

Relacja struktura - funkcja inherentnie nieuporządkowanego białka Starmaker w procesie biomineralizacji węglanu wapnia.

Marta Kalka

Streszczenie

Biomineralizacja to złożony i nadal słabo poznany proces wytwarzania minerałów przez organizmy żywe. Kwaśne białka, o inherentnie nieporządkowanej strukturze i wysokim poziomie modyfikacji potranslacyjnych pełnią szczególną funkcję w regulacji biomineralizacji. Jednym z takich białek jest Starmaker (Stm) – białko kontrolujące biomineralizację otolitów u ryby danio pręgowanego (*Danio rerio*). Otolity to biominerały węglanu wapnia zaangażowane w odczuwanie zmian przyspieszenia liniowego i równowagi u ryb. *In vivo*, Stm reguluje wielkości i kształt otolitów, a zahamowanie ekspresji białka przyczynia się do zmiany odmiany polimorficznej otolitów z aragonitowej w kalcytową. Rekombinowane białko ulega fosforylacji oraz kontroluje biomineralizację węglanu wapnia *in vitro*.

W pracy, dzięki zastosowaniu badań proteomicznych potwierdzono fosforylację Stm *in vivo*. Wykazano również, że białko znajduje się zarówno w otolitach aragonitowych, jak i waterytowych danio. W sekwencji aminokwasowej Stm znajdują się charakterystyczne fragmenty na końcu N i C białka, których roli wcześniej nie określono. W pracy przedstawiono metodę oczyszczania i rozdziału rekombinowanych fragmentów Stm. Udowodniono, że mimo nieuporządkowanej struktury obu fragmentów, różnią się one funkcjonalnie. Analiza fosforylacji i testy biomineralizacyjne *in vitro* wykazały, że koniec C białka jest odpowiedzialny za aktywności biomineralizacyjną Stm. Po raz pierwszy opracowano również procedurę izolacji homologu Stm z otolitów. Oczyszczono i wstępnie scharakteryzowano białko Starmaker-like z karpia zwyczajnego (kStm-l). Analizy wykazały, że kStm-l posiada nieuporządkowaną strukturę i występuje w formie ufosforylowanej *in vivo*. Homolog Stm z karpia kontroluje wielkość, ilość i odmianę polimorficzną kryształów węglanu wapnia *in vitro*. Dodatkowo, badania proteomiczne przyczyniły się do identyfikacji wielu, nowych białek obecnych w otolitach.

Summary

Biom mineralization is a complicated and still poorly understood process of creating minerals by living organisms. Acidic proteins that are intrinsically disordered and have high level of post-translational modifications, fulfill a special role in regulation of biom mineralization. Starmaker (Stm) is one of such proteins, which controls biom mineralization of zebrafish (*Danio rerio*) otoliths. Otoliths are calcium carbonate biom minerals that are involved in sensing changes in linear acceleration and balance in fish. *In vivo*, Stm regulates size and shape of otoliths, and inhibition of the protein expression contributes to changes in otolith polymorph from aragonite to calcite. The recombinant protein undergoes phosphorylation and controls biom mineralization of calcium carbonate *in vitro*.

The phosphorylation of Stm *in vivo* was confirmed using proteomics approach. It was also shown that the protein is present in both, aragonite and vaterite otoliths of zebrafish. There are two characteristic fragments in N- and C-end of the protein sequence, which roles have not yet been determined. A method of purification and separation of recombined fragments of Stm was developed. It was proven that regardless the disordered structure of both fragments, they differ in functions. An analysis of phosphorylation and biom mineralization tests *in vitro* has shown that the C-end of the protein is responsible for biom mineralization activity of Stm. For the first time, a procedure of isolation of Stm homolog from otoliths was developed. Starmaker-like protein from common carp (kStm-l) was purified and preliminary characterized. Analysis have shown that kStm-l has intrinsically disordered structure and appears in phosphorylated form *in vivo*. Stm homolog from carp controls size, amount and polymorph of calcium carbonate crystals *in vitro*. Additionally, the proteomics research contributed to identification of many new proteins present in otoliths.