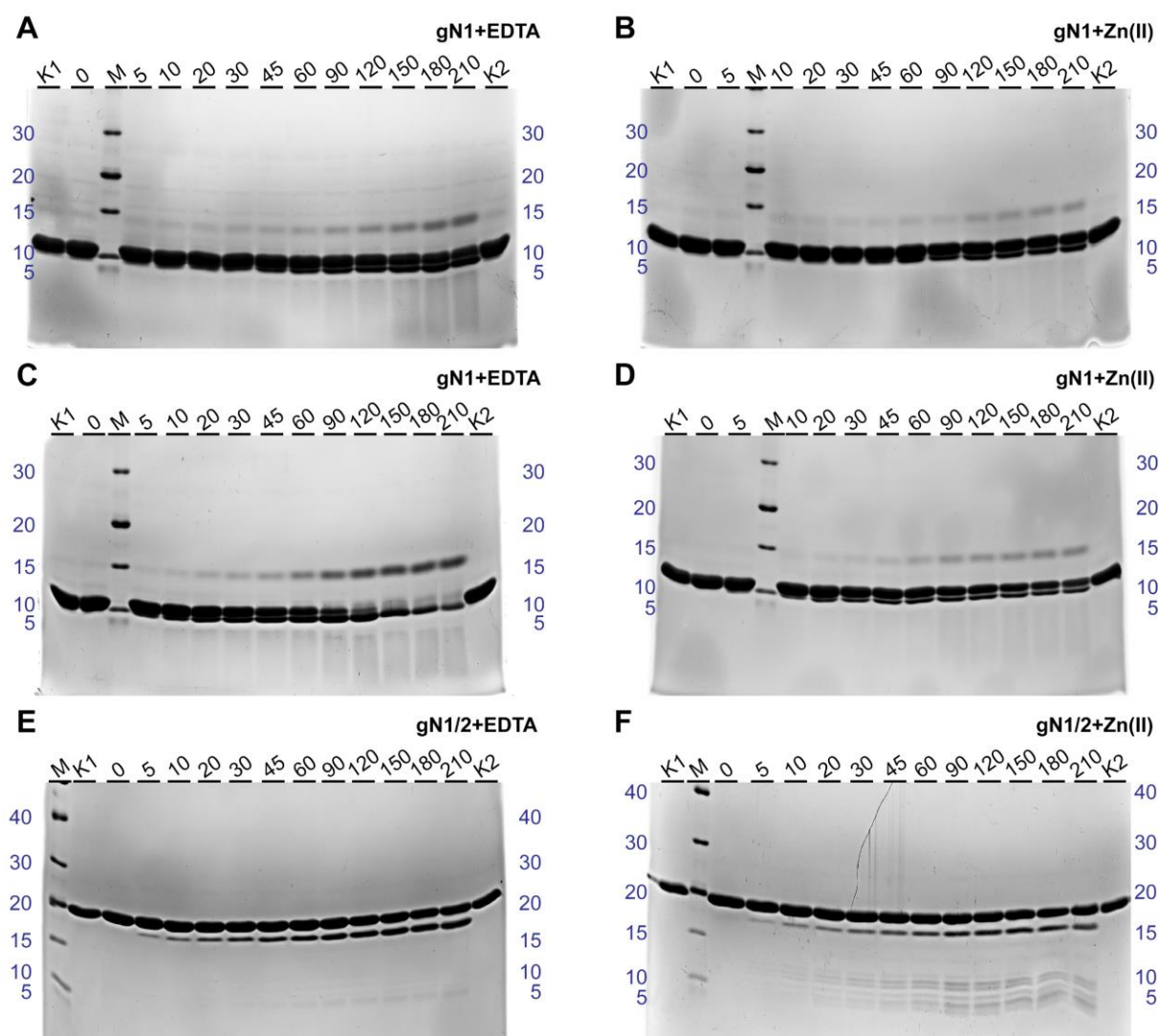


**Rys. 4.26** Analiza SDS-PAGE ograniczonej proteolizy hN1 i hN1/2

K1, K2 – próbki kontrolne niezawierające trypsyny pobrane odpowiednio na początku i końcu eksperymentu; M standard białkowy PageRuler Broad Range (*Rozdział 3.1.4.7*); 0-210 – próbki pobrane w interwałach czasowych podanych w minutach u góry każdego panelu. Zarówno hN1 (A- D) jak i hN1/2 (E, F) były inkubowane z trypsyną w stosunku masowym enzym:substrat równym 1:5000 oraz w przypadku hN1 dodatkowo w stosunku 1:1000 (C, D). Nesfatyny inkubowano w obecności EDTA (A, C, E) lub 500 (B, D)/50  $\mu$ M Zn(II) (F) w przypadku odpowiednio hN1 i hN1/2.

do regionów nieustrukturyzowanych, które stanowią lepszy substrat dla proteaz [210,211]. W związku z tym technika ograniczonej proteolizy umożliwia badanie zmian strukturalnych wywołanych wiązaniem ligandu jak również identyfikację domen ustrukturyzowanych [210–213].

Zarówno apo-hN1 (Rys. 4.26A) jak i apo-gN1 (Rys. 4.27A) inkubowane z trypsyną w stosunku masowym enzym:substrat (e/s) równym 1:5000 ulegały proteolizie zaskakująco wolno jak na białka należące do rodziny IDPs. Pasma odpowiadające formom apo- obu homologów były widoczne w żelu nawet po 210 min inkubacji z enzymem (Rys. 4.26A i Rys. 4.27A,



**Rys. 4.27** Analiza SDS-PAGE ograniczonej proteolizy kurzych nesfatyn

K1, K2 – próbki kontrolne niezawierające trypsyny pobrane odpowiednio na początku i końcu eksperymentu; M standard białkowy PageRuler Broad Range (Rozdział 3.1.4.7); 0-210 – próbki pobrane w interwałach czasowych podanych w minutach u góry każdego panelu. Zarówno gN1 (A, B) jak i gN1/2 (E, F) były inkubowane z trypsyną w stosunku masowym enzym:substrat równym 1:5000 oraz w przypadku gN1 dodatkowo w stosunku 1:1000 (C, D). Nesfatyny inkubowano w obecności EDTA (A, C, D) lub 500 (B, D)/50  $\mu$ M Zn(II) (F) w przypadku odpowiednio gN1 i gN1/2.



śląd 210). Głównymi produktami proteolizy hN1 były peptydy o  $MW_{app}$  około 7 kDa (**Rys. 4.26A**) podczas gdy głównymi produktami proteolizy gN1 były peptydy o  $MW_{app}$  około 5 i 7 kDa oraz nieoczekiwane pasmo o mniejszej ruchliwości elektroforetycznej niż pasmo substratu i  $MW_{app}$  równej około 14,2 kDa. Proteoliza holo-hN1 (**Rys. 4.26B**) oraz holo-gN1 (**Rys. 4.27B**) wydawała się natomiast postępować wolniej w porównaniu do proteolizy form apo- ze względu na mniejszą ilość oraz intensywność powstających produktów trawienia. Kontrolne trawienie apo-hNucb2 (**Rys. S8A**) przy tym samym stosunku masowym e/s wykazało, iż hydroliza białka pełnej długości postępowała szybciej w stosunku do form homologów apo-N1. Początkowo obserwowano akumulację produktów proteolizy o  $MW_{app}$  około 36 i 32 kDa. W miarę postępu reakcji hydrolizy zwiększała się także intensywność produktów o  $MW_{app}$  około 32, 26, 23 i 15 kDa. Po upływie 120 min inkubacji nastąpił niemal całkowity zanik pasma odpowiadającego formie apo-hNucb2 (**Rys. S8A**, ślad 120). Z drugiej strony otrzymany profil produktów proteolizy holo-Nucb2 (**Rys. S8A**) zawierał bardzo intensywne pasmo odpowiadające białku pełnej długości przez cały czas trwania reakcji. Co więcej, w przypadku formy holo-hNucb2 głównymi obserwowanymi produktami trawienia były pasma o  $MW_{app}$  około 38 i 36 kDa, których intensywność była większa dopiero pod koniec reakcji (**Rys. S8A**; pasma 90-210).

Ze względu na ograniczoną rozdzielczość poprzednich eksperymentów, przeprowadzone zostały dodatkowe eksperymenty ograniczonej proteolizy, tym razem w stosunku masowym 1:1000 (e/s) w celu lepszej obserwacji efektów indukowanych przez Zn(II). Apo-hN1 (**Rys. 4.26C**) oraz apo-gN1 (**Rys. 4.27C**) ulegały hydrolizie o wiele wydajniej w porównaniu do holo-hN1 (**Rys. 4.26D**) i holo-gN1 (**Rys. 4.27D**) przy wyższym stosunku masowym e/s. Ponadto intensywność nieoczekiwanego produktu o zawyżonej  $MW_{app}$  była również znacznie większa dla apo-gN1. Jednakowoż, w obecności jonów Zn(II) powstawanie powyższego pasma jest wyraźnie spowolnione. Co więcej podczas proteolizy apo-hN1 również pojawiło się bardzo słabe pasmo o  $MW_{app}$  około 14 kDa (**Rys. 4.26D**). W celu obserwacji pełnej degradacji gN1 i jej efektów na produkt o  $MW_{app}$  14 kDa wykonano dodatkowe eksperymenty. W tym celu apo- i holo-gN1 inkubowano z trypsyną przez 24 h zaraz po przygotowaniu próbek (**Rys. S9A**) lub po ich wcześniejsze inkubacji (20 °C, 24 h; **Rys. S9B**). Niemniej jednak, w obu przypadkach pełna degradacja białka była obserwowana. Dodatkowo, wszystkie próbki inkubowane przed proteolizą zawierały więcej pasm o bardzo niskiej intensywności i wyższej  $MW_{app}$  niż białko podstawowe. W celu dalszego zbadania peptydu o  $MW_{app}$  14 kDa został on poddany identyfikacji przy pomocy MS. Zidentyfikowane peptydy (dane niepokazane) pochodziły od gN1 i pokrywały sekwencję białka w 86% z brakującymi dwoma peptydami na końcu C. Najprawdopodobniej obecność powyższego peptydu jest związana z mniejszą zdolnością

wiązania SDS, co jest cechą charakterystyczną IDPs. Zwiększenie tej właściwości podkreśla jednocześnie silną zależność struktury i/lub właściwości homologów N1 w zależności od stopnia modyfikacji ich sekwencji aminokwasowej.

Efekt wiązania jonów Zn(II) przez homologi N1/2 ponownie pozostawał w kontraście do wyników ograniczonej proteolizy otrzymanych dla homologów N1. Po pierwsze, apo-hN1/2 (**Rys. 4.26E**) i apo-gN1/2 (**Rys. 4.27E**) ulegały proteolizie znacznie wolniej w porównaniu do holo-hN1/2 (**Rys. 4.26F**) i holo-gN1/2 (**Rys. 4.27F**) w oparciu o ilość i intensywność otrzymanych pasm produktów procesowania białek. Po drugie w przypadku obu form apo- główny produkt procesowania wykazuje  $MW_{app}$  około 18 kDa. Dodatkowo w przypadku apo-hN1/2 nieznacznie wzrastała również intensywność pasma odpowiadającego  $MW_{app}$  równej około 15 kDa. Proteolityczne procesowanie holo-hN1/2 oraz gN1/2 również prowadziło do otrzymania peptydów o  $MW_{app}$  około 18 kDa, niemniej jednak obecne były dodatkowe produkty. W przypadku hN1/2 obserwowano wzrost intensywności pasm odpowiadających  $MW_{app}$  około 15, 11 i 5 kDa, podczas gdy dla procesowania gN1/2 były to pasma odpowiadające  $MW_{app}$  w zakresie 9–12 kDa.

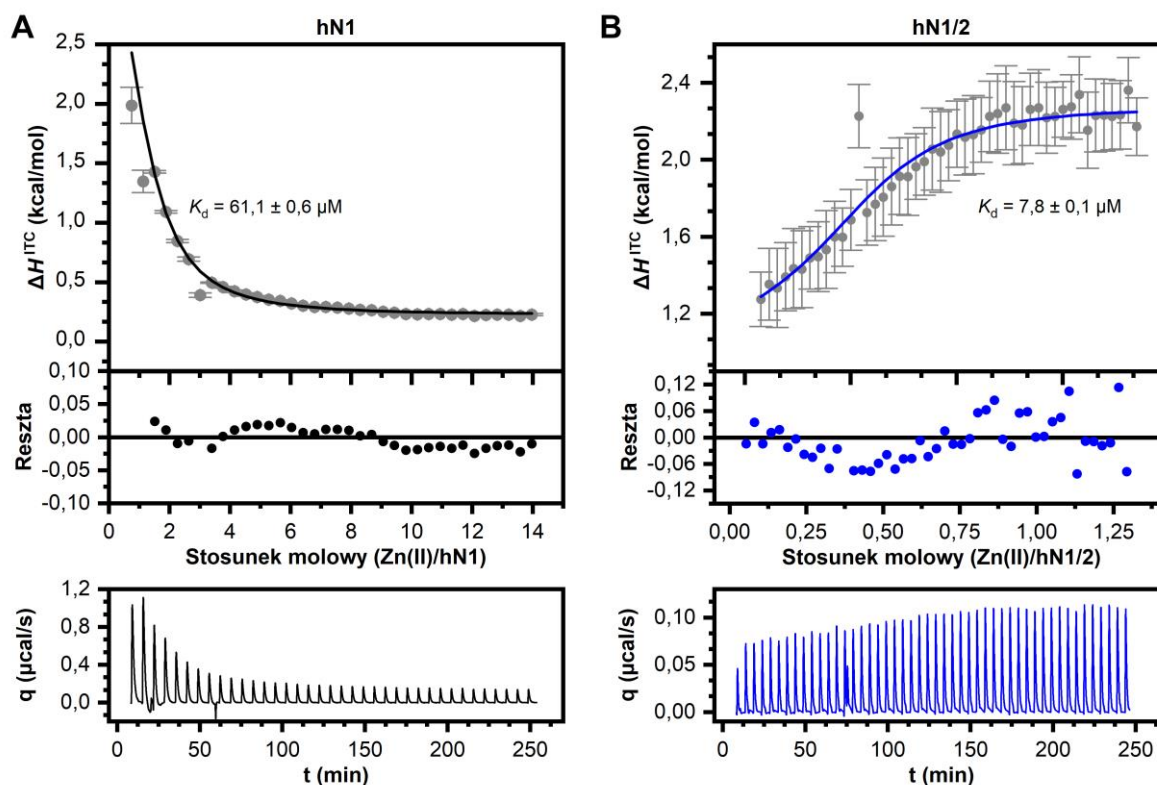
Podsumowując, ograniczona proteoliza ludzkich i kurzych homologów N1 oraz N1/2 uwidoczniała istotne różnice w ich budowie, które obserwowano w ich profilu proteolitycznym. Co zaskakujące apo-hN1 i apo-gN1 okazały się niedogodnym substratem proteazy, pomimo przynależności obu białek do rodziny IDPs. Białka te wraz z hN1/2 oraz gN1/2 ulegały proteolizie wolniej nawet w porównaniu do apo-hNucb2 przy tym samym stężeniu e/s. Z drugiej strony w obecności Zn(II) otrzymane wyniki silnie podkreślały odmienny wpływ jonów na oba białka.



### 4.7 ITC LUDZKICH NESFATYN

Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC) jest techniką umożliwiającą bezpośrednie wyznaczenie parametrów termodynamicznych charakteryzujących oddziaływanie białko-białko oraz białko-ligand w roztworze [214]. Technika ta oparta jest na pomiarze przepływu ciepła wywołanego procesem wiązania ligandu podczas miareczkowania analitu, co umożliwia wyznaczenie stałej dysocjacji ( $K_d$ ) i energii swobodnej wiązania ( $\Delta G^\circ = RT \ln K_d$ ). Dodatkowo ponieważ przepływ ciepła mierzony jest w warunkach stałego ciśnienia jest on związany ze zmianą entalpii układu ( $\Delta H = q_p$ ) i podczas pomiaru możliwe jest

wyznaczenie entalpii wiązania oraz entropii wiązania z podstawowej zależności termodynamicznej:  $\Delta G^\circ = \Delta H - T \Delta S$  [214,215]. Podczas realizacji projektu pomiary ITC prowadzono w celu wyznaczenia powyższych parametrów termodynamicznych dla ludzkich N1 i N1/2 (**Rozdział 3.2.8**). W przypadku hN1 podczas miareczkowania białka Zn(II) obserwowane były intensywne endotermiczne ciepła, które osiągały plateau przy wysokim nadmiarze molowym jonów Zn(II) (**Rys. 4.28A**). Powyższe wyniki wskazywały na niską wartość  $K_d$ , co potwierdziły wyniki dopasowania i otrzymana wartość  $K_d$  równa około 61  $\mu\text{M}$  dla hN1. Wyznaczona entalpia wiązania  $\Delta H^{\text{ITC}}$  wyniosła około 5 kcal/mol. Z drugiej strony wysoka wartość wyznaczonego współczynnika entropowego sprawiła (**Tab. 4.6**), iż otrzymana wartość energii swobodnej była negatywna i wynosiła około -5,75 kcal/mol. Dane były dopasowywane do modelu z jednym miejscem wiążącym przy czym wartość ułamka białka inkompetentnego (IPF, ang. *incompetent protein fraction*) wynosiła 0, co wskazywało na oddziaływanie hN1 z jonami Zn(II) w stosunku 1:1 na monomer. Wyniki analizy wskazują, iż proces wiązania jonów Zn(II) przez hN1/2 znacząco odbiegał od hN1. Po pierwsze otrzymany termogram (**Rys. 4.28B**) cechowały ujemne ciepła wiązania względem stanu równowagowego, co z kolei wskazywało na egzotermiczny charakter wiązania jonów Zn(II) przez hN1/2. Dodatkowo hN1/2 oddziaływała z jonami Zn(II)



**Rys. 4.28** Wyniki ITC ludzkich nesfatyn

(**A**) ITC hN1 i (**B**) ITC hN1/2. Panele zawierają: krzywą miareczkowania kalorymetrycznego (u góry panelu); wartości resztkowe punktów po dopasowaniu (środek panelu); termogram ITC (u dołu panelu).

Tab. 4.6 Parametry termodynamiczne wiązania jonów Zn(II) przez hN1 i hN1/2

Parametr	hN1 + Zn(II)	hN1/2 + Zn(II)
[hN1]/[hN1/2] ( $\mu\text{M}$ )	100	100
[Zn(II)] ( $\mu\text{M}$ )	7000	500
$\chi^2$	1,04	1,22
$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$61,1 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,1$
$\Delta H$ (kcal/mol)	$5,2 \pm 0,4$	$-1,2 \pm 0,2$
$T\Delta S$ (kcal/mol)	10,908	5,725
$\Delta G$ (kcal/mol)	-5,748	-6,965
IPF	0	$0,57 \pm 0,08$

Parametry otrzymano poprzez dopasowanie danych do modelu AB.

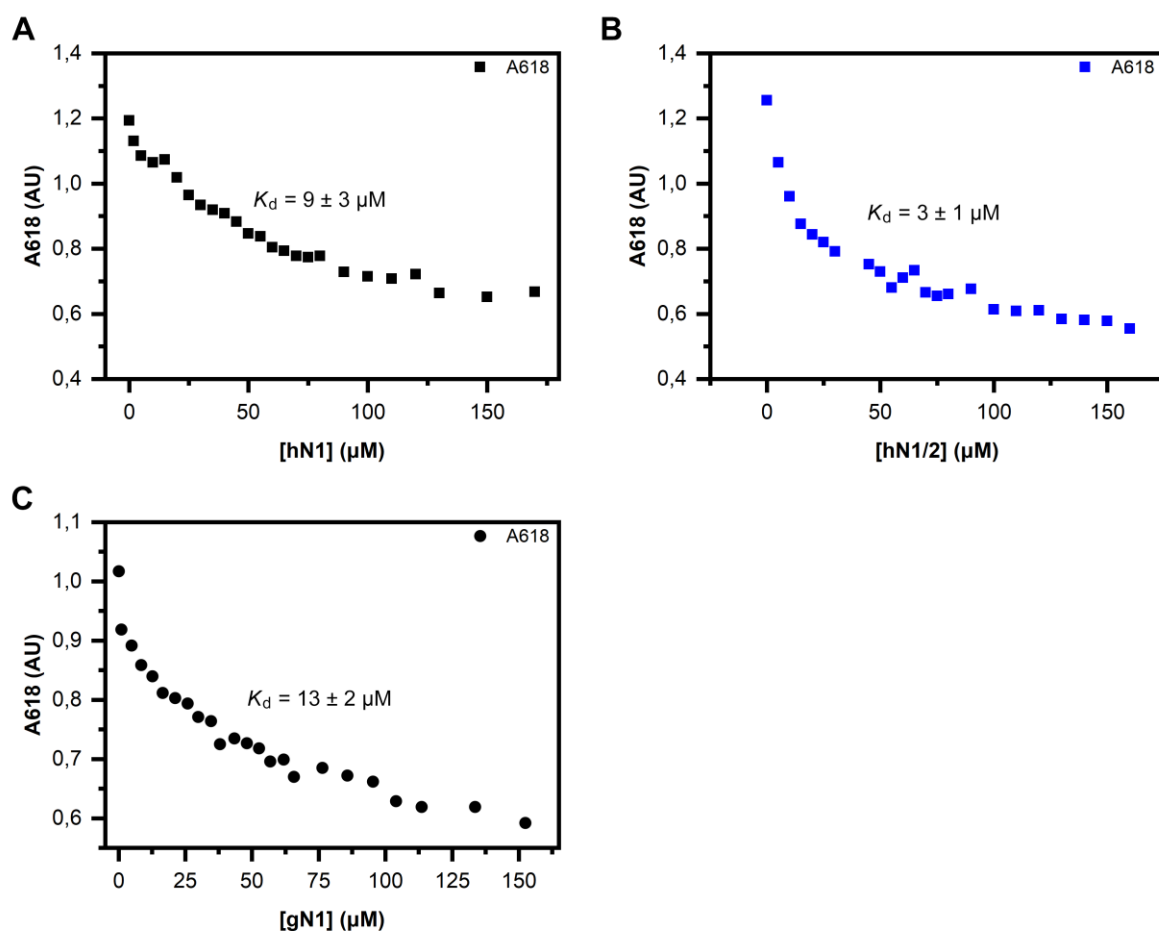
z większym powinowactwem przez co szybciej ulegała wysyceniu jonami. W zawiązku z tym dopasowanie otrzymanej krzywej miareczkowania kalorymetrycznego do tego samego modelu co hN1 prowadziło do otrzymania  $K_d$  równej  $7,8 \mu\text{M}$  (Tab. 4.6). Powyższa wartość jest niemal dziesięciokrotnie mniejsza niż  $K_d$  wyznaczona dla holo-hN1. Wiązanie jonów przez hN1/2 było bardziej uprzywilejowane termodynamicznie niż w przypadku hN1 w oparciu o wyznaczoną energię swobodną wiązania wynoszącą około  $-7$  kcal/mol. Zdecydowanie większy był również udział czynnika entalpowego w porównaniu do hN1, który wyniósł około  $-1,2$  kcal/mol. Wreszcie, ostatnią różnicą w stosunku do izolowanej hN1 była wartość współczynnika IPF wynosząca około  $0,5$ , co wskazuje na bardziej złożoną stechiometrię, która dla hN1/2 wyniosła 2:1 ( $\text{Zn}(\text{hN1}/2)_2$ ). W przypadku hN2 nie udało się zarejestrować odpowiedniej jakości danych z powodu destabilizacji białka podczas eksperymentu. Obserwowano jednak endotermiczne ciepła wiązania wskazujące na możliwe oddziaływanie z jonami (dane niepokazane), co było następnie weryfikowane innymi metodami. Wysoka niestabilność kurzych homologów nesfatyn podczas ITC uniemożliwiła wyznaczenie termodynamicznych parametrów wiązania przez nie jonów Zn(II) powyższą metodą. Niemniej jednak również obserwowano trendy wskazujące na wiązanie jonów przez kurze nesfatyny.

Podsumowując, przy pomocy ITC wyznaczono termodynamiczne parametry wiązania jonów Zn(II) przez hN1 oraz hN1/2, które wskazywały (tak jak w przypadku wyników opisanych powyżej) na odmienny wpływ jonów Zn(II) zarówno na strukturę obu białek jak i ich sposób oddziaływania z nimi.



## 4.8 SPEKTROSKOPIA ABSORPCYJNA

W celu zbadania zdolności nesfatyn do wiązania jonów Zn(II) inną, niezależną techniką przeprowadzono eksperymenty konkurencyjnego ich wiązania w obecności chromoforu Zincon (**Rozdział 3.2.10**). Zincon jest związkiem tworzącym kompleksy 1:1 z jonami Zn(II) o literaturowej wartości stałej dysocjacji kompleksu  $ZI \times Zn$  równej  $2,09 \mu M$  [201]. Wartość ta została wyznaczona dla kontroli, w warunkach eksperymentalnych stosowanych w projekcie i wyniosła  $K_{d,ZI \times Zn}$  równe  $1,3 \mu M \pm 0,2 \mu M$ . Otrzymana stała dysocjacji kompleksu  $ZI \times Zn$  była zatem zbliżona do literaturowej. Podczas miareczkowania kompleksu  $ZI \times Zn$  za pomocą hN1 obserwowano zależne od stężenia białka zmniejszenie absorbancji przy długości fali  $\lambda=618 \text{ nm}$  (A618). Wynik ten wskazuje zatem na konkurencyjne wiązanie jonów Zn(II) przez hN1. Wyznaczona stała dysocjacji kompleksu  $hN1 \times Zn$  wyniosła  $9 \mu M \pm 3 \mu M$ . Efekt



**Rys. 4.29** Konkurencyjne miareczkowanie chromoforu ZI

Panele przedstawiają zanik A618 podczas konkurencyjnego miareczkowania ZI ( $50 \mu M$ ) wysyczonego  $50 \mu M$  Zn(II) przez (A) hN1; (B) hN1/2; (C) gN1.

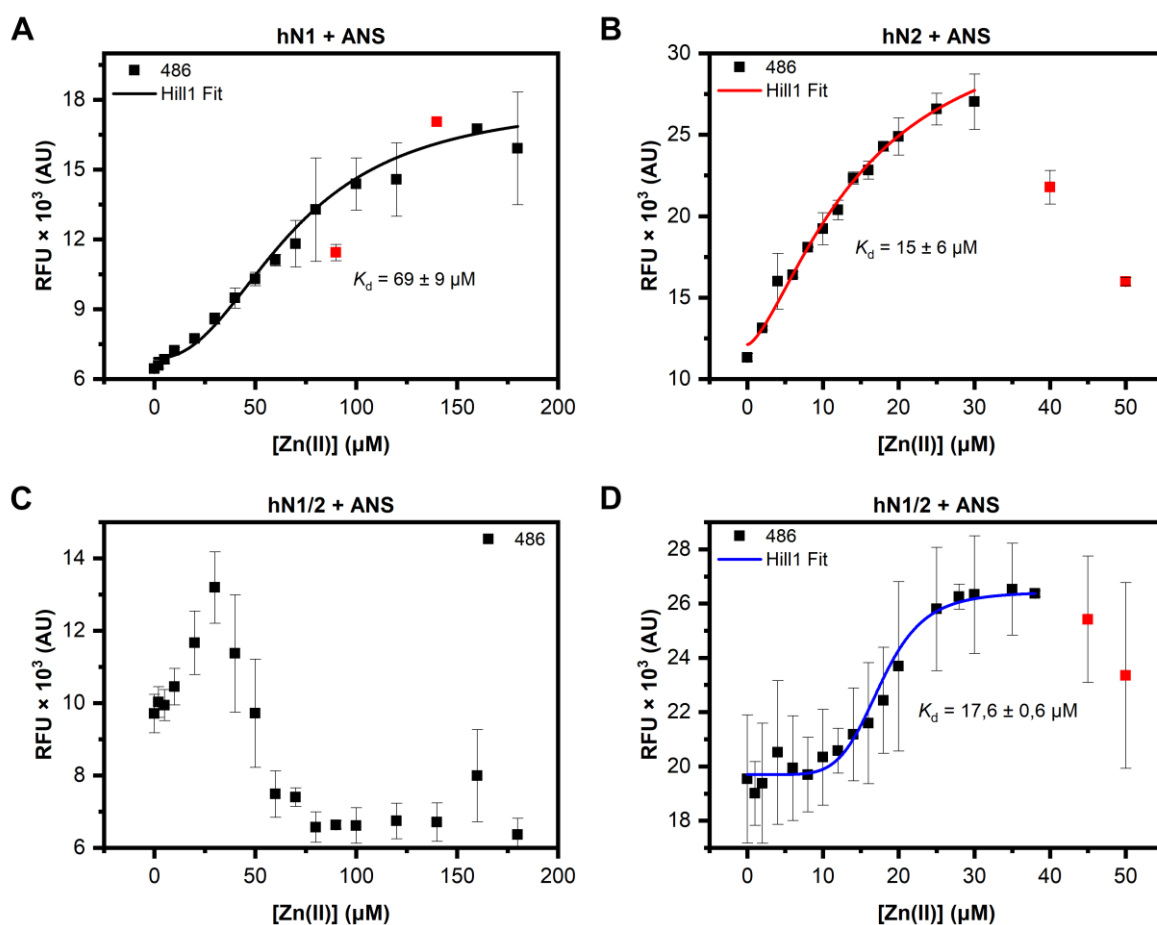
konkurencyjnego wiązania jonów Zn(II) był silniejszy w przypadku hN1/2 bazując na otrzymanej wartości  $K_d$  równej  $3 \mu\text{M} \pm 1 \mu\text{M}$ . W przypadku gN1 również obserwowano zależny od stężenia białka spadek wartości A618, co ponownie potwierdza wiązanie jonów Zn(II) przez homologi N1. Wyznaczona stała dysocjacji kompleksu gN1  $\times$  Zn wyniosła w tym wypadku  $13 \mu\text{M} \pm 2 \mu\text{M}$ . Co ciekawe, nie obserwowano spadku wartości A618 podczas miareczkowania ZI  $\times$  Zn za pomocą gN1/2 (dane niezalączone).



