



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój

**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



*„BioTechNan – Program Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii”*

Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny

Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii

# **Analiza molekularna Nukleobindyny-2 z *Gallus gallus***

Rozprawa doktorska

ANNA SKORUPSKA -STASIAK

Promotorzy

prof. dr hab. inż. Andrzej Ożyhar, Politechnika Wroclawska

prof. dr hab. Maciej Kozak, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wrocław, 2023



Politechnika Wroclawska



Uniwersytet  
Wroclawski



UNIWERSYTET  
PRZYRODNICZY  
WE WROCLAWIU

*Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego*

# Podziękowania

**Profesorowi Andrzejowi Ożyharowi**, mojemu promotorowi, dziękuję za umożliwienie mi wzięcia udziału w ciekawym projekcie, za wsparcie, cenne wskazówki oraz ciągłą motywację.

**Profesorowi Maciejowi Kozakowi**, mojemu promotorowi, dziękuję za wsparcie, nadzór merytoryczny, celne komentarze oraz możliwość wykonywania badań na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

**Doktor Dominice Bystranowskiej**, dziękuję za wprowadzenie mnie w świat biochemii, nieustanną pomoc, wsparcie oraz motywację.

Pracownikom oraz doktorantom z Katedry Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii dziękuję za pomoc oraz okazane wsparcie w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

# SPIS TREŚCI

Spis skrótów .....	5
Streszczenie .....	8
Summary .....	10
1 Wstęp .....	12
1.1 Nukleobindyna-2 .....	12
1.1.1 Motyw dłoni EF oraz wiązanie jonów $\text{Ca}^{2+}$ przez Nucb2 .....	13
1.1.2 Motyw wiązania jonów $\text{Zn}^{2+}$ .....	15
1.1.3 Domena wiążąca DNA oraz motyw zamka leucynowego .....	15
1.1.4 Wielofunkcyjność białka Nucb2 .....	16
1.2 Białka inherentnie nieuporządkowane .....	22
1.3 Biomineralizacja .....	25
1.3.1 Białko Nucb2 a proces biomineralizacji .....	27
1.4 Wiązanie jonów metali przez białka .....	29
2 Cel pracy .....	32
3 Materiały i metody .....	33
3.1 Materiały .....	33
3.1.1 Spis odczynników i materiałów .....	33
3.1.2 Plazmidy .....	35
3.1.3 Oligonukleotydy .....	36
3.1.4 Szczepy bakteryjne .....	37
3.1.5 Podłoża hodowlane i antybiotyki .....	38
3.1.6 Bufory .....	39
3.1.7 Standardy masowe DNA oraz białek .....	42
3.2 Metody .....	43
3.2.1 Podstawowe techniki pracy z DNA .....	43
3.2.2 Podstawowe techniki pracy z białkami .....	43
3.2.3 Przygotowanie plazmidów ekspresyjnych .....	44
3.2.4 Ekspresja rekombinowanych białek .....	44
3.2.5 Oczyszczanie rekombinowanych białek .....	45
3.2.6 Wyznaczenie masy molekularnej Nucb2 oraz Nesfatyny-3 .....	47
3.2.7 Charakterystyka molekularna białek Nucb2 oraz nesfatyny-3 .....	47
3.2.8 Test aktywności biomineralizacyjnej <i>in vitro</i> .....	53
3.2.9 Skaningowa mikroskopia elektronowa .....	53
3.2.10 Widma Ramana .....	53

4	Wyniki.....	55
4.1	Otrzymywanie plazmidów ekspresyjnych.....	55
4.2	Ekspresja i oczyszczanie Nucb2 .....	56
4.3	Ekspresja i oczyszczanie Nesfatyny-3 .....	58
4.4	Analiza molekularna Nucb2 oraz Nesfatyny-3 .....	60
4.4.1	Analiza bioinformatyczna .....	60
4.4.2	Analiza zawartości struktury drugorzędowej białek za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego.....	62
4.4.3	Analiza zmian struktury trzeciorzędowej białek za pomocą pomiarów wewnętrznej fluorescencji białka.....	67
4.4.4	Analiza zmian strukturalnych białek za pomocą limitowanej proteolizy .....	69
4.4.5	Analiza dynamiki strukturalnej Nucb2 za pomocą HDX-MS.....	74
4.4.6	Analiza zmian struktury czwartorzędowej białek za pomocą SV-AUC .....	77
4.4.7	Analiza oddziaływań białek z jonami metali za pomocą izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC).....	83
4.4.8	Analiza parametrów hydrodynamicznych białek za pomocą SAXS .....	88
4.4.9	Analiza morfologii oligomerów Nucb2 w obecności jonów metali za pomocą TEM .....	93
4.5	Aktywność biomineralizacyjna Nucb2 <i>in Vitro</i> .....	94
5	Dyskusja.....	100
5.1	Otrzymywanie rekombinowanych białek Nucb2 oraz Nesfatyny-3 .....	100
5.2	Nucb2 jako białko częściowo nieuporządkowane.....	101
5.3	Oddziaływanie z jonami wapnia .....	102
5.4	Oddziaływanie z jonami cynku .....	105
5.5	Oddziaływanie z jonami magnezu .....	109
5.6	Aktywność biomineralizacyjna białka Nucb2 .....	110
6	Podsumowanie i perspektywy dalszych badań.....	111
7	Dorobek Naukowy.....	114
7.1	Publikacje indeksowane w bazie Web of Science .....	114
7.2	Rozdziały w książkach.....	114
7.3	Konferencje międzynarodowe .....	114
7.4	Konferencje krajowe .....	115
7.5	Staże, szkolenia, warsztaty .....	115
7.6	Aktywność organizacyjna .....	116
8	Spis Tabel.....	117
9	Spis rysunków .....	118
10	Literatura.....	120

## SPIS SKRÓTÓW

Skrót	Znaczenie
<b>p38MAPK</b>	ang. <i>p38 mitogen-activated protein kinases</i> , kinazy aktywowane mitogenem p38
<b>AMPK</b>	ang. <i>5'AMP-activated protein kinase</i> , kinaza białkowa aktywowana przez AMP
<b>ARTS-1</b>	ang. <i>aminopeptidase regulator of TNFR1 shedding</i> , aminopeptydazowy regulator uwalniania TNFR1
<b>BMP</b>	ang. <i>bone morphogenetic protein</i> , białko morfogenetyczne kości
<b>bZIP</b>	ang. <i>basic region leucine zipper</i> , zasadowy region zamka leucynowego
<b>CBB R-250</b>	ang. <i>Coomasie Brilliant Blue R-250</i>
<b>CD</b>	ang. <i>Circular dichroism</i> , Dichroizm kołowy
<b>DBD</b>	ang. <i>DNA – binding domain</i> , domena wiążąca DNA
<b>DREAM</b>	ang. <i>downstream regulatory element antagonist modulator</i> , białko DREAM
<b>EMT</b>	ang. <i>epithelial-mesenchymal transition</i> , przejście epithelialno-mezenchymalne
<b>GEF</b>	ang. <i>guanine nucleotide exchange factor</i> , białka uczestniczące w wymianie GDP na GTP
<b>GIV/Girdin</b>	ang. <i>Ga-interacting vesicle- associated protein</i> , białko GIV/Girdin
<b>GPCRs</b>	ang. <i>G-protein -coupled receptors</i> , receptory sprzężonych z białkami G
<b>HEPES</b>	Kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy
<b>IPTG</b>	Izopropyloβ-D-1-tiogalaktopiranozyd
<b>ITC</b>	ang. <i>isothermal titration calorimetry</i> , izotermiczna kalorymetria miareczkowa
<b>JNK</b>	ang. <i>c-Jun N-terminal kinases</i> , kinaza końca N białka C-Jun

<b>HDX-MS</b>	ang. <i>Hydrogen-deuterium exchange coupled with mass spectrometry</i> , wymiana proton-deuter sprężona ze spektrometrią mas
<b>HLH</b>	ang. <i>helix-loop-helix</i> , motyw helisa-pętla-helisa
<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>LKB1</b>	ang. <i>liver kinase B</i> , wątrobowa kinaza B1
<b>MG</b>	ang. <i>molten globule</i> , stopiona globula
<b>mTOR</b>	ang. <i>mammalian target of rapamycin</i> , ssaczy cel rapamycyny
<b>MORFs</b>	ang. <i>molecular recognition features</i>
<b>Nucb1</b>	ang. <i>Nucleobindin-1</i> , Nukleobindyna-1
<b>Nucb2</b>	ang. <i>Nucleobindin-2</i> , Nukleobindyna-2
<b>PCR</b>	ang. <i>polymerase chain reaction</i> , reakcja łańcuchowej polimerazy
<b>PMG</b>	ang. <i>premolten globule-like</i> , stan podobny do stopionej globuli
<b>PMSF</b>	Fluorek fenylometrylosulfonylu
<b>RhoA</b>	ang. <i>Ras homologue gene family member A</i> , kinaza należąca do rodziny białek G
<b>ROCK</b>	ang. <i>Rho-associated coiled-coil-containing kinases</i> , kinaza zależna od Rho
<b>SAXS</b>	ang. <i>Small-angle X-ray scattering</i> , małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego
<b>SDS-PAGE</b>	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS
<b>SEM</b>	ang. <i>scanning electron microscopy</i> , skaningowa mikroskopia elektronowa
<b>SV-AUC</b>	ang. <i>sedimentation velocity analytical ultracentrifugation</i> , szybkościowe ultrawierowanie analityczne
<b>SLIMs</b>	ang. <i>short linear motifs</i> , krótkie motywy liniowe
<b>Slug</b>	ang. <i>snail family zinc finger 2</i>

<b>TEM</b>	ang. <i>transmission electron microscopy</i> , transmisyjna mikroskopia elektronowa
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
<b>TNFR1</b>	ang. <i>tumour necrosis factor receptor</i> , receptor wiązący czynnik martwicy nowotworów
<b>TRAP</b>	ang. <i>tartrate resistant alkaline phosphatase</i> , fosfataza zasadowa winiano-oporna
<b>Twist</b>	ang. <i>twist family bHLH transcription factor 1</i>
<b>ZEB-1</b>	ang. <i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
<b>ZIP</b>	ang. <i>leucine zipper motif</i> , motyw zamka leucynowego

## STRESZCZENIE

Nukleobindyna-2 (Nucb2, ang. *Nucleobindin-2*) jest białkiem multidomenowym, które może być konwertowane proteolitycznie do trzech peptydów: nesfatyny-1, -2 oraz -3. W skład struktury trzeciorzędowej Nucb2 wchodzi m. in. dwie domeny dłoni EF, które są odpowiedzialne za wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$ , znajdujące się w sekwencji nesfatyny-3. Dodatkowo w sekwencji nesfatyny-1 możemy wyróżnić przypuszczalny motyw wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Co ciekawe, do tej pory poznana została tylko rola nesfatyny-1. Badania przeprowadzone na gryzoniach wykazały, że nesfatyna-1 podawana im dokomorowo hamuje uczucie łaknienia, co sugeruje możliwą rolę białka w terapii otyłości. Do tej pory nie jest znana charakterystyka molekularna oraz rola dwóch pozostałych nesfatyn. Nucb2 charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji zarówno w układzie nerwowym oraz tkankach obwodowych. Co ciekawe, pokazano, że Nucb2 bierze udział w wielu procesach fizjologicznych, np. regulacji wydzielania insuliny czy kontroli procesów reprodukcyjnych. Prawdopodobnie za tę multifunkcjonalność Nucb2 odpowiada jego struktura.

Celem pracy była charakterystyka molekularna Nucb2 oraz nesfatyny-3 z *Gallus gallus* (Kura bankiwy). Ponieważ homologi Nucb2 odznaczają się 85% podobieństwem sekwencji aminokwasowej, wyniki badań przeprowadzone na jednym homologu możemy odnieść do pozostałych homologów. Przeprowadzone badania miały charakter interdyscyplinarny. Podczas realizacji pracy wykorzystano techniki z zakresu badań biochemicznych, biofizycznych oraz inżynierii genetycznej. Prace prowadzono na Politechnice Wrocławskiej oraz Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Badania rozpoczęto od opracowania skutecznej metody ekspresji oraz oczyszczania obu białek, co pozwoliło na przeprowadzenie analiz *in vitro*. Następnie wykonano analizy *in silico* sekwencji Nucb2. Na ich podstawie można było przypuszczać, że białko to wykazuje strukturę typu *mozaiki* składającą się z występujących naprzemiennie fragmentów globularnych oraz nieuporządkowanych. Fragmenty nieuporządkowane są charakterystyczne szczególnie dla nesfatyny-3. Przeprowadzone analizy dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*), fluorescencji oraz szybkościowego ultrawierowienia analitycznego (SV-AUC, ang. *sedimentation velocity analytical ultracentrifugation*) Nucb2 pokazały w sposób jednoznaczny, że Nucb2 oraz nesfatyna-3 należą do rodziny białek częściowo nieuporządkowanych. Dodatkowo wyniki analizy wymiany proton- deuter sprzężonej ze spektrometrią mas (HDX- MS, ang. *hydrogen- deuterium exchange coupled with mass spectrometry*) wykazały, że białko Nucb2 można podzielić na dwie części: fragment aminowy (nesfatyna-1 oraz -2), o strukturze złożonej z naprzemiennie występujących



fragmentów uporządkowanych oraz nieuporządkowanych oraz całkowicie nieuporządkowany fragment karboksylowy (nesfatyna- 3).

Jony metali mogą modulować strukturę białek, dostosowując ją do pełnienia funkcji w różnych procesach fizjologicznych. Kolejne analizy miały na celu zbadanie wpływu naturalnych ligandów białka, jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  na oba analizowane białka. Analizy CD, limitowanej proteolizy i SV-AUC pokazały, że oba białka ulegają kompaktowaniu pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Wyniki HDX-MS pokazały, że w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  dochodzi do strukturyzacji dwóch pętli domen dłoni EF Nucb2. Jony  $\text{Mg}^{2+}$  wpływają na stan oligomeryczny obu białek prowadząc do dimeryzacji. Co ciekawe, analiza termodynamiki oddziaływań obu białek z jonami  $\text{Mg}^{2+}$  za pomocą izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC ang. *isothermal titration calorimetry*) pokazała, że Nucb2 wiąże jeden jon  $\text{Mg}^{2+}$ . Natomiast izolowana nesfatyna-3 odznacza się obecnością dwóch identycznych miejsc wiązania jonów  $\text{Mg}^{2+}$ . Przedstawione wyniki pozwalają przypuszczać, że obecność nesfatyny-1 oraz nesfatyny-2 może blokować wiązanie drugiego jonu  $\text{Mg}^{2+}$  do Nucb2. Największą różnicę we właściwościach obu badanych białek zaobserwowano w obecności jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Wyniki HDX-MS pokazały, że obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  wpływa na nesfatynę-1 oraz nesfatynę-2, zwiększając dostępność do rozpuszczalnika peptydów znajdujących się w motywie wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Dodatkowo przeprowadzone analizy SV-AUC oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM, ang. *transmission electron microscopy*) pokazały, że w obecności jonów  $\text{Zn}^{2+}$  o stężeniach równych oraz większych niż 0,3 mM dochodzi do tworzenia się oligomerów wyższego rzędu Nucb2 oraz precypitacji białka. Natomiast, nesfatyna-3 wykazuje mniejszą wrażliwość na wysokie stężenie jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Nie obserwowano wytrącania się białka nawet przy wysokich stężeniach jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Co więcej, badania ITC pokazały, że nesfatyna-3 wiąże trzy jony  $\text{Zn}^{2+}$ , przy czym pierwszy jon jest wiązany ze stałą wiązania rzędu nanomolarnego. Jest to zaskakujący rezultat, ze względu na brak w tym białku znanego motywu wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Otrzymane wyniki sugerują udział fragmentu aminowego białka w tworzeniu oligomerów oraz precypitacji Nucb2 zależnej od jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Najprawdopodobniej, nieuporządkowany charakter obu białek jak i zmiana strukturalna zachodząca w obecności różnych jonów metali warunkuje ich udział w różnorodnych procesach biologicznych. Co ciekawe, izolowana nesfatyna-3, odznacza się nowymi właściwościami molekularnymi, których nie wykazywała gdy stanowiła fragment Nucb2. Przedstawiona w pracy molekularna charakterystyka białek pozwala na wytyczenie nowych ścieżek badań skupiających się na poznaniu ich funkcji oraz regulacji ich aktywności.

## SUMMARY

Nucleobindin-2 (Nucb2) is a multidomain protein, which can be proteolytically cleaved to three peptides: nesfatin-1, -2 and -3. The tertiary structure of the protein includes two EF hand domains, which are responsible for binding  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions, located in nesfatin-3 sequence. In addition, in nesfatin-1 sequence, we can distinguish a putative  $\text{Zn}^{2+}$  ion binding motif. Interestingly, only the role of nesfatin-1 has been identified so far. Nesfatin-1 administered intraventricularly to the rodents inhibits its appetite, suggesting a possible role of the protein in the treatment of obesity. Currently, both the characteristics and the role of the other two nesfatins are unknown. Nucb2 is highly expressed in both the nervous system and peripheral tissues. Interestingly, it has been shown that Nucb2 is involved in many physiological processes, e.g. the regulation of insulin secretion or the control of reproductive process. The structure of Nucb2 is most likely responsible for the multifunctionality of the protein.

The aim of the study was the molecular characterization of Nucb2 and nesfatin-3 from *Gallus gallus*. As the Nucb2 homologues share 85% amino acid sequence similarity, the results of studies conducted on one homologue can be applied to the other homologues. The conducted research was interdisciplinary. The techniques from biochemistry, biophysics and genetic engineering were used during the work. The research was conducted at the Wroclaw University of Science and Technology and Adam Mickiewicz University in Poznań. The research started with the development of an effective method for expressing and purifying both proteins, which allowed for further *in vitro* analyses. *In silico* analyses of Nucb2 sequence showed that Nucb2 has a *mosaic-like* structure consisting of intertwining globular and disordered fragments. The disordered fragments are especially present in nesfatin-3. Circular dichroism (CD), fluorescence and sedimentation velocity analytical ultracentrifugation (SV-AUC) analyses of Nucb2 have clearly shown that Nucb2 and nesfatin-3 belong to the family of partially disordered proteins. In addition, the results of the hydrogen-deuterium exchange coupled with mass spectrometry (HDX-MS) analysis showed that the Nucb2 protein can be divided into two parts: the amino terminal fragment (nesfatin-1 and -2), with a structure consisting of intertwined ordered and disordered fragments and a completely disordered carboxyl terminal fragment (nesfatin-3).

Metal ions can modulate the structure of proteins, adapting it to perform functions in various physiological processes. Subsequent analyses were aimed at examining the effect of natural protein ligands,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions, on both analyzed proteins. Analyses of CD, limited proteolysis and SV-AUC showed that both proteins are compacted in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. HDX-MS results showed that in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  ions, two loops of EF hand domains

undergo compaction.  $Mg^{2+}$  ions affect the oligomeric state of both proteins leading to its dimerization. Interestingly, the thermodynamic analysis of the interactions of both proteins with  $Mg^{2+}$  ions using isothermal titration calorimetry (ITC) determined that Nucb2 binds one  $Mg^{2+}$  ion. On the other hand, isolated nesfatin-3 is characterized by the presence of two identical  $Mg^{2+}$  binding sites. The presented results suggest that the presence of nesfatin-1 and -2 may structurally block the binding of the second  $Mg^{2+}$  ion to the Nucb2. The greatest difference in the properties of both tested proteins was observed in the presence of  $Zn^{2+}$  ions. HDX-MS results showed that the presence of  $Zn^{2+}$  ions affects the nesfatin-1 and nesfatin-2, increasing solvent accessibility of peptides located in the  $Zn^{2+}$  ion binding motif. In addition, SV-AUC and transmission electron microscopy (TEM) results showed that the presence of an equal and higher concentration of  $Zn^{2+}$  ions than 0,3 mM induces high-order oligomers formation and precipitation of Nucb2. On the other hand, nesfatin-3 is less sensitive to high concentrations of  $Zn^{2+}$  ions. Protein precipitation in the presence of higher  $Zn^{2+}$  ions concentration was not observed. Moreover, ITC studies have shown that nesfatin-3 binds three  $Zn^{2+}$  ions, with the first ion bound with nanomolar dissociation constant. This is a surprising result due to the lack of a known  $Zn^{2+}$  ion binding motif in nesfatin-3 sequence. The obtained results suggest the participation of the amino terminal fragment of Nucb2 in the  $Zn^{2+}$ -dependent oligomers formation and precipitation of Nucb2. Most likely, both the disordered nature of both proteins and the structural change occurring in the presence of various metal ions determine their participation in various biological processes. Interestingly, isolated nesfatin-3 is characterized by new molecular properties, which has not been shown when the protein was part of Nucb2. The molecular characteristics of both proteins presented in the thesis allow for setting new paths of research focused on understanding the functions of proteins and regulating their activity.

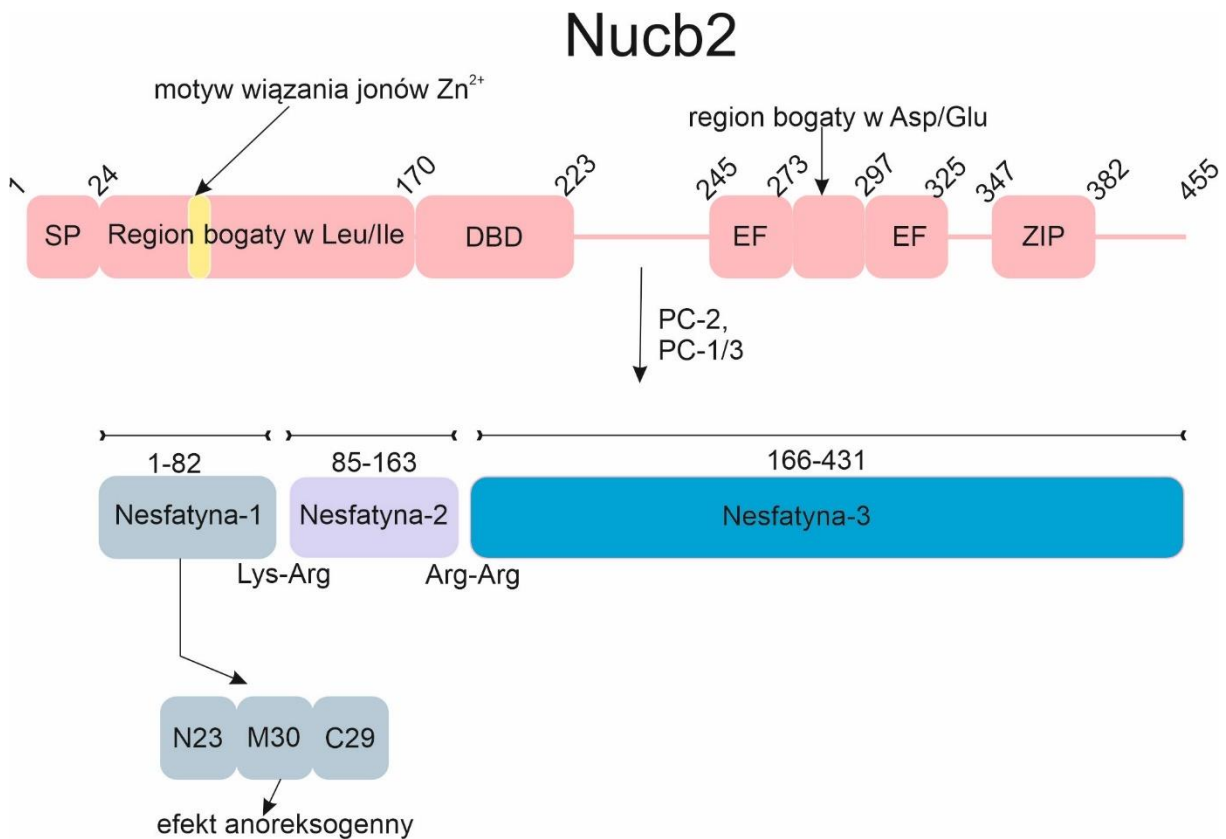
# 1 WSTĘP

## 1.1 NUKLEOBINDYNA-2

Nukleobindyny są klasą białek wiążących jony  $\text{Ca}^{2+}$ /cząsteczki DNA, które spełniają ważne role fizjologiczne. Do tej pory opisano dwie Nukleobindyny: Nukleobindynę-1 (Nucb1, ang. *Nucleobindin-1*) (1) oraz Nucb2 (2). Odznaczają się one 62% podobieństwem sekwencji aminokwasowej (3). Nucb2 jest białkiem sekrecyjnym odkrytym w linii komórkowej ostrej białaczki limfoblastycznej KM3 (2). Nucb2 posiada budowę multidomenową (2), na którą składają się: peptyd sygnałowy, domena bogata w Leu/Ile, domena wiążąca DNA (DBD, ang. *DNA-binding domain*), dwie domeny dłoni EF (Rozdział 1.1.1), odpowiedzialne za wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ , fragment bogaty w aminokwasy kwaśne oraz motyw zamka leucynowego (ZIP, ang. *leucine zipper motif*) (Rozdział 1.1.3) (Rys. 1.1) (2).

Sekwencja Nucb2 zawiera potencjalne miejsca trawienia przez konwertazy prohormonów. Miejsca trawienia stanowią pary aminokwasów zasadowych, Lys-Arg oraz Arg- Arg (4). Nucb2 może być potranslacyjnie trawione przez konwertazy prohormonów- 1/- 2/- 3 do trzech peptydów: nesfatyny-1 (reszty aminokwasowe 1-82 z sekwencji Nucb2), nesfatyny-2 (reszty aminokwasowe 85-163) oraz nesfatyny-3 (reszty aminokwasowe 166-396) (4) (Rys. 1.1). Do tej pory udało się poznać kilka fizjologicznych funkcji nesfatyny-1 (4, 5). Rola dwóch pozostałych segmentów Nucb2 nie została do tej pory opisana. Wykazano, że dokomorowe podanie nesfatyny-1 gryzoniom wywołuje zahamowanie uczucia łaknienia (4). Dokładny mechanizm tego działania nesfatyny-1 nie został do końca poznany, jednak istnieją dwie hipotezy. Według pierwszej, mechanizm inhibicji uczucia łaknienia niezależny od leptyny, związany jest z podwzgórzowym szlakiem melanokortynowym (6). Natomiast zgodnie z drugą, nesfatyna-1 uczestniczy w hamowaniu neuronów neuropeptydu Y (7). Przypuszcza się, że nesfatyna-1 może w przyszłości być wykorzystywana w terapii otyłości. Na podstawie struktury drugorzędowej, nesfatynę-1 można podzielić na 3 segmenty: fragment na końcu aminowym, składający się z 23 reszt aminokwasowych (N23), fragment środkowy, złożony z 30 reszt aminokwasowych (M30) oraz fragment znajdujący się na końcu karboksylowym o długości 29 reszt aminokwasowych (C29) (Rys. 1.1) (8). Przeprowadzone badania pokazały, że M30 wykazuje działanie anoreksogenne u myszy, co sugeruje, że jest on częścią nesfatyny-1 odpowiedzialną za regulację łaknienia (8).

Sekwencja ludzkiego Nucb2 składa się z 420 reszt aminokwasowych (w tym 24 reszty aminokwasowe peptydu sygnałowego). Sekwencja Nucb2 z Kura bankiwy (*Gallus gallus*), obiektu badawczego pracy doktorskiej składa się z 455 reszt aminokwasowych (w tym 24 reszty aminokwasowe peptydu sygnałowego). Homologi kurzy oraz ludzki wykazują największe zróżnicowanie w sekwencji nesfatyny-3. W przypadku białka kurzego, sekwencja nesfatyny-3 jest dłuższa o 35 reszt aminokwasowych.



**Rysunek 1.1 Wielodomenowa budowa Nucb2**

*Nucb2* charakteryzuje się budową wielodomenową, w której skład wchodzi: peptyd sygnałowy (SP), domena bogata w Leu/Ile, domena wiążąca DNA (DBD), dwie domeny dłoni EF, fragment bogaty w aminokwasy kwaśne oraz motyw zamka leucynowego (ZIP). *Nucb2* może być trawione przez konwertazy prohormonów (PC-1/3/2) do trzech peptydów: nesfatyny-1, -2 oraz -3. Tylko rola nesfatyny-1 została do tej pory poznana. U gryzoni peptyd ten wykazywał efekt anoreksogenny. Pokazano, że część środkowa nesfatyny-1 (M30) jest odpowiedzialna za hamowanie uczucia łaknienia. Podział domenowy został zaprezentowany zgodnie z resztami aminokwasowymi *Nucb2* z *Gallus gallus*. Rysunek został opracowany na podstawie (2).

### 1.1.1 Motyw dłoni EF oraz wiązanie jonów $\text{Ca}^{2+}$ przez Nucb2

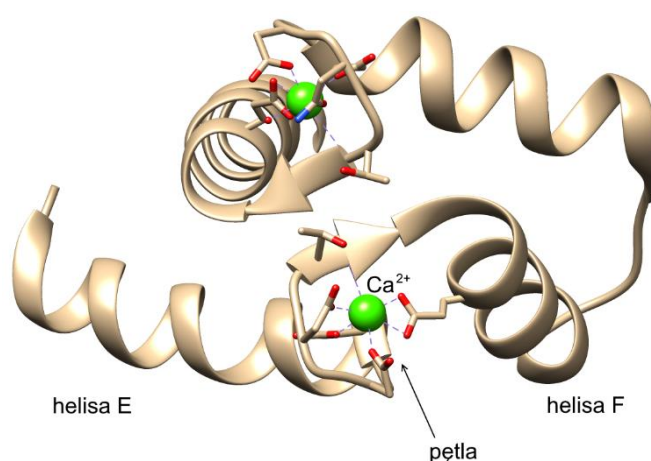
Motyw dłoni EF jest najczęściej występującym w białkach motywem wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  składającym się z 30 reszt aminokwasowych. Dodatkowo niektóre białka posiadające ten motyw są w stanie wiązać jony  $\text{Mg}^{2+}$  (9). Motywy dłoni EF zazwyczaj występują w parach (10) i w konsekwencji cząsteczki białka najczęściej zawierają dwa, cztery lub sześć takich motywów.

Motyw dłoni EF został po raz pierwszy opisany w strukturze parwalbuminy i składa się z dwóch prawie prostopadłych  $\alpha$ -helis (helisa E oraz helisa F) oddzielonych od siebie pętlą złożoną z 12 reszt aminokwasowych (Rys. 1.2) (11, 12). Jony  $\text{Ca}^{2+}$  są jonami „twardymi” i oddziałują z ligandami poprzez oddziaływania jonowe (13). Atomem koordynacyjnym w domenach dłoni EF jest tlen grup karboksylowych łańcuchów bocznych Asp oraz Glu. W standardowej pętli domeny dłoni EF, jon  $\text{Ca}^{2+}$  jest koordynowany przez siedem ligandów (pięć pochodzących z pętli oraz dwóch z helisy F) ułożonych w kształt pięciokątnej bipiramidy (12). Kilka reszt aminokwasowych znajdujących się w sekwencji pętli przyczynia się do odpowiedniego sfałdowania oraz stabilizacji struktury domeny dłoni EF. Jedną z nich jest zachowana reszta Gly w pozycji szóstej pętli, która umożliwia zachowanie pozostałym ligandom  $\text{Ca}^{2+}$  odpowiednich pozycji (14). W 90% przypadków w pozycji dwunastej pętli znajduje się reszta Glu, której obecność jest wymagana do przyjęcia geometrii pięciokątnej bipiramidy (10). Zastąpienie reszty Glu prowadzi do zmiany geometrii jony  $\text{Ca}^{2+}$  - ligand. Substytucja resztą Asp powoduje znaczne zmniejszenie się powinowactwa do jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (15).

**Tabela 1.1 Sekwencja aminokwasowa pętli dwóch domen dłoni EF białka Nucb2**

W tabeli przedstawiono sekwencję aminokwasową pętli dwóch domen dłoni EF Nucb2. Kolorem czerwonym oznaczono aminokwasy kwasowe, natomiast kolorem niebieskim aminokwasy zasadowe.

Pozycja	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
EF1	Asp	Val	Asn	Asn	Asp	Arg	Phe	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu
EF2	Asp	Ile	Asn	Lys	Asp	Arg	Leu	Val	Thr	Leu	Glu	Glu



**Rysunek 1.2 Budowa domeny dłoni EF znajdującej się w fragmencie aminowym kalmoduliny z Gallus gallus** Domena dłoni EF składa się z dwóch  $\alpha$ -helis (helisy E oraz F), które są oddzielone pętlą. W pętli znajdują się miejsca wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$ . Najczęściej w białkach motywy dłoni EF występują w parach. Rysunek został opracowany w programie UCSF Chimera (16) na podstawie (17) (PDB ID:1UP5).

Białko Nucb2 w swojej strukturze trzeciorzędowej zawiera dwie domeny dłoni EF, które są oddzielone regionem bogatym w kwaśne reszty aminokwasowe (2). Co ciekawe, w sekwencji obu pętli domen dłoni EF Nucb2 szóstą resztę stanowi Arg zamiast zachowanej Gly (Tab. 1.1), co może wpływać na sposób wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez Nucb2.

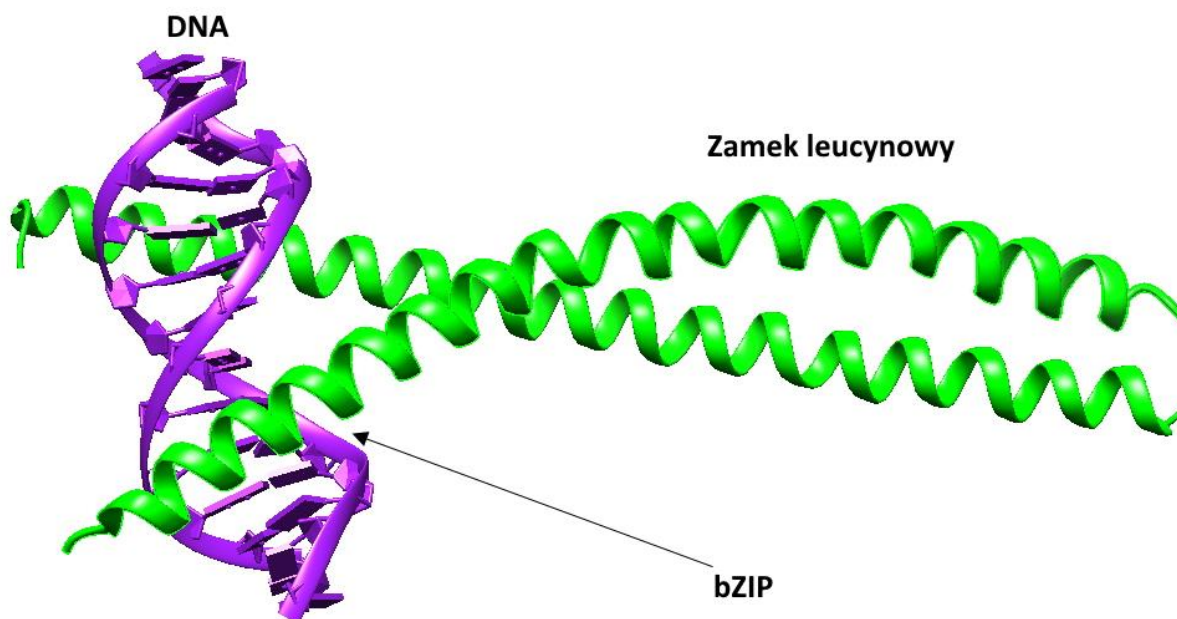
### 1.1.2 Motyw wiązania jonów $\text{Zn}^{2+}$

Nucb1, paralog białka Nucb2, zawiera w swoim fragmencie aminowym dwa motywy odpowiedzialne za wiązanie jonów  $\text{Zn}^{2+}$ : HFREX<sub>n</sub>H oraz HFTEX<sub>n</sub>H (18). Motywy te są bardzo podobne do miejsc aktywnych występujących w rodzinie karboksypeptydaz A (18). Dwie reszty His oraz jedna reszta Glu wiążą jony  $\text{Zn}^{2+}$  (18). Pokazano, że białko Nucb1 odznacza się wysokim powinowactwem do tych jonów (dwa miejsca wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$  o  $K_d = 32$  nm), co wskazuje na możliwość pełnienia przez Nucb1 roli sensora  $\text{Zn}^{2+}$ , który może reagować na zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $\text{Zn}^{2+}$  (18). Dodatkowo pokazano, że jony  $\text{Zn}^{2+}$  modulują strukturę Nucb1, prowadząc do inhibicji jego aktywności proteolitycznej (18). Co ciekawe, analiza sekwencji pokazała, że we fragmencie aminowym Nucb2 znajduje się tylko jeden motyw wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$  (HFREX<sub>n</sub>H) (Rys. 1.1). Może to wskazywać na różny od Nucb1, sposób oddziaływania z jonami  $\text{Zn}^{2+}$ .

### 1.1.3 Domena wiążąca DNA oraz motyw zamka leucynowego

Motyw zamka leucynowego (ZIP, ang. *leucine zipper motif*) powszechnie występuje w czynnikach transkrypcyjnych, ale także w innych białkach (19). ZIP bierze udział w specyficznym wiązaniu DNA oraz w oddziaływaniu białko-białko (20). Motyw ten tworzą okresowe powtórzenia reszty Leu, w każdej siódmej pozycji aminokwasowej (19). Łańcuch polipeptydowy ZIP charakteryzuje się  $\alpha$ -helikalną konformacją (20). Dwie równoległe helisy splatają się ze sobą tworząc motyw superhelikalny (ang. *coiled -coil*), co ułatwia dimeryzację białek (Rys.1.3) (20). W białkach posiadających ZIP, obecny jest także zasadowy region 20 reszt aminokwasowych, który sąsiaduje z końcem aminowym ZIP (20). Jest on nazywany zasadowym regionem zamka leucynowego bZIP (ang. *basic region leucine zipper*) (Rys. 1.3). bZIP ułatwia wiązanie DNA poprzez oddziaływanie z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi DNA (20). ZIP w białkach występuje również obok innych motywów wiążących DNA m.in. motywu helisa-pętla-helisa (HLH, ang. *helix-loop-helix*) (20).





**Rysunek 1.3 Model bZIP związanego z cząsteczką dsDNA**

Model został opracowany na podstawie struktury bZIP czynnika transkrypcyjnego PAP1 związanego z DNA (PDB ID: 1GD2) (21) w programie UCSF Chimera (16). Każdy z monomerów bZIP składa się z długiej  $\alpha$ -helisy. Region zasadowy wiążący cząsteczkę DNA znajduje się na końcu aminowym helisy. Natomiast koniec karboksylowy tworzy zamek leucynowy, który dimeryzuje tworząc równoległy motyw superhelikalny.

Analiza struktury pierwszorzędowej Nucb2 pozwoliła na zdefiniowanie złożonego motywu strukturalnego: „region zasadowy/HLH/region bogaty w aminokwasy kwaśne/HLH/ZIP” (2). Motyw: „region zasadowy/HLH/ZIP” jest obecny w wielu czynnikach transkrypcyjnych, co sugeruje, że białka te i Nucb2 mogą być homologami (2). Jednakże w przypadku tych białek wiążących DNA, region zasadowy bezpośrednio poprzedza ZIP, co nie jest obserwowane w strukturze białka Nucb2 (2). Taka różnica w budowie ZIP Nucb2 może świadczyć o innym niż klasyczny mechanizm wiązania cząsteczki DNA (2). Taki sam motyw strukturalny znajduje się w białku Nucb1. Zarówno Nucb2 jak i Nucb1 prawdopodobnie mogą tworzyć nową klasę białek wiążących DNA z motywem strukturalnym „region zasadowy/HLH/region bogaty w aminokwasy kwaśne/HLH/ZIP” (2).

#### 1.1.4 Wielofunkcyjność białka Nucb2

Nucb2/nesfatyna-1<sup>1</sup> charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji w centralnym układzie nerwowym (4) m.in. w częściach podwzgórza: w jądrze nadwzrokowym, łukowatym, przykomorowym oraz bocznym podwzgórzu, które są odpowiedzialne za regulację łaknienia (4) oraz w przysadce mózgowej (22). Nesfatyna-1 może pokonywać barierę krew-mózg (23).

<sup>1</sup> Komercyjnie dostępne przeciwciała wykrywają nie tylko nesfatynę-1, ale również mogą reagować z Nucb2, co nie pozwala na odróżnienie obu białek w testach skupiających się na badaniu występowania nesfatyny-1 (22).



Pokazano także, że Nucleob2/nesfatyna-1 jest zaangażowana w regulację stresu (24, 25), emocji oraz zachowania (26, 27). Dodatkowo sugeruje się, że Nucleob2/ nesfatyna-1 może być związana z rozwojem różnych zaburzeń psychicznych takich jak epizod maniakałny (28), zaburzenia lękowe (29) czy depresja (30).

Jak pokazano, do ekspresji Nucleob2/nesfatyny-1 dochodzi także w licznych tkankach obwodowych takich jak serce (31, 32), układ pokarmowy (33), układ rozrodczy (34), tkanka tłuszczowa (35) oraz w komórkach  $\beta$  trzustki (36). Tak szerokie występowanie Nucleob2/nesfatyny-1 może wskazywać na rolę tych białek w procesach utrzymania homeostazy organizmu. Najwyższą ekspresję Nucleob2 mRNA odnotowano w żołądku szczura (37). Poziom ekspresji był 10-krotnie wyższy w porównaniu do ekspresji w mózgu (37). Obecność Nucleob2/nesfatyny-1 wykryto w komórkach endokrynych X/A, które są odpowiedzialne za produkcję greliny, hormonu stymulującego łaknienie (37). Pod wpływem greliny dochodzi do zmniejszenia się poziomu ekspresji Nucleob2 mRNA, co wskazuje na jej inhibitorowe działanie na Nucleob2 (38). Jednak mechanizm zahamowywania działania Nucleob2 przez grelinę nie został do tej pory poznany. Dodatkowo Nucleob2/nesfatyna-1 wpływa na regulację funkcji układu pokarmowego. Domózgowe podanie nesfatyny-1 wywoływało u szczurów zahamowanie wydzielania kwasu żołądkowego (39) oraz ochronę błony śluzowej żołądka przed uszkodzeniem wywołanym stresem czy substancjami takimi jak etanol (40).

Wysoki poziom ekspresji Nucleob2/nesfatyny-1 został zlokalizowany wraz z insuliną w komórkach  $\beta$  wysepek Langerhansa (36, 41). Nucleob2 może indukować uwalnianie insuliny wraz z redukcją poziomu glukozy we krwi (42, 43). Co ciekawe, stymulacja Nucleob2/nesfatyną-1 komórek trzustkowych prowadziła do zwiększenia wydzielania glukagonu (44). Dodatkowo poziom ekspresji Nucleob2/nesfatyny-1 był zmniejszony u pacjentów z cukrzycą typu 2 (44). Co ważne, zmniejszenie ekspresji Nucleob2/nesfatyny-1 obserwowano także u nowo zdiagnozowanych pacjentów (45). Przedstawione dane sugerują potencjalną rolę Nucleob2/nesfatyny-1 jako biomarkera we wczesnej diagnostyce cukrzycy.

Nucleob2/nesfatyna-1 ulega ekspresji w układzie rozrodczym. Nucleob2/nesfatynę-1 wykryto w jądrach gryzoni oraz ludzi (46), dokładniej w komórkach śródmiąższowych jąder m.in. w komórkach Leydiga (47). Ekspresję Nucleob2/nesfatyna-1 zaobserwowano również w komórkach osłonkowych pęcherzyka Graffa, w jajnikach oraz macicy (48, 49). Pokazano, że Nucleob2/nesfatyna-1 występująca w miejscu implantacji zarodka w macicy może brać udział w procesie podtrzymania ciąży (49). Poziom ekspresji Nucleob2/nesfatyny-1 w jajnikach oraz

macicy myszy ulega zmianie podczas cyklu rozrodczego, przyjmując najwyższą wartość w fazie rui właściwej (50). Dodatkowo stężenie Nucb2/nesfatyny-1 może być kontrolowane przez gonadotropiny takie jak hormon folikulotropowy oraz hormon luteinizujący oraz sterydowe hormony płciowe takie jak  $17\beta$ -estradiol (50). Powyższe wyniki sugerują, że Nucb2/nesfatyna-1 może być zaangażowana w regulację funkcji jajników oraz macicy.

Ekspresję Nucb2/nesfatyny-1 zaobserwowano także w ludzkiej oraz mysiej tkance tłuszczowej (51). Podskórna tkanka tłuszczowa wykazywała znacznie wyższy poziom ekspresji Nucb2/nesfatyny-1 niż trzewiowa tkanka tłuszczowa (51). Nucb2/nesfatyna-1 występowała zarówno w pre- jak i po-adipocytach, a jej ekspresja wzrastała podczas procesu różnicowania się komórek tłuszczowych, co sugeruje udział białka w procesie rozwoju i różnicowaniu adipocytów. Dodatkowo ekspresja Nucb2/nesfatyny-1 obecnej w tkance tłuszczowej oraz cyrkulującej w krwi była podwyższona u myszy będących na diecie wysokotłuszczowej (51), co może wskazywać na udział białka w procesie akumulacji lipidów oraz indukowanej dietą otyłości. Jednakże ograniczenie pokarmu wywołało zmniejszenie się ilości mRNA Nucb2/nesfatyny-1 w mysiej tkance tłuszczowej, co sugeruje, że poziom ekspresji Nucb2/nesfatyny-1 może być zależny od zapasu energetycznego tkanki (51). Pokazano, że cytokiny, insulina oraz kortykosteroidy także mogą regulować ilość Nucb2/nesfatyny-1 obecnej w tkance tłuszczowej, prowadząc do zwiększenia poziomu ekspresji Nucb2/nesfatyny-1 (51). Przedstawione powyżej obserwacje sugerują, że Nucb2/nesfatyna-1 może pełnić rolę adipocytokiny ekspresjonowanej w podskórnej tkance tłuszczowej oraz adipocytach (51).

Nucb2/nesfatyna-1 może także wpływać na funkcję serca (31). Nucb2/nesfatyna-1 jest ekspresjonowana w tkance sercowej (31), gdzie bierze udział w ochronie przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym serca poprzez uwolnienie dehydrogenazy laktozowej oraz zmniejszenie rozmiaru zawału i przykurczu niedokrwienno (31).

**Tabela 1.2 Podsumowanie udziału Nucb2/nesfatyny-1 w procesach fizjologicznych różnych tkanek i narządów**

<b>Część organizmu</b>	<b>Rola Nucb2/nesfatyny-1</b>	<b>Literatura</b>
<b>Mózg</b>	Hamowanie łaknienia, regulacja stresu oraz emocji, rozwój zaburzeń psychicznych	(4, 27)
<b>Tkanka tłuszczowa</b>	Rozwój oraz różnicowanie adipocytów	(35)
<b>Serce</b>	Ochrona przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym serca, zmniejszenie rozmiaru zawału serca	(31, 32)
<b>Układ pokarmowy</b>	Zahamowanie wydzielania kwasu żołądkowego, ochrona błony śluzowej żołądka	(39, 40)
<b>Układ rozrodczy</b>	Podtrzymanie ciąży, regulacja funkcji macicy oraz jajników	(49, 50)
<b>Trzustka</b>	Stymulacja wydzielania insuliny oraz glukagonu	(36, 43, 52)

#### 1.1.4.1 Rola białka Nucb2 w procesie nowotworowym

Badania dotyczące Nucb2/nesfatyny-1 nie ograniczają się tylko do funkcji fizjologicznych (Tab. 1.2). W ostatnich latach wiele badań ujawniło, że białko odgrywa także ważną rolę w procesach nowotworowych. Wysoki poziom ekspresji Nucb2/nesfatyny-1 obserwowano w komórkach nowotworowych piersi (53), jelita grubego (54), prostaty (55, 56), endometrium (57) oraz komórek nerkowych (rak nerkowokomórkowy) (58–60). Podwyższona ekspresja Nucb2/nesfatyna-1 była wiązana z proliferacją oraz przerzutami nowotworów (54, 56, 58). Dodatkowo nadekspresja białka Nucb2/nesfatyny-1 była łączona ze złą prognozą. Pacjenci z wysokim poziomem ekspresji Nucb2/nesfatyny-1 w komórkach nowotworowych odznaczali się niższym wskaźnikiem przeżycia (58, 61) oraz zwiększonym ryzykiem nawrotu choroby nowotworowej (53). Sugeruje się możliwość użycia wysokiego poziomu ekspresji

Nucb2/nesfatyny-1 jako czynnika prognozującego w diagnozie nowotworowej. Dodatkowo pokazano, że białko Nucb2/nesfatyna-1 bierze udział w rozwoju nowotworów oraz w ich metastazie. Nucb2/nesfatyna-1 stymuluje proliferację, przemieszczanie się oraz inwazję komórek nowotworowych pęcherza moczowego (61). Podobne, indukujące działanie białka Nucb2/nesfatyny-1 obserwowano także dla komórek nowotworowych piersi (53), jelita grubego (54) oraz komórek nowotworu brodawkowego tarczycy (62). Obecność Nucb2/nesfatyny-1 w przypadku komórek nowotworowych żołądka (63) oraz endometrium (57) również wpływa stymulująco na proces proliferacji oraz przemieszczania się komórek. Mechanizm wpływu Nucb2/nesfatyny-1 na komórki nowotworowe nie został szczegółowo poznany. Jednakże badania przeprowadzone na komórkach nowotworowych jelita grubego wykazały, że Nucb2/nesfatyna-1 pośredniczy w przejściu epitelialno-mezenchymalnym (EMT, ang. *epithelial-mesenchymal transition*). Ponadto, pokazano, że supresja ekspresji Nucb2/nesfatyny-1 w komórkach nowotworowych jelita grubego prowadziła do zmniejszenia poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych biorących udział w EMT: białka ZEB1 (ang. *zinc finger E-box binding homeobox 1*), białka Twist (ang. *twist family bHLH transcription factor 1*) oraz Slug (ang. *snail family zinc finger 2*) (54). Obserwowano także, że wyciszenie ekspresji genu *Nucb2* prowadziło do zwiększenia fosforylacji wątrobowej kinazy K1 (LKB1, ang. *liver kinase B1*), kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK, ang. *5'AMP-activated protein kinase*) oraz kinazy mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) (54). Nucb2/nesfatyna-1 poprzez szlaki LKB1/AMPK/mTORC1/ZEB1 (54) przyczynia się do indukcji EMT oraz powstawania przerzutów nowotworowych. Udział Nucb2/nesfatyny-1 w indukcji EMT został także zaobserwowany w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuc (64). Badania wskazują także na możliwy udział Nucb2/nesfatyny-1 w procesie metastazy komórek czerniaka poprzez indukcję stresu retikulum endoplazmatycznego (65). Przedstawione powyżej obserwacje sugerują, że Nucb2/nesfatyna-1 odgrywa znaczącą funkcję w procesie rozwoju nowotworów. Działanie białka odbywa się z udziałem wielu ścieżek sygnałowych, co czyni je ważnym celem terapeutycznym.

Co ciekawe, w przypadku nowotworu komórek nabłonka jajnika (66) oraz kory nadnerczy (67), zaobserwowano inhibicję procesu proliferacji komórek oraz indukcję ich apoptozy przez Nucb2/nesfatynę-1. Podobnie jak w przypadku indukcji progresji choroby nowotworowej, hamowanie rozwoju komórek nowotworowych zachodzi z udziałem różnych ścieżek sygnałowych. W komórkach nowotworu nabłonka jajnika, Nucb2/nesfatyna-1 bierze udział w indukcji apoptozy poprzez ścieżkę mTOR/RhoA/ROCK (ang. *Ras homologue gene family*

*member A/Rho-associated coiled-coil-containing kinases*) (66). W przypadku nowotworu kory nadnerczy, działanie pro-apoptotyczne Nucb2/nesfatyny-1 zachodzi poprzez wzmocnienie ścieżki JNK-1/2/p38MAPK (ang. *c-Jun N-terminal kinases-1 and -2/p38 mitogen-activated protein kinases*) oraz zahamowanie działania szlaku sygnałowego Ras/Raf/MEK/ERK (67).

Wszystkie do tej pory znane oddziaływania Nucb2 z partnerami białkowymi były związane z procesami nowotworowymi (68–70). Analizy z wykorzystaniem drożdżowego systemu dwuhybridowego oraz ko-immunoprecypitacji potwierdziły występowanie oddziaływania pomiędzy Nucb2 a aminopeptydazowym regulatorem uwalniania TNFR1 (ARTS-1, ang. *aminopeptidase regulator of TNFR1 shedding*) w ludzkich komórkach śródbłonki naczyniowej (68). Pokazano, że Nucb2 wraz z ARTS-1 bierze udział w uwalnianiu powierzchniowego błonowego receptora wiążącego czynnik martwicy nowotworów (TNFR1, ang. *tumour necrosis factor receptor*) (68). Do oddziaływania dochodzi pomiędzy domeną zewnątrzkomórkową ARTS-1 a domenami dłoni EF białka Nucb2 w obecności jonów  $Ca^{2+}$  (68). Kompleks ARTS-1 – Nucb2 jest kluczowy w procesie uwalniania TNFR1 (68). Nucb2 bierze prawdopodobnie udział w regulacji stężenia TNFR1, co może wpływać na procesy apoptozy, w których uczestniczy TNFR1.

