Streszczenie

Biomineralizacja jest szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie procesem umożliwiającym organizmom żywym wytwarzanie nieorganicznych kryształów stanowiących mocne i trwałe materiały budulcowe. Proces ten jest bardzo złożony i jak dotąd słabo poznany. Każdy z etapów biomineralizacji podlega precyzyjnej kontroli, dzięki czemu powstające biominerały posiadają charakterystyczny kształt, wielkość i odmianę polimorficzną. Najważniejszą rolę w regulacji wytwarzania biominerałów odgrywają kwaśnie białka o wysokim poziomie modyfikacji potranslacyjnych, posiadające cechy białek inherentnie nieuporządkowanych (ang. *intrinsically disordered proteins*, IDPs).

Otolity, minerały biokompozytowe zbudowane głównie z nieorganicznego węglanu wapnia i frakcji organicznej, znajdujące się w uchu wewnętrznym ryb kostnoszkieletowych, odgrywają bardzo ważną rolę w procesie słyszenia oraz odczuwania sił grawitacji i bezwładności. U *Danio rerio*, biomineralizacja otolitów jest kontrolowana przez białko Starmaker (Stm), które należy do IDPs. Pomimo, że gen białka Starmaker-like (Stm-l) z *Oryzias latipes* i gen kodujący białko Starmaker nie wykazują dużego podobieństwa w sekwencji nukleotydowej, to zauważalna jest podobna struktura oraz wzór ekspresji obu tych genów. Obserwacja ta może wskazywać na zachowaną rolę białka Stm-l w procesie biomineralizacji otolitów, jednak właściwości molekularne Stm-l, jak dotąd nie zostały scharakteryzowane. Dlatego celem tej pracy było przeprowadzenie analizy właściwości molekularnych Stm-l, w szczególności pod kątem czy, i w jakim stopniu, białko to wykazuje cechy charakterystyczne dla IDPs, a także zbadanie czy Stm-l wpływa na morfologię kryształów węglanu wapnia otrzymanych *in vitro*.

W ramach niniejszej pracy opracowano system bakteryjny pozwalający na wydajną produkcję oraz oczyszczanie rekombinowanej pochodnej Stm-l. Dzięki temu możliwe było otrzymanie preparatu białka, którego czystość pozwalała na przeprowadzenie analiz właściwości molekularnych cząsteczki Stm-l. Wyczerpująca analiza biochemiczna oraz biofizyczna rekombinowanego Stm-l wraz z badaniami *in silico* jednoznacznie pokazały, że białko to występuje w roztworze jako monomer o wydłużonym kształcie, co sugeruje przynależność Stm-l do IDPs. Eksperymenty dichroizmu kołowego oraz sączenia molekularnego w obecności denaturanta w postaci chlorowodorku guanidyny (GdmCl) sugerują jednak możliwość występowania bardzo niewielkiej ilości uporządkowanych

struktur w Stm-l. Jednocześnie badania strukturalne prowadzone w obecności jonów Ca^{2+} lub też 2,2,2-trifluoroetanolu (TFE), a także w obniżonym pH lub podwyższonej temperaturze pokazały, że cząsteczka Stm-l charakteryzuje się giętkością i plastycznością, dzięki czemu może ona podlegać zmianom konformacyjnym. Co ciekawe, różne czynniki mogą indukować różne zmiany konformacyjne. Pokazano, że podwyższona temperatura, obniżone pH oraz obecność TFE powodowały wzrost zawartości struktur drugorzędowych w Stm-l, natomiast niewielkie stężenie GdmCl lub jony Ca^{2+} powodowały zmiany konformacji Stm-l bez istotnej zmiany udziału zawartości struktur drugorzędowych. Wyniki te sugerują, że różne warunki środowiska, mogłyby wywierać różny wpływ na konformację, a co za tym idzie funkcję, Stm-l. W oparciu o opracowany na potrzeby tej pracy test aktywności biomineralizacyjnej *in vitro* pokazano wpływ obecności Stm-l na morfologię powstających kryształów węglanu wapnia. Stm-l działa zarówno na etapie zarodkowania kryształów poprzez zwiększenie ilości miejsc nukleacji, jak i wpływa hamująco na wzrost rosnących kryształów, przez co powstające kryształy mają znacznie mniejsze rozmiary niż kryształy kontrolne rosnące w roztworze niezawierającym Stm-l. Eksperymenty fluorescencyjne pokazały również, że Stm-l jest składnikiem kryształów, a jego lokalizacja w środkowej części kryształu może świadczyć o tym, że białko to zapoczątkowuje nukleację węglanu wapnia. Otrzymane wyniki zostały przedyskutowane pod kątem roli, jaką mogłoby odgrywać Stm-l w procesie biomineralizacji otolitów.

