



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



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

KATEDRA BIOCHEMII, BIOLOGII MOLEKULARNEJ I BIOTECHNOLOGII

LABORATORIUM BIOCHEMII I BIOLOGII MOLEKULARNEJ

WYDZIAŁ CHEMICZNY

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA

oraz

INSTYTUT PALEOBIOLOGII IM. ROMANA KOZŁOWSKIEGO

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Otolina -1 – białko biomineralizacji ludzkich otokoniów i rybich otolitów

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr inż. Klaudia Bielak

Promotorzy:

prof. dr hab. inż. Piotr Dobryzkycki

prof. dr hab. Jarosław Stolarski

Wrocław, 2023



Politechnika Wrocławska



Uniwersytet
Wrocławski



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

Projekt współfinansowany przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Podziękowania

Pragnę podziękować moim promotorom, **Profesorowi Piotrowi Dobryszkiemu** i **Profesorowi Jarosławowi Stolarskiemu**, za wprowadzenie mnie w niezwykle ciekawą tematykę badawczą, przekazaną wiedzę i wskazówki, pomoc, cierpliwość oraz poświęcony czas, abym mogła ukończyć rozprawę doktorską.

◇◇◇

Profesorowi Andrzejowi Ożyharowi dziękuję za cenne rady, dyskusje oraz możliwość realizacji pracy w Katedrze Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii.

◇◇◇

Doktor Annie Zogłówek dziękuję, że wzięła mnie pod swoje skrzydła na początku mojej przygody z nauką, jeszcze w czasie studiów I i II stopnia, za jej niezliczoną pomoc, życzliwość i otwartość.

◇◇◇

Pragnę podziękować wszystkim, z którymi miałam okazję współpracować naukowo, w szczególności **dr Jeanie Drake**, **dr Mariuszowi Czarnockiemu-Cieciurze**, **dr inż. Rafałowi Hołubowiczowi** oraz **dr inż. Andrzejowi Żakowi**.

◇◇◇

Pragnę z całego serca podziękować wszystkim moim **koleżankom** i **kolegom** z Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej za pomoc w codziennej pracy oraz wsparcie. Obecny i byłym już **doktorantom** i **doktorantkom** (oraz **Karolinie**) dziękuję za miło spędzony czas i znajomość, która nie ograniczyła się jedynie do murów Politechniki.

◇◇◇

Najserdeczniejsze podziękowania pragnę złożyć moim najbliższym – **Mamie**, **Tacie** i **Dziadkowi**, za niezachwianą wiarę we mnie i moje możliwości, za cieszenie się ze wszystkich małych sukcesów i pełne zrozumienie. **Franzowi** pragnę podziękować za cierpliwość i spokój, które pozwalały mi przejść przez trudne momenty. Moim **przyjaciółom**, w szczególności **Monice** i **Magdzie**, dziękuję za niebywałe wsparcie.

*Pracę dedykuję moim najbliższym:
rodzicom i dziadkowi.*

Spis treści

Spis skrótów	9
Streszczenie	11
Summary	12
1. Wstęp.....	13
1.1. Biomineralizacja i biominerały	14
1.2. Ucho wewnętrzne i jego biominerały – otolity oraz otokonionia	23
1.3. Macierz otolitów i otokonionów	25
1.4. Otolina-1 – białko biomineralizacji otolitów i otokonionów	28
1.5. Interdyscyplinarność badań biomineralizacyjnych	33
2. Cel pracy	35
3. Materiały	36
3.1. Odczynniki, zestawy komercyjne	36
3.2. Plazmidy oraz oligonukleotydy	38
3.3. Szczepy bakteryjne.....	39
3.4. Otolity oraz endolimfa	39
3.5. Podłoża hodowlane, antybiotyki.....	40
3.6. Roztwory i bufory.....	40
4. Metody	43
4.1. Podstawowe techniki pracy z DNA i białkami	43
4.2. Ekspresja i oczyszczanie otoliny-1 z <i>Danio rerio</i> i <i>Homo sapiens</i>	44
4.2.1. Ekspresja białek w komórkach bakteryjnych.....	44
4.2.2. Liza komórek bakteryjnych.....	44
4.2.3. Techniki chromatograficzne	45
4.3. Analizy bioinformatyczne.....	46
4.4. Wyznaczanie masy cząsteczkowej białek z użyciem spektrometrii mas.....	47
4.5. Techniki spektroskopowe użyte przy analizie właściwości dOtol1 i hOtol1	47
4.6. Pomiar parametry hydrodynamicznych do analizy właściwości dOtol1 i hOtol1	49
4.7. Techniki mikroskopowe użyte przy analizie dOtol1 i hOtol1	50
4.8. Sieciowanie chemiczne	51
4.9. Test aktywności biomineralizacyjnej <i>in vitro</i> dOtol1 i hOtol1.....	52
4.10. Techniki mikroskopowe użyte do analizy biominerałów oraz otolitów	53
4.10.1. Mikroskopia świetlna i fluorescencyjna.....	53
4.11. Analiza proteomu i identyfikacja białek otolitów	55
4.11.1. Preparacja macierzy organicznej otolitów	55
4.11.2. Tandemowa spektrometria mas	56
5. Wyniki	58
5.1. Analizy bioinformatyczne sekwencji otoliny-1.....	58
5.2. Otrzymanie preparatów rekombinowanej otoliny-1	59
5.2.1. Strategia preparacji dOtol1 oraz hOtol1	60

5.2.2.	Preparacja dOtol1.....	60
5.2.3.	Preparacja hOtol1.....	61
5.3.	Badania właściwości molekularnych otoliny-1.....	63
5.3.1.	Porównanie struktury drugo- i trzeciorzędowej otoliny-1 z <i>Danio rerio</i> i <i>Homo sapiens</i>	63
5.3.2.	Oligomeryzacja otoliny-1.....	64
5.3.3.	Próba otrzymania modeli struktury otoliny-1 z użyciem mikroskopii krioelektronowej.....	68
5.3.4.	Wpływ jonów wapnia na właściwości molekularne otoliny-1.....	70
5.4.	Badania aktywności biomineralizacyjnej otoliny-1.....	79
5.4.1.	Wpływ otoliny-1 na morfologię i wzrost kryształów.....	80
5.4.2.	Lokalizacja i dystrybucja otoliny-1 w kryształach węglanu wapnia.....	83
5.5.	Badania proteomiczne otolitów <i>Cyprinus carpio</i> oraz <i>Gadiculus argenteus</i>	85
5.5.1.	Przygotowanie otolitów i macierzy otolitycznej.....	85
5.5.2.	Identyfikacja białek macierzy kopalnych otolitów <i>Gadiculus argenteus</i>	87
5.5.3.	Identyfikacja białek macierzy otolitów i endolimfy <i>Cyprinus carpio</i>	88
5.5.4.	Identyfikacja otoliny-1 z <i>Cyprinus carpio</i> oraz jej potencjalnych izoform.....	90
6.	Dyskusja.....	92
6.1.	Analiza bioinformatyczna sekwencji i preparacja otoliny-1.....	93
6.2.	Badania roli otoliny-1 w biomineralizacji węglanu wapnia.....	95
6.3.	Właściwości molekularne rybiej i ludzkiej otoliny-1 – podobieństwa i różnice.....	96
6.4.	Rola otoliny-1 w bioinspirowanej mineralizacji węglanu wapnia.....	100
6.5.	Badania proteomiczne i paleoproteomiczne otolitów <i>Cyprinus carpio</i> i <i>Gadiculus argenteus</i>	102
7.	Podsumowanie i perspektywy dalszych badań.....	105
8.	Spis rysunków i tabel.....	109
9.	Dorobek naukowy.....	111
10.	Dodatek.....	114
11.	Bibliografia.....	120

Spis skrótów

Skrót	Rozwinięcie
2PEFM	mikroskopia fluorescencyjna wzbudzana dwufotonowo, ang. <i>two-photon excited fluorescence microscopy</i>
A ₂₈₀	absorbancja przy 280 nm
ACC	amorficzny węglan wapnia, ang. <i>amorphous calcium carbonate</i>
AFM	mikroskopia sił atomowych, ang. <i>atomic force microscopy</i>
ANS	kwask 8-anilinonaftaleno-1-sulfonowy
BLAST	ang. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPPV	łagodne położeniowe zawroty głowy, ang. <i>benign paroxysmal positional vertigo</i>
C1q	białko układu dopełniacza
CARP	kwasowe białka koralowców, ang. <i>coral acid rich proteins</i>
cDNA	komplementarne DNA
CF	współczynnik korekcyjny, ang. <i>correction factor</i>
CLMS	mikroskopia konfokalna, ang. <i>confocal laser scanning microscopy</i>
CNT	teoria klasycznej nukleacji, ang. <i>classical nucleation theory</i>
COPROs	białka kokolitów, ang. <i>cocolith proteins</i>
CryoEM	kriomikroskopia elektronowa, ang. <i>cryoelectron microscopy</i>
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła, ang. <i>dynamic light scattering</i>
DOL	współczynnik wyznakowania, ang. <i>degree of labeling</i>
DSF	różnicowa fluorymetria skaningowa, ang. <i>differential scanning fluorimetry</i>
DTT	ditiotreitol
EDS	spektroskopia z dyspersją energii, ang. <i>energy dispersive spectroscopy</i>
EDTA	kwask wersenowy, ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ESI-QTOF	jonizacja typu elektrospray i hybrydowy analizator typu kwadrupol-czasu przelotu, ang. <i>electrospray ionization – quadrupole time of flight</i>
f/f ₀	współczynnik tarcia
FPLC	szybka chromatografia cieczowa białek, ang. <i>fast protein liquid chromatography</i>
IMAC	chromatografia powinowactwa do złoża metalu, ang. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>
IPTG	izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozyd
LC-MS/MS	chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas, ang. <i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>

Spis skrótów

MCS	polilinker, miejsce wielokrotnego klonowania, ang. <i>multiple cloning site</i>
Oc90	otokonina 90
OD ₆₀₀	gęstość optyczna przy 600 nm
OMM64	makromolekuła macierzy otolitów 64, ang. <i>otolith matrix macromolecule 64</i>
OMP1	białko macierzy otolitów -1, ang. <i>otolith matrix protein-1</i>
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	ang. <i>Protein Data Bank</i>
PILP	ciekły prekursor inicjowany polimerem, ang. <i>polimer induced liquid precursor</i>
PMSF	fluorek fenylometylosulfonylu
PNC	stabilny klaster pre nukleacyjny, ang. <i>stable prenucleation cluster pathway</i>
PVDF	polifluorek winylidenu
R	hydrodynamiczny promień skumulowany
RMSD	średnia kwadratowa błędu
RPC	chromatografia odwróconej fazy, ang. <i>reversed phase chromatography</i>
S	współczynnik sedymentacji
SDS-PAGE	elektroforeza w żelu poliakryloamidowym
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa, ang. <i>scanning electron microscopy</i>
SM	macierz rozpuszczalna, ang. <i>soluble matrix</i>
sPNC	alternatywna droga krystalizacji, ang. <i>stable prenucleation cluster pathway</i>
Stm	białko Starmaker
SV-AUC	analityczne ultrawiwowanie szybkościowe
$\overline{S}_{W_{20}}$	uśredniony współczynnik sedymentacji skorygowany o wodę
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa, ang. <i>transmission electron microscopy</i>
UPLC	ultrasprawną chromatografią cieczą, ang. <i>ultra-performance liquid chromatography</i>
V _e	objętość elucji
V ₀	objętość zerowa

Streszczenie

Biomineralizacja jest procesem podlegającym ścisłej kontroli fizjologicznej, w wyniku którego organizmy żywe wytwarzają struktury mineralne pełniące różnorodne funkcje. Interesującymi strukturami biomineralnymi występującymi wśród kręgowców są otolity i otokonia – zbudowane z biogenicznego węglanu wapnia sensory grawitacji i przyspieszenia liniowego, zlokalizowane w uchu wewnętrznym. Otolity i otokonia posiadają poniżej 10% macierzy organicznej, której składniki białkowe odgrywają kluczową rolę w ich postawaniu. Jednym ze składników macierzy organicznej ludzkich otokoniów i rybich otolitów jest otolina-1 - białko podobne, chociaż krótsze, do kolagenu należące do nadrodziny białek C1q. Otolina-1 jest otokoniną specyficzną dla ucha wewnętrznego, której rola biologiczna została nakreślona m.in. w badaniach nad *Danio rerio*, słodkowodnej ryby będącej organizmem modelowym m.in. chorób ucha człowieka. Molekularne podstawy działania poszczególnych składników macierzy organicznej otolitów i otokoniów są niezbędne do poznania mechanizmów ich mineralizacji oraz chorób związanych z uchem wewnętrznym, takich jak łagodne położeńiowe zawroty głowy.