Nucb2 zostało również scharakteryzowane jako białko wiążące białko Necdin poprzez fragment dwóch domen dłoni EF (69). Białko Necdin jest zlokalizowane w neuronach i bierze udział w hamowaniu wzrostu komórek nowotworowych (71, 72). Może również regulować aktywność transkrypcyjną poprzez wpływ na aktywność takich czynników transkrypcyjnych jak p53 oraz E2F1 (73). Co ciekawe, Necdin może wpływać na zwiększenie ekspresji Nucb2 w cytoplazmie (69). Dodatkowo oddziaływanie Nucb2 – Necdin spowodowało zwiększenie stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w cytoplazmie (69). Sugeruje się, że Nucb2 - Necdin poprzez zwiększenie stężenia jonów  $Ca^{2+}$  może regulować procesy zależne od jonów  $Ca^{2+}$  takie jak m.in. apoptoza (69).

Nucb2 może także oddziaływać z białkami G (70). Zarówno w sekwencji Nucb2 oraz Nucb1 zlokalizowano motyw wiążący oraz aktywujący białka  $G\alpha$ , tzw. motyw GBA, charakterystyczny dla białek uczestniczących w wymianie GDP na GTP (GEF, ang. *guanine nucleotide exchange factor*) (70). Motyw GBA składający się z 7 ewolucyjnie zachowanych reszt aminokwasowych, znajduje się we fragmencie karboksylowym drugiej domeny dłoni EF Nucb2 oraz Nucb1 (70). Motyw ten również występuje w innych białkach m.in. w białku GIV/Girdin (ang. *G $\alpha$ -interacting vesicle-associated protein*) oraz białku Daple, które charakteryzują się

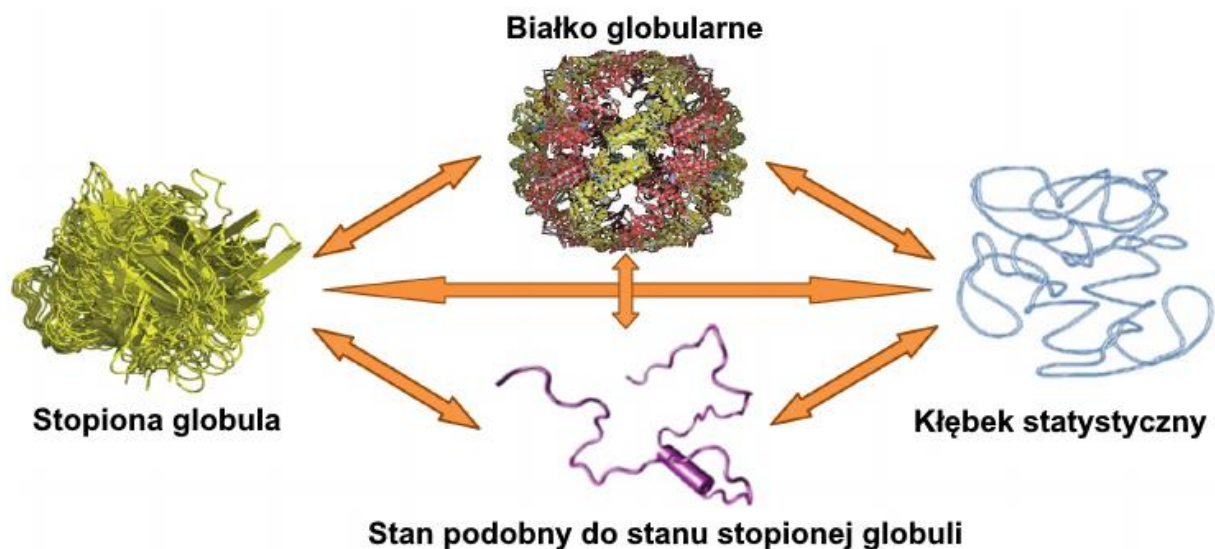
aktywnością GEF (74). Pokazano, że Nucb2 oraz Nucb1 wiążą się do nieaktywnej formy białka  $G_{\alpha 3}$  (GDP -  $G_{\alpha 3}$ ) poprzez motyw GBA (70), przy czym wiązanie to zwiększa aktywność GTPazową białka  $G_{\alpha 3}$  (70). Co ciekawe, jony  $Ca^{2+}$  hamują wiązanie Nucb2 oraz Nucb1 do białka  $G_{\alpha 3}$  zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (70). Pod wpływem jonów  $Ca^{2+}$ , dochodzi do zmiany strukturalnej Nucb2, co skutkuje zahamowaniem wiązania białka  $G_{\alpha 3}$  (70). Zmiana poziomu ekspresji oraz aktywności białek G i receptorów sprzężonych z białkami G (GPCRs, ang. *G-protein-coupled receptors*) jest bardzo często związana z procesami nowotworowymi (75). Na przykład, wysoka ekspresja białek posiadających motyw GBA (GIV/Girdin, Daple, Nucb1 oraz Nucb2) w krążących komórkach nowotworowych wyizolowanych z przerzutowego nowotworu jelita grubego związana jest z krótszym czasem bez nawrotu choroby (76). Białko GIV/Girdin zostało scharakteryzowane jako jedno z tzw. molekularnych „rheostatów” (74). Molekularne „rheostaty” mogą zwiększać transdukcję sygnału, zainicjowanego przez białka G oraz GPCR (74), co może prowadzić do dysfunkcji niektórych ścieżek sygnałowych, w konsekwencji prowadząc do metastazy nowotworowej (74). Postuluje się, że także Nucb2 może wpływać na rozwój nowotworów jako „rheostat” poprzez wzmacnianie aktywności ścieżek sygnałowych białek G (74).

Podsumowując, funkcja Nucb2/nesfatyny-1 w procesie nowotworzenia jest tkankowo-specyficzna. W zależności od miejsca występowania, Nucb2/nesfatyna-1 może wykazywać działanie anty- lub pro-apoptotyczne. Ponadto, na szczególną uwagę zasługują oddziaływania białka Nucb2 z partnerami molekularnymi, które mają wpływ na rozwój procesu nowotworowego.

## 1.2 BIAŁKA INHERENTNIE NIEUPORZĄDKOWANE

Białka inherentnie nieuporządkowane (IDPs, ang. *intrinsically disordered proteins*) przeciwstawiają się paradygmatowi, zgodnie z którym stabilna struktura trzeciorzędowa białka określa jego funkcję. IDPs pełnią swoje funkcje pomimo braku takiej zdefiniowanej struktury trzeciorzędowej w warunkach fizjologicznych (77). Brak struktury może dotyczyć całej cząsteczki białka lub tylko jego fragmentu tj. regionu inherentnie nieuporządkowanego (IDRs, ang. *intrinsically disordered regions*,) (77). IDPs/IDRs występują jako bardzo dynamiczne jednostki, zarówno na poziomie struktury drugo- jak i trzeciorzędowej (77). IDPs mogą występować w trzech różnych stanach strukturalnych (Rys. 1.4): stanie stopionej globuli (MG, ang. *molten globule*), stanie podobnym do stanu stopionej globuli (PMG, ang. *premolten globule-like*) oraz w stanie kłęбка statystycznego (ang. *random coil*). Stan MG jest najbardziej

kompaktowym stanem spośród trzech wymienionych powyżej (78). Białka w stanie MG charakteryzują się nienaruszoną strukturą drugorzędową, brakiem upakowanej oraz stabilnej struktury trzeciorzędowej oraz zwiększoną dostępnością regionów dla proteaz (79). Białka w stanie PMG podobnie jak białka w stanie MG nie posiadają struktury trzeciorzędowej jednakże zawierają szczątkową strukturę drugorzędową (80). Białka w stanie PMG wykazują mniejszy stopień upakowania niż białka w stanie MG, lecz charakteryzują się większym stopniem upakowania niż białka w stanie kłębka statystycznego. Stan kłębka statystycznego, najbardziej nieuporządkowany, charakteryzuje całkowity brak struktury drugorzędowej (80). Funkcja IDPs może wynikać z występowania tych stanów oraz przejścia pomiędzy nimi. IDPs/IDRs są szeroko rozpowszechnione w każdym z proteomów (81), na przykład stanowią one odpowiednio około 26% oraz 36% ludzkich białek (81).



**Rysunek 1.4 Stany konformacyjne białka**

*Funkcja białka wynika z przyjmowanej przez niego konformacji. Białka mogą należeć do rodziny białek globularnych lub IDPs. Białka z rodziny IDPs mogą przyjmować trzy różne stany strukturalne: MG, PMG oraz kłębka statystycznego. Rysunek został opracowany na podstawie (82).*

Podobnie jak w przypadku białek globularnych, których struktura jest określona przez ich sekwencję reszt aminokwasowych, tak IDPs/IDRs charakteryzują się specyficznym składem reszt aminokwasowych. IDPs/IDRs odznaczają się zwiększoną zawartością reszt obdarzonych ładunkiem połączoną z niską zawartością reszt hydrofobowych (83). Pokazano, że brak stabilnej struktury IDPs/IDRs jest spowodowany obecnością w tych białkach wielu nieskompensowanych naładowanych grup oraz niskiej zawartości reszt hydrofobowych. Niska średnia hydropatia oraz wysoki ładunek może przyczyniać się do braku struktury IDPs/IDRs w warunkach fizjologicznych (84). Wysoka dostępność sekwencji znajdujących się w IDRs ułatwia ich

modyfikacje potranslacyjne takie jak fosforylacja, acetylacja, ubikwitynacja czy sumoilacja (77). Podczas modyfikacji potranslacyjnej najczęściej dochodzi do zmian strukturalnych IDPs/IDRs takich jak stabilizacja/destabilizacja przejściowej struktury drugorzędowej lub fałdowanie się białek (85, 86), co pozwala na modulację funkcji białek. Na funkcje IDPs może mieć także wpływ proces alternatywnego splicingu (87).

Jedną z unikalnych właściwości IDPs jest ich zdolność do interakcji z wieloma partnerami białkowymi (88). IDPs są bardzo elastyczne i mogą modulować swoją strukturę w różny sposób po związaniu się z różnymi partnerami białkowymi (89). Na skutek wiązania partnerów, IDPs mogą ulegać fałdowaniu (90). IDPs często oddziałują z innymi białkami poprzez krótkie motywy sekwencyjne tzw. MORFs (ang. *molecular recognition features*) oraz SLIMs (ang. *short linear motifs*) (91). Motywy MORFs są regionami nieuporządkowanymi o długości do 70 reszt aminokwasowych (92), które ulegają fałdowaniu po związaniu do partnerów molekularnych (91, 92). MORFs można podzielić na cztery grupy w zależności od wzoru fałdowania, któremu ulegają:  $\alpha$ -MORFs tworzą  $\alpha$ -helisę,  $\beta$ -MORFs formują struktury  $\beta$ ,  $\tau$ -MORFs, tworzące nieregularne struktury oraz complex-MORFs, które tworzą mieszaninę struktur drugorzędowych (93). Motywy SLIMs są krótsze i zawierają od 3 do 10 reszt aminokwasowych (94). Są odpowiedzialne za pośredniczenie w oddziaływaniach białko-białko związanych ze szlakami sygnałowymi (95). W odróżnieniu od MORFs, SLIMs związane z partnerami białkowymi, mogą tworzyć zarówno fragmenty uporządkowane jak i nieuporządkowane (96).

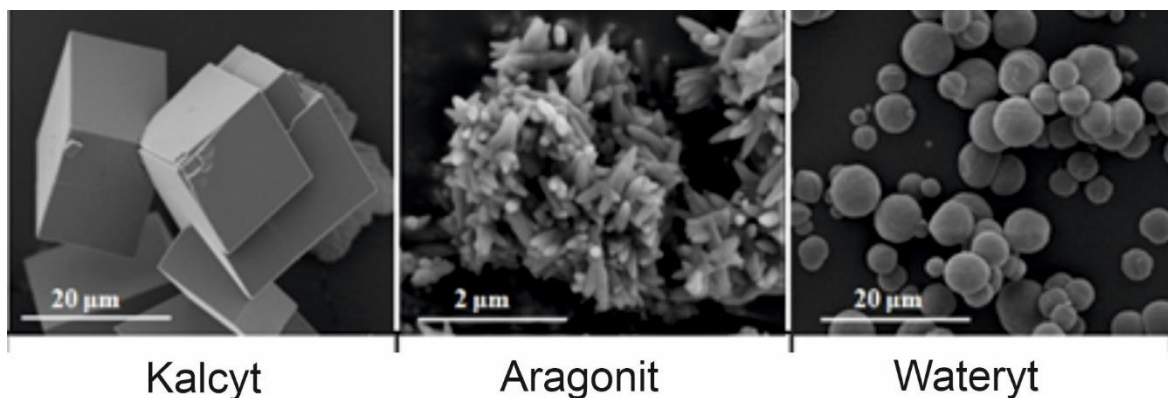
IDPs/IDRs pełnią główną rolę w sieci oddziaływań białkowych, działając jako tzw. białka węzłowe (ang. *hubs*), które wspomagają komunikację molekularną poprzez umożliwienie oddziaływania białko-białko (93). Białka węzłowe używają swoich IDRs do wiązania się z partnerami molekularnymi. Istnieją dwa mechanizmy takiego oddziaływania (97). W pierwszym z nich jeden IDR wiąże się do wielu partnerów białkowych. Natomiast w drugim dochodzi do wiązania wielu IDRs przez jednego partnera molekularnego (97). IDPs są w stanie wiązać wielu partnerów białkowych z wysoką specyficznością oraz niskim powinowactwem (97), dzięki czemu mogą uczestniczyć w procesach molekularnych takich jak przekazywanie sygnału, transkrypcja i translacja czy regulacja cyklu komórkowego (78). Stężenie IDPs w komórkach jest ściśle regulowane. Biorąc pod uwagę kluczową rolę jaką odgrywają IDPs, ich mutacje oraz odbiegające od normy stężenia tych białek w komórce są związane ze stanami chorobowymi, jak na przykład z nowotworami, chorobami układu krążenia, chorobami neurodegeneracyjnymi oraz cukrzycą (98). Choroby neurodegeneracyjne oraz amyloidozy stanowią największą grupę chorób związanych z anormalną konformacją białek. Patogeneza tych



chorób wynika z niepoprawnego fałdowania białka tzn. braku uzyskania przez niego odpowiedniej funkcjonalnej konformacji. W konsekwencji IDP może ulegać agregacji, przez co traci swoją funkcję. Niektóre z białek posiadają skłonność do przyjmowania patologicznej konformacji, co staje się widoczne wraz ze zwiększonym stężeniem tych białek. Białkowe agregaty mogą wpływać na funkcję w poszczególnych tkankach oraz organach akumulując się w nich (98). Jednakże nie tylko niepoprawne fałdowanie się IDPs może przyczynić się do rozwoju chorób. Jak wspomniano powyżej, IDPs wykazują się strukturalną plastycznością. Przyjmowanie konformacji przez IDPs jest zależne od środowiska, którego zmiany mogą prowadzić do zaburzenia funkcji polegającej na nierozpoznawaniu partnerów białkowych oraz tworzenia niefunkcjonalnych agregatów (98).

### 1.3 BIOMINERALIZACJA

Biomineralizacja jest procesem tworzenia minerałów przez organizmy żywe. Powstałe w jego wyniku biominerały są strukturami składającymi się z frakcji nieorganicznej oraz organicznej. Biominerały nie tylko chronią organizmy żywe, czego przykładem są skorupy mięczaków (99), ramienionogów (100) czy skorupa jaja kurzego (101) ale również spełniają funkcje podporowe organizmów tak jak kości (102), spikule gąbek (103) czy szkielet koralowców (104). Biominerały formują także otokonia u ssaków i otolity u ryb wchodzące w skład narządu zmysłu słuchu oraz zmysłu równowagi (105). Wyróżnia się ponad 60 biominerałów biorąc pod uwagę ich frakcję nieorganiczną (106). Najbardziej znanymi biominerałami są te oparte na węglanie oraz fosforanie wapnia. Węglan wapnia jest najczęściej występującym minerałem w naturze (107). Wyróżnia się sześć znanych odmian polimorficznych węglanu wapnia: pięć krystalicznych oraz jedną amorficzną (108). Wśród form krystalicznych znajdują się trzy formy bezwodne różniące się symetrią struktury krystalicznej: trygonalny kalcyt, rombowy aragonit i heksagonalny wateryt (Rys. 1.5) oraz dwie uwodnione: monohydrokalcyt ( $\text{CaCO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ ) oraz heksahydrat znany jako ikait ( $\text{CaCO}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ) (108). Trygonalny kalcyt oraz rombowy aragonit najpowszechniej występują w naturze. Natomiast heksagonalny wateryt stanowi formę mniej stabilną oraz przejściową (108).



**Rysunek 1.5 Odmiany polimorficzne węglań wapnia**

Na rysunku przedstawiono morfologię bezwodnych form węglań wapnia: kalcytu, aragonitu oraz waterytu. Rysunek został opracowany na podstawie (104).

Czynnikami, które określają kształt, rozmiar, strukturę oraz właściwości biominerałów są zarówno frakcje nieorganiczne jak i macierz organiczna (109), która może zawierać substancje nierozpuszczalne oraz rozpuszczalne. Nierozpuszczalną macierz stanowią cząsteczki tworzące rusztowanie dla osadzającego się minerału np. chityna u bezkręgowców czy kolagen w kościach czy zębinie. Natomiast frakcję rozpuszczalną stanowią białka, najczęściej silnie naładowane ujemnie, zawierające wiele reszt Asp oraz Glu, które oddziałują z jonami  $\text{Ca}^{2+}$ , oraz te posiadające reszty modyfikowane potranslacyjnie, np. przez fosforylację. Białka mogą mieć zarówno wpływ bezpośredni jak i pośredni na proces biomineralizacji. Pośrednio mogą brać udział w transporcie oraz wiązaniu jonów lub oddziaływać z innymi białkami, co może skutkować ich zmianami strukturalnymi. Białka mogą również bezpośrednio wpływać na morfologię kryształów powstających biominerałów, a także modulować kinetykę oraz termodynamikę wzrostu kryształów poprzez oddziaływanie z ich powierzchnią. Białka są w stanie spełniać funkcje nukleatorów i prowadzić do zwiększenia rozmiarów zarodków kryształów czy nawet powstawania nowych zarodków (109). Dodatkowo mogą brać udział w regulacji procesu nukleacji, aby wpływać na sieć krystaliczną oraz orientację kryształów (109).

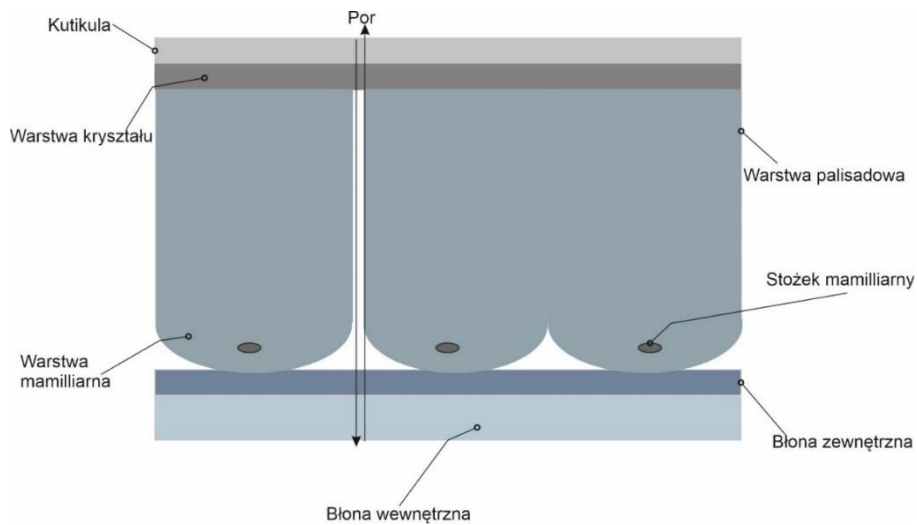
Większość białek, które są zaangażowane w proces biomineralizacji należy do rodziny IDPs (110). IDPs są białkami o charakterze kwasowym oraz asymetrycznym, wydłużonym kształcie, który zapewnia większą powierzchnię wiązania niż kompaktowa struktura białek globularnych. Cechy te mogą mieć znaczenie w hamowaniu wzrostu kryształów poprzez oddziaływanie białka z siecią krystaliczną (111). Jak już wcześniej było wspomniane, IDPs mogą oddziaływać z wieloma partnerami białkowymi, tworząc złożone kompleksy, co jest bardzo ważne w procesie prawidłowego tworzenia się biominerałów (77). Dodatkowo wiązanie

partnerów molekularnych przez IDPs może modulować strukturę białek, np. poprzez fałdowanie, co ułatwia oddziaływanie z innymi partnerami molekularnymi (112). Jony  $\text{Ca}^{2+}$  stanowią często kluczowy składnik biominerałów. Podczas pierwszej fazy biomineralizacji dochodzi do związania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  ze środowiska przez ujemnie naładowane reszty aminokwasowe (113). IDPs dzięki swojemu kwasowemu charakterowi oraz wydłużonej konformacji mogą wiązać duże ilości jonów dwuwartościowych, m.in. jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (79). IDPs mogą ulegać różnego rodzaju modyfikacjom potranslacyjnym, co pozwala na kontrolę ich oddziaływania z nierozpuszczalną macierzą oraz modulację ich roli w procesie biomineralizacji (114). Jednym z najczęściej spotykanych rodzajów modyfikacji jest fosforylacja, która pozwala na zmianę punktu izoelektrycznego białka oraz zwiększenie jego kwasowego charakteru (115, 116). Zawierające zmodyfikowane w ten sposób reszty aminokwasowe IDPs mogą bardziej efektywniej wiązać jony  $\text{Ca}^{2+}$  (117).

### 1.3.1 Białko Nucb2 a proces biomineralizacji

Skorupa jaja kurzego (Rys. 1.6) składa się z części mineralnej złożonej z kalcytu (> 96%), macierzy organicznej oraz magnezu, fosforu i różnych pierwiastków śladowych, które nadają jej odpowiednie mechaniczne właściwości (101). Proces tworzenia się skorupy jaja kurzego trwa około 17 h i jest podzielony na 3 etapy (101). Pierwszy etap odpowiada inicjacji biomineralizacji i trwa około 5 h. W jego trakcie dochodzi do osadzania się pierwszych kryształów kalcytu na powierzchni błon zewnętrznych skorupy jaja kurzego. Miejsca zarodkowania stają się zaczątkami dla stożków mamiliarnych (101). Drugi etap polega na tworzeniu warstwy palisadowej poprzez szybki wzrost kryształów kalcytu i zachodzi w czasie 10 h. Ostatni etap trwa około 1,5 h i odpowiada zakończeniu procesu mineralizacji (101). Podczas całego procesu dochodzi do osadzenia się 6 g węglanu wapnia (101). Mineralizacja skorupy jaja kurzego jest najszybszym znanym procesem biomineralizacyjnym, dzięki czemu może być wykorzystywana w badaniach jako proces modelowy (118). Procesy, które zachodzą podczas mineralizacji skorupy jaja kurzego możemy odnieść do innych procesów mineralizacyjnych, m. in. formowania się zbudowanych z węglanu wapnia otokoniów u kręgowców (118). Białko Nucb2 z *Gallus gallus*, będące obiektem badawczym niniejszej pracy, zostało odkryte podczas analiz proteomicznych jako białko związane ze stożkami warstwy mamilliarniej skorupy jaja kurzego (118). Białka związane z tą warstwą uczestniczą we wczesnych etapach biomineralizacji skorupy jaja (118). Stożki mamilliarnie (Rys. 1.6) zawierają ciała zapasowe wapnia, które są podatne na rozpuszczanie i dostarczają wapnia niezbędnego do

wzrostu zarodka (119, 120). Fakt ten sugeruje, że Nucb2 z *Gallus gallus* może być zaangażowane w procesy biomineralizacyjne.



**Rysunek 1.6 Schematyczny przekrój poprzeczny przez skorupę jaja kurzego**

Skorupa jaja kurzego jest zbudowana z 6 warstw. Zaczynając od wnętrza, wyróżniamy: błony komórkowe, warstwę mamiliarną, warstwę palisadową, warstwę kryształu oraz kutikulę. Stożki mamiliarne są zaczątkami kryształów, na których dochodzi do rozpoczęcia procesu krystalizacji skorupy jaja kurzego. Stożki mamiliarne stanowią także główne źródło wapnia podczas rozwoju zarodka (119).

Ludzki homolog Nucb2/nesfatyny-1 może brać udział w procesie osteogenezy (121). Badania przeprowadzone na samicach szczurów pozbawionych jajników, pokazały, że podawanie poprzez wstrzyknięcie Nucb2/nesfatyny-1 przez 60 dni wywołało znaczne aż 10% zwiększenie gęstości mineralnej kości (121). Test aktywności fosfatazy alkalicznej, która jest wykorzystywana jako marker różnicowania się osteoblastów, pokazał, że Nucb2/nesfatyna-1 w obecności ludzkiego rekombinowanego białka morfogenetycznego kości (BMP, ang. *bone morphogenetic protein*) prowadzi do znaczącego zwiększenia stężenia alkalicznej fosfatazy w komórkach mysiej linii komórkowej (121). Wyniki te sugerują udział Nucb2/nesfatyny-1 w procesie różnicowania się i mineralizacji osteoblastów. Dodatkowo badania *in vitro* przeprowadzone na mutantach Nucb2/nesfatyny-1, wykazały, że reszty Arg-60, Arg-63 oraz Ser-72 mogą być odpowiedzialne za osteogenne działanie Nucb2/nesfatyny-1 (121). Pokazano, że obecność Nucb2/nesfatyny-1 prowadzi do redukcji aktywności fosfatazy zasadowej winiano- odpornej (TRAP, ang. *tartrate resistant alkaline phosphatase*), która jest markerem aktywności osteoklastów. Powyższy wynik sugeruje, że Nucb2/nesfatyna-1 może również wpływać na zahamowanie procesu tworzenia się osteoklastów (121), a tym samym może brać udział w kontroli metabolizmu kości poprzez stymulację różnicowania się oraz mineralizacji

osteoblastów z równoczesnym hamowaniem różnicowania się osteoklastów (121). Sugeruje się, że białko to może być w przyszłości wykorzystywane w terapii osteoporozy (121).

#### 1.4 WIĄZANIE JONÓW METALI PRZEZ BIAŁKA

Jony metali biorą udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych oraz są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania prawie 30% wszystkich poznanych białek. Kationy metali poprzez wiązanie z białkami, mogą spełniać dwie role: strukturalną poprzez stabilizację cząsteczki białka oraz funkcjonalną, aktywując białko oraz uczestnicząc w reakcji enzymatycznej (122). Wiązanie jonów metali wywołuje znaczne zmiany w strukturze białka. Wysoki ładunek występujący w jonach musi być skompensowany poprzez przeciwie naładowane grupy funkcjonalne białka. W pozbawionym jonów metali białku naładowane funkcjonalne reszty znajdują się daleko od siebie. Dopiero związanie jonów metali powoduje, że reszty aminokwasowe zbliżają się do siebie co w konsekwencji prowadzi do dużych zmian strukturalnych. Do zmian może dochodzić zarówno we fragmencie jak i w całej cząsteczce białka, co może wpływać nawet na jego stan oligomeryczny (122). Wyróżnia się 12 metali, które są kluczowe dla organizmów żywych (123). Jony takie jak  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$  należą do najbardziej istotnych ze względu na ich wysoką zawartość w organizmie (124–126).

Wapń jest piątym najważniejszym pierwiastkiem na Ziemi, który odznacza się liczbą koordynacyjną 4-8 oraz szybką kinetyką wiązania, co ułatwia mu interakcję z wieloma różnymi ligandami (127). W wielokomórkowych organizmach eukariotycznych, stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  jest ściśle regulowane poprzez cały repertuar białek takich jak kanały  $\text{Ca}^{2+}$ , transportery  $\text{Ca}^{2+}$  oraz receptory  $\text{Ca}^{2+}$  (128). Całkowite stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w płynach pozakomórkowych wynosi około 2,2- 2,6 mM (129). W komórkach stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  jest utrzymywane na o wiele niższym poziomie, w zakresie od  $10^{-7}$  do  $10^{-8}$  M (129). W organellach takich jak retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego czy wakuole, stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  znajduje się w zakresie mikromolarnym. Nierozpuszczalny wapń stanowi najliczniej występujący minerał w ludzkim ciele (około 1 kg), z 99% zawartością Ca w formie fosforanu wapnia znajdującego się w kościach (130). Dodatkowo jony  $\text{Ca}^{2+}$  spełniają rolę uniwersalnych przekaźników sygnałów poprzez oddziaływanie z białkami różniącymi się powinowactwem (nM do mM) w komórkach eukariotycznych (130). Jony  $\text{Ca}^{2+}$  modulując aktywność białek, mogą uczestniczyć w wielu procesach biologicznych obejmujących sekrecję hormonów, skurcze mięśniowe, neurotransmisję czy apoptozę (131). Główną grupą białek, których funkcja zależy od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  są białka z rodziny białek domen dłoni EF (132, 133). Białka posiadające motyw dłoni EF można podzielić na dwie klasy: białkowe sensory  $\text{Ca}^{2+}$  oraz bufory  $\text{Ca}^{2+}$ . Sensory  $\text{Ca}^{2+}$  są to białka, które

ulegają zmianom konformacyjnym indukowanym przez  $\text{Ca}^{2+}$ , co skutkuje odsłonięciem ich hydrofobowej powierzchni, która stanowi płaszczyznę do oddziaływania z partnerami molekularnymi (132). Najbardziej znanym białkowym sensorem  $\text{Ca}^{2+}$  jest kalmodulina (134). Natomiast, białkowe bufory  $\text{Ca}^{2+}$  uczestniczą w inaktywacji sygnału, zależnego od jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , chroniąc komórki przed toksycznym efektem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (135).

Jony  $\text{Mg}^{2+}$  odgrywają kluczową rolę w wielu procesach biologicznych.  $\text{Mg}^{2+}$  biorą udział w stabilizacji struktur białek oraz grup fosforanowych lipidów błonowych na skutek związania się do powierzchni cząsteczek (136, 137). Jony  $\text{Mg}^{2+}$  uczestniczą w katalizie oraz aktywacji ponad 300 enzymów i są kluczowe w procesach transportu, przechowywania oraz wykorzystywania energii (138, 139). Procesy takie jak metabolizm ATP, skurcz mięśni, funkcje neurologiczne oraz uwalnianie neurotransmiterów są zależne od  $\text{Mg}^{2+}$  (140). Jony  $\text{Mg}^{2+}$ , w odróżnieniu do  $\text{Ca}^{2+}$ , występują w komórkach w stosunkowo stałym stężeniu w zakresie mM, skutkiem czego są łatwo dostępne dla oddziaływań z białkami (141). Jony  $\text{Mg}^{2+}$  oraz  $\text{Ca}^{2+}$  odznaczają się identycznym ładunkiem oraz podobnymi promieniami jonowymi. Jon  $\text{Ca}^{2+}$  ma nieco większy promień jonowy (1,0-1,12 Å) niż jon  $\text{Mg}^{2+}$  (0,57-0,72 Å) (142). Aby właściwie regulować odpowiednie ścieżki sygnałowe, białka wiążące jony  $\text{Ca}^{2+}$  muszą być w stanie odróżniać te dwa jony. W tym celu wykorzystują różnice w zachowaniu obu jonów. Kompleksy jonów  $\text{Mg}^{2+}$  zazwyczaj koordynują mniejszą liczbę ligandów niż kompleksy jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , przyjmując oktaedryczną geometrię z 6 ligandami (142). Jony  $\text{Ca}^{2+}$  wykazują większą zmienność liczby koordynacyjnej oraz geometrii. Jon  $\text{Ca}^{2+}$  jest koordynowany przez 7 lub 8 ligandów (13). Dodatkowo długość wiązania  $\text{Ca}^{2+}$ -ligand jest bardziej zmienna niż w przypadku wiązania  $\text{Mg}^{2+}$ -ligand. Jony  $\text{Mg}^{2+}$  ulegają także o wiele wolniejszej wymianie niż jony  $\text{Ca}^{2+}$  (13).

Spośród wszystkich jonów metali przejściowych spotykanych w organizmach żywych, jony  $\text{Zn}^{2+}$  są najbardziej rozpowszechnione (143). Analizy bioinformatyczne pokazały, że w wiązaniu jonów  $\text{Zn}^{2+}$  uczestniczy około 10% białek ludzkiego genomu (144). Jony  $\text{Zn}^{2+}$  mogą wiązać od 4-6 reszt aminokwasowych w tetraedrycznej lub oktaedrycznej geometrii. Najczęstszymi ligandami jonów  $\text{Zn}^{2+}$  są atomy azotu His, atomy siarki Cys oraz atomy tlenu Asp oraz Glu (145, 146). Istnieje wiele motywów wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Najczęściej występującym motywem wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$  jest tzw. domena palca cynkowego  $\beta\beta\alpha$  z motywem 2Cys-2His (147). Jednakże motywy: 4Cys, Asp-3His, 3Cys-His oraz 2 Asp-2Glu, są równie często spotykane (148, 149). Jony  $\text{Zn}^{2+}$  mają większe powinowactwo do białek niż jony  $\text{Mg}^{2+}$  czy  $\text{Ca}^{2+}$  (150). Wartości stałych dysocjacji białek wiążących jony  $\text{Zn}^{2+}$  wahają się w zakresie od pikomolarnego do femtomolarnego (145). Całkowite stężenie  $\text{Zn}^{2+}$  w komórce jest rzędu kilkuset mikromoli (151).

Jednakże stężenie wolnych jonów  $Zn^{2+}$  jest na poziomie pikomolarnym, co jest skutkiem wysokiego powinowactwa  $Zn^{2+}$  do białek (151). Stężenie  $Zn^{2+}$  podlega ścisłej regulacji ze względu na to, że zarówno zbyt wysokie jak i zbyt niskie stężenie jonów  $Zn^{2+}$  jest niekorzystne dla komórek (152). Utrzymanie homeostazy jonów  $Zn^{2+}$  wynika ze skoordynowanego działania różnych białek takich jak transportery  $Zn^{2+}$  czy metalotioneiny, które są zaangażowane w pobieranie, wydzielanie oraz magazynowanie jonów  $Zn^{2+}$  (153). Organizmy eukariotyczne charakteryzują się także kompartmentacją wewnątrzkomórkowego  $Zn^{2+}$ , która pozwala na wykorzystanie jonów  $Zn^{2+}$  przy jednoczesnym zachowaniu niskiego stężenia wolnych jonów  $Zn^{2+}$ . Zapobiega to niespecyficznemu wiązaniu się jonów  $Zn^{2+}$  z białkami (150). Dodatkowo duże ilości jonów  $Zn^{2+}$  są akumulowane w wielu komórkach oraz tkankach. Około 20%  $Zn^{2+}$  występuje w pęcherzykach synaptycznych neuronów w hipokampie i korze mózgowej (154). Prostate (155, 156) oraz komórki  $\beta$  trzustki (157) stanowią kolejne tkanki o wysokiej zawartości jonów  $Zn^{2+}$ . Jony  $Zn^{2+}$ , jako cząsteczki sygnałowe, podobnie jak jony  $Ca^{2+}$ , mogą uczestniczyć w przekazywaniu informacji między oraz w komórkach. Zwiększenie stężenia wolnych jonów  $Zn^{2+}$  może odbywać się na trzy sposoby: uwolnienie jonów  $Zn^{2+}$  z kompleksów z białkami, uwolnienie jonów  $Zn^{2+}$  z pęcherzyków do przestrzeni zewnątrzkomórkowej oraz uwolnienie jonów  $Zn^{2+}$  z pęcherzyków wewnątrzkomórkowych (158, 159). Kontrolowany wzrost stężenia  $Zn^{2+}$  odpowiada za regulację funkcji białek oraz różnych procesów komórkowych (160). Jednakże niekontrolowane zmiany stężenia jonów  $Zn^{2+}$  są związane z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych (161) oraz zaburzeniami psychicznymi takimi jak depresja (162). Wiązanie jonów  $Zn^{2+}$  wpływa na morfologię oraz kinetykę procesu agregacji dużej ilości białek tworzących amyloidy takich jak amyloid  $\beta$  (163),  $\beta$ -2-mikroglobulina (164) czy amyloidowy polipeptyd wyspowy (165). Wysokie stężenie jonów  $Zn^{2+}$  może także prowadzić do precypitacji białek oraz tworzenia przejściowych, szkodliwych agregatów białkowych (166).

## 2 CEL PRACY

Nadrzędnym celem pracy doktorskiej była charakterystyka molekularna Nucb2 z *Gallus gallus* (Kura bankiwy). Cele szczegółowe projektu obejmowały:

- opracowanie skutecznej procedury oczyszczania Nucb2 oraz nesfatyny-3 z *Gallus gallus*, jednego z produktów proteolitycznego procesowania Nucb2
- przeprowadzenie analiz biochemicznych obu białek
- zbadanie oddziaływania Nucb2 oraz nesfatyny-3 z *Gallus gallus*, z naturalnymi ligandami – jonami  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$
- przeprowadzenie testu aktywności biomineralizacyjnej *in vitro* Nucb2 z *Gallus gallus*



### 3 MATERIAŁY I METODY

#### 3.1 MATERIAŁY

##### 3.1.1 Spis odczynników i materiałów

Tabela 3.1 zawiera spis odczynników używanych podczas realizacji pracy doktorskiej. Wszystkie wykorzystane odczynniki charakteryzują się czystością cz.d.a lub większą. Podczas eksperymentów wykorzystano wodę oczyszczaną w aparacie Mili-Q Plus (Millipore).

**Tabela 3.1 Spis odczynników wykorzystywanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej**

Odczynnik	Producent
2-merkaptoetanol	Pierce
Agar	Invitrogen
Agarozą	Roth
Akrylamid Mix	Roth
ANS	Roth
ATTO 488	Roth
Błękit bromofenylowy	BDH Chemicals
Bromek etydyny	Roth
Chloramfenikol	Roth
Chlorek cynku ( $ZnCl_2$ )	Roth
Chlorek magnezu ( $MgCl_2$ )	Merck
Chlorek sodu ( $NaCl$ )	Roth
Chlorek wapnia ( $CaCl_2$ )	Roth
Coomasie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250)	Serva

Deoksyrybonukleaza I (DNAza I)	Sigma
dNTP	Thermo Fisher Scientific
Dodecylsulfian sodu (SDS)	Roth
Dwuwodorofosforan monosodowy ( NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma
EDTA	Roth
Endonukleaza restrykcyjna <i>HindIII</i>	Thermo Fisher Scientific
Endonukleaza restrykcyjna <i>SacI</i>	Thermo Fisher Scientific
Etanol 96%	POCH S. A.
Fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF)	Sigma
Fosfataza alkaliczna FastAP	Thermo Fisher Scientific
Glicyna	Roth
HRV3C	Sino Biological
Imidazol	Merck
Izopropyl-β-D-1-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	Roth
Karbenicylina	Roth
Kwas solny (HCl)	POCH S. A.
Kwas borny	Roth
Kwas 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowy (HEPES)	Roth

Ligaza DNA faga T4	Thermo Fisher Scientific
Medium LB	Invitrogen
Medium TB	Novagen
Metanol	POCH S. A.
N,N,N',N'- tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Roth
Nadsiarczan amonu (APS)	Sigma
NaOH	POCH S.A.
Polimeraza Phusion High- Fidelity	Thermo Fisher Scientific
Przeciwciała Anty-His	Clontech
Przeciwciała HAMPO	Vector Laboratories
RNaza A	Sigma
Siarczan amonu	Roth
Tris-HCl	Roth
Wodorowęglan amonu (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> )	POCH S.A.

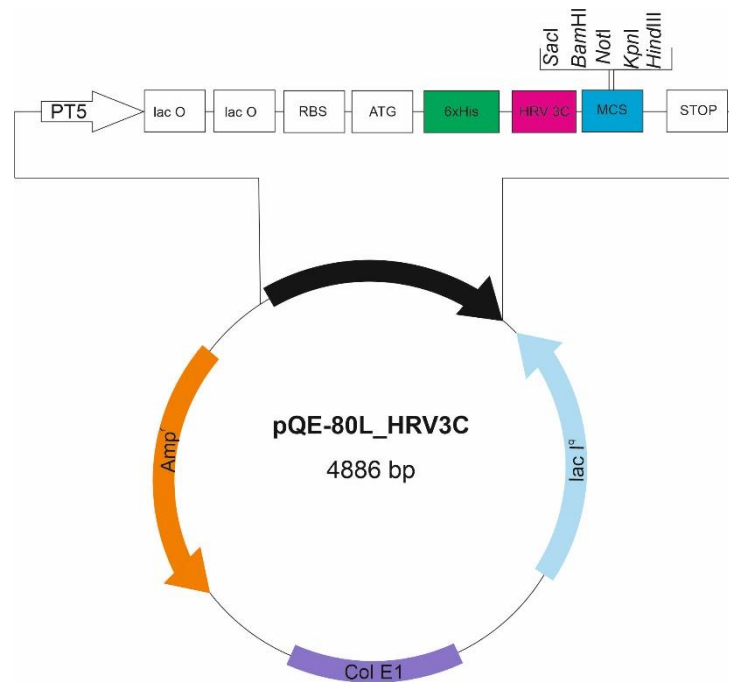
### 3.1.2 Plazmidy

#### 3.1.2.1 Plazmidy źródłowe

Sekwencja cDNA kodująca Nucb2 bez peptydu sygnałowego została zoptymalizowana w celu uzyskania wydajnej ekspresji w komórkach bakteryjnych *Escherichia coli*. Tak przygotowana sekwencja została zsyntetyzowana w plazmidzie p-MAT przez firmę Thermo Fisher Scientific. Konstrukc pQE-80L/Nucb2 został przygotowany podczas realizacji pracy magisterskiej (167).

### 3.1.2.2 Plazmidy ekspresyjne

Sekwencja cDNA kodująca Nucb2 jak i nesfatynę-3 została wklonowana do wektora pQE-80L\_HRV3C (Rys. 3.1) Wektor ten jest pochodną wektora pQE-80L (Qiagen), która została przygotowana w naszym laboratorium. Wektor pQE-80L\_HRV3C wprowadza do docelowego białka na końcu aminowym znacznik 6-histydylowy (6×His) oraz miejsce trawienia rozpoznawane przez proteazę HRV 3C. Pozwala to na uzyskanie białka pozbawionego znacznika 6×His w trakcie procedury oczyszczania.



**Rysunek 3.1** Mapa wektora pQE-80L\_HRV3C

Wektor pQE-80L\_HRV3C pozwala na pozbycie się znacznika 6×His z końca aminowego białka poprzez trawienie proteazą HRV 3C. Wektor ten zawiera: lac O - operator laktozowy, RBS – miejsce wiązania rybosomu, ATG - kodon start, 6×His – znacznik histydylowy, HRV 3C – miejsce trawienia przez proteazę HRV 3C, MCS – miejsce wielokrotnego klonowania, Amp<sup>R</sup> – gen nadający oporność na ampicylinę, Col E1 – miejsce początku replikacji, lac I<sup>q</sup> – gen kodujący represor laktozowy.

### 3.1.3 Oligonukleotydy

Za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) wprowadzono do sekwencji cDNA kodującej Nucb2 oraz nesfatynę-3 miejsca restrykcyjne SacI oraz HindIII. W tabeli 3.2 przedstawiono sekwencję starterów (Genomed), które wykorzystano podczas wprowadzenia odpowiednich miejsc restrykcyjnych, a także weryfikacji poprawności wklonowania sekwencji cDNA za pomocą PCR kolonijnego.

**Tabela 3.2 Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych podczas procesu klonowania**

Na czerwono zaznaczono sekwencje wprowadzanych miejsc restrykcyjnych.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja	Rodzaj startera	Zastosowanie
ggNucb2_F1	gcgcgagctcGTGCCGATTGAT	przedni, <i>SacI</i>	PCR
ggNesf3_F1	gcgcgagctcGAATATCTGAAAACCTGG	przedni, <i>SacI</i>	PCR
ggNucb2_R1	gcgcaagcttCGGATGAACCTGAT	tylny, <i>HindIII</i>	PCR
pQE-80L_F	CGGATAACAATTCACACAG	przedni	PCR kolonijny
pQE-80L_R	GTTCTGAGGTCATTACTGG	tylny	PCR kolonijny

### 3.1.4 Szczepy bakteryjne

W trakcie realizacji pracy doktorskiej wykorzystywano dwa rodzaje szczepów bakteryjnych *E. coli*. W tabeli 3.3 przedstawiono ich charakterystykę.

**Tabela 3.3 Charakterystyka wykorzystanych szczepów *E. coli***

Szczep <i>E. coli</i>	Genotyp
<b>TOP10</b>	F– mcrA Δ(mrr -hsd RMS -mcr BC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
<b>BL21(DE3)pLysS</b>	F– ompT hsdS(rB – mB – ) gal dcm λ (DE3) pLysS (Camr ) ( λ(DE3): lacI, lacUV5-T7 gene 1, ind1, sam7, nin5 )

Komórki bakteryjne TOP10 wykorzystywano podczas amplifikacji DNA, natomiast komórki BL21(DE3)pLysS były wykorzystywane do ekspresji białek rekombinowanych.

### 3.1.5 Podłoża hodowlane i antybiotyki

**Tabela 3.4 Skład użytych podłoży hodowlanych**

Podłoże płynne LB		Podłoże płynne LB-agar pH 7,5	
Ekstrakt drożdżowy	5,0 g/l	Ekstrakt drożdżowy	5,0 g/l
Hydrolizat kazeinowy	10,0 g/l	Hydrolizat kazeinowy	10,0 g/l
NaCl	10,0 g/l	NaCl	10,0 g/l
-		Agar	15,0 g/l

Podłoże płynne TB	
Ekstrakt drożdżowy	24,0 g/l
Hydrolizat kazeinowy	12,0 g/l
Glicerol	4 ml/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	2,31 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	12,54 g/l

#### Antybiotyki

Chloramfenikol (roztwór w 96% etanolu) 70 mg/ml

Karbenicylina (roztwór wodny) 100 mg/ml

### 3.1.6 Bufory

#### 3.1.6.1 Bufory i roztwory wykorzystywane podczas pracy z DNA

##### 3.1.6.1.1 Roztwory wykorzystywane podczas oczyszczania DNA plazmidowego według procedury NucleoBond® (MACHEREY-NAGEL)

**Tabela 3.5 Skład roztworów użytych podczas oczyszczania plazmidowego DNA**

<b>Bufor S1 pH=8,0</b>		<b>Roztwór S2</b>	
Tris-HCl	50 mM	NaOH	200 mM
EDTA	10 mM	SDS	1%
RNAza A	100 µg/ml		
<b>Bufor S3 pH=5,1</b>		<b>Bufor N2 pH=6,3</b>	
Octan potasu	2,8 mM	Tris	100 mM
		etanol	15%
<b>Bufor N3 pH=6,3</b>		KCl	900 mM
Tris	100 mM	Triton X-100	0,15%
Etanol	15%		
KCl	1,15 M	<b>Bufor N5 pH=6,3</b>	
		Tris	100 mM
		etanol	15%
		KCl	1 M

##### 3.1.6.1.2 Roztwory wykorzystywane podczas elektroforezy w żelu agarozowym

**Tabela 3.6 Skład roztworów użytych podczas elektroforezy w żelu agarozowym**

<b>Bufor TE</b>		<b>Bufor 10×TBE</b>	
Tris-HCl	10 mM	Tris-HCl	890 mM
EDTA	1 mM	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	890 mM
pH	7,8	EDTA	20 mM
		pH	8,3

3.1.6.1.3 Roztwory wykorzystywane podczas elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) oraz analizy Western blot

Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono w układzie nieciągłym według Laemmli'ego (168). W pracy nad Nucb2 wykorzystywano żel rozdzielający 10%, natomiast w pracy poświęconej nesfatynie-3 wykorzystano żel 15%.

**Tabela 3.7 Składy użytych żeli poliakrylamidowych**

Składnik	Żel zagęszczający 4% - stężenia składników	Żel rozdzielający 10% - stężenia składników	Żel rozdzielający 15% - stężenia składników
Akrylamid MIX	0,133% (v/v)	0,333% (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)	0,1% (w/v)
APS	0,05% (w/v)	0,05% (w/v)	0,05% (w/v)
TEMED	1% (v/v)	1% (v/v)	1% (v/v)

**Tabela 3.8 Składy buforów użytych do SDS-PAGE**

10× Bufor do SDS-PAGE		Bufor do nanoszenia próbek (4×SD)	
Tris	125 mM	Tris-HCl	250 mM
Glicyna	960 mM	SDS	8% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)	β-merkaptotanol	20% (v/v)
pH	6,8	glicerol	40% (v/v)
		błękit bromofenolowy	0,01 % (v/v)
		pH	6,8

**Tabela 3.9 Składy buforów wykorzystywanych podczas analizy Western blot**

Bufor do transferu (1×)		Bufor 5×TN	
Tris	5 mM	Tris-HCl	50 mM
Glicyna	38,5 mM	NaCl	750 mM
pH	8,3		

Roztwór do blokowania
Bufor TN (1×)
Mleko odtłuszczone 3%



Wykorzystano 10000- krotne rozcieńczenie przeciwciał Anty-His oraz HAMPO w roztworze do blokowania.

Detekcję prowadzono za pomocą roztworów substratów A i B Pierce® ECL Plus Western Blot Substrate.

**Tabela 3.10 Skład roztworów użytych do barwienia żeli poliakrylamidowych**

Roztwór do barwienia (Coomasie Brilliant Blue)		Roztwór do odbarwiania	
CH <sub>3</sub> OH	40% (v/v)	CH <sub>3</sub> OH	40% (v/v)
CH <sub>3</sub> COOH	10% (v/v)	CH <sub>3</sub> COOH	10% (v/v)
Coomasie Blue 250R	0,4% (w/v)		-

### 3.1.6.2 Bufory wykorzystywane podczas preparacji Nucb2

**Tabela 3.11 Składy buforów wykorzystywanych podczas preparacji Nucb2**

Bufor R		Bufor E	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
pH	7,0	imidazol	200 mM
		pH	7,0
Bufor A		Bufor B	
Tris-HCl	20 mM	Hepes	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
pH	7,5	pH	7,5

### 3.1.6.3 Bufory wykorzystywane podczas preparacji nesfatyny-3

**Tabela 3.12 Składy buforów wykorzystywanych podczas preparacji nesfatyny-3**

Bufor R		Bufor E	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
pH	7,0	imidazol	200 mM
		pH	7,0
Bufor HIC A		Bufor HIC B	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	700 mM	pH	7,0
pH	7,0		
Bufor A		Bufor B	
Tris-HCl	20 mM	Hepes	20 mM
NaCl	150 mM	NaCl	150 mM
pH	7,5	pH	7,5

### 3.1.6.4 Bufory wykorzystane podczas chromatografii odwróconych faz

**Tabela 3.13 Składy buforów wykorzystywanych podczas chromatografii odwróconych faz**

Bufor RPC A		Bufor RPC B	
HCOONH <sub>4</sub>	15 mM	HCOONH <sub>4</sub>	15 mM
HCOOH	0,1%	HCOOH	0,1%
		Acetonitryl	70%

### 3.1.6.5 Bufory wykorzystywane podczas wymiany izotopowej proton-deuter sprzężonej ze spektrometrią mas

**Tabela 3.14 Skład buforu „stop”**

Bufor „stop”
2 M glicyna
pH=2,5

Bufor „stop” został przygotowany na bazie H<sub>2</sub>O oraz D<sub>2</sub>O.

### 3.1.7 Standardy masowe DNA oraz białek

Do identyfikacji ruchliwości elektroforetycznej cząsteczek DNA w żelu agarozowym używano dwóch standardów wagowych DNA: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready- to-use oraz GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific).

Do identyfikacji masy cząsteczkowej białek na żelu poliakrylamidowym wykorzystano białkowe standardy wagowe: Pierce™ Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific).

## 3.2 METODY

### 3.2.1 Podstawowe techniki pracy z DNA

Podczas klonowania molekularnego korzystano z standardowych protokołów dostępnych w literaturze oraz procedur dostarczanych przez producenta odczynników. W kolejnych podrozdziałach opisano procedury opracowane samodzielnie.

