Charakterystyka właściwości molekularnych
i biomineralizacyjnych funkcjonalnych fragmentów ludzkiego białka DMP1

Aleksandra Porębska

# STRESZCZENIE

Szereg procesów, w których powstają kości, zęby, skorupy jaj czy muszli nazywamy biomineralizacją. W przyrodzie procesy te są szeroko rozpowszechnione i umożliwiają one żywym organizmom wytwarzanie nieorganicznych kryształów, które stanowią mocne i trwałe materiały budulcowe. Biominerały możemy podzielić na kilka grup, ze względu na materiał z jakiego powstają. Najczęściej występującymi są fosforan i węglan wapnia. Procesy biomineralizacji są złożone i podlegają precyzyjnej kontroli przez białka, glikoproteiny i proteoglikany. Makrocząsteczki te pełnią wiele funkcji, związanych zarówno z inicjacją, wzrostem kryształów, jak i tworzeniem rusztowania dla budowy zmineralizowanych tkanek. Wydaje się, że specjalną rolę pełnią kwaśne białka o nieuporządkowanej strukturze, należące do grupy inherentnie nieuporządkowanych (ang. *intrinsically disordered proteins*, IDPs). To dzięki nim powstające biominerały posiadają charakterystyczny kształt, wielkość i odmianę polimorficzną.

Otolity i otokonia, to biomateriały składające się głównie z węglanu wapnia oraz macierzy organicznej (ang. *organic matrix*). Otolity znajdują się w uchu wewnętrznym ryb kostnoszkieletowych. Otokonia znajdują się w błędniku błoniastym ssaków. Zarówno otolity, jak i otokonia pełnią istotne funkcje w procesie słyszenia, a także odczuwania sił grawitacji. Dzięki nim możliwa jest orientacja ciała w przestrzeni, odczuwanie przyspieszenia i utrzymanie równowagi.

Białko DMP1 (ang. *dentin matrix protein 1*, białko macierzy zębiny 1) bierze udział w procesie biomineralizacji fosforanu wapnia tworzącego kości i zębinę. Doniesienia literaturowe, mówiące o obecności DMP1 w otokoniach skłoniły mnie do zbadania roli DMP1 w biomineralizacji nie tylko fosforanu, ale także węglanu wapnia. W pracy przeprowadzono analizę właściwości molekularnych białka DMP1, a w szczególności jego funkcjonalnych fragmentów 44K i 56K pod kątem cech charakterystycznych dla białek inherentnie nieuporządkowanych, a także zbadano wpływ obu fragmentów na morfologię kryształów węglanu wapnia otrzymanych *in vitro*.

Opracowano system bakteryjny pozwalający na wydajną produkcję oraz oczyszczanie rekombinowanych białek 44K i 56K, dzięki czemu możliwe było otrzymanie homogennych preparatów. Przeprowadzono badania ich właściwości molekularnych. Analizy biochemiczne i biofizyczne, uzupełnione o badania *in silico,* wykazały, że oba białka występują w roztworze jako monomery o charakterystycznym, wydłużonym kształcie. Przeprowadzone eksperymenty strukturalne w obecności jonów Ca2+ i 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE), a także w podwyższonej temperaturze pokazały, że obie cząsteczki charakteryzują się dużą giętkością charakterystyczną dla IDPs, dzięki czemu są podatne na zmiany konformacyjne, w tym zmiany zawartości struktur drugorzędowych również w obecności jonów Ca2+. W oparciu o opracowany test aktywności biomineralizacyjnej *in vitro* wykazano wpływ obu białek na morfologię powstałych kryształów węglanu wapnia. Zauważono, że oba białka biorą udział w zarodkowaniu kryształów, poprzez zwiększenie ilości miejsc nukleacji powstałych w obecności białek. Zaobserwowano hamujący wpływ obu białek na wzrost kryształów. Eksperymenty fluorescencyjne pokazały, że białka 44K i 56K są składnikiem powstałych w ich obecności kryształów, a ich lokalizacja wewnątrz kryształu sugeruje, że biorą udział w procesie nukleacji. Otrzymane wyniki zostały przedyskutowane pod kątem roli, jaką mogą odgrywać badane białka w biomineralizacji otokoniów.