Celem pracy doktorskiej było dokonanie analizy porównawczej otoliny-1 z *Danio rerio* oraz *Homo sapiens*, skupiając się na badaniach nad właściwościami molekularnymi białek w obecności naturalnego liganda – jonów wapnia, oraz poznania ich roli w eksperymentach bioinspirowanej mineralizacji węglanu wapnia *in vitro*. Część pracy skupiała się na analizie proteomu otolitów *Cyprinus carpio* oraz kopalnych otolitów *Gadiculus argenteus*. Opracowanie metody nadekspresji i oczyszczania rekombinowanej otoliny-1 pozwoliły na przeprowadzenie analizy strukturalno-funkcjonalnej białek. Pomimo wysokiego podobieństwa sekwencji aminokwasowych i struktury drugorzędowej otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*, przekładających się na ogólne własności badanych białek, szczegóły relacji struktura-funkcja mogą być kluczowe dla zrozumienia ich roli w mineralizacji otolitów oraz otokoniów. Wykazano, że obecność jonów wapnia stabilizuje termicznie otolinę-1 oraz wpływa na tworzone przez nią oligomery. Przeprowadzone analizy wskazują, że niższe stężenia jonów wapnia wywierają silny wpływ na otolinę-1 z *Homo sapiens*, w odróżnieniu od otoliny-1 z *Danio rerio* modulowanej wyższymi stężeniami jonów wapnia. W pracy zaprezentowano częściowy, niskorozdzielczy obraz 3D otoliny-1 z *Danio rerio* uzyskany z użyciem mikroskopii krioelektronowej. W wyniku eksperymentów bioinspirowanej mineralizacji węglanu wapnia w obecności otoliny-1 zaproponowano rolę białka związaną z nukleacją oraz selektywną inhibicją budowania ścian kryształów z jednoczesnym indukowaniem powstawania kolejnych płaszczyzn mineralizacji. Zjawisko to jest szczególnie widoczne dla homologa z *Danio rerio*. W wyniku badań proteomicznych otolitów *Cyprinus carpio* zidentyfikowano białka będące potencjalnymi izoformami otoliny-1. Z kolei analiza proteomu kopalnych otolitów *Gadiculus argenteus* wykazała obecność dwóch białek lub ich fragmentów zachowanych w otolitach datowanych na epokę pliocenu.

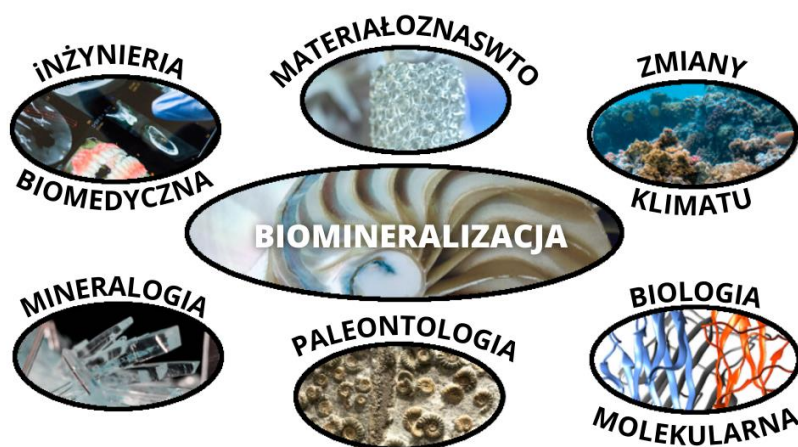
Summary

Biomineralization is a physiologically regulated process in which living organisms produce mineral structures that provide a variety of functions. Otoliths and otoconia, sensors of gravity and acceleration composed of biogenic calcium carbonate and located in the inner ear - are two intriguing biomineral structures found among vertebrates. Otoliths and otoconia consist of less than 10% organic matrix, of which protein components play a key role in their formation. One of the components of the organic matrix of human otoconia and fish otoliths is otolin-1, a short collagen-like protein, a member of the C1q superfamily. Otolin-1 is an inner ear-specific otoconin whose biological role has been outlined in studies on *Danio rerio*, a model organism for human ear diseases. The molecular basis of the action of otoliths and otoconia organic matrix individual components is essential for understanding the mechanisms of their mineralization and diseases associated with the inner ear, such as benign positional vertigo.

The aim of the thesis was to perform a comparative study of otolin-1 from *Danio rerio* and *Homo sapiens*, focusing on their molecular properties in the presence of a natural ligand - calcium ions, and to recognize their role in bioinspired mineralization of calcium carbonate *in vitro*. Part of the work focused on the analysis of the proteome of *Cyprinus carpio* otoliths and *Gadiculus argenteus* fossil otoliths. The development of overexpression and purification method of recombinant otolin-1 allowed an in-depth structural and functional analysis of the proteins. Despite the high similarity of the amino acid sequences and the secondary structure of otolin-1 from *Danio rerio* and *Homo sapiens* reflecting the general tendencies of the proteins studied, the details of their molecular behavior may be crucial for their role in the mineralization of otoliths and otoconia. The presence of calcium ions was shown to thermally stabilize otolin-1 and affect the formation of its oligomers. Conducted analyses indicate, that lower concentrations of calcium ions have a high effect on otolin-1 from *Homo sapiens*, in contrast to otolin-1 from *Danio rerio* modulated by higher concentrations. Additionally, a partial, low-resolution 3D map of otolin-1 from *Danio rerio* obtained using cryo-electron microscopy was shown. As a result of a set of bioinspired calcium carbonate mineralization experiments in the presence of otolin-1, the role for the protein related to nucleation and selective inhibition of crystal walls with simultaneous induction of the formation of subsequent mineralization planes was proposed. This phenomenon is specifically evident for the *Danio rerio* homolog. Proteomic studies on *Cyprinus carpio* otoliths have identified proteins, that could be potential isoforms of otolin-1. Analyzing the proteome of the fossil otoliths from *Gadiculus argenteus* revealed the presence of two proteins or their fragments preserved in the otoliths dating to the Pliocene era.

1. Wstęp

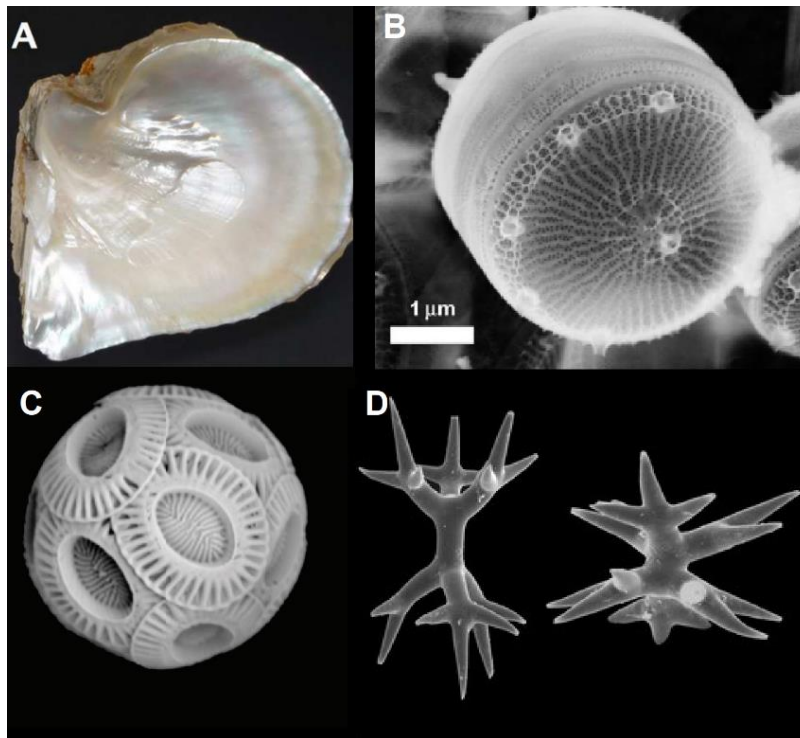
Biominaerały to szczególny rodzaj minerałów, których właściwości odbiegają od ich syntetycznych lub geologicznych, abiotycznych odpowiedników ze względu na wpływ biogenicznych cząsteczek organicznych na ich powstanie (Weiner, 2008). Powstają w wyniku biomineralizacji – fizjologicznego procesu zachodzącego w żywym organizmie, polegającym na powiązaniu powstawania minerału z aktywnością biologiczną tworzonych przez organizm cząsteczek organicznych (w szczególności białek). Formowane są w ściśle określonym czasie i przestrzeni, zachowując precyzję formy (Weiner i Dove, 2003). Szczególne właściwości mechaniczne biominerałów, wynikające ze współistnienia materii nieorganicznej z organiczną w jednej strukturze, stanowią klucz do pełnienia przez nie wyspecjalizowanych funkcji. Masa perłowa - aragonitowy biominerał węgla wapnia muszli mięczaków, posiada w swoim składzie około 5% macierzy organicznej. Pomimo stosunkowo niewielkiej ilości macierzy organicznej, jej odporność mechaniczna jest około 3000 razy większa niż nieorganicznego aragonitu (Jackson et al., 1988). Dzięki obecności macierzy organicznej muszla jest bardziej odporna na pęknięcia. Kluczem do zachowania jej funkcji ochronnej jest jej hierarchiczna i kompozytowa budowa. Masa perłowa zbudowana jest ze stosów, bardzo drobnych aragonitowych płytek, ściśle powiązanych z macierzą organiczną. Efektem tej kompozytowej budowy jest zwiększona wytrzymałość muszli na nacisk (technologiczną inspiracją wywodzącą się z kompozytowego charakteru muszli mięczaków są m.in. kompozytowe płyty pokrywające pancerz czołgów) (Loh et al., 2020). Z tego względu badania skupiające się na procesach biomineralizacyjnych często łączą w sobie wiele dziedzin nauki, a zjawisko kontrolowanej biologicznie mineralizacji znajduje zastosowanie w m.in. materiałoznawstwie czy inżynierii biomedycznej. Różnorodność biominerałów, rozpowszechnienie i elementy regulujące ich powstawanie czynią je niezwykle interesującym obiektem badawczym (Rysunek 1).



Rysunek 1. Biomineralizacja i jej zastosowanie. Zaznaczone dziedziny nauk mają bezpośredni związek z procesami biomineralizacyjnymi. Tworzenie nowych materiałów kompozytowych, badania nad frakcją mineralną i organiczną biominerałów oraz badania skamieniałości pokazują interdyscyplinarność procesu.