Abstract

Biomineralization is a process by which living organisms produce biominerals such as bones, shells, teeth and otoliths. However, it is a complex and still poorly understood process. Every step of a biomineral formation is strictly controlled thus the growing crystal possesses characteristic shape, size and polymorph. It has been shown that many biomineral organic matrix proteins are extremely acidic and have extensive post-translational modifications. Moreover, they often belong to the group of intrinsically disordered proteins (IDPs), a class of proteins devoid of a rigid tertiary structure.

Fish otoliths, biominerals composed of calcium carbonate with a small amount of organic matrix, are involved in the functioning of the inner ear, the sensory organ that plays an important role in hearing and balance. Starmaker (Stm) from *Danio rerio* was the first protein found to be capable of controlling the formation of otoliths. Recently, a gene was identified encoding the Starmaker-like (Stm-l) protein from *Oryzias latipes*, a putative homologue of Stm. Although there is no sequence similarity between *stm-l* and *stm* genes, their genomic structure and the expression pattern is highly similar. This observation suggest a common function of both proteins in the biomineralization of otholiths. However, the molecular properties and functioning of Stm-l have not been characterized yet. Therefore, the aim of this study was to investigate the molecular properties of Stm-l, particularly if Stm-l exhibits properties of IDPs and if it affects the morphology of calcium carbonate crystals obtained *in vitro*.

To facilitate exploration of the molecular basis of the Stm-l protein function, we have elaborated and optimized a protocol for the efficient expression and purification of homogeneous, non-tagged Stm-l. The comprehensive biochemical and biophysical characteristics of the Stm-l protein along with *in silico* examinations indicated that Stm-l exhibits properties typical of the IDP. However, CD spectroscopy together with the size exclusion chromatography experiments preformed in the presence of GdmCl (guanidine hydrochloride) suggest the existence of a small amount of more ordered structures in Stm-l molecule. Moreover, Stm-l possesses a highly pliable structure which can be easily modulated by external factors. Interestingly, these different factors induced different structural changes. Temperature, TFE (2,2,2-trifluoroethanol) and low pH caused the formation of ordered secondary structures in Stm-l. On the other hand, small concentrations

of GdmCl or the presence of Ca^{2+} resulted in the compaction of the protein, which did not correlate with an increase in the content of secondary structures. Therefore, it is possible that different environmental factors may exhibit different effects on the conformation and function of Stm-l. *In vitro* experiments demonstrated that Stm-l controlls the size, shape and number of calcium carbonate crystals. Although Stm-l inhibited crystal growth, the increased number of crystals in the presence of the protein might have been an indication that more nucleation sites were formed. Confocal laser scanning microscopy experiments indicated that Stm-l is located inside the crystal, in particular in its central part what may suggest its function as a nucleating agent. The high content of negative residues in the Stm-l sequence might possibly have caused Ca^{2+} from the solution to gather and promote a crystal nucleation. The extended and pliable conformation of Stm-l may facilitate its interaction with inorganic constituents of biominerals and other proteins in the organic matrix of otoliths. Obtained results are discussed in the contest of the possible roles of the structural features of Stm-l and how they function in the biomineralization process.