## 4.9 SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCYJNA

### 4.9.1 Pomiary fluorescencji ANS w obecności nesfatyn

W celu pogłębienia charakterystyki interakcji jonów Zn(II) z nesfatynami wykonano pomiary fluorescencji ANS w obecności holo-form białek (**Rozdział 3.2.11.1**). ANS jest



**Rys. 4.30** Emisja ANS przy 468 nm w obecności ludzkich nesfatyn

Zmiany RFU fluoroforu rejestrowano w obecności (A) hN1; (B) hN2; (C, D) hN1/2 miareczkowanych Zn(II). Czerwone punkty przedstawiają dane wyłączone z dopasowania krzywoliniowego.

fluoroforem, który wykazuje niską wydajność kwantową fluorescencji w wodzie. Natomiast podczas preferencyjnego wiązania fluoroforu do hydrofobowych kieszeni białek obserwowany jest znaczny wzrost intensywności fluorescencji jak również hipsokromowe przesunięcie maksimum widma emisji [216].

Zgodnie z powyższym, wolny ANS wzbudzany promieniowaniem przy długości fali 350 nm wykazywał znikomą wartość intensywności fluorescencji (RFU, ang. *raw fluorescence units*) z maksimum emisji obserwowanym przy 517 nm (**Rys. S7**). Jednakowoż, widma emisji ANS w obecności holo-hN1 wykazywały zależne od stężenia jonów Zn(II) hipsokromowe przesunięcie maksimum widma do 468 nm, któremu jednocześnie towarzyszyło znaczne zwiększenie RFU (**Rys. S7A**). Wzrost RFU był stopniowy i początkowo o wartości zbliżonej do wolnego fluoroforu, co wskazuje iż apo-hN1 nie posiada kieszeni hydrofobowych zdolnych do wiązania sondy fluorescencyjnej. Wartości RFU przy 468 nm zostały następnie dopasowane do modelu Hilla, co pozwoliło na estymację stałej dysocjacji  $K_d$  do wartości równej  $69 \mu\text{M} \pm 9 \mu\text{M}$  (**Rys. 4.30A**). Otrzymana wartość pozostawała w wysokiej zgodności z wartościami stałej wyznaczonymi przy pomocy pomiarów CD (**Rozdział 4.4.1.2**) oraz ITC (**Rozdział 4.7**). Widma emisyjne ANS w obecności holo-hN2 również cechowało zależne od stężenia jonów Zn(II) przesunięcie hipsokromowe (**Rys. S7B**). Co ciekawe, początkowa RFU fluoroforu była większa w porównaniu do wyników uzyskanych dla hN1. Ponadto wzrost RFU w obecności hN2 przebiegał wydajniej i do wyższych wartości w stosunku do RFU buforu. W związku z tym można przypuszczać, że kieszenie hydrofobowe hN2 cechują się większą dostępnością dla ANS jak i wykazują większą ekspozycję pod wpływem jonów Zn(II) w stosunku do hN1. Jednakowoż, po przekroczeniu stężenia jonów Zn(II) równego  $30 \mu\text{M}$  obserwowano spadek RFU, podobnie jak w przypadku pomiarów CD (**Rozdział 4.4.1.2**). Dopasowanie danych przy 468 nm w funkcji stężenia jonów Zn(II) do modelu Hilla umożliwiło estymację  $K_d$  do wartości równej  $15 \mu\text{M} \pm 6 \mu\text{M}$  (**Rys. 4.30B**). Jednocześnie powyższy wynik wskazuje na wiązanie jonów Zn(II) przez hN2. Widmo emisyjne ANS w obecności hN1/2 również cechowało się przesunięciem hipsokromowym z maksimum przy 468 nm (**Rys. S7C**, **Rys. S7D**). Przesunięciu widma emisji towarzyszył także wzrost RFU. Dodatkowo różnica pomiędzy RFU wolnej sondy jak i związanej do apo-hN1/2 była największa, co wskazuje na największą dostępność kieszeni hydrofobowych w dotychczas badanych ludzkich nesfatynach. Niemniej jednak ponownie obserwowano spadek wartości RFU po przekroczeniu stężenia jonów Zn(II) równego  $40 \mu\text{M}$  (**Rys. 4.30C**). Z powodu otrzymania dwuprzęściowego trendu danych otrzymanych przy 468 nm ponownie wykonano pomiary emisji ANS w obecności hN1/2 miareczkowanych Zn(II) w mniejszym zakresie stężeń, tj. 0–50  $\mu\text{M}$  (w którym dla pierwszej serii obserwowano trend

sugerujący wiązanie sondy). Dopasowanie modelu Hilla do otrzymanych danych pozwoliło na wyznaczenie pozornej stałej dysocjacji na równą  $17,6 \mu\text{M} \pm 0,6 \mu\text{M}$  (**Rys. 4.30D**). Otrzymana stała dysocjacji odpowiadała wartościom  $K_d$  dotychczas otrzymanym przy pomocy spektrometrii CD (**Rozdział 4.4.1.2**) oraz ITC (**Rozdział 4.7**). Co, ciekawe nie udało się zaobserwować podobnych efektów wiązania ANS przez kurze homologi nesfatyn w obecności jonów Zn(II) (dane niepokazane). Fakt ten podkreśla różnice pomiędzy homologami mimo bardzo wysokiego podobieństwa ich sekwencji.

Podsumowując, ponownie wykazano zdolność wiązania jonów Zn(II) przez ludzkie nesfatyny a zwłaszcza silną destabilizację izolowanej hN2 pod wpływem powyższych jonów. Ponadto hN2 zdaje się mieć znaczny wpływ na właściwości hN1/2, przy czym ponownie nie są one zwykłą sumą efektów obserwowanych dla izolowanych peptydów.

#### 4.9.2 Pomiary fluorescencji ThT w obecności nesfatyn

---

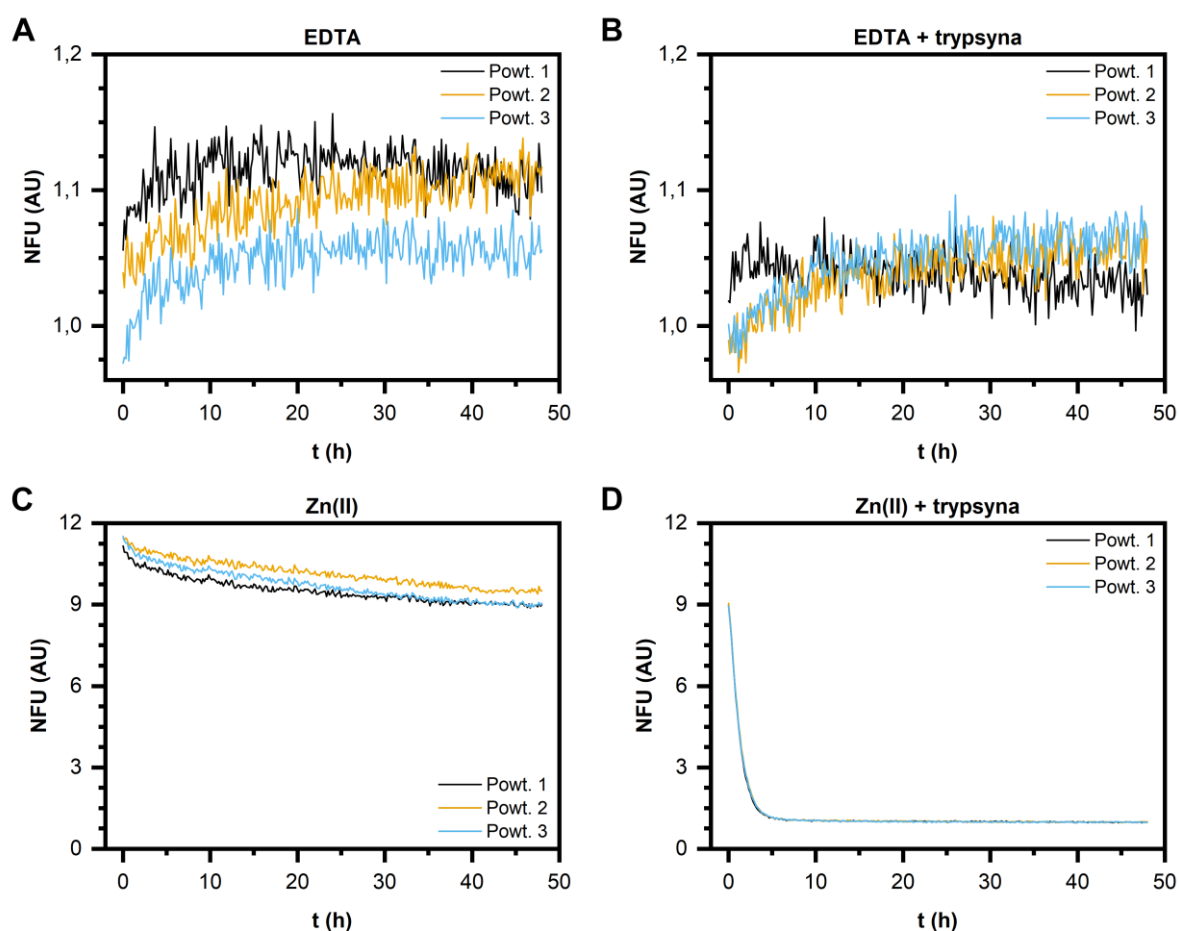
W celu zbadania zdolności nesfatyn do agregacji a zwłaszcza w kontekście pojawiania się pasma o wyższej  $MW_{app}$  podczas ograniczonej proteolizy (**Rozdział 4.6**) przeprowadzono pomiary wiązania ThT przez nesfatyny (**Rozdział 3.2.11.2**). W tym celu wykonywano pomiary zmian fluorescencji w czasie oraz w stanie ustalonym (ang. *steady-state fluorescence*). ThT jest fluoroforem, który już od 1965 r. jest powszechnie używany jako sonda fluorescencyjna specyficzna wobec fibryli amyloidowych [217]. Podczas wiązania ThT do fibryli amyloidowych następuje znaczny wzrost intensywności fluorescencji ThT, któremu towarzyszy przesunięcie maksimów zarówno wzbudzenia jak i emisji odpowiednio z 385 nm do 450 nm oraz z 445 nm do 482 nm [218–220]. Pokazano że, sonda wiąże się równolegle do długiej osi fibryli wykazując wysokie powinowactwo do motywów zawierających reszty aromatyczne oraz alifatyczne, zwłaszcza Val-Phe i Tyr-Leu [221].

Podczas pomiarów zmian fluorescencji w czasie inkubowano apo-gN1 (**Rys. 4.31A**, **Rys. 4.31B**) oraz holo-gN1 (**Rys. 4.31C**, **Rys. 4.31D**) w obecności ThT i nieobecności trypsyny (**Rys. 4.31A**, **Rys. 4.31C**) przez 48 h oraz w obecności trypsyny (**Rys. 4.31B**, **Rys. 4.31D**). Próbkę apo-gN1 zarówno w obecności trypsyny jak i bez niej cechowały się intensywnością znormalizowanej emisji na poziomie fluorescencji buforu (NFU oscylujące wokół 1). Odmiennie wyniki otrzymano dla holo-gN1 zarówno bez enzymu (**Rys. 4.31C**) jak i w obecności trypsyny (**Rys. 4.31D**), gdzie obserwowano wysoką wartość początkowej NFU. Niemniej jednak NFU próbek zawierających trypsynę zmniejszała się w czasie podążając hiperbolicznym trendem. Powyższy wynik kontrastował z wynikami zarejestrowanymi dla próbek bez enzymu,



gdzie obserwowano zdecydowanie stabilniejszą wartość NFU przez cały czas trwania eksperymentu.

Wyniki uzyskane podczas prowadzenia kinetycznych pomiarów fluorescencji wskazywały na wiązanie ThT przez holo-gN1. W celu głębszego zbadania tej właściwości oraz określenia czy jest ona zależna od stężenia jonów Zn(II) a także zachowana w toku ewolucji pomiędzy homologami przeprowadzono pomiary fluorescencji w stanie ustalonym w obecności homologów N1 oraz N1/2. Uzyskane wyniki cechował wyraźny wzrost wartości RFU przy 468 nm w sposób zależny od stężenia jonów Zn(II) dla hN1 (**Rys. S10A**) oraz gN1 (**Rys. S10B**). Ponadto, dane uzyskane przy tej długości fali w funkcji stężenia jonów Zn(II) wykazywały silnie hiperboliczny trend, który został dopasowany do modelu Hilla, co pozwoliło na estymację pozornej stałej dysocjacji do wartości równej  $71 \mu\text{M} \pm 3 \mu\text{M}$  dla hN1 (**Rys. 4.32A**) oraz  $77 \mu\text{M} \pm 6 \mu\text{M}$  dla gN1 (**Rys. S10B**). Uzyskane wartości  $K_d$  pozostają w doskonałej zgodności

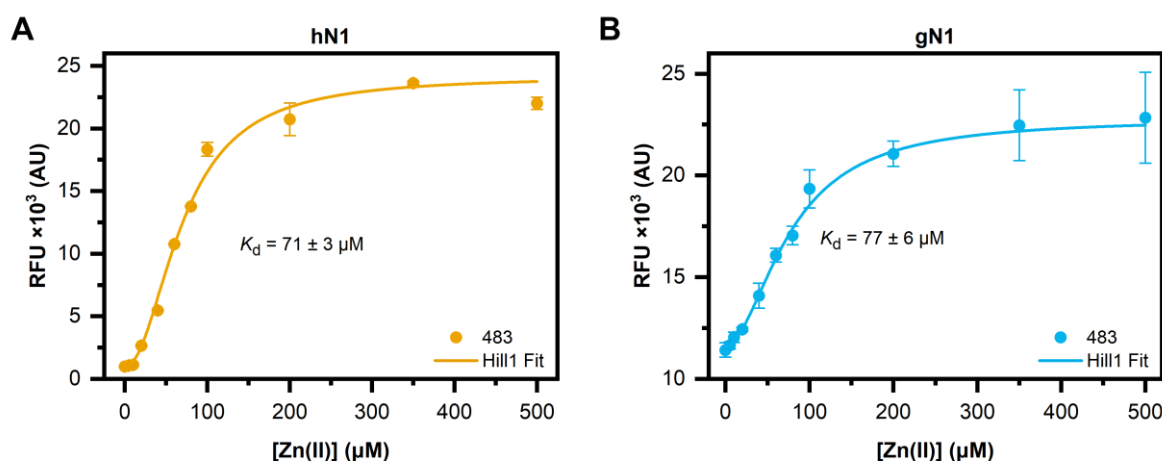


**Rys. 4.31** Kinetyczne pomiary agregacji gN1 w obecności ThT

Pomiary prowadzono w obecności 5 mM EDTA (**A**, **B**) i 500  $\mu\text{M}$  Zn(II) (**C**, **D**) w trzech powtórzeniach (Powt.). Panele (**B**, **D**) przedstawiają emisję fluorescencji ThT w próbkach suplementowanych trypsyną w stosunku masowym 1:1000 (e/s).

z wynikami dotychczas uzyskanymi przy pomocy spektroskopii CD (**Rozdział 4.4.1.2**), ITC (**Rozdział 4.7**) i pomiarów fluorescencji ANS (**Rozdział 4.9.1**) w obecności ludzkich nesfatyn. Z drugiej strony wyniki otrzymane dla homologów N1/2 ponownie silnie kontrastowały z wynikami uzyskanymi dla izolowanych homologów N1. Widma emisyjne ThT w obecności holo-hN1/2 (**Rys. S10C**) oraz holo-gN1/2 (**Rys. S10D**) charakteryzowała niska początkowa wartość RFU oraz dodatkowo spadek intensywności emisji indukowany jonami Zn(II).

Powyższy eksperyment pozwolił zatem na podkreślenie zmian oraz różnic strukturalnych pomiędzy ludzkimi oraz kurzymi homologami N1 i N1/2 powstającymi pod wpływem Zn(II). W przypadku hN1 oraz gN1 było to zależne od stężenia jonów Zn(II) formowanie się struktur o właściwościach amyloidowych (których bardziej szczegółowy opis wymaga dalszych badań), czego implikacje są poruszane szerzej w **Rozdziale 5**. Natomiast najprawdopodobniej w wyniku opisanej wcześniej destabilizacji hN1/2 oraz gN1/2 pod wpływem jonów Zn(II) obserwowano spadek powinowactwa ThT do tych białek.



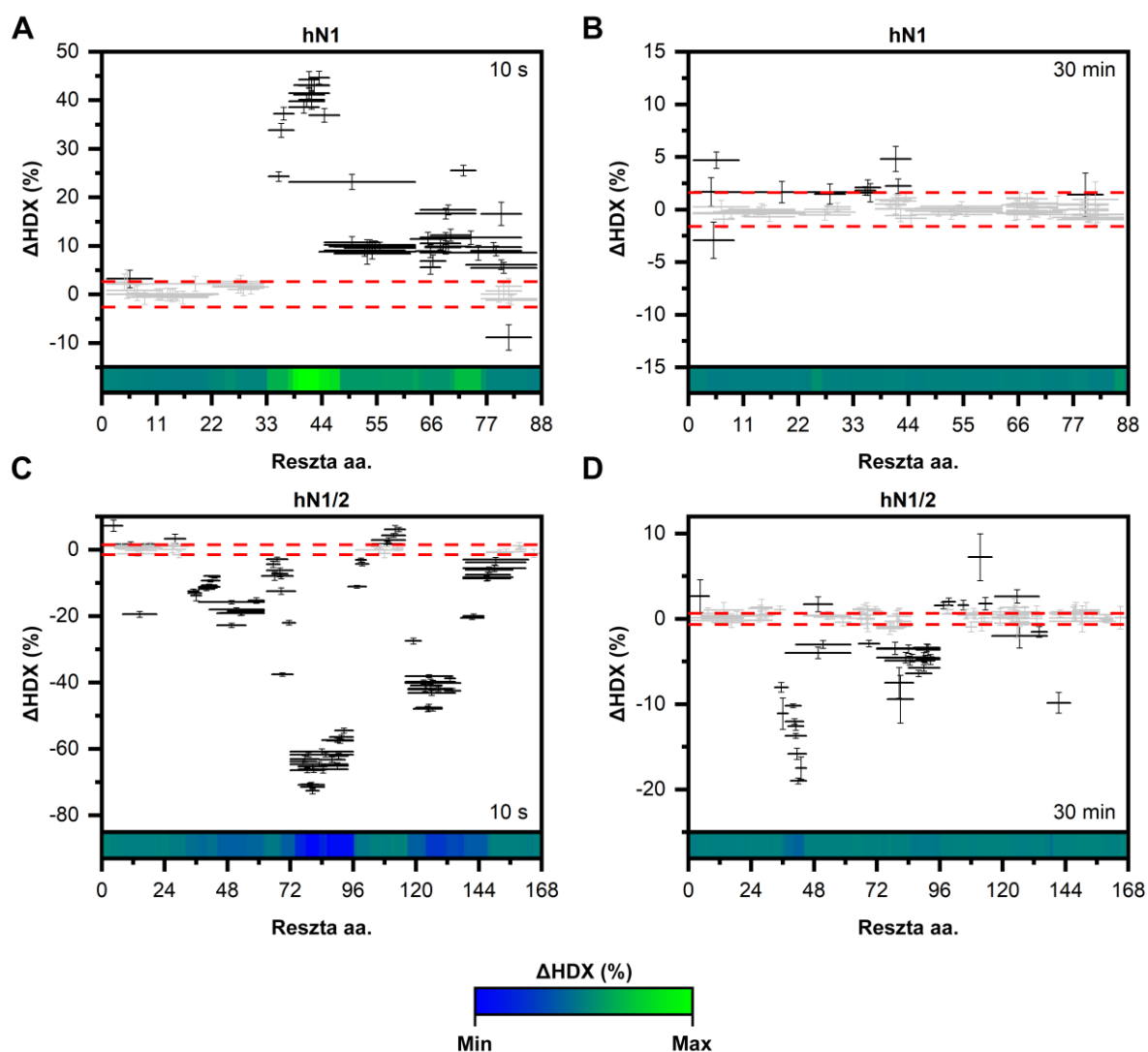
**Rys. 4.32** Emisja ThT przy 483 nm w obecności homologów holo-N1

RFU ThT przy 483 nm było rejestrowane w obecności (A) hN1 i (B) gN1 miareczkowanych Zn(II).



## 4.10 HDX-MS LUDZKICH I KURZYCH NESFATYN

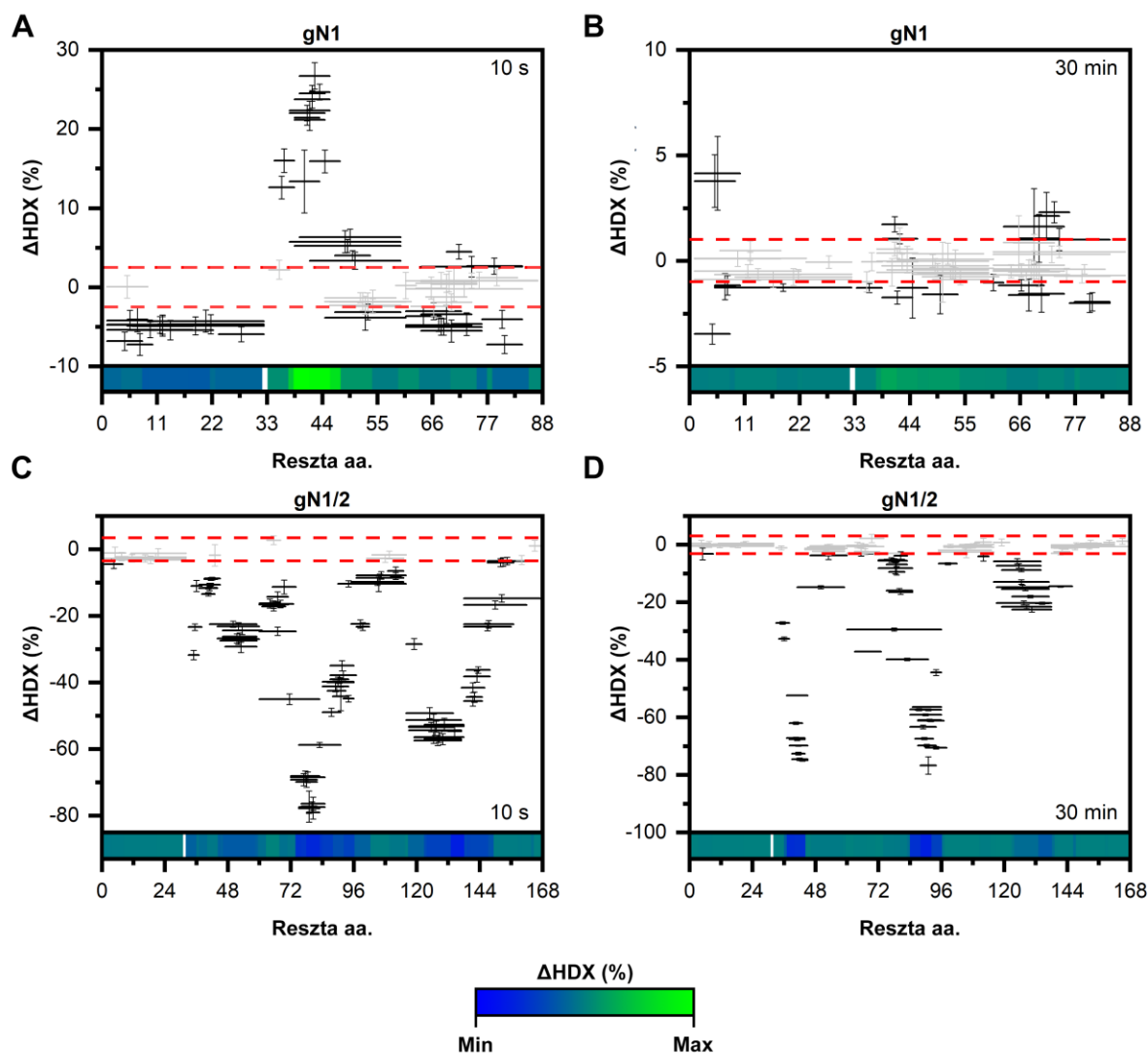
Wymiana izotopowa proton-deuter sprzężona ze spektrometrią mas (HDX-MS, ang. *hydrogen-deuterium exchange mass spectroscopy*) to technika analityczna umożliwiająca zbadanie dynamiki oraz struktury molekularnej białek. Metoda ta opiera się na analizie wymiany izotopowej protonu wiązania amidowego szkieletu głównego białka na deuter, który obecny jest w stosowanym rozpuszczalniku [222]. Zachodząca zatem wymiana izotopowa pociąga za



**Rys. 4.33** Analiza HDX-MS ludzkich nesfatyn

Panele przedstawiają różnice w relatywnej wymianie izotopowej pomiędzy stanami  $-/+Zn(II)$  w interwałach czasowych podanych w każdym panelu. Peptydy o statystycznie znaczącej i nieznaczącej wymianie izotopowej przedstawiono odpowiednio jako czarne i szare linie. Przedział ufności na poziomie 0,98 oznaczono jako czerwone przerywane linie. Mapa ciepła na dole każdego panelu oddaje różnicę w wymianie izotopowej dla zakresu danych uzyskanych dla danej nesfatyny dla wszystkich czasów inkubacji zgodnie z gradientem zamieszczonym na dole rysunku.

sobą zmianę masy cząsteczkowej, która z kolei może być śledzona przy pomocy spektrometrii mas [33]. Szybkość wymiany izotopowej jest silnie zależna od otoczenia chemicznego, w którym znajduje się proton wiązania amidowego. Na naturę otoczenia chemicznego wiązania peptydowego wpływ ma natomiast bliskość struktur wyższego rzędu, elastyczność szkieletu głównego, struktura wiązań wodorowych, jak i wreszcie dostępność dla rozpuszczalnika [33,222]. W związku z powyższym niskie stałe wymiany izotopowej obserwuje się typowo dla amidowych protonów uczestniczących w tworzeniu wewnątrzcząsteczkowej sieci wiązań wodorowych i przeciwnie, wysokie wartości stałej wymiany izotopowej są typowe dla rejonów



**Rys. 4.34** Analiza HDX-MS kurzych nesfatyn

Panele przedstawiają różnice w relatywnej wymianie izotopowej pomiędzy stanami  $-/+Zn(II)$  w interwałach czasowych podanych w każdym panelu. Peptydy o statystycznie znaczącej i nieznaczącej wymianie izotopowej przedstawiono odpowiednio jako czarne i szare linie. Przedział ufności na poziomie 0,98 oznaczono jako czerwone przerywane linie. Mapa ciepła na dole każdego panelu oddaje różnicę w wymianie izotopowej dla zakresu danych uzyskanych dla danej nesfatyny dla wszystkich czasów inkubacji zgodnie z gradientem zamieszczonym na dole rysunku.

wyeksponowanych do rozpuszczalnika, takich jak na przykład IDRs [33,222,223]. W celu opisanie miejsc zaangażowanych w oddziaływanie z  $Zn(II)$  oraz zmiany w stopniu ekspozycji szkieletu głównego wywołanego wiązaniem ligandu przeprowadzono eksperymenty HDX-MS (**Rozdział 3.2.12**). Uzyskane wyniki ponownie wskazywały na silny oraz odmienny wpływ jonów  $Zn(II)$  na ludzkie i kurcze homologi N1 oraz N1/2.

Przed analizą wymiany izotopowej przygotowano referencyjną listę peptydów w celu uzyskania najlepszego pokrycia sekwencji. W tym celu formy apo- oraz holo-nesfatyn o wyższym stężeniu końcowym (z dwóch stosowanych; **Rozdział 3.2.12**) były trawione na kolumnie

z immobilizowaną pepsyną a następnie listy zidentyfikowanych peptydów z obu stanów połączone. W ten sposób otrzymano referencyjną listę peptydów o 100% pokryciu sekwencji oraz zawierającą: 70 peptydów dla hN1 (**Rys. S11**; redundancja 9,5); 106 peptydów dla hN1/2 (**Rys. S12**; redundancja 7,9); 68 peptydów dla gN1 (**Rys. S13**; redundancja 10,3); 96 peptydów dla gN1/2 (**Rys. S14**; redundancja 7,5). Próbkę poddawano wymianie izotopowej w interwałach czasowych od 10 s do 150 min. Już po 10 s zarówno apo-hN1 (**Rys. S15A**) jak i apo-gN1 (**Rys. S16A**) po 10 s wykazywały całkowitą wymianę izotopową na całej długości sekwencji aminokwasowej, co było oczekiwane ze względu na ich przynależność do IDPs i wysoką dynamikę łańcuch głównego. W obecności Zn(II) obserwowano jednak statystycznie istotną różnicę we względnej wymianie izotopowej ( $\Delta$ HDX) po 10 s inkubacji na wykresie Woodsa [224] w peptydach obejmujących rejon pomiędzy 33–55 oraz 33–47 resztą aminokwasową dla odpowiednio holo-hN1 (**Rys. 4.33A**) oraz holo-gN1 (**Rys. 4.34A**). Najbardziej chronione przed wymianą były rejonu obejmujące 39–45 reszty aminokwasowej zarówno dla holo-hN1 (KQVIDVL) oraz holo-gN1 (RQVIDVL). Po 30 min inkubacji holo-hN1 (**Rys. 4.33B**) oraz holo-gN1 (**Rys. 4.34B**) ponownie wykazywały całkowitą wymianę izotopową na całej długości sekwencji i nie obserwowano statystycznie znaczącej  $\Delta$ HDX pomiędzy stanami  $-/+$  Zn(II).