1.1. Biomineralizacja i biominerały

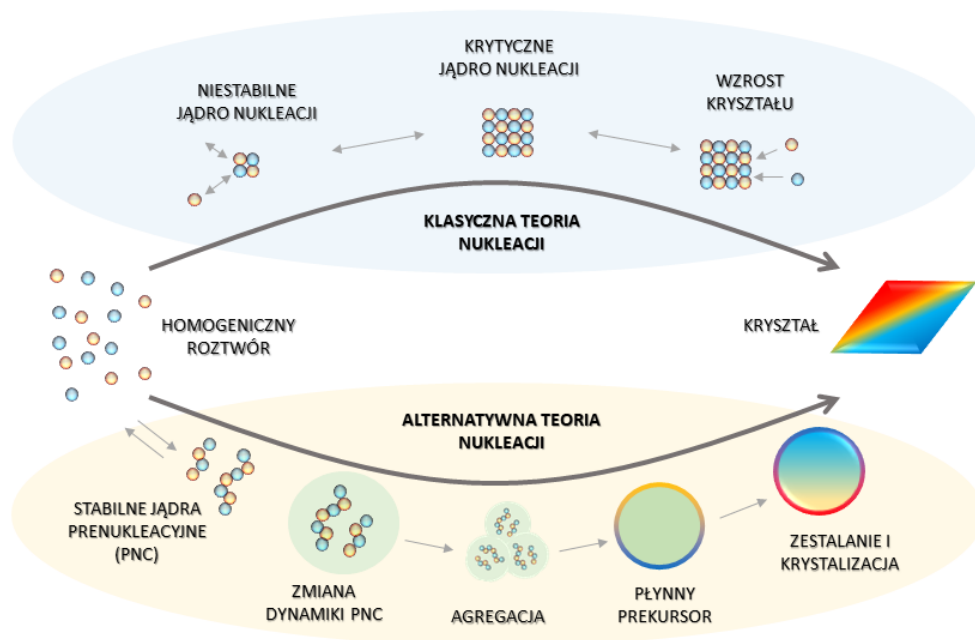
Do około 1980 roku termin *kalcyfikacja* odnosił się do biologicznie kontrolowanej mineralizacji, ze względu na szerokie rozpowszechnienie minerałów wapnia w przyrodzie (Weiner i Dove, 2003). Został on jednak zastąpiony przez *biomineralizację* odnoszącym się do szeregu aktywności biologicznych skutkujących powstaniem kompozytowego materiału składającego się z kryształów nieorganicznej soli wzrastających w obecności makromolekuł (Rysunek 2). Obecnie znanych jest około 64 biominerałów, z czego połowę stanowią wspomniane minerały zawierające wapń (Knoll, 2003). Najliczniejszymi grupami minerałów zawierających jony wapnia są węglany i fosforany (Lowenstam i Weiner, 1989). Są one rozpowszechnione między różnymi grupami organizmów i najczęściej stanowią endo- i egzozszkielety. Niemniej, minerały inne niż sole wapnia, jak np. tlenek krzemu, również obecne są w przyrodzie. Wiele biominerałów posiada domieszki pierwiastków śladowych, jak na przykład strontu i baru wbudowanych w sieć krystaliczną rybich otolitów (Hüssy et al., 2021). Wbudowanie pierwiastków śladowych w strukturę mineralną jest również wynikiem aktywnego, a nie biernego procesu. Obecność magnezu w szkielecie koralowców, pomimo, że odzwierciedla poziom jonów znajdujących się w środowisku, podlega fizjologicznej kontroli organizmu nad biominerałem (Brahmi, et al., 2012).



Rysunek 2. Różnorodne formy biominerałów. Zestawienie przedstawia (A) muszlę małży *Pinctada* z połyskującą masą perłową, (B) okrzemka *Thalassiosira pseudonana* z wysyconą krzemionką ścianą komórkową, (C) kokolitofor z gatunku *Emiliana huxleyi* z owalnymi blaszkami wapiennymi, (D) spikule gąbki z gatunku *Samus anonymus*. Zdjęcia nie oddają skali.

Na podstawie: (Balch, 2018; Łukowiak, 2020; Sumper, 2008; Zhang et al., 2017)

Powstawanie struktur biomineralnych jest ściśle kontrolowane. Zaczynając od precyzyjnie zdefiniowanych przestrzeni, w których powstaje (wewnątrz-, zewnątrz- i międzykomórkowej), poprzez regulację ekspresji genów, aktywność powstających białek, regulację nukleacji i tempa wzrostu kryształu, kończąc na ewentualnym transporcie struktury do miejsca, w którym występuje (Mann, 2001). Mechanizmy nukleacji i wzrostu biominerałów nie są do końca jasne. Do tej pory w kontekście tworzenia biominerałów węglanu wapnia, rozpatruje się dwa modele nukleacji opisujące klasyczną oraz alternatywną teorię nukleacji (Rysunek 3) (Gebauer et al., 2018). Klasyczna teoria (CNT, ang. *classical nucleation theory*) zakłada, że nukleacja kryształu następuje w wyniku pokonania bariery energii swobodnej przez składowe układu mineralizacyjnego. Następuje ona po przekroczeniu przez zarodek kryształu wielkości krytycznej (de Yoreo, 2003). Początkowo utworzone metastabilne jądro nukleacji przyrasta poprzez dodawanie nowych jonów, do momentu przekroczenia granicy energii potrzebnej do powstania stabilnego jądra. W przypadku alternatywnej teorii nukleacji (sPNC, ang. *stable prenucleation cluster pathway*) proces nukleacji kryształów przypisywany jest zmianom dynamiki tworzenia stabilnych jąder prenukleacyjnych (PNC) powstających w wyniku asocjacji jonów (Gebauer et al., 2008; Gebauer i Cölfen, 2011). Powstałe PNC mogą tworzyć większe nanocząstki, które stają się energetycznie niekorzystne i w rezultacie agregują, inicjując tym samym wzrost kryształu. Możliwe, że w przypadku biologicznie kontrolowanej mineralizacji dochodzi do procesu na drodze sPNC, jak w przypadku tworzenia węglanu wapnia w obecności alginianów (Rao et al., 2016).



Rysunek 3 Procesy zarodkowania i wzrostu kryształów węglanu wapnia. Górny panel przedstawia schemat powstawania jądra nukleacji i wzrost kryształu węglanu wapnia w oparciu o klasyczną teorię nukleacji, dolny panel odnosi się do alternatywnej drogi powstawania węglanu wapnia w oparciu o stabilne jądra prenukleacyjne (sPNC) Na podstawie:

(Gebauer et al., 2018)

Na powstawanie biominerału składa się wiele synergicznych procesów wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych. Jednym z kluczowych elementów regulujących powstawanie biominerałów są białka, które mogą być zaangażowane w proces w sposób pośredni, jak i bezpośredni. Do białek pośredniczących w procesach biomineralizacyjnych można zaliczyć takie, które regulują ekspresję genów kodujących białka biomineralizacyjne, pompy i transportery jonów, ATPazy, czy białka wykazujące aktywność enzymatyczną potrzebną do wprowadzania modyfikacji potranslacyjnych w białkach bezpośrednio zaangażowanych w proces (kinazy, fosfatazy, proteazy, transferazy) oraz inne enzymy, jak anhidraza węglanowa (Boskey, 1998; Falini i Fermani, 2017). Z kolei białka bezpośrednio regulujące wzrost kryształów najczęściej posiadają zdolność wiązania jonów, są w stanie oddziaływać z powstającym minerałem, w rezultacie hamować jego wzrost, ale również uczestniczyć w powstawaniu nowych kierunków i płaszczyzn mineralizacji (Addadi i Weiner, 1992).

Białka zaangażowane w proces umownie dzieli się na nierozpuszczalne białka macierzy organicznej tworzące tzw. rusztowanie (ang. *scaffold*) lub białka rozpuszczalne - SM (ang. *soluble matrix*). Białka tworzące rusztowanie to najczęściej białka kolagenowe oraz bezpośrednio z nimi oddziałujące, dodatkowo rekrutujące inne, niebiałkowe składniki macierzy organicznej (cukry, proteoglikany, lipidy) (Kawasaki et al., 2009; Weiner i Dove, 2003). Charakterystyczną cechą biomineralizacyjnych białek SM jest ich skład aminokwasowy - najczęściej białka te są polielektrolitami. Często białka kwasowe zaangażowane w procesy biomineralizacyjne należą do grupy białek inherentnie nieuporządkowanych (IDP, ang. *intrinsically disordered proteins*), a brak ściśle zdefiniowanej struktury jest kluczowy dla oddziaływań z minerałem (Boskey i Villarreal-Ramirez, 2016). Wszystkie opisane składniki macierzy organicznej nadają biominerałom niepowtarzalne struktury i właściwości.

Tabela 1. przedstawia zestawienie wybranych biominerałów występujących w przyrodzie, które zostaną omówione w dalszej części. Ze względu na tematykę pracy, mechanizmy stojące za powstawaniem rybich otolitów i ludzkich otokoniów zostaną omówione szerzej w dalszej części wstępu.

Różnorodność nieorganicznych i organicznych składników biominerałów i ich obecność wśród organizmów pochodzących z różnych królestw jest najlepszym przykładem użyteczności struktur zmineralizowanych w organizmach żywych. Szacuje się, że ponad 3500 milionów lat temu, organizmy prokariotyczne rozwinęły możliwość wytwarzania cząsteczek mineralnych, które później zostały zaadaptowane przez organizmy wyższe (Weiner i Dove, 2003). Magnetosomy - bakteryjne organella będące biominerałami Fe_3O_4 lub Fe_3S_4 , wykazują właściwości ferromagnetyczne i pozwalają bakterii na orientację w polu magnetycznym Ziemi. Badania magnetosomów *Magnetospirillum magnetotacticum* pokazują, że biominerały te również posiadają organiczną macierz, na którą składa

Wstęp

Tabela 1 Przykłady biominerałów. Biominerały zostały pogrupowane ze względu na organizmy, w których występują, pełnioną funkcję oraz składniki. Znakiem * zaznaczona została indukowana biologicznie mineralizacja.

KRÓLESTWO	GRUPA ORGANIZMÓW	BIOMINERAŁ	FUNKCJA	CZĘŚĆ MINERALNA	GŁÓWNE SKŁADNIKI BIAŁKOWE	ODNOŚNIK
PROKARIOTA	Bakteria	Magnetosom	Magnetotaksja	Magnetyt, greigit	Mam12, Mam 22, MmsF, MamJ	(Azuma et al., 2006; Karen et al., 2004; Murat et al., 2012)
PROTISTY	Okrzemki	Pancerzyk	Ochrona mechaniczna	Tlenek krzemu	silafiny	(Pamirsky et al., 2013)
	Kokolitofory	Kokolit		Węglan wapnia	Białka COPRO	(Skeffington et al., 2022)
GRZYBY	Grzyby strzępkowe	Zmineralizowane strzępki	Ochrona przed metalami	Sole szczawianów	*	(Gadd et al., 2014)
ROŚLINY	Kaktusowate Obrazkowate Psiankowate	Druzy	Ochronna, magazyn wapnia	Szczawian wapnia, węglan wapnia	-	(Bouropoulos et al., 2001; X. Li et al., 2003; Monje, et al. 2002)
	Wiechlinowate	Fitolity	Ochrona przed temperaturą	Tlenek krzemu	Siliplant1	(Kumar et al., 2021)
ZWIERZĘTA	Kręgowce	Kości	Strukturalna, podporowa	Fosforan wapnia	Osteokalcyna, osteopontyna, sjaloproteina, kolageny	(Fujisawa et al., 2012)
		Zębina, szkliwo	Rozdrabnianie pokarmów		DPP, DSP	(Moradian-Oldak et al., 2021)
		Otolity, otokonionia	Odczuwanie grawitacji	Starmaker, OMP-1, SPARC, otolina-1	(Lundberg et al., 2015)	
	Mięczaki	Muszle	Ochronna	Węglan wapnia	Aspeina	(Takeuchi et al., 2008)
	Szkarłupnie	Kolce			SM30, SM50	(Jain et al., 2016)
	Skorupiaki	Egzoszkielec			CAP-1	(Inoue et al., 2007)
	Korale rafotwórcze	Szkielet			Białka CARP	(Drake et al., 2013)
	Gąbki	Spikule		Węglan wapnia lub tlenek krzemu	Silikateina, Silintafina-1, gļasyna	(Kumar et al., 2021)

się głównie białko Mam22, a z kolei głównym białkowym elementem błony magnetosomu jest białko Mam12 (Azuma et al., 2006). Białko Mam22 posiada tandemowe powtórzenia motywu TPR (tetratrikopeptydowego), które najprawdopodobniej wyznaczają rolę białka jako mediatora