**Tabela 3.15 Techniki wykorzystywane podczas pracy z DNA**

<b>Eksperyment</b>	<b>Procedura</b>
Amplifikacja DNA metodą PCR	(169)
Trawienie enzymami restrykcyjnymi	(169)
Ligacja	(169)
Oczyszczanie DNA po reakcjach enzymatycznych (Clean-Up®, Gel-Out®)	Instrukcja producenta firmy A&A Biotechnology
PCR kolonijny	(169)
Przygotowanie komórek kompetentnych	(169)
Transformacja komórek kompetentnych	(169)
Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	(169)
Oznaczenie stężenia i czystości DNA	(169)
Sekwencjonowanie metodą Sangera	(169)
Izolacja DNA z żelu agarozowego	(169)

### 3.2.2 Podstawowe techniki pracy z białkami

**Tabela 3.16 Techniki wykorzystywane podczas pracy z białkami**

<b>Eksperyment</b>	<b>Procedura</b>
Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym	(168)
Barwienie białek Coomassie Brilliant Blue R250	(170)
Western blotting	(167)

### 3.2.3 Przygotowanie plazmidów ekspresyjnych

Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR) została wykorzystana w celu wprowadzenia odpowiednich miejsc restrykcyjnych: *SacI* i *HindIII* do sekwencji cDNA kodującej Nucb2 oraz nesfatynę-3 oraz ograniczenia liczby aminokwasów pochodzących z wektora pQE-80L/HRV3C. Matrycę stanowił konstrukt pQE-80L/Nucb2 (167). Reakcje prowadzono w standardowej objętości 50  $\mu$ l z wykorzystaniem par starterów przedstawionych w tabeli 3.1. Uzyskane produkty PCR zostały oczyszczone za pomocą zestawu Clean-Up® (Rozdział 3.2.1) oraz przeanalizowane podczas elektroforezy w żelu agarozowym (Rozdział 3.2.1). Następnie produkty PCR były poddawane reakcji trawienia odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi. Tak otrzymane fragmenty ligowano z wektorem pQE-80L/HRV3C (Rozdział 3.1.2), zdefosforylowanym oraz zlinearyzowanym odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi. Mieszaniną poligacyjną transformowano (Rozdział 3.2.1) komórki kompetentne *E. coli* szczepu Top10 (Rozdział 3.1.4) i wysiewano je na płytce z podłożem płynnym LB-agar (Rozdział 3.1.5), zawierające karbenicylinę o stężeniu 50  $\mu$ g/ml. Po całonocnej inkubacji w 37°C, z płytek pobierano kilka klonów, które stanowiły matrycę do przeprowadzenia reakcji PCR kolonijnego (Rozdział 3.2.1) w celu weryfikacji poprawności wklonowania odpowiednich insertów do wektora. Otrzymane produkty analizowano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Następnie wybrane klony namnażano i izolowano za pomocą zestawu NukleoBond® (Rozdział 3.1.6.1.1). W celu weryfikacji poprawności klonowania, wyselekcjonowane klony poddawano sekwencjonowaniu w firmie Genomed S.A. w Warszawie (Rozdział 3.2.1).

### 3.2.4 Ekspresja rekombinowanych białek

Komórki kompetentne szczepu BL21(DE3)pLysS *E. coli* zostały stransformowane odpowiednimi konstruktami ekspresyjnymi: pQE-80L/HRV3C zawierającymi cDNA kodujące Nucb2 lub nesfatyny-3. Tak przygotowane mieszaniny wysiewano na płytce z podłożem LB-agar, zawierające karbenicylinę w stężeniu 50  $\mu$ g/ml oraz chloramfenikol w stężeniu 35  $\mu$ g/ml. Po całonocnej inkubacji w 37°C, z płytek pobierano 1 kolonię bakteryjną i zaszczepiano nią 250 ml podłoża płynnego TB wraz z odpowiednimi antybiotykami. Hodowlę wstępną inkubowano w 37°C przy 200 rpm przez 12 h. Następnie zaszczepiano 1 l podłoża płynnego TB zawierającego odpowiednie antybiotyki tzw. hodowlę właściwą, taką ilością hodowli wstępnej, aby stanowiła ona 4% objętości całkowitej hodowli właściwej. Prowadzono inkubację w 37°C przy 200 rpm, do momentu, aż gęstość optyczna nie osiągnie wartości  $OD_{600}=0,8-0,9$ . Po osiągnięciu odpowiedniej wartości gęstości optycznej, indukowano nadekspresję białek poprzez dodanie IPTG w stężeniu końcowym 0,2 mM. Po 3 h inkubacji w 29°C przy 200 rpm, hodowle

wirowano (5000×g, 10 min, 4°C). Supernatant odrzucono, a osad zawieszono w buforze do równoważenia i przechowywano w -80°C

### 3.2.5 Oczyszczanie rekombinowanych białek

#### 3.2.5.1 Oczyszczanie Nukleobindyny-2

##### 3.2.5.1.1 Otrzymywanie lizatów komórkowych

Ekstrakty komórek bakteryjnych poddawano kolejno rozmrażaniu oraz zamrażaniu, co miało na celu wywołanie szoku cieplnego, który spowoduje przerwanie integralności błony wewnętrznej komórek. Następstwem dezintegracji błony komórkowej było uwolnienie lizozymu faga T4, który jest kodowany na plazmidzie pLysS (171). Do rozmrożonych ekstraktów dodawano PMSF w końcowym stężeniu 0,2 mg/ml oraz DNAzę I i RNAzę A w końcowym stężeniu 20 µg/ml. Zawiesiny inkubowano na lodzie, od czasu do czasu mieszając, aż do momentu utraty przez nie lepkości. Ekstrakty wirowano (18,000×g, 60 min, 4°C). Następnie osad odrzucano a supernatant wykorzystywano w dalszych etapach oczyszczania.

##### 3.2.5.1.2 Chromatografia powinowactwa na złożu Ni-NTA

Pierwszym etapem oczyszczania Nucb2 była chromatografia powinowactwa na złożu Ni-NTA His-Bind Resin, która wykorzystuje obecność znacznika 6× His na końcu aminowym białka. Na początku przygotowano 2 ml złoża Ni-NTA His-Bind Resin, równoważąc je 5 objętościami buforu R (Rozdział 3.1.6.2). Do supernatantu uzyskanego podczas lizy komórkowej dodawano 2 ml zrównoważonego złoża Ni-NTA His-Bind Resin i inkubowano przez 0,5 h w 4°C, cały czas mieszając. Przesącz ze złożem odwirowano (700×g, 3 min, 4°C). Następnie całość nanoszono na kolumnkę. Złoże przepłukiwano 10 objętościami buforu R w celu pozbycia się białek związanych niespecyficycznie. Następnie płukano złoże buforem R z 40 mM imidazolem, aby usunąć zanieczyszczenia białkowe wiążące się ze złożem. Nucb2 eluowano 5 ml buforu E (Rozdział 3.1.6.2), zbierając frakcję 0,5 ml. Frakcje o największej absorbancji przy fali długości 280 nm łączono oraz wymieniano bufor na bufor R na kolumnie do odsalania PD-10 (Cytiva).

##### 3.2.5.1.3 Trawienie przez proteazę HRV 3C

Aby usunąć znacznik 6×His z końca aminowego białka wykorzystano proteazę HRV 3C. Do połączonych frakcji Nucb2 dodawano 10 µl roztworu proteazy HRV 3C o stężeniu 1 mg/ml na 1 mg białka. Reakcje trawienia prowadzono przez 12 h w 4°C, ciągle mieszając.

#### 3.2.5.1.4 Chromatografia powinowactwa na złożu Ni-NTA II

Do oddzielenia produktów trawienia (Nucb2 oraz znacznika 6×His) wykorzystano chromatografię powinowactwa na złożu Ni-NTA. Do próbek Nucb2 poddanych trawieniu dodawano 300 µl złoża Ni-NTA oraz inkubowano przez 15 min w 4°C. Następnie наносzono całość na kolumnkę i zbierano supernatant zawierający strawione białko. Strawione próbki Nucb2 pozbawione znacznika 6×His zagęszczono do objętości około 500 µl z wykorzystaniem koncentratorów Amicon® Ultra-4 o MWCO 30 kDa (Millipore) poprzez wirowanie (14,000×g, 4°C).

#### 3.2.5.1.5 Filtracja żelowa

Filtrację żelową przeprowadzono na kolumnie Superdex200 Increase 30/100 GL (GE Healthcare) z wykorzystaniem systemu AKTA Avant (GE Healthcare). Na kolumnę Superdex200 Increase 30/100 GL zrównoważoną buforem A (Rozdział 3.1.6.2) naniesiono próbkę Nucb2. Rozdział prowadzono przy przepływie 0,5 ml/min w temperaturze pokojowej. Elucję białek monitorowano za pomocą pomiaru absorbancji przy fali długości 280 nm. Frakcje zawierające białko zebrano, połączono i przechowywano do dalszych badań w -80°C.

### 3.2.5.2 Oczyszczanie Nesfatyny-3

#### 3.2.5.2.1 Otrzymywanie lizatów komórkowych

Liza komórek bakteryjnych zawierających nesfatynę-3 była prowadzona analogicznie jak liza komórek zawierających Nucb2 (Rozdział 3.2.5.1.1).

#### 3.2.5.2.2 Trawienie na kolumnie do chromatografii powinowactwa na złożu Ni-NTA

Podobnie jak w przypadku Nucb2, pierwszym etapem oczyszczania nesfatyny-3 była chromatografia powinowactwa na złożu Ni-NTA His-Bind Resin. Przygotowano 1,5 ml złoża Ni-NTA His-Bind Resin, równoważąc go 5 objętościami buforu R (Rozdział 3.1.6.3). Do supernatantu powstałego po lizie komórek bakteryjnych zawierających nesfatynę-3 dodano 1,5 ml złoża Ni-NTA i inkubowano je przez 0,5 h w 4°C, ciągle mieszając. Przesącz ze złożem odwirowano (700×g, 3 min, 4°C). Następnie całość наносzono na kolumnkę. Złoże przepłukiwano 10 objętościami buforu R w celu pozbycia się białek związanych niespecyficjnie. Na złoże nawarstwiono 8 ml buforu R oraz dodano 250 µl proteazy HRV 3C o stężeniu 1 mg/ml. Całość pozostawiono na 12 h w 4°C. Po całonocnej inkubacji, zebrano supernatant. Następnie wymieniono bufor na bufor HIC A (Rozdział 3.1.6.3) oraz zagęszczono próbkę do około 1 ml z wykorzystaniem koncentratorów Amicon® Ultra-4 o MWCO 10 kDa (Millipore) za pomocą wirowania (14,000×g).

### 3.2.5.2.3 Chromatografia oddziaływań hydrofobowych

W kolejnym etapie do oddzielenia zanieczyszczeń białkowych od nesfatyny-3, wykorzystano chromatografię oddziaływań hydrofobowych. Rozdział przeprowadzono na kolumnie HiTrap Phenyl HP (Cytiva) o objętości 5 ml z wykorzystaniem systemu AKTA Avant (GE Healthcare). Na kolumnę zrównoważoną buforem HIC A (Rozdział 3.1.6.3) nakładano zagęszczoną próbkę. Rozdział prowadzono przy przepływie 2 ml/min z detekcją elucji białek za pomocą pomiaru absorbancji przy fali długości 280 nm. Kolumnę przepłukiwano 2 objętościami buforu HIC A, aby wypłukać białka niezwiązane z kolumną. Następnie eluowano białko docelowe liniowym gradientem (0,7-0,0 M  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ ) buforu HIC B (Rozdział 3.1.6.3) obniżając stężenie  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  do 0 M w czasie 10 min. Frakcję zawierającą białko docelowe zbierano, łączono i zagęszczano na koncentratorze Amicon® Ultra-4 o MWCO 10 kDa poprzez wirowanie (14,000×g). Następnie wymieniało bufor na bufor A (Rozdział 3.1.6.3) na kolumnie HiTrap Desalting (Cytiva). Otrzymane frakcję łączyło ze sobą i przechowywano w - 80°C.

## 3.2.6 Wyznaczenie masy molekularnej Nucb2 oraz Nesfatyny-3

### 3.2.6.1 Chromatografia metodą faz odwróconych

Chromatografię metodą faz odwróconych prowadzono na kolumnie Resource™ RPC (Cytiva) o objętości złoża 1 ml z wykorzystaniem systemu AKTA Avant (GE Healthcare). Około 100 µg białka nałożono na kolumnę Resource™ RPC zrównoważoną buforem RPC A (Rozdział 3.1.6.4). Rozdział prowadzono przy stałym przepływie 1 ml/min, stosując liniowy gradient 0- 100% buforu RPC B.

### 3.2.6.2 Spektrometria mas

Masę cząsteczkową białek zmierzono wykorzystując spektrometr masowy Q-TOF Premier (Waters) połączony z systemem UPLC (Waters). Próbki każdego z białek zostały naniesione na kolumnę Acquity UPLC BEH300 C4 1,7 µM, 1,00 × 50 mm połączoną bezpośrednio ze źródłem ESI przy przepływie 100 µl/min. Pomiarów prowadzono w trybie jonów dodatnich. Analizę danych wykonano w narzędziu MaxEnt oprogramowania MassLynx 4.1 (Waters). Pomiarów spektrometrii mas zostały wykonane w Środowiskowej Pracowni Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

## 3.2.7 Charakterystyka molekularna białek Nucb2 oraz nesfatyny-3

### 3.2.7.1 Analiza bioinformatyczna

Przewidywanie nieuporządkowania Nucb2 na podstawie jego sekwencji zostało przeprowadzone z wykorzystaniem predyktorów PONDR® (172, 173) dostępnego na stronie

<http://www.pondr.com/> oraz IUPRED2a (174), dostępnego na stronie <https://iupred2a.elte.hu/>. Przewidywanie dynamiki łańcucha bocznego Nucb2 zostało przeprowadzone za pomocą programu Dynamine (175) dostępnego na stronie <https://bio2byte.be/dynamine/in-a-nutshell/>. Podstawowe parametry fizykochemiczne Nucb2 oraz nesfatyny-3 zostały określone na podstawie ich sekwencji aminokwasowej za pomocą programu ProtParam (176), dostępnego na stronie <https://web.expasy.org/protparam/>. Dodatkowo wartości średniego ładunku netto oraz średniej hydrofobowości białek zostały wyznaczone na podstawie danych otrzymanych z programu znajdującego się na stronie <http://www.pondr.com/>.

### 3.2.7.2 Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)

Pomiary widm spektroskopii dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) zostały przeprowadzone z wykorzystaniem spektropolarymetru Jasco J-815 wyposażonego w urządzenie kontrolujące temperaturę Peltier CDF 426S/15. Pomiary były wykonywane w kuwecie kwarcowej o długości drogi optycznej 0,1 cm w 20°C od 300 nm do 195 nm z prędkością skanowania 50 nm/min oraz z rozdzielczością 1 nm. Pomiary prowadzono dla każdego z białek w stężeniu 10 µM w buforze A (Rozdział 3.1.6.2) w obecności 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz zmiennych stężeń ZnCl<sub>2</sub> (0-0,3 mM). Widma końcowe powstały w wyniku uśrednienia trzech pomiarów oraz odjęcia widma odpowiedniego buforu. Zawartość struktury drugorzędowej została oszacowana za pomocą programu CDNN (177).

### 3.2.7.3 Techniki fluorescencyjne

Pomiary fluorescencji były prowadzone w 20°C przy użyciu fluorometru Fluorolog-3 (Horiba Jobin Ivon Inc.). Widma fluorescencyjne reszt Trp były rejestrowane dla Nucb2 w stężeniu 2 µM oraz dla nesfatyny-3 w stężeniu 3 µM w obecności 5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub> oraz zmiennych stężeń ZnCl<sub>2</sub> (0-0,3 mM) w buforze A (Rozdział 3.1.6.2). Oba białka były inkubowane w obecności odpowiednich dodatków przez 0,5 h przed pomiarem. Widma fluorescencji były rejestrowane w zakresie 310-500 nm z długością fali wzbudzenia 295 nm oraz prędkością skanowania 1 nm/s w temp. 20°C. Szerokości szczelin na drodze wiązek wzbudzającej oraz emitowanej wynosiła 4 nm. Wszystkie pomiary zostały powtórzone trzykrotnie. Widma końcowe powstały po odjęciu widm odpowiednich buforów.

### 3.2.7.4 Szybkościowe ultrawierowanie analityczne (SV-AUC)

Eksperymenty szybkościowego ultrawierowania analitycznego (SV-AUC, ang. *sedimentation velocity analytical ultracentrifugation*) zostały przeprowadzone przy użyciu ultrawirówki analitycznej Beckman Coulter Proteome Lab XL-I, wyposażonej w rotor An-60 Ti.



Próbki obu białek o objętości 415  $\mu$ l w buforze A (Rozdział 3.1.6.2) zostały przygotowane w trzech różnych stężeniach: 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml oraz 1,0 mg/ml w obecności 5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub> oraz różnych stężeń (0- 0,3 mM) ZnCl<sub>2</sub>. Proces sedymentacji był monitorowany poprzez pomiar absorbancji przy fali długości 280 nm. Próbki wirowano przy 50000 rpm w 20°C przez całą noc. Dane takie jak cząstkowa objętość całkowita Nucb2 (0,727 ml/g) oraz nesfatyny-3 (0,72389 ml/g), gęstość (1,0059 g/ml, 1,006 g/ml, 1,0057 g/ml, 1,006 g/ml kolejno dla buforu z EDTA, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> oraz ZnCl<sub>2</sub>) oraz lepkość buforów (1,0265 mPa  $\times$  s, 1,0288 mPa  $\times$  s, 1,0258 mPa  $\times$  s, 1,0265 mPa  $\times$  s kolejno dla buforu z EDTA, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> oraz ZnCl<sub>2</sub>) zostały oszacowane z wykorzystaniem programu SENDTERP (178). Dane skorygowane o czas przeanalizowano za pomocą programu Sedfit (179, 180) wykorzystując model ciągły rozkładu współczynnika sedymentacji  $c(s)$ . Zastosowano regularyzację maksymalnej entropii przy  $p=0,68$ . Podczas analizy wyznaczono współczynniki sedymentacji skorygowane na wodę w 20°C ( $s_{w,20}$ ), pozorną masę cząsteczkową (MW), stosunek współczynników tarcia ( $f/f_0$ ), promienie Stokes'a. Wysokiej jakości dane otrzymano z wykorzystaniem oprogramowania Gussi (1.4.2) (181). Eksperymenty AUC były przeprowadzone we współpracy z dr inż. Dominiką Bystranowską z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

#### 3.2.7.5 *Limitowana proteoliza*

Nucb2 oraz nesfatyna-3 w stężeniu 0,5 mg/ml były trawione endoproteazą Glu-C (V8) wykorzystując stosunek substratu do proteazy 1:5000 (w/w). Reakcja trawienia była prowadzona w obecności 5 mM EDTA oraz przy różnych stężeniach CaCl<sub>2</sub> (0-10 mM), MgCl<sub>2</sub> (0-10 mM), ZnCl<sub>2</sub> (0-0,3 mM) w 20°C przez 4 h. Reakcja była prowadzona w buforze A (Rozdział 3.1.6.2). W określonych odstępach czasu (0-240 min) pobierano 5  $\mu$ g każdej z mieszanin reakcyjnych i zahamowywano reakcję poprzez dodanie denaturującego buforu do nanoszenia próbek (4 $\times$ SD). Próbki po reakcji trawienia (3,75  $\mu$ g) były analizowane za pomocą SDS-PAGE.

#### 3.2.7.6 *Wymiana izotopowa proton-deuter sprzężona ze spektrometrią mas (HDX-MS)*

Eksperymenty wymiany izotopowej proton-deuter sprzężonej ze spektrometrią mas (HDX-MS, ang. *hydrogen-deuterium exchange coupled with mass spectrometry*) prowadzono z wykorzystaniem urządzenia SYNAPT<sup>®</sup>2 HDMS (Waters) z technologią HDX Manager, który jest połączony z systemem nanoACQUITY (UPLC). Pomiar HDX-MS prowadzono wyłącznie dla Nucb2. W pierwszym etapie analizowano próbki niedeuterowane w celu utworzenia listy peptydów Nucb2 niezbędnej do dalszej analizy. W tym celu, 15  $\mu$ l Nucb2 (90  $\mu$ M) rozcieńczano 35  $\mu$ l buforu A. Następnie, próbka została zakwaszona poprzez dodanie 10  $\mu$ l buforu „stop” na

bazie H<sub>2</sub>O (Rozdział 3.1.6.5). Próbkę trawiono na kolumnie z immobilizowaną pepsyną (Poroszyme™, Applied Biosystem) i eluowano z wykorzystaniem 0,07% kwasu mrówkowego przy stałym przepływie 200 µl/min. Otrzymane peptydy kierowano na kolumnę ACQUITY BEH C18 Van-Guard pre-column, z której były eluowane na kolumnę reversed-phase ACQUITY BEH C18 column (Waters) wykorzystując 6-40% gradient acetonitrylu w 0,01% kwasie mrówkowym przy stałym przepływie 40 µl/min.

Analiza HDX-MS była prowadzona dla próbek deuterowanych. Reakcja HDX była prowadzona dla białka Nucb2 w obecności 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Na początku Nucb2 wraz z odpowiednią ilości poszczególnych dodatków (5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>) było inkubowane przez 30 min w 4°C. Następnie, inicjowano wymianę proton-deuter poprzez dodanie 45 µl D<sub>2</sub>O zawierającej bufor A z dodatkiem 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> do 5 µl Nucb2 (90 µM). Wymianę zahamowano poprzez dodanie 10 µl buforu „stop” na bazie D<sub>2</sub>O w określonych odstępach czasu (10 s, 1 min, 10 min, 25 min, 1 h). Wykonano również dwa eksperymenty kontrolne. W pierwszym, tzw. „in-exchange”, analizowano minimalny poziom wymiany proton-deuter. Nucb2 dodawano do mieszaniny 10 µl buforu „stop” z 45 µl buforu A z D<sub>2</sub>O z dodatkiem 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Drugi eksperyment kontrolny, tzw. „out-exchange”, miał na celu sprawdzenie maksymalnego poziomu wymiany. Do Nucb2 z 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> dodawano bufor A z D<sub>2</sub>O z dodatkiem 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Po 24 h inkubacji, do mieszaniny dodawano 10 µl buforu „stop” w celu jej zakwaszenia. Każda z reakcji była wykonywana w trzykrotnym powtórzeniu. Identyfikację peptydów prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania ProteinLynx Global Server (PLGS) (Waters). Analizę peptydów prowadzono za pomocą programu DynamX 3.0 wykorzystując następujące parametry: minimalną intensywność równą 3000 oraz minimalną ilość produktu na aminokwas o wartości 0,3. Obwiednie izotopowe peptydów również zostały przeanalizowane za pomocą programu DynamX 3.0. Uzyskane wyniki były korygowane manualnie.

Analizy HDX-MS wykonywano we współpracy z dr. inż. Magdaleną Kaus-Drobek oraz mgr inż. Katarzyną Dąbrowską ze Środowiskowego Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

### 3.2.7.7 Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ITC)

Zdolność wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$  do Nucb2 oraz nesfatyny-3 była analizowana za pomocą izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC, ang. *isothermal titration calorimetry*) z wykorzystaniem kalorymetru Nano-ITC (TA Waters) w  $25^{\circ}\text{C}$  w celce pomiarowej o objętości 1 ml. Wszystkie eksperymenty były prowadzone w buforze B (Rozdział 3.1.6.2). Analizy prowadzono dla próbek Nucb2 w stężeniach 32-75  $\mu\text{M}$  oraz dla nesfatyny-3 w stężeniach 95- 120  $\mu\text{M}$ . Stężenie wykorzystanych jonów metali wynosiło 1-6 mM. Po ustabilizowaniu się temperatury, do celki pomiarowej zaczęto dodawać tritrant - jony metali w 5,22  $\mu\text{l}$  porcjach w odstępie 300 s przy szybkości mieszania 250 rpm. Przeprowadzono miareczkowanie samego buforu identycznymi ilościami jonów w celu określenia ciepła rozpuszczania jonów. Ciepła reakcji zostały oszacowane poprzez odjęcie ciepła rozpuszczania poszczególnych jonów od ciepła całkowitego reakcji.

Dane miareczkowania były analizowane z wykorzystaniem programów: NanoAnalyze (wersja 3.3.0 oraz 3.11.0), NITPIC (wersja 1.2.7) (182, 183) oraz SEDPHAT (wersja 15.2b) (184). W zależności od analizowanego wariantu wykorzystywano różne modele oddziaływań do dopasowywania. Wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$  przez Nucb2 zostało dopasowane do modelu ABB, w którym monomer białka posiada dwa symetryczne miejsca wiązania jonu (184). Kolejny z wykorzystanych modeli brał pod uwagę asocjację monomerów białka do dimerów. Model ten został użyty ze względu na zwiększający się udział procesu egzotermicznego obserwowany dla Nucb2 podczas wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Wiązanie jonów  $\text{Mg}^{2+}$  przez Nucb2 oraz nesfatynę-3 zostało dopasowane do modelu AB, w którym monomer białka wiąże jeden jon  $\text{Mg}^{2+}$ . Wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez nesfatynę-3 zostało dopasowane do sekwencyjnego modelu wiązania dwóch jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Natomiast, wiązanie jonów  $\text{Zn}^{2+}$  przez nesfatynę-3 zostało dopasowane do dwóch modeli: jednego miejsca wiązania oraz dwóch niezależnych miejsc wiązania jonu. Parametry termodynamiczne, stałe wiązania ( $K_d$ ), stechiometria reakcji, zmiany entalpii ( $\Delta H$ ) zmiany entropii ( $\Delta S$ ) oraz stopień dysocjacji zostały obliczone na podstawie dopasowania krzywej modelu do izotermi wiązania. Ze względu na swoją kompleksowość proces wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez Nucb2 był analizowany przy użyciu dwóch podejść: „wąski zakres”- do dopasowania brano pod uwagę tylko drugą część izotermi oraz „szeroki zakres” – dopasowanie było oparte na dwóch obserwowanych podczas miareczkowania procesach.

Pomiary ITC zostały wykonane przy współpracy z dr Michałem Padjaskiem, mgr Józefem Tranem oraz prof. dr hab. Arturem Krężłem z Zakładu Chemii Biologicznej Uniwersytetu Wrocławskiego

### 3.2.7.8 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Obrazowanie mikroskopowe było przeprowadzone z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopy elektronowego Hitachi H-800 (Hitachi Hightech). Wykorzystano napięcie przyspieszające 150 kV oraz kamerę CCD EMSIS Quemesa. Próbkki zostały przygotowane w sposób analogiczny do protokołów wcześniej opublikowanych (185, 186). Wykorzystano dostępne komercyjnie siatki miedziane z pokryciem węglowym 200 mesh (Agar Scientific). Nucb2 było inkubowane z 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 0,3 mM ZnCl<sub>2</sub> w 4°C przez 2 tygodnie. W określonych odstępach czasu (zero, siedem oraz czternaście dni) pobierano 20 µl próbki Nucb2, po czym nakładano je na podkładkę silikonową i dodawano 150 µl wody dejonizowanej. Na siatki miedziane nałożono kroplę każdej z próbek, po 30 s osuszono próbkę za pomocą bibuły filtracyjnej. Następnie przemyto siatki wodą. Po usunięciu ostatniej warstwy wody, siatki osuszono za pomocą bibuły filtracyjnej i nałożono na nie 4 µl 2% octanu uranylu. Po 30 s, osuszono siatki i pozostawiono je do wyschnięcia w szalce Petriego na 24 h. Analogiczny protokół był wykorzystany do określenia morfologii supernatantu i osadu Nucb2 otrzymanego w obecności 300 µM ZnCl<sub>2</sub> po eksperymencie AUC.

Na etapie preparacji, porównywano użycie różnych filmów węglowych, różne stężenia białek, przepłukiwanie próbki wodą lub buforem oraz kontrastowanie przy użyciu octanu uranylu i mrówczanu uranylu. Opracowana procedura przygotowania próbek okazała się procedurą powtarzalną. Pomiar TEM realizowano przy współpracy z dr inż. Andrzejem Żakiem z Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

### 3.2.7.9 Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS)

Badania małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS, ang. *small angle X-ray scattering*) dla Nucb2 i nesfatyny-3 były prowadzone z wykorzystaniem urządzenia XEUSS 2.0 SAXS/WAXS system (Xenocs). Próbkki Nucb2 (3,5 mg/ml) oraz nesfatyny-3 (5,0, 2,5 oraz 1 mg/ml) w buforze A (Rozdział 3.1.6.2) w obecności 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> oraz białka referencyjnego surowiczej albuminy wołowej (BSA, ang. *bovine serum albumin*) zostały poddane ekspozycji na promieniowanie rentgenowskie (długość fali  $\lambda = 0,134$  nm) uzyskane ze źródła MetalJet D2 microfocus generator (Excillum AB). Dla każdej próbki rejestrowano 10 niezależnych skanów (czas pojedynczej ekspozycji wynosił 600 s) z wykorzystaniem detektora PILATUS3 1 M (Dectris Ltd.). Dane SAXS były procesowane za pomocą programu FOXTROT (187). Program Primus wykorzystano do obliczenia wartości promieni żyracji  $R_g$  (188), a za pomocą programu GNOM wyznaczono funkcję rozkładu odległości par ( $p(r)$ ) oraz maksymalną średnicę cząsteczki

( $D_{\max}$ ) (189). Masa cząsteczkowa białek została wyznaczona na podstawie masy cząsteczkowej oraz intensywności rozpraszania BSA.

Pomiary prowadzone były we współpracy z dr Michałem Taubem oraz prof. Maciejem Kozakiem na Wydziale Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

### 3.2.8 Test aktywności biomineralizacyjnej *in vitro*

Test biomineralizacji *in vitro* został przeprowadzony na podstawie metody powolnej dyfuzji zgodnej z wcześniej opracowanymi protokołami (115, 190–192). Metoda ta opiera się na powolnym rozkładzie  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  oraz dyfuzji  $\text{CO}_2$  do roztworu  $\text{CaCl}_2$ . Wzrost kryształów węglanu wapnia prowadzono na płytkach 96- dołkowych Nunc MicroWell 96-Well Microplates (Thermo Fisher Scientific), w których umieszczano szkiełka nakrywkowe o średnicy 5 mm (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH). Przygotowano roztwory Nucb2 o różnych stężeniach (0-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wraz z roztworem  $\text{CaCl}_2$  o końcowym stężeniu 10 mM w objętości całkowitej 300  $\mu\text{l}$ . Następnie umieszczano roztwory na odpowiednich szkiełkach. Płytki wraz z roztworami umieszczano w szczelnie zamkniętym eksykatorze w obecności  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (2 g). Wzrost kryształów węglanu wapnia był prowadzony przez 24 h w  $20^\circ\text{C}$ . Kryształy były przemywane wodą miliQ oraz 96% etanolu.

### 3.2.9 Skaningowa mikroskopia elektronowa

Morfologia kryształów węglanu wapnia powstałych w obecności Nucb2 była analizowana z wykorzystaniem mikroskopu skaningowego Philips/FEI XL-20, przy napięciu przyspieszającym 25 kV oraz odległości roboczej 34 mm. Przed pomiarami, próbki kryształów pokrywano 20 nm warstwą platyny. Pomiary zostały wykonane przez prof. dr hab. Jarosława Stolarskiego z Instytutu Paleobiologii PAN w Warszawie.

### 3.2.10 Widma Ramana

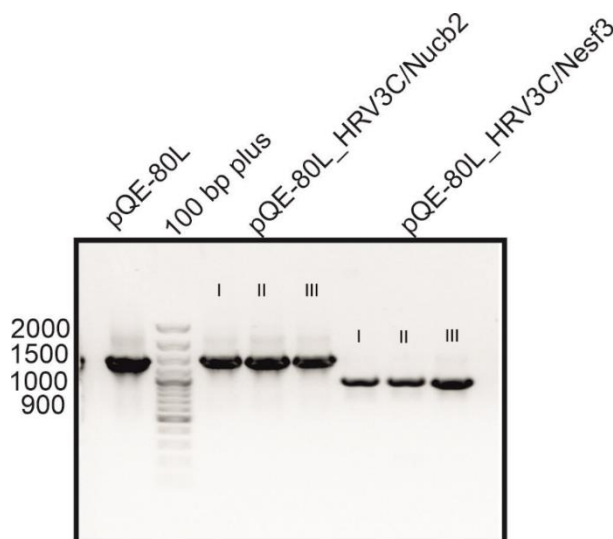
Mapowanie Ramana zostało przeprowadzone z wykorzystaniem mikroskopu Renishaw inVia Raman wyposażonego w optyczny mikroskop konfokalny DM 2500 Leica, kamerę CCD jako detektor oraz laser emitujący promieniowanie o długości 830 nm. Widma ramanowskie były rejestrowane z czasem integracji 5 s. Mapy ramanowskie były tworzone przy użyciu programu Wire 3.4 (Renishaw) poprzez analizę intensywności pików przy  $205\text{ cm}^{-1}$  dla aragonitu,  $280\text{ cm}^{-1}$  dla kalcytu oraz  $300\text{ cm}^{-1}$  dla waterytu. Mapy ramanowskie były zbierane poprzez pomiar widm Ramana z krokiem 10  $\mu\text{m}$  w kierunku osi x oraz y na obszarze  $1000\text{ }\mu\text{m} \times 1000\text{ }\mu\text{m}$ . Pomiary zostały wykonane we współpracy z dr hab. Maciejem Ptakiem z Instytutu Niskich Temperatur oraz Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu.



## 4 WYNIKI

### 4.1 OTRZYMYWANIE PLAZMIDÓW EKSPRESYJNYCH

W celu wprowadzenia do sekwencji cDNA kodującej Nucb2 oraz nesfatynę-3 miejsc restrykcyjnych *SacI* oraz *HindIII* oraz kodonu stop przeprowadzono PCR (Rozdział 3.1.3 oraz 3.2.3). Matrycę do PCR stanowił konstrukct pQE-80L/Nucb2 zawierający cDNA kodujące sekwencję Nucb2 bez peptydu sygnałowego (167). Następnie przygotowane cDNA kodujące Nucb2 i nesfatynę-3 oraz wektor pQE-80L\_HRV3C poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi *SacI* oraz *HindIII*. Po przeprowadzeniu ligacji wektora z poszczególnymi cDNA kodującymi Nucb2 oraz nesfatynę-3, poprawność wklonowania sekwencji kodującej cDNA Nucb2 oraz nesfatyny-3 do wektora pQE-80L\_HRV3C sprawdzono za pomocą PCR kolonijnego. Wynik PCR kolonijnego został przeanalizowany za pomocą elektroforezy analitycznej w żelu agarozowym (Rys. 4.1). Dla obu konstrukctów pQE-80L\_HRV3C/Nucb2 oraz pQE-80L\_HRV3C/nesfatyna-3 wybrano jedną z kolonii, z której wyizolowano DNA za pomocą zestawu NucleoBond®. Poprawność wklonowania sekwencji została potwierdzona za pomocą sekwencjonowania wykonanego przez firmę Genomed (Polska).



**Rysunek 4.1 Elektroforeza analityczna PCR kolonijnego wybranych klonów poligacyjnych**

Dla przygotowanych konstrukctów pQE-80L\_HRV3C/Nucb2 oraz pQE-80L\_HRV3C/nesfatyna-3 sprawdzono trzy kolonie (opisane I, II, III). We wszystkich wybranych koloniach obserwowano obecność produktu o oczekiwanej długości (Nucb2 – 1471 pz, nesfatyna-3 – 976 pz). Jako kontrolę pozytywną reakcji wykorzystano wektor pQE-80L.

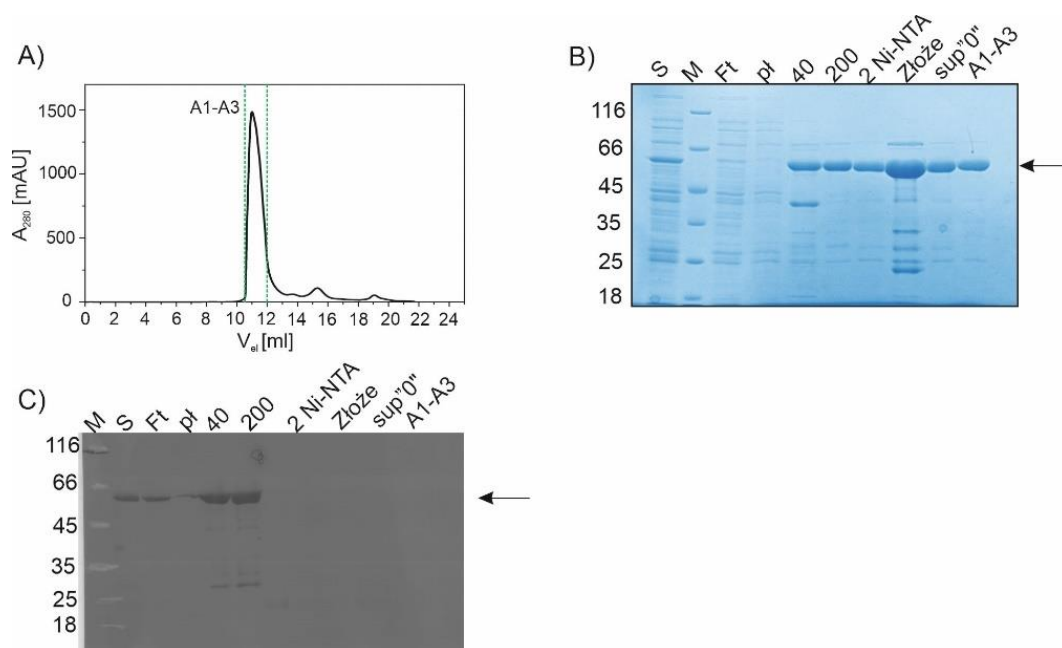


## 4.2 EKSPRESJA I OCZYSZCZANIE NUCB2

Podczas realizacji studiów magisterskich sprawdzono poziom ekspresji oraz rozpuszczalność Nucb2 w różnych warunkach (167). Najwyższy poziom ekspresji oraz rozpuszczalności białka obserwowano dla konstruktu Nucb2 w wektorze pQE-80L w komórkach *E.coli* BL21(DE3)pLysS w temp. 29°C przez 3 h (167). Ekspresję z wektora pQE-80L\_HRV3C prowadzono we wcześniej zoptymalizowanych warunkach dla wektora pQE-80L (167). Uzyskany produkt ekspresji Nucb2 posiada na końcu aminowym znacznik 6×His oraz sekwencje rozpoznawaną przez proteazę HRV3C, co umożliwia otrzymanie białka bez znacznika w procedurze oczyszczania Nucb2. Pierwszym etapem opracowanej procedury oczyszczania była chromatografia powinowactwa na złożu Ni-NTA (Merck). Prowadzono elucję zanieczyszczeń za pomocą roztworu zawierającego 40 mM imidazol oraz elucję białka docelowego roztworem zawierającym 200 mM imidazol. Następnie prowadzono trawienie proteazą HRV 3C (12 h, 4°C) w celu pozbycia się znacznika 6×His. Po całonocnej inkubacji, przeprowadzono drugą chromatografię powinowactwa na złożu Ni-NTA w celu oddzielenia znacznika oraz białka niestrawionego od białka pozbawionego znacznika 6×His. Końcowym etapem była filtracja żelowa na kolumnie Superdex200 Increase (GE Healthcare) (Rys. 4.2A), którą wykorzystano do pozbycia się pozostałych zanieczyszczeń oraz wymiany buforu na bufor odpowiedni do badań. Obecność białka oraz skuteczność procesu trawienia była potwierdzona na każdym etapie oczyszczania za pomocą SDS-PAGE (Rys. 4.2B) oraz Western blot (Rys. 4.2C).

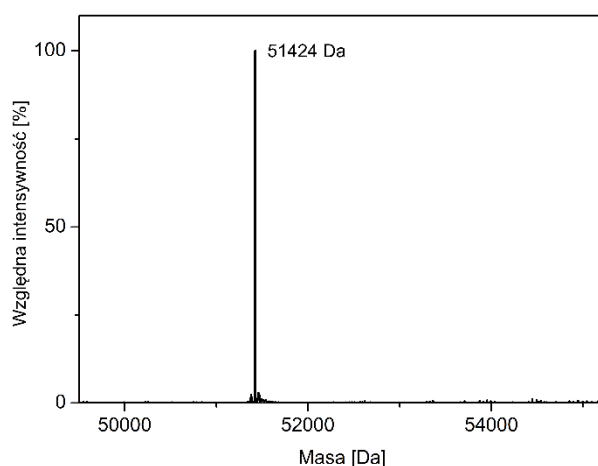
Opracowana procedura pozwalała na uzyskanie z 0,5 l hodowli komórek bakteryjnych około 3,5 mg białka o czystości rzędu 93% określonej metodą densytometryczną. Masa cząsteczkowa białka została potwierdzona za pomocą spektrometrii mas (Rozdział 3.2.6.2). Wyznaczona masa cząsteczkowa (51,424 kDa) (Rys. 4.3) była zgodna z teoretyczną obliczoną na podstawie sekwencji aminokwasowej przez narzędzie ProtParam (51,424 kDa) (193). Co ciekawe, pozorna masa cząsteczkowa białka oszacowana na podstawie analizy SDS-PAGE była większa niż rzeczywista i wynosiła około 60 kDa, co sugeruje, że Nucb2 może należeć do IDPs. IDPs charakteryzują się anormalną migracją na żelu SDS-PAGE, a co za tym idzie zawyżoną pozorną masą cząsteczkową, ze względu na specyficzną zawartość reszt aminokwasowych (194).





**Rysunek 4.2 Oczyszczanie Nucb2**

A) Chromatogram filtracji żelowej Nucb2. Zieloną przerywaną linią oznaczono frakcje białkowe wybrane do analizy SDS-PAGE i Western Blot. B) Analiza SDS-PAGE oczyszczania Nucb2. C) Analiza Western blot oczyszczania Nucb2. M – standard wagowy Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific); S – frakcja białek rozpuszczalnych; Ft – frakcja białek niezwiązanych ze złożem; pł – płukanie buforem do równoważenia; 40 – frakcja białek eluowana buforem R z 40 mM imidazolem; 200 – frakcja białek eluowana buforem R z 200 mM imidazolem; 2 Ni-NTA – frakcja białek niezwiązanych ze złożem po drugiej chromatografii powinowactwa na złożu Ni-NTA; Złoże – frakcja białek związanych ze złożem po drugiej chromatografii powinowactwa na złożu Ni-NTA; sup "0" – frakcja białek przed nałożeniem na kolumnę Superdex200 Increase; A1-A3 – frakcja Nucb2 uzyskana po oczyszczeniu na kolumnie Superdex200 Increase. Czarna strzałka wskazuje pasmo odpowiadające Nucb2.



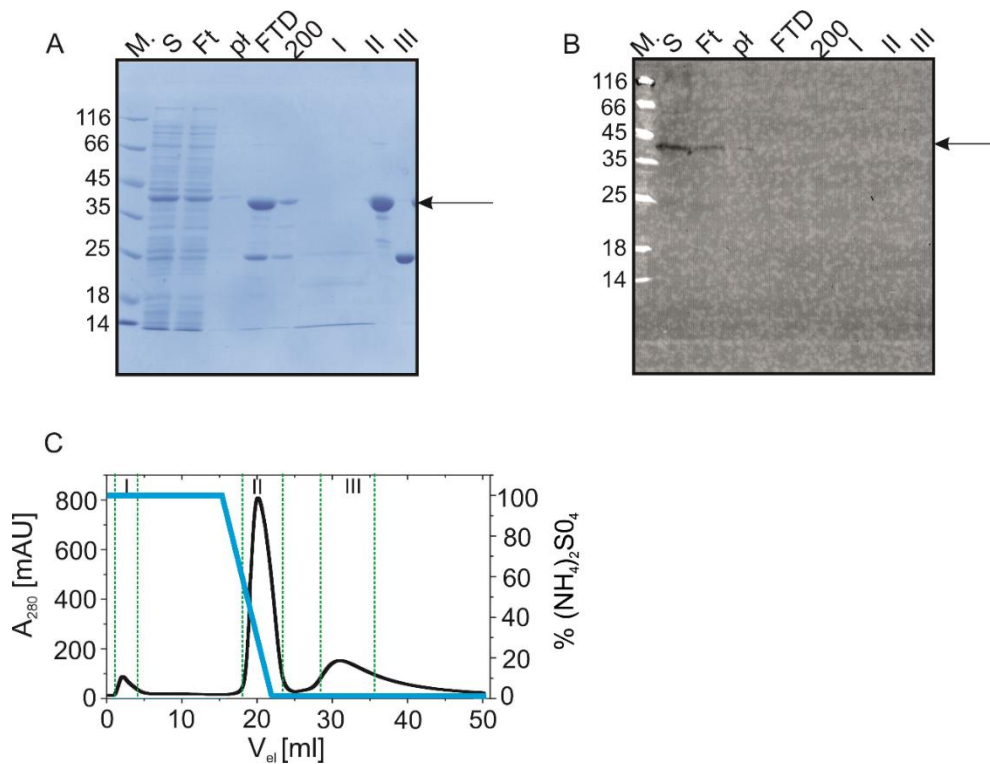
**Rysunek 4.3 Widmo masowe Q-TOF białka Nucb2**

Oszacowana masa głównej populacji cząsteczek wynosi 51424 Da.

### 4.3 EKSPRESJA I OCZYSZCZANIE NESFATYNY-3

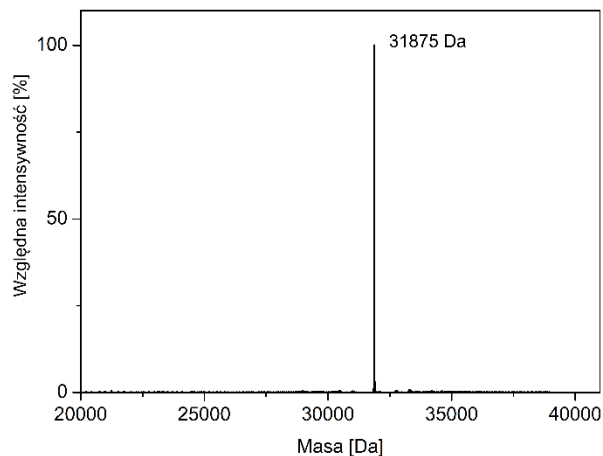
Ekspresja nesfatyny-3 była prowadzona z wektora pQE-80L\_HRV3C w komórkach *E.coli* BL21(DE3)pLysS przez 3 h w temp. 29°C. Na końcu aminowym rekombinowanego białka znajduje się znacznik 6×His oraz sekwencja rozpoznawana przez proteazę HRV3C. Pierwszym etapem oczyszczania nesfatyny-3 była chromatografia powinowactwa na złożu Ni-NTA. Następnie, znacznik 6×His z końca aminowego nesfatyny-3 usunięto za pomocą trawienia na złożu proteazą HRV3C. Po całonocnej inkubacji w 4°C zbierano frakcję białek niezwiązanych ze złożem (Rys. 4.4A). Zagęszczono frakcję oraz wymieniono bufor na bufor HIC A. Metoda filtracji żelowej okazała się nieskuteczna do oddzielenia nesfatyny-3 od towarzyszących jej zanieczyszczeń. Aby skutecznie oddzielić nesfatynę-3 od zanieczyszczeń posłużono się chromatografią oddziaływań hydrofobowych na kolumnie HiTrap Phenyl HP, wykorzystując różnice hydrofobowości nesfatyny-3 oraz obecnego zanieczyszczenia o masie cząsteczkowej około 25 kDa (Rys. 4.4A). Oba białka wiązano do kolumny w buforze HIC A zawierającym 700 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Następnie nesfatyna-3 oraz zanieczyszczenie zostały rozdzielone poprzez obniżenie stężenia (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do 0 mM, poprzez zastosowanie liniowego gradientu buforu HIC B (Rys. 4.4C). Obecność białka była sprawdzana na każdym etapie procedury za pomocą SDS- PAGE (Rys. 4.4A). Skuteczność trawienia przez proteazę HRV3C potwierdzono metodą Western blot (Rys. 4.4B). Opracowana procedura umożliwiała otrzymywanie z 0,5 l hodowli komórek bakteryjnych 2 mg białka nesfatyny-3 o czystości rzędu 90% określonej metodą densytometryczną

Masa cząsteczkowa nesfatyny-3 wyznaczona za pomocą spektrometrii mas (Rozdział 3.2.6.2) wynosiła 31,875 kDa i była zgodna z teoretyczną masą cząsteczkową obliczoną za pomocą narzędzia ProtParam (31,875 kDa) (Rys. 4.5) (193). Podobnie jak Nucb2, nesfatyna-3 wykazuje zawyżoną pozorną masę cząsteczkową, oszacowaną na podstawie analizy SDS- PAGE (42,9 kDa), co sugeruje, że białko to także może należeć do IDPs.



#### Rysunek 4.4 Oczyszczanie nesfatyny-3

A) Analiza SDS-PAGE poszczególnych etapów oczyszczania nesfatyny-3. B) Analiza Western blot poszczególnych etapów oczyszczania nesfatyny-3. M – standard wagowy Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Scientific); S – frakcja białek rozpuszczalnych; Ft – frakcja białek niezwiązanych ze złożem; pI – płukanie buforem do równoważenia; FTD – frakcja białek niezwiązanych ze złożem po całkowitym trawieniu proteazą HRV3C; 200 – frakcja białek eluowana buforem R zawierającym 200 mM imidazol; I - frakcja białek niezwiązana z kolumny HiTrap Phenyl HP; II – frakcja nesfatyny-3 uzyskana po rozdzieleniu na kolumnie HiTrap Phenyl HP; III – frakcja zawierająca zanieczyszczenie oddzielone od nesfatyny-3 na kolumnie HiTrap Phenyl HP. Czarna strzałka wskazuje pasmo odpowiadające nesfatynie-3. C) Chromatogram przedstawiający rozdział nesfatyny-3 na kolumnie HiTrap Phenyl HP, czarną linią przedstawiono zależność absorbancji białka przy długości fali 280 nm od objętości elucji ( $V_{el}$ ), niebieską linią przedstawiono gradient stężenia  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (%). Początkowe stężenie  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wynosiło 700 mM, natomiast końcowe 0 mM.



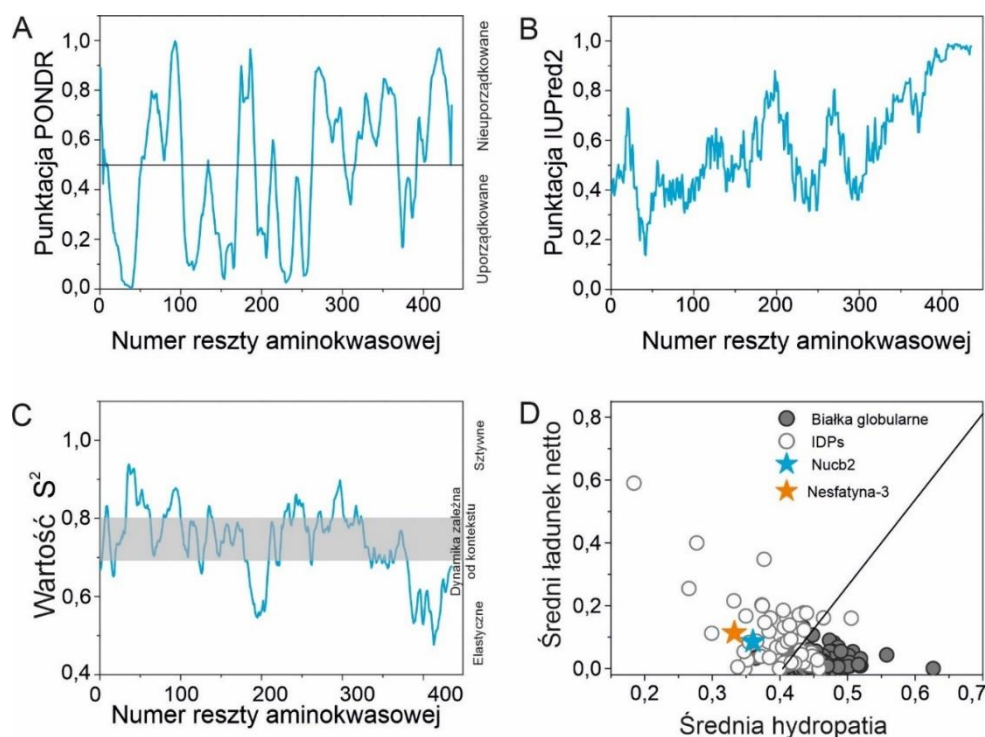
#### Rysunek 4.5 Widmo masowe Q-TOF białka nesfatyny-3

Oszacowana masa głównej populacji cząsteczek wynosi 31875 Da.

## 4.4 ANALIZA MOLEKULARNA NUCB2 ORAZ NESFATYNY-3

### 4.4.1 Analiza bioinformatyczna

Podczas procedury oczyszczania Nucb2 zaobserwowano, że białko to charakteryzuje się małą objętością elucji podczas filtracji żelowej w odniesieniu do objętości zerowej kolumny oraz anormalną szybkością migracji w żelu SDS-PAGE, co sugerowało, że może ono należeć do rodziny IDPs. Dodatkowo Nucb2 bierze udział w wielu różnorodnych procesach molekularnych, co jest również charakterystyczne dla IDPs. W związku z powyższym, wykorzystano kilka dostępnych narzędzi bioinformatycznych w celu oszacowania stopnia nieuporządkowania Nucb2. Analiza predyktorem PONDR<sup>®</sup> (172, 173) pokazała, że Nucb2 wykazuje nieuporządkowanie w 51,4% (reszty, dla których punktacja PONDR  $\geq 0,5$ ) (Rys. 4.6A).