Profil wymiany izotopowej H/D w przypadku apo-hN1/2 (**Rys. S15D-F**) oraz apo-gN1/2 (**Rys. S16D-F**) znacząco odbiegał od wyników uzyskanych dla krótszych homologów N1. Przede wszystkim, homologi N1/2 cechowały się mozaikowym profilem wymiany izotopowej, w którym przeplatały się rejonu o szybkiej i wolnej wymianie H/D. W przypadku hN1/2 zidentyfikowano trzy regiony o dużej wymianie H/D pomiędzy 1–32, 97–116 i 138–167 resztą aminokwasową, które już po 10 s charakteryzowała 100% względna wymiana izotopowa. Z drugiej strony regiony zawarte pomiędzy 33–96 oraz 116–137 resztą aminokwasową były bardzo silnie chronione przed wymianą H/D, a zwłaszcza peptydy pokrywające region pomiędzy 38–45 i 65–96 resztą aminokwasową, które nie ulegały wymianie H/D nawet po 30 min. W przypadku gN1/2 regiony, które cechowała szybka wymiana H/D zawierały się pomiędzy 1–32, 97–115 i 138–167 resztą aminokwasową. Z kolei regiony o niskiej wymianie H/D zawierały się pomiędzy 33–96 i 116–137 resztą aminokwasową. Co ciekawe, peptydy pokrywające sekwencję pomiędzy 33–45 i 60–96 resztą aminokwasową, a zwłaszcza w regionie 84–96 reszty aminokwasowej, nie ulegały wymianie nawet po 150 min inkubacji. Powyższe wyniki wskazują na bardzo wysokie zachowanie w toku ewolucji charakteru IDRs oraz regionów ustrukturyzowanych pomiędzy homologami. Dodatkowo pozostają one w wysokiej zgodności z wynikami uzyskanymi dla apo-Nucb2 obu homologów [41,46].

W obecności jonów Zn(II) wystąpiły silne i zaskakujące zmiany w profilach wymiany H/D obu homologów. Obserwowano znaczącą, ujemną różnicę w  $\Delta\text{HDX}$  dla hN1/2 oraz gN1/2. W przypadku hN1/2 po 10 s inkubacji peptydy pokrywające sekwencję białka pomiędzy 33–62, 72–96 oraz 116–137 resztą aminokwasową cechowało silne zwiększenie stopnia wymiany H/D w porównaniu do apo-hN1/2. Co więcej, nawet po upływie 30 min zwiększenie ekspozycji wymienionych regionów wciąż było dobrze widoczne, zwłaszcza między 34–45 i 76–93 resztą aminokwasową. Podobnie w przypadku gN1/2 obserwowano znaczny wzrost stopnia wymiany w sekwencji pomiędzy 33–45, 60–96 oraz 117–137 resztą aminokwasową i związaną z tym ujemną wartość  $\Delta\text{HDX}$  po 10 s inkubacji. Ponadto, 30 min później obserwowano zwiększenie szybkości wymiany, zwłaszcza w peptydach pokrywających sekwencję pomiędzy 33–45, 60–96 oraz 117–137 resztą aminokwasową.

Otrzymane wyniki wskazują, iż jony Zn(II) mają Janusowy wpływ na region M30 ludzkich i kurzych homologów N1 oraz N1/2. W przypadku hN1 i gN1 pod wpływem oligomeryzacji białek (**Rozdział 4.5**) dochodzi do zmniejszenia dostępności tego regionu (kluczowego dla ich aktywności anoreksygeniczej) do rozpuszczalnika, co może wskazywać na zwiększenie upakowania struktury wokół tego rejonu. Z kolei silna destabilizacja hN1/2 i gN1/2 pod wpływem jonów Zn(II) (opisywana w wynikach powyżej) jest w części wynikiem ekspozycji regionów M30 oraz rozpoznawanego przez PCs do rozpuszczalnika, które w nieobecności jonów pozostają względnie niedostępne dla rozpuszczalnika. Ten stan rzeczy może mieć wysokie znaczenie z punktu widzenia funkcjonowania N1 oraz N1/2, co przeanalizowano szczegółowiej w **Rozdziale 5**.

# 5.

## Dyskusja

Przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej były ludzkie i kurcze homologii nesfatyn, tj.: N1, N2 oraz N1/2, które są produktami proteolitycznego procesowania Nucb2. Wszystkie wymienione białka należą do wysoce zachowanej w toku ewolucji rodziny NUCBs [16]. Zarówno Nucb2 oraz nesfatyny wykazują ponad 80% podobieństwa sekwencji aminokwasowej pomiędzy homologiem ludzkim, kurzym, mysim oraz szczurzym [16,225]. Nucb2 jest białkiem wielodomenowym, które razem z N1 zaangażowane jest w wiele procesów fizjologicznych, wśród nich wymienić można: regulację homeostazy energetycznej [1]; udział w odpowiedzi na bodźce stresowe oraz lęk [2]; udział w karcynogenezie [3,4]; regulację zaburzeń psychiczno-neuronalnych takich jak depresja [5,150], demencja [226] i epilepsja [6]; regulację ciśnienia osmotycznego krwi [7]. Ponadto Nucb2/N1 jako białka o aktywności hormonalnej ulegają ekspresji nie tylko w centralnym układzie nerwowym [171,227], ale również w licznych tkankach obwodowych [90,91,93,105,228]. Złożona budowa Nucb2/nesfatyn w połączeniu z ich powszechnym występowaniem bardzo silnie podkreśla zarówno ich znaczenie biologiczne jak i mnogość potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Tym niemniej, aktywność biologiczna została odkryta i opisana wyłącznie dla Nucb2/N1 a znaczenie fizjologiczne pozostałych nesfatyn nie zostało do tej pory opisane. Z tego powodu przez długi czas to właśnie Nucb2/N1 były głównym przedmiotem badań w dostępnej literaturze. Ponadto, pomimo rosnącej liczby artykułów na temat funkcji i lokalizacji Nucb2/N1 wciąż niewiele jest doniesień w literaturze o relacji struktura-funkcja Nucb2/nesfatyn [41,46,60]. Właśnie z tego powodu celem badań realizowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej było przeprowadzenie charakterystyki molekularnej, która stanowiłaby podstawę do zrozumienia zależności pomiędzy strukturą a funkcją produktów proteolitycznego procesowania końca N ludzkiej i kurzej Nucb2, a także zbadanie istnienia różnic strukturalnych pomiędzy homologami, które pomimo wysokiego podobieństwa sekwencji aminokwasowej mogłyby wskazywać na występowanie funkcji nesfatyn specyficznych dla danego organizmu.



## 5.1 OTRZYMYWANIE LUDZKICH I KURZYCH NESFATYN

Otrzymanie homogennych preparatów nesfatyn wraz z opracowaniem wydajnych procedur ich ekspresji było niezbędne w celu rozpoczęcia badań nad ich właściwościami. Pierwszym etapem na drodze otrzymywania białek było przygotowanie konstruktów zawierających cDNA nesfatyn w oparciu o wektor pQE-80L-HRV3C (**Rozdział 3.2.2**). Wektor ten umożliwił otrzymanie rekombinowanych nesfatyn zawierających na końcu N dodatkowo znacznik sześć-histydylowy oraz miejsce rozpoznawane przez proteazę HRV3C (**Załącznik**). Otrzymane konstrukty wykorzystywano następnie do nadekspresji białek. Podczas realizacji projektu nesfatyny otrzymywano z wykorzystaniem systemu bakteryjnego opartego o komórki *E. coli* [229]. Nadekspresję nesfatyn prowadzono wykorzystując szczep B121(DE3) pLysS (**Rozdział 3.1.3**), który: wykazuje konstytutywnie aktywną ekspresję lizozymu faga T7 [176], co ułatwia lizę komórek bakteryjnych oraz posiada delecję genów proteaz *ompT* [230] i *lon* [231], co zmniejsza degradację rekombinowanych białek podczas ich nadekspresji. Podczas analizy SDS-PAGE białek zawartych w ekstrakcie komórkowym obserwowano intensywne pasmo o  $MW_{app}$  odpowiadającej rekombinowanym białkom (**Rozdział 4.2**).

Kolejnym etapem projektu było opracowanie i optymalizacja procesu oczyszczania nesfatyn. Ze względu na obecność znacznika histydylowego na końcu N białek jako pierwszy etap oczyszczania wykorzystywano IMAC na złożu Ni-NTA (**Rozdział 3.2.3.2**). W celu ustalenia optymalnych warunków wykorzystywano ekstrakty komórkowe z 1 l hodowli i optymalizowano stężenie imidazolu w buforze płuczającym, które dla homologów N1 wyniosło 35 mM oraz 20 mM zarówno dla homologów N2 jak i N1/2. Etap ten pozwolił na uzyskanie najlepszego stosunku stężenia białka do czystości uzyskanego preparatu (**Rozdział 4.2**). Następnie zwiększono skalę oczyszczania prowadząc je z 3,25 l hodowli. Ostatecznie po IMAC uzyskiwano bardzo duże zagęszczenie białka dla każdej z nesfatyn jak i znaczne zwiększenie stopnia oczyszczenia. W następnym kroku usuwano znacznik histydylowy, który mógłby interferować z wynikami planowanych badań oddziaływania nesfatyn z dwuwartościowymi jonami metali i/lub zmieniać ich właściwości. W tym celu wykorzystywano obecność miejsca rozpoznawanego przez proteazę HRV3C na końcu N białek. (**Rozdział 3.2.3.2**). Etap ten umożliwił oddzielenie znacznika oraz proteazy od białka podstawowego a także części obecnych zanieczyszczeń (**Rozdział 4.2**). Co ciekawe, wszystkie nesfatyny nawet po usunięciu znacznika histydylowego wykazywały powinowactwo do złoża Ni-NTA, co generowało nieznaczne straty podczas



preparacji (**Rozdział 4.2**). Ponadto podczas inkubacji hN2 z HRV3C nie dochodziło do pełnego usunięcia znacznika prawdopodobnie z powodu niedostatecznej ekspozycji końca N, co mogłoby również wyjaśniać większą ilość zanieczyszczeń związanych do złoża i niższą wydajność preparacji. W celu zwiększenia stopnia oczyszczenia nesfatyn preparaty po traktowaniu HRV3C i zagęszczeniu poddawano SEC na kolumnie Superdex 75 Increase 10/300 GL (**Rozdział 3.2.3.2**). Co ciekawe, podczas rozdzielania homologów N1 oraz N1/2 w wyższym stężeniu obserwowano nietypowe profile elucji białek podstawowych będące złożeniem dwóch lub więcej szczytów o zmienionej wartości  $V_e$ , które jak wykazała analiza SDS-PAGE zebranych frakcji zawierały wyłącznie nesfatyny (**Rozdział 4.2**). Fakt ten może wskazywać na obecność różnych, zależnych od stężenia form konformacyjnych nesfatyn. Ponadto warto również zauważyć, iż homologi N1 oraz N2 cechują się wartością  $V_e$  zbliżoną do  $V_e$  homologów N1/2, a więc białek o dwukrotnie większej masie cząsteczkowej. Co więcej,  $V_e$  nesfatyn wykazuje również odstępstwa od krzywej standardowej producenta. Fakt ten jest skutkiem odstępstw od struktury globularnej nesfatyn oraz obserwowanych w dalszych badaniach właściwości molekularnych charakterystycznych dla IDPs. gN2 nie poddawano oczyszczaniu ze względu na ograniczony czas trwania projektu i niską wydajność preparacji obserwowaną dla homologu ludzkiego. Ostatecznie wydajność preparacji wyniosła około: 1,25–2,5 g/l dla homologów N1; 0,4 g/l dla hN2; 8–10 mg/l dla homologów N1/2. Różnice w wydajnościach, poza dotychczas opisanymi, mogą wynikać dodatkowo z charakteru IDPs homologów N1 oraz toksyczności dla komórek *E. coli* i/lub agregacji hN2 podczas ekspresji. Niemniej jednak, uzyskana wydajność była wystarczająca do przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów. Co więcej, homogenne preparaty charakteryzowały się bardzo wysoką czystością na poziomie 96–98%. W celu identyfikacji i potwierdzenia tożsamości białek wykonano Western-blot frakcji otrzymanych podczas oczyszczania białek. Reprezentatywne wyniki potwierdzały otrzymanie hN1 i hN2 oraz dodatkowo usunięcie znacznika histydylowego (**Rozdział 4.2.3.1**). Co ciekawe, dopiero po zastosowaniu roztworów przeciwciał suplementowanych detergentem Tween-20 możliwa była detekcja hN2, co ponownie sugeruje słabą ekspozycję końca N białka. Wyniki spektrometrii mas otrzymanych preparatów jednoznacznie potwierdziły tożsamość nesfatyn (**Rozdział 4.2.3.2**). Co więcej, widma masowe cechowały się jednym intensywnym sygnałem i nie obserwowano obecności sygnałów w zakresie niższych mas cząsteczkowych, wskazujących na degradację białek. Brak było również sygnałów przy wyższych masach cząsteczkowych. Ponadto, wyznaczone eksperymentalnie masy cząsteczkowe odpowiadały masom teoretycznym z różnicą  $\pm 1$  Da.



## 5.2 ANALIZY STRUKTURALNE IN SILICO

Jak przedstawiono to we wprowadzeniu (**Rozdział 1**), nesfatyny jako produkty proteolitycznego procesowania końca N Nucb2 zawierają fragmenty jej regionu bogatego w reszty Leu/Ile oraz fragment DBD, pozostałe domeny w tym motyw dłoni EF i zamek leucynowy zawierające klasyczne struktury oparte o budowę helikalną [51,232] są obecne w N3 [233]. Ludzkie i kurcze homologu Nucb2 na podstawie pomiarów HDX-MS oraz innych metod biofizycznych zostały opisane przez Skorupską i wsp. [41] jako składające się z dwóch fragmentów: pierwszego pomiędzy 1-140 resztą aminokwasową wykazującą mozaikowatą budowę z przeplatającymi się wzajemnie regionami o szybkiej/wolnej wymianie izotopowej oraz drugiego od 141 reszty do końca C białek, które ulega przejściu nieuporządkowanie-uporządkowanie pod wpływem jonów Ca(II) [41]. W związku z brakiem dostępnych struktur krystalicznych zarówno homologów Nucb2 oraz nesfatyn w ramach niniejszego projektu wykonano analizy *in silico* w celu przewidzenia obecności IDRs i/lub zmian we właściwościach strukturalnych izolowanych nesfatyn. Wszystkie nesfatyny na wykresie Uversky'ego leżały po stronie białek nieuporządkowanych (**Rozdział 4.3.1**), co z kolei wskazywało na ich przynależność do IDPs. Z drugiej strony, ich lokalizacja blisko granicy nieuporządkowanie/uporządkowanie wskazywała, iż dynamika molekularna nesfatyn może być jednak w rzeczywistości bardziej złożona. Wyniki uzyskane przy pomocy algorytmu PONDR (**Rozdział 4.3.1**) wskazywały na istnienie przeplatających się regionów IDRs i uporządkowanych w strukturze hN1/2, sugerując iż ta właściwość może być zachowana po oddzieleniu sekwencji N3 z jej kontekstu. Ponadto, podobne wyniki uzyskano dla homologów N1, które cechowało istnienie krótkich IDRs na obu końcach neuropeptydów oraz dłuższego fragmentu przy końcu C. Niemniej jednak, obserwowano niewielkie zmniejszenie IDRs na końcu C, po oddzieleniu N2 z kontekstu sekwencji N1. Z drugiej strony, wyniki przewidywań struktury homologów N2 wskazywały te produkty procesowania Nucb2 jako najbardziej uporządkowane. Co interesujące, wyniki przewidywań dynamiki molekularnej łańcucha głównego przy pomocy DynaMine sugerowały, iż struktura wszystkich homologów nesfatyn jest bardzo silnie zależna od otoczenia (**Rozdział 4.3.1**). Jest to właściwość szczególnie mocno obserwowana zarówno podczas realizacji wszystkich badań w projekcie jak i również przez Skorupską i wsp. [41,60] oraz Bystranowską i wsp. [46].

Wyniki przewidywań struktury krystalicznej przy pomocy I-TASSER oraz AlphaFold (**Rozdział 4.3.2**) kontrastowały z wynikami opisanymi powyżej. Wygenerowane modele

cechowała bowiem wysoka zawartość  $\alpha$ -helis. Co ciekawe, modele wskazywały na globularną budowę homologów N1 i/lub na budowę przypominającą włókna kolagenowe w przypadku homologów N2 i hN1/2. Z drugiej strony struktura apo-hN1 otrzymana przy pomocy programu Modeller przypominała bardziej kłębek statystyczny ze szczątkową ilością struktury drugorzędowej. Model holo-hN1 otrzymany przy pomocy programu Modeller zawierał większe ilości struktury drugorzędowej, w tym nici  $\beta$ . Struktura hN2 oraz hN1/2 wygenerowana przy pomocy programu Modeller przypominała z kolei pre-stopioną globulę. Model gN1/2 otrzymany przy pomocy I-TASSER kontrastował natomiast z modelem hN1/2 obecnością długiego elastycznego regionu przy końcu N a także w regionie obejmującym sekwencję gN2. Wygenerowane modele wyraźnie wskazują zatem na zupełnie odmienną strukturę wszystkich analizowanych w ramach niniejszej rozprawy produktów procesowania Nucb2. Jest to kolejna bardzo ważna właściwość nesfatyn obecna już na etapie przewidywań *in silico* oraz obserwowana podczas realizacji projektu, która może mieć wysokie znaczenie fizjologiczne i została opisana szczegółowiej w dalszej części dyskusji. Dodatkowo, warto podkreślić różnice w wymodelowanej strukturze hN1/2 oraz gN1/2 otrzymanych przy pomocy I-TASSER, które pomimo wysokiej homologii obu sekwencji cechują się inną strukturą. Różnice strukturalne oraz funkcjonalne pomiędzy homologami ludzkimi oraz kurzymi również były widoczne podczas realizacji projektu. Ponownie zatem analizy *in silico* sugerowały subtelne różnice pomiędzy homologami nesfatyn, które mogą mieć implikacje funkcjonalne specyficzne dla danego gatunku. Porównanie widm wygenerowanych *in silico* algorytmem SESCO na podstawie modeli do widm eksperymentalnych (**Rozdział 4.3.2**) wyłoniło modele otrzymane przy pomocy programu Modeller jako najlepiej opisujące struktury danych nesfatyn.



### 5.3 ANALIZA WŁAŚCIWOŚCI MOLEKULARNYCH NESFATYN

Otrzymane wyniki przewidywań *in silico* i doniesienia literaturowe dla homologów Nucb2 [41,46] oraz N3 [60] wskazywały na różnice we właściwościach i strukturze nesfatyn pomiędzy formami apo oraz holo, a także dodatkowo pomiędzy homologami. Każdy fragment zdaje się wykazywać silną zależność swoich właściwości od otoczenia przez co efekt ten może stanowić element regulacji złożonej aktywności biologicznej Nucb2/N1. W związku z powyższym kolejnym etapem projektu było zbadanie powyższej zależności eksperymentalnie dla produktów procesowania końca N Nucb2.

### 5.3.1 Proteolityczne procesowanie Nucb2 prowadzi do powstania inherentnie nieuporządkowanej struktury N1

---

W trakcie realizacji projektu wykazano na podstawie pomiarów CD (**Rozdział 4.4.1.1**), iż struktura drugorzędowa ludzkich i kurzych homologów apo-N1 wykazuje największą tendencję do nieuporządkowania struktury. Fragmenty IDRs stanowią ponad 50% zawartości struktury drugorzędowej obu homologów i jednoznacznie wskazują na ich przynależność do IDPs. Natomiast położenie ludzkich i kurzych homologów apo-N1 na wykresie podwójnych MRE (**Rys. S3**) wskazywało, iż ich struktura jest najprawdopodobniej podobna do kłęбка statystycznego. Warto również zaznaczyć, iż zawartość  $\beta$ -kardek również była wysoka i oscylowała wokół 20%. Z drugiej strony zarówno hN2 jak i homologi N1/2 cechowały się wysoką zawartością  $\alpha$ -helis sięgającą prawie 50%. Niemniej jednak, istotny był także udział regionów IDRs na poziomie około 30%, co pozostawało w dużej zgodności z przewidywaniami *in silico* i wskazywało na zachowanie mozaikowatej budowy obserwowanej dla końca N białka pełnej długości [41]. Ponadto warto podkreślić zachowanie w toku ewolucji charakteru IDPs homologów N1 oraz bardziej zbliżony do białek globularnych charakter homologów N1/2. Analiza właściwości hydrodynamicznych nesfatyn przy pomocy SV-AUC (**Rozdział 4.5**) wykazała, iż ludzkie i kurze homologi apo-N1 występowały w roztworze w formie monomerycznej. Przy czym oba neuropeptydy cechowała wysoka wartość współczynnika  $f/f_0$  wynosząca około 1,8, co wskazuje iż kształt cząsteczek jest silnie wydłużoną elipsoidą. Otrzymane wyniki ponownie podkreślały przynależność homologów N1 do IDPs, dla których typowe są wysokie wartości parametru  $f/f_0$  [209]. Warto również zauważyć, iż ze względu na inherentne nieuporządkowanie homologów N1 wartość ich  $R_h$  była zbliżona do  $R_h$  homologów N1/2, które posiadają dwukrotnie większą masę cząsteczkową. Z kolei dla hN2 oraz homologów N1/2 wartość  $f/f_0$  wynosiła około 1,5; co wskazywało na ich wciąż asymetryczną, jednak bardziej globularną budowę.

Dane eksperymentalne potwierdzały zatem sugerowaną uprzednio przez analizy *in silico* hipotezę wpływu N1 oraz N2 na strukturę białka kiedy oba fragmenty są ze sobą połączone (N1/2). Właściwość ta została dokładniej zbadana w dalszej części projektu (zob. tekst poniżej). Wyniki eksperymentów CD wykazały, iż nie dochodzi do zmian struktury drugorzędowej w wyniku oddziaływania hN1 z hN2 w roztworze, jak i również nie dochodzi do odtworzenia struktury drugorzędowej hN1/2. Ponadto, podczas SV-AUC mieszanin hN1+2 o różnych stosunkach masowych nie obserwowano zmian w rozkładzie współczynnika  $c(s)$ , które mogłoby wynikać z oddziaływania białek. W związku z powyższym dowiedziono, iż struktura izolowanej hN1 jest odmienna od przyjmowanej gdy hN1 i hN2 są połączone wiązaniem

kowalencyjnym (w hN1/2). Ponadto właściwości molekularne homologów N1/2 również nie są prostą sumą efektów obserwowanych dla izolowanych nesfatyn.

W związku z powyższym przejście N1 do struktury IDPs z formy pro-hormonu (Nucb2/N1/2) podczas jej procesowania przez PCs mogłoby zatem pełnić rolę aktywacyjną. Następnie, apo-N1 jako IDPs mogłaby spełniać część swoich licznych roli fizjologicznych poprzez oddziaływanie z wieloma partnerami białkowymi, co jest cechą charakterystyczną IDPs [234]. Z drugiej strony N2 wydaje się nadawać sekwencji N1 w jej kontekście (N1/2) bardziej uporządkowany charakter. W związku z powyższym N2 wpływając na strukturę N1 mogła by kierować Nucb2/N1/2 do oddziaływania z inną pulą partnerów białkowych.

Warto również wspomnieć, iż obecnie odchodzi się od postrzegania hormonów jako „jednorazowych” przekaźników sygnałów, które po aktywacji kanonicznej kaskady sygnałowej podlegają degradacji. Z perspektywy wydatku energetycznego potrzebnego do syntezy hormonów wywołanie jedynie efektu osiąganego również przez mniejsze (niebiałkowe) cząsteczki byłoby stratą. Badania pokazują, iż wiele pierwotnych transkryptów hormonów jest raczej złożeniem kilku bioaktywnych cząsteczek, które są uwalniane przez specyficzną proteolizę w ściśle kontrolowany sposób [235]. Tak jak na przykład wspomniany w **Rozdziale 1.2.4.1** POMC. Co więcej, niektóre hormony mogą być hydrolizowane do drugorzędowych przekaźników o przeciwnych efektach. Przykładowo, transkrypt glukagonu będącego stymulatorem glukoneogenezy zawiera także inne hormony (uwalniane w sposób tkankowo-specyficzny), w tym GLP1 będący inhibitorem sekrecji glukagonu [236]. Selektywna obróbka proteolityczna hormonu może zatem wzmacniać lub hamować jego działanie. Dodatkowo, nawet podczas proteolizy hormonów przez metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, katepsyny obecne w endosomach, trombinę, plazminę oraz inne proteazy mogą powstawać produkty odporne na proteolizę (co zaobserwowano również w przypadku nesfatyn – patrz tekst poniżej) i wykazujące aktywność biologiczną. Przykładowo, wazoinhibina jest hormonem powstającym z prolaktyny pod wpływem proteolizy tej ostatniej przez katepsynę D, która wykazuje działanie antyangiogenne w przeciwieństwie do hormonu macierzystego [237]. Ostatnie badania bioinformatyczne wskazują również, iż bioaktywne regiony/domeny hormonów oraz miejsca rozpoznawane przez proteazy są zachowane w toku ewolucji a te ostatnie leżą najczęściej na granicy egzonów [238]. Podobne mechanizmy mogłyby zatem również modulować aktywność nesfatyn, przy czym hipoteza ta wymaga dalszych badań.

Podsumowując, N2 mogłaby działać jako swoisty przełącznik molekularny aktywujący odmienne funkcje N1. Właściwości N1 charakterystyczne dla IDPs w połączeniu z szeroką

dystrybucją Nucb2/N1 w CUN oraz tkankach obwodowych mogą zatem częściowo tłumaczyć ich auto-, parakryny i tkankowo-specyficzny mechanizm działania, który dalej mógłby być modulowany przez specyficzną proteolizę.

### 5.3.2 Jony Zn(II) indukują silne zmiany konformacyjne nesfatyn i zmiany w ich stanie oligomerycznym

Jony metali są bardzo ważnym składnikiem systemów biologicznych. Funkcjonują jako przekaźniki kaskad sygnałowych, efekторы oraz są niezbędnymi kofaktorami wielu białek [239]. Nawet co trzecie białko może być zależne od jonów metali, przez co identyfikacja metaloprotein i badanie ich interakcji stanowi istotny element odrębnej dziedziny nauki – metalomiki [239]. Jednym z najbardziej powszechnie występujących w organizmach żywych jonów metali z bloku d (obok żelaza) są jony Zn(II) [240]. Jony te stanowią kluczowy element regulacji takich procesów biologicznych jak: proliferacja [241]; procesy neurodegeneracyjne [242]; apoptoza [243]; regulacja odpowiedzi immunologicznej [244,245]; karcynogeneza [246]; patogeneza chorób sercowo-naczyniowych [247]. Ponadto białka zależne od jonów Zn(II) występują powszechnie w organizmach żywych. Szacuje się, iż nawet 3% ludzkiego genomu koduje białka palca cynkowego (ZFPs, ang. *zinc finger proteins*) [248]. Analizy bioinformatyczne wskazują, iż nawet 10% ludzkiego proteomu może zawierać białka wiążące Zn(II) [249]. W rzeczywistości pula białek cynkozależnych może być jeszcze większa ze względu na występowanie przejściowych oddziaływań białko-białko zależnych od jonów Zn(II) będących przedmiotem niedawnych doniesień literaturowych [250]. Ponadto, stale rośnie liczba białek wiążących Zn(II), których miejsca wiążące różnią się od kanonicznych i nie mogą zostać zdefiniowane jako charakterystyczne [251].

Nucb2 może zostać podzielona na dwie części ze względu na zdolność do wiązania jonów metali: pierwszą pomiędzy 1-140 resztą aminokwasową wiążącą jony Zn(II) oraz drugą od 141 reszty aminokwasowej do końca C, która wiąże jony Ca(II) [46]. W związku z powyższym w dalszej części projektu badano zachowanie zdolności nesfatyn do wiązania jonów Zn(II) jak również wykonano eksperymenty kontrolne braku wiązania jonów Ca(II). Wykonane badania wskazywały na brak zmian struktury drugo- (**Rozdział 4.4.1.2**) i trzeciorzędowej (**Rozdział 4.5**) N1 i N2 pod wpływem jonów Ca(II), co jednocześnie potwierdzało ich wiązanie jedynie w obrębie końca C Nucb2. Jednocześnie, wszystkie badane nesfatyny wykazywały zdolność do wiązania jonów Zn(II), które silnie wpływały na ich strukturę. Niemniej jednak, pomimo wysokiej homologii obserwowano istotne różnice w ich oddziaływaniu z Zn(II).