interakcji białek macierzy. Z kolei białko MmsF zaangażowane jest w proces dojrzewania magnetosomu i jego morfogenezy, jednak nie jest niezbędne do jego nukleacji (Murat et al., 2012). Białko MamJ, zaangażowane w proces mineralizacji magnetosomów *M. gryphiswaldense*, jest przedstawicielem kwasowych białek bogatych w reszty Glu i Asp. Ze względu na jego charakter spekuluje się, że może być czynnikiem wiążącym jony żelaza niezbędnych do powstania organellum (Karen et al., 2004). Pomimo stosunkowej prostoty komórek prokariotycznych, formowanie magnetosomu podlega równie ścisłej regulacji, co powstawanie struktur zmineralizowanych w jednokomórkowych organizmach wyższych rzędów, takich jak okrzemki i kokolitofofy (Rysunek 2B,C). Ściana komórkowa okrzemków, autotroficznych glonów, wysycona jest krzemionką, która powstaje w wyspecjalizowanych pęcherzykach SDV (ang. *silica deposition vesicle*). Silafiny, będące grupą białek zaangażowanych w proces silifikacji ściany komórkowej okrzemków, są bogate w reszty Ser i Lys. Białka te są ekstensywnie modyfikowane, przez co nadawany jest im silny ładunek ujemny. Silafiny wraz z poliaminami, tworzą organiczną macierz krzemionki, inicjując jej powstawanie z kwasu krzemowego. Regulacja procesu silifikacji zależy od miejscowego stężenia silafin. W obecności wysokich stężeń białek, a niskich poliamin, wytrącanie krzemionki jest ograniczone, natomiast w sytuacji odwrotnej następuje nasilenie tworzenia tlenku krzemu (Pamirsky, 2013).

Emiliania huxley, gatunek kokolitoforów, jest zarazem organizmem modelowym oraz najbardziej znanym przedstawicielem swojej grupy, ze względu na morfologię formowanych kokolitów (Rysunek 2C). Badania nad mineralizacją tych glonów najczęściej skupiają się na ich roli w biologii oceanów oraz ekologii - są one jednym z głównych organizmów wiążących atmosferyczny dwutlenek węgla do formy węglanu wapnia, a mechanizm ich biomineralizacji jest obecnie zachwiany przez zakwaszenie oceanów (Brownlee et al., 2015). Niestety w literaturze istnieje niewiele bezpośrednich doniesień na temat białek zaangażowanych w proces mineralizacji kokolitów. Ostatnie badania łączące w sobie podejście genomiki, transkryptomiki i proteomiki pozwoliły na zidentyfikowanie 26 białek mogących pełnić funkcję w mineralizacji kokolitów (grupa COPROs, ang. *cocolith proteins*). Wśród wytypowanych białek 6 posiadało motyw pentapeptydowy, mogący stanowić element strukturalny dla powstających kokolitów. Kolejne z białek posiada domenę MAM typową dla adhezyjnych białek zewnątrzkomórkowych oraz inne białka, fosforylowane, posiadające motyw bogaty w prolinę (Skeffington et al., 2022).

Procesy kontrolowanej biologicznie mineralizacji nie są jedynymi, w których organizmy żywe wytwarzają minerały. W przypadku wielu bakterii i grzybów strzępkowych dochodzi do procesów biologicznie indukowanej mineralizacji, najczęściej zewnątrzkomórkowo pod wpływem lub z udziałem niskocząsteczkowych metabolitów (Frankel i Bazyliński, 2003). Powstające w ten sposób minerały, jak na przykład sole szczawianów, pełnią funkcję ochrony przed toksycznymi dla komórek

metalami chelatowanymi kwasem szczawiowym, ale też pozwalają na przytwierdzenie grzybów do powierzchni ich siedliska (Gadd et al., 2014).

Wśród roślin, biominerały najczęściej są podstawą mechanizmów ochronnych, zarówno przed drapieżnikami (druzy) jak i czynnikami atmosferycznymi (fitolity). Druzy, będące drobnymi minerałami szczawianu lub węglanu wapnia, obecne są w niemalże wszystkich organach roślinnych. Okazuje się, że w druzach *Pistia stratiotes* obecne są minimum 3 białka, główne - o masie 55 kDa oraz w mniejszości białka o masie 60 i 63 kDa, posiadające aminokwasy kwasowe wiążące jony wapnia (Li et al., 2003). Białka izolowane z druzów liści pomidora *Lycopersicon esculentum* i tytoniu *Nicotiana tabacum* wykazują dużą ilość reszt Glu, ale również Gln, Gly i Ser. W badaniach *in vitro* nad mineralizacją szczawianu wapnia pokazano ich aktywność kontrolującą morfologię kryształów oraz wzrost ich wybranej płaszczyzny (Bouropoulos et al., 2001). Fitolity, roślinne biominerały tlenu krzemu, obecne we wszystkich roślinnych organach pełnią funkcję ochronną. Najczęściej również wysycają korzenie roślin wiechlinowatych. Jednym z lepiej poznanych białek zaangażowanych w biomineralizację fitolitów jest siliplant-1. Rekombinowane siliplant-1 z sorgo *Sorghum bicolor* jest w stanie wytrącić krzemionkę z roztworu kwasu krzemowego *in vitro*. W swojej budowie posiada fragment bogaty w reszty Pro, Lys i Glu, który po odseparowaniu od białka pełnej długości wykazuje wzmożone właściwości mineralizacyjne i jest w stanie zainicjować mineralizację krzemionki już przy 5 mM stężeniu kwasu krzemowego, stężeniu niższym niż w soku mlecznym roślin. Co ciekawe, sekwencja siliplant-1 znacznie różni się od sekwencji białek zaangażowanych w procesy mineralizacyjne krzemionki okrzemków oraz gąbek (Kumar et al., 2021).

Dobrze poznane są mechanizmy mineralizacji zwierząt morskich oraz kręgowców. Co ciekawe, w odróżnieniu od organizmów niższych, jednym z głównych składników macierzy organicznej biominerałów zwierzęcych są białka kolagenowe. W Rozdziale 1.2 zostaną szczegółowo omówione mechanizmy mineralizacji otolitów i otokoniów i składniki ich macierzy organicznej (Tabela 1), natomiast w następnej części zostaną podsumowane podstawowe informacje na temat innych biominerałów zwierzęcych.

Gąbki - beztkankowe zwierzęta morskie, produkują spikule będące ich swoistym systemem ochronnym i podporowym. W zależności od klasy, spikule przyjmują formę biominerałów tlenu krzemu lub węglanu wapnia o odmianie kalcytowej lub aragonitowej (Łukowiak, 2020). Tworzenie spikuli odbywa się w ściśle regulowany sposób w sklerocytach, do których w aktywny sposób dostarczany jest kwas krzemowy, a następnie miejscowo zagęszczany przez silikateinę w silikasomach. Silikateina, podobnie jak wiele białek biomineralizacyjnych, podlega fosforylacji oraz dehydroksylacji reszt Tyr do Phe (Kumar et al., 2021). Kwas krzemowy obecny w silikasomach stabilizowany jest przez resztę His obecną w centrum aktywnym białka złożonego z reszt Ser, His

i Asp. Molekularnym partnerem silikateiny jest silintafina-1, bogata w N- i C-końcowe powtórzenia reszt Pro, Glu, Ala i Thr. Silintafina-1 wraz z silikateiną tworzą filamenty katalizujące formowanie krzemionki spikul. Interesującym białkiem mineralizacyjnym spikuli jest również głasyna - białko glikozylowane składające się z około 30% reszt His. Co interesujące, brak glikozylacji rekombinowanej głasyny nie wpływa *in vitro* na proces mineralizacji krzemionki (Kumar et al., 2021).

Wśród organizmów wyższych najbardziej rozpowszechnione są biominerały węgla i fosforanu wapnia (Weiner i Dove, 2003). Najczęściej występującymi wśród zwierząt odmianami fosforanu wapnia są fosforan amorficzny, ośmiowapniowy oraz hydroksyapatyt, będący hydroksylovanym fosforanem wapnia - składnikiem kości i zębów (Tang, 2008). Kości są elementem podporowym ciała tworzącym szkielet. Ich powstawanie odbywa się na drodze mineralizacji zewnątrzkomórkowej macierzy powstającej w osteoblastach (Hołubowicz et al., 2015). Głównym składnikiem białkowym kości jest kolagen typu I, na którego włóknach odkładany jest, w obecności białek niekolagenowych, fosforan wapnia. Istnieją dwie hipotezy mineralizacji kości. Mechanizm, opierający się na obecności ciekłego prekursora inicjowanego polimerem (PILP, ang. *polymer induced liquid precursor*), zakłada tworzenie kropli zawierających jony wapnia oraz jony fosforanowe i polimer – składnik białkowy (Sugawara-Narutaki et al., 2021). Krople mogą osadzać się na włóknach macierzy kolagenowej inicjując jej mineralizację. W myśl drugiego mechanizmu cząsteczki o dużej masie molekularnej, pełniące funkcje inhibitorów mineralizacji, nie są w stanie wnikać we włókna kolagenu, natomiast składniki mineralne mogą tego dokonać mineralizując kolagen (Nudelman et al., 2013). Kolagen typu I jest głównym białkowym składnikiem kości stanowiącym ponad 80% macierzy białkowej. Występuje w postaci heterotrimeru składającego się z łańcuchów oplatających się w strukturę potrójnej helisy (Patino et al., 2002). W strukturze pierwszorzędowej kolagenu znajduje się motyw powtórzeń Gly-X-Y, gdzie Y stanowi najczęściej hydroksyprolina wprowadzającą element stabilizujący helisę kolagenu, a X dowolną resztę aminokwasową, często Pro. Aby pełnić rolę macierzy kości, kolagen typu I ulega sieciowaniu poprzez reszty hydroksylizylowe. Włókna powstające z kolagenu typu I służą jako rusztowanie dla odkładanego hydroksyapatytu (Garnero, 2015). Regulacja mineralizacji kości natomiast zachodzi w obecności białek niekolagenowych, których przedstawicielami są m.in. sjaloproteina kości, osteokalcyna i osteopontyna (Gorski, 2011). Sjaloproteina jest białkiem zaangażowanym w proces nukleacji hydroksyapatytu. Swoją nazwę zawdzięcza glikozylacji kwasem sjalowym. Jest białkiem silnie nieuporządkowanym o rejonach bogatych w reszty kwasu glutaminowego. Jest zdolna wiązać kolagen typu I, dzięki czemu jej potencjał biomineralizacyjny i zdolność wiązania jonów wapnia wzrasta dziesięciokrotnie (Baht et al., 2010). Z kolei osteokalcyna jest białkiem występującym zarówno w kościach jako inhibitor mineralizacji, oraz w osoczu. Przypuszcza się, że poza kością przyjmuje funkcję hormonalną, związaną z regulacją poziomu insuliny (Li et al., 2016). Co ciekawe,

osteopontyna posiada domenę GLA, w której reszty kwasu glutaminowego ulegają karboksylacji uzależnionej od obecności witaminy K. Karboksylowana osteopontyna posiada aktywność biomieralizacyjną, silnie wiążąc jony wapnia, tym samym kontrolując szybkość powstawania kryształów. Natomiast wersja niemodyfikowana znajdująca się w osoczu (Garnero, 2015; Zoch et al., 2016). Osteopontyna, kolejna z białek zaangażowanych w mineralizację kości, jest również białkiem inherentnie nieuporządkowanym (IDP) i fosforylowanym. Ekspresjonowana jest w wielu tkankach, zarówno zmineralizowanych jak i miękkich. W zależności od lokalizacji zmienia się jej poziom ufosforylowania. W kościach dodatkowo ulega glikozylacji. Osteopontyna pełni funkcję inhibitora mineralizacji zarówno w kościach, poprzez wiązanie się do hydroksyapatytu oraz w tkankach miękkich w przejawach patologicznej mineralizacji (Gericke et al., 2005).