#### **Rysunek 4.6 Analiza in silico sekwencji Nucb2.**

A) Skłonność do nieuporządkowania Nucb2 wyznaczona za pomocą predyktora PONDR<sup>®</sup> (172). Wykres przedstawia punktację PONDR dla poszczególnych reszt aminokwasowych. Czarna linia oddziela od siebie wartości uporządkowane oraz nieuporządkowane. Fragmenty o punktacji  $\geq 0,5$  wykazują nieuporządkowanie. B) Tendencja do nieuporządkowania Nucb2 oszacowana przez predyktor IUPred2A. Fragmenty o największych wartościach punktacji wykazują największe prawdopodobieństwo do nieuporządkowania. C) Dynamika łańcucha bocznego Nucb2 wyznaczona programem DynaMine. Wartość  $S^2$  poniżej 0,69 oznacza fragmenty elastyczne, natomiast  $S^2$  powyżej 0,8 - fragmenty uporządkowane, sztywne. Fragmenty o wartościach  $S^2$  0,69 - 0,8 charakteryzują się dynamiką zależną od kontekstu. D) Wykres Uversky'ego przedstawiający zależność średniego ładunku netto od średniej hydropatii. Na wykresie znajdują się 54 IDPs (białe symbole) oraz 105 białek globularnych (szare symbole), które są oddzielone czarną linią. Niebieska gwiazda przedstawia Nucb2, a pomarańczowa gwiazda - nesfatynę-3.

Nucb2 zawiera pięć IDRs obejmujących następujące reszty aminokwasowe: 52-101, 171-192, 263-302, 316-368 oraz 392-435. Natomiast tendencję do strukturyzacji wykazują reszty aminokwasowe: 10-51, 102-170 oraz 193-262. Analiza PONDR<sup>®</sup> (Rys. 4.6A) pokazała, że Nucb2 może charakteryzować się strukturą złożoną z występujących naprzemiennie fragmentów nieuporządkowanych oraz uporządkowanych. W szczególności dotyczy to fragmentu Nucb2 obejmującego nesfatyny-1 oraz -2. Natomiast fragment karboksylowy (nesfatyna-3), odznacza się niższym udziałem fragmentów uporządkowanych. Wynik kolejnego predyktora nieuporządkowania IUPred2A (174) również potwierdza powyższe obserwacje (Rys. 4.6B).

Przewidywanie dynamiki łańcucha bocznego Nucb2 wykonane narzędziem bioinformatycznym DynaMine (195) pokazało obecność 2 IDRs (parametr  $S^2 < 0,69$ ) obejmujących reszty 183-208 oraz 381-435 Nucb2 (Rys. 4.6C). Dodatkowo Nucb2 odznacza się wysoką zawartością fragmentów (49,1%), których dynamika jest zależna od kontekstu (wartość  $S^2 > 0,69$ ). Fragmenty o pośredniej wartości  $S^2$  mogą ulegać fałdowaniu w obecności ligandów/partnerów molekularnych (175). Co ciekawe, fragmenty o dynamice zależnej od kontekstu są rozłożone równomiernie w całej sekwencji Nucb2 (Rys. 4.6C).

Sekwencja aminokwasowa białka determinuje jego sposób fałdowania. IDPs posiadają charakterystyczny skład aminokwasowy, różny od białek globularnych (194). IDPs bogate są w aminokwasy promujące nieuporządkowanie, głównie o charakterze polarnym oraz posiadające ładunek takie jak Arg, Gln, Glu, Asp, Pro, Lys oraz Ser (196). Jednocześnie charakteryzują się zmniejszoną zawartością aminokwasów promujących fałdowanie się białka, najczęściej hydrofobowych takich jak Ile, Leu, Phe, Cys, Trp, Tyr oraz Val (196). Wiele IDPs zawiera względnie dużo reszt aminokwasowych o charakterze kwasowym czy zasadowym (196). Sekwencja Nucb2 jest bogata w aminokwasy promujące nieuporządkowanie (około 53%), szczególnie aminokwasy o charakterze kwasowym (24,4%), z czego około 66% tych reszt aminokwasowych znajduje się w sekwencji nesfatyny-3. Aminokwasy aromatyczne stanowią 5,5% sekwencji Nucb2. Skład aminokwasowy Nucb2 sugeruje, że może ono posiadać w dużej mierze nieuporządkowany charakter. Dodatkowo na wykresie Uversky'ego, który przedstawia zależność średniego ładunku netto od średniej hydropatii, Nucb2 oraz nesfatyna-3 znajdują się w grupie IDPs (Rys. 4.6D). Nesfatyna-3 ze względu na wyższą wartość średniego ładunku netto znajduje się dalej od granicy pomiędzy IDPs a białkami globularnymi niż białko pełnej długości, co sugeruje większy stopień nieuporządkowania (Rys. 4.6D).

Podsumowując, analizy *in silico* pokazały, że Nucb2 może wykazywać strukturę złożoną zarówno z IDRs jak i fragmentów uporządkowanych, występujących naprzemiennie. Dalsze analizy *in vitro* były przeprowadzane w celu określenia metodami eksperymentalnymi molekularnej charakterystyki Nucb2 oraz nesfatyny-3.

#### 4.4.2 Analiza zawartości struktury drugorzędowej białek za pomocą spektroskopii dichroizmu kołowego

Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) jest metodą wykorzystywaną do oszacowania zawartości struktur drugorzędowych w białkach (197). Technika ta opiera się na różnicy pomiędzy absorpcją światła spolaryzowanego kołowo lewo- oraz prawoskrętnie przez chromofor w próbce (197). W obszarze dalekiego nadfioletu (190- 260 nm), wiązanie peptydowe jest główną grupą absorbującą promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu UV/Vis w białkach (197). Elementy struktury drugorzędowej wykazują charakterystyczne widma CD. Struktury  $\alpha$ -helikalne charakteryzują się dwoma minimami przy długościach fali 208 oraz 222 nm (198). W przypadku dobrze zdefiniowanej  $\beta$ - struktury obserwuje się minimum przy długości fali 218 nm oraz maksimum przy długości fali 200 nm (199). Natomiast peptydy zawierające IDRs wykazują minimum przy długości fali 200 nm (200). Spektroskopia CD jest często wykorzystywaną techniką do analizy zmian konformacyjnych białek, które są wywołane zmianą parametrów takich jak temperatura, pH czy obecność/wiązanie się różnych ligandów (201).

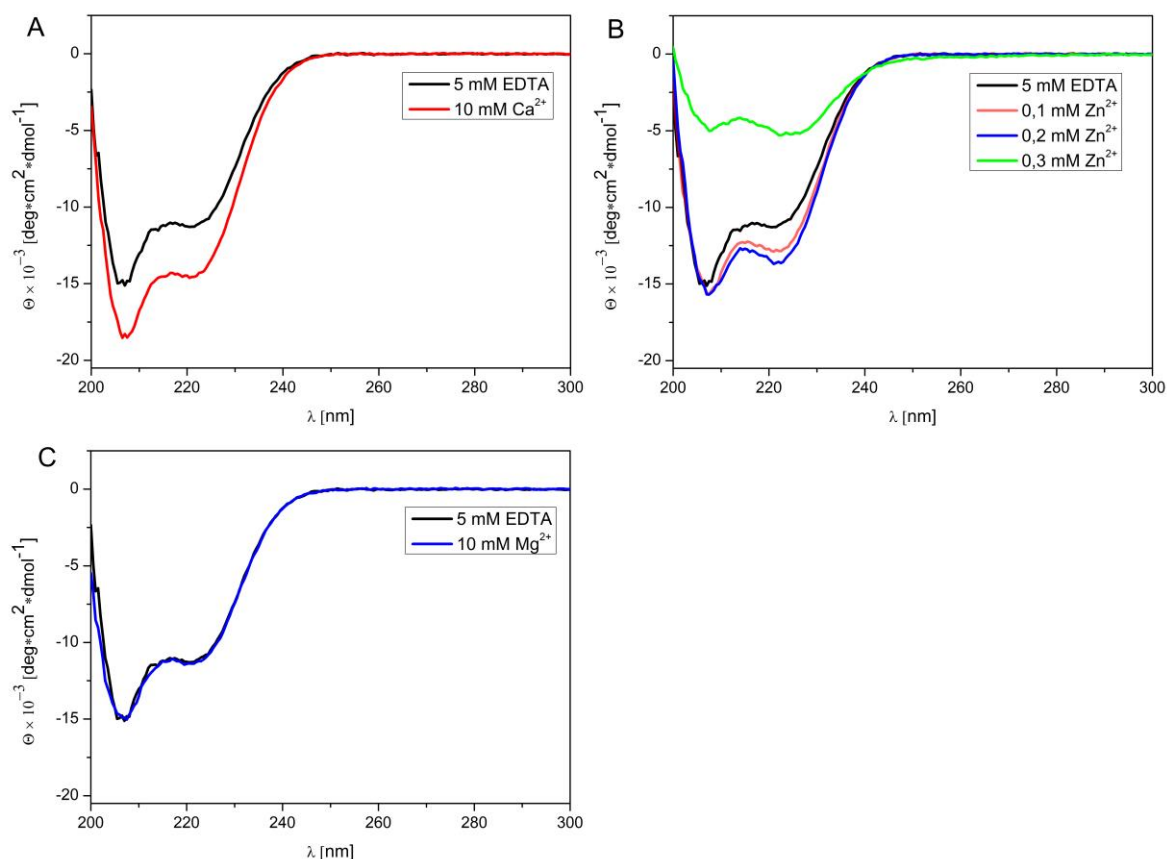
Nucb2 posiada w swojej strukturze trzeciorzędowej dwie domeny dłoni EF (202), które są odpowiedzialne za wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  (133). Dodatkowo na końcu aminowym Nucb2 jest zlokalizowany domniemany motyw wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$ , obecny także w paralogu Nucb1 (18). W celu wyznaczenia zawartości struktur drugorzędowych Nucb2 oraz ich zmian pod wpływem naturalnych ligandów białka- jonów metali ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$ ), zarejestrowano widma CD w obszarze dalekiego nadfioletu. Odpowiednie stężenia jonów wybrano bazując na informacji o ich stężeniach fizjologicznych. Wewnątrzkomórkowe stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu jest równe około 100 nM, natomiast zewnątrzkomórkowe stężenie wynosi około 2 mM (203, 204). Fizjologiczne stężenie wolnych jonów  $\text{Zn}^{2+}$  jest bardzo niskie (od pM do nM). Jednakże w przypadku  $\text{Zn}^{2+}$  wykorzystano w pomiarach stężenia mikromolarne, ze względu na akumulację w warunkach fizjologicznych jonów  $\text{Zn}^{2+}$  o takim stężeniu w komórkach określonych tkanek np. neuronach (205) czy komórkach  $\beta$  trzustki (206). Stężenie fizjologiczne

jonów  $Mg^{2+}$  jest w zakresie milimolarnym (126). Całkowite wewnątrzkomórkowe stężenie jonów  $Mg^{2+}$  wynosi 15 mM (207).

Widmo CD dla Nucb2 w obecności 5 mM EDTA (Rys. 4.7), charakteryzuje się dwoma minimami przy długości fali 208 oraz 222 nm, co sugeruje obecność znaczącej ilości struktur  $\alpha$ -helikalnych w białku. Dekonwolucja danych CD za pomocą oprogramowania CDNN (177) (Tab. 4.1) pokazała, że dominującym typem struktury drugorzędowej Nucb2 jest struktura  $\alpha$ -helikalna ( $46,9 \pm 0,4\%$ ). Nucb2 posiada również znaczną ilość struktur nieuporządkowanych ( $24,6 \pm 0,2\%$ ).  $\beta$ -struktury stanowią  $11,46 \pm 0,06\%$  zawartości Nucb2, natomiast zwroty  $\beta$  -  $14,83 \pm 0,06\%$ . Obecność jonów  $Ca^{2+}$  o stężeniu 10 mM spowodowała zwiększenie się zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych Nucb2 (Rys. 4.7A oraz Tab. 4.1) z  $46,8 \pm 0,4\%$  do  $54,0 \pm 1,8\%$ . Jednocześnie zaobserwowano zmniejszenie się zawartości struktur nieuporządkowanych z  $24,6 \pm 0,2\%$  do  $20,6 \pm 0,9\%$ . Powyższe wyniki wskazują, że jony  $Ca^{2+}$  istotnie wpływają na strukturę drugorzędową Nucb2. Następnie zbadano wpływ jonów  $Zn^{2+}$  na strukturę drugorzędową Nucb2. Obecność jonów  $Zn^{2+}$  o stężeniu 0,1 oraz 0,2 mM nieznacznie wpływa na zawartość struktury drugorzędowej, prowadząc do zwiększenia zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych oraz zmniejszenia się udziału struktur nieuporządkowanych (Rys. 4.7B oraz Tab. 4.1). Natomiast w obecności jonów  $Zn^{2+}$  o stężeniu 0,3 mM obserwowano znaczny zanik sygnału CD (Rys. 4.7B). Dla badanego stężenia Nucb2 oraz dla stężeń  $ZnCl_2 \geq 0,3$  mM, pomiary oraz ich analiza są problematyczne, ze względu na obserwowane wytrącanie się białka. Pomiary CD Nucb2 w obecności 10 mM  $MgCl_2$  pokazały, że jony  $Mg^{2+}$  nie mają wpływu na jego strukturę drugorzędową (Rys. 4.7C oraz Tab. 4.1).

Przedstawione powyżej wyniki wskazują, że Nucb2 ulega zmianom strukturalnym w obecności 10 mM  $CaCl_2$  oraz 0,1-0,2 mM  $ZnCl_2$ , które polegają na zwiększeniu zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych oraz zmniejszeniu udziału struktur nieuporządkowanych. Jony  $Ca^{2+}$  mają większy efekt na zmianę struktury drugorzędowej. Natomiast obecność wysokiego stężenia  $ZnCl_2$  prowadzi do wytrącania się Nucb2. Jony  $Mg^{2+}$  nie zmieniają struktury drugorzędowej Nucb2.





**Rysunek 4.7** Wpływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  na strukturę drugorzędową Nucb2

Widma CD dalekiego nadfioletu były rejestrowane dla 10  $\mu\text{M}$  Nucb2 w buforze A w obecności 5 mM EDTA, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (A), 0,1 mM, 0,2 mM i 0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$  (B) oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (C) w 20°C.

**Tabela 4.1** Zawartość struktury drugorzędowej Nucb2 w nieobecności oraz obecności  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$

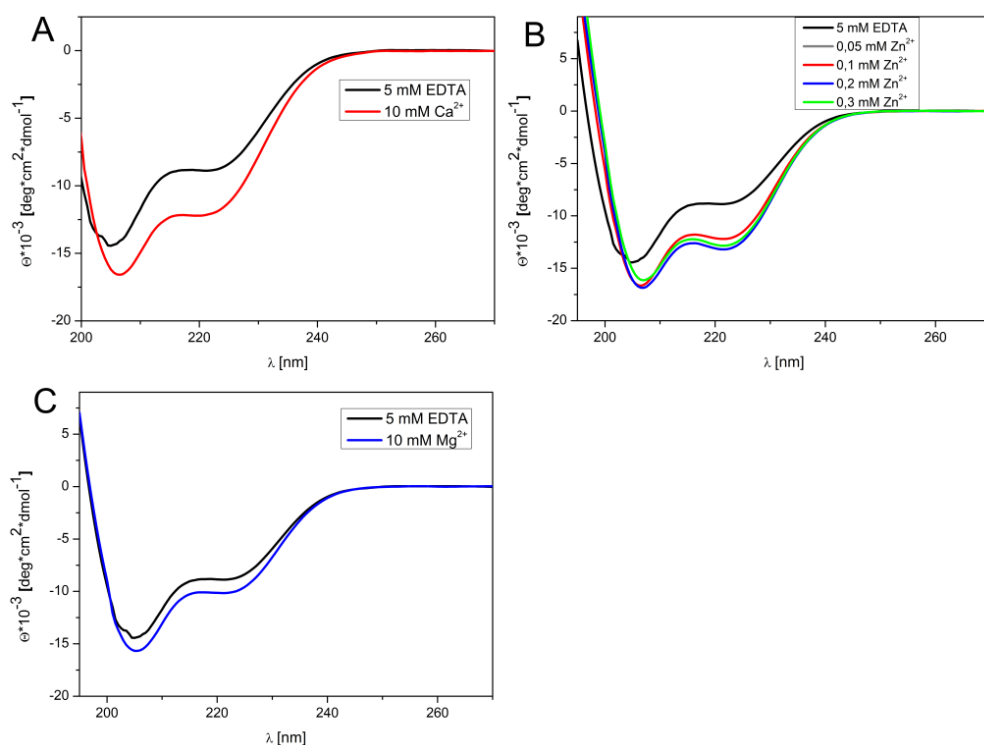
W tabeli przedstawiono udział procentowy każdego elementu struktury drugorzędowej Nucb2, która została oszacowana za pomocą programu CDNN (177). Wyniki są średnią z trzech niezależnych eksperymentów. Wyniki przedstawione dla Nucb2 w obecności 0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$  nie sumują się do 100% i należy je traktować z ostrożnością ze względu na precipitację Nucb2 w tych warunkach.

Czynnik	Helisy $\alpha$	Arkusze $\beta$		Zwroty $\beta$	Struktury nieuporządkowane (D)
		Antyrównoległe	Równoległe		
<b>udział (%)</b>					
EDTA(5 mM)	46,9 $\pm$ 0,4	5,53 $\pm$ 0,06	5,93 $\pm$ 0,06	14,83 $\pm$ 0,06	24,6 $\pm$ 0,2
$\text{Ca}^{2+}$ (10 mM)	54,0 $\pm$ 1,8	4,5 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,3	13,8 $\pm$ 0,3	20,6 $\pm$ 0,9
$\text{Zn}^{2+}$ (0,1mM)	49,8 $\pm$ 0,6	5,2 $\pm$ 0,06	5,46 $\pm$ 0,06	14,4 $\pm$ 0,1	23,2 $\pm$ 0,3
$\text{Zn}^{2+}$ (0,2 mM)	51,7 $\pm$ 0,8	4,9 $\pm$ 0,11	5,16 $\pm$ 0,11	14,13 $\pm$ 0,11	22,3 $\pm$ 0,4
$\text{Zn}^{2+}$ (0,3 mM)	18,7 $\pm$ 0,0	12,6 $\pm$ 0,0	15,4 $\pm$ 0,0	19,7 $\pm$ 0,0	46,6 $\pm$ 0,0
$\text{Mg}^{2+}$ (10 mM)	43,5 $\pm$ 2,0	6,0 $\pm$ 0,3	6,6 $\pm$ 0,4	15,3 $\pm$ 0,3	26,5 $\pm$ 1,2



Strukturę drugorzędową nesfatyny-3 w obecności jonów metali ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$ ), także analizowano za pomocą spektroskopii CD. Widma CD nesfatyny-3 w obecności 5 mM EDTA, podobnie jak widma białka Nucb2 charakteryzują się minimami przy długości fali 208 oraz 222 nm (Rys. 4.8). Nesfatyna-3 jest białkiem bogatym w struktury  $\alpha$ -helikalne ( $33,0 \pm 1,3\%$ ) oraz struktury nieuporządkowane ( $33,0 \pm 1,0\%$ ) (Tab. 4.2). Odznacza się także zawartością  $\beta$ -struktur ( $17,1 \pm 0,7\%$ ) oraz zwrotów  $\beta$  ( $16,9 \pm 0,3\%$ ). W obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  dochodzi do zwiększenia udziału struktur  $\alpha$ -helikalnych ( $43,8 \pm 3,0\%$ ) oraz zmniejszenia ilości struktur nieuporządkowanych ( $26,4 \pm 1,7\%$ ) oraz  $\beta$ -struktur ( $12,6 \pm 0,11\%$ ) (Tab. 4.2) Zatem, podobnie jak w przypadku Nucb2, jony  $\text{Ca}^{2+}$  wpływają na strukturę drugorzędową nesfatyny-3. Obecność wzrastającego stężenia jonów  $\text{Zn}^{2+}$  (do 0,3 mM) prowadzi także do zwiększenia udziału struktur  $\alpha$ -helikalnych ( $45,9 \pm 0,8\%$ ) oraz równoczesnego zmniejszenia udziału struktur nieuporządkowanych ( $25,2 \pm 0,5\%$ ) nesfatyny-3 (Rys. 4.8B). Dodatkowo nesfatyna-3 jest mniej wrażliwa na wysokie stężenia jonów  $\text{Zn}^{2+}$  niż białko Nucb2. Podczas eksperymentów nie obserwowano procesu wytrącania białka. Co ciekawe, obecność jonów  $\text{Mg}^{2+}$  także powoduje wzrost zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych ( $38,0 \pm 1,0\%$ ) wraz ze zmniejszeniem się struktur nieuporządkowanych ( $29,8 \pm 0,6\%$ ) (Rys. 4.8C oraz Tab. 4.2). Jednak efekt jonów  $\text{Mg}^{2+}$  jest słabszy niż jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$ .

Wyniki analizy CD pokazały, że do zmian struktury drugorzędowej nesfatyny-3 dochodzi w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$ . Obecność tych jonów prowadzi do zwiększenia się zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych w nesfatynie-3 oraz zmniejszenia udziału struktur nieuporządkowanych. Największy efekt obserwowano dla jonów  $\text{Zn}^{2+}$ , a najmniejszy dla jonów  $\text{Mg}^{2+}$ .



**Rysunek 4.8** Wpływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  na strukturę drugorzędową nesfatyny-3

Widma CD dalekiego nadfioletu były rejestrowane dla 10  $\mu\text{M}$  nesfatyny-3 w buforze A w obecności 5 mM EDTA, 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (A), 0,05-0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$  (B) oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (C) w 20 °C.

**Tabela 4.2** Zawartość struktury drugorzędowej nesfatyny-3 w nieobecności oraz obecności  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$

W tabeli przedstawiono zawartość procentową każdego elementu struktury drugorzędowej nesfatyny-3, która została oszacowana za pomocą programu CDNN (177). Wyniki są średnią z trzech niezależnych eksperymentów.

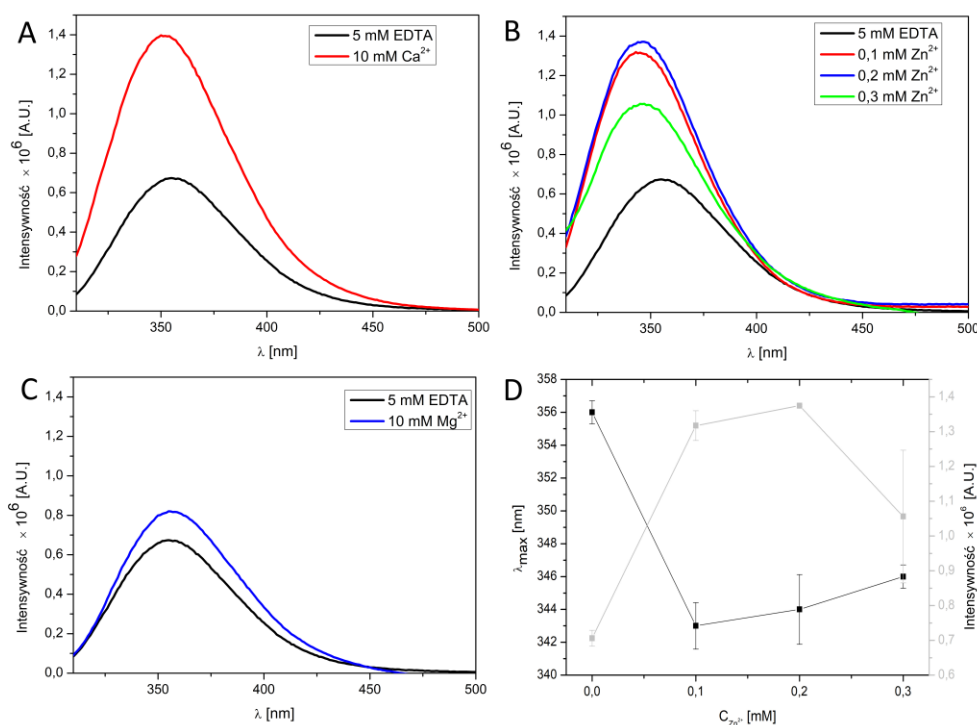
Czynnik	Helisy $\alpha$	Arkusze $\beta$		Zwroty beta	Struktury nieuporządkowane (D)
		Antyrównoległe	Równoległe		
<b>Udział (%)</b>					
EDTA (5 mM)	33,0 ± 1,3	8,0 ± 0,3	9,1 ± 0,4	16,9 ± 0,3	33,0 ± 1,0
$\text{Ca}^{2+}$ (10 mM)	44,0 ± 3,0	6,1 ± 0,5	6,5 ± 0,6	15,2 ± 0,4	26,4 ± 1,7
$\text{Mg}^{2+}$ (10 mM)	38,0 ± 1,0	7,0 ± 0,2	7,8 ± 0,2	16,1 ± 0,14	29,8 ± 0,6
$\text{Zn}^{2+}$ (0,05 mM)	45,0 ± 1,1	5,8 ± 0,2	6,3 ± 0,2	15,1 ± 0,2	25,7 ± 0,6
$\text{Zn}^{2+}$ (0,1 mM)	45,1 ± 0,5	5,77 ± 0,06	6,27 ± 0,06	15,07 ± 0,06	25,6 ± 0,3
$\text{Zn}^{2+}$ (0,2 mM)	47,0 ± 1,0	5,47 ± 0,12	5,9 ± 0,2	14,7 ± 0,2	24,4 ± 0,5
$\text{Zn}^{2+}$ (0,3 mM)	45,9 ± 0,8	5,67 ± 0,15	6,13 ± 0,15	14,9 ± 0,1	25,2 ± 0,5

#### 4.4.3 Analiza zmian struktury trzeciorzędowej białek za pomocą pomiarów wewnętrznej fluorescencji białka

Analiza widm CD pokazała, że Nucb2 oraz nesfatyna-3 ulegają zmianom struktury drugorzędowej pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$ . Możemy przypuszczać, że badane jony wpływają także na strukturę trzeciorzędową obu białek. W celu określenia wpływu jonów metali  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  na strukturę trzeciorzędową białek, przeprowadzono pomiary wewnętrznej fluorescencji reszt Trp Nucb2 oraz nesfatyny-3. Widmo emisji reszt Trp jest zależne od ich otoczenia (208). Kiedy reszta Trp jest zlokalizowana w środowisku hydrofobowym w cząsteczce białka, charakteryzuje się maksimum emisji przy długościach fal mniejszych od 340 nm (208). Reszty Trp, które są zlokalizowane w środowisku polarnym posiadają maksimum emisji przy długościach fal większych od 340 nm (208). Nucb2 posiada dwie reszty Trp, które są zlokalizowane w sekwencji nesfatyny-3. Maksimum emisji dwóch reszt Trp Nucb2 w nieobecności jonów metali znajduje się przy długości fali 356 nm (Rys.4.9A), co wskazuje na lokalizację tych reszt w otoczeniu polarnym, najprawdopodobniej na powierzchni białka. Taka ekspozycja do rozpuszczalnika jest charakterystyczne dla reszt Trp, które znajdują się w regionach IDPs (208). W obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  o stężeniu 10 mM, obserwowano znaczny wzrost intensywności fluorescencji (około 2-krotny) (Rys. 4.9A) oraz nieznaczne przesunięcie maksimum fluorescencji w kierunku fal krótszych tzw. *blue shift* (208) (z 356 nm do 354 nm), co sugeruje niewielką zmianę otoczenia reszt Trp w kierunku hydrofobowym (Rys. 4.9A).

W obecności jonów  $\text{Zn}^{2+}$  o stężeniu 0,1-0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$  dochodzi do znacznego przesunięcia maksimum fluorescencji w kierunku fal krótszych (Rys. 4.9B i D) wynoszącego około 10 nm, co wskazuje na zmianę otoczenia reszt Trp na bardziej hydrofobowe pod wpływem jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Podobnie jak w przypadku jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  o stężeniu 0,1- 0,2 mM powoduje znaczny wzrost intensywności fluorescencji (1,94-krotny). Jednakże intensywność fluorescencji Nucb2 spada w obecności 0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$ , co może być spowodowane wytrącaniem się Nucb2 (Rys. 4.9B i D). Obecność jonów  $\text{Mg}^{2+}$  nie ma wpływu na zmianę pozycji maksimum emisji reszt Trp. Natomiast powoduje niewielki wzrost intensywności fluorescencji (Rys. 4.9C).

Powyższe badania pokazały, że jony  $\text{Zn}^{2+}$  wpływają na strukturę trzeciorzędową Nucb2. Prawdopodobnie jony  $\text{Zn}^{2+}$  poprzez zmiany strukturalne w obrębie nesfatyny-3 prowadzą do kompaktowania się struktury białka. Obecność jonów  $\text{Ca}^{2+}$  powoduje niewielką zmianę w otoczeniu reszt Trp Nucb2, natomiast jony  $\text{Mg}^{2+}$  nie wpływają na widmo fluorescencyjne Nucb2.

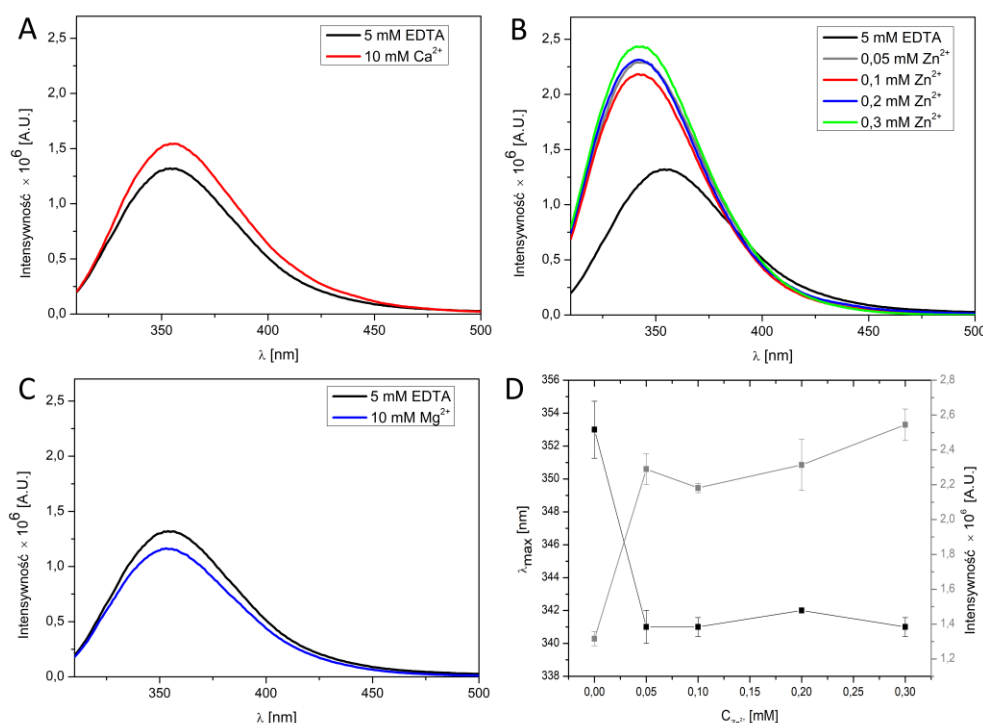


**Rysunek 4.9** Zmiany wewnętrznej fluorescencji Nucb2 w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$

Widma fluorescencji reszt Trp 2  $\mu\text{M}$  Nucb2 w buforze A w obecności 5 mM EDTA, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , (A) 0,1- 0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$ (B) oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (C). Zmiana długości fali oraz intensywności fluorescencji reszt Trp Nucb2 w obecności wzrastającego stężenia  $\text{ZnCl}_2$  (D).

Badania wewnętrznej fluorescencji reszt Trp nesfatyny-3 w obecności jonów metali pokazały, że nesfatyna-3 reaguje w podobny sposób na jony metali jak Nucb2. Nesfatyna-3 w nieobecności jonów metali odznacza się maksimum emisji reszt Trp przy długości fali 353 nm, co wskazuje na jej nieuporządkowany charakter (Rys. 4.10). W obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  obserwowano niewielki wzrost fluorescencji oraz przesunięcie się maksimum fluorescencji reszt Trp w kierunku fal krótszych o 2 nm (531 nm). Podobnie jak w przypadku białka pełnej długości Nucb2 sugeruje to nieznaczną zmianę otoczenia w kierunku hydrofobowym (Rys. 4.10A). Obecność jonów  $\text{Mg}^{2+}$  spowodowała nieznaczne zmniejszenie intensywności fluorescencji, jednak nie spowodowała przesunięcia maksimum emisji reszt Trp (Rys. 4.10C). Największe zmiany w strukturze trzeciorzędowej nesfatyny-3 obserwowano w obecności jonów  $\text{Zn}^{2+}$  (Rys. 4.10B i D). Obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  we wzrastającym stężeniu (0,05 - 0,3 mM) prowadziła do przesunięcia się maksimum emisji o 13 nm w kierunku fal krótszych (z 353 do 340 nm), co sugeruje bardziej hydrofobowe otoczenie reszt Trp w obecności jonów  $\text{Zn}^{2+}$ . Dodatkowo intensywność fluorescencji nesfatyny-3 wzrastała wraz ze wzrostem stężenia jonów  $\text{Zn}^{2+}$  (Rys. 4.10D).

Przedstawione badania pokazują, że struktura trzeciorzędowa nesfatyny-3 jest wrażliwa w podobny sposób na jony metali jak Nucb2. Oba białka ulegają niewielkiej zmianie strukturalnej w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Może to wynikać z przegrupowania reszt Trp obecnych w białkach. Natomiast, jony  $\text{Zn}^{2+}$  prowadzą do zmiany otoczenia reszt Trp obu białek na bardziej hydrofobowe, co pozwala przypuszczać, że obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  indukuje proces fałdowania zarówno Nucb2 jak i nesfatyny-3, przynajmniej w obrębie dwóch Trp obecnych w białkach. Jest to zaskakująca obserwacja, z uwagi na brak typowego motywu wiązania  $\text{Zn}^{2+}$  w sekwencji nesfatyny-3. Dodatkowo w odróżnieniu od Nucb2, nesfatyna-3 nie ulega wytrąceniu się w obecności jonów  $\text{Zn}^{2+}$  o stężeniu 0,3 mM, co może sugerować różny wpływ  $\text{Zn}^{2+}$  na oba badane białka.



**Rysunek 4.10** Zmiany wewnętrznej fluorescencji białka nesfatyny-3 w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$

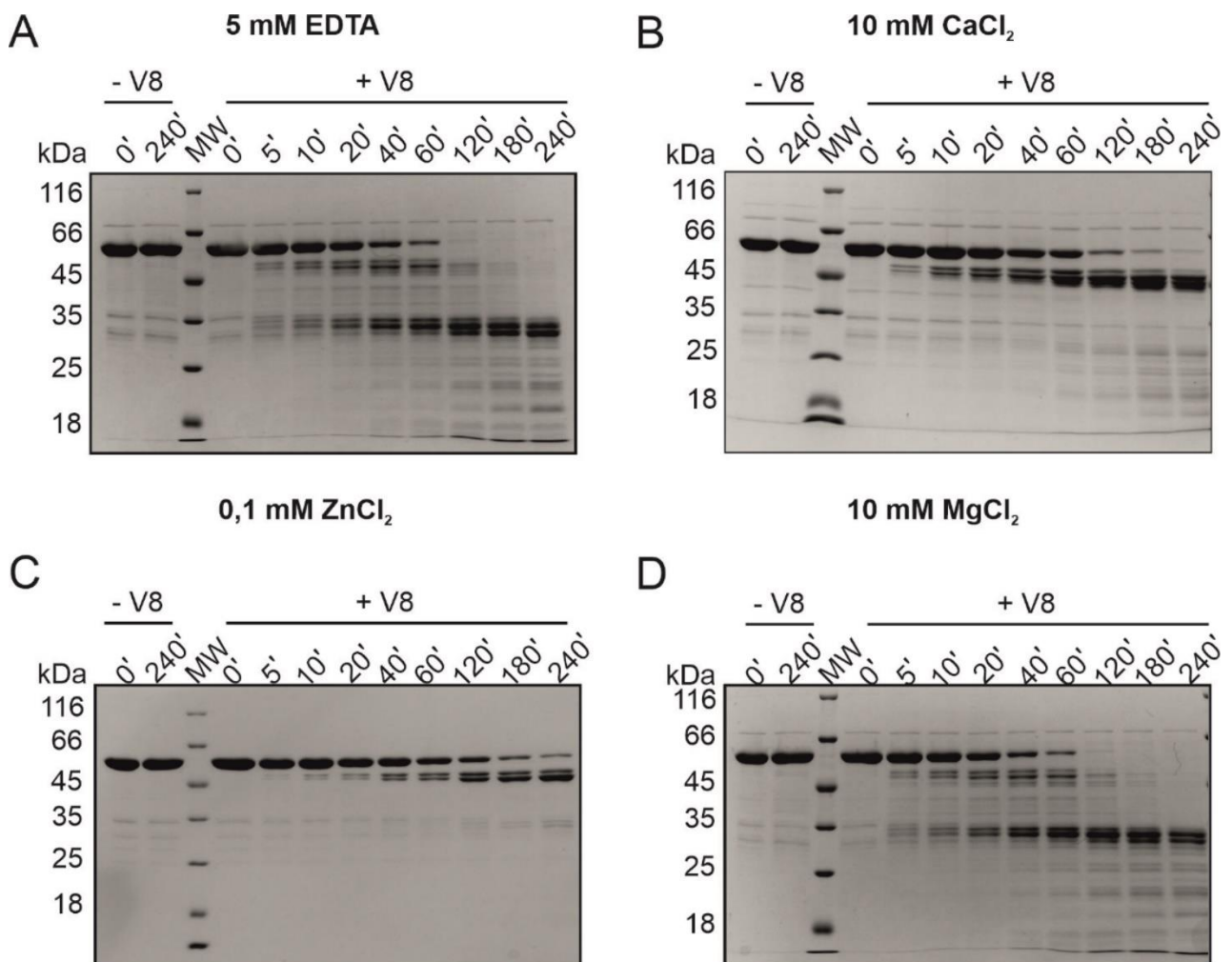
Widma fluorescencji reszt Trp 2  $\mu\text{M}$  nesfatyny-3 w buforze A w obecności 5 mM EDTA, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , (A) 0,05-0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$ (B) oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (C). Zmiana długości fali oraz intensywności fluorescencji reszt Trp nesfatyny-3 w obecności wzrastającego stężenia  $\text{ZnCl}_2$  (D).

#### 4.4.4 Analiza zmian strukturalnych białek za pomocą limitowanej proteolizy

Wyniki analiz widm CD oraz fluorescencyjnych pokazały, że struktura drugo- oraz trzeciorzędowa Nucb2 oraz nesfatyny-3 ulegają zmianie pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$ . W celu dalszego scharakteryzowania wpływu jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  na strukturę Nucb2 oraz nesfatyny-3 wykorzystano limitowaną proteolizę. Trawienie obu białek prowadzono

w nieobecności oraz obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  przy użyciu proteazy serynowej, endopeptydazy glutamyłowej Glu-C ze szczepu V8 *Staphylococcus aureus* (GluV8). GluV8 selektywnie hydrolizuje wiązanie peptydowe po karboksylowej stronie reszt Glu oraz Asp (209). Proteoliza białka jest obserwowana szczególnie w tych częściach łańcucha polipeptydowego, które wykazują znaczną elastyczność oraz nieuporządkowanie (210–212). Na rysunku 4.11A oraz B przedstawiono wynik analizy elektroforetycznej produktów trawienia Nucb2 w nieobecności oraz obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Jak pokazano (Rys. 4.11A) inkubacja białka w nieobecności jonów z proteazą GluV8 prowadziła do powstania kilku fragmentów o masie molekularnej około 45 kDa oraz 30 kDa. Fragmenty o masie molekularnej około 45 kDa (Rys. 4.11A) ulegają dalszej hydrolizie w czasie i dochodzi do akumulacji produktów trawienia o masie molekularnej około 30 kDa. Natomiast, obecność 10 mM  $\text{CaCl}_2$  sprawia, że Nucb2 staje się bardziej odporne na trawienie (Rys. 4.11B). W obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , powstaje jeden główny produkt o masie molekularnej około 45 kDa, którego akumulację obserwowano nawet po 240 minutach (Rys. 4.11B).

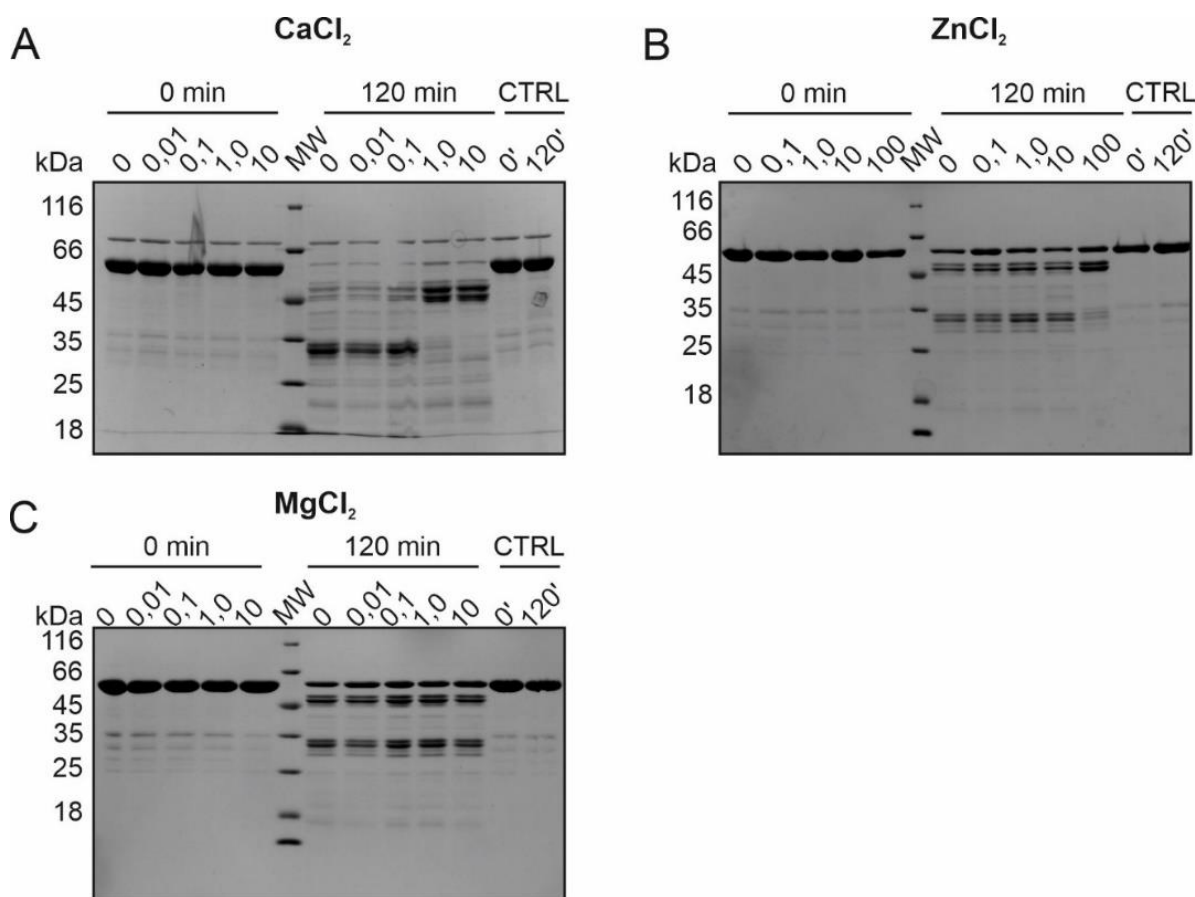
Aby uzyskać więcej informacji o wpływie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na strukturę Nucb2, przeprowadzono trawienie białka w różnych stężeniach  $\text{CaCl}_2$  (0-10 mM) (Rys. 4.12A). Małe stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (0,01-0,1 mM) nie zmieniają wrażliwości Nucb2 na trawienie. Dopiero obecność 1 mM  $\text{CaCl}_2$  sprawia, że Nucb2 staje się bardziej odporne na trawienie proteazą GluV8 (Rys. 4.12A). Podczas trawienia dochodzi do akumulacji produktu o masie molekularnej 45 kDa (Rys. 4.12A). Analizę zmian strukturalnych Nucb2 za pomocą limitowanej proteolizy prowadzono także w obecności 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  spowodowała, że Nucb2 wykazywało większą odporność na trawienie proteazą GluV8 (Rys. 4.11C). Dalsza analiza pokazała, że Nucb2 w obecności niskiego stężenia  $\text{Zn}^{2+}$  (Rys. 4.12B) (0- 0,01 mM) jest wrażliwe na trawienie proteazy GluV8. Jednakże inkubacja z 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  pozwoliła na zaobserwowanie odporności na proteolizę (Rys. 4.12B). Ślad pochodzący od białka niestrawionego jest widoczny nawet po 240 min. Natomiast jony  $\text{Mg}^{2+}$  nie wpływają na zmianę wzoru trawienia Nucb2 (Rys. 4.11D). Powyższe wyniki pokazały, że Nucb2 odznacza się znaczną stopniem elastyczności, a w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$  ulega zmianom strukturalnym, prowadzącym do wzrostu zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych wraz ze zmniejszeniem zawartości struktur nieuporządkowanych. Wyniki są zgodne z wcześniej przedstawionymi analizami CD oraz fluorescencji.



**Rysunek 4.11 Analiza SDS-PAGE produktów limitowanej proteolizy Nucb2 w różnych odstępach czasowych (0-240 min)**

Nucb2 było inkubowane z proteazą GluV8 w 20°C w obecności 5 mM EDTA (A), 10 mM CaCl<sub>2</sub> (B), 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> (C) oraz 10 mM MgCl<sub>2</sub> (D) w czasie 0-240 min. M – białkowy standard masowy; -V8 – próbka kontrolna bez proteazy GluV8; +V8 – reakcja proteolizy; 0-'240'- próbki pobierane w poszczególnych odstępach czasowych (0-240 min).





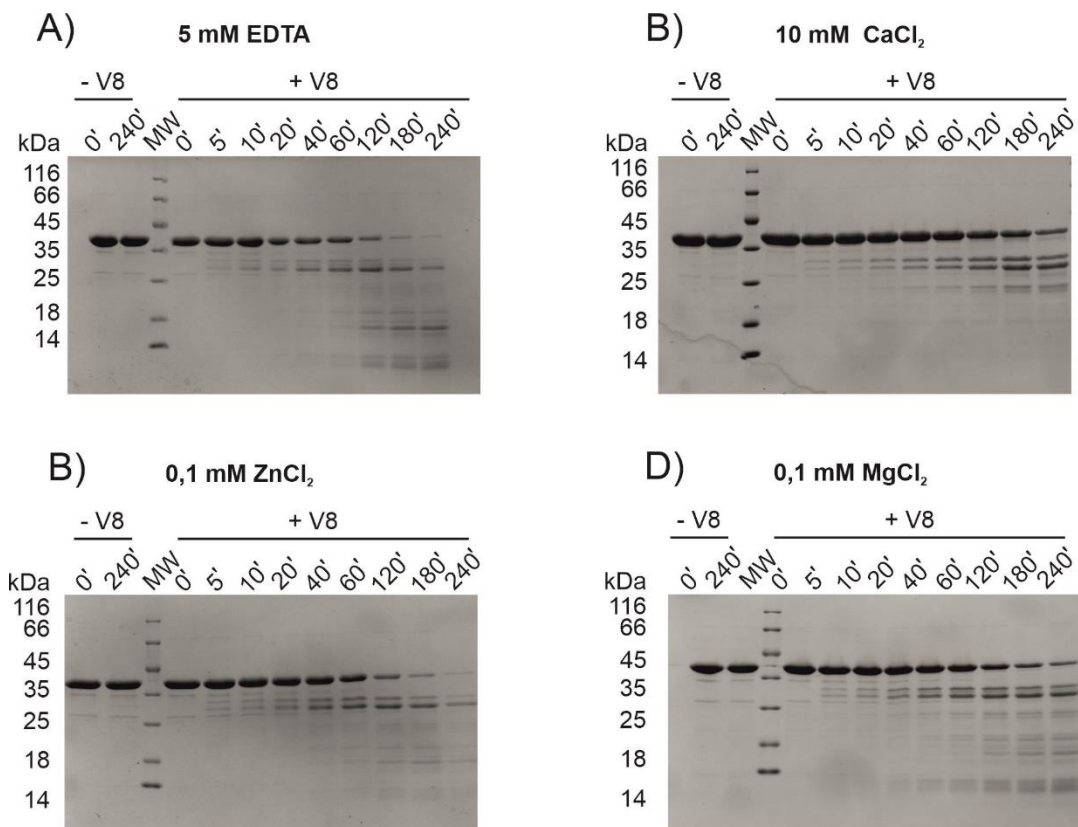
**Rysunek 4.12 Analiza SDS-PAGE trawienia Nucb2 przez proteazę GluV8 w obecności różnych stężeń jonów metali**

Reakcja trawienia Nucb2 w obecności A) 0-10 mM CaCl<sub>2</sub>, B) 0-0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>, C) 0-10 mM MgCl<sub>2</sub>. Proteoliza Nucb2 była prowadzona w 20°C przez 120 min. M - białkowy standard masowy; 0 min – Nucb2 trawione przez GluV8 w obecności odpowiednich stężeń użytych jonów metali w czasie 0; 120 min – Nucb2 trawione przez GluV8 w obecności odpowiednich stężeń użytych jonów metali po 120 min; CTRL - kontrola reakcji bez proteazy GluV8; 0', 120' – kontrola reakcji bez proteazy GluV8 odpowiednio w czasie 0 oraz 120 min.

Trawienie nesfatyny-3 proteazą GluV8 w nieobecności jonów prowadzi do powstania kilku produktów o masie molekularnej około 27 kDa, które ulegają dalszemu trawieniu do krótszych peptydów (Rys. 4.13A). Obecność CaCl<sub>2</sub> w stężeniu 10 mM prowadzi do zmniejszenia wrażliwości nesfatyny-3 na trawienie GluV8 (Rys. 4.13B). Trawienie zachodzi o wiele wolniej, a niestrawione białko jest widoczne nawet po 240 min. Obecność jonów Ca<sup>2+</sup> powoduje stabilizację produktów o masie molekularnej około 27 kDa, które nie ulegają dalszemu trawieniu (Rys. 4.13B). W celu zbadania wrażliwości nesfatyny-3 na jony Ca<sup>2+</sup> przeprowadzono trawienie białka w obecności różnych stężeń CaCl<sub>2</sub> w ciągu 120 min. Nesfatyna-3 w obecności CaCl<sub>2</sub> w stężeniu 0,01 mM wykazuje podobną wrażliwość na trawienie jak w nieobecności jonów. Dopiero obecność CaCl<sub>2</sub> w stężeniu 0,1 mM oraz większym prowadzi do uzyskania odporności na trawienie przez nesfatynę-3 (Rys. 4.14A). Trawienie nesfatyny-3 w obecności ZnCl<sub>2</sub>

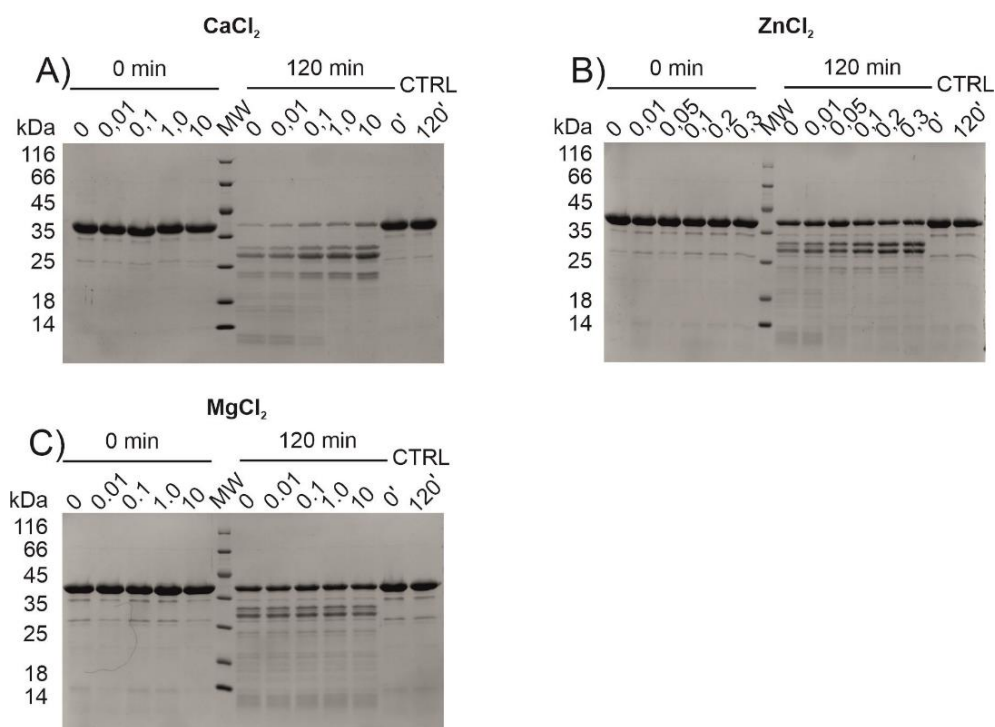


w stężeniu 0,1 mM odznacza się podobnym wzorem trawienia jak białko w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (Rys. 4.13C), jednak efekt jest mniejszy niż w przypadku jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Trawienie nesfatyny-3 w obecności różnych stężeń jonów  $\text{Zn}^{2+}$  pokazało, że mniejsze stężenia  $\text{ZnCl}_2$  (0- 0,01 mM) nie zmieniają wrażliwości nesfatyny-3 na trawienie. Dopiero obecność  $\text{ZnCl}_2$  w stężeniu 0,05 mM prowadzi do odporności białka na trawienie (Rys. 4.14B). Obecność jonów  $\text{Mg}^{2+}$  nie zmienia wrażliwości nesfatyny-3 na trawienie GluV8 (Rys. 4.14C). Nesfatyna-3 wykazuje podobne zachowanie jak Nucb2. Jednakże nesfatyna-3 wydaje się być bardziej wrażliwa na zmianę stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w porównaniu do Nucb2.