### 5.3.2.1 Wpływ jonów Zn(II) na strukturę drugorzędową nesfatyn

Podczas pomiarów CD wykonanych dla ludzkich i kurzych homologów N1 (**Rozdział 4.4.1.2**) obserwowano zależny od stężenia jonów Zn(II) silny wzrost zawartości  $\alpha$ -helis przy jednoczesnym zmniejszaniu się zawartości IDR<sub>s</sub>. Uzyskane wyniki wskazywały zatem na zależne od jonów Zn(II) przejście nieuporządkowanie-uporządkowanie. Dopasowanie danych uzyskanych przy 208 nm i 222 nm do modelu Hilla pozwoliło na estymację  $K_d$  dla obu homologów N1, które wskazywały na ich podobne powinowactwo do jonów Zn(II), co z kolei wskazuje na silne zachowanie tej właściwości w toku ewolucji. Otrzymane wartości pozostawały w wysokiej zgodności z wynikami ITC (**Rozdział 4.7**), spektroskopii absorpcyjnej (**Rozdział 4.8**) oraz fluorescencyjnej (**Rozdział 4.9**). Co ciekawe, dopasowane modele różniły się stopniem kooperatywności ze względu na różnice wartości współczynnika Hilla równego 2 dla hN1 oraz 1 dla gN1 umożliwiające najlepsze dopasowanie. Była to pierwsza z zaobserwowanych różnic pomiędzy homologami wskazująca na odmienny mechanizm wiązania jonów przez te neuropeptydy. Z drugiej strony, kontrastujące wyniki (w stosunku do hN1 i gN1) uzyskano dla hN2 oraz homologów N1/2, które wskazywały na ich indukowaną jonami Zn(II) destabilizację. Dopasowanie uzyskanych danych do modelu Hilla analogicznie jak dla homologów N1 wykazało silnie kooperatywny zanik intensywności sygnału CD, który z kolei sugerował wiązanie jonów Zn(II) i następczą precypitację i/lub agregację peptydów. Ponadto, przebieg krzywej dla homologów N1/2 ponownie wskazuje na ich dwoistą naturę będącą wynikiem odmiennych właściwości N1 oraz N2 połączonych kowalencyjnie. Warto również zauważyć wyrównanie się wartości ujemnych maksimów przy 208 nm i 222 nm dla gN1/2 przy stężeniu Zn(II) równym 75  $\mu$ M oraz 100  $\mu$ M, czego nie obserwowano dla ludzkiego homologu. Fakt ten wskazywał na różnice w oddziaływaniu homologów N1/2, które widoczne były także w kolejnych eksperymentach. Dodatkowo, na podstawie dopasowania krzywoliniowego ustalono optymalne stężenie jonów Zn(II) dla hN2 oraz homologów N1/2 używane w kolejnych eksperymentach i odpowiadające relatywnej zawartości białka powyżej 80%.

Eksperymenty CD w funkcji temperatury (**Rozdział 4.4.2**) wykazały zależny od stężenia jonów Zn(II) spadek  $T_m$  dla hN1 oraz gN1, przy czym spadek ten był bardziej widoczny w przypadku homologu ludzkiego. To z kolei ponownie wskazuje na możliwe różnice w oddziaływaniu z jonami Zn(II) pomiędzy homologami. Dla homologów N1, należących do rodziny IDPs, obserwowany spadek  $T_m$  był wynikiem stopniowej formacji struktur  $\alpha$ -helikalnych o mniejszej stabilności temperaturowej w porównaniu do form apo-, które nie wykazywały obecności  $T_m$  (dane niepokazane). Ponadto wyniki HDX-MS (tekst poniżej) wskazywały, iż niska wartość  $T_m$  może być także wynikiem strukturyzacji jedynie krótkiego odcinka sekwencji

aminokwasowej homologów N1. Największy wpływ jonów Zn(II) obserwowano jednak w przypadku homologów N1/2, które cechował większy spadek wartości  $T_m$  w stosunku do homologów N1. Co intrygujące, ponownie obserwowano dwoistą naturę homologów holo-N1/2, których profile topnienia wykazywały dwustopniowy trend. Powyższe wyniki sugerują, iż jony Zn(II) stabilizują i destabilizują różne części białek, co częściowo tłumaczy silna ekspozycja części szkieletu głównego indukowana Zn(II) i zbadana przy pomocy HDX-MS (tekst poniżej). Co ciekawe, poprzez eksperymenty z udziałem czynników denaturujących wykazano, iż domeny hNucb1 w obecności jonów Ca(II) oddziałują ze sobą w kooperatywny sposób [56]. W przypadku homologów N1/2 w obecności Zn(II) ze względu na pojawienie się kilku punktów przejścia w ich profilach topnienia (w przeciwieństwie do apo-N1/2) można przypuszczać, iż miejsce ma zjawisko odwrotne do tego obserwowanego dla hNucb1.

#### 5.3.2.2 *Jony Zn(II) wpływają na stan oligomeryczny nesfatyn*

Przeprowadzone eksperymenty SV-AUC (**Rozdział 4.5**) wykazały, iż wiązanie jonów Zn(II) przez ludzkie i kurcze homologi N1 skutkuje (obok uprzednio opisanego przejścia nieuporządkowanie-uporządkowanie) znacznym zmniejszeniem ich objętości hydrodynamicznej oraz dimeryzacją. Wynik ten podkreśla zatem zachowanie w toku ewolucji tej właściwości neuropeptydów N1. Może być ona niezbędna dla funkcjonowania i regulacji aktywności N1 oraz czynić ją zdolną do oddziaływania z inną pulą partnerów białkowych niż w przypadku apo-N1. Co więcej, ze względu na wysoką homologię Nukleobindyn może być to właściwość uniwersalna i obecna u pozostałych homologów N1 oraz NLP, co z kolei mogłoby stanowić jeden z poziomów regulacji złożonej aktywności biologicznej Nukleobindyn. Co ciekawe, podczas analizy obserwowano trzeci szeroki szczyt wskazujący na agregację gN1, którego nie zaobserwowano dla homologu ludzkiego. Ponownie zatem uwidoczniło się różnicę w skutkach wywoływanych przez wiązanie Zn(II) na homologi N1. Ponadto, obecność agregatów wpłynęła również na zmianę stosunku pól powierzchni dwóch głównych szczytów z 1:1 obserwowanego dla hN1 do 1:2 dla gN1. Ponadto agregacja gN1 mogłaby również częściowo odpowiadać za zmniejszenie kooperatywności krzywej dopasowanej podczas pomiarów CD. Różnice pomiędzy dystrybucją współczynnika  $c(s)$  obserwowano także pomiędzy hN1/2 i gN1/2. Wpływ jonów Zn(II) był bardziej uwydatniony dla gN1/2; wystąpiło przesunięcie współczynnika  $s_{(20,w)}$  względem stanu apo- wraz z równoległym pojawieniem się niewielkiej populacji dimerów o szerokim szczycie. Silniejsza tendencja kurzych homologów do oligomeryzacji i/lub agregacji pozostaje w zgodności z wynikami opisanymi dla hNucb2 oraz gNucb2 przez Bystranowską i wsp. [46].



Innym przykładem hormonu, którego struktura czwartorzędowa modulowana jest przez jony Zn(II) jest insulina. Hormon ten w nieobecności jonów Zn(II) tworzy monomery i dimery przy małym stężeniu białka. Duże stężenie insuliny skutkuje z kolei powstaniem heksamerów hormonu stabilizowanych przez jony Zn(II) [252]. W komórkach  $\beta$ -trzustki insulina oraz Zn(II) są magazynowane razem w pęcherzykach wydzielniczych, gdzie obie cząsteczki osiągają milimolarne stężenia [253]. Warto w tym miejscu także przypomnieć, iż Nucb2/N1 stymulują sekrecję insuliny (**Rozdział 1.2.4.1**). Innym hormonem ulegającym dimeryzacji pod wpływem jonów Zn(II) jest hormon wzrostu [254]. Obie cząsteczki są obecne w neuronalnych pęcherzykach wydzielniczych, gdzie stężenie jonów Zn(II) ponownie sięga wartości milimolarnych [255]. Opisany wpływ jonów Zn(II) oraz wysokiego zagęszczenia przytoczonych hormonów na ich stan oligomeryczny wydaje się dobrze wpisywać w kontekst wyników omówionych do tej pory dla nesfatyn. Co ciekawe, wymienione hormony mają również tendencję do tworzenia agregatów, co omówiono szczegółowiej w dalszej części tego rozdziału.

### 5.3.2.3 Różnice w oddziaływaniu jonów Zn(II) z ludzką i kurzą N1 oraz N1/2

Opisane dotąd zmiany strukturalne nesfatyn indukowane jonami Zn(II) wpłynęły również na różnice profili produktów proteolizy (**Rozdział 4.6**). Homologi holo-N1 oraz holo-hNucb2 cechowały się zwiększoną odpornością na proteolizę w porównaniu do ich form apo-. Stan ten jest najprawdopodobniej wynikiem zależnej od jonów Zn(II) strukturyzacji homologów holo-N1. Co jednak ciekawe, homologi N1 były degradowane zaskakująco wolno jak na IDPs w porównaniu do białka pełnej długości przy tym samym stosunku e/s, co obserwowano zarówno w badaniach opisanych tutaj jak i przez Skorupską i wsp. [41]. Dopiero po pięciokrotnym zwiększeniu zawartości trypsyny obserwowano całkowity zanik pasm pochodzących od N1 i możliwa była pełna obserwacja wpływu jonów Zn(II) na strukturę białek. Powyższe wyniki sugerują, iż *in vivo* N1 może cechować się wysoką odpornością na degradację. Różnice w podatności na proteolizę mają zatem niewątpliwie odzwierciedlenie w różnych funkcjach biologicznych pełnionych przez Nucb2 i produkty jej degradacji. Ponadto, w profilach produktów proteolizy homologów N1 obserwowano pasmo o zmniejszonej ruchliwości elektroforetycznej w stosunku do białka podstawowego. Ze względu na zbyt niską  $MW_{app}$  wykluczono by produkt ten był wynikiem utworzenia adduktu acylo-enzymu [211]. Identyfikacja przy pomocy MS wskazała natomiast, iż pasmo to pochodziło w całości od N1. Zwiększona retardacja w żelu może być zatem wynikiem utraty szczytkowej struktury i intensyfikacją właściwości IDPs, a w szczególności mniej wydajnym wiązaniem SDS [32]. Wniosek ten wydaje się wyjątkowo zasadny biorąc pod uwagę znaczny wpływ otoczenia na strukturę nesfatyn oraz fakt, iż

każde „wycięcie” fragmentu z sekwencji Nucb2 skutkowało dotąd obserwacją innych właściwości molekularnych produktów. Co więcej, powstały produkt dla hN1 wykazywał słabsze wiązanie CBB w porównaniu do gN1, który z kolei był degradowany szybciej w porównaniu do homologu ludzkiego. Wskazuje to ponownie na różnice strukturalne pomiędzy homologami. Różnice w profilu produktów proteolizy obserwowano również dla homologów N1/2. Co ciekawe, efekt jonów Zn(II) był w tym przypadku odwrotny w stosunku do efektu opisanego powyżej dla homologów N1. Homologi holo-N1/2 były bowiem procesowane szybciej w stosunku do ich form apo-. To z kolei może wyjaśniać destabilizację N1/2 pod wpływem Zn(II) oraz jest zgodne z obserwowaną ekspozycją szkieletu głównego podczas HDX-MS (tekst poniżej).

Wyniki ITC (**Rozdział 4.7**) potwierdziły zdolność ludzkich homologów nesfatyn do wiązania jonów Zn(II). Mechanizm ich wiązania dla hN1 i hN1/2 okazał się jednak odmienny. W przypadku hN1 był to proces sterowany entropowo, co wskazywało iż jest on możliwy termodynamicznie ze względu na zachodzące zmiany konformacyjne i/lub oligomeryzację neuropeptydu [256]. Uzyskane wyniki pozostawały zatem w wysokiej zgodności z wynikami CD oraz SV-AUC. W przypadku hN1/2 wiązanie jonów Zn(II) cechowało się znacznie większym udziałem czynnika entalpowego i było bardziej korzystne termodynamicznie. Niemniej jednak, udział czynnika entropowego wciąż był znaczący. Wynika to najpewniej z częściowej ekspozycji szkieletu głównego obserwowanej podczas HDX-MS (tekst poniżej). Co ciekawe, wyznaczona stechiometria wiązania wyniosła 2:1 ( $\text{Zn}(\text{hN1/2})_2$ ) mimo, iż podczas SV-AUC nie obserwowano dimeryzacji białka. Może to wynikać częściowo z destabilizacji oraz precypitacji i/lub agregacji homologów N1/2 obserwowanych podczas wszystkich wykonanych eksperymentów. Warto podkreślić, iż podobne wyniki obserwowano dla kurzych homologów, jednak ze względu na brak osiągnięcia stabilnej linii bazowej i/lub wytrącanie się białek wiarygodna interpretacja otrzymanych danych była niemożliwa. Ponadto, różnice w wiązaniu jonów Zn(II) były także obserwowane podczas ITC dla ludzkich i kurzych homologów Nucb2 [46] oraz N3 [60]. Ponownie zatem wydaje się być to cecha zachowana pomiędzy homologami.

Powinowactwo nesfatyn do jonów Zn(II) badano również przez konkurencyjne miarczkowanie chromoforu Zincon (**Rozdział 4.8**). Zarówno hN1 jak i gN1 konkurowały z tym chromoforem o jony Zn(II). Niemniej jednak, wyznaczone wartości  $K_d$  znacząco odbiegały od pozostałych, co prawdopodobnie jest wynikiem istnieniem bardziej złożonego faktycznego modelu opisującego oddziaływanie neuropeptydów z kompleksem  $\text{ZI} \times \text{Zn}$  i/lub ich oddziaływaniem z chromoforem. Co ciekawe, spośród homologów N1/2 wyłącznie homolog ludzki

konkurował z  $ZI \times Zn$  o jony  $Zn(II)$ . To z kolei może być wynikiem znacznie mniejszego stopnia ekspozycji szkieletu głównego apo-gN1/2 we fragmentach wiążących jony  $Zn(II)$  (uwidocznionej przy pomocy HDX-MS), co z kolei uniemożliwiłoby optymalne oddziaływanie białka z kompleksem  $ZI \times Zn$  i dysocjację jonu z kompleksu.

Ludzkie i kurze homologi cechowały się również różnicami w zdolności do wiązania ANS (**Rozdział 4.9.1**). W przypadku hN1 obserwowano wzrost RFU indukowany stężeniem jonów  $Zn(II)$ , który jednocześnie był wynikiem stopniowej strukturyzacji neuropeptydu i utworzeniem hydrofobowych kieszeni zdolnych do wiązania fluoroforu. Dopasowanie RFU przy 486 nm w funkcji stężenia jonów  $Zn(II)$  pozwoliło dodatkowo na wyznaczenie pozornej stałej dysocjacji, której wartość pozostawała w wysokiej zgodności z jej wartościami otrzymanymi innymi metodami. W przypadku hN2 oraz hN1/2 również obserwowano początkowy wzrost wartości RFU, po czym po przekroczeniu progowej wartości stężenia jonów  $Zn(II)$  obserwowano jej zanik. Otrzymane dane i ich analogiczne dopasowanie dla hN2 potwierdziło hipotezę wiązania przez nią jonów  $Zn(II)$ , co postulowano na podstawie wyników CD, SV-AUC i ITC oraz umożliwiło estymację  $K_d$ . Co ciekawe, największą kooperatywność dopasowanej krzywej obserwowano dla hN1/2. Stan ten może być wynikiem przeciwstawnych właściwości pochodzących od fragmentów N1 oraz N2 będących w swoim otoczeniu. Jednocześnie wartość wyznaczonej stałej dysocjacji wykazywała wysoką zgodność z pozostałymi wynikami otrzymanymi dla hN1/2. Kurze homologi N1 oraz N1/2 nie wykazywały natomiast zdolności do wiązania fluoroforu, co podkreśla różnice w ich strukturze, mechanizmie i efektach oddziaływania homologów z jonami  $Zn(II)$ . Dodatkowo, stan ten może wynikać z większej ekspozycji kieszeni hydrofobowych homologów holo-N1/2 i/lub związanego fluoroforu do rozpuszczalnika, co skutkowało wygaszeniem fluorescencji ANS.

#### 5.3.2.4 *Ludzkie i kurze homologi N1 oraz N1/2 zawierają motyw amyloidowy*

Pomiary zmian fluorescencji ThT w czasie (**Rozdział 4.9.2**) wykazały brak agregacji apo- i holo-gN1. Intensywność fluorescencji ThT w obecności apo-gN1 cechowała się wartością na poziomie emisji fluoroforu w buforze, co wskazywało na brak wiązania sondy. W obecności holo-gN1 zaobserwowano natomiast znaczne zwiększenie NFU, która dla próbek zawierających trypsynę zmniejszała się w hiperboliczny sposób. Wynik ten wykazał, iż pojawienie się produktu o wyższej  $MW_{app}$  nie było związane następnie z tworzeniem struktur amyloidowych. Niemniej jednak, wysoka początkowa wartość NFU dla próbek zawierających holo-gN1 wskazywała na obecność motywu rozpoznawanego przez fluorofor, który jest używany rutynowo jako sonda specyficzna wobec struktur amyloidowych [216,221]. Właściwość ta została

zbadana szerzej przy pomocy pomiarów fluorescencji w stanie ustalonym dla ThT w obecności ludzkich i kurzych homologów N1 oraz N1/2 w obecności zmiennego stężenia jonów Zn(II). Co ciekawe, wpływ jonów Zn(II) na emisję ThT w obecności homologów holo-N1 oraz holo-N1/2 był rozbieżny; w przypadku homologów N1 obserwowano silny wzrost RFU zależny od stężenia jonów Zn(II), podczas gdy dla homologów N1/2 obserwowano stopniowy spadek wartości RFU. Ponadto, dopasowanie krzywoliniowe danych dla homologów N1 ponownie umożliwiło estymację  $K_d$ , których wartości wykazywały wysoką zgodność z wartościami otrzymanymi dotychczas opisanymi metodami. Pokazano zatem dla obu homologów N1, iż utworzenie motywu amyloidowego jest indukowane jonami Zn(II). Z drugiej strony, wyniki otrzymane dla homologów N1/2 nie wykazywały trendu, który można było dopasować do żadnego testowanego modelu. Spadek RFU może być natomiast ponownie spowodowany ekspozycją miejsc wiążących sondę do rozpuszczalnika pod wpływem jonów Zn(II) i wygaszeniem fluorescencji.

Mając na uwadze powyższe wyniki oraz lokalizację Nucb2/N1 w CUN jest zatem możliwe, iż uczestniczą one w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych. W związku z powyższym, Nucb2/N1 być może przejawia aktywność czaperoninową, jak w przypadku Nucb1 [257], i przez przyjęcie odpowiedniej konformacji wiąże się do protofibrili amyloidowych hamując proces amyloidogenezy. Niewątpliwie konieczne są dalsze badania w celu ustalenia czy homologi Nucb2/N1 wykazują właściwości zapobiegające czy promujące amyloidegenezę jak w przypadku innych Zn(II)-zależnych białek, takich jak amyloid  $\beta$  [258] czy  $\alpha_2$ -makroglobulina [259]. Warto także dodać, iż insulina [260] oraz hormon wzrostu [261] również są zdolne do tworzenia struktur amyloidowych, przy czym w przypadku insuliny jony Zn(II) zdają się hamować proces tworzenia fibryli [260]. Niemniej, jony Zn(II) są kluczowe dla ścisłego upakowania hormonów w pęcherzykach wydzielniczych: w postaci heksamerów dla insuliny [260] i struktur amyloido-podobnych w przypadku hormonu wzrostu [261]. W rzeczywistości wiele hormonów jest magazynowanych w wysokim stężeniu w pęcherzykach wydzielniczych w postaci funkcjonalnego amyloidu, co ułatwia ich przechowywanie, sortowanie i sekrecję [262]. Stąd też konieczne są dalsze badania w celu ustalenia dokładnej natury amyloidegenicznych właściwości Nucb2/N1.

### 5.3.2.5 Janusowy wpływ jonów Zn(II) na ludzką i kurzą N1 oraz N1/2

Eksperymenty HDX-MS (**Rozdział 4.10**) ponownie ujawniły homologi apo-N1 jako silnie nieustrukturyzowane białka, przez co profile ich wymiany izotopowej cechowały się niemal całkowitą wymianą H/D na całej długości sekwencji już po 10 s. Z drugiej strony,

w obecności jonów Zn(II) region M30 oraz w mniejszym stopniu koniec C zostały zidentyfikowane jako regiony o spowolnionej wymianie H/D w stosunku do stanu apo-. Ma to szczególne znaczenie ze względu na wysoki stopień zachowania w toku ewolucji i białkach z rodziny Nucb2 anoreksygenicznego rdzenia M30. Co ciekawe, region zawierający sekwencję HFREX<sub>n</sub>H [47] przewidzianą jako rejon wiążący jony Zn(II) był o wiele mniej chroniony przed wymianą w stosunku do regionu R/KQVIDVL wykazującego podobieństwo do AgRP, który jednocześnie stanowi kluczową część rdzenia anoreksygenicznego fragmentu M30 [125]. W związku z powyższym jest możliwe, iż fragment M30 stanowi powierzchnię oligomeryzacji i w konsekwencji wpływa na i/lub ogranicza właściwości anoreksygenicznego neuropeptydu.

Z drugiej strony w przypadku homologów N1/2 zidentyfikowano trzy regiony o zwiększonej wymianie izotopowej pod wpływem jonów Zn(II). Co ciekawe, regiony te odpowiadały również zwiększonej wymianie H/D obserwowanej na końcu N homologów Nucb2 [46]. Ponadto, te same regiony apo-gN1/2 co apo-gNucb2 cechowały się zwiększoną protekcją w stosunku do apo-hN1/2 i apo-hNucb2, co skutkowało różnicami w wymianie widocznymi nawet po upływie 2,5 h. W związku z powyższym pojawia się pytanie czy wysoka niedostępność regionów M30 w prekursorowych formach apo- cechuje się tym samym potencjałem anoreksygenicznym co N1. Największy stopień ekspozycji był obserwowany w rejonie obejmującym 60–96 reszty aminokwasowe obu homologów N1/2, co jest szczególnie istotne ze względu iż zawiera on miejsce rozpoznawane przez PCs. Fakt ten dodatkowo ugruntowuje strukturalną rolę N2, która wydaje się regulować aktywność i lokalizację Nucb2/nesfatyn.

Jak wspomniano we Wprowadzeniu, koniec N Nucb1 bogaty w reszty Leu/Ile został niedawno zidentyfikowany jako nowy motyw retencji w GA, gdzie dojrzewaniu podlega również PC1/3. Ponadto GA jest jednym z magazynów komórkowego Zn(II), zwłaszcza w przypadku komórek sekrecyjnych takich jak komórki  $\beta$  trzustki [263]. W związku z wysoką homologią sekwencji pomiędzy Nucb1 i Nucb2/N1/2 mogłyby one podlegać procesowaniu w tym organellum a związana z tym utrata motywu retencji GA inicjować transport wewnątrzkomórkowy i/lub pakowanie N1, N2 i NLP do granul wydzielniczych (gdzie jony Zn(II) również są obecne wysokim stężeniu) i ich sekrecję zewnątrzkomórkową. To z kolei mogłoby przekładać się na część obserwowanych właściwości auto- i parakrynych ortologów. Ponadto, stężenie Zn(II) w komórce jest ściśle regulowane i utrzymywane w nanomolarnym zakresie [264] a wzrost stężenia cytozolowego Zn(II) jest związany z ich redystrybucją do ERm oraz GA [265]. Niemniej jednak, w GA [263] oraz w przestrzeniach synaptycznych neuronów glutaminergicznych [266] stężenie wolnego Zn(II) może osiągać wartości mikromolarne. Neurony

glutaminergiczne obecne są m. in. w układzie limbicznym, którego część stanowią HYP oraz AG [267]. Aktywności synaptycznej neuronów glutaminergicznych towarzyszy również wyrzut jonów Zn(II) [268]. Z drugiej strony, zaburzenia homeostazy Zn(II) mogą prowadzić do neurotoksyczności i/lub stymulować procesy neurodegeneracyjne takie jak rozwój AD [269]. HYP oraz AG są także jednym z miejsc ekspresji Nucb2/N1 [270]. W związku z powyższym udział Nucb2/nesfatyn w regulacji procesów poznawczych, odpowiedzi na stres oraz depresji może być w części Zn(II)-zależny [85]. Co więcej, wspomniana lokalizacja obu peptydów w miejscach o wysokim stężeniu jonów Zn(II) mogłaby również częściowo wyjaśniać wysokie wartości wyznaczonych  $K_d$  *in vitro* w poniższej pracy.

## 6.

# Podsumowanie i dalsze badania

Wyniki przedstawionych badań pozwoliły na scharakteryzowanie ludzkich i kurzych homologów N1, N2 oraz N1/2 będących produktami proteolitycznego procesowania końca N Nucb2. Spośród powyższych białek rola fizjologiczna została poznana jedynie dla Nucb2/N1, podczas gdy rola pozostałych nesfatyn wciąż pozostaje niezbadana. Dodatkowo, niewiele jest również doniesień w literaturze na temat relacji struktura-funkcja nesfatyn. Z tego właśnie powodu przeprowadzone analizy skupiały się na właściwościach molekularnych nesfatyn oraz wpływie jonów metali dwuwartościowych na ich strukturę.

Wyniki analiz *in silico*, spektroskopii CD, SV-AUC oraz HDX-MS wskazały na niemal w pełni nieuporządkowany charakter ludzkich i kurzych homologów apo-N1, które cechowały się silnie wydłużonym kształtem. Struktura ta kontrastowała z bardziej globularną strukturą hN2 oraz ludzkich i kurzych homologów N1/2, zawierających przeplatające się regiony globularne i IDRs. Zarówno hN2 oraz hN1/2 i gN1/2 wykazywały mozaikową budowę o elipsoidalnym kształcie. Wszystkie powyższe białka cechowała wysoka zawartość IDRs, ze względu na co zakwalifikowano je jako członków rodziny IDPs. Warto tutaj podkreślić, iż uzyskane wyniki sugerowały szczególną rolę fragmentu N2, który połączony z N1 zmieniał jego właściwości molekularne. Procesowanie Nucb2/N1/2 *in vivo* i uwolnienie IDPs N1 niewątpliwie stanowi zatem jeden z poziomów regulacji tych wielofunkcyjnych białek. Dodatkowo wykazano, iż struktura i właściwości homologów N1/2 nie są prostą sumą jej składowych peptydów a izolowane fragmenty N1 oraz N2 nie oddziałują ze sobą odtwarzając strukturę prekursora. Ponadto, struktura form apo-nesfatyn jest silnie zachowana w toku ewolucji i silnie zależna od otoczenia.

Eksperymenty przeprowadzone w obecności jonów metali dwuwartościowych wykazały potencjalne zaangażowanie nesfatyn w homeostazie jonów Zn(II). Wiązanie jonów Zn(II) jest właściwością silnie zachowaną w toku ewolucji i wydaje się być cechą uniwersalną nesfatyn. Ponadto jony Zn(II) silnie wpływały na właściwości i strukturę wszystkich badanych homologów nesfatyn. Niemniej jednak widoczne były również różnice w sposobie ich

oddziaływania z jonami Zn(II), co pomimo wysokiej homologii białek wskazuje na możliwość istnienia funkcji niesfatyn specyficznych dla danego organizmu. Ludzkie i kurze homologu holo-N1 wykazywały zależne od jonów Zn(II) przejście ich struktury od nieuporządkowanej do uporządkowanej wraz ze zmianą ich stanu oligomerycznego. Przy czym homolog kurzy cechował się dodatkowo większą tendencją do agregacji w porównaniu do homologu ludzkiego. Różnice strukturalne stanów holo-N1 pomiędzy homologami dodatkowo skutkowały rozbieżnym oddziaływaniem z ANS. Co istotne, region M30 został zidentyfikowany jako uczestniczący w strukturyzacji ludzkiej i kurzej N1, co sugeruje możliwość częściowej inhibicji ich działania anoreksygenicznego. Co więcej, homologu holo-N1 posiadają motyw amyloidowy wiążący ThT, co wskazuje na ich możliwy udział w procesach neurodegeneracyjnych. Istotne zatem mogłyby być badania wpływu N1 na kinetykę agregacji znanych białek amyloidowych, takich jak tau, A $\beta$  lub transtyretyna, zwłaszcza biorąc pod uwagę czaperoninową funkcję Nucb1 w tworzeniu fibryli amyloidowych. Badaniem wartym uwagi jest również ustalenie formy przechowywania N1 w pęcherzykach wydzielniczych i czy jest ona podobna do amyloidu tak jak np. w przypadku wspomnianego już hormonu wzrostu. Z drugiej strony jony Zn(II) wywoływały silną destabilizację hN2 oraz homologów N1/2 związaną z ekspozycją trzech regionów form prekursorowych. Ponownie obserwowano także różnice w wiązaniu ANS oraz chromoforu Zincon pomiędzy homologami. Dodatkowo, w przeciwieństwie do hN1/2 obserwowano oligomeryzację gN1/2 pod wpływem jonów Zn(II). Ekspozycja regionu zawierającego miejsce rozpoznawane przez PCs jest szczególnie istotna, gdyż sugeruje ona, iż procesowanie prekursora może być zależne od jonów Zn(II).

Wstępne próby krystalizacyjne wskazały na otrzymanie precypitatów oraz potencjalnych mikrokryształów hN1 w nieobecności (**Rys. S17A-J**) i obecności jonów Zn(II) (**Rys. S18A-J**). Warto również podkreślić wysoką tendencję do agregacji apo- (**Rys. S17L**) i holo-hN1 (**Rys. S18L**) w obecności jonów Cd(II) oraz wysokiej siły jonowej (1M NaOAc). Co więcej, zaobserwowano również potencjalne rozdzielanie faz ciecz-ciecz (LLPS, ang. *liquid-liquid phase separation*) w obecności wysokiego stężenia 2-metylo-2,4-pentadiolu dla próbek w obecności (**Rys. S17L**) i nieobecności jonów Zn(II) (**Rys. S18L**). Nieco lepsze efekty przyniosły próby krystalizacji hN1/2 (**Rys. S19**), które prowadzono we współpracy z Małopolskim Centrum Biotechnologii. Warto zatem rozważyć dalszą optymalizację warunków i/lub ekspresję N1 i/lub N1/2 w fuzji z innym białkiem w celu zwiększenia jej stabilności i otrzymania kryształów odpowiedniej jakości do eksperymentów XRD. Niemniej jednak, z wykorzystaniem takich technik jak mikrokryształiczna dyfrakcja elektronowa (microED, ang. *microcrystal electron diffraction*) możliwe byłoby wykorzystanie mikrokryształów do opisu strukturalnego.