Innym, zmineralizowanym hydroksyapatytem, narzędem człowieka są zęby, zbudowane z pokrytej szkliwem korony, otoczonych cementem korzeni oraz szyjki na styku szkliwa i cementu. Wnętrze zęba wypełnione jest zębiną okrywającą miążgę zęba. Ze względu na duży udział kolagenu typu I zębina pod względem składu i mineralizacji podobna jest do kości (Hołubowicz et al., 2015). W mineralizacji zębiny charakterystyczne są białka DPP (fosfoproteina zębiny) i DSP (sjaloproteina zębiny) należące do rodziny SIBLING (ang. *small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein*). DPP i DSP są produktami cięcia proteolitycznego DSPP (sjalofosfoproteiny zębiny). Cechą charakterystyczną DPP jest znaczna liczba silnie fosforylowanych reszt Asp i Ser. DPP jest białkiem kwasowym z pI wynoszącym około 1,1. Posiada ono powinowactwo zarówno do jonów wapnia, jak i kolagenu, i stanowi element nukleatorowy w mineralizacji zębiny. DSP natomiast jest białkiem glikozylowanym, nieufosforylowanym. Jego rola w mineralizacji zębiny nie jest do końca znana (Prasad et al., 2010).

Węglan wapnia występuje w postaci uwodnionej (monohydrokalcyt, ikait i ACC (amorficzny węglan wapnia, ang. *amorphous calcium carbonate*) oraz bezwodnej - pod postacią romboedrycznego kalcytu, ortorombicznego aragonitu oraz waterytu (Dhami et al., 2013). Kalcyt i aragonit są stabilnymi odmianami węglanu wapnia, w odróżnieniu od waterytu uznawanego niekiedy za fazę pośrednią przemiany ACC w formy krystaliczne, niemniej wateryt również występuje w biominerałach (Christy, 2017). Wiele zwierząt wodnych wykorzystuje węglan wapnia do budowy muszli i szkieletów zewnętrznych w celach ochronnych. Muszle mięczaków, np. małży, zbudowane są z dwóch warstw - masy perłowej oraz warstwy pryzmatycznej. Częścią mineralną masy perłowej jest najczęściej odmiana aragonitowa węglanu wapnia, natomiast warstwa pryzmatyczna może przybierać zarówno formę biominerału kalcytowego, jak i aragonitowego (de Paula, 2009). Aspeina jest jednym z najlepiej opisanych białek mineralizacyjnych muszli, zlokalizowanym w części pryzmatycznej. Podobnie jak inne białka mineralizacyjne, jest również silnie kwasowa, co wynika z posiadania ponad 60% reszt Asp w sekwencji. Białko to jest niezwykle ważne w kontekście

kierowania mineralizacją węglanu wapnia do formy kalcytowej (Takeuchi et al., 2008). Podobne kierowanie w wybraną odmianę polimorficzną obserwowane jest u szkarłupni. Kolce szkarłupni stanowią szkielet wewnętrzny zwierzęcia składający się z węglanu wapnia z domieszką jonów magnezu. W fazie larwalnej, kolce wzrastają z amorficznego węglanu wapnia, który z czasem przekształca się w kalcyt (Beniash et al., 1997). Białka macierzy SM30 i SM50 są zaangażowane w powstawanie szkieletu szkarłupni. SM30 jest silnie glikozylowane, posiada domenę lektyny typu C na końcu-N białka oraz region nieuporządkowany bogaty w reszty aminokwasów kwasowych na końcu-C białka. SM50 również posiada domenę lektyny typu C oraz dwa regiony - bogate w reszty Gly i Pro. Białka te są w stanie formować hydrożel i stabilizować metastabilny ACC kontrolując jego przekształcanie w kalcyt (Jain et al., 2016). Z kolei pancerz skorupiaków pełniący funkcję egzoszkieletu podlega wymianie, przebudowie i rekrytalizacji w czasie życia zwierzęcia ze względu na wzrost jego ciała. Jednym z białek zaangażowanych we wzrost egzoszkieletu m.in. raków jest białko CAP-1 (białko związane z kalcyfikacją-1) (Inoue et al., 2007). Jest ono białkiem IDP, bogatym w reszty kwasowe. Koniec-N białka jest dodatkowo fosforylowany. CAP-1 może bezpośrednio oddziaływać z chityną, składnikiem macierzy organicznej szkieletu, poprzez obecność zachowanej w toku ewolucji 35-36 aminokwasowej sekwencji zgodnej Rebers'a-Riddiford'a. Początkowo ACC odkłada się na chitynowym rusztowaniu, następnie CAP-1 oddziałuje z ACC przekształcając go w krystaliczny węglan wapnia (Arakaki et al., 2015).

Mineralizacja aragonitowego szkieletu koralowców rafotwórczych jest kontrolowana m.in. przez grupę białek CARP (kwasowe białka koralowców, ang. *coral acid rich proteins*). Do tej pory opisane zostały cztery białka CARP (-1,-2,-3 oraz -4) (Mass et al., 2013). Badania *in vitro* wykazały, że CARP mają wysokie powinowactwo do jonów wapnia i są w stanie spontanicznie mineralizować węglan wapnia w postaci aragonitu z roztworu wody morskiej. Natomiast białko CARP-3 zdolne jest do wytrącania odmiany waterytowej *in vitro*, niemniej w obecności jonów magnezu ta zdolność znika na rzecz kalcytu. Białko CARP-2 jest bogate w reszty Glu i w początkowej fazie mineralizacji jest w stanie stabilizować ACC, które następnie jest przekształcane do krystalicznego aragonitu przez białka CARP-1, -3 i -4 (Laipek et al., 2020).

Procesy biomineralizacyjne, obok zaangażowania w normalne procesy szkieletotwórcze, są również powiązane z mineralizacją patologiczną, np. kamieni nerkowych w wyniku kamicy nerkowej. Kamienie zbudowane są z frakcji mineralnej w przeważającej większości będącej szczawianem wapnia (Sivaguru et al., 2021). Początkowo wytwarzane w nerkach mogą przemieszczać się wzdłuż dróg moczowych powodując ból. Powstawanie kamieni jest rezultatem wielu czynników, które wpływają na zachowanie równowagi pomiędzy powstawaniem, a rozpuszczaniem kryształów z nasyconego lub przesyconego składnikami mineralnymi moczu. W kamieniach nerkowych zidentyfikowana została osteopontyna, białko zaangażowane w biomineralizację kości (Tabela 1).

W przypadku kamicy nerkowej przybiera rolę inhibitora patologicznej mineralizacji. Ze względu na przesunięcie równowagi tworzenia kamieni względem hamowania ich tworzenia, makromolekuły początkowo wiążące się na powierzchni zarodków kryształów są w nie wbudowywane, a ich działanie ograniczone, w konsekwencji prowadząc do stanu patologicznego (Alelign, 2018).

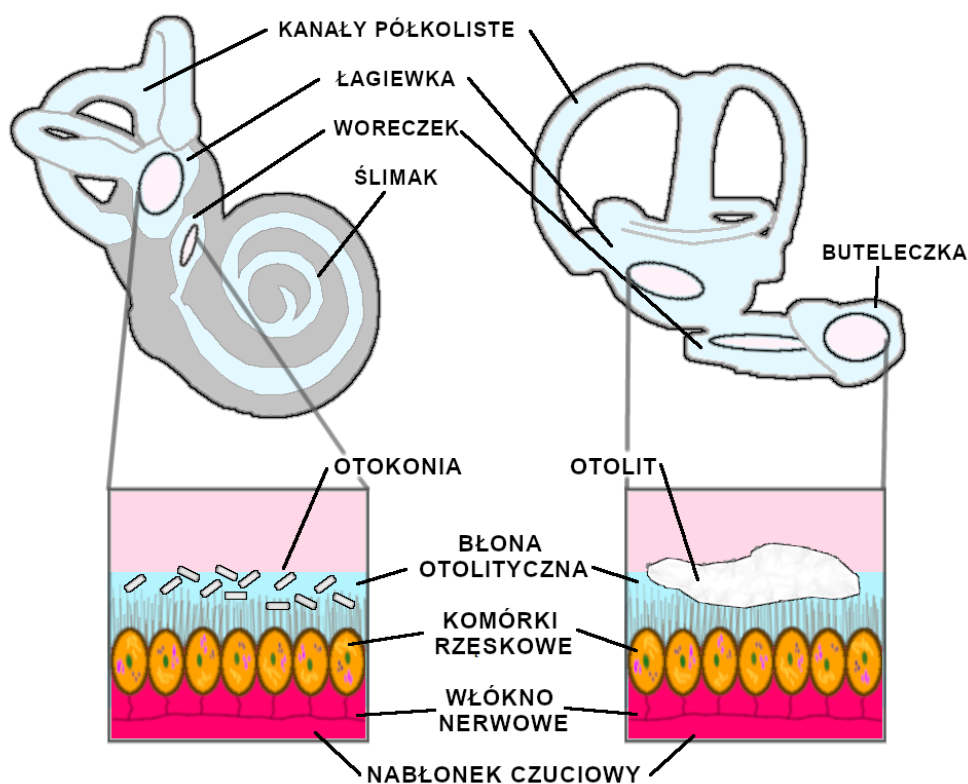
Przedstawione w rozdziale przykłady biominerałów i białek zaangażowanych w ich powstawanie są jedynie przeglądem różnorodności procesów biomineralizacyjnych na różnych szczeblach taksonomicznych. W kolejnej części omówione zostaną biominerały ucha wewnętrznego – otolity i otokonia, bezpośrednio związane z tematyką pracy.

1.2. Ucho wewnętrzne i jego biominerały – otolity oraz otokonia

Ucho jest narządem, które u kręgowców odpowiada za słuch oraz poczucie równowagi, odczuwanie grawitacji i przyspieszenia liniowego (Pfaff et al., 2019). Składa się z trzech części - zewnętrznej, ucha środkowego oraz wewnętrznego. Ucho wewnętrzne jest zbudowane z szeregu kanałów wewnątrzczaszkowych tworzących błędnik, w którym część odpowiadająca za słuch stanowi narząd Cortiego, natomiast za poczucie równowagi odpowiadają kanały półkoliste. U podstawy kanałów półkolistych, w przedsiönku błędnika kostnego, znajdują się narządy otolityczne różniące się ilością w zależności od organizmu. Woreczek oraz łagiewka to narządy otolityczne znajdujące się u ssaków, natomiast wśród innych kręgowców występuje dodatkowo buteleciczka. Trzy kanały półkoliste odpowiadają za odczuwanie przyspieszenia kąowego, natomiast rolą narządów otolitowych jest odczuwanie grawitacji oraz przyspieszenia liniowego. U ryb narządy otolitowe są zaangażowane w odczuwanie fal dźwiękowych, natomiast u wyższych kręgowców rola ta została przejęta przez ślimak (Baxendale, 2016; Carey, 2006). Kanały półkoliste i narządy otolitowe wypełnione są endolimfą, płynem wywodzącym się z osocza (Thalman, 1999). Wnętrze narządów otolitowych wysłane jest nabłonkiem czuciowym posiadającym komórki rzęskowe. Otolity oraz otokonia - biominerały węglanu wapnia, szerzej omówione w następującej części, są częścią narządu zawieszoną w galaretowatej błonie otolitycznej w pobliżu rzęsek. Podczas zmiany pozycji głowy, otolity lub otokonia również zmieniają swoją pozycję w odpowiedzi na ruch, uciskając na rzęski (Lundberg et al., 2015). Stymulacja mechaniczna komórek otwiera kanały wapniowe, przez co sygnał pochodzący z ruchu otolitów wpływa na dalsze przekazanie sygnału. Rysunek 4. przedstawia schematy ucha wewnętrznego człowieka i ryby wraz z zaznaczonymi narządami otolitowymi.