**Rysunek 4.13 Analiza SDS-PAGE produktów trawienia nesfatyny-3 w różnych odstępach czasowych (0- 240 min)**

Proteoliza nesfatyny-3 była prowadzona w  $20^\circ\text{C}$  w obecności 5 mM EDTA (A), 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (B), 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  (C) oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (D). M – białkowy standard masowy; -V8 - próbka kontrolna bez proteazy; +V8 – reakcja proteolizy; 0-240'- próbki pobierane w poszczególnych odstępach czasowych (0- 240 min).



**Rysunek 4.14 Analiza SDS-PAGE trawienia nesfatyny-3 przez proteazę GluV8 w obecności różnych stężeń jonów metali**

Reakcja trawienia nesfatyny-3 w obecności A) 0 - 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , B) 0 - 0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$ , C) 0 - 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Proteoliza nesfatyny-3 była prowadzona w  $20^\circ\text{C}$  przez 120 min. M- białkowy standard masowy; 0 min – nesfatyna-3 trawiona przez GluV8 w obecności odpowiednich stężeń użytych jonów metali w czasie 0; 120 min – nesfatyna-3 trawiona przez GluV8 w obecności odpowiednich stężeń użytych jonów metali po 120 min; CTRL - kontrola reakcji bez proteazy GluV8; 0', 120' – kontrola reakcji bez proteazy GluV8 odpowiednio w czasie 0 oraz 120 min.

#### 4.4.5 Analiza dynamiki strukturalnej Nucb2 za pomocą HDX-MS

Analizy wyników CD pokazały, że białko Nucb2 zawiera znaczną ilość struktur nieuporządkowanych. W obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$ , dochodzi do zwiększenia ilości struktur  $\alpha$ -helikalnych białka z jednoczesnym zmniejszeniem zawartości struktur nieuporządkowanych. W celu sprawdzenia strukturalnej dynamiki białka, a także identyfikacji reszt, które mogą brać udział w wiązaniu jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$ , wykorzystano technikę wymiany proton-deuter sprzężonej ze spektrometrią mas (HDX-MS, ang. *hydrogen deuterium exchange coupled with mass spectrometry*). Metoda ta opiera się na analizie szybkości wymiany protonu z deuterem w grupach amidowych białek (213). Postęp wymiany jest określany za pomocą spektrometrii mas (214). Jest on zależny od konformacyjnej elastyczności łańcucha polipeptydowego oraz dostępności do rozpuszczalnika reszt amidowych (215, 216). Wymiana w grupach amidowych, które są zaangażowane w wiązania wewnątrzcząsteczkowe i są zlokalizowane w strukturze drugo- oraz trzeciorzędowej zachodzi wolno. Natomiast, wymiana w grupach eksponowanych do rozpuszczalnika oraz niezaangażowanych w tworzenie

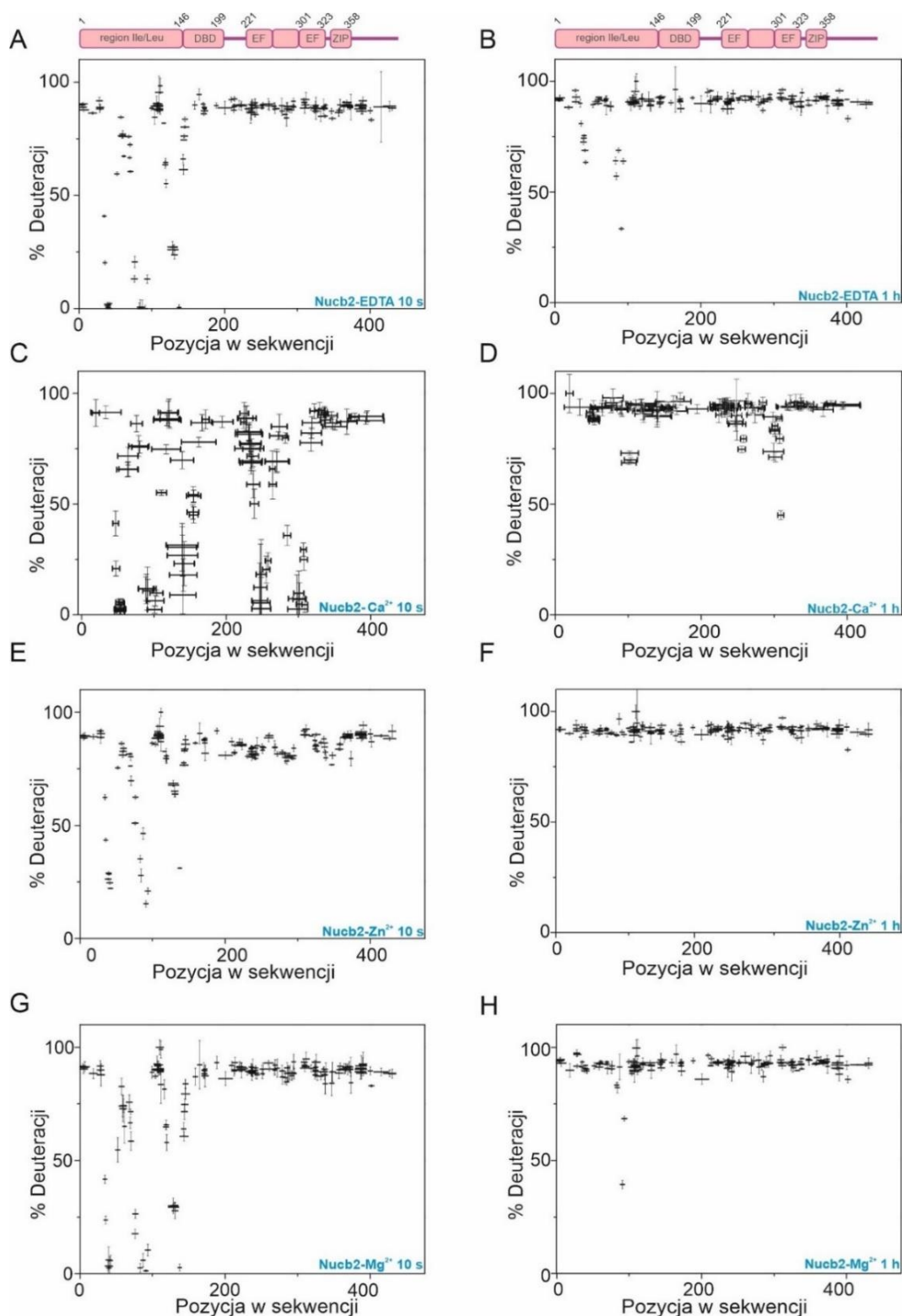
elementów strukturalnych, zachodzi szybko (217, 218). HDX-MS jest często wykorzystywana techniką do detekcji IDRs w białkach ze względu na zdolność odróżniania pomiędzy regionami białka o różnym stopniu wymiany proton-deuter (213).

Pomiary HDX-MS prowadzono dla Nucb2 w obecności 5 mM EDTA, 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  oraz 0,1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  w różnych odstępach czasu (10 s do 1 h). Stężenia jonów metali zostały wybrane na podstawie wcześniej przeprowadzonych analiz. Wzór deuteracji (Rys. 4.15A i B) dla Nucb2 w obecności 5 mM EDTA pokazał, że fragment aminowy białka zawiera zarówno peptydy ulegające szybkiej oraz wolnej wymianie występujące naprzemiennie, tworzące mozaikową strukturę (Rys. 4.15A i B). Natomiast, peptydy znajdujące się we fragmencie karboksylowym (Rys. 4.15B) charakteryzowały się szybką wymianą (powyżej 80%) zachodzącą już po 10 s, co sugeruje ich wysoką konformacyjną elastyczność, dynamikę oraz ekspozycje do otoczenia.

Eksperyment HDX-MS dla Nucb2 w obecności 10 mM  $\text{CaCl}_2$  pokazał, że obecność jonów  $\text{Ca}^{2+}$  wpływa na fragment karboksylowy Nucb2 (Rys. 4.15C i D). Efekt jonów  $\text{Ca}^{2+}$  był widoczny dla peptydów 241-260 oraz 285-310, które odpowiadają sekwencji pętli z motywu HLH dwóch domen dłoni EF. Obserwowano zmniejszenie się stopnia deuteracji dla tych peptydów Nucb2, co świadczy o strukturyzowaniu się tych części białka w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ .

W obecności 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  do zmian dochodzi w fragmencie aminowym Nucb2. Stopień wymiany proton-deuter ulega zwiększeniu w obszarze trzech regionów (peptydy 32- 55, 72-94, 115-149), co świadczy o ich zwiększonej ekspozycji do otoczenia. Zmiany zachodzą w obrębie konserwatywnego motywu wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$  HFREX<sub>n</sub>H (18) (Rys. 4.15E). Różnice w stopniu wymiany pomiędzy Nucb2 w obecności 5 mM EDTA oraz 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  są widoczne nawet po 1 h (Rys. 4.15B i Rys. 4.15F).

Wzory deuteracji dla Nucb2 w obecności 5 mM EDTA oraz 10 mM  $\text{MgCl}_2$  są do siebie podobne (Rys. 4.15G i Rys. 4.15H), co świadczy o braku zmian strukturalnych Nucb2 pod wpływem jonów  $\text{Mg}^{2+}$ .



**Rysunek 4.15** Procent deuteracji w peptydach Nucb2 w obecności 5 mM EDTA, 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , 0,1 mM  $\text{Zn}^{2+}$  oraz 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$

Rysunek przedstawia wzory deuteracji peptydów Nucb2 w obecności poszczególnych dodatków po 10 s (A, C, E, G) oraz 1 h (B, D, F, H) inkubacji z  $\text{D}_2\text{O}$ . Przedstawione słupki błędów stanowią odchylenie standardowe wyznaczone na podstawie trzech niezależnych pomiarów.

Podsumowując, analizy HDX-MS pokazały, że Nucb2 jest białkiem częściowo nieuporządkowanym składającym się z dwóch części: fragmentu aminowego zawierającego zarówno fragmenty uporządkowane jak i nieuporządkowane zlokalizowane naprzemiennie oraz całkowicie nieuporządkowanego fragmentu karboksylowego. Pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  dochodzi do fałdowania w obrębie sekwencji dwóch domen dłoni EF. Natomiast, obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  prowadzi do zwiększonej ekspozycji do otoczenia fragmentu aminowego Nucb2, co jest prawdopodobnie wywołane destabilizacją tej części białka. Jony  $\text{Mg}^{2+}$  nie wprowadzają znaczących zmian w strukturze Nucb2.

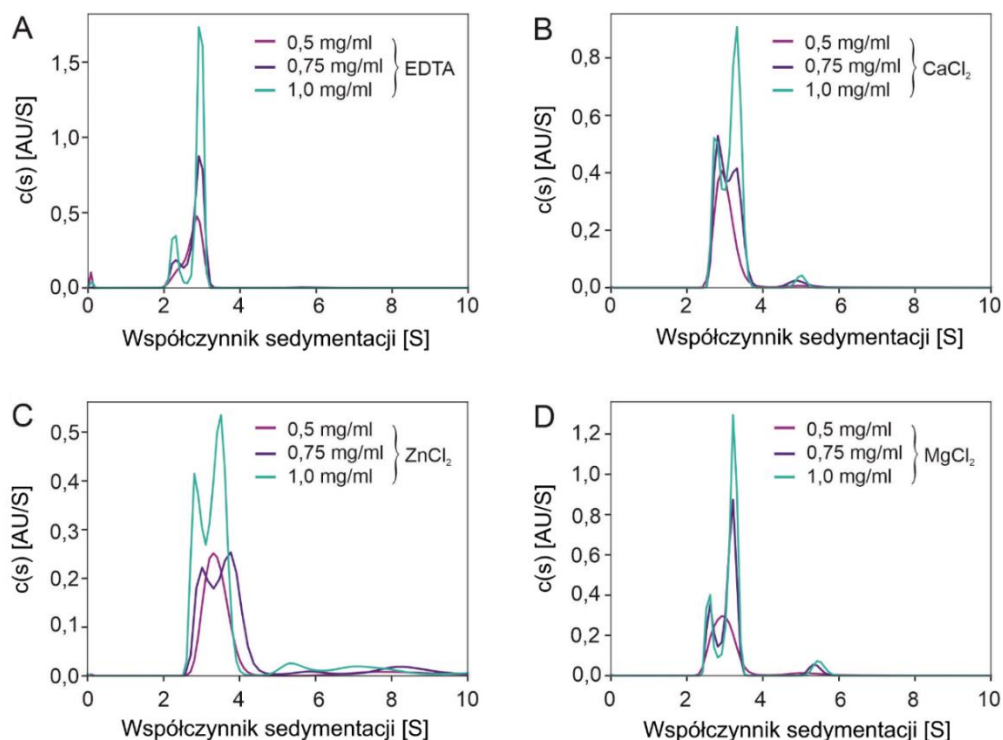
#### 4.4.6 Analiza zmian struktury czwartorzędowej białek za pomocą SV-AUC

Elastyczność białek zawierających IDRs sprawia, że ich chemiczne oraz fizyczne właściwości różnią się znacząco od białek globularnych (219). Technika szybkościowego ultrawierowania analitycznego (SV-AUC, ang. *sedimentation velocity analytical centrifugation*) pozwala na wyznaczenie jego promienia hydrodynamicznego oraz masy cząsteczkowej, a także czystości próbki (220).

Aby zbadać wpływ jonów metali na właściwości hydrodynamiczne oraz stan oligomeryzacji białka, przeprowadzono eksperyment SV-AUC dla Nucb2 i nesfatyny-3 w nieobecności oraz obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$ . Pomiary prowadzono dla trzech stężeń Nucb2: 0,5, 0,75 oraz 1 mg/ml (Tab. 4.3 oraz Rys. 4.16). W obecności 5 mM EDTA, główną populację cząsteczek Nucb2 stanowi monomer o masie cząsteczkowej ( $MW_{app}$ ) 51 kDa, która jest zgodna z masą teoretyczną białka (51,4 kDa) (Rys. 4.16A oraz Tab. 4.3). Wraz ze wzrastającym stężeniem białka Nucb2, obserwowano dwa piki (Tab. 4.3) o masie molekularnej 41 kDa oraz 56 kDa, które mogą stanowić mieszaninę form molekularnych, ulegających szybkiej i odwracalnej asocjacji.

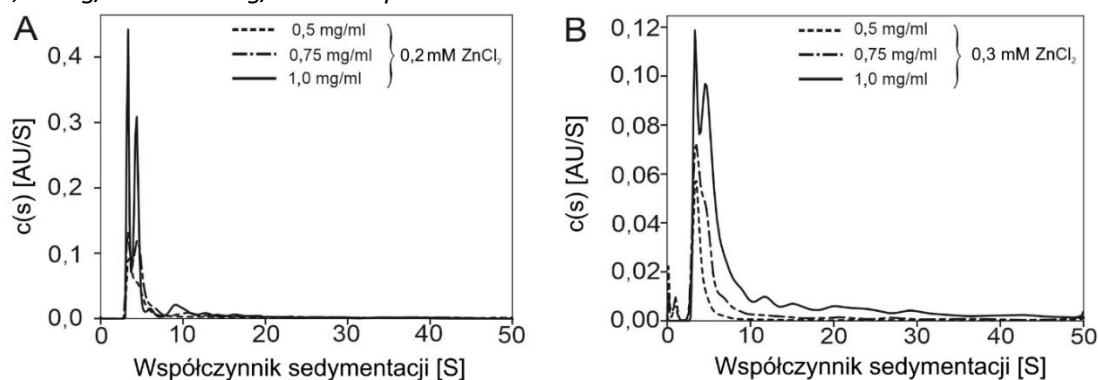
W obecności 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$  oraz 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , obserwowano różne formy molekularne Nucb2 (Rys. 4.16 oraz Tab. 4.3). Obecność jonów  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  prowadzi do powstania niewielkiej ilości frakcji dimerycznej oraz trimerycznej Nucb2 (Rys. 4.16B i D, Tab. 4.3), co sugeruje, że oba te jony stabilizują dimery oraz trimery Nucb2. Największą zmianę obserwowano dla Nucb2 po dodaniu 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  (Rys. 4.16C). W obecności jonów  $\text{Zn}^{2+}$  dochodzi do tworzenia się dimerów oraz oligomerów wyższego rzędu Nucb2 (Rys. 4.16C oraz Tab. 4.3). Dodatkowo obecność  $\text{ZnCl}_2$  w stężeniu 0,3 mM powoduje wytrącenie Nucb2. Osad Nucb2 został usunięty przez odwirowanie przed pomiarem SV-AUC. Nucb2 w supernatancie nadal wykazywało silną agregację (Rys. 4.17), co sugeruje, że obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  indukuje

oligomeryzację oraz tworzenie się agregatów Nucb2 w roztworze. Wytrącanie Nucb2 jest zależne od stosunku stężenia jonów  $Zn^{2+}$  do stężenia białka (dane niezaprezentowane).



**Rysunek 4.16** Analiza struktury czwartorzędowej Nucb2 w obecności jonów metali za pomocą SV- AUC

Dystrybucja współczynnika sedymentacji  $c(s)$  dla Nucb2 w obecności A) 5 mM EDTA; B) 10 mM  $CaCl_2$ ; C) 0,1 mM  $ZnCl_2$ ; D) 10 mM  $MgCl_2$ . Eksperyment wykonano dla Nucb2 w trzech stężeniach: 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml oraz 1 mg/ml w temp. 20°C.



**Rysunek 4.17** Analiza struktury czwartorzędowej Nucb2 w obecności jonów metali za pomocą SV- AUC

Dystrybucja współczynnika sedymentacji  $c(s)$  dla Nucb2 w obecności A) 0,2 mM  $ZnCl_2$ ; B) 0,3 mM  $ZnCl_2$ . Eksperyment wykonano dla Nucb2 w trzech stężeniach: 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, oraz 1 mg/ml w temp. 20°C.



**Tabela 4.3 Właściwości hydrodynamiczne Nucb2 w obecności badanych jonów metali wyznaczone na podstawie danych z SV-AUC.**

Białko	Czynnik	C [mg/ml]	S <sub>20,w</sub> [S]	f/f <sub>0</sub>	rmsd	MW <sub>app</sub> [kDa]	Udział [%]	R [nm]
Nucb2	EDTA (5 mM EDTA)	0,5	2,89	1,75	0,005871	51	100	4,28
		0,75	2,46	1,75	0,006157	41	20	3,99
			3,04			56	80	4,43
	1	2,42	1,76	0,006470	40	20	3,97	
		3,08			57	80	4,48	
	Ca <sup>2+</sup> (10 mM)	0,5	3,12	1,60	0,005559	50,8	97	3,92
			5,14			107	2,5	5,03
		0,75	2,99	1,65	0,005921	49,6	54	4,00
			3,42			60,6	51	4,27
			5,37			119	4,7	5,36
		1	2,97	1,65	0,006658	49,4	42	4,00
	3,42				61	63	4,29	
	5,20				114	3	5,29	
	Mg <sup>2+</sup> (10 mM)	0,5	3,09	1,74	0,005721	56,7	93	4,42
			5,69			142	7	6,00
		0,75	2,78	1,74	0,006160	48,4	28	4,20
			3,31			62,8	70	4,58
			5,61			139	6	5,97
		1	2,74	1,76	0,006452	48	22	4,23
	3,35				65	74	4,68	
5,72				145	6	6,12		
Zn <sup>2+</sup> (0,1 mM)	0,5	3,53	1,23	0,005836	41	76	2,79	
		8,60			156	10	4,36	
	0,75	3,24	1,40	0,006141	44	35	3,27	
		3,93			59	47	3,61	
		6,19			116	3	4,52	
	1	8,88			200	9	5,42	
3,05		1,58	0,006762	48	34	3,78		
3,61				61	50	4,11		
	5,74			124	5	5,19		
	7,74			194	7	6,03		

Analizy SV-AUC pokazały, że jony Ca<sup>2+</sup> oraz Zn<sup>2+</sup> wpływają nie tylko na stan oligomeryczny Nucb2, ale również na zmianę współczynnika tarcia (f/f<sub>0</sub>). Współczynnik tarcia f/f<sub>0</sub> cząsteczki jest zależny od jej kształtu i elastyczności (221). Dla białek globularnych wartość f/f<sub>0</sub> mieści się w zakresie 1,2-1,4 (221). Ze względu na swój wydłużony kształt, IDPs charakteryzują się większą wartością f/f<sub>0</sub>. Wraz ze wzrostem promienia hydrodynamicznego IDPs, zwiększa się f/f<sub>0</sub> białka (222). Nucb2 w obecności 5 mM EDTA charakteryzuje się współczynnikiem tarcia f/f<sub>0</sub> równym 1,75, co świadczy o jego wydłużonym, asymetrycznym

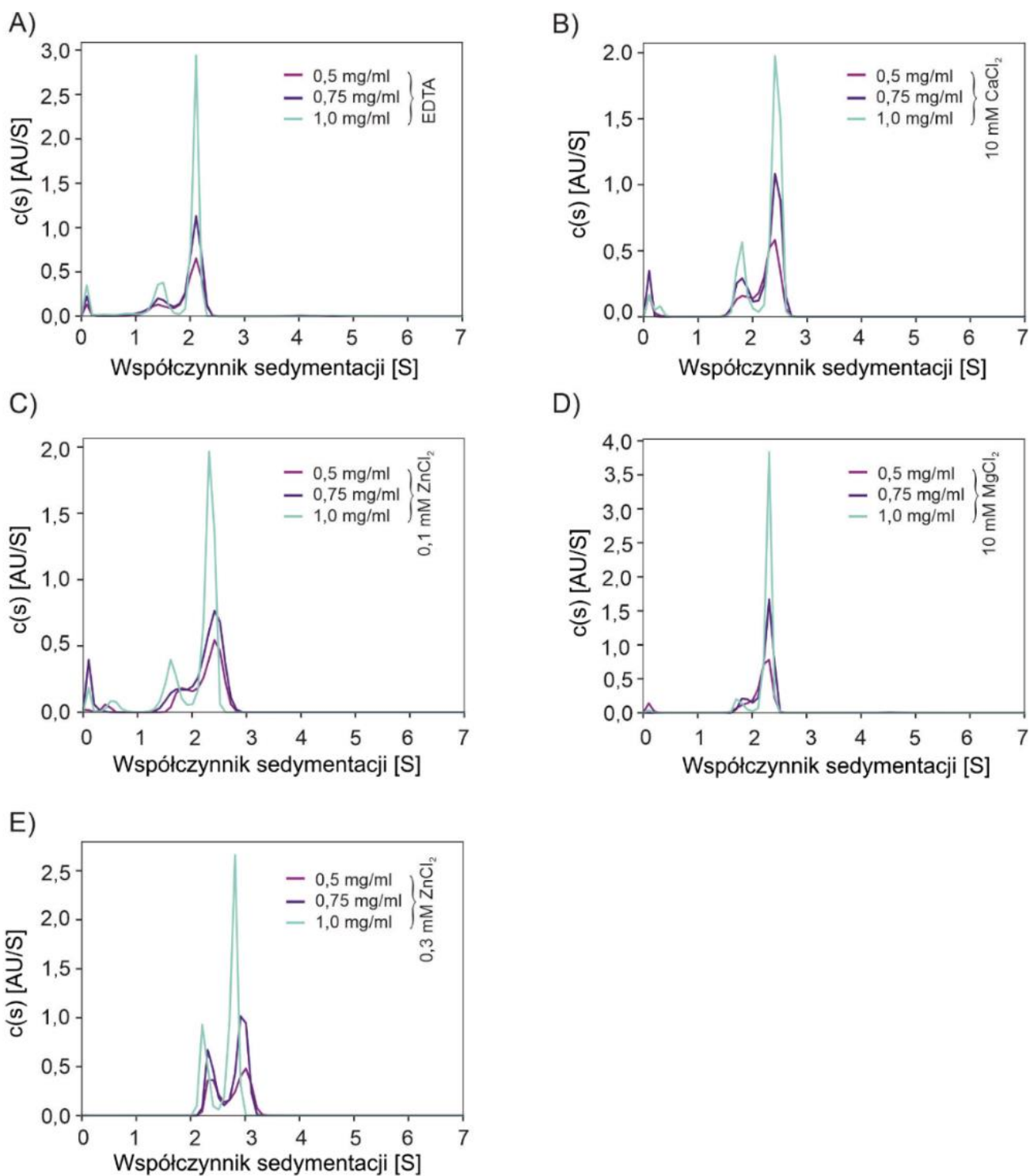
kształcie (Tab. 4.3). Obecność jonów  $Mg^{2+}$  nie wpływa na zmianę wartości  $f/f_0$  (Tab. 4.3). W obecności jonów  $Ca^{2+}$  oraz  $Zn^{2+}$  dochodzi do zmniejszenia się wartości  $f/f_0$  (Tab. 4.3), co wskazuje na kompaktowanie się struktury białka pod wpływem tych jonów. Obecność jonów  $Zn^{2+}$  (Tab. 4.3) prowadzi do większego zmniejszenia wartości  $f/f_0$  niż w przypadku pozostałych jonów, co świadczy o większym stopniu kompaktowania się cząsteczki.

Pomiary SV-AUC wykonano także dla trzech stężeń nesfatyny-3: 0,5, 0,75 oraz 1 mg/ml. Nesfatyna-3 w obecności 5 mM EDTA stanowi mieszaninę dwóch komponentów (Tab. 4.4, Rys. 4.18). W najwyższym stężeniu białka, pik odpowiadający masie cząsteczkowej 26 kDa odpowiada monomerowi nesfatyny-3 ( $MW_{\text{monomeru}} = 31,5$  kDa) (Rys. 4.18A oraz Tab. 4.4). Pik odpowiadający masie cząsteczkowej 49 kDa prawdopodobnie jest frakcją dimeryczną (Rys. 4.18A oraz Tab. 4.4). Obie frakcje znajdują się ze sobą w równowadze (Tab. 4.4) z przewagą frakcji dimerycznej. W obecności 10 mM  $CaCl_2$  oraz  $ZnCl_2$  obserwowano podobną zależność. Jednakże dodanie 10 mM  $MgCl_2$  do nesfatyny-3 spowodowało przesunięcie się równowagi w stronę dimeru. Wraz ze wzrastającym stężeniem nesfatyny-3 w obecności  $Mg^{2+}$  dochodzi do zwiększenia udziału frakcji dimerycznej aż do 92% (Tab. 4.4). Jony  $Mg^{2+}$  stabilizują frakcję dimeryczną nesfatyny-3, podobnie jak w przypadku Nucb2.

Badane jony metali dwuwartościowych miały także wpływ na zmianę kształtu cząsteczki nesfatyny-3. Wartość  $f/f_0$  dla nesfatyny-3 w obecności EDTA wynosiła 2,12, co świadczy o bardzo wydłużonym kształcie oraz asymetrii cząsteczek białka (Tab. 4.4). W obecności badanych jonów metali dochodzi do zmniejszenia się wartości  $f/f_0$  (Tab. 4.4). Wynik ten wskazuje na kompaktowanie się/fałdowanie białek w obecności badanych jonów metali. Zmiana wartości  $f/f_0$  jest największa dla jonów  $Zn^{2+}$ , pośrednia dla jonów  $Ca^{2+}$  oraz najmniejsza dla jonów  $Mg^{2+}$  (Tab. 4.4)

Podsumowując, wyniki SV-AUC potwierdzają, że Nucb2 oraz nesfatyna-3 są białkami o wydłużonym, asymetrycznym kształcie. Dodatkowo pokazano, że jony metali wpływają zarówno na kształt oraz stan oligomeryczny obu białek, prowadząc w różnym stopniu do ich fałdowania.





**Rysunek 4.18** Analiza struktury czwartorzędowej nesfatyny-3 w obecności jonów metali za pomocą

**SV-AUC**

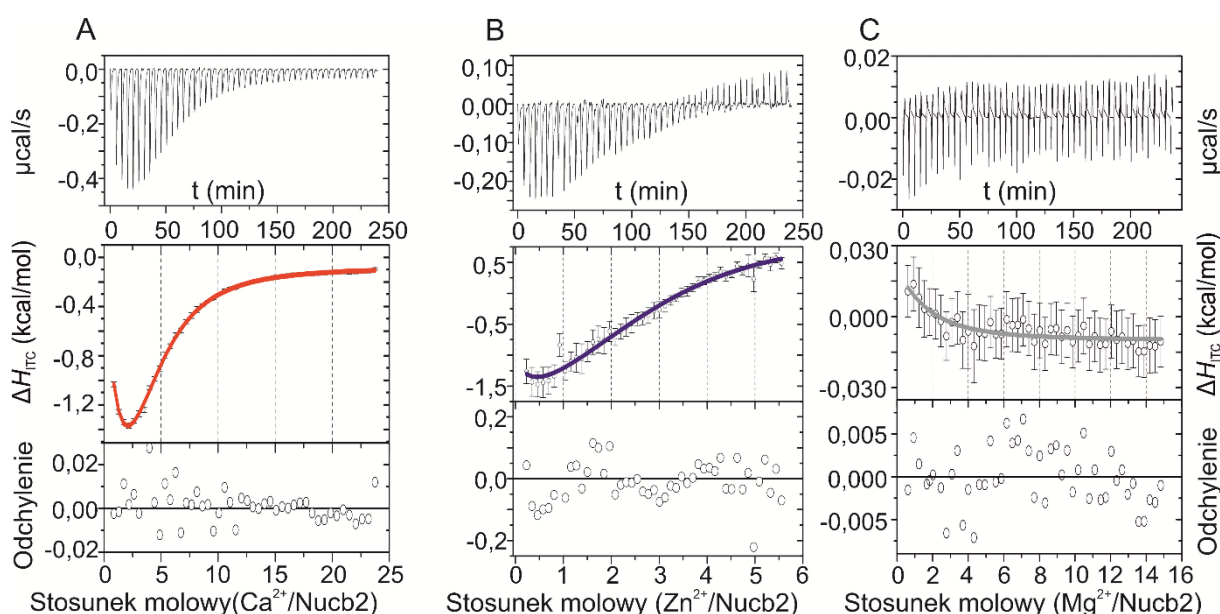
Dystrybucja współczynnika sedymentacji  $c(s)$  dla nesfatyny-3 w obecności A) 5 mM EDTA, B) 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , C) 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$ , D) 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . Eksperyment wykonano dla nesfatyny-3 w trzech stężeniach: 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml oraz 1 mg/ml w temp. 20°C.

**Tabela 4.4 Właściwości hydrodynamiczne nesfatyny-3 w obecności badanych jonów metali**

Białko	Czynnik	C [mg/ml]	S <sub>20,w</sub> [S]	f/f <sub>0</sub>	rmsd	MW <sub>app</sub> [kDa]	Udział[%]	R [nm]
Nesfatyna-3	EDTA (5 mM)	0,5	1,53	2,12	0,004678	26	25	4,18
			2,17			44	75	4,93
		0,75	1,49	2,18	0,005386	26	24	4,27
	Ca <sup>2+</sup> (10 mM)	0,5	1,94	1,72	0,004854	27	26	3,40
			2,44			38	74	3,81
		0,75	1,91	1,80	0,005517	28	24	3,61
	Mg <sup>2+</sup> (10 mM)	0,5	2,28	1,89	0,005294	40	100	4,26
			2,40			33	17	4,08
		0,75	2,00	1,92	0,005872	44	83	4,47
	Zn <sup>2+</sup> (0,1 mM)	0,5	1,88	1,93	0,006543	31	8	4,00
			2,40			44	92	4,52
		0,75	1,95	1,70	0,005252	27	26	3,36
	Zn <sup>2+</sup> (0,3 mM)	0,5	1,95	1,70	0,005252	27	26	3,36
			2,48			39	74	3,80
		0,75	1,82	1,78	0,006271	26	20	3,48
Zn <sup>2+</sup> (0,3 mM)	0,5	2,46	1,58	0,005293	41	80	4,03	
		2,41			25	21	3,56	
	0,75	1,70	1,85	0,005493	42	79	4,24	
Zn <sup>2+</sup> (0,3 mM)	0,5	2,54	1,59	0,005616	36	41	3,41	
		3,08			47	59	3,76	
	0,75	2,50	1,59	0,005616	35	36	3,45	
Zn <sup>2+</sup> (0,3 mM)	0,75	3,06	1,62	0,006104	48	64	3,82	
		2,37			34	30	3,46	
Zn <sup>2+</sup> (0,3 mM)	1	2,91	1,62	0,006104	46	70	3,83	
		2,91			46	70	3,83	

#### 4.4.7 Analiza oddziaływań białek z jonami metali za pomocą izotermicznej kalorymetrii miareczkowej (ITC)

Jak przedstawiono powyżej jony  $\text{Ca}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$  wpływają na zmianę struktury drugo-, trzecio- oraz czwartorzędowej Nucb2 oraz nesfatyny-3. Natomiast jony  $\text{Mg}^{2+}$  mają wpływ tylko na stan oligomeryzacji. Aby scharakteryzować parametry termodynamiczne oddziaływania Nucb2 oraz nesfatyny-3 z jonami  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$ , wykorzystano izotermiczną kalorymetrię miareczkową (ITC, ang. *isothermal titration calorimetry*). ITC jest techniką wykorzystywaną do badania efektów energetycznych mających miejsce podczas wiązania się ligandów do makromolekuł. Pozwala ona na wyznaczenie zarówno stałej wiązania oddziaływań jak i zmian w entalpii i entropii procesu (223). Analizy ITC pokazały, że wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez Nucb2 jest dwufazowym egzotermicznym procesem (Rys. 4.19 oraz Tab. 4.5). Wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez Nucb2 zostało opisane przez model dwóch miejsc wiązania różniących się powinowactwem (Rys. 4.19A oraz Tab. 4.5). Stała wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  pierwszego miejsca ( $K_{d1}$ ) jest 5 razy większa niż  $K_{d2}$ . Pierwszy proces wiązania jest kierowany entropowo, natomiast drugi – entalpowo. Dodatkowo stopień dysocjacji białka Nucb2 jest równy zero, co sugeruje, że białko Nucb2 w formie apo jest w przeważającej części monomerem. Wzrastający udział procesu egzotermicznego podczas miareczkowania białka Nucb2 jonami  $\text{Ca}^{2+}$  może być spowodowany zachodzącą pod wpływem jonów dimeryzacją Nucb2.



**Rysunek 4.19 Analiza ITC wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oraz  $\text{Mg}^{2+}$  przez Nucb2**

Profile ITC wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (A),  $\text{Zn}^{2+}$  (B) oraz  $\text{Mg}^{2+}$  (C) przez Nucb2. Na rysunku przedstawiono kolejno termogramy, opisujące zmianę ciepła w czasie miareczkowania oraz izotermy wiązania.

Wiązaniu jonów  $Zn^{2+}$  przez Nucb2 odpowiada skomplikowany termogram odpowiadającym procesom endo- oraz egzotermicznym (Rys. 4.19B oraz 4.20). Aby scharakteryzować procesy zachodzące podczas procesu wiązania, Nucb2 było miareczkowane 1 mM oraz 4 mM roztworem  $ZnCl_2$ . Podczas pierwszego eksperymentu obserwowano stopniowo wzrastający proces egzotermiczny, co wskazuje na indukowaną jonami  $Zn^{2+}$  dimeryzację. Drugi eksperyment, podczas którego wykorzystano wyższe stężenie titranta, odznaczał się znacznym udziałem procesu endotermicznego, który może być wywołany przez oligomeryzację oraz precypitację Nucb2 w obecności jonów  $Zn^{2+}$  o wyższym stężeniu. Uzyskano dobre dopasowanie dla modelu wiązania dwóch jonów  $Zn^{2+}$  (Tab. 4.5 oraz Rys. 4.19B). Wyniki wskazują, że Nucb2 znajduje się w formie monomeru. Pierwszy jon  $Zn^{2+}$  jest wiązany z  $K_d = 190 \mu M$  oraz entalpią wiązania  $-10 \text{ kcal/mol}$ . Drugi jon  $Zn^{2+}$  jest wiązany z wyższym powinowactwem  $35 \mu M$ , ale z małą zmianą entalpii  $+1 \text{ kcal/mol}$ . Entropia wiązania drugiego jonu  $Zn^{2+}$  jest większa od entropii wiązania pierwszego jonu  $Zn^{2+}$  (różnica  $+12 \text{ kcal/mol}$  w  $T\Delta\Delta S_{2-1}$ ), co sugeruje, że na drugi zachodzący proces może mieć wpływ stan oligomeryzacji Nucb2 (Tab. 4.5). Takie warunki procesu wiązania jonów  $Zn^{2+}$  sprawiają, że wyznaczone parametry wiązania odznaczają się dużą niepewnością.

Miareczkowanie Nucb2 jonami  $Mg^{2+}$  pokazało, że monomer Nucb2 wiąże jeden jon  $Mg^{2+}$  ze stosunkowo wysokim powinowactwem wynoszącym  $230 \mu M$  (Tab. 4.5). Proces ten był kierowany entropowo (Rys. 4.19C oraz Tab. 4.5). Wiązanie jonów  $Mg^{2+}$  wydaje się być reakcją endotermiczną. Jednakże przedstawione wyniki ciepła są bardzo małe, na poziomie podobnym do ciepła rozcieńczenia ligandu (Tab. 4.5), powodując niepewność dopasowanych parametrów.

**Tabela 4.5 Parametry termodynamiczne oddziaływania Nucb2 z jonami Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> oraz Mg<sup>2+</sup>**

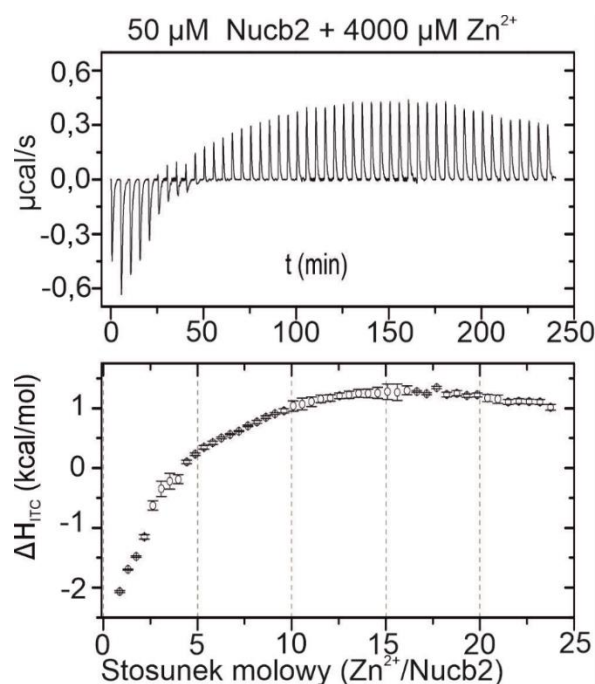
Otrzymane dane były dopasowywane do modelu ABB opisującego oddziaływanie z dwoma miejscami wiązania dla jonów Ca<sup>2+</sup> oraz Zn<sup>2+</sup>. W przypadku kompleksowania jonów Mg<sup>2+</sup> zastosowano model AB. K<sub>d1,2</sub> - stała dysocjacji dla poszczególnych miejsc wiązania, ΔH<sub>1,2</sub> - zmiana entalpii tworzenia kompleksu dla poszczególnych miejsc wiązania, TΔS<sub>1,2</sub> – zmiana entropii dla poszczególnych miejsc wiązania

Parametr	Nucb2 + Ca <sup>2+</sup> (szeroki zakres*)	Nucb2 + Ca <sup>2+</sup> (wąski zakres**)	Nucb2 + Zn <sup>2+</sup>	Nucb2 + Mg <sup>2+</sup>
C <sub>Nucb2</sub> (μM)	50	50	46,2	104,8
C <sub>jonu</sub> (μM)	4000	4000	1000	6000
K <sub>d1</sub> (μM)	302,8 ± 0,9	190,0 ± 0,8	188 ± 3	230 ± 32
ΔH <sub>1</sub> (kcal/mol)	-1,72 ± 0,11	-1,3 ± 0,2	-10 ± 1	0,09 ± 0,11
TΔS <sub>1</sub> (kcal/mol)	3,11	3,78	-4,9	5,05
K <sub>d2</sub> (μM)	60,6 ± 0,4	73,2 ± 0,7	34,4 ± 1,9	-
ΔH <sub>2</sub> (kcal/mol)	-9,6 ± 0,8	-8,1 ± 0,3	1,6 ± 0,5	-
TΔS <sub>2</sub> (kcal/mol)	-3,8	-2,5	7,3	-
Stopień dysocjacji *** Nucb2	0,00 ± 0,10	0,00 ± 0,05	0	0

\* szeroki zakres – podczas dopasowania brano pod uwagę wszystkie obserwowano procesy.

\*\* wąski zakres – podczas dopasowania brano pod uwagę drugą część izotermy.

\*\*\* stopień dysocjacji – parametr wyznaczony na podstawie dopasowania w programie SEDPHAT, mówiący o stanie oligomeryzacji białka, wartość 0 wskazuje na występowanie monomeru białka; wartości od 0,5 wskazuje na występowanie dimerów białka.



**Rysunek 4.20 Profil ITC wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$  przez Nucb2**

Na rysunku przedstawiono termogram oraz izotermę wiązania. Nucb2 było miareczkowane 4 mM  $\text{ZnCl}_2$ . Pomiar prowadzono w buforze B w 20°C.

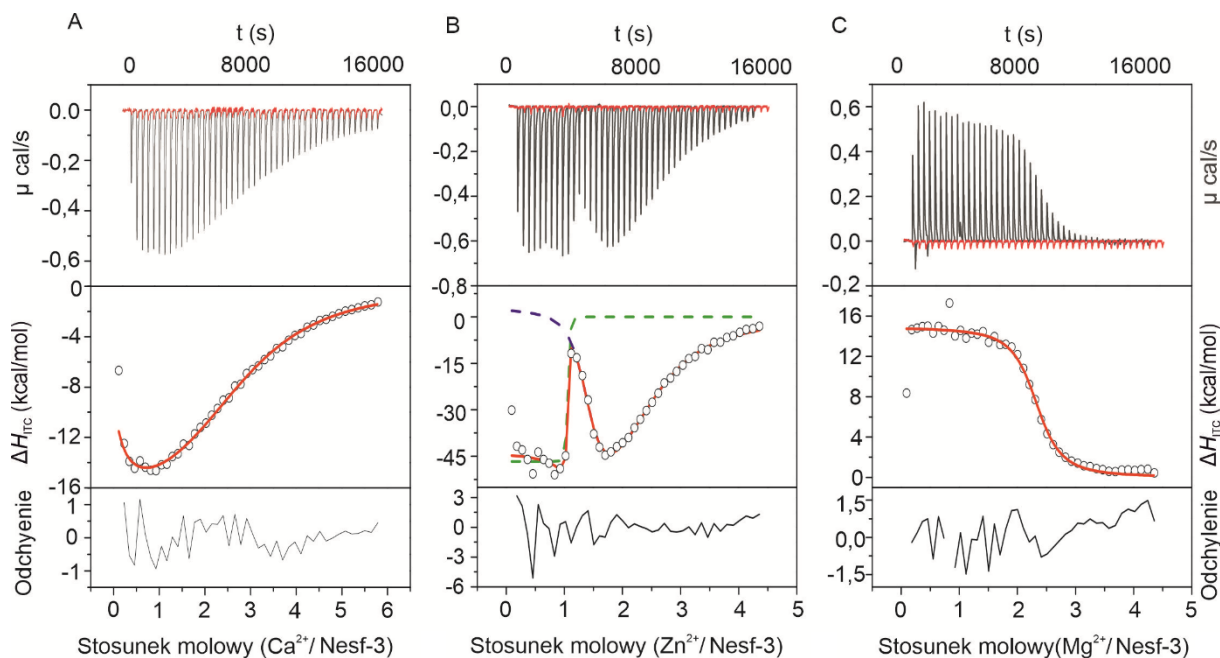
Wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez nesfatynę-3 jest prostym procesem egzotermicznym (Tab. 4.6). Nesfatyna-3 wiąże dwa jony  $\text{Ca}^{2+}$  na cząsteczkę monomeru (Rys. 4.21A). Jest to proces sekwencyjny, składający się z dwóch etapów. Drugi jon  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d = 45,9 \mu\text{M}$ ) jest wiązany z większym powinowactwem niż pierwszy ( $K_d = 116 \mu\text{M}$ ) (Tab. 4.6).

Wiązaniu jonów  $\text{Zn}^{2+}$  przez nesfatynę-3 odpowiada bardzo złożona izoterma wiązania (Rys. 4.21B), co oznacza, że na wiązanie jonów  $\text{Zn}^{2+}$  składa się wiele procesów. Otrzymane dane były dopasowywane jednocześnie do modeli jednego niezależnego miejsca wiązania oraz wielu niezależnych miejsc wiązania występujących w oprogramowaniu NanoAnalyze. Wiązanie pierwszego jonu  $\text{Zn}^{2+}$  jest procesem egzotermicznym charakteryzujący się stałą wiązania, przynajmniej mniejszą niż 7,21 nM (Tab. 4.6). Wyznaczona stała wiązania nie jest wartością pewną, ze względu na to, że ITC nie jest odpowiednią metodą do badania oddziaływań z tak wysokimi wartościami powinowactwa (224, 225). Proces wiązania drugiego jonu  $\text{Zn}^{2+}$  jest procesem o małym efekcie endotermicznym oraz charakteryzuje się wyższą wartością  $K_d = 0,42 \mu\text{M}$  (Tab. 4.6). Dodatkowo proces odznacza się dużą zmianą entropii, co sugeruje, że proces ten może być sterowany przez efekt hydrofobowy, do którego dochodzi podczas uwalniania cząsteczek wody na skutek tworzenia się oligomerów lub zmiany strukturalnej białka. Wiązanie trzeciego jonu  $\text{Zn}^{2+}$  jest procesem sterowanym entalpowo. Wyznaczone wartości stałych wiązań

pozwalają przypuszczać, że proces wiązania zachodzi sekwencyjnie. Najpierw dochodzi do wiązania pierwszego jonu  $Zn^{2+}$ , po czym następuje wiązanie dwóch pozostałych.

Wiązanie jonów  $Mg^{2+}$  przez nesfatynę-3 jest przedstawione przez prostą, jednofazową izotermę wiązania (Rys. 4.21C). Nesfatyna-3 wiąże dwa jony  $Mg^{2+}$  ze znacznym powinowactwem ( $K_d = 2,38 \mu M$ ) (Tab. 4.6). Proces ten jest endotermiczny i sterowany entropowo (Tab. 4.6), co jest charakterystyczne dla procesów oligomeryzacji.

Podsumowując, Nucb2 znajduje się w równowadze monomer-dimer oraz monomer-oligomer. Miareczkowanie jonami metali sprawia, że dochodzi do powstawania oligomerów białka Nucb2, przez co analiza białka techniką ITC jest utrudniona. Przedstawione dane potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące oligomeryzacji białek otrzymane techniką SV-AUC. W przypadku nesfatyny-3 badanie procesu wiązania jonów metali metodą ITC nie stanowiło problemu. Otrzymane wyniki sugerują, że N-terminalna część Nucb2 (nesfatyny-1 oraz -2) może wpływać na procesy wiązania się jonów i utrudniać ich analizę. Na szczególną uwagę zasługuje proces wiązania jonów  $Zn^{2+}$  przez nesfatynę-3. Białko to wykazuje się bardzo niską stałą wiązania oraz wiązaniem trzech jonów  $Zn^{2+}$  pomimo, że nie posiada typowego motywu wiązania jonów  $Zn^{2+}$ .



**Rysunek 4.21 Analiza ITC wiązania jonów  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  oraz  $Mg^{2+}$  przez nesfatynę-3**

Profile ITC wiązania jonów  $Ca^{2+}$  (A),  $Zn^{2+}$  (B) oraz  $Mg^{2+}$  (C) przez nesfatynę-3. Na rysunku przedstawiono kolejno termogramy, opisujące zmianę ciepła w czasie miareczkowania oraz izotermę wiązania. Na izotermie wiązania jonów  $Zn^{2+}$  przez nesfatynę-3 zieloną przerywaną linią oznaczono model pojedynczego miejsca wiązania, a niebieską przerywaną linią oznaczono model dwóch sekwencyjnych miejsc wiązania. Natomiast suma obu tych modeli jest przedstawiona za pomocą czerwonej linii.

**Tabela 4.6 Parametry termodynamiczne oddziaływania nesfatyny-3 z jonami  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  oraz  $Mg^{2+}$**

Otrzymane dane zostały dopasowane do modelu AB, w którym monomer nesfatyny-3 wiąże jeden jon  $Mg^{2+}$ . Wiązanie jonów  $Ca^{2+}$  przez nesfatynę-3 zostało dopasowane do sekwencyjnego modelu wiązania dwóch jonów  $Ca^{2+}$ . Natomiast, wiązanie jonów  $Zn^{2+}$  przez nesfatynę-3 zostało dopasowane do dwóch modeli: jednego miejsca wiązania oraz dwóch niezależnych miejsc wiązania jonu  $Zn^{2+}$ .  $K_{d1,2,3}$  - stała dysocjacji dla poszczególnych miejsc wiązania,  $\Delta H_{1,2,3}$  - zmiana entalpii tworzenia kompleksu dla poszczególnych miejsc wiązania,  $T\Delta S_{1,2,3}$  - zmiana entropii dla poszczególnych miejsc wiązania,  $n_{1,2,3}$  - stechiometria danego miejsca wiązania.