Ponadto warto również zbadać bardziej wnikliwie wpływ jonów Cd(II) i wysokiej siły jonowej na proces agregacji. Dalsze badania nad LLPS hN1 oraz hN1/2 również jest zagadnieniem wartym dalszej uwagi.

Uzyskane wyniki kompleksowej analizy strukturalnej nesfatyn pozwoliły na przedstawienie funkcji nesfatyn w nowym świetle, które może pozwolić na lepsze zrozumienie ich szerokiej roli fizjologicznej. Ponadto, badania wykonane podczas realizacji projektu stanowią fundament do dalszych badań nad relacją struktura-funkcja nesfatyn. Wiedza o funkcjonalnej roli Nucb2/N1 jest systematycznie pogłębianą, podczas gdy rola pozostałych nesfatyn wciąż jest niepoznana. W związku z powyższym, na podstawie uzyskanych wyników, niewątpliwie dalsza analiza powinna obejmować zbadanie strukturalnej roli N2 i jej wpływu na lokalizację Nucb2/N1/2 *in vivo*. Ponadto zbadanie wpływu PTM nesfatyn na ich strukturę i oddziaływanie z jonami Zn(II) jest również bardzo interesująca perspektywą. Określenie znaczenia oddziaływania nesfatyn z jonami Zn(II) na pełnione przez nesfatyny funkcje jest również obszarem jak dotąd niezbadanym. Wreszcie pomiary SAXS, wzajemnie powiązanej spektrometrii mas (XL-MS, ang. *cross-linking mass spectrometry*) i/lub NMR mogły by pozwolić na głębsze zrozumienie dynamiki molekularnej białek i/lub przybliżenie struktury atomowej form apo- i holo-peptydów.

# Załącznik



## SEKWENCJE REKOMBINOWANYCH NESFATYN

Kolorem pomarańczowym zaznaczono znacznik 6-histydylowy, niebieskim sekwencję rozpoznawaną przez proteazę HRV3C, szarym pozostałe reszty pochodzące z wektora, kolorem czarnym oznaczono sekwencję nesfatyn.

**gN1**; 106 reszt aminokwasowych

MRGSHHHHHHGSAGLEVL<sup>▼</sup>FQ<sup>▼</sup>GPELV<sup>▼</sup>PIDIDKTKVKGEGHVEGEKIENPDTGLYYDEYLRQVIDVLETDK  
HFREKLQTADIEEIKSGKLSRELDLVSHHVRTRLDEL

**gN2**; 103 reszty aminokwasowe

MRGSHHHHHHGSAGLEVL<sup>▼</sup>FQ<sup>▼</sup>GPELQEVARLRMLIKAKMDSVQDTGIDHQALLKQFEHLNHQNPDTF  
EPKDLDMLIKAATSDLENYDKTRHEEFK<sup>▼</sup>KYEMMKEHE

**gN1/2**; 187 reszt aminokwasowych

MRGSHHHHHHGSAGLEVL<sup>▼</sup>FQ<sup>▼</sup>GPELV<sup>▼</sup>PIDIDKTKVKGEGHVEGEKIENPDTGLYYDEYLRQVIDVLETDK  
HFREKLQTADIEEIKSGKLSRELDLVSHHVRTRLDELKRQEVARLRMLIKAKMDSVQDTGIDHQALLKQFEH  
LNHQNPD<sup>▼</sup>TFEPKDLDMLIKAATSDLENYDKTRHEEFK<sup>▼</sup>KYEMMKEHE

**hN1**; 106 reszt aminokwasowych

MRGSHHHHHHGSAGLEVL<sup>▼</sup>FQ<sup>▼</sup>GPELV<sup>▼</sup>PIDIDKTKVQNIHPVESAKIEPPDTGLYYDEY<sup>▼</sup>LKQVIDVLETDKH  
FREKLQKADIEEIKSGRLSKELDLVSHHVRTKLDEL

**hN2**; 103 reszty aminokwasowe

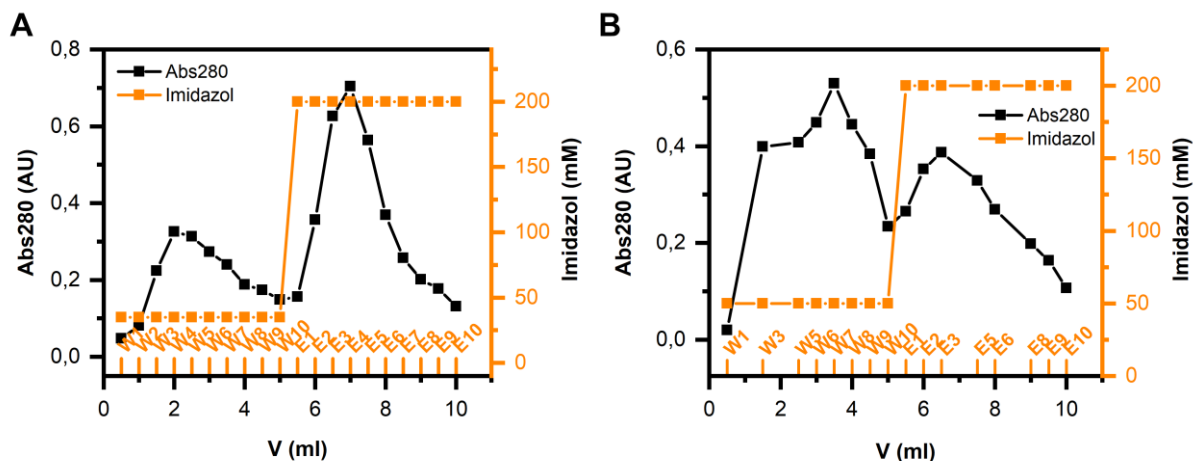
MRGSHHHHHHGSAGLEVL<sup>▼</sup>FQ<sup>▼</sup>GPELQEVGRLRMLIKAKLDSLQDIGMDHQALLKQFDHLNHLNPD<sup>▼</sup>KFE  
STDLDMLIKAATSDLEHYDKTRHEEFK<sup>▼</sup>KYEMMKEHE

**hN1/2**; 187 reszt aminokwasowych

MRGSHHHHHHGSAGLEVL<sup>▼</sup>FQ<sup>▼</sup>GPELV<sup>▼</sup>PIDIDKTKVQNIHPVESAKIEPPDTGLYYDEY<sup>▼</sup>LKQVIDVLETDKH  
FREKLQKADIEEIKSGRLSKELDLVSHHVRTKLDELKRQEVGRLRMLIKAKLDSLQDIGMDHQALLKQFDHL  
NHLNPD<sup>▼</sup>KFESTDLMLIKAATSDLEHYDKTRHEEFK<sup>▼</sup>KYEMMKEHE

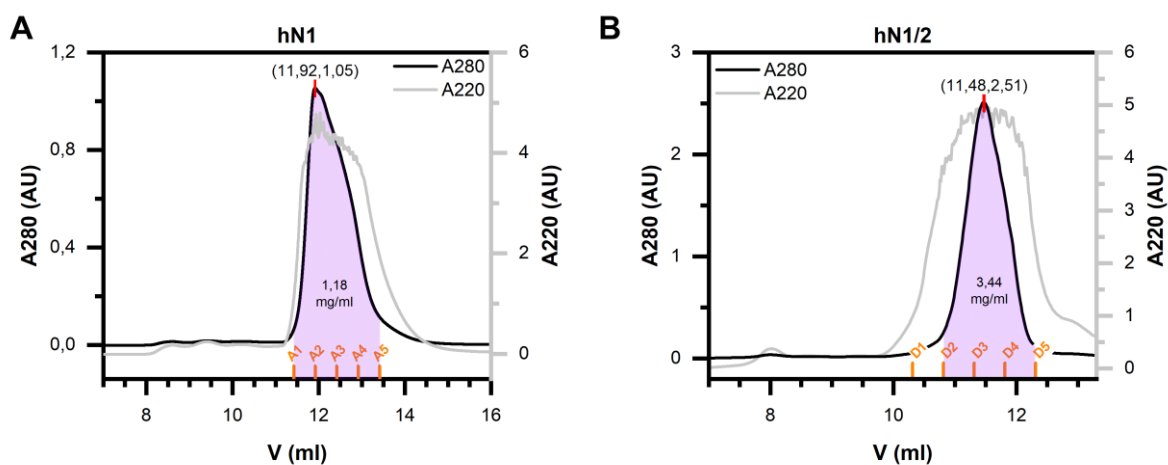


## MATERIAŁY DODATKOWE



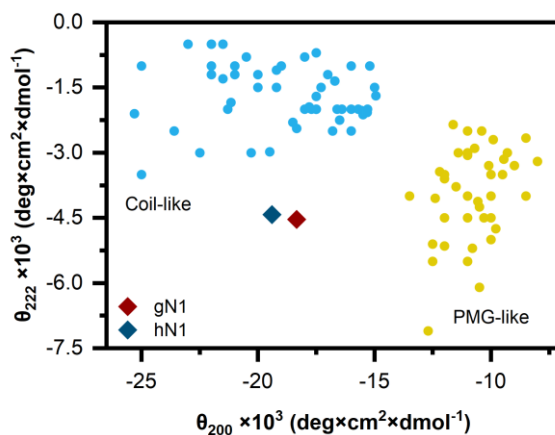
**Rys. S1** Optymalizacja zawartości imidazolu podczas oczyszczania hN1

Profile elucji hN1 podczas IMAC z wykorzystaniem imidazolu w buforze płuczącym o stężeniu (A) 35 mM; (B) 50 mM. W1-W10 – frakcje zebrane podczas zwalniania białek niespecyficycznie związanych do złoża. E1-E10 – frakcje zbierane podczas elucji wszystkich białek związanych do złoża.



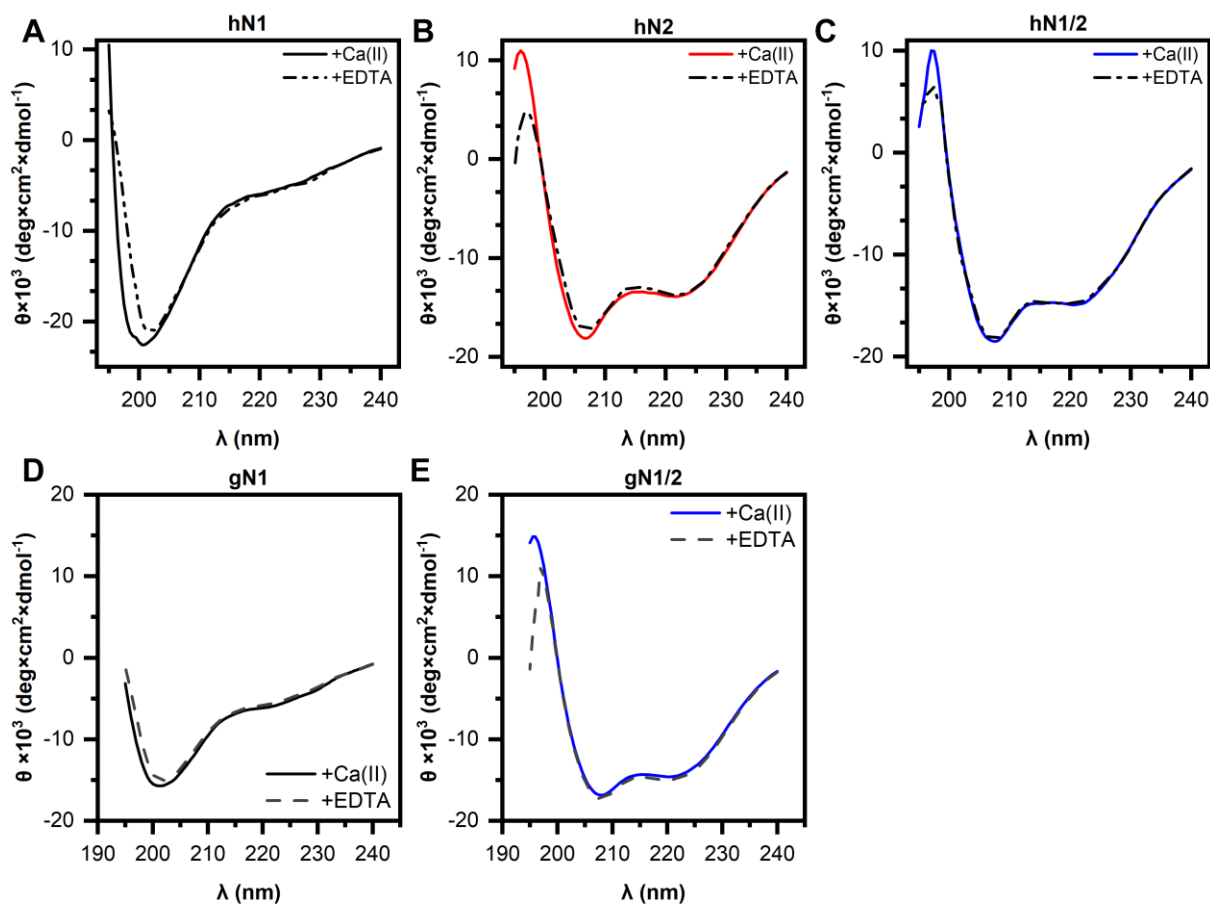
**Rys. S2** Profile elucji hN1 i hN1/2 podczas SEC

Profile elucji (A) hN1 oraz (B) hN1/2 podczas analitycznego rozdzielania na kolumnie Superdex 75 Increase 10/300



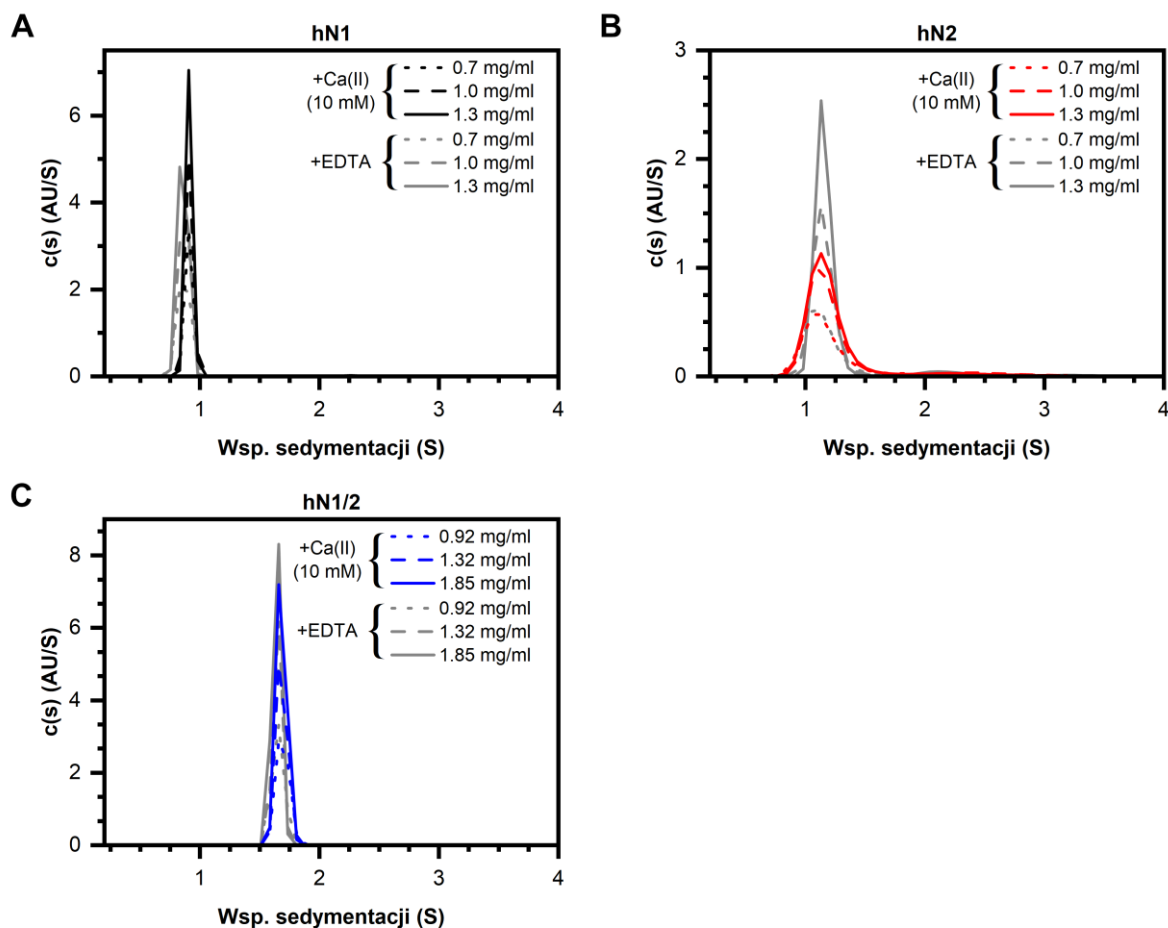
Rys. S3 Wykres podwójnych MRE

Wykres przedstawia wartości MRE przy 200 i 222 nm ludzkich i kurzych homologów apo-N1 (romby) oraz zestawu IDPs na podstawie [32].



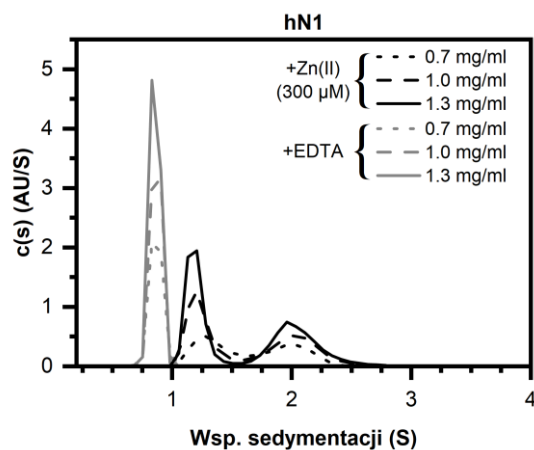
Rys. S4 Widma CD niesfatyn w obecności jonów Ca(II)

Widmo CD (A) hN1 (czarna linia); (B) hN2 (czerwona linia); (C) hN1/2 (niebieska linia); (D) gN1 (czarna linia); (E) gN1/2 (niebieska linia) w obecności Ca(II) (10 mM). Czarną przerywaną linią oznaczono widmo odpowiednich niesfatyn w obecności EDTA (5 mM).



**Rys. S5** SV-AUC ludzkich nesfatyn w obecności jonów Ca(II)

Eksperymenty SV-AUC prowadzono w obecności 10 mM Ca(II) (linie czarne, czerwone lub niebieskie) lub 5 mM EDTA (szare linie). Dystrybucja współczynnika sedimentacji  $c(s)$  dla białka: hN1 (A); hN2 (C); hN1/2 (D).

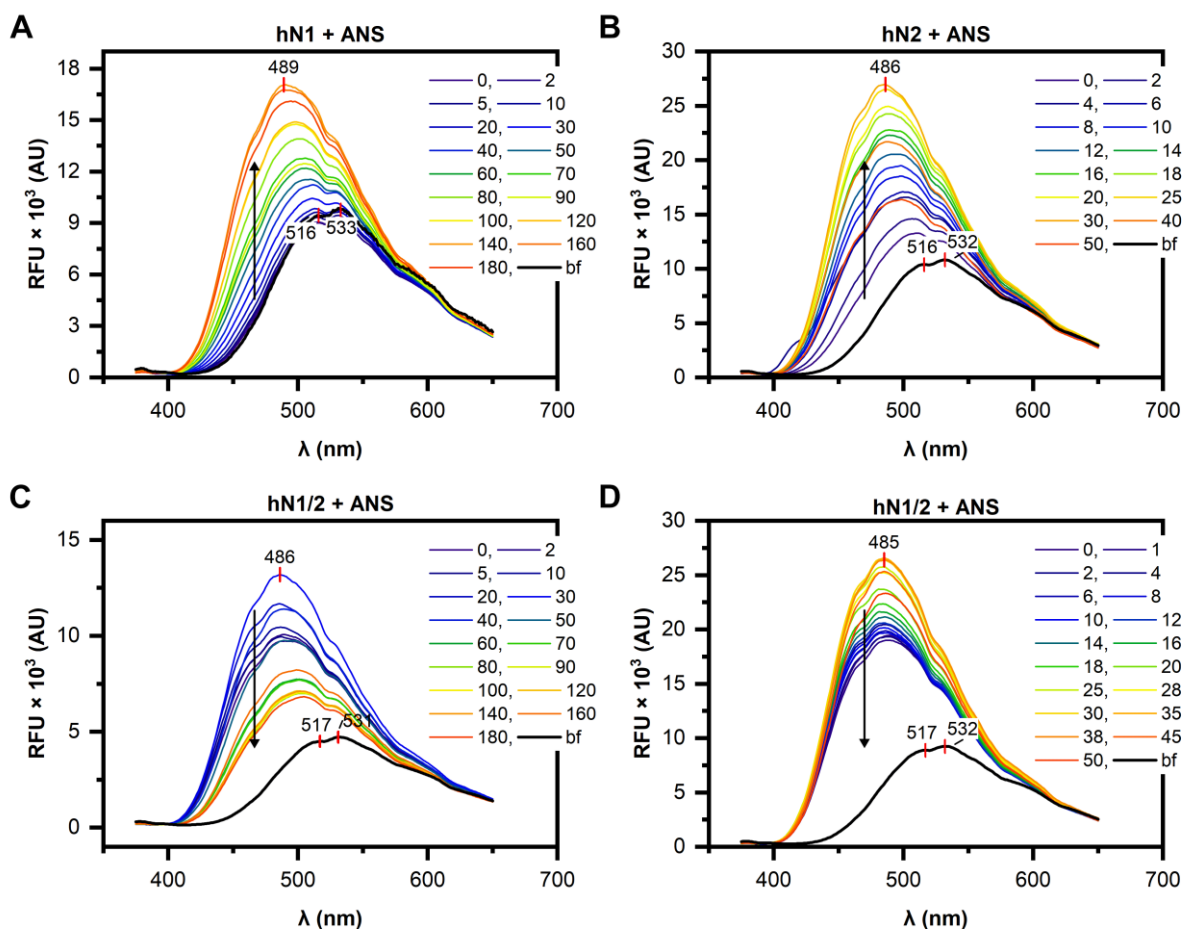


**Rys. S6** SV-AUC hN1 w obecności 300  $\mu$ M Zn(II)

Dystrybucja współczynnika sedimentacji  $c(s)$  hN1 w obecności 300  $\mu$ M Zn(II) (czarne linie) lub 5 mM EDTA (szare linie).

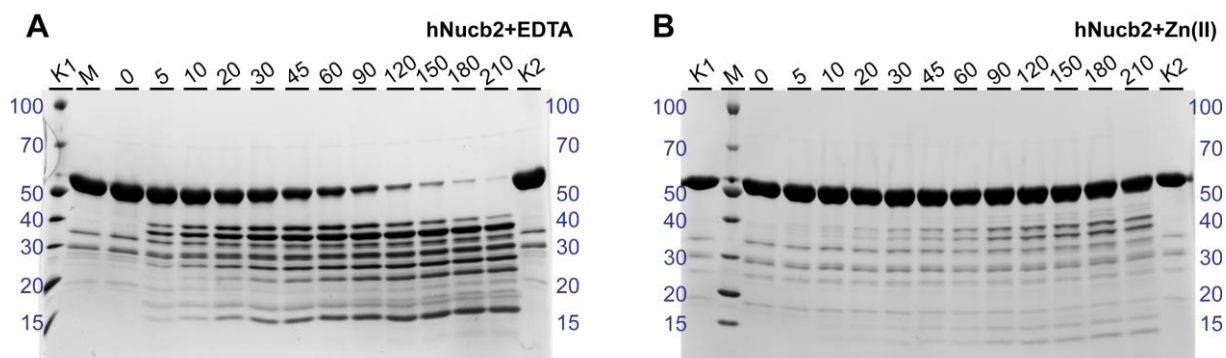
Tab. S1 Parametry hydrodynamiczne ludzkich i kurzych homologów nesfatyn

Białko	Związek	c [mg/ml]	rmsd $\times 10^3$	$s_{(20,w)}$ [S]	f/f <sub>0</sub>	R <sub>h</sub> [nm]	MW <sub>app</sub> [kDa]
hN1	(300 $\mu$ M) ZnCl <sub>2</sub>	0,7	6,58	1,42	1,42	2,32	14,5 (54%)
			2,08	1,34	2,80	25,9 (46%)	
		1,0	6,98	1,30	1,36	2,02	11,7 (53%)
			2,14	1,25	2,59	24,5 (47%)	
		1,3	7,54	1,25	1,36	2,03	11,3 (53%)
			2,14	2,14	2,65	25,2 (47%)	



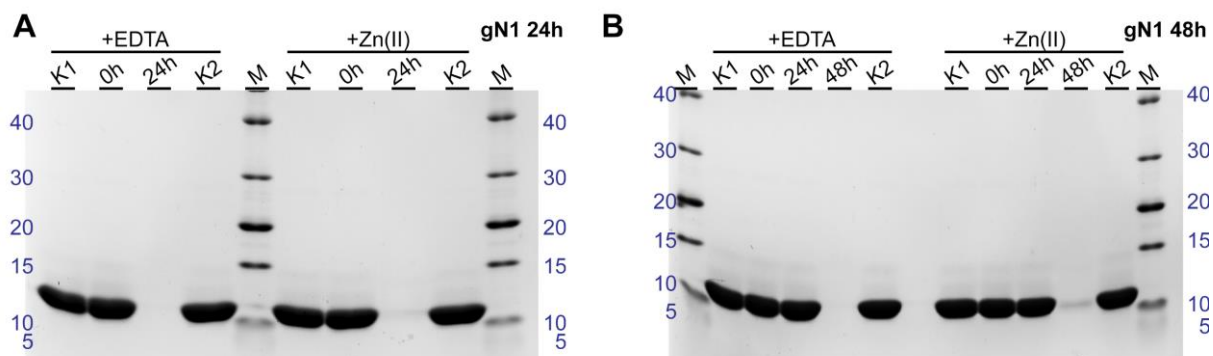
Rys. S7 Widma emisyjne ANS w obecności nesfatyn

Widma emisyjne ANS rejestrowano w obecności (A) hN1; (B) hN2 i (C, D) hN1/2 miareczkowanych jonami Zn(II) w stężeniu opisanym w legendzie każdego panelu. Liniją czarną przedstawiono intensywność emisji ANS w buforze (bf).



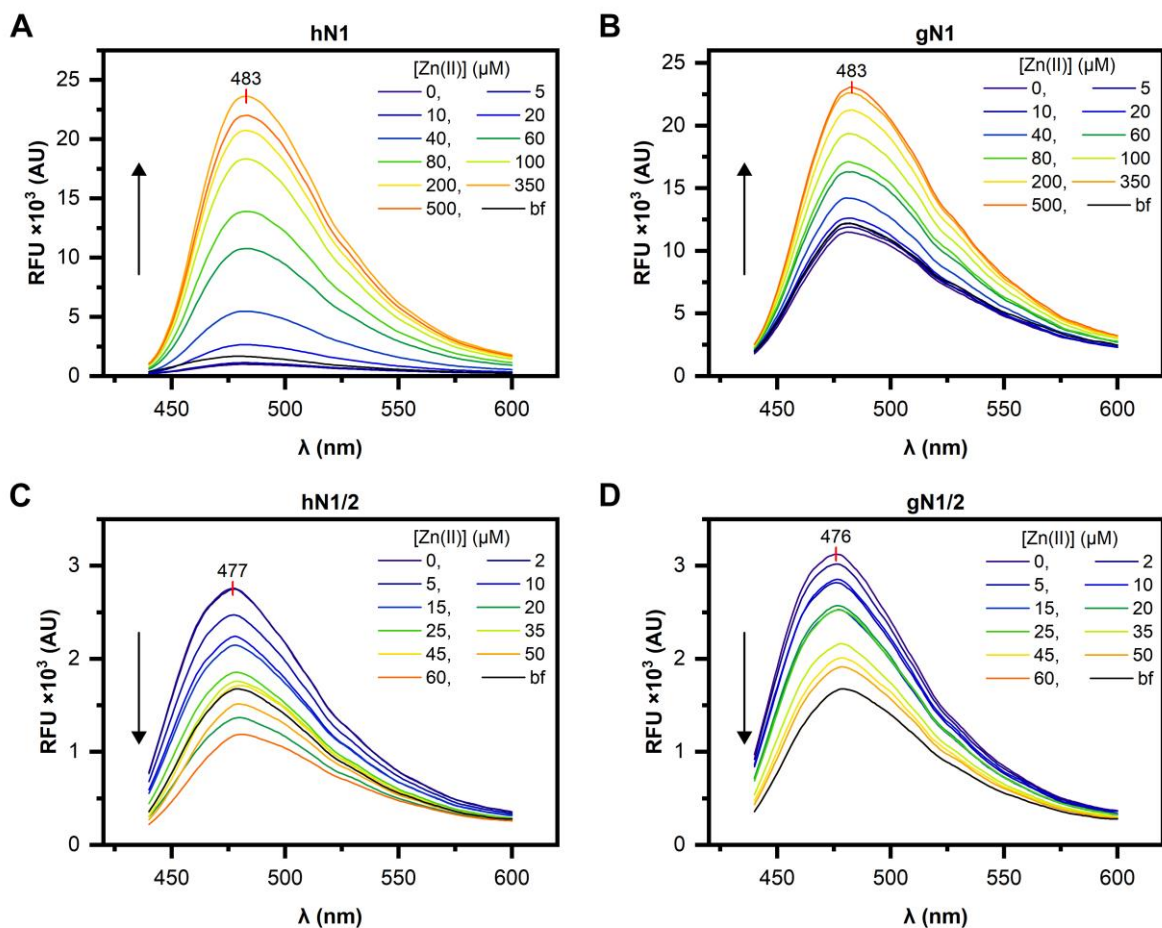
**Rys. S8** Analiza SDS-PAGE produktów proteolizy hNucb2 z udziałem trypsyny

K1, K2 – próbki kontrolne nie zawierające trypsyny pobrane odpowiednio na początku i końcu eksperymentu; M standard białkowy PageRuler Broad Range (*Rozdział 3.1.4.7*); 0–210 – próbki pobrane w interwałach czasowych podanych u góry każdego panelu w minutach. Białko pełnej długości było inkubowane z trypsyną w stosunku masowym enzym:substrat (e/s) równym 1:5000 w obecności EDTA (**A**) lub 300  $\mu$ M Zn(II) (**B**).