Otolity i otokonia to biominerały węglanu wapnia znajdujące się w uchu wewnętrznym. U kręgowców lądowych funkcję receptorów grawitacji przejęły otokonia przypominające drobny piasek zawieszony w galaretowatej błonie otolitycznej, natomiast wśród ryb doskonałokostnych rozpowszechnione są pojedyncze otolity przypominające kamyki (Lundberg et al., 2015). Otolity i otokonia są wysoce zmineralizowane (ponad 90%) (Kang et al., 2008; Walther, et al., 2014). Pomimo

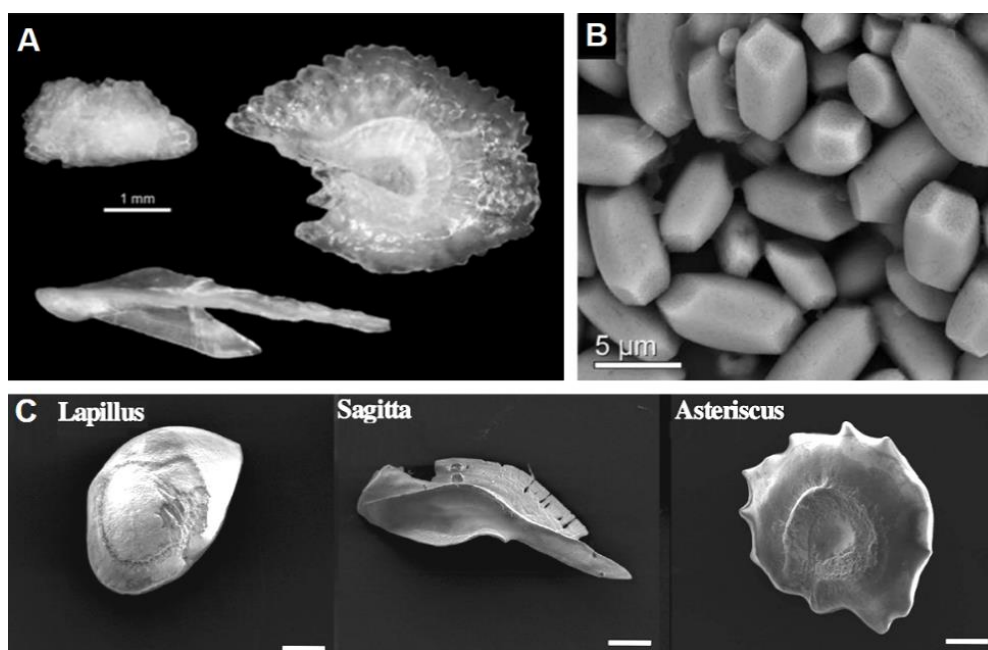
pełnienia analogicznych funkcji, otolity i otokonia różnią się pod względem budowy i mechanizmów powstawania.



Rysunek 4. Schemat ucha wewnętrznego. Po lewej przedstawiony został schemat ludzkiego ucha wewnętrznego wraz z otokoniami zawieszonymi w błonie otolitycznej. Po prawej znajduje się schemat budowy ucha wewnętrznego ryby z przedstawionym otolitem. Na podstawie: (Lundberg et al., 2015)

Wśród ryb występują trzy rodzaje otolitów: kamyczek (*lapillus*) znajdujący się w łagiewce, strzałka (*sagitta*) w woreczku i gwiazdka (*asteriscus*) w buteleczce, znajdujące się po dwóch stronach głowy (Popper et al., 2005). Rysunek 5. przedstawia różnorodne morfologie otolitów dwóch słodkowodnych ryb z rodziny karpowatych (panel A - otolity karpia *Cyprinus carpio*, C - otolity danio pręgowanego *Danio rerio*). Otolity różnią się kształtem, wielkością oraz odmianą polimorficzną węgla wapnia. Najczęściej otolity zbudowane są z węgla wapnia w odmianie aragonitowej, niekiedy waterytowej. Zróżnicowanie to nie jest przypadkowe – różnice w gęstości aragonitu i waterytu przekładają się na zróżnicowaną stymulację komórek rzęskowych narządów otolitywowych, podobnie jak różnice w rozmiarze i kształcie przekładają się na zróżnicowaną dynamikę odpowiedzi na ruch rozszerzając tym samym zdolność odbioru sygnałów zewnętrznych przez ryby (Schulz-Mirbach et al., 2019). Otolity, w przeciwieństwie do otokoniów, przyrastają dobowo tworząc naprzemienne pierścienie macierzy organicznej i frakcji nieorganicznej (Popper et al., 2005).

Z kolei otokonia przybierają kształt beczulek o trójskośnym zakończeniu (Rysunek 5C). Ludzkie otokonia to biominerały kalcytu, powstające w trakcie stadium embrionalnego, które w trakcie życia nie ulegają przyrostom, jedynie mogą ulegać degeneracji (Walther, et al., 2014). Otokonia są silnie zmineralizowane na obrzeżach, a na ich wnętrzu składa się słabiej zmineralizowany rdzeń macierzy. Pomimo, że obraz dyfrakcyjny mysich otokoniów wskazuje na monokryształy, badania z wykorzystaniem zaawansowanych technik mikroskopowych wykazały, że na strukturę otokoniów składają się sferyczne nanokryształy kalcytu, tym samym sugerując możliwość ich powstawania w wyniku alternatywnej drogi mineralizacji (Athanasiadou et al., 2020) (Rozdział 1.1).



Rysunek 5. Porównanie morfologii otolitów oraz otokoniów. Panel A przedstawia otolity *Cyprinus carpio* wraz z odpowiadającą im skalą, panel B przedstawia ludzkie otokonia. Na panelu C zostały przedstawione otolity *Danio rerio*, skala odpowiada 100 µm. Na podstawie: (Kniep, 2015; Pachoensuk et al., 2021; Schulz-Mirbach Reichenbacher, 2006)

1.3. Macierz otolitów i otokoniów

Zarówno otolity ryb doskonałokostnych, jak i ssacze otokonia wzrastają w sposób kontrolowany przez białka. Białka zaangażowane bezpośrednio w proces mineralizacji nazywa się otokoninami, tworzą one macierz otolitów oraz otokoniów (Lundberg et al., 2015). Poza otokoninami, w proces również zaangażowane są białka enzymatyczne oraz pompy i transportery, a także białka niewchodzące w skład macierzy wbudowanej w struktury zmineralizowane. Anhydraza węglanowa, wapniowa ATPaza PMCA2 oraz otopetryna-1 są przykładami takich białek macierzy organicznej. Anhydraza węglanowa przekształca ditlenek węgla do jonów węglanowych, które są transportowane do endolimfy przez białko przenoszące aniony B2AE (Thomas et al., 2019). Wrażliwe na kalmodulinę wapniowe ATPazy (PMCA) dostarczają wewnątrzkomórkowych jonów wapnia do endolimfy (Lundberg et al., 2015). Z kolei otopetryna-1

zaangażowana jest w proces mineralizacji na dwa sposoby - reguluje wydzielanie ekspresjonowanych otokonin oraz monitoruje stężenie jonów wapnia w miejscu mineralizacji (Qian, 2022; Lundberg et al., 2015). Ponadto, szereg proteaz i ich inhibitorów reguluje aktywność białek macierzy, jak na przykład metaloproteinaza 2 (MMP-2) oraz neuroserpina, regulujące odkładanie się macierzy organicznej podczas przyrostów dobowych (Thomas et al., 2019, 2020). Błona otolityczna zawiera m.in. białka zaangażowane w utrzymywanie otolitów oraz otokoniów w pobliżu komórek rzęskowych. Białka te są częściowo zanurzone w biominerałach. Otogelina oraz białko podobne do otogeliny kotwiczą błonę otolityczną do nabłonka czuciowego (Huang Qian, 2022). Te białka transmembranowe są również zaangażowane w nukleację i kotwiczenie otolitów oraz otokoniów. U ludzi mutacje genu *otog*, kodującego otogelinę, przyczyniają się do rozwoju choroby Ménière'a (Roman-Naranjo et al., 2020). Podobnie jak otoperyna-1, α - i β -tektoryna, obecne w błonie otolitycznej i nakrywkowej, również zaangażowane są w kotwiczenie otolitów i otokoniów. Białka mocujące biominerały do nabłonka czuciowego posiadają domeny von Willebrand'a typu C, wskazujące na tendencję do oligomeryzacji (Lundberg et al., 2015).

Niedawne badania proteomiczne opisały bogactwo proteomu otolitów (Kalka et al., 2019; Thomas et al., 2019). Białka zaangażowane w mineralizację otolitów i otokoniów mogą być podzielone na dwie grupy – białka nierozpuszczalne, tworzące rusztowanie i sieć połączeń międzybiałkowych oraz rozpuszczalne - najczęściej nieuporządkowane, stanowiące elementy regulatorowe depozycji frakcji nieorganicznej (Rozdział 1.1). Najważniejsze dane o białkach zaangażowanych w mineralizację otolitów i otokoniów zebrano w Tabeli 1.

Otokonina 90 (Oc90) jest jedną z głównych otokonin ssaczych otokoniów, ale także jest obecna przy powstawaniu otolitów *Danio rerio* (Petko et al., 2008). Jest białkiem silnie kwasowym, glikozylowanym oraz posiadającym reszty cysteinyłowe niezbędne do pełnionej funkcji. W strukturze posiada domeny podobne do fosfolipazy A2 wiążące jony wapnia (Lu et al., 2010). Oc90 bierze udział w procesie zarodkowania kryształów węglanu wapnia, co pokazano zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* i jest niezbędnym składnikiem macierzy (Lundberg et al., 2015). W badaniach *in vivo*, knockout genu *otoc1* kodującego Oc90 powodował wykształcenie niepoprawnych otolitów *Danio rerio*. *In vitro*, Oc90 pełni funkcję inhibitora wzrostu kryształów (Hong et al., 2015; Moreland et al., 2014). Pojawienie się ektopowej ekspresji Oc90, poza uchem wewnętrznym, związane jest z potrójnie ujemnym rakiem piersi, a białko w tym przypadku przybiera rolę indykatora metastatycznego (Pearlman et al., 2019). Kolejna otokonina, białko Sparc z *Danio rerio* oraz ssacze Sparc-like 1 są nadekspresjonowane, gdy ekspresja Oc90 jest zahamowana (Kang et al., 2008; Xu et al., 2010). Możliwe, że nadekspresja tego białka ma za zadanie rekompensować brak jednego z głównych białek mineralizacyjnych otolitów i otokoniów. Sparc jest również silnie kwasowym, glikozylowanym białkiem, posiadającym reszty cysteinyłowe. W budowie domenowej Sparc można wyszczególnić

domeny EF wiążące jony wapnia, domenę folistatyny wiążącą kolageny oraz rejon nieuporządkowany (Chun et al., 2006). Innymi otokoninami zidentyfikowanymi do tej pory w mysich otokoniach są fetuina-A oraz osteopontyna (Thalmann et al., 2006). mRNA osteopontyny, siałoproteiny zaangażowanej w mineralizację kości (Rozdział 1.1), zostało zidentyfikowane również w uchu wewnętrznym (Sakagami, 2000). Podobnie jak w przypadku kości, białko reguluje tworzenie otokoniów ze względu na wysokie powinowactwo do jonów wapnia. W badaniach *in vitro* pokazano, że zarówno osteopontyna jak i fetuina-A (bardziej aktywna biomineralizacyjnie) są w stanie hamować wzrost kryształów węglanu wapnia (Hong et al., 2015). Obecna w endolimfie fetuina-A nie jest ekspresjonowana w obrębie ucha wewnętrznego, jednak ze względu na pochodzenie plazmatyczne, reguluje precypitację różnego rodzaju kryształów wapniowych. (Zhao et al., 2007).