Parametr	Nesf-3+ $Ca^{2+}$	Nesf-3 + $Zn^{2+}$	Nesf-3 + $Mg^{2+}$
$C_{Nesf-3}$ ( $\mu M$ )	95	120	120
$C_{jonu}$ ( $\mu M$ )	2000	2000	2000
$n_1$	--	$1,011 \pm 0,011$	$2,29 \pm 0,02$
$K_{d1}$ ( $\mu M$ )	$116,3 \pm 81,1$	$0,00721 \pm 0,0243$	$2,38 \pm 0,36$
$\Delta H_1$ (kcal/mol)	$-5,6 \pm 1,7$	-4,568	$3,47 \pm 0,05$
$T\Delta S_1$ (cal/mol)	-187	6541,4	11241,3
$n_2$	--	$1,4 \pm 0,1$	--
$K_{d2}$ ( $\mu M$ )	$45,9 \pm 16,1$	$0,4 \pm 0,3$	--
$\Delta H_2$ (kcal/mol)	$-6,4 \pm 2,1$	$0,28 \pm 0,6$	--
$T\Delta S_2$ (cal/mol)	-437	8968,4	--
$n_3$	--	$1,12 \pm 0,2$	--
$K_{d3}$ ( $\mu M$ )	--	$31,1 \pm 9,2$	--
$\Delta H_3$ (kcal/mol)	--	$-7,4 \pm 1,8$	--
$T\Delta S_3$ (cal/mol)	--	-1265,6	--

#### 4.4.8 Analiza parametrów hydrodynamicznych białek za pomocą SAXS

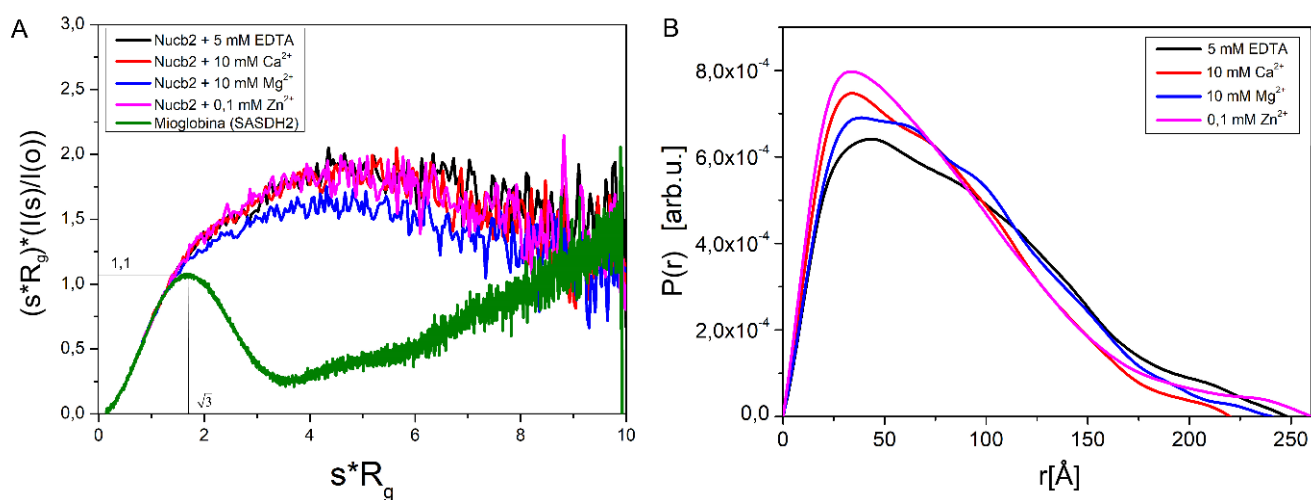
Przedstawione powyżej badania pokazały, że Nucb2 oraz nesfatyna-3 są białkami częściowo nieuporządkowanymi, których struktura ulega zmianom w obecności jonów  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  oraz  $Mg^{2+}$ . Aby uzyskać dodatkowe informacje o zmianach strukturalnych Nucb2 oraz nesfatyny-3 w obecności jonów metali wykorzystano technikę małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS, ang. *small angle X-ray scattering*). SAXS jest technika dostarczająca informacji o parametrach hydrodynamicznych białek w różnych warunkach (226, 227). SAXS jest często używany do badań IDPs (228). Pomiary SAXS zostały



przeprowadzone dla Nucb2 o stężeniu 3,5 mg/ml w obecności 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Dane rozpraszania dla Nucb2 zostały przedstawione na wykresie Kratky'ego (Rys. 4.22). Wykres Kratky'ego pozwala na jakościowe rozróżnienie białek globularnych od białek częściowo oraz całkowicie nieuporządkowanych (229). Wykres Kratky'ego wyznaczony dla Nucb2 w obecności 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> charakteryzuje się szerokim, asymetrycznym pikiem oraz *plateau*, po których następuje zmniejszenie intensywności rozpraszania przy wyższych wartościach wektora rozpraszania (Rys. 4.22A). Takie zachowanie wykazują białka częściowo nieuporządkowane oraz białka wielodomenowe cechujące się dynamiką domen (230). Dla porównania zestawiono wykres Kratky'ego dla białka globularnego – mioglobiny (id:SASDAH2) (Rys. 4.22A), który ma kształt dzwonu ze ściśle zdefiniowanym maksimum (227). Następnie wyznaczono wartości promienia żyracji ( $R_g$ ) Nucb2 w badanych stanach.  $R_g$  jest parametrem, który dostarcza informację o rozmiarze cząsteczki (227). Wartość  $R_g$  jest mniejsza dla białek globularnych w porównaniu do IDPs o takiej samej liczbie reszt aminokwasowych (227). Wartość  $R_g$  Nucb2 w obecności 5 mM EDTA (Tab. 4.7) wynosi  $66,5 \pm 1,9 \text{ \AA}$ . W obecności jonów Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> oraz Mg<sup>2+</sup> dochodzi do zmniejszenia się wartości  $R_g$ , co wskazuje na kompaktowanie się białka w obecności jonów. Największą zmianę  $R_g$  obserwowano dla Nucb2 w obecności 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Jest to zgodne z wcześniej przedstawionymi wynikami analizy SV-AUC.

Funkcja rozkładu odległości  $p(r)$ , która przedstawia dystrybucję wektorów wewnątrzcząsteczkowych, została wyznaczona w programie GNOM z wykorzystaniem odwrotnej transformaty Fouriera (189). Funkcja  $p(r)$  dostarcza cennych informacji o kształcie i rozmiarze cząsteczki. Wykres funkcji  $p(r)$  dla Nucb2 w obecności 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> lub 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> ma kształt asymetryczny z wydłużonym ramieniem zstępującym, co jest typowe dla białek o asymetrycznym kształcie cząsteczki (Rys. 4.22B). Wyznaczona z wykresu  $p(r)$  wysoka wartość maksymalnej odległości wewnątrzcząsteczkowej ( $D_{\max}$ ) Nucb2 także wskazuje na jego nieuporządkowany charakter (Tab. 4.7). W obecności jonów Ca<sup>2+</sup> oraz Mg<sup>2+</sup>, dochodzi do zmniejszenia się wartości  $D_{\max}$  (Tab. 4.7). Natomiast po dodaniu jonów Zn<sup>2+</sup>, wartość  $D_{\max}$  ulega zwiększeniu. Prawdopodobnie może na to wpływać zachodzący w obecności jonów Zn<sup>2+</sup> proces agregacji. Dodatkowo kształt krzywych  $p(r)$  Nucb2 (Rys. 4.22B) wskazuje na obecność dwóch komponentów (monomeru i dimeru) w roztworze. Różnice w otrzymanych krzywych  $p(r)$  pomiędzy różnymi formami Nucb2 mogą wynikać ze strukturalnego przegrupowania pomiędzy komponentami. Korzystając z wartości  $I(0)$  wyznaczonych z dopasowania do równania Guiniera można uzyskać także informacje o masie

cząsteczkowej oraz stanie oligomeryzacji Nucb2. Ekstrapolowano intensywność rozpraszania do kąta zero ( $I(0)$ ) oraz porównywano ją z  $I(0)$  białka standardowego o znanej masie cząsteczkowej (w tym przypadku BSA). Otrzymane dane (Tab. 4.7) pokazały, że Nucb2 w apo- jak i holo- formie występuje jako mieszanina monomeru oraz dimeru. Obserwacje te są zgodne z wcześniej wykonanymi analizami SV- AUC. Obecność mieszaniny monomeru z dimerem we wszystkich formach Nucb2 nie pozwoliła na otrzymanie wiarygodnych modeli niskorozdzielczych białka w oparciu o dane SAXS.



**Rysunek 4.22 Analiza SAXS Nucb2**

A) Wykres Kratky'ego Nucb2 w obecności 5 mM EDTA (linia czarna), 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (linia czerwona), 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (linia niebieska) oraz 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  (linia różowa), Mioglobina - białko globularne (id:SASDH2) (linia zielona).

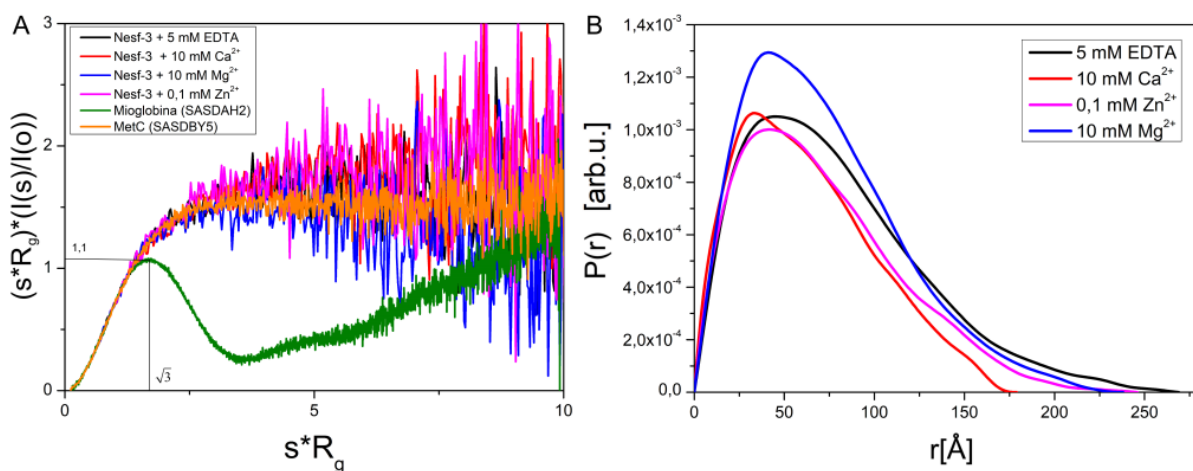
B) Wykres funkcji  $p(r)$  Nucb2 w obecności 5 mM EDTA (linia czarna), 10 mM  $\text{CaCl}_2$  (linia czerwona), 10 mM  $\text{MgCl}_2$  (linia niebieska) oraz 0,1 mM  $\text{ZnCl}_2$  (linia różowa). Pomiarzy prowadzono w temp. 20°C.

**Tabela 4.7 Parametry strukturalne Nucb2 ( $R_g$ ,  $D_{max}$  oraz  $MW_{app}$ ) w nieobecności oraz obecności jonów metali wyznaczone z danych SAXS**

Czynnik	$R_g$ [Å]	$D_{max}$ [Å]	$MW_{app}$ [kDa]	MW [kDa]
Nucb2 + 5 mM EDTA	66,5 ± 1,9	248	82,8	51,4
Nucb2 + 10 mM $\text{CaCl}_2$	58,9 ± 1,2	220	75,4	
Nucb2 + 10 mM $\text{MgCl}_2$	60,5 ± 1,6	240	85,9	
Nucb2 + 0,1 mM $\text{ZnCl}_2$	55,3 ± 1,7	260	67,7	

Pomiary SAXS wykonano dla trzech różnych stężeń nesfatyny-3 (1, 2,5 oraz 5 mg/ml) w obecności 5 mM EDTA, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>. Wykresy Kratky'ego dla nesfatyny-3 w obecności EDTA jak i badanych jonów metali, podobnie jak dla Nucb2, charakteryzuje się widocznym *plateau* poprzedzającym zmniejszenie intensywności rozpraszania (Rys. 4.23A), co świadczy o jego nieuporządkowanym charakterze. Wartości R<sub>g</sub> białka w nieobecności oraz obecności jonów metali nie ulegają znaczącym zmianom pomiędzy różnymi stężeniami nesfatyny-3 (Tab. 4.8). Jednakże w obecności jonów Zn<sup>2+</sup>, dochodzi do zwiększenia się wartości R<sub>g</sub> wraz ze wzrostem stężenia nesfatyny-3, co może świadczyć o zmianach konformacyjnych białka wraz ze wzrostem stężenia. Obecność jonów metali ma wpływ na rozmiar oraz kompaktowanie się cząsteczki nesfatyny-3. Wyznaczona wartość R<sub>g</sub> dla nesfatyny-3 (5 mg/ml) w obecności 5 mM EDTA wynosi 58,9 ± 1,11 Å (Tab. 4.8). Obecność badanych jonów metali prowadzi do zmniejszenia wartości R<sub>g</sub>. Efekt ten jest największy dla jonów Ca<sup>2+</sup> oraz Zn<sup>2+</sup>, a najmniejszy dla jonów Mg<sup>2+</sup> (Tab. 4.8). Wyniki są zgodne z wyżej opisanymi wynikami SV-AUC.

W kolejnym etapie wyznaczono funkcję p(r) dla nesfatyny-3 w nieobecności oraz obecności badanych jonów metali. Rysunek 4.23 przedstawia uzyskane wykresy p(r) dla nesfatyny-3 o najwyższym stężeniu (5 mg/ml) w nieobecności oraz obecności jonów metali. Podobnie jak w przypadku Nucb2, wykresy p(r) nesfatyny-3 charakteryzują się asymetrycznym kształtem z wydłużonym ramieniem zstępującym, co potwierdza asymetryczny kształt cząsteczki (Rys. 4.23B). Otrzymane wysokie wartości D<sub>max</sub> dla nesfatyny-3 także świadczą o wysokim stopniu nieuporządkowaniu cząsteczki. Wartość D<sub>max</sub> nesfatyny-3 ulega zmniejszeniu w obecności jonów metali, co potwierdza wcześniej obserwowane kompaktowanie się białka w ich obecności (Tab. 4.8). Wyznaczona masa molekularna nesfatyny-3 (MW<sub>app</sub>) na podstawie intensywności rozpraszania w nieobecności oraz obecności jonów metali sugeruje, że białko to znajduje się w formie dimeru (Tab. 4.8).



**Rysunek 4.23 Analiza SAXS nesfatyny-3**

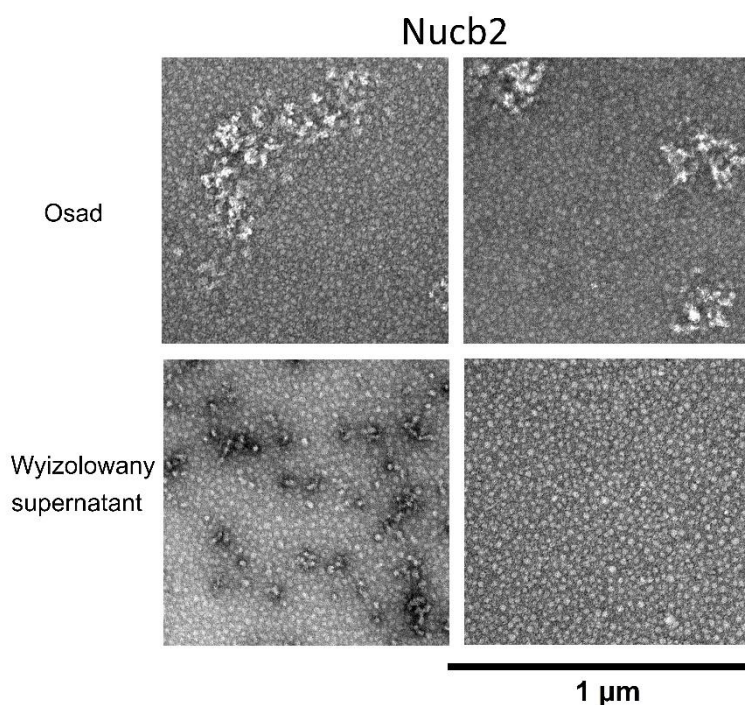
A) Wykres Kratki'ego nesfatyny-3 o stężeniu 5 mg/ml w obecności 5 mM EDTA (linia czarna), 10 mM CaCl<sub>2</sub> (linia czerwona), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (linia niebieska) oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> (linia różowa), Mioglobina- białko globularne (SASDAH2) (linia zielona) oraz fragment karboksylowy białka Metophrene tolerant (MetC) – IDP (SASDBY5) (linia pomarańczowa). B) Wykres funkcji p(r) nesfatyny- 3 w obecności 5 mM EDTA (linia czarna), 10 mM CaCl<sub>2</sub> (linia czerwona), 10 mM MgCl<sub>2</sub> (linia niebieska) oraz 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub> (linia różowa). Pomiary prowadzono w temp. 20°C.

**Tabela 4.8 Parametry strukturalne nesfatyny-3 ( $R_g$ ,  $D_{max}$  oraz  $MW_{app}$ ) w nieobecności oraz obecności jonów metali wyznaczone z danych SAXS**

Próbka	C <sub>białka</sub> [mg/ml]	I(0)	$R_g$ [Å]	$MW_{app}$ [kDa]	$D_{max}$ [Å]	MW [kDa]
Nesfatyna-3 + 5 mM EDTA	5	1,44 ± 0,02	58,9 ± 1,1	65,4	269	31,5
	2,5	1,4 ± 0,03	59,3 ± 2,2	63,6	268	
	1	1,32 ± 0,1	59,6 ± 4,3	60	246	
Nesfatyna-3 + 10 mM Ca <sup>2+</sup>	5	1,2 ± 0,012	48,1 ± 0,8	61,7	230	
	2,5	1,3 ± 0,02	49,5 ± 1,5	64,8	234	
	1	1,3 ± 0,04	48,1 ± 2,4	68,9	201	
Nesfatyna-3 + 0,1 mM Zn <sup>2+</sup>	5	1,3 ± 0,02	54,4 ± 1,3	64	239	
	2,5	1,6 ± 0,04	56,12 ± 2,13	81,8	241	
	1	0,9 ± 0,03	41,9 ± 2,3	45,2	179	
Nesfatyna-3 +10 mM Mg <sup>2+</sup>	5	1,6 ± 0,02	54,9 ± 1,2	69,9	238	
	2,5	1,6 ± 0,04	52,2 ± 1,2	68,2	240	
	1	1,5 ± 0,06	54,9 ± 3,1	67,3	264	

#### 4.4.9 Analiza morfologii oligomerów Nucb2 w obecności jonów metali za pomocą TEM

Wyniki SV-AUC pokazały, że w obecności jonów  $Zn^{2+}$  dochodzi do tworzenia się oligomerów wyższego rzędu Nucb2. Dodatkowo podczas SV-AUC obserwowano wytrącanie Nucb2 pod wpływem wysokiego stężenia jonów  $Zn^{2+}$  ( $C \geq 0,3$  mM). Do analizy morfologii powstających oligomerów Nucb2, wykorzystano transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM, ang. *transmission electron microscopy*). Obrazy TEM wykonano dla supernatantu oraz osadu Nucb2 o stężeniu 0,5 mg/ml otrzymanego po SV-AUC w obecności jonów  $Zn^{2+}$  o stężeniu 0,3 mM (Rys. 4.24). Osad Nucb2 stanowiły rozłożone równomiernie (Rys. 4.24) sferyczne agregaty oraz amorficzne agregaty. Natomiast w wyizolowanym supernatancie Nucb2 obserwowano sferyczne agregaty oraz wydłużone struktury (Rys. 4.24).

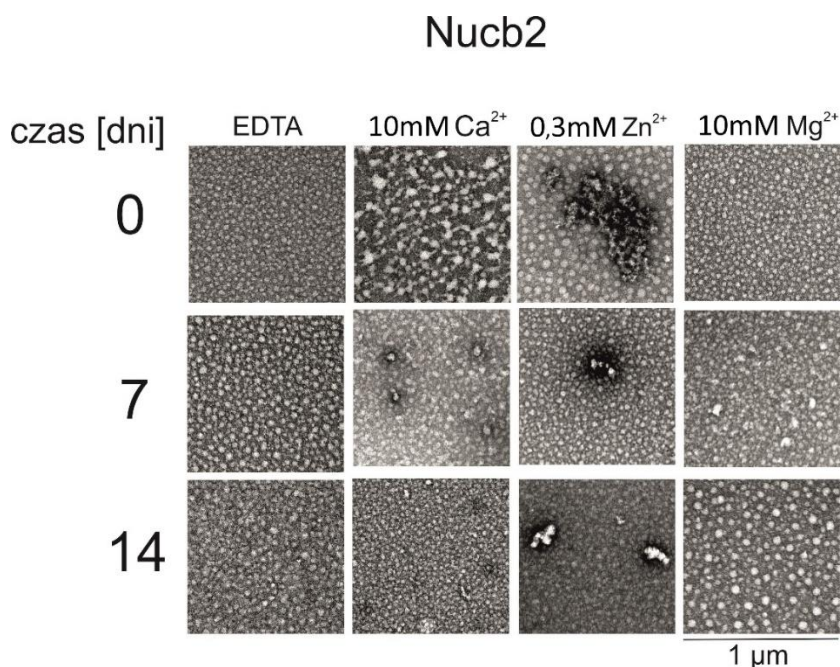


**Rysunek 4.24** Morfologia oligomerów Nucb2 tworzonych w obecności 0,3 mM  $ZnCl_2$

Obrazy TEM przedstawiają reprezentacyjne struktury występujące w próbkach wyizolowanego supernatantu oraz osadu Nucb2. Skala odpowiada 1 µm.

Dalsze badania skupiły się na zmianie morfologii Nucb2 w obecności jonów w ciągu 14 dni. Pomiary TEM wykonano dla białka Nucb2 w nieobecności oraz obecności 10 mM  $CaCl_2$ , 10 mM  $MgCl_2$  oraz 0,3 mM  $ZnCl_2$  w czasie zero, siedmiu oraz czternastu dni. Stężenie 0,3 mM  $ZnCl_2$  zostało wybrane jako stężenie krytyczne, które wywołuje największe zmiany w stanie oligomeryzacji białka podczas SV-AUC oraz prowadzi do wytrącania białka, które jest widoczna dla Nucb2 o stężeniu  $\leq 0,5$  mg/ml. Nucb2 w nieobecności jonów metali tworzy sferyczne agregaty, których rozmiar nie uległ zmianie przez 14 dni (Rys. 4.25). W obecności jonów  $Ca^{2+}$  obserwowano mieszaninę kulistych struktur, których rozmiar zmniejszał się wraz z czasem (Rys. 4.25). Natomiast, obecność jonów  $Mg^{2+}$  powoduje zwiększenie się rozmiaru

sferycznych agregatów w ciągu 14 dni. Największe zmiany morfologii obserwowano dla Nucb2 w obecności jonów  $Zn^{2+}$ . Inkubacja Nucb2 z 0,3 mM  $ZnCl_2$  prowadzi do formowania się sferycznych agregatów oraz wydłużonych struktur (Rys. 4.25). Wyniki TEM są zgodne z danymi z analiz SV-AUC. W obecności jonów  $Zn^{2+}$ , dochodzi do tworzenia się agregatów wyższego rzędu Nucb2.



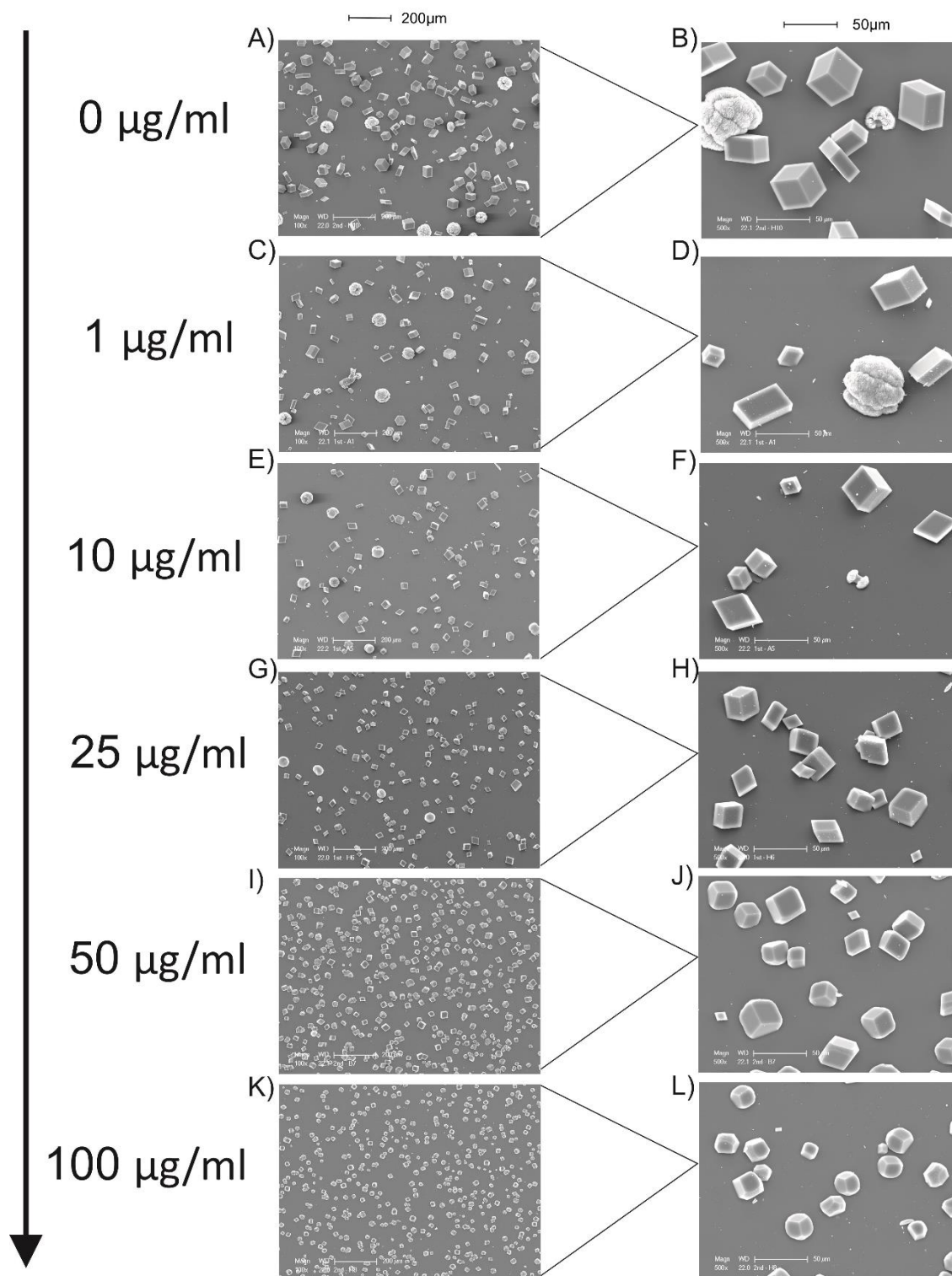
**Rysunek 4.25** Reprezentacyjne obrazy TEM agregatów Nucb2 w obecności 5 mM EDTA, 10 mM  $CaCl_2$ , 10 mM  $MgCl_2$  oraz 0,3 mM  $ZnCl_2$  otrzymane w ciągu 0-14 dni

Skala odpowiada 1  $\mu$ m.

#### 4.5 AKTYWNOŚĆ BIOMINERALIZACYJNA NUCB2 *IN VITRO*

Nucb2 z *Gallus gallus* zostało odkryte w warstwie mamilliary skorupie jaja kurzego (118). Kolejną część badań skupiła się na określeniu wpływu Nucb2 na biomineralizację węgla wapnia. Zastosowano metodę powolnej dyfuzji. Rys. 4.26 przedstawia zdjęcia skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM, ang. *scanning electron microscopy*) kryształów otrzymanych w nieobecności oraz obecności wzrastającego stężenia Nucb2 w czasie 24 h. W próbie kontrolnej obserwowano powstawanie kryształów węgla wapnia o kształcie romboedrycznym (Rys. 4.26A i B). Obecność Nucb2 o stężeniu 1-10  $\mu$ g/ml nie wpływa na biomineralizację węgla wapnia (Rys. 4.26C, D, E, F). Natomiast, dodatek Nucb2 o stężeniu 25-100  $\mu$ g/ml wpływa znacząco na proces biomineralizacji węgla wapnia. Wraz ze wzrostem stężenia Nucb2, dochodzi do zmiany w morfologii kryształów. W obecności Nucb2 powstają kryształy o wygładzonych krawędziach (Rys. 4.26G, H, I, J, K i L). Efekt ten pogłębia się wraz ze wzrastającym stężeniem Nucb2 (Rys. 4.26K oraz L).

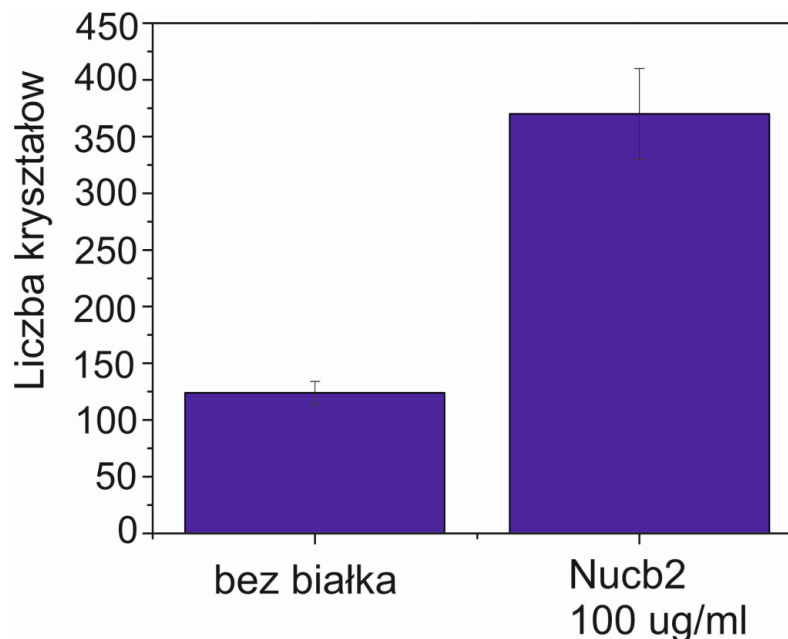




**Rysunek 4.26** Obrazy SEM kryształów węglańu wapnia otrzymanych w ciągu 24 h w nieobecności oraz obecności wzrastającego stężenia Nucb2

A, B) Kryształy otrzymane w nieobecności Nucb2; C, D, E, F, G, H, I, J, K, L) kryształy powstałe w obecności wzrastającego stężenia Nucb2; Skala przedstawiona na zdjęciach A, C, E, G, I, K przedstawia 200  $\mu\text{m}$ , natomiast skala przedstawiona na zdjęciach B, D, F, H, J oraz L reprezentuje 50  $\mu\text{m}$ .

Oprócz zmiany morfologii, wraz ze zwiększającym się stężeniem Nucb2 obserwowano także zwiększenie się liczby kryształów węglanu wapnia (Rys. 4.27). W obecności Nucb2 o stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  obserwowano 3-krotny wzrost liczby kryształów w stosunku do próby kontrolnej (Rys. 4.27).

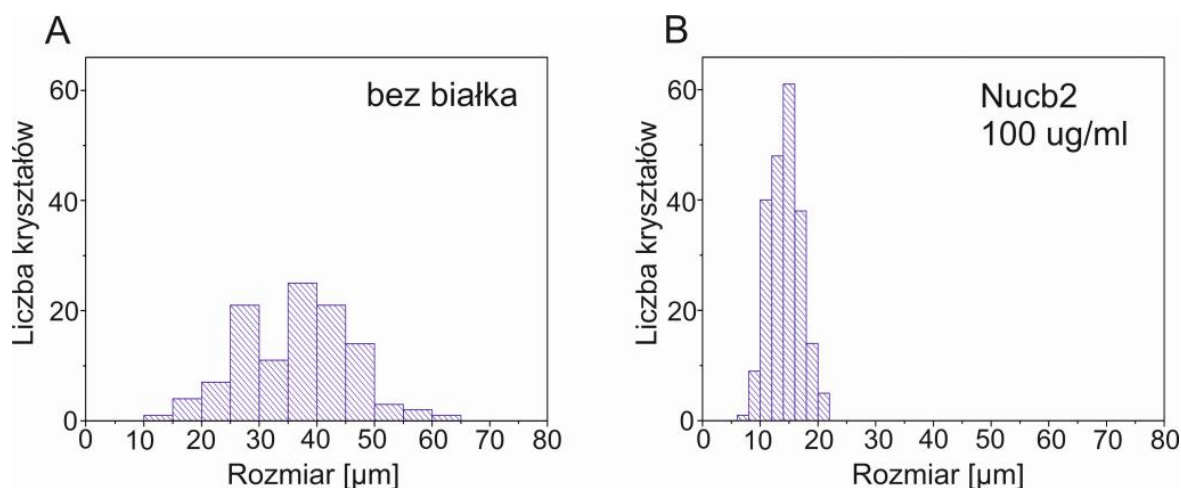


**Rysunek 4.27 Wpływ Nucb2 na liczbę kryształów węglanu wapnia**

Liczba kryształów węglanu wapnia powstała w nieobecności oraz obecności 100  $\mu\text{g/ml}$  Nucb2 podczas 24 h. Ilość kryształów została wyznaczona poprzez policzenie wyników z 3 różnych zdjęć SEM o powierzchni  $1,2 \times 0,9$  mm w programie ImageJ oraz ich uśrednienie dla każdego z przedstawionych warunków.

Dodatkowo wzrost stężenia Nucb2 ma także wpływ na rozmiar powstających kryształów węglanu wapnia. Rysunek 4.28 przedstawia histogramy rozkładu wielkości poszczególnych kryształów węglanu wapnia znajdujących się w przedstawionych warunkach. Kryształy otrzymane w próbie kontrolnej (Rys. 4.28) bez Nucb2 odznaczają się długościami krawędzi w przedziałach 10-65  $\mu\text{m}$  ( $36,5 \pm 9,5$   $\mu\text{m}$ ). Natomiast obecność wzrastającego stężenia Nucb2 prowadzi się do zmniejszania się rozmiaru kryształów. W obecności Nucb2 o stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  obserwowano tworzenie się kryształów węglanu wapnia (Rys. 4.28) o długościach krawędzi w przedziale 5-25  $\mu\text{m}$  ( $14,3 \pm 2,7$   $\mu\text{m}$ ).

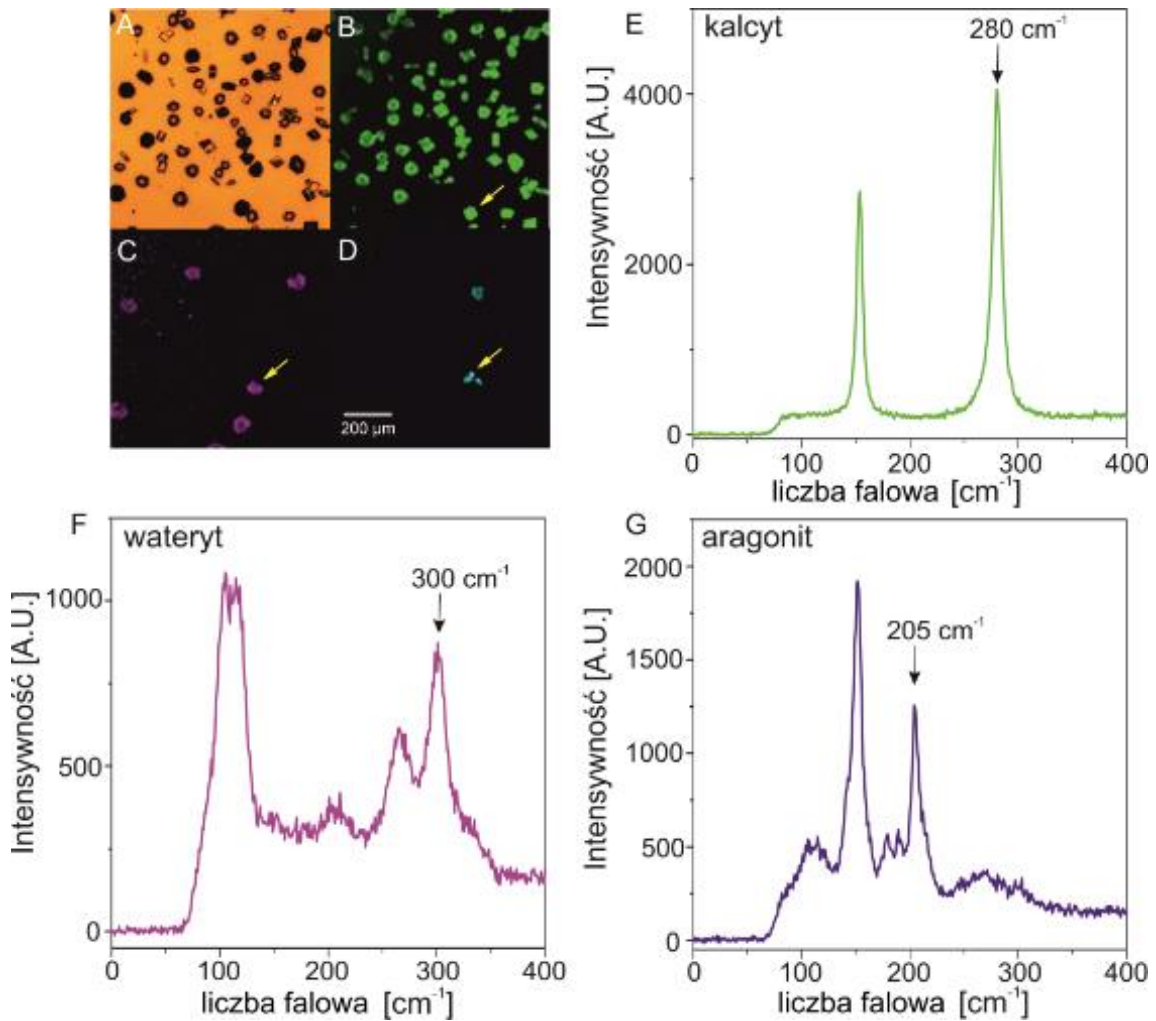




**Rysunek 4.28 Wpływ Nucb2 na rozmiar kryształów węgla wapnia**

*Histogramy przedstawiają rozkład rozmiarów kryształów węgla wapnia obliczonych dla próby kontrolnej (A) oraz 100  $\mu\text{g/ml}$  Nucb2 (B). Średnią wielkość kryształów obliczono wykorzystując długość krawędzi kryształów węgla wapnia na podstawie zdjęć SEM w programie ImageJ.*

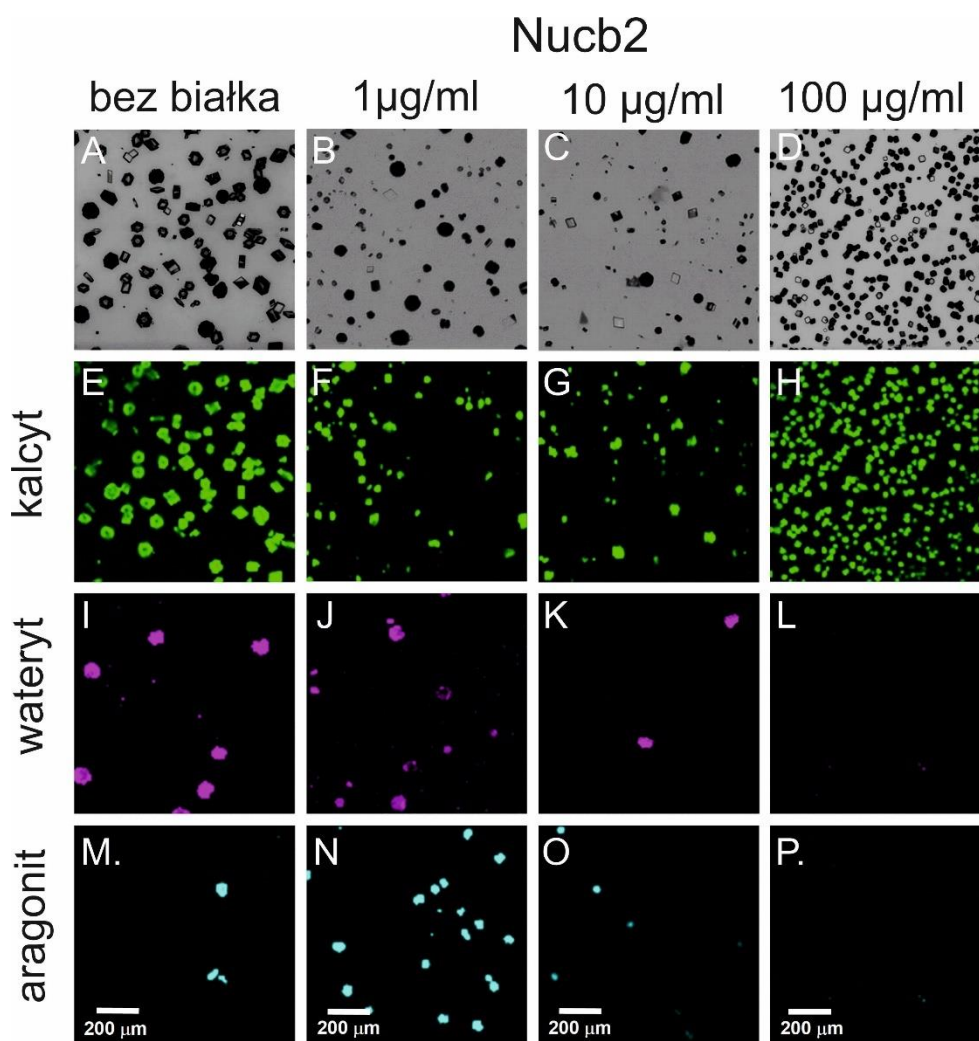
W celu określenia odmiany polimorficznej powstających kryształów węgla wapnia w obecności Nucb2 mapowano całe szkiełka poszczególnych próbek kryształów otrzymanych w nieobecności oraz obecności różnych stężeń Nucb2 z wykorzystaniem spektroskopii Ramana połączonej z mikroskopią konfokalną (Rys. 4.29 oraz 4.30). Na Rys. 4.29 przedstawiono otrzymane widma dla poszczególnych odmian węgla wapnia obecnych w próbkach. Można zaobserwować, że wraz ze wzrostem stężenia białka Nucb2 (Rys. 4.30) dochodziło do zwiększenia się udziału kalcytu oraz zmniejszania udziału pozostałych odmian polimorficznych (waterytu oraz aragonitu) (Rys. 4.30). W obecności najwyższego stężenia białka Nucb2 (100  $\mu\text{g/ml}$ ), obserwowano tworzenie się tylko kryształów kalcytu (Rys. 4.30).



**Rysunek 4.29** Widma Ramana otrzymane dla poszczególnych odmian polimorficznych węgla wapnia obecnych w próbce kontrolnej

Zmapowany obszar próbki kontrolnej (A), Mapy Ramana zmapowanego regionu przygotowane na podstawie intensywności piku przy  $280\text{ cm}^{-1}$  dla kalcytu (B),  $300\text{ cm}^{-1}$  dla waterytu (C) oraz  $205\text{ cm}^{-1}$  dla aragonitu (D). Widma Ramana otrzymane dla kalcytu (E), waterytu (F) oraz aragonitu (G). Żółtymi strzałkami zaznaczono kryształy dla których wygenerowano widma Ramana (B-D). Czarną strzałką oznaczono piki, którymi posłużono się podczas mapowania obszaru (E-G). Skala przedstawia  $200\text{ }\mu\text{m}$ .

Podsumowując, obecność Nucb2 wpływa na proces biomineralizacji węgla wapnia. Nucb2 zmienia morfologię kryształów kalcytu, prowadząc do powstawania kryształów o wygładzonych krawędziach. W obecności Nucb2 dochodzi do zwiększenia się ilości kryształów kalcytu, co wskazuje na rolę białka w procesie indukcji nukleacji biomineralizacji. Z kolei, zmniejszanie się rozmiarów kryształów kalcytu pod wpływem Nucb2, może świadczyć o jego działaniu jako inhibitora wzrostu kryształów.



**Rysunek 4.30 Aktywność biomineralizacyjna Nucb2**

Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiają mapy Ramana kryształów otrzymanych w nieobecności (A, E, I, M) oraz obecności 1  $\mu\text{g/ml}$  (B, F, J, N), 10  $\mu\text{g/ml}$  (C, G, K, O) oraz 100  $\mu\text{g/ml}$  Nucb2 (D, H, L, P). Obrazy A – D przedstawiają zmapowane obszary poszczególnych próbek, E – H – zmapowane kalcyty na obszarach, I – L – zmapowane wateryty oraz M – P – zmapowane aragonity.

## 5 Dyskusja

Białko Nucb2 jest obecne w wielu tkankach organizmu człowieka i może uczestniczyć w różnorodnych procesach fizjologicznych (35, 231). Dodatkowo Nucb2 odznacza się dualną rolą w procesach nowotworowych (54, 59, 64). W zależności od miejsca występowania, Nucb2 wykazuje działanie anty- lub pro-apoptotyczne. Nucb2 może mieć szerokie zastosowanie w medycynie, jednak jego aktywność wymaga ścisłej regulacji. Większość przeprowadzonych badań skupiała się na udziale Nucb2 w procesach fizjologicznych. Nie przedstawiono do tej pory analizy molekularnej białka ani produktów jego konwersji proteolitycznej: nesfatyn. Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej była molekularna charakterystyka Nucb2 oraz jego karboksylowego fragmentu nesfatyny-3 z *Gallus gallus* (Kura bankiwy). Homologi Nucb2 odznaczają się 85% podobieństwem sekwencji aminokwasowej (232) i dlatego badania przeprowadzone na jednym homology możemy odnieść do pozostałych homologów. Dodatkowo ze względu na potencjalną rolę w procesie biomineralizacji, szczególnie interesujący wydaje się być homolog kurzy Nucb2. Poznanie molekularnej charakterystyki obu białek może przyczynić się do postępu w dalszych badaniach fizjologicznych.

### 5.1 OTRZYMYWANIE REKOMBINOWANYCH BIAŁEK NUCB2 ORAZ NESFATYNY-3

Realizacja tematu rozprawy doktorskiej wymagała opracowania skutecznej i powtarzalnej procedury ekspresji oraz oczyszczania Nucb2 oraz nesfatyny-3. Do ekspresji obu białek wykorzystano komórki bakteryjne *E. coli* ze względu na łatwość ich hodowli, niski koszt oraz możliwość otrzymania dużej ilości białka rekombinowanego (233). Ekspresję obu białek prowadzono w szczepie BL21(DE3)pLysS *E. coli*, który posiada plazmid kodujący lizozym T7, co ułatwia lizę komórkową. Sekwencje obu białek zostały wklonowane do pochodnej wektora pQE-80L – pQE-80L\_HRV3C. Wektor ten umożliwia uzyskanie białka z wprowadzonym na końcu aminowym znacznikiem 6×His oraz miejscem trawienia rozpoznawanym przez proteazę HRV 3C. Ekspresja obu białek była prowadzona według wcześniej zoptymalizowanych warunków (167). Białka w formie rozpuszczalnej uzyskiwano w wyniku nadekspresji w temp. 29°C przez 3 h.

Kolejnym krokiem było opracowanie skutecznej procedury oczyszczania białek. W pierwszym etapie wykorzystano chromatografię powinowactwa na złożu Ni-NTA, korzystając z obecności 6 reszt His na końcu aminowym Nucb2 oraz nesfatyny-3, wprowadzonych przez wektor pQE-80L\_HRV3C. W obu przypadkach, technika ta pozwoliła na

oddzielenie większości zanieczyszczeń. Następnie oba białka były poddawane trawieniu przez proteazę HRV 3C, aby usunąć znacznik 6× His. W celu otrzymania homogennego preparatu Nucb2 pozbawionego pozostałych zanieczyszczeń, zastosowano metodę filtracji żelowej. W przypadku nesfatyny-3, wykorzystano chromatografię oddziaływań hydrofobowych. Opracowane procedury umożliwiły uzyskanie 3,5 mg Nucb2 oraz 2 mg Nesfatyny-3 o czystości na poziomie 90% z 0,5 litra hodowli bakteryjnej. Taka wydajność pozwoliła na przeprowadzenie analizy molekularnej.

## 5.2 NUCB2 JAKO BIAŁKO CZĘŚCIOWO NIEUPORZĄDKOWANE

Nucb2 jest białkiem wielodomenowym, które uczestniczy w wielu procesach fizjologicznych oraz oddziaływaniach. Założono, że może to wynikać z obecności IDRs w strukturze Nucb2. Analizę molekularną rozpoczęto od analizy *in silico*. Analiza sekwencji Nucb2 predyktorami PONDR<sup>®</sup> oraz IUPRED2a zasugerowała, że Nucb2 charakteryzuje się dużym stopniem nieuporządkowania – 51,4% sekwencji białka stanowią fragmenty nieuporządkowane. Dodatkowo zaobserwowano, że Nucb2 może posiadać strukturę składającą się z fragmentów nieuporządkowanych oraz uporządkowanych zlokalizowanych naprzemiennie. Fragment karboksylowy białka odznacza się większym udziałem fragmentów nieuporządkowanych niż fragment aminowy. Występowanie fragmentów IDRs w Nucb2 zostało także potwierdzone za pomocą narzędzia DynaMine, które skupia się na przewidywaniu dynamiki łańcucha bocznego. Co ciekawe DynaMine nie tylko określa obecność regionów nieuporządkowanych oraz uporządkowanych, ale również regionów o dynamice, zależnej od kontekstu. Analiza pokazała obecność takich regionów rozłożonych równomiernie w sekwencji białka Nucb2. Fragmenty o dynamice zależnej od kontekstu mogą brać udział w oddziaływaniach z partnerami molekularnymi. Dodatkowo sekwencja Nucb2 jest bogata w aminokwasy promujące nieuporządkowanie takie jak Arg, Glu, Gln, Asp, Pro, Lys czy Ser. Co więcej, ponad 60% tych aminokwasów znajduje się w sekwencji nesfatyny-3. Nieuporządkowany charakter Nucb2 oraz nesfatyny-3 zdaje się także potwierdzać wykres zależności średniego ładunku netto od średniej hydropatii, który pozwala na klasyfikację białek do globularnych lub IDPs. Zarówno białko Nucb2 jak i nesfatyna-3 znajdują się po stronie białek nieuporządkowanych, charakteryzujących się niską wartością hydropatii oraz wyższym ładunkiem netto.

W kolejnym etapie wykorzystano techniki eksperymentalne do zweryfikowania czy i w jakim zakresie badane białka są nieuporządkowane. Zachowanie białka podczas procesu

oczyszczania tj. niska objętość elucji zbliżona do objętości zerowej kolumny oraz zwiększona pozorna masa cząsteczkowa białka widoczna na żelu SDS-PAGE także wskazują na jego nieuporządkowany charakter. Analiza CD pokazała, że Nucb2 jak i nesfatyna-3 charakteryzują się wysoką zawartością reszt  $\alpha$ -helikalnych (Nucb2 –  $46,8 \pm 0,4\%$ , nesfatyna-3 –  $33,3 \pm 0,013\%$ ) oraz struktur nieuporządkowanych (Nucb2 –  $24,6 \pm 0,2\%$ , nesfatyna-3 –  $33,3 \pm 0,01\%$ ). Dodatkowo oba białka charakteryzują się znaczną obecnością struktur typu  $\beta$  (Nucb2 –  $26,2 \pm 0,1\%$ , nesfatyna-3 –  $34 \pm 0,03\%$ ). Badania fluorescencji wewnętrznej reszt Trp Nucb2 i nesfatyny-3 pokazały, że reszty te znajdują się na powierzchni białka, co także jest charakterystyczne dla białek należących do rodziny IDPs. Ponadto, wartość  $f/f_0$  wyznaczona na podstawie pomiarów SV-AUC jest wyższa w porównaniu z białkami globularnymi (Nucb2 – 1,75, nesfatyna-3 – 2,12, białka globularne – (1,2 – 1,4)), co sugeruje asymetryczny kształt białek. Dodatkowo wykres Kratky’ego obu białek otrzymany podczas analizy SAXS posiada kształt charakterystyczny dla białek nieuporządkowanych. Aby zmapować regiony o nieuporządkowanym charakterze białka Nucb2, wykorzystano technikę HDX-MS, która na podstawie stopnia wymiany proton-deuter pozwala określić występowanie IDRs w białku. Analiza otrzymanych wyników HDX-MS pokazała, że białko Nucb2 można podzielić na dwie części: fragment aminowy (nesfatyna-1 oraz nesfatyna-2) wykazujący strukturę *mozaiki* składający się z odcinków nieuporządkowanych oraz uporządkowanych oraz fragment karboksylowy (nesfatyna-3) który w całości zawiera odcinki nieuporządkowane o wysokim poziomie wymiany (powyżej 90%) już po 10 s.

Zarówno wykorzystane metody *in silico* jak i techniki eksperymentalne potwierdziły, że białko Nucb2 charakteryzuje się dużym stopniem nieuporządkowania oraz należy do rodziny IDPs.

### 5.3 ODDZIAŁYWANIE Z JONAMI WAPNIA

Nucb2 posiada w swojej strukturze we fragmencie karboksylowym dwie domeny dłoni EF, które są odpowiedzialne za wiązania jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Jony metali mogą modulować strukturę białek, adaptując ich strukturę do roli w różnych procesach molekularnych oraz oddziaływania z różnymi partnerami białkowymi. Dodatkowo białka z rodziny IDPs mogą przybierać bardziej stabilną funkcję po związaniu ze swoimi partnerami molekularnymi. W pracy, zbadano wpływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$  na strukturę Nucb2 oraz nesfatyny-3. Analiza widm CD pokazała, że w obecności 10 mM  $\text{CaCl}_2$  dochodzi do zwiększenia się zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych oraz zmniejszenia się struktur nieuporządkowanych. Technika limitowanej proteolizy ujawniła, że oba białka



w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  charakteryzują się zwiększoną opornością na trawienie proteazą GluV8. W obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ , dochodzi do zmiany strukturalnej, która zmniejsza dostępność miejsc trawienia proteazy GluV8. Miejsca trawienia proteolitycznego znajdują się częściej w strukturze pętli niż w strukturze  $\alpha$ -helis (194, 210). Otrzymany wynik również wskazuje na zwiększenie się zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych w obu białkach w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Białko Nucb2 nabywa odporność na trawienie proteazą GluV8 w obecności 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Natomiast, w przypadku nesfatyny-3 zmiany strukturalne obserwowano już podczas inkubacji białka z 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ . Analiza wyników HDX-MS w obecności 10 mM  $\text{CaCl}_2$  pokazała, że w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  dochodzi do znacznego zmniejszenia stopnia deuteracji (poniżej 50%) w obrębie sekwencji dwóch pętli pochodzących z domen dłoni EF znajdujących się w sekwencji nesfatyny-3, co świadczy o strukturyzowaniu się tej części białka. Podobne obserwacje dotyczą też innych białek posiadających domeny dłoni EF (234). Co więcej, dodanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  spowodowało odtworzenie przewidywanej struktury *mozaiki* we fragmencie karboksylowym białka. Fałdowanie się obu białek w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  zostało potwierdzone za pomocą analizy SV-AUC oraz SAXS. Wartość  $f/f_0$  oraz  $R_g$  Nucb2 oraz nesfatyny-3 ulega zmniejszeniu po dodaniu jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Dodatkowo jony  $\text{Ca}^{2+}$  biorą udział w stabilizacji frakcji dimerycznej białka Nucb2. Analiza wyników ITC potwierdziła wiązanie dwóch jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez Nucb2 oraz nesfatynę-3. Podczas miareczkowania białka Nucb2 jonami  $\text{Ca}^{2+}$  obserwowano wzrost wydzielania ciepła, co może świadczyć o oligomeryzacji białka. Wyniki te są zgodne z wcześniej opisanymi wynikami HDX-MS oraz SAXS.