**Rys. S9** Analiza SDS-PAGE produktów proteolizy gN1 z udziałem trypsyny

Próbki inkubowano przed reakcją 0 h (**A**) lub 24 h (**B**) w obecności EDTA lub 500  $\mu$ M Zn(II), po czym poddawano proteolizie z udziałem trypsyny w stosunku masowym 1:1000 (e/s). K1, K2 – próbki kontrolne pobrane na początku i końcu inkubacji; M – standard białkowy PageRuler Broad Range (*Rozdział 3.1.4.7*); 0–48h – próbki pobrane w interwałach czasowych zgodnych z opisanym u góry paneli.



**Rys. S10** Widma emisyjne ThT w obecności ludzkich i kurzych homologów nesfatyn

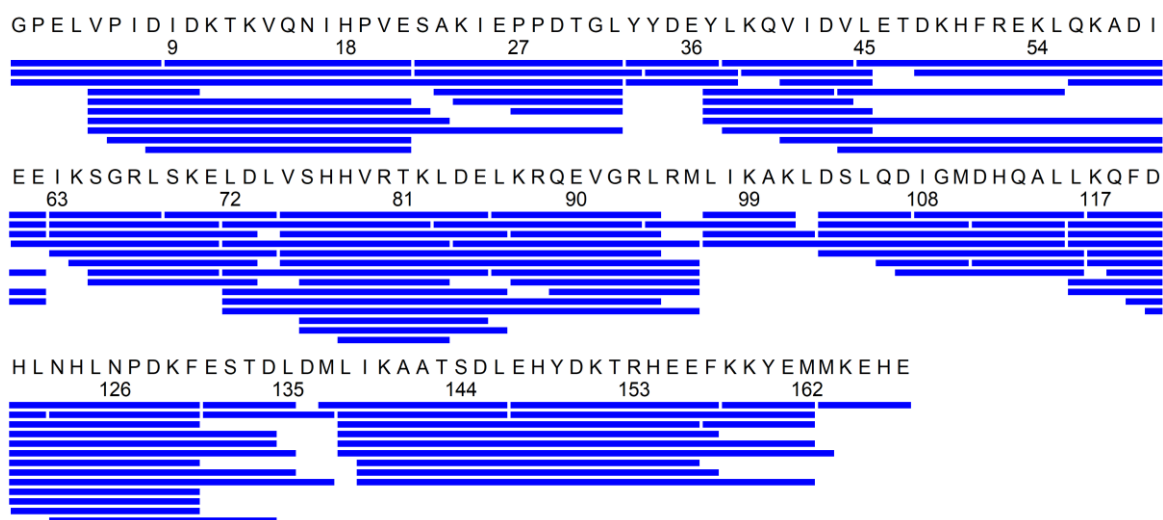
Widma emisyjne ThT rejestrowano w obecności (A) hN1; (B) gN1; (C) hN1/2; (D) gN1/2 miareczkowanych Zn(II) o stężeniu podanym w legendzie każdego panelu. Linia czarna przedstawiono RFU fluoroforu w buforze (bf).





Razem: 70 peptydów; 100% pokrycia sekwencji aa.; redundancja: 9,49

**Rys. S11** Mapa pokrycia sekwencji aminokwasowej hN1



Razem: 106 peptydów; 100% pokrycia sekwencji aa.; redundancja: 7,87

**Rys. S12** Mapa pokrycia sekwencji aminokwasowej hN1/2



Razem: 68 peptydów; 100% pokrycia sekwencji aa.; redundancja: 10,29

**Rys. S13** Mapa pokrycia sekwencji aminokwasowej gN1

GPELVPI D I D K T K V K G E G H V E G E K I E N P D T G L Y D E Y L R Q V I D V L E T D K H F R E K L Q T A D I  
9 18 27 36 45 54



E E I K S G K L S R E L D L V S H H V R T R L D E L K R Q E V A R L R M L I K A K M D S V Q D T G I D H Q A L L K Q F E  
63 72 81 90 99 108 117

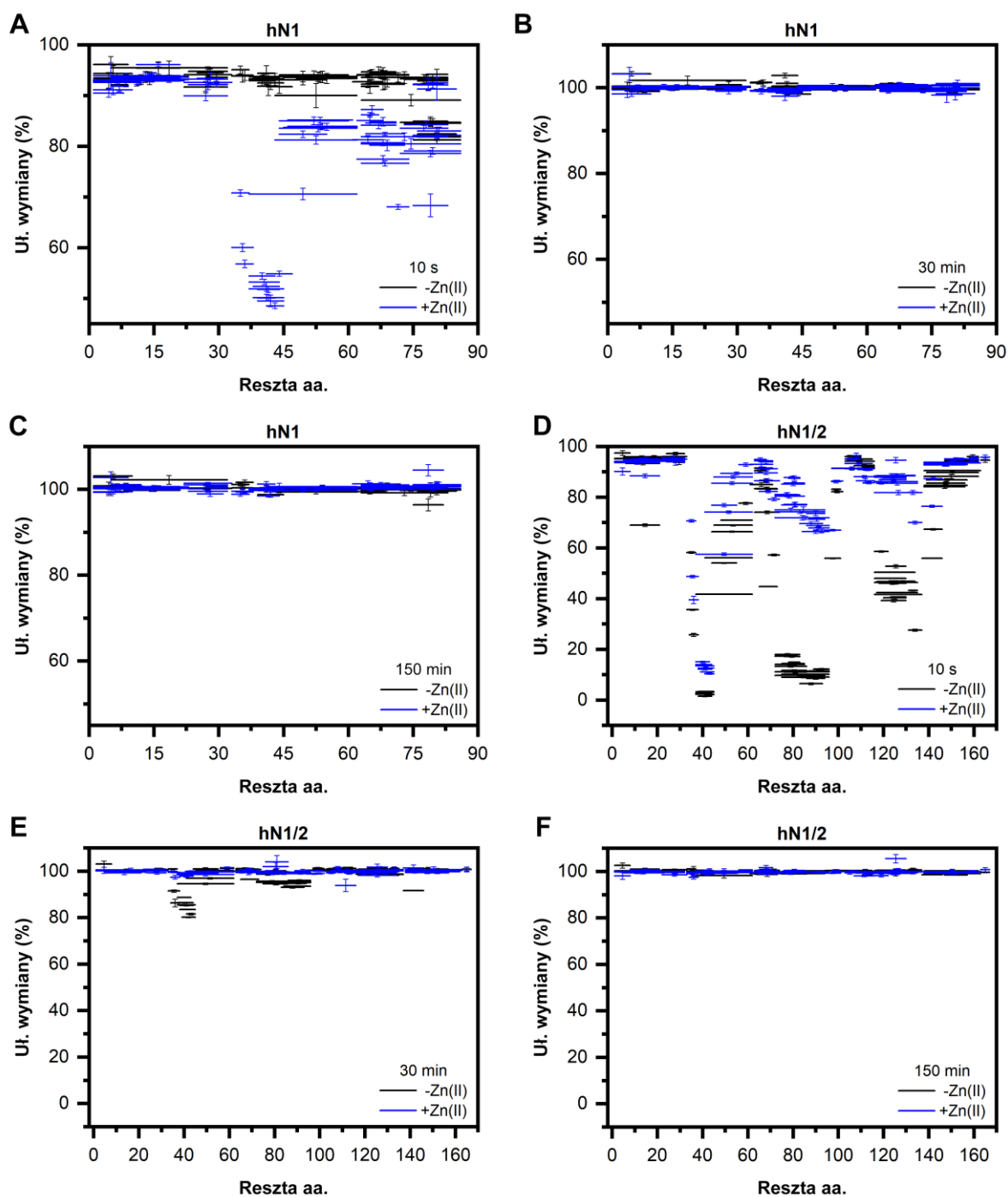


H L N H Q N P D T F E P K D L D M L I K A A T S D L E N Y D K T R H E E F K K Y E M M K E H E  
126 135 144 153 162



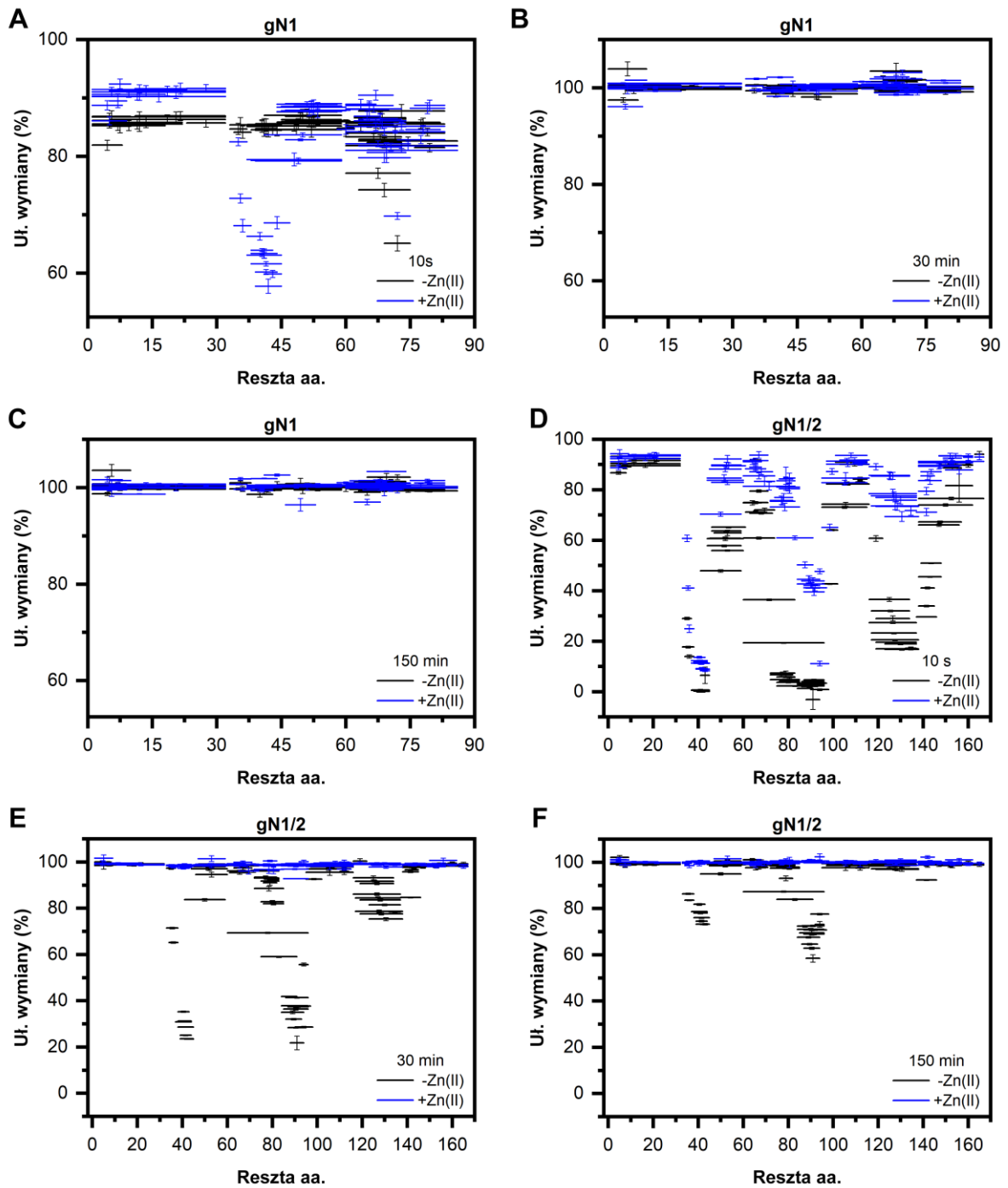
Razem: 96 peptydów; 100% pokrycia sekwencji aa.; redundancja: 7,47

**Rys. S14** Mapa pokrycia sekwencji aminokwasowej gN1/2



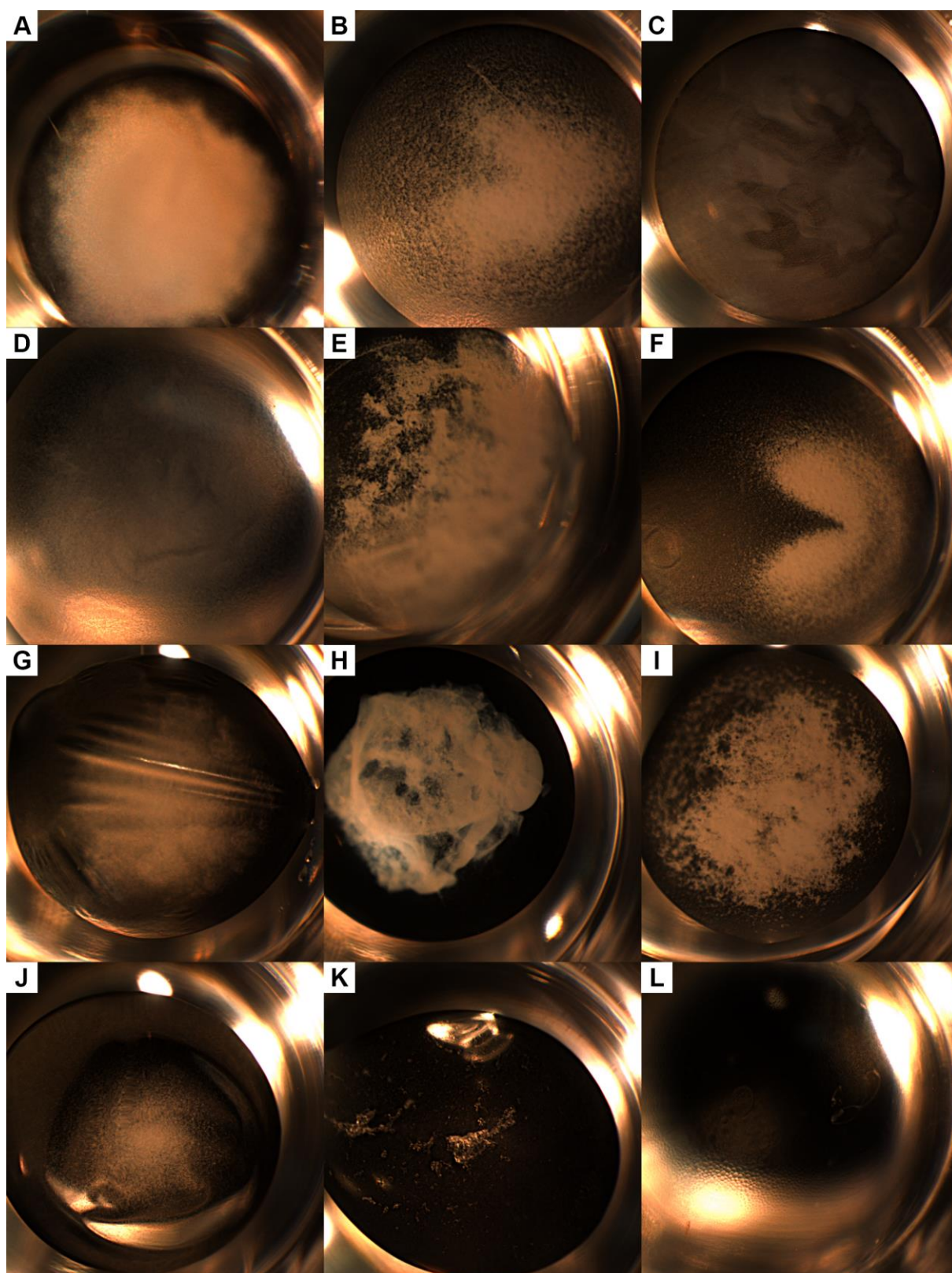
**Rys. S15** Profil HDX-MS ludzkich nesfatyn w (nie)obecności jonów Zn(II)

Panele przedstawiają względną wymianę izotopową stanów  $-/+$  Zn(II) hN1 (A-C) i hN1/2 (D-F) w interwałach czasowych określonych w legendzie każdego panelu.



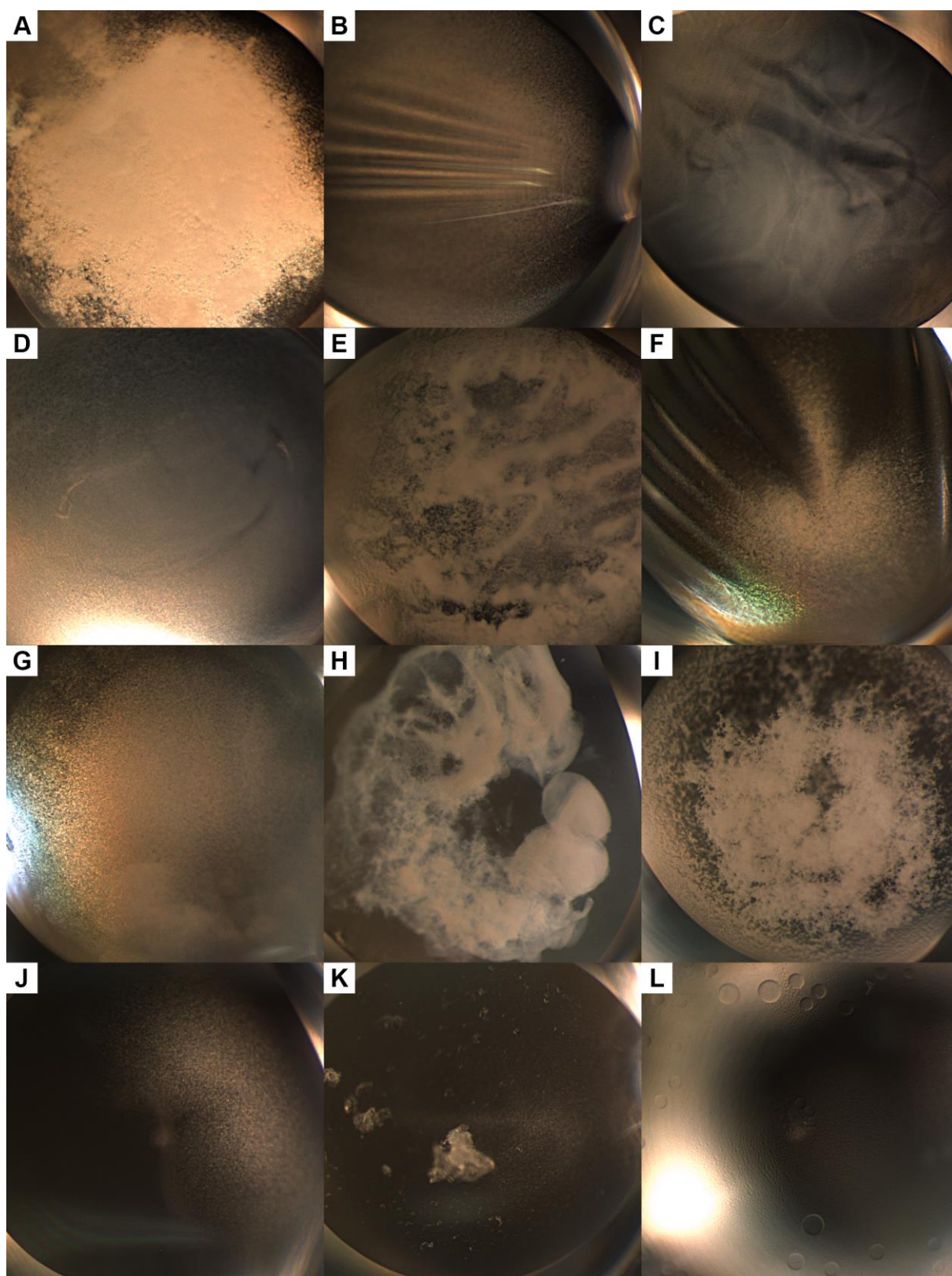
**Rys. S16** Profil HDX-MS kurzych nesfatyn w (nie)obecności jonów Zn(II)

Panele przedstawiają względną wymianę izotopową stanów  $-/+$  Zn(II) hN1 (A-C) i hN1/2 (D-F) w interwałach czasowych określonych w legendzie każdego panelu.



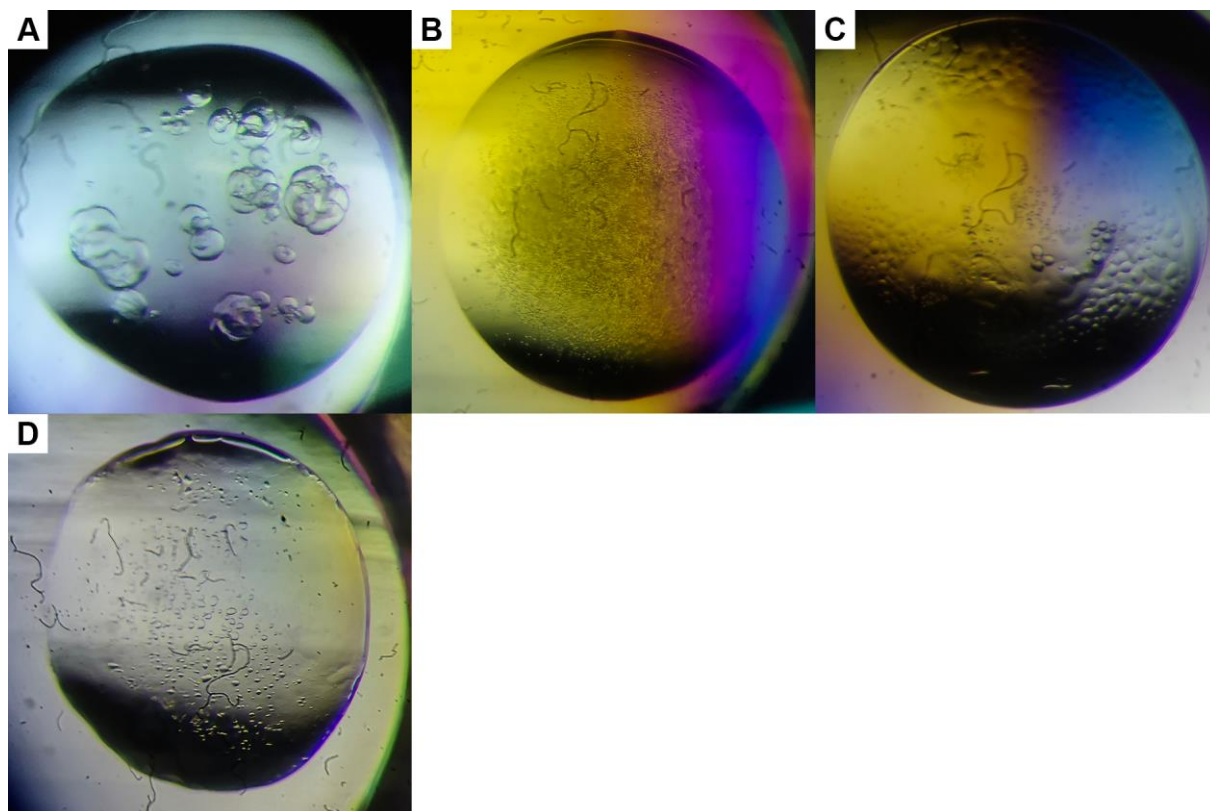
**Rys. S17** Próby krystalizacji hN1 w nieobecności jonów Zn(II)

Mikrofotografie wybranych dołków podczas prób krystalizacji hN1 metodą siedzącej kropli w nieobecności jonów Zn(II). Próbkę wykonano przy użyciu odczynników z zestawu Hampton Crystal Screen2 o nr: (A) 1; (B) 5; (C) 9; (D) 10; (E) 13; (F) 23; (G) 26; (H) 27; (I) 28; (J) 32; (K) 34; (L) 35.



**Rys. S18** Próby krystalizacji hN1 w nieobecności jonów Zn(II)

Mikrofotografie wybranych dołków podczas prób krystalizacji hN1 metodą siedzącej kropli w obecności 500  $\mu\text{M}$  jonów Zn(II). Próbkę wykonano przy użyciu odczynników z zestawu Hampton Crystal Screen2 o nr: (A) 1; (B) 5; (C) 9; (D) 10; (E) 13; (F) 23; (G) 26; (H) 27; (I) 28; (J) 32; (K) 34; (L) 35.



**Rys. S19** Próby krystalizacji hN1/2

Próby krystalizacyjne prowadzono we współpracy z Małopolskim Centrum Biotechnologii. Panele (A)-(D) przedstawiają najbardziej obiecujące warunki w kontekście dalszej optymalizacji.