Najwięcej prac dotyczących otokonin powstało podczas badań otolitów, ze względu na ich stosunkowo duży rozmiar, dostępność i łatwość izolacji. Dwoma białkami charakterystycznymi dla otolitów różnych ryb są Starmaker (Stm) oraz białko macierzy otolitów 1 (OMP-1, ang. *otolith matrix protein-1*). Stm jest białkiem kontrolującym mineralizację otolitów *Danio rerio*. Wyciszenie genu *stm* powoduje tworzenie zdeformowanych otolitów, kształtem przypominających gwiazdy (Söllner et al., 2003). Białko to jest niezwykle ciekawym obiektem badawczym ze względu na rolę biologiczną oraz właściwości molekularne. Należy do klasy IDP, posiada dwa regiony bogate w aminokwasy kwasowe, charakterystyczne powtórzenia reszt Asp i Ser, a jego fosforylacja, potwierdzona *in vivo*, znacząco wpływa na jego aktywność mineralizacyjną *in vitro* (Kalka et al., 2019; Kapton et al., 2009; Wojtas et al., 2015). Białko to posiada liczne homologi jak np. OMM64 (ang. *otolith matrix macromolecule 64*) z *Oncorhynchus mykiss* (Poznar et al., 2017; Tohse et al., 2009) i Starmaker-like z *Oryzias latipes* (Różycka et al., 2014). Drugie z białek macierzy otolitów, OMP-1, jest zaangażowane w powstawanie przyrostów dobowych otolitów. OMP-1 zostało po raz pierwszy wyizolowane i scharakteryzowane wraz z otoliną-1 z otolitów kety *Oncorhynchus keta* (Murayama et al., 2000). Możliwe, że rolą OMP-1 jest organizacja macierzy organicznej, ze względu na uzależnienie ekspresji otoliny-1, głównego składnika macierzy, od obecności OMP-1 (Thomas et al., 2019). Białko to jest glikoproteiną i należy do rodziny transferyn, jednak najprawdopodobniej nie wiąże jonów żelaza, a jony cynku (Murayama et al., 2005). Z tego względu OMP-1 może być białkiem pośredniczącym w dostarczaniu jonów węglanowych w miejsce wzrostu otolitu i regulującym aktywność anhidrazy węglanowej (Swearer, 2019).

Prócz wymienionych białek, na macierz organiczną składają się również m.in. proteoglikany, mogące oddziaływać z kolagenami i jonami wapnia (Thomas et al., 2019). Opisane powyżej białka bogatego proteomu macierzy organicznej otolitów i otokoniów nie są jedynymi zaangażowanymi w proces tworzenia otolitów i otokoniów. W otolitach *Acanthopagrus butcheri*, wśród kilkuset innych białek, zidentyfikowano wspólne dla otolitów i kości, należące do kolagenów typu I i II oraz białko

zawierające powtórzenia potrójnej helisy kolagenowej (Thomas et al., 2019). Dodatkowo, w otolitach *Danio rerio* również znaleziono kolageny (Kalka et al., 2019). Otolity oraz otokonia posiadają również krótkie, w stosunku do innych białek kolagenowych, białko podobne do kolagenu - otolinę-1, które oprócz roli rusztowania pośredniczy interakcji pomiędzy otokoninami oraz fazą nieorganiczną biominerałów. W kolejnej części (Rozdział 1.4.) opisano to białko stanowiące obiekt badawczy pracy.

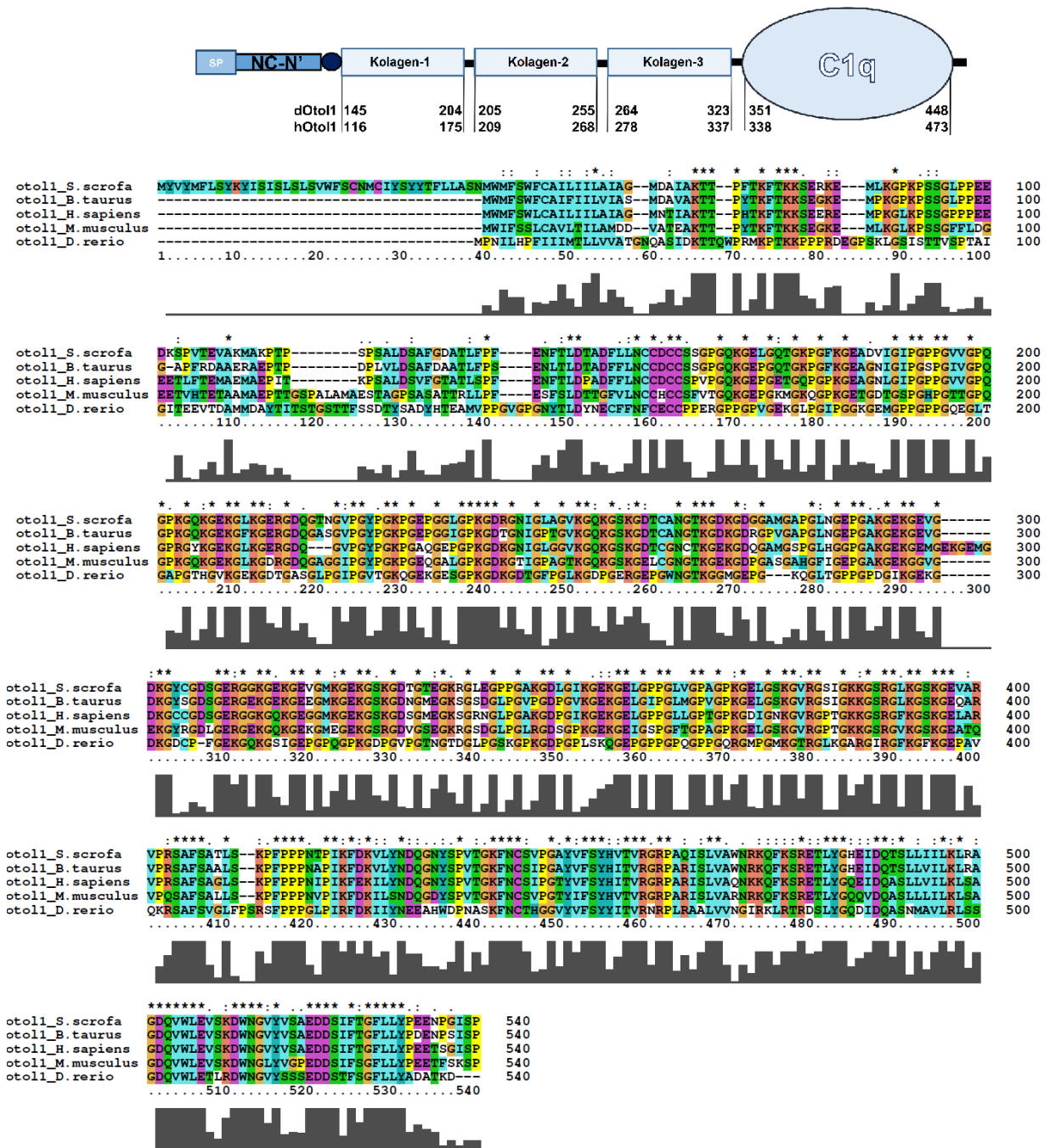
Tabela 2. Główne składniki białkowe macierzy otolitów i otokoniów. Do wymienionych białek została przypisana pełniona przez nie funkcja. Legenda: U – białko ustrukturyzowane, C-U – białko częściowo ustrukturyzowane, N – białko nieustrukturyzowane, K – białko o charakterze kwasowym, Z – białko o charakterze zasadowym.

BIĄŁKO	WYSTĘPOWANIE	CHARAKTER	FUNKCJA	ODNOŚNIK
Otokonina-90	Otolity, otokonia	U, K	Strukturalna, wiązanie wapnia, organizacja macierzy	(Hong et al., 2015)
Otolina-1		U, Z	Strukturalna, organizacja macierzy	(Murayama et al., 2005)
Sparc/Sparc-like 1		C-U, K	Strukturalna, wiązanie wapnia	(Kang et al., 2008)
α -tektoryna		U, K	Strukturalna, mocowanie biominerału	(Stooke-Vaughan et al., 2015)
β -tektoryna		U, Z	Strukturalna, mocowanie biominerału	
Otogelina		C-N, K	Strukturalna, organizacja macierzy	
Fetuina-A	Otokonia	C-N, K	Wiązanie wapnia, regulacja wzrostu biominerału	(Hong et al., 2015)
Osteopontyna		N, K	Wiązanie wapnia, regulacja wzrostu biominerału	
Starmaker	Otolity	N, K	Wiązanie wapnia, regulacja wzrostu biominerału	(Sollner et al., 2003)
OMP-1		U, K	Struktura, organizacja macierzy	(Murayama et al., 2005)

1.4. Otolina-1 – białko biomineralizacji otolitów i otokoniów

Otolina-1 jest sekrecyjnym białkiem podobnym do kolagenu. Po identyfikacji sekwencji cDNA z ucha wewnętrznego bassy niebieskiego *Lepomis macrochirus* opisywana była jako *saccular collagen* (Davis et al., 1995a). Przewidziana na podstawie DNA sekwencja białka zawierała 3 charakterystyczne domeny: domenę kolagenową, N-końcową domenę niekolagenową oraz C-końcową domenę homologiczną do domen kolagenu typu VIII oraz X. Tym samym białko to zostało przypisane do białek o krótkim łańcuchu kolagenowym. Z kolei, badania otolitów *Oncorhynchus keta* przyczyniły się do identyfikacji krótkiego białka podobnego do kolagenu nazwanego otoliną-1 (Murayama et al., 2000). Otolina-1 została wyizolowana z frakcji nierozpuszczalnej w EDTA wraz z białkiem OMP-1. Została poddana deglikozylacji, potwierdzając obecność tej modyfikacji potranslacyjnej. Białko to jest ekspresjonowane wyłącznie w uchu wewnętrznym (Murayama et al., 2002).

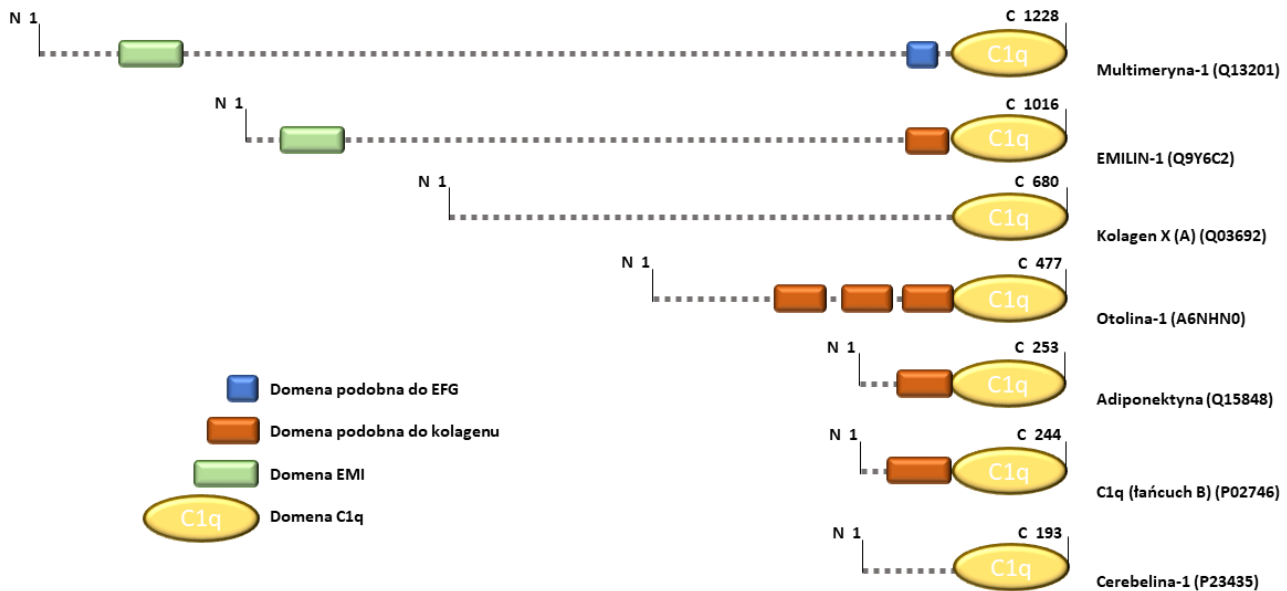
Wstęp



Rysunek 6. Porównanie sekwencji otoliny-1 z różnych gatunków. Górny panel przedstawia schemat budowy domenowej otoliny-1. Przedstawiona poniżej analiza podobieństwa sekwencji otoliny-1 z *Sus scrofa* (dzik euroazjatycki), *Bos taurus* (bydło domowe), *Homo sapiens* (człowiek rozumny), *Mus musculus* (mysz domowa) oraz *Danio rerio* (danio pęgowany) została wykonana w programie Clustal Omega i obrazuje podobieństwo struktury pierwszorzędowej białka oraz fragmentów zachowanych w toku ewolucji.