Nucb2 oraz nesfatyna-3 wiążą dwa jony  $\text{Ca}^{2+}$ , co skutkuje zmianą strukturalną obu białek. Jony  $\text{Ca}^{2+}$  neutralizują ładunek ujemny reszt aminokwasowych kwasowych białek, co indukuje strukturyzację IDRs w białku oraz w konsekwencji kompaktowanie się całej cząsteczki białkowej. Zmiana zapoczątkowana przez wiązanie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  rozprzestrzenia się na całą cząsteczkę białkową wpływając na strukturę trzecio- oraz czwartorzędową białek. Podobne zmiany strukturalne pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  były obserwowane w przypadku innych białek posiadających domeny dłoni EF m.in. białka DREAM (ang. *downstream regulatory element antagonist modulator*) (234). Prawdopodobnie zmiana strukturalna białek pod wpływem jonów  $\text{Ca}^{2+}$  może wpływać na oddziaływania białek z ich partnerami molekularnymi. Jony  $\text{Ca}^{2+}$  są niezbędne do oddziaływania białka Nucb2 z białkiem Necdin (69) oraz z białkiem ARTS-1 (68). Miejsca wiązania obu białek znajdują się w sekwencji nesfatyny-3. Z drugiej strony, na skutek związania jonów  $\text{Ca}^{2+}$  przez Nucb2 dochodzi do zablokowania oddziaływania białka z białkiem  $G_{\alpha 3}$  poprzez motyw GBA znajdujący się również w sekwencji nesfatyny-3 (70). Co ciekawe,

wszystkie te oddziaływania mają wpływ na procesy nowotworowe. Wydaje się, że zmiany strukturalne Nucb2 indukowane przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  mogą adaptować strukturę białka do udziału w różnych procesach molekularnych. Kompaktowanie się domen dłoni EF było obserwowane także w przypadku paraloga Nucb2, białka Nucb1 (235). Zarówno modulacja struktury Nucb2 przez jony  $\text{Ca}^{2+}$  oraz udział białka w oddziaływaniach zależnych od  $\text{Ca}^{2+}$  wskazują, że białko Nucb2 może należeć do rodziny białkowych sensorów  $\text{Ca}^{2+}$ , które ulegają znacznym zmianom strukturalnym w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Jednym z najbardziej przebadanych oraz znanych przykładów białka sensorowego posiadającego domeny dłoni EF jest kalmodulina (134). Pełnienie różnych funkcji przez kalmodulinę oraz jej oddziaływanie z różnorodnymi partnerami jest regulowane poprzez zmiany konformacyjne białka w obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (134). Co ciekawe, analiza filogenetyczna sekwencji dwóch domen dłoni EF metodą największej parsymonii pokazała, że pochodzą one od pierwszych dwóch domen z rodziny CTER (ang. *calmodulin*, *troponin C*, and *essential and regulatory light chains of myosin*), czyli kalmoduliny, troponiny C oraz miozyny, które wykazują podobieństwo w budowie domen dłoni EF (236). Podobieństwo pomiędzy tymi domenami sugeruje pochodzenie tych białek od czterodomenowego prekursora rodziny CTER (236). Dodatkowo fragment nesfatyny-3 odznacza się znacznym podobieństwem do czwartej domeny dłoni EF kalmoduliny z *Emericella nidulans* (236). Najprawdopodobniej Nucb2 oraz nesfatyna-3 mogą należeć do rodziny białkowych sensorów  $\text{Ca}^{2+}$  a modulacja ich struktury zależna od jonów  $\text{Ca}^{2+}$  sprawia, że mogą one oddziaływać z różnymi partnerami białkowymi.

Analiza wyników SV-AUC pokazała, że obecność jonów  $\text{Ca}^{2+}$  prowadzi do zwiększenia zawartości frakcji dimerycznej oraz trimerycznej Nucb2. Dodatkowo podczas pomiarów ITC obserwowano wzrost udziału procesu egzotermicznego, który może wskazywać na dimeryzację białka podczas oddziaływania z jonami  $\text{Ca}^{2+}$ . Nesfatyna-3 zarówno w nieobecności jak i obecności jonów  $\text{Ca}^{2+}$  znajduje się w równowadze monomer – dimer z przewagą frakcji dimerycznej. Nucb2 zawiera w swoim fragmencie karboksylowym dwie domeny dłoni EF oraz motyw zamka leucynowego, które mogą brać udział w procesie dimeryzacji Nucb2 (2). Stan oligomeryczny białka także może wpływać na jego udział w różnych procesach molekularnych. Białka S100, z rodziny białek posiadających domeny dłoni EF, występują w formie homodimerów lub oligomerów wyższego rzędu w warunkach fizjologicznych (237). Białka S100, podobnie jak Nucb2, charakteryzują się szeroką dystrybucją w organizmie ludzkim, a także udziałem w wielu procesach fizjologicznych jak i patologicznych (238). Natomiast, neuronalne sensory białkowe takie jak rekoweryna ulegają dimeryzacji pod wpływem jonów



$\text{Ca}^{2+}$ , co ułatwia ich oddziaływanie z partnerami białkowymi (239). Nucb2 wykazuje wysoką ekspresję w centralnym układzie nerwowym (4), co sugeruje jego udział w procesach neuronalnych. Dodatkowo pokazano, że obecność nesfatyny-1 skutkowałą zwiększeniem się stężenia jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w neuronach (240). Jony  $\text{Ca}^{2+}$  stanowią przekaźnik pośredniczący w wielu procesach, m.in. w modulacji ścieżek neuronalnych. Zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego wolnych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  są niezbędne dla transmisji informacji poprzez system nerwowy, co przyczynia się do uwolnienia neurotransmiterów z synaps (241). Ponadto, zmiany w stężeniu wewnątrzkomórkowych jonów  $\text{Ca}^{2+}$  mogą prowadzić do różnorodnych zmian fizjologicznych, które mogą modulować funkcję neuronalne (242). Wśród białek biorących udział w regulacji procesów neuronalnych możemy wyróżnić białkowe sensory  $\text{Ca}^{2+}$ , m.in. synaptotagminy, kontrolujące uwolnienie neurotransmiterów (243) czy wcześniej wymienioną kalmodulinę (244) oraz neuronalne sensory białkowe  $\text{Ca}^{2+}$  (245). Ponadto, paralog Nucb2, Nucb1 wykazuje 30% podobieństwo sekwencji z kalretikulina, białkiem z obecną domeną dłoni EF znajdującym się w siateczce śródplazmatycznej (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) (246). Kalretikulina jest białkiem czaperonowym biorącym udział w fałdowaniu glikoprotein oraz regulacji homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$  (247). Sekwencja regionu bogatego w Ile/Leu fragmentu aminowego Nucb2 posiada motyw odpowiedzialny za retencję Nucb2 w aparacie Golgiego (248). Aparat Golgiego, podobnie jak ER stanowi rezerwuar jonów  $\text{Ca}^{2+}$  (249). Prawdopodobnie białka z rodziny Nucleobindin mogą kontrolować homeostazę  $\text{Ca}^{2+}$  w aparacie Golgiego podobnie jak kalretikulina w ER.

Jony  $\text{Ca}^{2+}$  mogą wywoływać zmiany strukturalne Nucb2 oraz nesfatyny-3 warunkując ich udział w różnorodnych procesach fizjologicznych takich jak apoptoza czy procesy neuronalne.

#### 5.4 ODDZIAŁYWANIE Z JONAMI CYNKU

Nucb1, paralog Nucb2, został scharakteryzowany jako białko wiążące dwa jony  $\text{Zn}^{2+}$  z wysokim powinowactwem (18). Nucb1 posiada dwa motywy wiążące jony  $\text{Zn}^{2+}$ . Nucb2 zawiera na końcu aminowym, jeden domniemany motyw wiązania jonów  $\text{Zn}^{2+}$  (HFREX<sub>n</sub>H), obecny także w Nucb1. Prezentowane w niniejszej pracy analizy widm CD pokazały, że obecność jonów  $\text{Zn}^{2+}$  w nieznacznym sposób wpływa na zmianę struktury drugorzędowej Nucb2, prowadząc do zwiększenia zawartości struktur  $\alpha$ -helikalnych oraz zmniejszenia zawartości struktur nieuporządkowanych. Jednakże przy zwiększeniu stężenia jonów  $\text{Zn}^{2+}$  (0,3 mM) obserwowano zanik sygnału CD oraz wytrącanie Nucb2. Nesfatyna-3 wydaje się być mniej wrażliwa na stężenie jonów  $\text{Zn}^{2+}$  i nie ulega wytrąceniu w obecności 0,3 mM  $\text{ZnCl}_2$ . Dodatkowo pod wpływem jonów  $\text{Zn}^{2+}$  w cząsteczce nesfatyny-3 dochodzi do znacznego zwiększenia udziału

struktur  $\alpha$ -helikalnych wraz ze zmniejszeniem udziału struktur nieuporządkowanych. Co ciekawe, zmiana udziałów struktur drugorzędowych nesfatyny-3 w obecności jonów  $Zn^{2+}$  jest większa niż w obecności jonów  $Ca^{2+}$ . Ponownie wykorzystano technikę HDX-MS, aby zbadać zmiany dynamiki strukturalnej Nucb2 w obecności 0,1 mM  $ZnCl_2$ . Analiza wyników HDX-MS pokazała, że pod wpływem jonów  $Zn^{2+}$  dochodzi do zwiększenia się dostępności do rozpuszczalnika peptydów fragmentu aminowego Nucb2, co może być odpowiedzialne za destabilizację białka. Zmiany stopnia deuteracji są widoczne w odcinkach fragmentu aminowego Nucb2 m.in. w obrębie motywu wiążącego rejonu  $Zn^{2+}$ . Ponadto obecność jonów  $Zn^{2+}$  wpływa znacznie na maksimum emisji fluorescencji dwóch reszt Trp obecnych w fragmencie karboksylowym Nucb2. Po dodaniu jonów  $Zn^{2+}$  (0,1 – 0,3 mM) dochodzi do przesunięcia maksimum emisji fluorescencji reszt Trp w kierunku fal krótszych o około 10 nm, co wskazuje na zmianę ich otoczenia na bardziej hydrofobowe. Wyniki te pokazują, że jony  $Zn^{2+}$  indukują zmiany także w strukturze nesfatyny-3. Wyniki analiz SV-AUC oraz SAXS potwierdziły zmiany struktury nesfatyny-3 pod wpływem jonów  $Zn^{2+}$ . Nesfatyna-3 w obecności  $Zn^{2+}$ , podobnie jak w nieobecności jonów, znajduje się w równowadze monomer - dimer. Natomiast, jony  $Zn^{2+}$  znacznie wpływają na stan oligomeryzacji Nucb2. Obecność jonów  $Zn^{2+}$  indukuje powstanie dimerów oraz oligomerów wyższego rzędu białka Nucb2. Analiza morfologii powstających oligomerów Nucb2 za pomocą TEM ujawniła, że dodanie jonów  $Zn^{2+}$  prowadzi do powstania wydłużonych oraz sferycznych agregatów. Dodatkowo podczas CD, SV-AUC oraz badań fluorescencyjnych obserwowano wytrącanie Nucb2 w obecności 0,3 mM  $ZnCl_2$ . Zjawisko wytrącania się białka z roztworu było zależne od stosunku stężenia białka do stężenia jonów  $Zn^{2+}$ . Analiza SV-AUC potwierdziła, że pomimo wytrącenia Nucb2 nadal wykazuje tendencję do tworzenia agregatów wyższego rzędu. Dzięki wykorzystaniu techniki TEM udało się zaobserwować obecność charakterystycznych amorficznych agregatów w osadzie Nucb2 oraz amorficznych agregatów i wydłużonych struktur w supernatancie Nucb2 otrzymanym po SV-AUC. Tworzenie się podobnych morfologicznie amorficznych agregatów pod wpływem jonów  $Zn^{2+}$  obserwowano w przypadku białka tworzącego filamenty pośrednie wimentyny (250). Powstałe agregaty wimentyny nie były w stanie spełniać swojej funkcji i przekształcić się w filamenty pośrednie (250). Wimentyna jest ekspresjonowana w komórkach mezenchymalnych i charakteryzuje się zwiększoną ekspresją podczas metastazy nowotworowej (251). Podobnie jak Nucb2, wimentyna bierze udział w EMT (252). Tworzące się agregaty Nucb2 w obecności  $Zn^{2+}$  prawdopodobnie mogą być związane z rolą w procesie nowotworowym lub mogą stanowić formę niefunkcjonalną białka. Precypitacja oraz powstawanie agregatów wyższych rzędów pod wpływem zwiększonego stężenia jonów  $Zn^{2+}$

było obserwowane u białek takich jak S100A1 (253), insulina (254) czy neuronalny sensor wapnia (255). Białko S100, które również posiada domeny dłoni EF, pod wpływem jonów  $Zn^{2+}$  ulega destabilizacji, która skutkuje zwiększoną wrażliwością na agregację (253). Komórki  $\beta$  trzustki (157) oraz komórki mózgu (256) charakteryzują się wysokim poziomem jonów  $Zn^{2+}$ . Jony  $Zn^{2+}$  stanowią drugi po jonach  $Ca^{2+}$  przekaźnik w układzie nerwowym (159). Jony  $Zn^{2+}$  uczestniczą zarówno w procesach fizjologicznych jak i patologicznych zachodzących w różnych częściach mózgu. Jony te są niezbędne podczas procesu różnicowania się układu nerwowego. Mają wpływ na tworzenie się i pełnienie funkcji przez wiele różnych białek, hormonów oraz czynników wzrostu, które kierują proliferacją komórek oraz ich różnicowaniem (257). Dodatkowo  $Zn^{2+}$  wpływa także na układ immunologiczny, stanowiąc sygnał indukujący komórki immunologiczne oraz czynniki transkrypcyjne, które są odpowiedzialne za ekspresję cytokin. Pokazano, że niedobór jonów  $Zn^{2+}$  prowadzi do upośledzenia odpowiedzi immunologicznej wrodzonej jak i nabytej (258). Z drugiej strony, zmiany w stężeniu jonów  $Zn^{2+}$  są jednym z czynników odpowiedzialnych za powstawanie i rozwój chorób neurodegeneracyjnych (259). Nucb2 odznacza się zwiększoną ekspresją w centralnym układzie nerwowym (22) oraz komórkach  $\beta$  trzustki (36). Jony  $Zn^{2+}$  są istotne do poprawnego formowania, przechowywania, wydzielania oraz działania insuliny w komórkach  $\beta$  trzustki (260). Nucb2/nesfatyna-1 indukuje wydzielanie insuliny, co sugeruje potencjał obu białek w przeciwdziałaniu powstawaniu cukrzycy (52). Nucb2 w obecności  $Zn^{2+}$  ulega destabilizacji we fragmencie aminowym białka, co prowadzi prawdopodobnie do zmian we fragmencie karboksylowym Nucb2 i tworzenia się oligomerów/agregatów Nucb2. Jednakże wyizolowana nesfatyna-3 nie zmienia stanu oligomeryzacji w obecności jonów  $Zn^{2+}$  oraz odznacza się niższą wrażliwością na jony  $Zn^{2+}$  niż Nucb2, co wskazuje na udział fragmentu aminowego Nucb2 w indukcji oligomeryzacji oraz precypitacji.

Wytrącanie Nucb2 miało także wpływ na analizę metodą ITC. Podczas miareczkowania Nucb2 jonami  $Zn^{2+}$  obserwowano dwa procesy: egzotermiczny oraz endotermiczny. W zależności od stężenia jonów  $Zn^{2+}$  jeden z tych procesów przeważał. Podczas miareczkowania niższym stężeniem jonów  $Zn^{2+}$  obserwowano wzrost udziału procesu egzotermicznego, po którym następował proces endotermiczny. Natomiast miareczkowanie wyższym stężeniem jonów  $Zn^{2+}$  prowadziło do przewagi procesu endotermicznego. Proces egzotermiczny jest prawdopodobnie spowodowany dimeryzacją białka w obecności jonów  $Zn^{2+}$ . Natomiast zachodzący po nim proces endotermiczny wywołany jest tworzeniem oligomerów wyższego rzędu oraz precypitacją białka. Obecność podobnych procesów egzotermicznych połączonych

z endotermicznymi zachodzącymi podczas oddziaływania białek z jonami  $Zn^{2+}$  obserwowano dla monomerów insuliny (254), białka ASR (ang. *Abscisic acid-, stress-, and ripening-induced*) z soi (261) oraz jednego z przedstawicieli roślinnych białek LEA (ang. *Late Embryogenesis Abundant*) (262). Procesy te również były związane z indukowaną przez  $Zn^{2+}$  oligomeryzacją białka (262, 263). Nucb2 wiąże dwa jony  $Zn^{2+}$  z powinowactwem rzędu mikromolarnego. Jest to powinowactwo o wiele niższe od obserwowanego dla ludzkiego homologu Nucb1, który został scharakteryzowany jako sensor jonów  $Zn^{2+}$  z  $K_d = 32$  nm (18). Różnice w wiązaniu jonów  $Zn^{2+}$  mogą wynikać z obecności tylko jednego zachowanego motywu wiążącego jony  $Zn^{2+}$  w sekwencji Nucb2. Prawdopodobnie występowanie innego motywu wiążącego drugi jon  $Zn^{2+}$  w sekwencji Nucb2 może wpływać na oddziaływanie Nucb2 z jonami  $Zn^{2+}$ . Możliwe jest też, że oba paralogi Nucb2 oraz Nucb1 mogą spełniać różne funkcje.

Co ciekawe, pomimo braku typowego motywu wiążącego jony  $Zn^{2+}$  w sekwencji nesfatyny-3, za pomocą analizy ITC potwierdzono, że nesfatyna-3 także wiąże jony  $Zn^{2+}$ . Wiązanie jonów  $Zn^{2+}$  przez nesfatynę-3 również jest opisane skomplikowaną izotermą. Nesfatyna-3 wiąże trzy jony  $Zn^{2+}$ . Pierwszy jon  $Zn^{2+}$  jest wiązany z bardzo wysokim powinowactwem ( $K_d$  rzędu nanomolarnego). Dwa kolejne jony  $Zn^{2+}$  są wiązane z niższym powinowactwem o  $K_d$  rzędu mikromolarnego. Prawdopodobnie wiązanie jonów zachodzi sekwencyjnie. Podczas procesu nie zaobserwowano precypitacji białka w obecności wyższego stężenia jonów  $Zn^{2+}$ . Wyizolowana nesfatyna-3 jest w stanie wiązać jony  $Zn^{2+}$ , pomimo braku typowego miejsca wiązania jonów  $Zn^{2+}$ . Jednakże sekwencja nesfatyny-3 charakteryzuje się występowaniem dużej ilości kwasowych reszt aminokwasowych (Asp, Glu) oraz reszt His, które mogą uczestniczyć w wiązaniu jonów  $Zn^{2+}$ . Możemy wyróżnić następujące typowe motywy wiążące jony  $Zn^{2+}$ : 2Cys-2His, 4Cys, Asp-3His, 3Cys-His oraz 2Asp-2Glu (148, 149). Bardzo niska stała wiązania (rzędu nanomoli) dla pierwszego miejsca wiązania jonów  $Zn^{2+}$  może świadczyć o wiązaniu tego jonu przez reszty His, które obok reszt Cys wykazują największe powinowactwo w stosunku do jonów  $Zn^{2+}$  w warunkach fizjologicznych (264). W wiązaniu dwóch pozostałych jonów  $Zn^{2+}$  prawdopodobnie biorą udział reszty Asp oraz/lub Glu.

Powyżej przedstawione wyniki pokazują silny wpływ jonów  $Zn^{2+}$  na strukturę Nucb2 oraz nesfatyny-3. Pod wpływem jonów  $Zn^{2+}$  dochodzi do destabilizacji Nucb2 w obrębie fragmentu aminowego, co prowadzi do kompaktowania się, oligomeryzacji i precypitacji białka. Powstające oligomery/agregaty białka mogą mieć zarówno funkcję fizjologiczną jak i patologiczną. Dodatkowo wyniki zaprezentowane dla nesfatyny-3 pozwalają przypuszczać, że za zachowanie Nucb2 w obecności jonów  $Zn^{2+}$  (tj. oligomeryzację oraz precypitację) odpowiada

fragment aminowy Nucb2 (nesfatyna-1 oraz nesfatyna-2). Badania przeprowadzone na homologue ludzkim Nucb2 pokazały, że za precypitację białka w obecności jonów  $Zn^{2+}$  odpowiada nesfatyna-2 (265). Cząsteczka nesfatyny-3 wiążąc trzy jony  $Zn^{2+}$  ulega kompaktowaniu. Prawdopodobnie oddzielenie nesfatyny-1 oraz -2 od nesfatyny-3 pozwoliło na odsłonięcie, do tej pory ukrytych miejsc wiązania  $Zn^{2+}$  w sekwencji nesfatyny-3. Wysokie powinowactwo białka do jonów  $Zn^{2+}$  sugeruje, że nesfatyna-3 może stanowić białkowy sensor jonów  $Zn^{2+}$ . Nucb2 oraz nesfatyna-3 pod wpływem jonów  $Zn^{2+}$  ulegają zmianie strukturalnej, która prawdopodobnie ułatwia im udział w różnych procesach molekularnych.

## 5.5 ODDZIAŁYWANIE Z JONAMI MAGNEZU

Jony  $Mg^{2+}$  są najbardziej rozpowszechnionymi jonami metali dwuwartościowych znajdującymi się w komórkach. Domeny dłoni EF mogą wiązać zarówno jony  $Ca^{2+}$  jak i jony  $Mg^{2+}$  (9). Dlatego kolejny etap prac dotyczył zbadania czy i w jaki sposób jony  $Mg^{2+}$  wpływają na strukturę obu białek. Na początku przeprowadzono analizę ITC w celu sprawdzenia termodynamiki oddziaływań obu białek z jonami  $Mg^{2+}$ . Analizy ITC Nucb2 w obecności jonów  $Mg^{2+}$ , podobnie jak w obecności pozostałych badanych jonów były bardziej skomplikowane. Pomimo, że obserwowany efekt cieplny wiązania jonów  $Mg^{2+}$  przez Nucb2 był na bardzo niskim poziomie, zbliżonym do efektu cieplnego buforu, udało się wyznaczyć parametry wiązania. Nucb2 wiąże jeden jon  $Mg^{2+}$  z wysokim jak na jony  $Mg^{2+}$  powinowactwem (rzędu mikromolarnego).  $Mg^{2+}$  wiąże się słabiej z białkami oraz enzymami od pozostałych badanych jonów ( $K_a \leq 10^5 M^{-1}$ ) (139). Pokazano, że nesfatyna-3 wiąże dwa jony  $Mg^{2+}$  z takim samym dość wysokim powinowactwem (rzędu mikromolarnego). Prawdopodobnie jony  $Mg^{2+}$  są wiązane przez domeny dłoni EF nesfatyny-3. Na podstawie przedstawionych w pracy wyników badań możemy przypuszczać, że na wiązanie jonów  $Mg^{2+}$  przez białko Nucb2 ma wpływ koniec aminowy białka. Prawdopodobnie fragment aminowy swoim ułożeniem blokuje jedno z miejsc wiązania jonów  $Mg^{2+}$  obecnych w nesfatynie-3. Możliwe jest również, że do wiązania w białku pełnej długości dochodzi w zupełnie innym miejscu niż fragment karboksylowy, a nesfatyna-3 dopiero po oddzieleniu się od białka na drodze proteolitycznej konwersji jest w stanie wiązać jony  $Mg^{2+}$ . Wyniki analizy CD, limitowanej proteolizy oraz fluorescencji pokazały, że obecność jonów  $Mg^{2+}$  nie zmienia struktury drugo- oraz trzecio-rzędowej Nucb2. Analiza HDX-MS potwierdziła, że jony  $Mg^{2+}$  nie indukują zmian dynamiki strukturalnej w cząsteczce Nucb2. Z drugiej strony, analiza CD pokazała, że nesfatyna-3 ulega kompaktowaniu w obecności jonów  $Mg^{2+}$ . Wpływ jonów  $Mg^{2+}$  jest jednak mniejszy niż dwóch pozostałych badanych jonów. Zmniejszenia się wartości  $f/f_0$  oraz  $R_g$  białka w obecności jonów  $Mg^{2+}$  obserwowane podczas

analiz SV-AUC oraz SAXS również sugeruje kompaktowanie się nesfatyny-3. Zarówno Nucb2 jak i nesfatyna-3 ulegają dimeryzacji indukowanej przez jony  $Mg^{2+}$ . Zmiany stanu oligomeryzacji po dodaniu jonów  $Mg^{2+}$  były także widoczne podczas eksperymentu ITC z udziałem obu białek. Dimeryzacja białek Nucb2 oraz nesfatyny-3 może zachodzić z udziałem domen dłoni EF oraz/lub ZIP. Warto dodać, że jony  $Mg^{2+}$  stanowią istotny kofaktor dla wielu enzymów. Jony  $Mg^{2+}$  są niezbędne dla prawidłowej struktury oraz funkcji białek biorących udział w replikacji, transkrypcji oraz translacji informacji genetycznej (266). Na podstawie budowy Nucb2, można przypuszczać, że może ono stanowić czynnik transkrypcyjny o niestandardowym mechanizmie wiązania DNA (Rozdział 1.1.3). ZIP obecny w czynnikach transkrypcyjnych pośredniczy w dimeryzacji białek oraz wiązaniu DNA (19). Wiązanie się jonów  $Mg^{2+}$  oraz zachodząca dimeryzacja Nucb2 oraz nesfatyny-3 mogą wpływać na wiązanie się DNA do obu białek. Podobną stabilizację białka pod wpływem jonów  $Mg^{2+}$  oraz wpływ na wiązanie się DNA obserwowano dla białka p53 (267). Jony  $Mg^{2+}$  są kluczowe także dla procesów neurologicznych oraz przekazywania neurotransmiterów (140). Zmiana strukturalna Nucb2 pod wpływem jonów  $Mg^{2+}$  może mieć również wpływ na procesy zachodzące z udziałem białka w centralnym układzie nerwowym. Jednakże wpływ jonów  $Mg^{2+}$  na funkcję Nucb2 oraz nesfatyny-3 wymaga dalszych badań.

Jony  $Mg^{2+}$  w odróżnieniu do pozostałych badanych jonów metali dwuwartościowych, wpływają w nieznaczny sposób na strukturę Nucb2 oraz nesfatyny-3. Jednak, w obecności jonów  $Mg^{2+}$  dochodzi do stabilizacji frakcji oligomerycznej obu białek. Prawdopodobnie przesunięcie równowagi w stronę formy dimerycznej Nucb2 oraz nesfatyny-3 w obecności jonów  $Mg^{2+}$  może być istotne dla pełnienia funkcji przez białka. Na szczególną uwagę zasługuje również różnica w stechiometrii wiązania jonów  $Mg^{2+}$  przez oba białka. Może ona wynikać z ułożenia fragmentu aminowego Nucb2, które blokuje jedno z miejsc wiązania  $Mg^{2+}$  obecne w nesfatynie-3. Ponadto, możliwe jest występowanie różnych miejsc wiązania jonów  $Mg^{2+}$  w sekwencji Nucb2 oraz nesfatyny-3.

## 5.6 AKTYWNOŚĆ BIOMINERALIZACYJNA BIAŁKA NUCB2

Nucb2 z *Gallus gallus* zostało zidentyfikowane jako białko związane z warstwą mamilliarną skorupy jaja kurzego (118), co może świadczyć o udziale tego białka w procesie biomineralizacji. Ponadto, badania *in vivo* pokazały, że ludzki homolog Nucb2 bierze udział w indukcji różnicowania się osteoblastów oraz hamowaniu tworzenia osteoklastów (121). Przedstawione w rozprawie wyniki pokazały, że Nucb2 jest IDP wiążącym jony  $Ca^{2+}$ , co również wskazuje na

jego możliwy udział w procesie biomineralizacji. Z tego powodu postanowiono wstępnie zbadać wpływ Nucb2 na proces biomineralizacji węglanu wapnia *in vitro*. Wykonano testy biomineralizacji węglanu wapnia metodą powolnej dyfuzji dla różnych stężeń Nucb2. Niższe stężenie Nucb2 (0-10 µg/ml) nie wpływa na proces biomineralizacji węglanu wapnia. Natomiast, analizy SEM oraz widm Ramana pokazały, że obecność 25 – 100 µg/ml Nucb2 prowadzi do powstania kryształów kalcytu o charakterystycznych wygładzonych krawędziach, różnych od romboedrycznych kryształów otrzymanych w nieobecności białka. Ponadto, obserwowano zwiększenie ilości kryształów wraz ze wzrostem stężenia Nucb2 co sugeruje, że białko może wpływać na proces nukleacji biominerałów. Najprawdopodobniej duży ładunek Nucb2 oraz jego zdolność do wiązania jonów  $Ca^{2+}$  powodują wzrost lokalnego stężenia jonów, co może sprzyjać procesowi nukleacji. Dodatkowo wraz ze wzrostem stężenia obserwowano zmniejszenie się rozmiaru otrzymywanych kryształów kalcytu, co świadczy o roli Nucb2 w hamowaniu wzrostu kryształów. Jednakże mechanizm inhibicji wzrostu kryształów przez białka nie został do tej pory poznany. Podobne zmiany w morfologii, rozmiarze oraz ilości kryształów obserwowano w przypadku IDPs wiążących jony  $Ca^{2+}$  m.in. białka Starmaker-like (192), fragmentów ludzkiego białka macierzy zębiny (DMP-1, ang. *dentin matrix protein 1*) (268), oraz globularnego białka mysiej otokoniny-90 (269). Białka te podobnie jak Nucb2 charakteryzują się wysokim udziałem reszt aminokwasowych o charakterze kwasowym oraz są związane z procesem biomineralizacji węglanu wapnia. Prawdopodobnie Nucb2 podobnie jak pozostałe wymienione powyżej białka może wpływać na proces biomineralizacji węglanu wapnia.

## 6 PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY DALSZYCH BADAŃ

Przedstawione w niniejszej pracy analizy pozwoliły na kompleksową charakterystykę molekularną Nucb2 oraz nesfatyny-3 z *Gallus gallus*. Nucb2 jak i nesfatyna-3 należą do rodziny białek częściowo nieuporządkowanych. Moje badania pokazały, że oba białka mają tendencję do strukturyzacji w obecności badanych jonów metali. Modulacja struktury obu białek przez jony  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  oraz  $Zn^{2+}$  prawdopodobnie pozwala na adaptację białek do roli w różnych procesach fizjologicznych, zależną od stężenia tych jonów oraz obecności białek w różnych przedziałach komórkowych/tkankach. Oba białka prawdopodobnie mogą spełniać funkcję białkowych sensorów  $Ca^{2+}$ , oddziałując z różnymi partnerami białkowymi. Przedstawiony w pracy udział Nucb2 w procesie biomineralizacji także jest związany z jego zdolnością do wiązania jonów  $Ca^{2+}$ . Jony  $Mg^{2+}$ , indukując dimeryzację białek, mogą wpływać na oddziaływanie badanych białek z DNA. Na szczególną uwagę zasługuje różne zachowanie obu białek w obecności jonów

$Zn^{2+}$ . Białko Nucb2 tworzy oligomery wyższego rzędu oraz wytrąca się w roztworze w obecności 0,3 mM  $ZnCl_2$ . Natomiast izolowana nesfatyna-3 jest mniej wrażliwa na jony  $Zn^{2+}$ . Dodatkowo analiza wyników ITC pokazała, że nesfatyna-3 wiąże 3 jony  $Zn^{2+}$ , z czego pierwszy jon  $Zn^{2+}$  jest wiązany z bardzo niskim wartością  $K_d$  (nanomolarną), co sugeruje że białko to może brać udział w procesach związanych z jonami  $Zn^{2+}$ . Jest to szczególnie istotny wynik ze względu na brak wcześniejszych przesłanek co do wiązania jonów  $Zn^{2+}$  przez nesfatynę-3, będącą częścią Nucb2, tj. połączoną w jednym łańcuchu polipeptydowym z nesfatyną-1 oraz nesfatyną-2. Co ważne, w literaturze nie ma prac opisujących rolę nesfatyny-3. Opisane wyniki pozwalają na ukształtowanie kierunków dalszych badań, które skupią się na poszukiwaniu funkcji Nucb2 oraz nesfatyny, związanych z jonami metali.

Zarówno Nucb2 jak i produkty proteolitycznej konwersji białka - nesfatyny stanowią istotny obiekt badawczy biorąc pod uwagę udział Nucb2/nesfatyny-1 w wielu procesach fizjologicznych oraz jego szeroką ekspresję w licznych tkankach. Ważną kwestią wydaje się charakterystyka strukturalna nesfatyny-1 oraz nesfatyny-2, w szczególności, biorąc pod uwagę oddziaływanie obu białek z jonami  $Zn^{2+}$ . Należy sprawdzić czy izolowane nesfatyny-1 oraz -2 ulegają oligomeryzacji/precypitacji w obecności jonów  $Zn^{2+}$  w większym stopniu niż Nucb2 oraz czy tworzące się agregaty/oligomery Nucb2/nesfatyny-1/2 mogą spełniać funkcję fizjologiczne lub/oraz patologiczne. Dalsze analizy powinny skupić się także na sprawdzeniu czy izolowany fragment aminowy Nucb2 wykazuje zdolność do wiązania jonów  $Mg^{2+}$ . Pozwoli to określić wpływ fragmentu aminowego białka Nucb2 na wiązanie jonów  $Mg^{2+}$  przez białko Nucb2. Ponadto, kolejny etapy badań powinien być poświęcony określeniu miejsc wiązania jonów  $Zn^{2+}$  obecnych w sekwencji nesfatyny-3, co pozwoli na dokładniejsze zbadanie interakcji tego białka z jonami.

Interesujące wydaje się także kontynuowanie badań skupiających się na udziale tej grupy białek w procesie biomineralizacji. W tym celu, istotne są opracowanie oraz optymalizacja procesu biomineralizacji węglanu wapnia w obecności izolowanych nesfatyn oraz określenie lokalizacji znakowanych fluorescencyjnie białek w otrzymanych kryształach. Dodatkowo występujące w białkach modyfikacje potranslacyjne, jak np. fosforylacja mogą wpływać na zwiększenie aktywności białek w procesie biomineralizacji *in vitro* (116). Analiza serwerem NetPhos – 3.1 (270, 271) pokazała, że w sekwencji białka znajduje się 22 potencjalne miejsca ulegające fosforylacji w tym 9 Ser, 11 Thr oraz 2 Tyr (Rys. 6.1). Przyszłe badania mogą się skupić na zbadaniu wpływu ufosforylowanego Nucb2 na proces biomineralizacji węglanu wapnia.



GPELVPIIDDKTKVKGEGHVEGEKIENPDTGLYYDEYLRQVIDVLETDKH	#	50
FREKLQTADIEEIKSGKLSRELDLVSHHVRTRLDELKRQEVARLRMLIKA	#	100
KMDSVQDTGIDHQALLKQFEHLNHQNPDTFEPKDLDMLIKAATSLENYD	#	150
KTRHEEFKKYEMMKEHERREYLKTLDEEKRQREESKFGEMKKKHGDHPKV	#	200
HHPGSKDQLKEVWEEADGLDPNEFDPKTFFKLHDVNNDRFLDEQELEALF	#	250
TKELEKVYDPKNEEDMVEEMEEERLRMREHVMNEVDINKDRLVTLEEF LR	#	300
ATEKKEFLEPDSWETLDQQQLFTEDELKEFESHISQQEDELRRKAEELQK	#	350
QKEELQRQHDQLQAQEQELQQVVKQMEQKLLQANPPAGPAGELKFQPPG	#	400
EHKIEEAPKHPAGGDQPLPPGHIQEPAARTDQVHP	#	450
.....T..Y.....T...	#	50
.....T.....S...S.....S.....	#	100
...S.....TS.....	#	150
.T.....Y.....T.....S.....	#	200
....S.....T.....	#	250
.....T.....	#	300
.T.....S..T.....T.....S.....	#	350
.....	#	400
.....		

**Rysunek 6.1** Potencjalne miejsca fosforylacji znajdujące się w sekwencji Nucb2 wyznaczone za pomocą serwera NetPhos – 3.1

Na górze rysunku znajduje się sekwencja Nucb2. Na dole rysunku znajdują się reszty aminokwasowe dla których wynik przewidywania jest większy od 0,5 (prawdopodobnie ufosforylowane), natomiast kropką oznaczono reszty, których wartość wyniku przewidywania jest poniżej linii progu.

## 7 DOROBEK NAUKOWY

### 7.1 PUBLIKACJE INDEKSOWANE W BAZIE WEB OF SCIENCE

D. Bystranowska, **A. Skorupska**, K. Sołtys, M. Padjasek, A. Krężel, A. Żak, M. Kaus-Drobek, M. Taube, M. Kozak, A. Ożyhar, 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. **IF=7,271**

**A. Skorupska**, R. Lenda, A. Ożyhar, D. Bystranowska. The Multifaceted Nature of Nucleobindin-2 in Carcinogenesis. International Journal of Molecular Sciences. 2021, 22. **IF=5,923**

**A. Skorupska**, D. Bystranowska, K. Dąbrowska, A. Ożyhar, Calcium ions modulate the structure of the intrinsically disordered Nucleobindin-2 protein. International Journal of Biological Macromolecules. 2020,154. **IF=5.162**

**A. Skorupska**, A. Ożyhar, D. Bystranowska. The physiological role of nucleobindin-2/nesfatin-1 and their potential clinical significance. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2018, 72. **IF=1.106**

### 7.2 ROZDZIAŁY W KSIĄŻKACH

**A. Skorupska**, A. Mościszko, D. Bystranowska, Otrzymanie rekombinowanych wektorów umożliwiających ekspresję w komórkach bakteryjnych białka Nucleobindin-2 z *Gallus gallus*. Prace Naukowe Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Prace Badawcze Studentów. 2017, z. 15, s. 87-93.

A. Mościszko, **A. Skorupska**, D. Bystranowska, Otrzymanie rekombinowanych wektorów umożliwiających ekspresję i oczyszczenie ludzkiego białka Nucleobindin-2. Prace Naukowe Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Prace Badawcze Studentów. 2017, z. 15, s. 55-61.

### 7.3 KONFERENCJE MIĘDZYNARODOWE

**A. Skorupska**, M. Kaus-Drobek, A. Ożyhar, D. Bystranowska, The Zn<sup>2+</sup>-dependent change of Nucleobindin-2 structure. FEBS 2021, doniesienie w formie plakatu

**A. Skorupska**, A.M. Żak, A. Ożyhar, D. Bystranowska, Zinc-dependent oligomerization propensity of Nucleobindin-2 from *Gallus gallus*. ChemBiotIC, Chemistry & Biotechnology International Conference, Wrocław, 2021, doniesienie w formie plakatu

**A. Skorupska**, A. Ożyhar, D. Bystranowska, The structure of Nucleobindin-2 is regulated by divalent metal cations. 4<sup>th</sup> International Wrocław Scientific Meetings, Wrocław, 2020, wystąpienie ustne

**A. Skorupska**, A. Ożyhar, D. Bystranowska, The effect of metal ions binding on the structure of Nucleobindin-2 from *Gallus gallus* and *Homo sapiens*. 3rd Wroclaw Scientific Meetings, Wrocław, 2019, doniesienie w formie plakatu

**A. Skorupska**, K. Dąbrowska, A. Ożyhar, D. Bystranowska, Intrinsic disorder of the C-terminus of nucleobindin-2 from *Gallus gallus*. FEBS 2019, doniesienie w formie plakatu

**A. Skorupska**, A. Ożyhar, D. Bystranowska, Initial biochemical and structural characterization of Nucleobindin-2 from *Homo sapiens* and *Gallus gallus*. Biomolecules and Nanostructures 7, 15-19 May 2019, Pomlewo koło Gdańska, Polska, doniesienie w formie plakatu

#### 7.4 KONFERENCJE KRAJOWE

**A. Skorupska**, A. Ożyhar, D. Bystranowska, Wpływ jonów  $Zn^{2+}$  na strukturę Nukleobindyny-2. Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2021, Lublin, 2021, doniesienie w formie plakatu

**A. Skorupska**, M. Padjasek, A. Krężel, A. Ożyhar, D. Bystranowska, Nucleobindin-2 is a  $Ca^{2+}$  ions sensor. PANIC 2020 : PhoBiA Annual Nanophotonics International Conference, 2020, Wrocław, doniesienie w formie plakatu

**A. Skorupska**, A. Nowak, A. Ożyhar, D. Bystranowska, Preparation of recombinant vectors used for expression and purification of *Gallus gallus* Nucleobindin-2 protein and products of its proteolytic cleavage. 2nd Wroclaw Scientific Meetings, Wrocław, 2018, doniesienie w formie plakatu

**A. Skorupska**, A. Ożyhar, D. Bystranowska, The initial purification of Nucleobindin-2 protein from *Gallus gallus domesticus*. Konferencja Młodych Naukowców "Ko-oper field 2018", Szklarska Poręba, 2016, wystąpienie ustne.

**A. Skorupska**, D. Bystranowska, Preparation of recombinant vectors to aid in carrying out expression and purification of *Gallus gallus* Nucleobindin-2 protein. Konferencja Młodych Naukowców "Ko-oper field 2018", Szklarska Poręba, 2017, wystąpienie ustne.

#### 7.5 STAŻE, SZKOLENIA, WARSZTATY

09-11.2021 **Protein Structure Dynamics, Central European Institute of Technology**, Brno, Czechy.

Staż obejmował przygotowanie białka podwójnie znakowanego do pomiarów NMR oraz pomiary TROSY NMR

25.06.2021 **Microscale Thermophoresis Seminar & Remote Workshop**, NanoTemper Technologies

21.03.2019 Szkolenie z podstaw **cytometrii przepływowej** z wykorzystaniem rozwiązań Sysmex Partec.

## 7.6 AKTYWNOŚĆ ORGANIZACYJNA

Pomysłodawczyni i organizatorka międzynarodowej konferencji Chemisty & Biotechnology International Conference (ChemBiotIC), 2021, Wrocław.

## 8 SPIS TABEL

Tabela 1.1 Sekwencja aminokwasowa pętli dwóch domen dłoni EF białka Nucb2.....	14
Tabela 1.2 Podsumowanie udziału Nucb2/nesfatyny-1 w procesach fizjologicznych różnych tkanek i narządów.....	19
Tabela 3.1 Spis odczynników wykorzystywanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej.....	33
Tabela 3.2 Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych podczas procesu klonowania.....	37
Tabela 3.3 Charakterystyka wykorzystanych szczepów E. coli .....	37
Tabela 3.4 Skład użytych podłoży hodowlanych .....	38
Tabela 3.5 Skład roztworów użytych podczas oczyszczania plazmidowego DNA .....	39
Tabela 3.6 Skład roztworów użytych podczas elektroforezy w żelu agarozowym .....	39
Tabela 3.7 Składy użytych żeli poliakrylamidowych .....	40
Tabela 3.8 Składy buforów użytych do SDS-PAGE .....	40
Tabela 3.9 Składy buforów wykorzystywanych podczas analizy Western blot .....	40
Tabela 3.10 Skład roztworów użytych do barwienia żeli poliakrylamidowych.....	41
Tabela 3.11 Składy buforów wykorzystywanych podczas preparacji Nucb2.....	41
Tabela 3.12 Składy buforów wykorzystywanych podczas preparacji nesfatyny-3 .....	41
Tabela 3.13 Składy buforów wykorzystywanych podczas chromatografii odwróconych faz.....	42
Tabela 3.14 Skład buforu „stop” .....	42
Tabela 3.15 Techniki wykorzystywane podczas pracy z DNA .....	43
Tabela 3.16 Techniki wykorzystywane podczas pracy z białkami.....	43
Tabela 4.1 Zawartość struktury drugorzędowej Nucb2 w nieobecności oraz obecności $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ , $Mg^{2+}$ .....	64
Tabela 4.2 Zawartość struktury drugorzędowej nesfatyny-3 w nieobecności oraz obecności $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ .....	66
Tabela 4.3 Właściwości hydrodynamiczne Nucb2 w obecności badanych jonów metali wyznaczone na podstawie danych z SV-AUC. ....	79
<b>Tabela 4.4 Właściwości hydrodynamiczne nesfatyny-3 w obecności badanych jonów metali.....</b>	<b>82</b>
Tabela 4.5 Parametry termodynamiczne oddziaływania Nucb2 z jonami $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ .....	85
Tabela 4.6 Parametry termodynamiczne oddziaływania nesfatyny-3 z jonami $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ .....	88
Tabela 4.7 Parametry strukturalne Nucb2 ( $R_g$ , $D_{max}$ oraz $MW_{app}$ ) w nieobecności oraz obecności jonów metali wyznaczone z danych SAXS.....	90
Tabela 4.8 Parametry strukturalne nesfatyny-3 ( $R_g$ , $D_{max}$ oraz $MW_{app}$ ) w nieobecności oraz obecności jonów metali wyznaczone z danych SAXS.....	92

## 9 SPIS RYSUNKÓW

Rysunek 1.1 Wielodomenowa budowa Nucb2 .....	13
Rysunek 1.2 Budowa domeny dłoni EF znajdującej się w fragmencie aminowym kalmoduliny z Gallus gallus.....	14
Rysunek 1.3 Model bZIP związanego z cząsteczką dsDNA .....	16
Rysunek 1.4 Stany konformacyjne białka.....	23
Rysunek 1.5 Odmiany polimorficzne węglanu wapnia .....	26
Rysunek 1.6 Schematyczny przekrój poprzeczny przez skorupę jaja kurzego .....	28
Rysunek 3.1 Mapa wektora pQE-80L_HRV3C .....	36
Rysunek 4.1 Elektroforeza analityczna PCR kolonijnego wybranych klonów poligacyjnych .....	55
Rysunek 4.2 Oczyszczanie Nucb2 .....	57
Rysunek 4.3 Widmo masowe Q-TOF białka Nucb2 .....	57
Rysunek 4.4 Oczyszczanie nesfatyny-3.....	59
Rysunek 4.5 Widmo masowe Q-TOF białka nesfatyny-3 .....	59
Rysunek 4.6 Analizy in silico sekwencji Nucb2.....	60
Rysunek 4.7 Wpływ jonów $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ na strukturę drugorzędową Nucb2 .....	64
Rysunek 4.8 Wpływ jonów $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ na strukturę drugorzędową nesfatyny-3.....	66
Rysunek 4.9 Zmiany wewnętrznej fluorescencji Nucb2 w obecności jonów $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ .....	68
Rysunek 4.10 Zmiany wewnętrznej fluorescencji białka nesfatyny-3 w obecności jonów $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ .....	69
Rysunek 4.11 Analiza SDS-PAGE produktów limitowanej proteolizy Nucb2 w różnych odstępach czasowych (0-240 min).....	71
Rysunek 4.12 Analiza SDS-PAGE trawienia Nucb2 przez proteazę GluV8 w obecności różnych stężeń jonów metali.....	72
Rysunek 4.13 Analiza SDS-PAGE produktów trawienia nesfatyny-3 w różnych odstępach czasowych (0- 240 min) .....	73
Rysunek 4.14 Analiza SDS-PAGE trawienia nesfatyny-3 przez proteazę GluV8 w obecności różnych stężeń jonów metali .....	74
Rysunek 4.15 Procent deuteracji w peptydach Nucb2 w obecności 5 mM EDTA, 10 mM $Ca^{2+}$ , 0,1 mM $Zn^{2+}$ oraz 10 mM $Mg^{2+}$ .....	76
Rysunek 4.16 Analiza struktury czwartorzędowej Nucb2 w obecności jonów metali za pomocą SV- AUC .....	78
Rysunek 4.17 Analiza struktury czwartorzędowej Nucb2 w obecności jonów metali za pomocą SV- AUC .....	78
Rysunek 4.18 Analiza struktury czwartorzędowej nesfatyny-3 w obecności jonów metali za pomocą SV- AUC.....	81
Rysunek 4.19 Analiza ITC wiązania jonów $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ przez Nucb2.....	83
Rysunek 4.20 Profil ITC wiązania jonów $Zn^{2+}$ przez Nucb2.....	86
Rysunek 4.21 Analiza ITC wiązania jonów $Ca^{2+}$ , $Zn^{2+}$ oraz $Mg^{2+}$ przez nesfatynę-3 .....	87
Rysunek 4.22 Analiza SAXS Nucb2.....	90
Rysunek 4.23 Analiza SAXS nesfatyny-3 .....	92
Rysunek 4.24 Morfologia oligomerów Nucb2 tworzonych w obecności 0,3 mM $ZnCl_2$ .....	93
Rysunek 4.25 Reprezentacyjne obrazy TEM agregatów Nucb2 w obecności 5 mM EDTA, 10 mM $CaCl_2$ , 10 mM $MgCl_2$ oraz 0,3 mM $ZnCl_2$ otrzymane w ciągu 0-14 dni.....	94
Rysunek 4.26 Obrazy SEM kryształów węglanu wapnia otrzymanych w ciągu 24 h w nieobecności oraz obecności wzrastającego stężenia Nucb2 .....	95

Rysunek 4.27 Wpływ Nucb2 na liczbę kryształów węglanu wapnia .....	96
Rysunek 4.28 Wpływ Nucb2 na rozmiar kryształów węglanu wapnia.....	97
Rysunek 4.29 Widma Ramana otrzymane dla poszczególnych odmian polimorficznych węglanu wapnia obecnych w próbce kontrolnej .....	98
Rysunek 4.30 Aktywność biomineralizacyjna Nucb2 .....	99
Rysunek 6.1 Potencjalne miejsca fosforylacji znajdujące się w sekwencji Nucb2 wyznaczone za pomocą serwera NetPhos – 3.1 .....	113

## 10 LITERATURA

1. K. Miura, K. Titani, Y. Kurosawa, Y. Kanai, Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 375–380 (1992).
2. S. Barnikol-Watanabe, N. A. Gross, H. Gotz, T. Henkel, A. Karabinos, H. Kratzin, H. U. Barnikol, N. Hilschmann, 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. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* **375**, 497–512 (1994).
3. K. Miura, Y. Kurosawa, Y. Kanai, Calcium-binding activity of nucleobindin mediated by an EF hand moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1388–1393 (1994).
4. S. Oh-I, H. Shimizu, T. Satoh, S. Okada, S. Adachi, K. Inoue, H. Eguchi, M. Yamamoto, T. Imaki, K. Hashimoto, T. Tsuchiya, T. Monden, K. Horiguchi, M. Yamada, M. Mori, Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* (2006), doi:10.1038/nature05162.
5. A. Stengel, Nesfatin-1 - More than a food intake regulatory peptide. *Peptides.* **72**, 175–183 (2015).
6. Y. Maejima, U. Sedbazar, S. Suyama, D. Kohno, T. Onaka, E. Takano, N. Yoshida, M. Koike, Y. Uchiyama, K. Fujiwara, T. Yashiro, T. L. Horvath, M. O. Dietrich, S. Tanaka, K. Dezaki, K. Hashimoto, H. Shimizu, M. Nakata, M. Mori, T. Yada, Nesfatin-1-Regulated Oxytocinergic Signaling in the Paraventricular Nucleus Causes Anorexia through a Leptin-Independent Melanocortin Pathway. *Cell Metab.* (2009), doi:10.1016/j.cmet.2009.09.002.
7. C. J. Price, W. K. Samson, A. V. Ferguson, Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res.* (2008), doi:10.1016/j.brainres.2008.06.084.
8. H. Shimizu, S. Oh-I, K. Hashimoto, M. Nakata, S. Yamamoto, N. Yoshida, H. Eguchi, I. Kato, K. Inoue, T. Satoh, S. Okada, M. Yamada, T. Yada, M. Mori, Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology.* **150**, 662–671 (2009).
9. A. Malmendal, S. Linse, J. Evenas, S. Forsen, T. Drakenberg, Battle for the EF-hands: magnesium-calcium interference in calmodulin. *Biochemistry.* **38**, 11844–11850 (1999).
10. J. L. Gifford, M. P. Walsh, H. J. Vogel, Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. J.* **405** (2007), pp. 199–221.