# Spis rysunków i tabel



## SPIS RYSUNKÓW

<i>Rys. 1.1 Stany konformacyjne białek</i>	6
<i>Rys. 1.2 Podział IDPs ze względu na funkcję.</i>	7
<i>Rys. 1.3 Zachowanie w toku ewolucji sekwencji Nukleobindyn</i>	11
<i>Rys. 1.4 Struktura krystaliczna regionu wiążącego jony Ca(II) hNucb1</i>	15
<i>Rys. 1.5 Dystrybucja Nucb1 w CUN</i>	18
<i>Rys. 1.6 Oddziaływanie Nucb1 z białkami G</i>	19
<i>Rys. 1.7 Wpływ NLP na poziom wybranych hormonów</i>	21
<i>Rys. 1.8 Dystrybucja Nucb2/N1 w CUN</i>	23
<i>Rys. 1.9 Subkomórkowa dystrybucja Nucb1/NLP i Nucb2/N1</i>	24
<i>Rys. 1.10 Dystrybucja i działanie Nucb2/N1</i>	25
<i>Rys. 1.11 Anoreksygenne działanie N1 oraz LEP</i>	27
<i>Rys. 1.12 Regulacja odpowiedzi na stres</i>	30
<i>Rys. 1.13 Model struktury krystalicznej Nucb2 wygenerowany przez AlphaFold</i>	33
<i>Rys. 1.14 Wpływ jonów metali dwuwartościowych na hNucb2 i gNucb2</i>	37
<i>Rys. 1.15 Wpływ jonów metali dwuwartościowych na hN3 oraz gN3</i>	39
<i>Rys. 3.1 Mapa wektora pQE-80L-HRV3C</i>	45
<i>Rys. 3.2 Standardy DNA i białkowe</i>	48
<i>Rys. 4.1 Analiza elektroforetyczna produktów PCR i trawienia insertów</i>	65
<i>Rys. 4.2 Analiza elektroforetyczna produktów PCR kolonijnej</i>	66
<i>Rys. 4.3 Oczyszczanie hN1</i>	68
<i>Rys. 4.4 Oczyszczanie gN1</i>	69
<i>Rys. 4.5 Oczyszczanie hN2</i>	71
<i>Rys. 4.6 Oczyszczanie hN1/2</i>	72
<i>Rys. 4.7 Oczyszczanie gN1/2</i>	73
<i>Rys. 4.8 Identyfikacja ludzkich nesfatyn techniką Western-blot</i>	74
<i>Rys. 4.9 Widma masowe nesfatyn</i>	75
<i>Rys. 4.10 Przewidywania IDRs ludzkich nesfatyn</i>	77



Rys. 4.11 Przewidywania IDRs kurzych nesfatyn	79
Rys. 4.12 Modele strukturalne apo-hN1	80
Rys. 4.13 Modele strukturalne holo-hN1	81
Rys. 4.14 Modele strukturalne hN2	82
Rys. 4.15 Model struktury trzeciorzędowej hN1/2	84
Rys. 4.16 Modele struktury trzeciorzędowej kurzych nesfatyn	85
Rys. 4.17 Widma CD ludzkich nesfatyn	87
Rys. 4.18 Widma CD kurzych nesfatyn	88
Rys. 4.19 Widma CD ludzkich nesfatyn w obecności jonów Zn(II)	89
Rys. 4.20 Widma CD kurzych nesfatyn w obecności jonów Zn(II)	91
Rys. 4.21 Profile topnienia ludzkich nesfatyn	92
Rys. 4.22 Profile topnienia kurzych nesfatyn	94
Rys. 4.23 SV-AUC ludzkich nesfatyn w obecności jonów Zn(II)	95
Rys. 4.24 SV-AUC mieszaniny hN1 i hN2	97
Rys. 4.25 SV-AUC gN1 i gN1/2 w obecności jonów Zn(II)	99
Rys. 4.26 Analiza SDS-PAGE ograniczonej proteolizy hN1 i hN1/2	101
Rys. 4.27 Analiza SDS-PAGE ograniczonej proteolizy kurzych nesfatyn	102
Rys. 4.28 Wyniki ITC ludzkich nesfatyn	105
Rys. 4.29 Konkurencyjne miareczkowanie chromoforu ZI	107
Rys. 4.30 Emisja ANS przy 468 nm w obecności ludzkich nesfatyn	108
Rys. 4.31 Kinetyczne pomiary agregacji gN1 w obecności ThT	111
Rys. 4.32 Emisja ThT przy 483 nm w obecności homologów holo-N1	112
Rys. 4.33 Analiza HDX-MS ludzkich nesfatyn	113
Rys. 4.34 Analiza HDX-MS kurzych nesfatyn	114
Rys. S1 Optymalizacja zawartości imidazolu podczas oczyszczania hN1	137
Rys. S2 Profile elucji hN1 i hN1/2 podczas SEC	137
Rys. S3 Wykres podwójnych MRE	138
Rys. S4 Widma CD nesfatyn w obecności jonów Ca(II)	138
Rys. S5 SV-AUC ludzkich nesfatyn w obecności jonów Ca(II)	139
Rys. S6 SV-AUC hN1 w obecności 300 $\mu$ M Zn(II)	139
Rys. S7 Widma emisyjne ANS w obecności nesfatyn	140
Rys. S8 Analiza SDS-PAGE produktów proteolizy hNucb2 z udziałem trypsyny	141
Rys. S9 Analiza SDS-PAGE produktów proteolizy gN1 z udziałem trypsyny	141
Rys. S10 Widma emisyjne ThT w obecności ludzkich i kurzych homologów nesfatyn	142
Rys. S11 Mapa pokrycia sekwencji aa. hN1	143
Rys. S12 Mapa pokrycia sekwencji aa. hN1/2	143
Rys. S13 Mapa pokrycia sekwencji aa. gN1	143
Rys. S14 Mapa pokrycia sekwencji aa. gN1/2	144
Rys. S15 Profil HDX-MS ludzkich nesfatyn w (nie)obecności jonów Zn(II)	145

<i>Rys. S16 Profil HDX-MS kurzych nesfatyn w (nie)obecności jonów Zn(II).....</i>	<i>146</i>
<i>Rys. S17 Próby krystalizacji hN1 w nieobecności jonów Zn(II).....</i>	<i>147</i>
<i>Rys. S18 Próby krystalizacji hN1 w nieobecności jonów Zn(II).....</i>	<i>148</i>
<i>Rys. S19 Próby krystalizacji hN1/2.....</i>	<i>149</i>



<i>Tab. 1.1 Profil PTMs paralogów Nukleobindyn _____</i>	<i>17</i>
<i>Tab. 1.2 Parametry hydrodynamiczne ludzkich i kurzych homologów Nucb2 oraz N3 _____</i>	<i>35</i>
<i>Tab. 1.3 Termodynamiczne parametry wiązania jonów metali dwuwartościowych przez hNucb2 i gNucb2 ____</i>	<i>36</i>
<i>Tab. 3.1 Wykaz odczynników używanych w pracy _____</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 3.2 Oligonukleotydy wykorzystywane podczas realizacji badań. _____</i>	<i>44</i>
<i>Tab. 3.3 Szczepy bakteryjne _____</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 3.4 Skład żeli akryloamidowych _____</i>	<i>47</i>
<i>Tab. 3.5 Wykaz metod standardowych stosowanych podczas realizacji badań _____</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 3.6 Program PCR dla amplifikacji ludzkich nesfatyn _____</i>	<i>50</i>
<i>Tab. 3.7 Warunki kolonijnej PCR _____</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 3.8 Parametry fizykochemiczne nesfatyn _____</i>	<i>54</i>
<i>Tab. 4.1 Wyniki dekonwolucji widm CD ludzkich i kurzych nesfatyn. _____</i>	<i>87</i>
<i>Tab. 4.2 Zmiany struktury drugorzędowej ludzkich i kurzych homologów N1 w obecności jonów Zn(II) _____</i>	<i>90</i>
<i>Tab. 4.3 Stabilność temperaturowa ludzkich i kurzych homologów nesfatyn w obecności jonów Zn(II) _____</i>	<i>93</i>
<i>Tab. 4.4 Parametry hydrodynamiczne ludzkich nesfatyn _____</i>	<i>96</i>
<i>Tab. 4.5 Parametry hydrodynamiczne kurzych nesfatyn _____</i>	<i>100</i>
<i>Tab. 4.6 Parametry termodynamiczne wiązania jonów Zn(II) przez hN1 i hN1/2 _____</i>	<i>106</i>
<i>Tab. S1 Parametry hydrodynamiczne ludzkich i kurzych homologów nesfatyn _____</i>	<i>140</i>

# Dorobek naukowy i pozanaukowy



## PUBLIKACJE I KONFERENCJE NAUKOWE

### Publikacje:

1. Lenda R, Żukowa L, Ożyhar A, Bystranowska D. Deciphering the dual nature of nesfatin-1: a tale of zinc ion's Janus-faced influence. W trakcie korekty po recenzji czasopisma.
2. Lenda R, Padjasek M, Krężel A, Ożyhar A, Bystranowska D. Does one plus one always equal two? Structural differences between nesfatin-1, -2, and nesfatin-1/2. *Cell Communication and Signaling*. **2022**. vol. 20, art. 163, s. 1-19. doi:10.1186/s12964-022-00980-7.
3. Skorupska A, Lenda R, Ożyhar A, Bystranowska D. The multifaceted nature of nucleobindin-2 in carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. **2021**. vol. 22, nr 11, art. 5687, s. 1-15. doi: 10.3390/ijms22115687.

### Konferencje:

1. Lenda R, Padjasek M, Ożyhar A, Bystranowska D. Human nesfatin-1 is a Zn(II)-binding intrinsically disordered peptide hormone. *Intrinsically Disordered Protein*. **2022**. Les Diableretes, Szwajcaria.
2. Lenda R, Ożyhar A, Bystranowska D. Conformational changes of nesfatin-1 in the presence of Zn(II) ions. Lubljana, Słowenia. *FEBS Open Bio*. **2021**, vol. 11, suppl. 1, s. 195-196.
3. Lenda R, Bystranowska D. Wpływ jonów Zn(II) na strukturę drugorzędową ludzkiej nesfatyny-1. XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2021. Lublin, Polska. "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju" : abstrakty / red. Izabela Mołdoch-Mendoń, Kamil Maciąg. Lublin: Fundacja na rzecz Promocji Nauki i Rozwoju TYGIEL, **2021**. s. 282-282.

4. Lenda R, Bystranowska D. Preparation of nesfatin-1 - a novel multifunctional hormone peptide. W: 4th International Wroclaw Scientific Meetings : Wroclaw, 09-10 October 2020 / eds. Julita Kulbacka, Nina Rembiałkowska, Joanna Weźgowiec. Lublin : Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, **2020**. s. 161-163.



#### **INNE OSIĄGNIĘCIA/AKTYWNOŚĆ**

1. Współorganizator oraz gospodarz pierwszej edycji konferencji Chemisty & Biotechnologii International Conference ChemBiotIC.
2. Członek Polskiego Towarzystwa Biochemicznego.
3. Przygotowanie i zaprojektowanie makiety strony internetowej dla laboratorium.

# Literatura

1. Wilz A-MM, Wernecke K, et al. Endogenous NUCB2/Nesfatin-1 Regulates Energy Homeostasis Under Physiological Conditions in Male Rats. *Hormone and Metabolic Research* 2020; **52**(09):676–684. doi:10.1055/a-1196-2059.
2. Merali Z, Cayer C, et al. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology* 2008; **201**(1):115–123. doi:10.1007/s00213-008-1252-2.
3. Liu G-MM, Xu Z-QQ, et al. Nesfatin-1/Nucleobindin-2 Is a Potent Prognostic Marker and Enhances Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Bladder Cancer. *Disease Markers* 2018; **2018**:1–9. doi:10.1155/2018/4272064.
4. Zeng L, Zhong J, et al. Identification of Nucleobindin-2 as a Potential Biomarker for Breast Cancer Metastasis Using iTRAQ-based Quantitative Proteomic Analysis. *Journal of Cancer* 2017; **8**(15):3062–3069. doi:10.7150/jca.19619.
5. Weibert E, Hofmann T, et al. Role of nesfatin-1 in anxiety, depression and the response to stress. *Psychoneuroendocrinology* 2019; **100**(September 2018):58–66. doi:10.1016/j.psyneuen.2018.09.037.
6. Aydin S, Dag E, et al. Nesfatin-1 and ghrelin levels in serum and saliva of epileptic patients: Hormonal changes can have a major effect on seizure disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2009; **328**(1–2):49–56. doi:10.1007/s11010-009-0073-x.
7. Yosten GLC, Samson WK. The anorexigenic and hypertensive effects of nesfatin-1 are reversed by pretreatment with an oxytocin receptor antagonist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; **298**:1642–1647. doi:10.1152/ajpregu.00804.2009.
8. Wang Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. *Cells* 2021; **10**(12):3327. doi:10.3390/cells10123327.
9. Basson MA. Signaling in Cell Differentiation and Morphogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012; **4**(6):a008151–a008151. doi:10.1101/cshperspect.a008151.
10. Cui L, Li H, et al. Vesicle trafficking and vesicle fusion: mechanisms, biological functions, and their implications for potential disease therapy. *Molecular Biomedicine* 2022; **3**(1):29. doi:10.1186/s43556-022-00090-3.
11. Devreotes P, Horwitz AR. Signaling Networks that Regulate Cell Migration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2015; **7**(8):a005959. doi:10.1101/cshperspect.a005959.
12. Strasser A, O'Connor L, et al. Apoptosis Signaling. *Annual Review of Biochemistry* 2000; **69**(1):217–245. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.217.
13. Esbenshade TA, Duzic E. Overview of Signal Transduction. *Current Protocols in Pharmacology* 2005; **31**(1):1–20. doi:10.1002/0471141755.ph0201s31.
14. Cooper GM. Signaling Molecules and Their Receptors. In: *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed. Sinauer Associates; 2000.
15. Bradshaw RA, Dennis EA. Cell Signaling: Yesterday, Today, and Tomorrow. In: *Handbook of Cell Signaling*, vol 1, Second Edi. Elsevier; 2010:1–4.
16. Oh-I S, Shimizu H, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 2006; **443**(7112):709–712. doi:10.1038/nature05162.
17. Fischer E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1894; **27**(3):2985–2993. doi:10.1002/CBER.18940270364.
18. Mirsky AE, Pauling L. On the Structure of Native, Denatured, and Coagulated Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1936; **22**(7):439–447. doi:10.1073/PNAS.22.7.439.
19. Uversky VN, Gillespie JR, et al. Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 2000; **41**(3):415–427. doi:10.1002/1097-0134(20001115)41:3<415::AID-PROT130>3.0.CO;2-7.
20. Uversky VN. *Functional roles of transiently and intrinsically disordered regions within proteins*. John Wiley & Sons, Ltd; 2015:1182–1189.
21. Dunker AK, Obradovic Z, et al. Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome informatics. Workshop on Genome Informatics* 2000; **11**:161–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700597> Accessed.
22. Dunker AK, Lawson JD, et al. Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 2001; **19**(1):26–59. doi:10.1016/S1093-3263(00)00138-8.
23. Ayyadevara S, Ganne A, et al. Intrinsically disordered proteins identified in the aggregate proteome serve as biomarkers of neurodegeneration. *Metabolic Brain Disease* 2022; **37**(1):147–152. doi:10.1007/s11011-021-00791-8.

24. van der Lee R, Buljan M, et al. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chemical Reviews* 2014; **114**(13):6589–6631. doi:10.1021/cr400525m.
25. Kim PS, Baldwin RL. INTERMEDIATES IN THE FOLDING REACTIONS OF SMALL PROTEINS. *Annual Review of Biochemistry* 1990; **59**(1):631–660. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.003215.
26. Trivedi R, Nagarajaram HA. Intrinsically Disordered Proteins: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; **23**(22):14050. doi:10.3390/ijms232214050.
27. Ward JJ, Sodhi JS, et al. Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *Journal of Molecular Biology* 2004; **337**(3):635–645. doi:10.1016/j.jmb.2004.02.002.
28. Uversky VN. Intrinsically Disordered Proteins and Their “Mysterious” (Meta)Physics. *Frontiers in Physics* 2019; **7**(FEB):8–23. doi:10.3389/fphy.2019.00010.
29. van der Lee R, Lang B, et al. Intrinsically Disordered Segments Affect Protein Half-Life in the Cell and during Evolution. *Cell Reports* 2014; **8**(6):1832–1844. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.055.
30. Kelly S, Price N. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein & Peptide Science* 2005; **1**(4):349–384. doi:10.2174/1389203003381315.
31. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols* 2006; **1**(6):2876–2890. doi:10.1038/nprot.2006.202.
32. Uversky VN. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Science* 2002; **11**(4):739–756. doi:10.1110/ps.4210102.
33. Vinciauskaite V, Masson GR. Fundamentals of HDX-MS. *Essays in Biochemistry* 2022; **0**(August):1–14. doi:10.1042/EBC20220111.
34. Bernadó P, Mylonas E, et al. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. *Journal of the American Chemical Society* 2007; **129**(17):5656–5664. doi:10.1021/ja069124n.
35. Leung AK-W, Ramesh N, et al. Nucleobindins and encoded peptides: From cell signaling to physiology. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, vol 116, 1st ed. Elsevier Inc.; 2019:91–133.
36. Lin P, Le-Niculescu H, et al. The Mammalian Calcium-binding Protein, Nucleobindin (CALNUC), Is a Golgi Resident Protein. *Journal of Cell Biology* 1998; **141**(7):1515–1527. doi:10.1083/jcb.141.7.1515.
37. Yoshiyuki Kanai, Sei-ichi Tanuma. Purification of a novel B cell growth and differentiation factor associated with lupus syndrome. *Immunology Letters* 1992; **32**(1):43–48. doi:10.1016/0165-2478(92)90197-V.
38. Barnikol-Watanabe S, Groß NA, et al. Human Protein NEFA, a Novel DNA Binding / EF-Hand / Leucine Zipper Protein. Molecular Cloning and Sequence Analysis of the cDNA, Isolation and Characterization of the Protein. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 1994; **375**(8):497–512. doi:10.1515/bchm3.1994.375.8.497.
39. Miura K, Titani K, et al. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1992; **187**(1):375–380. doi:10.1016/S0006-291X(05)81503-7.
40. Miura K, Kurosawa Y, et al. Calcium-Binding Activity of Nucleobindin Mediated by an EF Hand Moiety. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1994; **199**(3):1388–1393. doi:10.1006/bbrc.1994.1384.
41. Skorupska A, Bystranowska D, et al. Calcium ions modulate the structure of the intrinsically disordered Nucleobindin-2 protein. *International Journal of Biological Macromolecules* 2020; **154**:1091–1104. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.110.
42. Tsukumo Y, Tsukahara S, et al. A novel endoplasmic reticulum export signal: proline at the +2-position from the signal peptide cleavage site. *The Journal of biological chemistry* 2009; **284**(40):27500–10. doi:10.1074/jbc.M109.021592.
43. Nesselhut J, Jurgan U, et al. Golgi retention of human protein NEFA is mediated by its N-terminal Leu/Ile-rich region. *FEBS Letters* 2001; **509**(3):469–475. doi:10.1016/S0014-5793(01)03187-8.
44. Lavoie C, Meerloo T, et al. Calnuc, an EF-Hand Ca<sup>2+</sup>-Binding Protein, Is Stored and Processed in the Golgi and Secreted by the Constitutive-Like Pathway in AtT20 Cells. *Molecular Endocrinology* 2002; **16**(11):2462–2474. doi:10.1210/me.2002-0079.
45. Liu Q-J, Lv J-X, et al. Nucleobindin-2 Promotes the Growth and Invasion of Glioblastoma. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 2019; **34**(9):581–588. doi:10.1089/cbr.2019.2829.
46. Bystranowska D, Skorupska A, et al. Nucleobindin-2 consists of two structural components: The Zn<sup>2+</sup>-sensitive N-terminal half, consisting of nesfatin-1 and -2, and the Ca<sup>2+</sup>-sensitive C-terminal half, consisting of nesfatin-3. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2021; **19**:4300–4318. doi:10.1016/j.csbj.2021.07.036.
47. Kanuru M, Raman R, et al. Serine Protease Activity of Calnuc. *Journal of Biological Chemistry* 2013; **288**(3):1762–1773. doi:10.1074/jbc.M112.382846.
48. Sinha S, Pattnaik S, et al. Molecular evolution guided functional analyses reveals Nucleobindin-1 as a canonical E-box binding protein promoting Epithelial-to-Mesenchymal transition (EMT). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2019; **1867**(9):765–775. doi:10.1016/j.bbapap.2019.05.009.
49. Valencia CA, Cotten SW, et al. Modulation of nucleobindin-1 and nucleobindin-2 by caspases. *FEBS Letters* 2008; **582**(2):286–290. doi:10.1016/j.febslet.2007.12.019.
50. McPhalen CA, Strynadka NCJ, et al. Calcium-Binding Sites in Proteins: A Structural Perspective. In: *Advances in Protein Chemistry*, vol 42; 1991:77–144.

51. Nelson MR, Chazin WJ. Structures of EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca<sup>2+</sup> binding. *Biomaterials: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 1998; **11**(4):297–318. doi:10.1023/a:1009253808876.
52. Kapoor N, Gupta R, et al. Nucleobindin 1 Is a Calcium-regulated Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor of G $\alpha$ i1. *Journal of Biological Chemistry* 2010; **285**(41):31647–31660. doi:10.1074/jbc.M110.148429.
53. Christova P, Cox JA, et al. Ion-induced conformational and stability changes in Nereis sarcoplasmic calcium binding protein: Evidence that the APO state is a molten globule. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 2000; **40**(2):177–184. doi:10.1002/(SICI)1097-0134(20000801)40:2<177::AID-PROT10>3.0.CO;2-T.
54. Gifford JL, Walsh MP, et al. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix–loop–helix EF-hand motifs. *Biochemical Journal* 2007; **405**(2):199–221. doi:10.1042/BJ20070255.
55. de Alba E, Tjandra N. Structural Studies on the Ca<sup>2+</sup>-binding Domain of Human Nucleobindin (Calnuc). *Biochemistry* 2004; **43**(31):10039–10049. doi:10.1021/bi049310a.
56. Vignesh R, Aradhyam GK. A Change in Domain Cooperativity Drives the Function of Calnuc. *Biochemistry* 2020; **59**(27):2507–2517. doi:10.1021/acs.biochem.0c00207.
57. Garcia-Marcos M, Ghosh P, et al. GIV/Girdin transmits signals from multiple receptors by triggering trimeric G protein activation. *The Journal of biological chemistry* 2015; **290**(11):6697–6704. doi:10.1074/jbc.R114.613414.
58. Jindrich K, Degnan BM. The diversification of the basic leucine zipper family in eukaryotes correlates with the evolution of multicellularity. *BMC Evolutionary Biology* 2016; **16**(1):28. doi:10.1186/s12862-016-0598-z.
59. Glover JNM, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos–c-Jun bound to DNA. *Nature* 1995; **373**(6511):257–261. doi:10.1038/373257a0.
60. Skorupska-Stasiak A, Bystranowska D, et al. Nesfatin-3 possesses divalent metal ion binding properties, which remain hidden in the nucleobindin-2 precursor protein. *Cell Communication and Signaling* 2023; **21**(1):165. doi:10.1186/s12964-023-01181-6.
61. Ramazi S, Allahverdi A, et al. Evaluation of post-translational modifications in histone proteins: A review on histone modification defects in developmental and neurological disorders. *Journal of Biosciences* 2020; **45**(1):135. doi:10.1007/s12038-020-00099-2.
62. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology* 2003; **21**(3):255–261. doi:10.1038/nbt0303-255.
63. Hornbeck P V., Zhang B, et al. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Research* 2015; **43**(D1):D512–D520. doi:10.1093/nar/gku1267.
64. Aradhyam GK, Balivada LM, et al. Calnuc: Emerging roles in calcium signaling and human diseases. *IUBMB Life* 2010; **62**(6):436–446. doi:10.1002/iub.341.
65. Tulke S, Williams P, et al. Nucleobindin 1 (NUCB1) is a Golgi-resident marker of neurons. *Neuroscience* 2016; **314**:179–188. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.11.062.
66. Williams P, Tulke S, et al. Expression of nucleobindin 1 (NUCB1) in pancreatic islets and other endocrine tissues. *Cell and Tissue Research* 2014; **358**(2):331–342. doi:10.1007/s00441-014-1948-z.
67. Garcia-Marcos M, Kietsunthorn PS, et al. G Protein Binding Sites on Calnuc (Nucleobindin 1) and NUCB2 (Nucleobindin 2) Define a New Class of G $\alpha$ i-regulatory Motifs. *Journal of Biological Chemistry* 2011; **286**(32):28138–28149. doi:10.1074/jbc.M110.204099.
68. Tsukumo Y, Tomida A, et al. Nucleobindin 1 Controls the Unfolded Protein Response by Inhibiting ATF6 Activation. *Journal of Biological Chemistry* 2007; **282**(40):29264–29272. doi:10.1074/jbc.M705038200.
69. Petersson U, Somogyi E, et al. Nucleobindin is produced by bone cells and secreted into the osteoid, with a potential role as a modulator of matrix maturation. *Bone* 2004; **34**(6):949–960. doi:10.1016/j.bone.2004.01.019.
70. Vignesh R, Sjölander A, et al. Aberrant environment and PS-binding to calnuc C-terminal tail drives exosomal packaging and its metastatic ability. *Biochemical Journal* 2021; **478**(12):2265–2283. doi:10.1042/BCJ20210016.
71. Rosenbaum DM, Rasmussen SGF, et al. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009; **459**(7245):356–363. doi:10.1038/nature08144.
72. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; **9**(1):60–71. doi:10.1038/nrm2299.
73. McCudden CR, Hains MD, et al. G-protein signaling: back to the future. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; **62**(5):551–577. doi:10.1007/s00018-004-4462-3.
74. Lin P, Fischer T, et al. Calnuc, an EF-Hand Ca<sup>2+</sup> binding protein, specifically interacts with the C-terminal  $\alpha$ 5-helix of G $\alpha$ i3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000; **97**(2):674–679. doi:10.1073/pnas.97.2.674.
75. Lin P, Fischer T, et al. Calnuc plays a role in dynamic distribution of G $\alpha$ i but not G $\beta$  subunits and modulates ACTH secretion in AtT-20 neuroendocrine secretory cells. *Molecular Neurodegeneration* 2009; **4**(1):15. doi:10.1186/1750-1326-4-15.
76. Gawli K, Ramesh N, et al. Nesfatin-1-like peptide is a novel metabolic factor that suppresses feeding, and regulates whole-body energy homeostasis in male Wistar rats. *PLoS ONE* 2017; **12**(5):1–15. doi:10.1371/journal.pone.0178329.
77. Sundarajan L, Blanco AM, et al. Nesfatin-1-Like Peptide Encoded in Nucleobindin-1 in Goldfish is a Novel Anorexigen Modulated by Sex Steroids, Macronutrients and Daily Rhythm. *Scientific Reports* 2016; **6**(1):28377. doi:10.1038/srep28377.
78. Nasri A, Unniappan S. Nucleobindin-derived nesfatin-1 and nesfatin-1-like peptide stimulate pro-opiomelanocortin synthesis in murine AtT-20 corticotrophs through the cAMP/PKA/CREB signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2021;

- 536(March):111401. doi:10.1016/j.mce.2021.111401.
79. Day R. Proopiomelanocortin. In: *Encyclopedia of Neuroscience*; 2009:1139–1141.
  80. Mohan H, Gasner M, et al. Ghrelin, ghrelin-*O*-acyl transferase, nucleobindin-2/nesfatin-1 and prohormone convertases in the pancreatic islets of Sprague Dawley rats during development. *Journal of molecular histology* 2016; **47**(3):325–36. doi:10.1007/s10735-016-9673-4.
  81. Sundarajan L, Jayakumar Rajeswari J, et al. Nesfatin-1-like peptide is a negative regulator of cardiovascular functions in zebrafish and goldfish. *General and Comparative Endocrinology* 2021; **313**(March):113892. doi:10.1016/j.ygcen.2021.113892.
  82. Ramesh N, Mohan H, et al. Nucleobindin-1 encodes a nesfatin-1-like peptide that stimulates insulin secretion. *General and Comparative Endocrinology* 2015; **216**:182–189. doi:10.1016/j.ygcen.2015.04.011.
  83. Caldwell GM, Eddy RL, et al. Mapping of genes and transcribed sequences in a gene rich 400-kb region on human chromosome 11p15.1→p14. *Cytogenetic and Genome Research* 2001; **92**(1–2):103–107. doi:10.1159/000056877.
  84. Goebel M, Stengel A, et al. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neuroscience Letters* 2009; **452**(3):241–246. doi:10.1016/j.neulet.2009.01.064.
  85. Goebel-Stengel M, Wang L, et al. Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Research* 2011; **1396**:20–34. doi:10.1016/j.brainres.2011.04.031.
  86. Ludwig M. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *Journal of neuroendocrinology* 1998; **10**(12):881–95. doi:10.1046/j.1365-2826.1998.00279.x.
  87. Landgraf R, Neumann ID. Vasopressin and oxytocin release within the brain: A dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2004; **25**(3–4):150–176. doi:10.1016/j.yfrne.2004.05.001.
  88. Ludwig M, Leng G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; **7**(2):126–136. doi:10.1038/nrn1845.
  89. Pan W, Hsueh H, et al. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides* 2007; **28**(11):2223–2228. doi:10.1016/j.peptides.2007.09.005.
  90. Ramanjaneya M, Chen J, et al. Identification of Nesfatin-1 in Human and Murine Adipose Tissue: A Novel Depot-Specific Adipokine with Increased Levels in Obesity. *Endocrinology* 2010; **151**(7):3169–3180. doi:10.1210/en.2009-1358.
  91. Stengel A, Goebel M, et al. Identification and Characterization of Nesfatin-1 Immunoreactivity in Endocrine Cell Types of the Rat Gastric Oxyntic Mucosa. *Endocrinology* 2009; **150**(1):232–238. doi:10.1210/en.2008-0747.
  92. Kim J, Chung Y, et al. The tissue distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in mouse. *Dev Reprod* 2014; **18**(4):301–309. doi:10.12717/dr.2014.18.4.301.
  93. Zhang A-Q. Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World Journal of Gastroenterology* 2010; **16**(14):1735. doi:10.3748/wjg.v16.i14.1735.
  94. Zhang Y, Song D, et al. Importance of functional monomer dimerization in the molecular imprinting process. *Macromolecules* 2010; **43**(15):6284–6294. doi:10.1021/ma101013c.
  95. Morton KA, Hargreaves L, et al. Tissue-specific expression and circulating concentrations of nesfatin-1 in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology* 2018; **65**:56–66. doi:10.1016/j.domaniend.2018.04.006.
  96. Liu F, Xie Q, et al. Effects of NUCB2/nesfatin-1 on lipid metabolism in the hepatopancreas of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture Reports* 2023; **30**(May):101610. doi:10.1016/j.aqrep.2023.101610.
  97. Gonzalez R, Kerbel B, et al. Molecular, Cellular and Physiological Evidences for the Anorexigenic Actions of Nesfatin-1 in Goldfish. Roberts RG, ed. *PLoS ONE* 2010; **5**(12):e15201. doi:10.1371/journal.pone.0015201.
  98. Goebel M, Stengel A, et al. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides* 2011; **32**(1):36–43. doi:10.1016/j.peptides.2010.09.027.
  99. Nakata M, Manaka K, et al. Nesfatin-1 enhances glucose-induced insulin secretion by promoting Ca<sup>2+</sup> influx through L-type channels in mouse islet β-cells. *Endocrine Journal* 2011; **58**(4):305–313. doi:10.1507/endocrj.K11E-056.
  100. Vas S, Ádori C, et al. Nesfatin-1/NUCB2 as a Potential New Element of Sleep Regulation in Rats. Fisone G, ed. *PLoS ONE* 2013; **8**(4):e59809. doi:10.1371/journal.pone.0059809.
  101. Yamawaki H, Takahashi M, et al. A novel adipocytokine, nesfatin-1 modulates peripheral arterial contractility and blood pressure in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; **418**(4):676–681. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.076.
  102. Angelone T, Filice E, et al. Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2013; **70**(3):495–509. doi:10.1007/s00018-012-1138-7.
  103. Scotece M, Conde J, et al. NUCB2/nesfatin-1: A new adipokine expressed in human and murine chondrocytes with pro-inflammatory properties, an in vitro study. *Journal of Orthopaedic Research* 2014; **32**(5):653–660. doi:10.1002/jor.22585.
  104. Könczöl K, Pintér O, et al. Nesfatin-1 exerts long-term effect on food intake and body temperature. *International Journal of Obesity* 2012; **36**(12):1514–1521. doi:10.1038/ijo.2012.2.
  105. Garcia-Galiano D, Navarro VM, et al. The Anorexigenic Neuropeptide, Nesfatin-1, Is Indispensable for Normal Puberty Onset in the Female Rat. *Journal of Neuroscience* 2010; **30**(23):7783–7792. doi:10.1523/JNEUROSCI.5828-09.2010.
  106. García-Galiano D, Pineda R, et al. Cellular Distribution, Regulated Expression, and Functional Role of the Anorexigenic Peptide, NUCB2/Nesfatin-1, in the Testis. *Endocrinology* 2012; **153**(4):1959–1971. doi:10.1210/en.2011-2032.



