

## 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 ultrawierowania 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.