11. R. H. Kretsinger, C. E. Nockolds, Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J. Biol. Chem.* **248**, 3313–3326 (1973).
12. N. C. Strynadka, M. N. James, Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 951–998 (1989).
13. J. J. Falke, S. K. Drake, A. L. Hazard, O. B. Peersen, Molecular tuning of ion binding to calcium signaling proteins. *Q. Rev. Biophys.* **27**, 219–290 (1994).
14. A. Godzik, C. Sander, Conservation of residue interactions in a family of ca-binding proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* (1989), doi:10.1093/protein/2.8.589.
15. A. P. Yamniuk, L. T. Nguyen, T. T. Hoang, H. J. Vogel, Metal ion binding properties and conformational states of calcium- and integrin-binding protein. *Biochemistry.* **43**, 2558–2568 (2004).
16. E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin, UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
17. B. Rupp, D. R. Marshak, S. Parkin, Crystallization and preliminary X-ray analysis of two new crystal forms of calmodulin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **52**, 411–413 (1996).
18. M. Kanuru, R. Raman, G. K. Aradhyam, Serine protease activity of calnuc: regulation by Zn<sup>2+</sup> and G proteins. *J. Biol. Chem.* **288**, 1762–1773 (2013).
19. W. H. Landschulz, P. F. Johnson, S. L. McKnight, The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science.* **240**, 1759–1764 (1988).
20. T. Hakoshima, Leucine zippers. *Encycl. LIFE Sci. John Wiley Sons, Ltd* (2005).
21. Y. Fujii, T. Shimizu, T. Toda, M. Yanagida, T. Hakoshima, Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 889–893 (2000).
22. K. S. Foo, H. Brismar, C. Broberger, Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience.* **156**, 563–579 (2008).
23. W. Pan, H. Hsuchou, A. J. Kastin, Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides.* **28**, 2223–2228 (2007).
24. A. Stengel, M. Goebel-Stengel, J. Jawien, P. Kobelt, Y. Taché, N. W. G. Lambrecht, Lipopolysaccharide increases gastric and circulating NUCB2/nesfatin-1 concentrations in rats.

- Peptides*. **32**, 1942–1947 (2011).
25. B. Okere, L. Xu, E. W. Roubos, D. Sonetti, T. Kozicz, Restraint stress alters the secretory activity of neurons co-expressing urocortin-1, cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and nesfatin-1 in the mouse Edinger–Westphal nucleus. *Brain Res.* **1317**, 92–99 (2010).
  26. J. F. Ge, Y. Y. Xu, G. Qin, X. Y. Pan, J. Q. Cheng, F. H. Chen, Nesfatin-1, a potent anorexic agent, decreases exploration and induces anxiety-like behavior in rats without altering learning or memory. *Brain Res.* **1629**, 171–181 (2015).
  27. Y. Wei, J. Li, H. Wang, G. Wang, NUCB2/nesfatin-1: Expression and functions in the regulation of emotion and stress. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* **81**, 221–227 (2018).
  28. M. Emul, N. Karamustafalioglu, T. Kalelioglu, A. Genc, A. Tasdemir, F. C. Gungor, S. Incir, A. Seven, The nesfatin 1 level in male patients with manic episode and alterations of nesfatin 1 level after antipsychotic and electroconvulsive treatment. *J. Affect. Disord.* **151**, 849–853 (2013).
  29. Y. Bez, M. Ari, O. H. Ozturk, S. Oktar, Y. Can, S. Sogut, Plasma Nesfatin-1 Level May Be Associated with Disease Severity in Patients with Panic Disorder. *Klin. Psikofarmakol. Bülteni-Bulletin Clin. Psychopharmacol.* **20**, 288–292 (2010).
  30. M. Ari, O. H. Ozturk, Y. Bez, S. Oktar, D. Erduran, High plasma nesfatin-1 level in patients with major depressive disorder. *Neurobiol. Neurodegener. Disord. From Basic to Clin. Res.* **35**, 497–500 (2011).
  31. T. Angelone, E. Filice, T. Pasqua, N. Amodio, M. Galluccio, G. Montesanti, A. M. Quintieri, M. C. Cerra, Nesfatin-1 as a novel cardiac peptide: Identification, functional characterization, and protection against ischemia/reperfusion injury. *Cell. Mol. Life Sci.* (2013), doi:10.1007/s00018-012-1138-7.
  32. S. Imbrogno, T. Angelone, M. C. Cerra, Nesfatin-1 and the Cardiovascular System: Central and Pheripheral Actions and Cardioprotection. *Curr. Drug Targets.* **16**, 877–883 (2015).
  33. A. Q. Zhang, X. L. Li, C. Y. Jiang, L. Lin, R. H. Shi, J. De Chen, Y. Oomura, Expression of nesfatin-1/NUCB2 in rodent digestive system. *World J. Gastroenterol.* (2010), doi:10.3748/wjg.v16.i14.1735.
  34. D. Garcia-Galiano, R. Pineda, T. Ilhan, J. M. Castellano, F. Ruiz-Pino, M. A. Sanchez-Garrido, M. J. Vazquez, S. Sangiao-Alvarellos, A. Romero-Ruiz, L. Pinilla, C. Dieguez, F. Gaytan, M. Tena-Sempere, Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic

- peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology*. **153**, 1959–1971 (2012).
35. B. K. Tan, G. Tripathi, J. E. Brown, J. Chen, M. Ramanjaneya, S. Patel, H. S. Randeve, H. Lehnert, M. Hallschmid, W. Kern, E. W. Hillhouse, Identification of Nesfatin-1 in Human and Murine Adipose Tissue: A Novel Depot-Specific Adipokine with Increased Levels in Obesity. *Endocrinology*. **151**, 3169–3180 (2010).
  36. K. S. Foo, H. Brauner, C. G. Östenson, C. Broberger, Nucleobindin-2/nesfatin in the endocrine pancreas: Distribution and relationship to glycaemic state. *J. Endocrinol.* (2010), doi:10.1677/JOE-09-0254.
  37. A. Stengel, M. Goebel, I. Yakubov, L. Wang, D. Witcher, T. Coskun, Y. Taché, G. Sachs, N. W. G. Lambrecht, Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology* (2009), doi:10.1210/en.2008-0747.
  38. B. Kerbel, S. Unniappan, Nesfatin-1 suppresses energy intake, co-localises ghrelin in the brain and gut, and alters ghrelin, cholecystokinin and orexin mRNA expression in goldfish. *J. Neuroendocrinol.* **24**, 366–377 (2012).
  39. Z. F. Xia, D. M. Fritze, J. Y. Li, B. Chai, C. Zhang, W. Zhang, M. W. Mulholland, Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion via a central vagal mechanism in rats. *Am. J. Physiol. liver Physiol.* **303**, G570-7 (2012).
  40. A. Szlachcic, Z. Sliwowski, G. Krzysiek-Maczka, J. Majka, M. Surmiak, R. Pajdo, D. Drozdowicz, S. J. Konturek, T. Brzozowski, New satiety hormone nesfatin-1 protects gastric mucosa against stress-induced injury: Mechanistic roles of prostaglandins, nitric oxide, sensory nerves and vanilloid receptors. *Peptides*. **49**, 9–20 (2013).
  41. R. Gonzalez, A. Tiwari, S. Unniappan, Pancreatic beta cells colocalize insulin and nesfatin immunoreactivity in rodents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009), doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.104.
  42. Y. Yang, B. Zhang, M. Nakata, J. Nakae, M. Mori, T. Yada, Islet  $\beta$ -cell-produced NUCB2/nesfatin-1 maintains insulin secretion and glycemia along with suppressing UCP-2 in  $\beta$ -cells. *J. Physiol. Sci.* **69**, 733–739 (2019).
  43. M. Nakata, T. Yada, Role of NUCB2/nesfatin-1 in glucose control: diverse functions in islets, adipocytes and brain. *Curr. Pharm. Des.* **19**, 6960–6965 (2013).
  44. M. Riva, M. D. Nitert, U. Voss, R. Sathanoori, A. Lindqvist, C. Ling, N. Wierup, Nesfatin-1 stimulates glucagon and insulin secretion and beta cell NUCB2 is reduced in human type 2

- diabetic subjects. *Cell Tissue Res.* (2011), doi:10.1007/s00441-011-1268-5.
45. B. M. Kadim, E. A. Hassan, Nesfatin-1 - as a diagnosis regulatory peptide in type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes Metab. Disord.* **21**, 1369–1375 (2022).
  46. D. García-Galiano, R. Pineda, T. Ilhan, J. M. Castellano, F. Ruiz-Pino, M. A. Sánchez-Garrido, M. J. Vazquez, S. Sangiao-Alvarellos, A. Romero-Ruiz, L. Pinilla, C. Diéguez, F. Gaytán, M. Tena-Sempere, Cellular Distribution, Regulated Expression, and Functional Role of the Anorexigenic Peptide, NUCB2/Nesfatin-1, in the Testis. *Endocrinology.* **153**, 1959–1971 (2012).
  47. Kim J., Kim H., Kim S., Yang H., Cho H., Hwang S., Moon C., Yang H., Expression of Nesfatin-1/NUCB2 and its binding site in mouse testis and epididymis,. *Dev. Reprod.* **15**, 249–256 (2011).
  48. J. Kim, Y. Chung, H. Kim, E. Im, H. Lee, H. Yang, The Tissue Distribution of Nesfatin-1/NUCB2 in Mouse. *Dev. Reprod.* **18**, 301–309 (2014).
  49. Y. Chung, H. Kim, S. Seon, H. Yang, Serum Cytokine Levels are related to Nesfatin-1/NUCB2 Expression in the Implantation Sites of Spontaneous Abortion Model of CBA/j × DBA/2 Mice. *Dev. Reprod.* **21**, 35–46 (2017).
  50. J. Kim, S. Sun, D. Lee, H. Youk, H. Yang, Gonadotropin regulates NUCB2/nesfatin-1 expression in the mouse ovary and uterus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **513**, 602–607 (2019).
  51. M. Ramanjaneya, J. Chen, J. E. Brown, G. Tripathi, M. Hallschmid, S. Patel, W. Kern, E. W. Hillhouse, H. Lehnert, B. K. Tan, H. S. Randeve, Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: A novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology* (2010), doi:10.1210/en.2009-1358.
  52. Y. Yang, B. Zhang, M. Nakata, J. Nakae, M. Mori, T. Yada, Islet  $\beta$ -cell-produced NUCB2/nesfatin-1 maintains insulin secretion and glycemia along with suppressing UCP-2 in  $\beta$ -cells. *J. Physiol. Sci.* **69**, 733–739 (2019).
  53. S. Suzuki, K. Takagi, Y. Miki, Y. Onodera, J. I. Akahira, A. Ebata, T. Ishida, M. Watanabe, H. Sasano, T. Suzuki, Nucleobindin 2 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci.* (2012), doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02119.x.
  54. J. Y. Kan, M. C. Yen, J. Y. Wang, D. C. Wu, Y. J. Chiu, Y. W. Ho, P. L. Kuo, Nesfatin-1/Nucleobindin-2 enhances cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition via LKB1/AMPK/TORC1/ZEB1 pathways in colon cancer. *Oncotarget.* **7**, 31336–31349 (2016).
  55. H. Zhang, C. Qi, A. Wang, B. Yao, L. Li, Y. Wang, Y. Xu, Prognostication of prostate cancer based

- on NUCB2 protein assessment: NUCB2 in prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **32**, 77 (2013).
56. H. Zhang, C. Qi, L. Li, F. Luo, Y. Xu, Clinical significance of NUCB2 mRNA expression in prostate cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* (2013), doi:10.1186/1756-9966-32-56.
57. K. Takagi, Y. Miki, S. Tanaka, C. Hashimoto, M. Watanabe, H. Sasano, K. Ito, T. Suzuki, Nucleobindin 2 (NUCB2) in human endometrial carcinoma: a potent prognostic factor associated with cell proliferation and migration. *Endocr. J.* **63**, 287–299 (2016).
58. C. Qi, H. Ma, H.-T. Zhang, J.-D. Gao, Y. Xu, Nucleobindin 2 expression is an independent prognostic factor for clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology.* **66**, 650–7 (2015).
59. R. Tao, W. Bin Niu, P. H. Dou, S. Bin Ni, Y. P. Yu, L. C. Cai, X. Y. Wang, S. Y. Li, C. Zhang, Z. G. Luo, Nucleobindin-2 enhances the epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma. *Oncol. Lett.* **19**, 3653–3664 (2020).
60. R. Xin, D. Qu, H. Xu, D. Chen, circ\_001504 promotes the development of renal cell carcinoma by sponging microRNA-149 to increase NUCB2. *Cancer Gene Ther.* **28**, 667–678 (2021).
61. G.-M. Liu, Z.-Q. Xu, H.-S. Ma, Nesfatin-1/Nucleobindin-2 Is a Potent Prognostic Marker and Enhances Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Bladder Cancer. *Dis. Markers.* **2018**, 4272064 (2018).
62. J. Zhao, X. Yun, X. Ruan, J. Chi, Y. Yu, Y. Li, X. Zheng, M. Gao, High expression of NUCB2 promotes papillary thyroid cancer cells proliferation and invasion. *Oncol. Targets. Ther.* **12**, 1309–1318 (2019).
63. L. Ren, D. Bao, L. Wang, Q. Xu, Y. Xu, Z. Shi, Nucleobindin-2/nesfatin-1 enhances the cell proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition in gastric carcinoma. *J. Cell. Mol. Med.* (2022), doi:10.1111/jcmm.17522.
64. X. Huo, H. Wang, B. Huo, L. Wang, K. Yang, J. Wang, L. Wang, H. Wang, FTX contributes to cell proliferation and migration in lung adenocarcinoma via targeting miR-335-5p/NUCB2 axis. *Cancer Cell Int.* **20**, 89 (2020).
65. D. Zhang, J. Lin, Y. Chao, L. Zhang, L. Jin, N. Li, R. He, B. Ma, W. Zhao, C. Han, Regulation of the adaptation to ER stress by KLF4 facilitates melanoma cell metastasis via upregulating NUCB2 expression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37** (2018), doi:10.1186/s13046-018-0842-z.
66. Y. Xu, X. Pang, M. Dong, F. Wen, Y. Zhang, Nesfatin-1 inhibits ovarian epithelial carcinoma cell proliferation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2013), doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.001.

67. M. Ramanjaneya, B. K. Tan, M. Rucinski, M. Kawan, J. Hu, J. Kaur, V. H. Patel, L. K. Malendowicz, H. Komarowska, H. Lehnert, H. S. Randeve, Nesfatin-1 inhibits proliferation and enhances apoptosis of human adrenocortical H295R cells. *J. Endocrinol.* (2015), doi:10.1530/JOE-14-0496.
68. A. Islam, B. Adamik, F. I. Hawari, G. Ma, F. N. Rouhani, J. Zhang, S. J. Levine, Extracellular TNFR1 release requires the calcium-dependent formation of a nucleobindin 2-ARTS-1 complex. *J. Biol. Chem.* (2006), doi:10.1074/jbc.M509397200.
69. N. Taniguchi, H. Taniura, M. Niinobe, C. Takayama, K. Tominaga-Yoshino, A. Ogura, K. Yoshikawa, The postmitotic growth suppressor necdin interacts with a calcium-binding protein (NEFA) in neuronal cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **275**, 31674–31681 (2000).
70. M. Garcia-Marcos, P. S. Kietrsunthorn, H. Wang, P. Ghosh, M. G. Farquhar, G Protein binding sites on Calnuc (nucleobindin 1) and NUCB2 (nucleobindin 2) define a new class of G(alpha)-regulatory motifs. *J. Biol. Chem.* **286**, 28138–28149 (2011).
71. M. Lee, S. M. Beggs, D. Gildea, S. Bupp, J. Lichtenberg, N. S. Trivedi, Y. Hu, D. M. Bodine, N. P. S. Crawford, Necdin is a breast cancer metastasis suppressor that regulates the transcription of c-Myc. *Oncotarget.* **6**, 31557–31568 (2015).
72. H. Yang, P. Das, Y. Yu, W. Mao, Y. Wang, K. Baggerly, Y. Wang, R. T. Marquez, A. Bedi, J. Liu, D. Fishman, Z. Lu, R. C. J. Bast, NDN is an imprinted tumor suppressor gene that is downregulated in ovarian cancers through genetic and epigenetic mechanisms. *Oncotarget.* **7**, 3018–3032 (2016).
73. K. I. Kuwako, H. Taniura, K. Yoshikawa, Necdin-related MAGE Proteins Differentially Interact with the E2F1 Transcription Factor and the p75 Neurotrophin Receptor. *J. Biol. Chem.* (2004), doi:10.1074/jbc.M308454200.
74. P. Ghosh, M. Garcia-Marcos, M. G. Farquhar, GIV/Girdin is a rheostat that fine-tunes growth factor signals during tumor progression. *Cell Adh. Migr.* **5**, 237–248 (2011).
75. M. O'Hayre, J. Vázquez-Prado, I. Kufareva, E. W. Stawiski, T. M. Handel, S. Seshagiri, J. S. Gutkind, The emerging mutational landscape of G proteins and G-protein-coupled receptors in cancer. *Nat. Rev. Cancer* (2013), doi:10.1038/nrc3521.
76. J. Barbazan, Y. Dunkel, H. Li, U. Nitsche, K. P. Janssen, K. Messer, P. Ghosh, Prognostic Impact of Modulators of G proteins in Circulating Tumor Cells from Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Sci. Rep.* **6**, 22112 (2016).
77. V. N. Uversky, A. K. Dunker, Understanding protein non-folding. *Biochim. Biophys. Acta -*

*Proteins Proteomics* (2010), , doi:10.1016/j.bbapap.2010.01.017.

78. H. J. Dyson, P. E. Wright, Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6** (2005), pp. 197–208.
79. V. N. Uversky, in *Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins* (John Wiley & Sons, Ltd, 2010; <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470602614.ch19>), pp. 545–568.
80. R. van der Lee, M. Buljan, B. Lang, R. J. Weatheritt, G. W. Daughdrill, A. K. Dunker, M. Fuxreiter, J. Gough, J. Gsponer, D. T. Jones, P. M. Kim, R. W. Kriwacki, C. J. Oldfield, R. V Pappu, P. Tompa, V. N. Uversky, P. E. Wright, M. M. Babu, Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem. Rev.* **114**, 6589–6631 (2014).
81. V. N. Uversky, What does it mean to be natively unfolded? *Eur. J. Biochem.* **269**, 2–12 (2002).
82. X. Sun, W. T. Jones, V. N. Uversky, in *Protein Engineering*, P. Kaumaya, Ed. (IntechOpen, Rijeka, 2012; <https://doi.org/10.5772/29246>).
83. V. N. Uversky, Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Sci.* **11**, 739–756 (2002).
84. V. N. Uversky, J. R. Gillespie, A. L. Fink, Why are “natively unfolded” proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins.* **41**, 415–427 (2000).
85. Y. He, Y. Chen, S. M. Mooney, K. Rajagopalan, A. Bhargava, E. Sacho, K. Weninger, P. N. Bryan, P. Kulkarni, J. Orban, Phosphorylation-induced Conformational Ensemble Switching in an Intrinsically Disordered Cancer/Testis Antigen. *J. Biol. Chem.* **290**, 25090–25102 (2015).
86. J. M. R. Baker, R. P. Hudson, V. Kanelis, W.-Y. Choy, P. H. Thibodeau, P. J. Thomas, J. D. Forman-Kay, CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 738–745 (2007).
87. P. R. Romero, S. Zaidi, Y. Y. Fang, V. N. Uversky, P. Radivojac, C. J. Oldfield, M. S. Cortese, M. Sickmeier, T. LeGall, Z. Obradovic, A. K. Dunker, Alternative splicing in concert with protein intrinsic disorder enables increased functional diversity in multicellular organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 8390–8395 (2006).
88. V. N. Uversky, C. J. Oldfield, A. K. Dunker, Showing your ID: Intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J. Mol. Recognit.* (2005), , doi:10.1002/jmr.747.
89. V. N. Uversky, A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered

- protein involved in neurodegenerative disorders. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **21**, 211–234 (2003).
90. P. E. Wright, H. J. Dyson, Linking folding and binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2009), , doi:10.1016/j.sbi.2008.12.003.
  91. M. Fuxreiter, I. Simon, P. Friedrich, P. Tompa, Preformed structural elements feature in partner recognition by intrinsically unstructured proteins. *J. Mol. Biol.* **338**, 1015–1026 (2004).
  92. A. Mohan, C. J. Oldfield, P. Radivojac, V. Vacic, M. S. Cortese, A. K. Dunker, V. N. Uversky, Analysis of Molecular Recognition Features (MoRFs). *J. Mol. Biol.* (2006), doi:10.1016/j.jmb.2006.07.087.
  93. A. Cumberworth, G. Lamour, M. M. Babu, J. Gsponer, Promiscuity as a functional trait: intrinsically disordered regions as central players of interactomes. *Biochem. J.* **454**, 361–369 (2013).
  94. R. J. Weatheritt, T. J. Gibson, Linear motifs: Lost in (pre)translation. *Trends Biochem. Sci.* (2012), , doi:10.1016/j.tibs.2012.05.001.
  95. N. E. Davey, K. Van Roey, R. J. Weatheritt, G. Toedt, B. Uyar, B. Altenberg, A. Budd, F. Diella, H. Dinkel, T. J. Gibson, Attributes of short linear motifs. *Mol. Biosyst.* (2012), doi:10.1039/c1mb05231d.
  96. O. M. Morris, J. H. Torpey, R. L. Isaacson, Intrinsically disordered proteins: modes of binding with emphasis on disordered domains. *Open Biol.* **11**, 210222 (2021).
  97. A. K. Dunker, M. S. Cortese, P. Romero, L. M. Iakoucheva, V. N. Uversky, Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J.* **272**, 5129–5148 (2005).
  98. V. N. Uversky, C. J. Oldfield, A. K. Dunker, Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 215–246 (2008).
  99. R. T. DeVol, C.-Y. Sun, M. A. Marcus, S. N. Coppersmith, S. C. B. Myneni, P. U. P. A. Gilbert, Nanoscale Transforming Mineral Phases in Fresh Nacre. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 13325–13333 (2015).
  100. A. Pérez-Huerta, Y. Dauphin, M. Cusack, Biogenic calcite granules--are brachiopods different? *Micron.* **44**, 395–403 (2013).
  101. Y. Nys, J. Gautron, J. M. Garcia-Ruiz, M. T. Hincke, Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol.* **3**, 549–562 (2004).



102. T. Kokubo, Design of bioactive bone substitutes based on biomineralization process. *Mater. Sci. Eng. C*. **25**, 97–104 (2005).
103. M. Manuel, C. Borchiellini, E. Alivon, Y. Le Parco, J. Vacelet, N. Boury-Esnault, Phylogeny and evolution of calcareous sponges: monophyly of calcinea and calcaronea, high level of morphological homoplasy, and the primitive nature of axial symmetry. *Syst. Biol.* **52**, 311–333 (2003).
104. A. E. Ingalls, C. Lee, E. R. M. Druffel, Preservation of organic matter in mound-forming coral skeletons. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **67**, 2827–2841 (2003).
105. Y. W. Lundberg, Y. Xu, K. D. Thiessen, K. L. Kramer, Mechanisms of otoconia and otolith development. *Dev. Dyn.* **244**, 239–253 (2015).
106. Mann S, *Biomaterialization, principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. (Oxford University Press, 2001).
107. Lowenstam H. A., Weiner S., *On Biomaterialization* (Oxford University Press, 1989).
108. L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomaterialization. *Adv. Mater.* **15**, 959–970 (2003).
109. L. B. Gower, Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomaterialization. *Chem. Rev.* **108**, 4551–4627 (2008).
110. L. Kalmar, D. Homola, G. Varga, P. Tompa, Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomaterialization. *Bone.* **51**, 528–534 (2012).
111. M. Wojtas, P. Dobryszyci, A. Ożyhar, in *Advanced Topics in Biomaterialization*, J. Seto, Ed. (IntechOpen, Rijeka, 2012; <https://doi.org/10.5772/31121>).
112. F. F. Amos, E. Destine, C. B. Ponce, J. S. Evans, The N- and C-Terminal Regions of the Pearl-Associated EF Hand Protein, PFMG1, Promote the Formation of the Aragonite Polymorph in Vitro. *Cryst. Growth Des.* **10**, 4211–4216 (2010).
113. P. U. P. A. Gilbert, M. Abrecht, B. H. Frazer, The Organic-Mineral Interface in Biomaterials. *Rev. Mineral. Geochemistry.* **59**, 157–185 (2005).
114. A. L. Boskey, E. Villarreal-Ramirez, Intrinsically disordered proteins and biomaterialization. *Matrix Biol.* **52–54**, 43–59 (2016).
115. M. Wojtas, M. Wołczyrz, A. Ożyhar, P. Dobryszyci, Phosphorylation of Intrinsically Disordered

- Starmaker Protein Increases Its Ability To Control the Formation of Calcium Carbonate Crystals. *Cryst. Growth Des.* **12**, 158–168 (2012).
116. M. Kalka, N. Markiewicz, M. Ptak, E. D. Sone, A. Ożyhar, P. Dobryczycki, M. Wojtas, *FASEB J.*, in press, doi:10.1096/fj.201802268R.
117. K. Alvares, The role of acidic phosphoproteins in biomineralization. *Connect. Tissue Res.* **55**, 34–40 (2014).
118. M. Rose-Martel, S. Smiley, M. T. Hincke, Novel identification of matrix proteins involved in calcitic biomineralization. *J. Proteomics.* **116**, 81–96 (2015).
119. M. T. Hincke, Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A. B. Rodriguez-Navarro, M. D. McKee, The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **17**, 1266–1280 (2012).
120. J. Gautron Nys, Y., in *Bioactive Egg Compounds* (Springer Berlin Heidelberg, 2007), pp. 99–102.
121. R. Li, Q. Wu, Y. Zhao, W. Jin, X. Yuan, X. Wu, Y. Tang, J. Zhang, X. Tan, F. Bi, J. N. Liu, The Novel Pro-Osteogenic Activity of NUCB21-83. *PLoS One* (2013), doi:10.1371/journal.pone.0061619.
122. X. Arias-Moreno, O. Abian, S. Vega, J. Sancho, A. Velazquez-Campoy, Protein-Cation Interactions: Structural and Thermodynamic Aspects. *Curr. Protein Pept. Sci.* **12**, 325–338 (2011).
123. E. A. Permyakov, Metal Binding Proteins. *Encyclopedia.* **1**, 261–292 (2021).
124. Y. Zhou, S. Xue, J. J. Yang, Calciomics: Integrative studies of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins and their interactomes in biological systems. *Metallomics.* **5** (2013), pp. 29–42.
125. K. A. McCall, C. Huang, C. A. Fierke, Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *J. Nutr.* **130**, 1437S-1446S (2000).
126. H. Ebel, T. Günther, Magnesium Metabolism: A Review. *Clin. Chem. Lab. Med.* **18**, 257–270 (1980).
127. R. J. P. Williams, The evolution of calcium biochemistry. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**, 1139–1146 (2006).
128. M. J. Berridge, M. D. Bootman, H. L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–529 (2003).
129. E. M. Brown, Clinical lessons from the calcium-sensing receptor. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **3**, 122–133 (2007).

130. J.-P. Bonjour, Calcium and phosphate: a duet of ions playing for bone health. *J. Am. Coll. Nutr.* **30**, 438S–48S (2011).
131. E. Carafoli, Membrane transport of calcium: an overview. *Methods Enzymol.* **157**, 3–11 (1988).
132. K. L. Yap, J. B. Ames, M. B. Swindells, M. Ikura, Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins.* **37**, 499–507 (1999).
133. M. Ikura, Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 14–17 (1996).
134. D. Chin, A. R. Means, Calmodulin: A prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **10** (2000), pp. 322–328.
135. B. Schwaller, Cytosolic Ca<sup>2+</sup> buffers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a004051 (2010).
136. J. A. Cowan, Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry. *Chem. Rev.* **98**, 1067–1088 (1998).
137. M. Stillman, Biological Inorganic Chemistry. Structure and Reactivity. Edited by Ivano Bertini, Harry B. Gray, Edward I. Stiefel and Joan S. Valentine. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**, 8741–8742 (2007).
138. A. Hartwig, Role of magnesium in genomic stability. *Mutat. Res.* **475**, 113–121 (2001).
139. J. A. Cowan, Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. *Biometals an Int. J. role Met. ions Biol. Biochem. Med.* **15**, 225–235 (2002).
140. W. Jahnen-Dechent, M. Ketteler, Magnesium basics. *Clin. Kidney J.* **5**, i3–i14 (2012).
141. H. Kawasaki, R. H. Kretsinger, Calcium-binding proteins 1: EF-hands. *Protein Profile.* **2**, 297–490 (1995).
142. R. B. Martin, in *Metal Ions in Biological Systems.*, A. Sigel, H. & Sigel, Ed. (Marcel Dekker Inc., New York, ed. 26, 1990), pp. 1–13.
143. W. Maret, Y. Li, Coordination dynamics of zinc in proteins. *Chem. Rev.* **109**, 4682–4707 (2009).
144. C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome Res.* **5**, 196–201 (2006).
145. T. Kocharczyk, A. Drozd, A. Krezel, Relationship between the architecture of zinc coordination and zinc binding affinity in proteins - Insights into zinc regulation. *Metallomics.* **7** (2015), pp. 244–257.

146. H. Zheng, M. Chruszcz, P. Lasota, L. Lebioda, W. Minor, Data mining of metal ion environments present in protein structures. *J. Inorg. Biochem.* **102**, 1765–1776 (2008).
147. M. S. Lee, G. P. Gippert, K. V. Soman, D. A. Case, P. E. Wright, Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science (80-. )*. **245**, 635–637 (1989).
148. D. S. Auld, in *Handbook of Metalloproteins* (John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2006; <http://doi.wiley.com/10.1002/0470028637.met014>).
149. K. Kluska, J. Adamczyk, A. Krężel, Metal binding properties, stability and reactivity of zinc fingers. *Coord. Chem. Rev.* **367** (2018), pp. 18–64.
150. R. A. Colvin, W. R. Holmes, C. P. Fontaine, W. Maret, Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics.* **2** (2010), pp. 306–317.
151. A. Krężel, W. Maret, Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J. Biol. Inorg. Chem.* **11**, 1049–1062 (2006).
152. M. Clegg, L. Hanna, B. Niles, T. Momma, C. Keen, Zinc deficiency-induced cell death. *IUBMB Life (International Union Biochem. Mol. Biol. Life)*. **57**, 661–669 (2005).
153. F. Chimienti, M. Aouffen, A. Favier, M. Seve, Zinc homeostasis-regulating proteins: new drug targets for triggering cell fate. *Curr. Drug Targets.* **4**, 323–338 (2003).
154. T. B. Cole, H. J. Wenzel, K. E. Kafer, P. A. Schwartzkroin, R. D. Palmiter, Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1716–1721 (1999).
155. D. VARTSKY, S. SHILSTEIN, A. BERCOVICH, M. HUSZAR, A. BRESKIN, R. CHECHIK, S. KOROTINSKY, S. D. MALNICK, E. MORIEL, Prostatic Zinc and Prostate Specific Antigen: An Experimental Evaluation of Their Combined Diagnostic Value. *J. Urol.* **170**, 2258–2262 (2003).
156. F. Györkey, K. W. Min, J. A. Huff, P. Györkey, Zinc and magnesium in human prostate gland: normal, hyperplastic, and neoplastic. *Cancer Res.* **27**, 1348–1353 (1967).
157. M. C. Foster, R. D. Leapman, M. X. Li, I. Atwater, Elemental composition of secretory granules in pancreatic islets of Langerhans. *Biophys. J.* **64**, 525–532 (1993).
158. C. Hogstrand, P. Kille, R. I. Nicholson, K. M. Taylor, *Trends Mol. Med.*, in press, doi:10.1016/j.molmed.2009.01.004.
159. C. J. Frederickson, J. Y. Koh, A. I. Bush, The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat. Rev.*

- Neurosci.* **6** (2005), pp. 449–462.
160. W. Maret, Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. *Adv. Nutr.* **4**, 82–91 (2013).
  161. S. Ayton, P. Lei, A. I. Bush, Metallostasis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **62** (2013), pp. 76–89.
  162. I. J. McLoughlin, J. S. Hodge, Zinc in depressive disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* **82**, 451–453 (1990).
  163. I. Solomonov, E. Korkotian, B. Born, Y. Feldman, A. Bitler, F. Rahimi, H. Li, G. Bitan, I. Sagi, Zn<sup>2+</sup>-A $\beta$ 40 complexes form metastable quasi-spherical oligomers that are cytotoxic to cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **287**, 20555–20564 (2012).
  164. M. F. Calabrese, A. D. Miranker, Metal binding sheds light on mechanisms of amyloid assembly. *Prion.* **3** (2009), pp. 1–4.
  165. J. R. Brender, K. Hartman, R. P. R. Nanga, N. Popovych, R. De La Salud Bea, S. Vivekanandan, E. N. G. Marsh, A. Ramamoorthy, Role of zinc in human islet amyloid polypeptide aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 8973–8983 (2010).
  166. D. Noy, I. Solomonov, O. Sinkevich, T. Arad, K. Kjaer, I. Sagi, Zinc-amyloid  $\beta$  interactions on a millisecond time-scale stabilize non-fibrillar Alzheimer-related species. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1376–1383 (2008).
  167. A. Skorupska, Otrzymanie rekombinowanych wektorów umożliwiających ekspresję w komórkach bakteryjnych białka Nucleobindin-2 z *Gallus gallus*. *Pr. magisterska* (2016).
  168. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685 (1970).
  169. J. Sambrook Russell DW., *Molecular Cloning: A laboratory manual, Tom 1*. (CSHL Press, 2001).
  170. G. Fairbanks, T. L. Steck, D. F. Wallach, Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* **10**, 2606–2617 (1971).
  171. F. W. Studier, Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* **219**, 37–44 (1991).
  172. Li, Romero, Rani, Dunker, Obradovic, Predicting Protein Disorder for N-, C-, and Internal Regions. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* (1999).

173. Garner, Romero, Dunker, Brown, Obradovic, Predicting Binding Regions within Disordered Proteins. *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* (1999).
174. B. Mészáros, G. Erdős, Z. Dosztányi, IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Res.* **46**, W329–W337 (2018).
175. E. Cilia, R. Pancsa, P. Tompa, T. Lenaerts, W. F. Vranken, From protein sequence to dynamics and disorder with DynaMine. *Nat. Commun.* (2013), doi:10.1038/ncomms3741.
176. H. C. Gasteiger E. Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A., in *The Proteomics Protocols Handbook.*, W. JM., Ed. (Humana Press, 2005), pp. 571–607.
177. B. G, M. R, J. R, Quantitative Analysis of Protein Far UV Circular Dichroism Spectra by Neural Networks. *Protein Eng.* **5** (1992), doi:10.1093/PROTEIN/5.3.191.
178. S. B. D. Laue T. M. Ridgeway T. M., Pelletier S. L., Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. *Anal. Ultracentrifugation Biochem. Polym. Sci.* (1992).
179. P. Schuck, Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.* (2000), doi:10.1016/S0006-3495(00)76713-0.
180. P. Schuck, Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation. *Biophys. J.* (1998), doi:10.1016/S0006-3495(98)74069-X.
181. C. A. Brautigam, in *Methods in Enzymology* (2015).
182. S. Keller, C. Vargas, H. Zhao, G. Piszczek, C. A. Brautigam, P. Schuck, High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis. *Anal. Chem.* **84**, 5066–5073 (2012).
183. T. H. Scheuermann, C. A. Brautigam, High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: New features of NITPIC. *Methods* (2015), doi:10.1016/j.ymeth.2014.11.024.
184. J. C. D. Houtman, P. H. Brown, B. Bowden, H. Yamaguchi, E. Appella, L. E. Samelson, P. Schuck, 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 Sci.* **16**, 30–42 (2007).
185. C. A. Scarff, M. J. G. Fuller, R. F. Thompson, M. G. Iadaza, Variations on negative stain electron microscopy methods: Tools for tackling challenging systems. *J. Vis. Exp.* **2018** (2018),

doi:10.3791/57199.

186. D. S. Booth, A. Avila-Sakar, Y. Cheng, Visualizing proteins and macromolecular complexes by negative stain EM: from grid preparation to image acquisition. *J. Vis. Exp.* (2011), doi:10.3791/3227.
187. G. David, J. Pérez, Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 892–900 (2009).
188. D. Franke, M. V Petoukhov, P. V Konarev, A. Panjkovich, A. Tuukkanen, H. D. T. Mertens, A. G. Kikhney, N. R. Hajizadeh, J. M. Franklin, C. M. Jeffries, D. I. Svergun, ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *J. Appl. Crystallogr.* **50**, 1212–1225 (2017).
189. D. I. Svergun, Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J. Appl. Crystallogr.* **25**, 495–503 (1992).
190. I. W. Kim, R. E. Robertson, R. Zand, Selected Polymorphs of CaCO<sub>3</sub> Through Epitaxy with Inorganic Substrates Aligned with an Electric Field. *Adv. Mater.* **15**, 709–712 (2003).
191. S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, Polysaccharides of Intracrystalline Glycoproteins Modulate Calcite Crystal Growth In Vitro. *Chem. – A Eur. J.* **2**, 278–284 (1996).
192. M. Różycka, M. Wojtas, M. Jakób, C. Stigloher, M. Grzeszkowiak, M. Mazur, A. Ożyhar, Intrinsically disordered and pliable Starmaker-like protein from medaka (*Oryzias latipes*) controls the formation of calcium carbonate crystals. *PLoS One.* **9**, e114308 (2014).
193. M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, D. F. Hochstrasser, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol. Biol.* **112**, 531–552 (1999).
194. V. Receveur-Brechot, J. M. Bourhis, V. N. Uversky, B. Canard, S. Longhi, Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins.* **62**, 24–45 (2006).
195. E. Cilia, R. Pancsa, P. Tompa, T. Lenaerts, W. F. Vranken, The DynaMine webserver: Predicting protein dynamics from sequence. *Nucleic Acids Res.* (2014), doi:10.1093/nar/gku270.
196. V. N. Uversky, The alphabet of intrinsic disorder: II. Various roles of glutamic acid in ordered and intrinsically disordered proteins. *Intrinsically Disord. proteins.* **1**, e24684 (2013).
197. S. Kelly, N. Price, The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and

- Function. *Curr. Protein Pept. Sci.* (2005), doi:10.2174/1389203003381315.
198. G. HOLZWARTH, P. DOTY, THE ULTRAVIOLET CIRCULAR DICHROISM OF POLYPEPTIDES. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 218–228 (1965).
199. N. Greenfield, G. D. Fasman, Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* **8**, 4108–4116 (1969).
200. V. SYu, I. A. Baikalov, Z. M. Shen, C. S. Wu, J. T. Yang, Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set. *Anal. Biochem.* **214**, 17–24 (1993).
201. S. M. Kelly, N. C. Price, The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* (1997), , doi:10.1016/S0167-4838(96)00190-2.
202. S. Barnikol-Watanabe, N. A. GroB, H. Götz, A. Karabinos, H. Kratzin, H. U. Barnikol, N. Hilschmann, T. Henkel, 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. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* (1994), doi:10.1515/bchm3.1994.375.8.497.
203. S. Mokka, P. A. Postila, S. Rissanen, H. Juhola, I. Vattulainen, T. Róg, Calcium Assists Dopamine Release by Preventing Aggregation on the Inner Leaflet of Presynaptic Vesicles. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 1242–1250 (2017).
204. N. Xu, M. Francis, D. L. Cioffi, T. Stevens, Studies on the resolution of subcellular free calcium concentrations: a technological advance. Focus on “Detection of differentially regulated subsarcolemmal calcium signals activated by vasoactive agonists in rat pulmonary artery smooth muscle cells.” *Am. J. Physiol. Physiol.* **306**, C636–C638 (2014).
205. T. B. Cole, H. J. Wenzel, K. E. Kafer, P. A. Schwartzkroin, R. D. Palmiter, Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 1716–1721 (1999).
206. P. D. Zalewski, S. H. Millard, I. J. Forbes, O. Kapaniris, A. Slavotinek, W. H. Betts, A. D. Ward, S. F. Lincoln, I. Mahadevan, Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. *J. Histochem. Cytochem.* **42**, 877–884 (1994).
207. R. E. White, H. C. Hartzell, Magnesium ions in cardiac function. Regulator of ion channels and second messengers. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 859–867 (1989).



208. E. A. Permyakov, V. N. Uversky, in *Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins* (John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2010; <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470602614.ch11>), pp. 323–344.
209. G. R. Drapeau, Y. Boily, J. Houmard, Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **247**, 6720–6726 (1972).
210. A. Fontana, P. Polverino de Laureto, V. De Filippis, E. Scaramella, M. Zambonin, Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Fold. Des.* **2**, R17-26 (1997).
211. H. Neurath, Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem. Sci.* (1989), doi:10.1016/0968-0004(89)90061-3.
212. V. Receveur-Brechot, J. M. Bourhis, V. N. Uversky, B. Canard, S. Longhi, Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins.* **62**, 24–45 (2006).
213. J. R. Engen, Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS. *Anal. Chem.* **81**, 7870–7875 (2009).
214. L. Konermann, J. Pan, Y. H. Liu, Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics. *Chem. Soc. Rev.* (2011), , doi:10.1039/c0cs00113a.
215. S. W. Englander, T. R. Sosnick, J. J. Englander, L. Mayne, Mechanisms and uses of hydrogen exchange. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (1996), doi:10.1016/S0959-440X(96)80090-X.
216. Z. Zhang, D. L. Smith, Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci.* (1993), doi:10.1002/pro.5560020404.
217. T. E. Wales, J. R. Engen, Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrom. Rev.* (2006), , doi:10.1002/mas.20064.
218. Y. Xiao, L. Konermann, Protein structural dynamics at the gas/water interface examined by hydrogen exchange mass spectrometry. *Protein Sci.* **24**, 1247–56 (2015).
219. V. N. Uversky, Intrinsically disordered proteins and their environment: effects of strong denaturants, temperature, pH, counter ions, membranes, binding partners, osmolytes, and macromolecular crowding. *Protein J.* **28**, 305–325 (2009).
220. A. G. Salvay, G. Communie, C. Ebel, Sedimentation velocity analytical ultracentrifugation for intrinsically disordered proteins. *Methods Mol. Biol.* **896**, 91–105 (2012).
221. O. Tcherkasskaya, V. N. Uversky, Denatured collapsed states in protein folding: example of

- apomyoglobin. *Proteins*. **44**, 244–254 (2001).
222. F. Manon, C. Ebel, in *Instrumental Analysis of Intrinsically Disordered Proteins: Assessing Structure and Conformation* (2010), pp. 431–449.
223. M. W. Freyer, E. A. Lewis, Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods Cell Biol.* **84**, 79–113 (2008).
224. T. R. Young, Z. Xiao, Principles and practice of determining metal–protein affinities. *Biochem. J.* **478**, 1085–1116 (2021).
225. A. Velazquez-Campoy, E. Freire, Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nat. Protoc.* **1**, 186–191 (2006).
226. D. I. Svergun, M. H. J. Koch, Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution. *Reports Prog. Phys.* **66**, 1735–1782 (2003).
227. A. G. Kikhney, D. I. Svergun, A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett.* **589** (2015), pp. 2570–2577.
228. P. Bernadó, D. I. Svergun, Structural analysis of intrinsically disordered proteins by small-angle X-ray scattering. *Mol. Biosyst.* **8** (2012), pp. 151–167.
229. T. N. Cordeiro, F. Herranz-Trillo, A. Urbanek, A. Estaña, J. Cortés, N. Sibille, P. Bernadó, in *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Springer New York LLC, 2017; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29218556/>), vol. 1009, pp. 107–129.
230. V. Receveur-Brechot, D. Durand, How Random are Intrinsically Disordered Proteins? A Small Angle Scattering Perspective. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 55–75 (2012).
231. P. Prinz, M. Goebel-Stengel, P. Teuffel, M. Rose, B. F. Klapp, A. Stengel, Peripheral and central localization of the nesfatin-1 receptor using autoradiography in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **470**, 521–527 (2016).
232. D. García-Galiano, V. M. Navarro, F. Gaytan, M. Tena-Sempere, Expanding roles of NUCB2/nesfatin-1 in neuroendocrine regulation. *J. Mol. Endocrinol.* **45**, 281–290 (2010).
233. G. L. Rosano, E. A. Ceccarelli, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5** (2014), doi:10.3389/fmicb.2014.00172.
234. J. Zhang, J. Li, T. A. Craig, R. Kumar, M. L. Gross, Hydrogen-Deuterium Exchange Mass

- Spectrometry Reveals Calcium Binding Properties and Allosteric Regulation of Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator (DREAM). *Biochemistry* (2017), doi:10.1021/acs.biochem.7b00100.
235. E. De Alba, N. Tjandra, Structural studies on the Ca<sup>2+</sup>-binding domain of human nucleobindin (calnuc). *Biochemistry* (2004), doi:10.1021/bi049310a.
236. A. Karabinos, D. Bhattacharya, C. Morys-Wortmann, K. Kroll, G. Hirschfeld, H. D. Kratzin, S. Barnikol-Watanabe, N. Hilschmann, The divergent domains of the NEFA and nucleobindin proteins are derived from an EF-hand ancestor. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 990–998 (1996).
237. B. C. Potts, G. Carlstrom, K. Okazaki, H. Hidaka, W. J. Chazin, 1H NMR assignments of apo calcyclin and comparative structural analysis with calbindin D9k and S100 beta. *Protein Sci.* **5**, 2162–2174 (1996).
238. S. R. Gross, C. G. T. Sin, R. Barraclough, P. S. Rudland, Joining S100 proteins and migration: for better or for worse, in sickness and in health. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 1551–1579 (2014).
239. W. K. Myers, X. Xu, C. Li, J. O. Lagerstedt, M. S. Budamagunta, J. C. Voss, R. D. Britt, J. B. Ames, Double electron-electron resonance probes Ca(2)(+)-induced conformational changes and dimerization of recoverin. *Biochemistry.* **52**, 5800–5808 (2013).
240. G. C. Brailoiu, S. L. Dun, E. Brailoiu, S. Inan, J. Yang, K. C. Jaw, N. J. Dun, Nesfatin-1: Distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* (2007), doi:10.1210/en.2007-0701.
241. R. D. Burgoyne, N. Helassa, H. V McCue, L. P. Haynes, Calcium Sensors in Neuronal Function and Dysfunction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11** (2019), doi:10.1101/cshperspect.a035154.
242. M. J. Berridge, Neuronal calcium signaling. *Neuron.* **21**, 13–26 (1998).
243. T. C. Südhof, Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron.* **80**, 675–690 (2013).
244. G. C. Faas, S. Raghavachari, J. E. Lisman, I. Mody, Calmodulin as a direct detector of Ca<sup>2+</sup> signals. *Nat. Neurosci.* **14**, 301–304 (2011).
245. R. D. Burgoyne, L. P. Haynes, Sense and specificity in neuronal calcium signalling. *Biochim. Biophys. Acta.* **1853**, 1921–1932 (2015).
246. M. Michalak, J. Groenendyk, E. Szabo, L. I. Gold, M. Opas, Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **417**, 651–666 (2009).

247. D. B. Williams, Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **119**, 615–23 (2006).
248. J. Nesselhut, U. Jurgan, E. Onken, H. Gotz, H. U. Barnikol, G. Hirschfeld, S. Barnikol-Watanabe, N. Hilschmann, Golgi retention of human protein NEFA is mediated by its N-terminal Leu/Ile-rich region. *FEBS Lett.* **509**, 469–475 (2001).
249. R. Pezzati, M. Bossi, P. Podini, J. Meldolesi, F. Grohovaz, High-resolution calcium mapping of the endoplasmic reticulum-Golgi-exocytic membrane system. Electron energy loss imaging analysis of quick frozen-freeze dried PC12 cells. *Mol. Biol. Cell.* **8**, 1501–12 (1997).
250. A. Mónico, S. Zorrilla, G. Rivas, D. Pérez-Sala, Zinc differentially modulates the assembly of soluble and polymerized vimentin. *Int. J. Mol. Sci.* (2020), doi:10.3390/ijms21072426.
251. S. Wu, Y. Du, J. Beckford, H. Alachkar, Upregulation of the EMT marker vimentin is associated with poor clinical outcome in acute myeloid leukemia. *J. Transl. Med.* **16**, 170 (2018).
252. M. G. Mendez, S. Kojima, R. D. Goldman, Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* **24**, 1838–1851 (2010).
253. V. E. Baksheeva, A. Y. Roman, C. Villard, F. Devred, D. Byrne, D. Yatoui, A. O. Zalevsky, A. A. Vologzhannikova, A. S. Sokolov, S. E. Permyakov, A. V Golovin, G. S. Shaw, P. O. Tsvetkov, E. Y. Zernii, Mechanism of Zn(2+) and Ca(2+) Binding to Human S100A1. *Biomolecules.* **11** (2021), doi:10.3390/biom11121823.
254. M. C. Carpenter, D. E. Wilcox, Thermodynamics of formation of the insulin hexamer: Metal-stabilized proton-coupled assembly of quaternary structure. *Biochemistry.* **53**, 1296–1301 (2014).
255. J. R. Naranjo, Y. Sharma, A. Dizhoor, E. Yu Zernii, R. AYu, Z. A. Jr, Z. EYu, P. O. Tsvetkov, A. Yu Roman, V. E. Baksheeva, A. A. Nazipova, M. P. Shevelyova, V. I. Vladimirov, M. F. Buyanova, D. V Zinchenko, A. A. Zamyatnin Jr, F. Devred, A. V Golovin, S. E. Permyakov, Functional Status of Neuronal Calcium Sensor-1 Is Modulated by Zinc Binding (2018), doi:10.3389/fnmol.2018.00459.
256. C. J. Frederickson, Neurobiology of Zinc and Zinc-Containing Neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* **31**, 145–238 (1989).
257. A. M. Adamo, M. P. Zago, G. G. Mackenzie, L. Aimo, C. L. Keen, A. Keenan, P. I. Oteiza, The role of zinc in the modulation of neuronal proliferation and apoptosis. *Neurotox. Res.* **17**, 1–14 (2010).

258. T. Hara, T. Takeda, T. Takagishi, K. Fukue, T. Kambe, T. Fukada, Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis. *J. Physiol. Sci.* **67**, 283–301 (2017).
259. H. Kozłowski, M. Luczkowski, M. Remelli, D. Valensin, Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). *Coord. Chem. Rev.* **256**, 2129–2141 (2012).
260. Y. V. Li, Zinc and insulin in pancreatic beta-cells. *Endocrine.* **45** (2014), pp. 178–189.
261. R. H. Li, G. B. Liu, H. Wang, Y. Z. Zheng, Effects of Fe<sup>3+</sup> and zn<sup>2+</sup> on the structural and thermodynamic properties of a soybean ASR protein. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 475–481 (2013).
262. L. French-Pacheco, C. L. Cuevas-Velazquez, L. Rivillas-Acevedo, A. A. Covarrubias, C. Amero, Metal-binding polymorphism in late embryogenesis abundant protein AtLEA4-5, an intrinsically disordered protein. *PeerJ.* **2018** (2018), doi:10.7717/peerj.4930.
263. M. C. Carpenter, D. E. Wilcox, Thermodynamics of formation of the insulin hexamer: Metal-stabilized proton-coupled assembly of quaternary structure. *Biochemistry.* **53**, 1296–1301 (2014).
264. A. Jabrani, S. Makamte, E. Moreau, Y. Gharbi, A. Plessis, L. Bruzzone, M. Sanial, V. Biou, Biophysical characterisation of the novel zinc binding property in Suppressor of Fused. *Sci. Rep.* **7**, 11139 (2017).
265. R. Lenda, M. Padjasek, A. Krężel, A. Ożyhar, D. Bystranowska, Does one plus one always equal two? Structural differences between nesfatin-1, -2, and nesfatin-1/2. *Cell Commun. Signal.* **20**, 163 (2022).
266. J. H. F. de Baaij, J. G. J. Hoenderop, R. J. M. Bindels, Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiol. Rev.* **95**, 1–46 (2015).
267. Y. Chen, T. Gao, Y. Wang, G. Yang, Investigating the Influence of Magnesium Ions on p53-DNA Binding Using Atomic Force Microscopy. *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017), doi:10.3390/ijms18071585.
268. A. Porębska, M. Różycka, R. Hołubowicz, Z. Szewczuk, A. Ożyhar, P. Dobryczycki, Functional derivatives of human dentin matrix protein 1 modulate morphology of calcium carbonate crystals. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **34**, 6147–6165 (2020).
269. K. T. Moreland, M. Hong, W. Lu, C. W. Rowley, D. M. Ornitz, J. J. De Yoreo, R. Thalmann, In Vitro

- Calcite Crystal Morphology Is Modulated by Otoconial Proteins Otolin-1 and Otoconin-90. *PLoS One*. **9**, 1–8 (2014).
270. N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak, Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. **4**, 1633–1649 (2004).
271. N. Blom, S. Gammeltoft, S. Brunak, Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* **294**, 1351–1362 (1999).