107. Kalra SP, Kalra PS. Hypothalamic Regulation of Appetite and Obesity. In: *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Elsevier; 2004:699–706.
108. Kalra SP, Kalra PS. Neuroendocrine Control of Energy Homeostasis: Update on New Insights. In: *Progress in Brain Research*, vol 181, First edit. Elsevier; 2010:17–33.
109. Zhang Y, Proenca R, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; **372**(6505):425–432. doi:10.1038/372425a0.
110. Mandrup S, Loftus TM, et al. Obese gene expression at in vivo levels by fat pads derived from s.c. implanted 3T3-F442A preadipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; **94**(9):4300–5. doi:10.1073/pnas.94.9.4300.
111. Russell CD, Petersen RN, et al. Leptin expression in adipose tissue from obese humans: depot-specific regulation by insulin and dexamethasone. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 1998; **275**(3):E507–E515. doi:10.1152/ajpendo.1998.275.3.E507.
112. Zhang Y, Olbort M, et al. The Leptin Receptor Mediates Apparent Autocrine Regulation of Leptin Gene Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; **240**(2):492–495. doi:10.1006/bbrc.1997.7622.
113. Boden G, Chen X, et al. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1996; **81**(9):3419–23. doi:10.1210/jcem.81.9.8784108.
114. Banks WA, Kastin AJ, et al. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 1996; **17**(2):305–11. doi:10.1016/0196-9781(96)00025-3.
115. Cowley MA, Smart JL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001; **411**(6836):480–484. doi:10.1038/35078085.
116. Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2009; **297**(6):E1247–E1259. doi:10.1152/ajpendo.00274.2009.
117. Baumann H, Morella KK, et al. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; **93**(16):8374–8. doi:10.1073/pnas.93.16.8374.
118. Banks AS, Davis SM, et al. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *The Journal of biological chemistry* 2000; **275**(19):14563–72. doi:10.1074/jbc.275.19.14563.
119. Rahmouni K, Sigmund CD, et al. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* 2009; **58**(3):536–42. doi:10.2337/db08-0822.
120. Bjorbak C, Lavery HJ, et al. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *The Journal of biological chemistry* 2000; **275**(51):40649–57. doi:10.1074/jbc.M007577200.
121. Niswender KD, Morton GJ, et al. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 2001; **413**(6858):794–5. doi:10.1038/35101657.
122. Duan C, Li M, et al. SH2-B promotes insulin receptor substrate 1 (IRS1)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin. *The Journal of biological chemistry* 2004; **279**(42):43684–91. doi:10.1074/jbc.M408495200.
123. Powley TL, Phillips RJ. Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive. *Physiology & Behavior* 2004; **82**(1):69–74. doi:10.1016/j.physbeh.2004.04.037.
124. Brailoiu GC, Dun SL, et al. Nesfatin-1: Distribution and Interaction with a G Protein-Coupled Receptor in the Rat Brain. *Endocrinology* 2007; **148**(10):5088–5094. doi:10.1210/en.2007-0701.
125. Shimizu H, Oh-I S, et al. Peripheral Administration of Nesfatin-1 Reduces Food Intake in Mice: The Leptin-Independent Mechanism. *Endocrinology* 2009; **150**(2):662–671. doi:10.1210/en.2008-0598.
126. Price CJ, Samson WK, et al. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Research* 2008; **1230**:99–106. doi:10.1016/j.brainres.2008.06.084.
127. Lin Y-F, Jan YN, et al. Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. *The EMBO Journal* 2000; **19**(5):942–955. doi:10.1093/emboj/19.5.942.
128. Yosten GLC, Samson WK. Nesfatin-1 exerts cardiovascular actions in brain: possible interaction with the central melanocortin system. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2009; **297**(2):R330–R336. doi:10.1152/ajpregu.90867.2008.
129. Stengel A, Goebel M, et al. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: Differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology* 2009; **150**(11):4911–4919. doi:10.1210/en.2009-0578.
130. Maejima Y, Sedbazar U, et al. Nesfatin-1-Regulated Oxytocinergic Signaling in the Paraventricular Nucleus Causes Anorexia through a Leptin-Independent Melanocortin Pathway. *Cell Metabolism* 2009; **10**(5):355–365. doi:10.1016/j.cmet.2009.09.002.
131. Darambazar G, Nakata M, et al. Paraventricular NUCB2/nesfatin-1 is directly targeted by leptin and mediates its anorexigenic effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; **456**(4):913–918. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.065.
132. Ramesh N, Mortazavi S, et al. Nesfatin-1 stimulates cholecystokinin and suppresses peptide YY expression and secretion in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016; **472**(1):201–208. doi:10.1016/j.bbrc.2016.02.095.
133. Ramesh N, Mortazavi S, et al. Nesfatin-1 stimulates glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion from STC-1 cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015; **462**(2):124–130. doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.100.

134. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; **132**(6):2131–2157. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.054.
135. Foo KS, Brauner H, et al. Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: distribution and relationship to glycaemic state. *Journal of Endocrinology* 2010; **204**(3):255–263. doi:10.1677/JOE-09-0254.
136. Li Z, Gao L, et al. Peripheral Effects of Nesfatin-1 on Glucose Homeostasis. *PLOS ONE* 2013; **8**(8):e71513. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0071513.
137. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience* 2009; **10**(6):397–409. doi:10.1038/nrn2647.
138. McEwen BS. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. *Physiological Reviews* 2007; **87**(3):873–904. doi:10.1152/physrev.00041.2006.
139. Gunnar M, Quevedo K. The Neurobiology of Stress and Development. *Annual Review of Psychology* 2007; **58**(1):145–173. doi:10.1146/annurev.psych.58.110405.085605.
140. Torres SJ, Nowson CA. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 2007; **23**(11–12):887–894. doi:10.1016/j.nut.2007.08.008.
141. Takeda E, Terao J, et al. Stress control and human nutrition. *The journal of medical investigation : JMI* 2004; **51**(3–4):139–45. doi:10.2152/jmi.51.139.
142. Goebel M, Stengel A, et al. Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Research* 2009; **1300**:114–124. doi:10.1016/j.brainres.2009.08.082.
143. Könczöl K, Bodnár I, et al. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in rats. *Neurochemistry International* 2010; **57**(3):189–197. doi:10.1016/j.NEUINT.2010.04.012.
144. Yoshida N, Maejima Y, et al. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Aging* 2010; **2**(11):775–784. doi:10.18632/aging.100207.
145. Tanida M, Mori M. Nesfatin-1 stimulates renal sympathetic nerve activity in rats. *NeuroReport* 2011; **22**(6):309–312. doi:10.1097/WNR.0b013e328346107f.
146. Gunay H, Tutuncu R, et al. Decreased plasma nesfatin-1 levels in patients with generalized anxiety disorder. *Psychoneuroendocrinology* 2012; **37**(12):1949–1953. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.04.007.
147. Bez Y, Ari M, et al. Plasma Nesfatin-1 Level May Be Associated with Disease Severity in Patients with Panic Disorder. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology* 2010; **20**(4):288–292. doi:10.1080/10177833.2010.11790674.
148. Bez Y, Ari M, et al. Increased Plasma Nesfatin-1 Levels in Patients with Obsessive Compulsive Disorder. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni-Bulletin of Clinical Psychopharmacology* 2012; **22**(1):5–9. doi:10.5455/bcp.20110627110925.
149. Ari M, Ozturk OH, et al. High plasma nesfatin-1 level in patients with major depressive disorder. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 2011; **35**(2):497–500. doi:10.1016/j.pnpbp.2010.12.004.
150. Xiao M-MM, Li J-BB, et al. Plasma nesfatin-1 level is associated with severity of depression in Chinese depressive patients. *BMC Psychiatry* 2018; **18**(1):88./pmc/articles/PMC5883589/AccessedNovember 1, 2023.
151. Li C, Zhang F, et al. Nesfatin-1 Decreases Excitability of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra. *Journal of Molecular Neuroscience* 2014; **52**(3):419–424. doi:10.1007/s12031-013-0169-3.
152. Mimeo A, Smith PM, et al. Nesfatin-1 influences the excitability of neurons in the nucleus of the solitary tract and regulates cardiovascular function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2012; **302**(11):R1297–R1304. doi:10.1152/ajpregu.00266.2011.
153. Aydin S, Dag E, et al. Time-dependent changes in the serum levels of prolactin, nesfatin-1 and ghrelin as a marker of epileptic attacks young male patients. *Peptides* 2011; **32**(6):1276–1280. doi:10.1016/j.peptides.2011.04.021.
154. Osaki A, Shimizu H. Peripheral administration of nesfatin-1 increases blood pressure in mice. *Hypertension Research* 2014; **37**(2):185–186. doi:10.1038/hr.2013.122.
155. Zhang J-R, Lu Q-B, et al. Nesfatin-1 promotes VSMC migration and neointimal hyperplasia by upregulating matrix metalloproteinases and downregulating PPAR $\gamma$ . *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018; **102**(1800):711–717. doi:10.1016/j.biopha.2018.03.120.
156. Lu QB, Wang HP, et al. Nesfatin-1 functions as a switch for phenotype transformation and proliferation of VSMCs in hypertensive vascular remodeling. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease* 2018; **1864**(6 Pt A):2154–2168. doi:10.1016/J.BBADIS.2018.04.002.
157. Mazza R, Gattuso A, et al. Nesfatin-1 as a new positive inotrope in the goldfish (*Carassius auratus*) heart. *General and Comparative Endocrinology* 2015; **224**:160–167. doi:10.1016/j.ygcen.2015.08.003.
158. Ramanjaneya M, Tan BK, et al. Nesfatin-1 inhibits proliferation and enhances apoptosis of human adrenocortical H295R cells. *Journal of Endocrinology* 2015; **226**(1):1–11. doi:10.1530/JOE-14-0496.
159. Takagi K, Miki Y, et al. Nucleobindin 2 (NUCB2) in human endometrial carcinoma: A potent prognostic factor associated with cell proliferation and migration. *Endocrine Journal* 2016; **63**(3):287–299. doi:10.1507/endocrj.EJ15-0490.
160. Xu Y, Pang X, et al. Nesfatin-1 inhibits ovarian epithelial carcinoma cell proliferation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013; **440**(4):467–472. doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.001.
161. Zhang H, Qi C, et al. Prognostication of prostate cancer based on NUCB2 protein assessment: NUCB2 in prostate cancer. *Journal*

- of experimental & clinical cancer research : CR* 2013; **32**(1):77. doi:10.1186/1756-9966-32-77.
162. Huo X, Wang HHH, et al. FTX contributes to cell proliferation and migration in lung adenocarcinoma via targeting miR-335-5p/NUCB2 axis. *Cancer Cell International* 2020; **20**(1):1–13. doi:10.1186/s12935-020-1130-5.
163. Suzuki S, Takagi K, et al. Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Science* 2012; **103**(1):136–143. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02119.x.
164. Kan JY, Yen MC, et al. Nesfatin-1/Nucleobindin-2 enhances cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition via LKB1/AMPK/TORC1/ZEB1 pathways in colon cancer. *Oncotarget* 2016; **7**(21):31336–31349. doi:10.18632/oncotarget.9140.
165. Skorupska A, Lenda R, et al. The Multifaceted Nature of Nucleobindin-2 in Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; **22**(11):5687. doi:10.3390/ijms22115687.
166. Zhou Q, Liu Y, et al. NUCB2: roles in physiology and pathology. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2022; **78**(3):603–617. doi:10.1007/s13105-022-00895-4.
167. Tadross JA, Patterson M, et al. Nesfatin suppresses feeding and stimulates the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *Endocrine Journal* 2010; **57**:S442–S442.
168. Jumper J, Evans R, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021; **596**(7873):583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2.
169. Varadi M, Anyango S, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* 2022; **50**(D1):D439–D444. doi:10.1093/nar/gkab1061.
170. Zhao B, Ghadermarzi S, et al. Comparative evaluation of AlphaFold2 and disorder predictors for prediction of intrinsic disorder, disorder content and fully disordered proteins. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2023; **21**:3248–3258. doi:10.1016/j.csbj.2023.06.001.
171. Stengel A, Taché Y. Nesfatin-1 — Role as possible new potent regulator of food intake. *Regulatory Peptides* 2010; **163**(1–3):18–23. doi:10.1016/j.regpep.2010.05.002.
172. Romani AMP. Intracellular magnesium homeostasis. In: Vink R, Nechifor M, eds. *Magnesium in the central nervous system*. University of Adelaide Press; 2011:1–352.
173. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**(5259):680–685. doi:10.1038/227680a0.
174. Miller AJ, Roman B, et al. A method for easily customizable gradient gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 2016; **509**:12–14. doi:10.1016/j.ab.2016.07.003.
175. J.F. S, W. (Eds.) Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3-Volume Set)*; 2001.
176. Studier FW. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology* 1991; **219**(1):37–44. doi:10.1016/0022-2836(91)90855-Z.
177. Gasteiger E, Hoogland C, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the Expasy Server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 2005:571–607.
178. Towbin H, Staehelin T, et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979.
179. Li, Romero, et al. Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions. *Genome informatics. Workshop on Genome Informatics* 1999.
180. Garner, Romero, et al. Predicting Binding Regions within Disordered Proteins. *Genome informatics. Workshop on Genome Informatics* 1999; **10**:41–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11072341> Accessed.
181. Cilia E, Pancsa R, et al. From protein sequence to dynamics and disorder with DynaMine. *Nature Communications* 2013; **4**(1):2741. doi:10.1038/ncomms3741.
182. Cilia E, Pancsa R, et al. The DynaMine webserver: predicting protein dynamics from sequence. *Nucleic Acids Research* 2014; **42**(W1):W264–W270. doi:10.1093/nar/gku270.
183. Yang J, Yan R, et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature Methods* 2015; **12**(1):7–8. doi:10.1038/nmeth.3213.
184. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 2008; **9**(1):40. doi:10.1186/1471-2105-9-40.
185. Zheng W, Zhang C, et al. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Reports Methods* 2021; **1**(3):100014. doi:10.1016/j.crmeth.2021.100014.
186. Mirdita M, Schütze K, et al. ColabFold: Making Protein folding accessible to all. *Nature Methods* 2022; **19**(6):679–682. doi:10.1038/s41592-022-01488-1.
187. Šali A, Blundell TL. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *Journal of Molecular Biology* 1993; **234**(3):779–815. doi:10.1006/jmbi.1993.1626.
188. Whitmore L, Mavridis L, et al. DichroMatch at the protein circular dichroism data bank (DM@PCDDb): A web-based tool for identifying protein nearest neighbors using circular dichroism spectroscopy. *Protein Science* 2018; **27**(1):10–13. doi:10.1002/pro.3207.
189. Pallarès I, Fernández D, et al. Direct interaction between a human digestive protease and the mucoadhesive poly(acrylic acid). *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 2008; **64**(7):784–791. doi:10.1107/S0907444908013474.

190. Nagy G, Igaev M, et al. SESCO: Predicting Circular Dichroism Spectra from Protein Molecular Structures. *Journal of Chemical Theory and Computation* 2019; **15**(9):5087–5102. doi:10.1021/acs.jctc.9b00203.
191. Pettersen EF, Goddard TD, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 2004; **25**(13):1605–1612. doi:10.1002/jcc.20084.
192. Kelly SM, Jess TJ, et al. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2005; **1751**(2):119–139. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
193. Sreerama N, Venyaminov SY, et al. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Inclusion of Denatured Proteins with Native Proteins in the Analysis. *Analytical Biochemistry* 2000; **287**(2):243–251. doi:10.1006/abio.2000.4879.
194. Sreerama N, Woody RW. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. *Methods in Enzymology* 2004. doi:10.1016/S0076-6879(04)83013-1.
195. Sreerama N. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Science* 2004. doi:10.1110/ps.03258404.
196. Laue TM, Shah BD, et al. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. *Computer-aided Interpretation of Analytical Sedimentation Data for Proteins* 1992:90–125.
197. Schuck P. Sedimentation Analysis of Noninteracting and Self-Associating Solutes Using Numerical Solutions to the Lamm Equation. *Biophysical Journal* 1998; **75**(3):1503–1512. doi:10.1016/S0006-3495(98)74069-X.
198. Schuck P. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophysical Journal* 2000; **78**(3):1606–1619. doi:10.1016/S0006-3495(00)76713-0.
199. Keller S, Vargas C, et al. High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis. *Analytical Chemistry* 2012; **84**(11):5066–5073. doi:10.1021/ac3007522.
200. Houtman JCD, Brown PH, et al. Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: Application to adaptor protein complexes in cell signaling. *Protein Science* 2007; **16**(1):30–42. doi:10.1110/ps.062558507.
201. Kocyla A, Pomorski A, et al. Molar absorption coefficients and stability constants of Zincon metal complexes for determination of metal ions and bioinorganic applications. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2017; **176**(August):53–65. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.08.006.
202. Cimperman P, Matulis D. Chapter 8. Protein Thermal Denaturation Measurements via a Fluorescent Dye. In: *Biophysical Approaches Determining Ligand Binding to Biomolecular Targets: Detection, Measurement and Modelling*. The Royal Society of Chemistry; 2011:247–274.
203. Puchała W, Burdukiewicz M, et al. HaDeX: an R package and web-server for analysis of data from hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry experiments. Ponty Y, ed. *Bioinformatics* 2020; **36**(16):4516–4518. doi:10.1093/bioinformatics/btaa587.
204. Lenda R. Otrzymanie rekombinowanego wektora umożliwiającego ekspresję nesfatyny- 1/2 z Gallus gallus oraz opracowanie metod produkcji białka metodami chromatograficznymi. 2019.
205. Błaszczak K. Otrzymanie rekombinowanego wektora umożliwiającego ekspresję nesfatyny- 1/2 z Homo sapiens oraz opracowanie metod produkcji białka metodami chromatograficznymi. 2019.
206. Ruff KM, Pappu R V. AlphaFold and Implications for Intrinsically Disordered Proteins. *Journal of Molecular Biology* 2021; **433**(20):167208. doi:10.1016/j.jmb.2021.167208.
207. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry* 2009; **78**(1):929–958. doi:10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
208. Fasman GD ed. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. 1st ed. Boston, MA: Springer US; 1996.
209. Salvay AG, Communie G, et al. Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation for Intrinsically Disordered Proteins. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol 896; 2012:91–105.
210. Keil B. *Specificity of Proteolysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1992.
211. Wu C, Robertson DHL, et al. Proteolysis of Native Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 1999; **274**(2):1108–1115. doi:10.1074/jbc.274.2.1108.
212. Fontana A, De Laureto PP, et al. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochimica Polonica* 2004; **51**(2):299–321. doi:10.18388/abp.2004\_3573.
213. Koth CM, Orlicky SM, et al. Use of Limited Proteolysis to Identify Protein Domains Suitable for Structural Analysis. In: *Methods in Enzymology*, vol 368; 2003:77–84.
214. Wilcox DE. Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorganica Chimica Acta* 2008; **361**(4):857–867. doi:10.1016/j.ica.2007.10.032.
215. Liang Y. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2008; **40**(7):565–576. doi:10.1111/j.1745-7270.2008.00437.x.
216. Hawe A, Sutter M, et al. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharmaceutical Research* 2008; **25**(7):1487–1499. doi:10.1007/s11095-007-9516-9.
217. Rogers DR. Screening for Amyloid with the Thioflavin-T Fluorescent Method. *American Journal of Clinical Pathology* 1965; **44**(1):59–61. doi:10.1093/ajcp/44.1.59.

218. Naiki H, Higuchi K, et al. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavine T. *Analytical Biochemistry* 1989; **177**(2):244–249. doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90046-8.
219. Naiki H, Higuchi K, et al. Fluorometric Examination of Tissue Amyloid Fibrils in Murine Senile Amyloidosis: Use of the Fluorescent Indicator, Thioflavine T. In: *Amyloid and Amyloidosis 1990*. Dordrecht: Springer Netherlands; 1991:393–396.
220. Levine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* 1993; **2**(3):404–410. doi:10.1002/pro.5560020312.
221. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2010; **1804**(7):1405–1412. doi:10.1016/j.bbapap.2010.04.001.
222. Weis DD ed. *Hydrogen Exchange Mass Spectrometry of Proteins*. Wiley; 2016.
223. Hvidt A, Nielsen SO. Hydrogen Exchange in Proteins. *Advances in Protein Chemistry* 1966; **21**(C):287–386. doi:10.1016/S0065-3233(08)60129-1.
224. Woods VL, Hamuro Y. High resolution, high-throughput amide deuterium exchange-mass spectrometry (DXMS) determination of protein binding site structure and dynamics: Utility in pharmaceutical design. *Journal of Cellular Biochemistry* 2001; **84**(S37):89–98. doi:10.1002/jcb.10069.
225. Cowley MA, Grove KL. To be or NUCB2, is nesfatin the answer? *Cell Metabolism* 2006; **4**(6):421–422. doi:10.1016/j.cmet.2006.11.001.
226. Alpua M, Kisa U. Nesfatin-1 and caspase-cleaved cytokeratin-18: Promising biomarkers for Alzheimer's disease? *Bratislava Medical Journal* 2019; **120**(04):295–298. doi:10.4149/BLL\_2019\_046.
227. Kohno D, Nakata M, et al. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 2008; **149**(3):1295–1301. doi:10.1210/en.2007-1276.
228. Yang Y, Zhang B, et al. Islet  $\beta$ -cell-produced NUCB2/nesfatin-1 maintains insulin secretion and glycemia along with suppressing UCP-2 in  $\beta$ -cells. *J Physiol Sci* 2019; **69**(5):733–739. doi:10.1007/s12576-019-00689-2.
229. Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2019; **7**. doi:10.3389/fbioe.2019.00420.
230. Baneyx F, Georgiou G. In vivo degradation of secreted fusion proteins by the Escherichia coli outer membrane protease OmpT. *Journal of Bacteriology* 1990; **172**(1):491–494. doi:10.1128/jb.172.1.491-494.1990.
231. Phillips TA, VanBogelen RA, et al. lon gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein. *Journal of Bacteriology* 1984; **159**(1):283–287. doi:10.1128/jb.159.1.283-287.1984.
232. Hirst JD, Vieth M, et al. Predicting leucine zipper structures from sequence. "Protein Engineering, Design and Selection" 1996; **9**(8):657–662. doi:10.1093/protein/9.8.657.
233. Aydin S. Multi-functional peptide hormone NUCB2/nesfatin-1. *Endocrine* 2013; **44**(2):312–325. doi:10.1007/s12020-013-9923-0.
234. Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2015; **16**(1):18–29. doi:10.1038/nrm3920.
235. Triebel J, Robles JP, et al. New horizons in specific hormone proteolysis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2022; **33**(6):371–377. doi:10.1016/j.tem.2022.03.004.
236. Pocai A. Unraveling oxyntomodulin, GLP1's enigmatic brother. *Journal of Endocrinology* 2012; **215**(3):335–346. doi:10.1530/JOE-12-0368.
237. Piwnica D, Touraine P, et al. Cathepsin D Processes Human Prolactin into Multiple 16K-Like N-Terminal Fragments: Study of Their Antiangiogenic Properties and Physiological Relevance. *Molecular Endocrinology* 2004; **18**(10):2522–2542. doi:10.1210/me.2004-0200.
238. Campbell KL, Haspel N, et al. Protein hormone fragmentation in intercellular signaling: Hormones as nested information systems. *Biology of Reproduction* 2021; **104**(4):887–901. doi:10.1093/biolre/iaaa234.
239. Mounicou S, Szpunar J, et al. Metallomics: the concept and methodology. *Chemical Society Reviews* 2009; **38**(4):1119. doi:10.1039/b713633c.
240. Zoroddu MA, Aaseth J, et al. The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2019; **195**(March):120–129. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013.
241. Corniola RS, Tassabehji NM, et al. Zinc deficiency impairs neuronal precursor cell proliferation and induces apoptosis via p53-mediated mechanisms. *Brain Research* 2008; **1237**:52–61. doi:10.1016/j.brainres.2008.08.040.
242. Watt NT, Whitehouse IJ, et al. The Role of Zinc in Alzheimer's Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011; **2011**:1–10. doi:10.4061/2011/971021.
243. Chimienti F, Seve M, et al. Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. Abbreviations: Chx, cycloheximide; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; TNF $\alpha$ , tumor necros. *Biochemical Pharmacology* 2001; **62**(1):51–62. doi:10.1016/S0006-2952(01)00624-4.
244. Wellinghausen N, Rink L. The significance of zinc for leukocyte biology. *Journal of Leukocyte Biology* 1998; **64**(5):571–577. doi:10.1002/jlb.64.5.571.
245. Rink L, Gabriel P. Extracellular and immunological actions of zinc. *Biometals* 2001; **14**(3–4):367–83. doi:10.1023/a:1012986225203.

246. Costello LC, Franklin RB. Cytotoxic/tumor suppressor role of zinc for the treatment of cancer: an enigma and an opportunity. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2012; **12**(1):121–128. doi:10.1586/era.11.190.
247. Little PJ, Bhattacharya R, et al. Zinc and cardiovascular disease. *Nutrition* 2010; **26**(11–12):1050–1057. doi:10.1016/j.nut.2010.03.007.
248. Klug A. The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. *Annual Review of Biochemistry* 2010; **79**(1):213–231. doi:10.1146/annurev-biochem-010909-095056.
249. Andreini C, Banci L, et al. Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. *Journal of Proteome Research* 2006; **5**(1):196–201. doi:10.1021/pr050361j.
250. Kocyla A, Tran JB, et al. Galvanization of Protein–Protein Interactions in a Dynamic Zinc Interactome. *Trends in Biochemical Sciences* 2021; **46**(1):64–79. doi:10.1016/j.tibs.2020.08.011.
251. Auld DS. Zinc-Binding Sites in Proteins. In: Kretsinger RH, Uversky VN, et al., eds. *Encyclopedia of Metalloproteins*. New York, NY: Springer New York; 2013:2554–2559.
252. Coffman FD, Dunn MF. Insulin-metal ion interactions: the binding of divalent cations to insulin hexamers and tetramers and the assembly of insulin hexamers. *Biochemistry* 1988; **27**(16):6179–6187. doi:10.1021/bi00416a053.
253. Izumi T, Kasai K, et al. Secretory vesicle docking to the plasma membrane: molecular mechanism and functional significance. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2007; **9**(s2):109–117. doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00789.x.
254. Cunningham BC, Mulkerrin MG, et al. Dimerization of Human Growth Hormone by Zinc. *Science* 1991; **253**(5019):545–548. doi:10.1126/science.1907025.
255. Thorlacius-Ussing O. Zinc in the Anterior Pituitary of Rat: A Histochemical and Analytical Work. *Neuroendocrinology* 1987; **45**(3):233–242. doi:10.1159/000124731.
256. Caro JA, Harpole KW, et al. Entropy in molecular recognition by proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017; **114**(25):6563–6568. doi:10.1073/pnas.1621154114.
257. Bonito-Oliva A, Barbash S, et al. Nucleobindin 1 binds to multiple types of pre-fibrillar amyloid and inhibits fibrillization. *Scientific Reports* 2017; **7**(1):42880. doi:10.1038/srep42880.
258. Huang X, Cuajungco MP, et al. Alzheimer's Disease,  $\beta$ -Amyloid Protein and Zinc. *The Journal of Nutrition* 2000; **130**(5):1488S–1492S. doi:10.1093/jn/130.5.1488S.
259. Adham NF, Song MK, et al. Binding of zinc to alpha-2-macroglobulin and its role in enzyme binding activity. *BBA - Protein Structure* 1977; **495**(2):212–219. doi:10.1016/0005-2795(77)90378-6.
260. Noormägi A, Gavrilova J, et al. Zn(II) ions co-secreted with insulin suppress inherent amyloidogenic properties of monomeric insulin. *Biochemical Journal* 2010; **430**(3):511–518. doi:10.1042/BJ20100627.
261. Jacob RS, Das S, et al. Amyloid formation of growth hormone in presence of zinc: Relevance to its storage in secretory granules. *Scientific Reports* 2016; **6**(1):23370. doi:10.1038/srep23370.
262. Maji SK, Perrin MH, et al. Functional Amyloids As Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science* 2009; **325**(5938):328–332. doi:10.1126/science.1173155.
263. Lu Q, Haragopal H, et al. Intracellular zinc distribution in mitochondria, ER and the Golgi apparatus. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 2016; **8**(1):35–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27186321> Accessed.
264. Maret W. Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics* 2015; **7**(2):202–211. doi:10.1039/C4MT00230J.
265. Qin Y, Dittmer PJ, et al. Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn<sup>2+</sup> with genetically encoded sensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; **108**(18):7351–7356. doi:10.1073/pnas.1015686108.
266. Sensi SL, Paoletti P, et al. The Neurophysiology and Pathology of Brain Zinc. *The Journal of Neuroscience* 2011; **31**(45):16076–16085. doi:10.1523/JNEUROSCI.3454-11.2011.
267. May-Simera H, Levin ED. NMDA systems in the amygdala and piriform cortex and nicotinic effects on memory function. *Cognitive Brain Research* 2003; **17**(2):475–483. doi:10.1016/S0926-6410(03)00163-0.
268. Pochwat B, Nowak G, et al. Relationship between Zinc (Zn<sup>2+</sup>) and Glutamate Receptors in the Processes Underlying Neurodegeneration. *Neural Plasticity* 2015; **2015**:1–9. doi:10.1155/2015/591563.
269. Granzotto A, Canzoniero LMT, et al. A Neurotoxic Ménage-à-trois: Glutamate, Calcium, and Zinc in the Excitotoxic Cascade. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2020; **13**(November):1–13. doi:10.3389/fnmol.2020.600089.
270. Zhou XP, Sha J, et al. Nesfatin-1/NUCB2 in the amygdala influences visceral sensitivity via glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in male maternal separation rats. *Neurogastroenterology and Motility* 2016; **28**(10):1545–1553. doi:10.1111/nmo.12853.