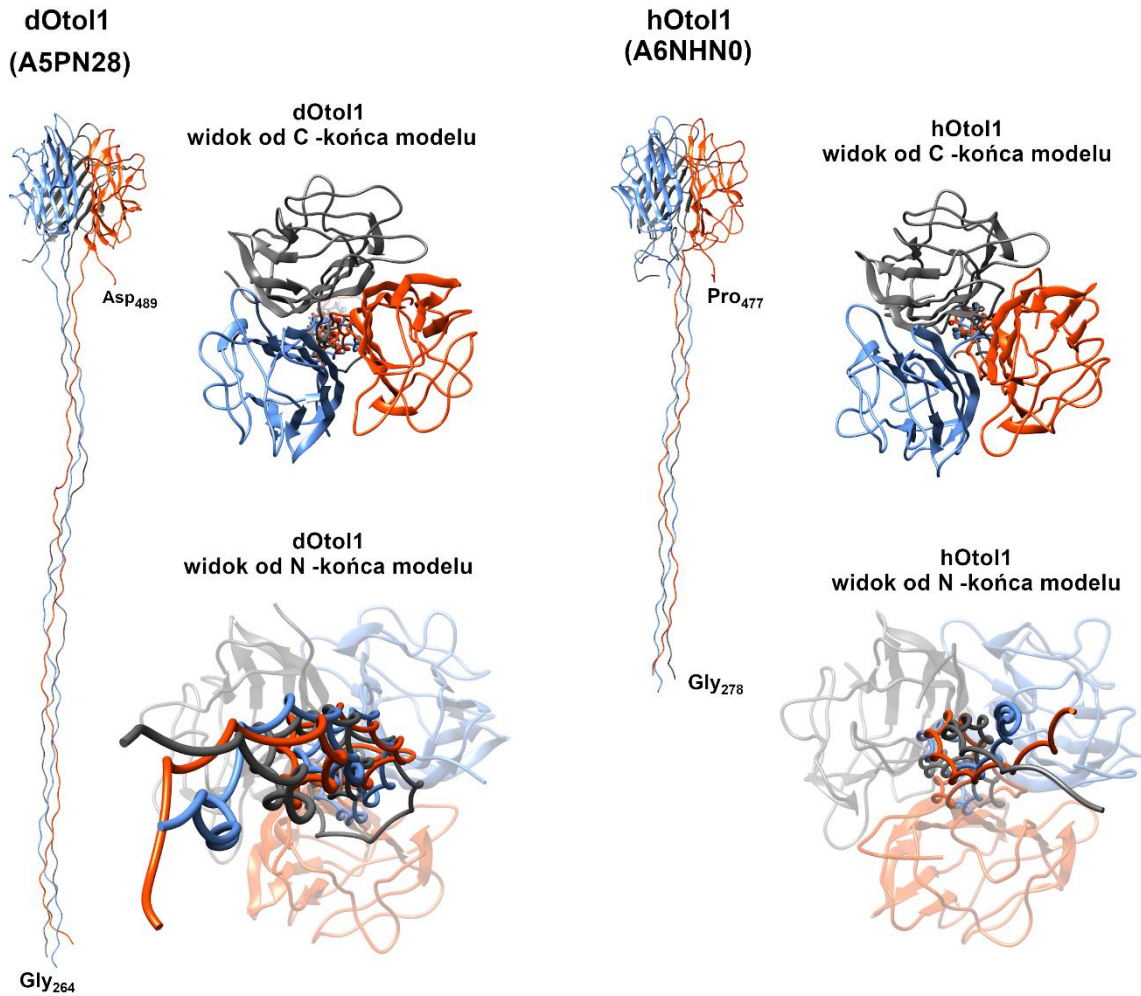
Sekwencja otoliny-1 pokazała, że białko to jest w 68% podobne do opisanego przez Davisa i wsp. (1995) białka kolagenowego. Porównanie dostępnych w bazie UniProtowanych sekwencji otoliny-1 również potwierdziło duże podobieństwo białek pomiędzy organizmami z różnych grup. Najbardziej zachowana w ewolucji jest jego część C-końcowa, na którą składa się globularna domena C1q. Również charakterystyczne powtórzenia Gly-X-Y (gdzie X – dowolny

aminokwas, Y – hydroksyprolina) położone w centralnej domenie podobnej do kolagenu są zachowane w sekwencji otoliny-1 (Rysunek 6). Nadrodzina białek C1q charakteryzuje się występowaniem na C-końcu domeny globularnej. Białka te pełnią różnorodne role biologiczne i są zaangażowane m.in. w odpowiedź układu dopełniacza, jak białko C1q, w metabolizm, jak adiponektyna, czy w rozwój systemu nerwowego (precerebelina) i tkanki mięśniowej (EMILIN) (Ressl et al., 2015). Rysunek 7. zestawia schemat budowy domenowej wybranych białek z rodziny C1q.



Rysunek 7. Budowa domenowa białek z nadrodziny C1q. Charakterystyczną cechą białek jest obecność globularnej domeny C1q na C-końcu białka. W zależności od pełnionej funkcji, N-końcowa część bogata jest w domeny podobne do kolagenu, domeny podobne do EFG oraz domeny EMI. Na podstawie: (Ghai et al., 2007)

Sekwencja otoliny-1 posiada cechy charakterystyczne dla białek z nadrodziny C1q (Rysunek 6), tj. 23-aminokwasowy peptyd sygnałowy, N-końcową domenę niekolagenową z zachowanym ciągiem reszt cysteinyłowych zaangażowanych w tworzenie oligomerów wysokiego rzędu, centralnie położoną domeną podobną do kolagenu z trzema powtórzeniami ciągów Gly-X-Y oraz C-końcową domeną C1q (Kishore, 2000). Rysunek 8. przedstawia częściowe modele trimeru otoliny-1, na który składa się domena C1q oraz trzecie powtórzenie ciągu Gly-X-Y. Badania proteomiczne wykazują, że otolina-1 jest powszechnym składnikiem macierzy organicznej otolitów, tym samym umacniając jej rolę jako otokoniny niezbędnej w rozwoju biominerału (Kalka et al., 2019; Thomas et al., 2019).



Rysunek 8. Model *in silico* fragmentu trimeru otoliny-1. Fragment otoliny-1 z *Danio rerio* (po lewej) oraz *Homo sapiens* (po prawej). Model składa się z pełnej długości domeny C1q białka oraz trzeciego fragmentu ciągu powtórzeń kolagenowych. Na podstawie: (Bielak et al., 2022)

Murayama i wsp. (2002) spekulowali, że ze względu na podobieństwo otoliny-1 do kolagenu VIII i X, białko to może tworzyć heksagonalną sieć macierzy otolitów. Ta hipoteza została częściowo potwierdzona badaniami *in vitro* rekombinowanej mysiej otoliny-1. Pomiary przy pomocy mikroskopii sił atomowych (AFM, ang. *atomic force microscopy*) pokazały, że białko to jest w stanie tworzyć sieć (Moreland et al., 2014). Oddziaływanie mysiej otoliny-1 z Oc90 oraz cerebeliną-1 zostało potwierdzone (Deans et al., 2010), a wpływ otoliny-1 i Oc90 na mineralizację węglanu wapnia został pokazany w badaniach *in vitro* (Moreland et al., 2014). Sama mysia otolina-1 wpływa na morfologię otrzymywanych kryształów, jednak w obecności Oc90 i otoliny-1 uzyskane kryształy przypominały kształtem otokonia. Otolina-1 była również izolowana z agregatów o wysokiej masie cząsteczkowej (HMWA) z otolitów pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss* wraz z białkiem OMM-64, homologiem białka Starmaker (Tohse et al., 2008). W badaniach nad mineralizacją *in vitro* z użyciem agregatów, oraz osobno OMM-64 i otoliny-1, wykazano, że w obecności agregatów powstające kryształy węglanu

wapnia były aragonitowe, w odróżnieniu od kalcytowych powstających w obecności samej otoliny-1, oraz waterytowych powstających w obecności OMM-64 (Tohse et al., 2009).

Fizjologiczna rola otoliny-1 została przebadana na różnych etapach rozwoju *Danio rerio* (Murayama et al., 2005). Białko zostało zidentyfikowane zarówno w otolicie, jak i poza nim jako element kotwiczący otolity w pobliżu nabłonka czuciowego. U tilapii mozambijskiej *Oreochromis mossambicus*, otolina-1 nie została znaleziona w łagiewce, a jedynie w woreczku. Możliwe zatem, że kotwiczenie otolitów przez otolinę-1 jest ograniczone jedynie do tego narządu otolitowego (Weigele et al., 2015). W przypadku rozwoju *Danio rerio*, otolina-1 jest wbudowywana w otolit 72 godzin po zapłodnieniu (Murayama et al., 2005). U pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss*, zmiany ekspresji otoliny-1 zostały połączone z odkładaniem przyrostów dobowych otolitów (Takagi et al., 2005). Po wyciszeniu genu kodującego otolinę-1 dochodziło do fuzji kamyczka i strzałki oraz zmiany ich położenia, przez co ryby nie mogły poruszać się w skoordynowany sposób (Murayama et al., 2005). W przypadku ssaków, z użyciem technik mikroskopowych, udało się również potwierdzić zaangażowanie otoliny-1 w tworzenie połączeń pomiędzy otokoniami (Andrade et al., 2012). Obecność otoliny-1 w osoczu jest markerem chorób związanych z degeneracją otolitów oraz urazów ucha wewnętrznego, jak na przykład w chorobie łagodnych położeniowych zawrotów głowy (BPPV), czy w wyniku uszkodzeń mechanicznych (Doğan et al., 2019; Tabtabai et al., 2017; Wu et al., 2020). Od niedawna łączy się hiperkalcemię powstałą w wyniku nadczynności przytarczyc z występowaniem BPPV i obecnością otoliny-1 w osoczu (McKenna et al., 2020).

Do tej pory opis właściwości molekularnych otoliny-1 ograniczał się do badań biofizycznych nad domeną C1q rekombinowanego białka z *Danio rerio* i *Homo sapiens*. W wyniku szeregu eksperymentów udało się pokazać znaczący wpływ jonów wapnia na trimeryzację domeny oraz jej stabilność (Hołubowicz et al., 2017). Rozwinięcie badań ujawniło znaczący wpływ zachowanej w toku ewolucji domeny wiążącej jony wapnia w C1q na stabilność trimerów (Hołubowicz et al., 2021a). Co więcej, badania *in vitro* nad domeną C1q i naturalnie występującymi w niej mutacjami ujawniły znaczący wpływ na stabilność trimerów domeny, tym samym będąc możliwym czynnikiem patologii ucha wewnętrznego (Hołubowicz et al., 2021b).

Thomas i wsp. wysnuli hipotezę na temat roli otoliny-1 w organizacji macierzy w czasie przyrostów dobowych, w której cięcie proteolityczne białka przez metaloproteinazę 2, zidentyfikowaną w badaniu proteomicznym, jest czynnikiem niezbędnym do zainicjowania tworzenia macierzy organicznej, a następnie odkładania się fazy mineralnej (Thomas et al., 2019). W ostatnich latach rola otoliny-1 w organizacji macierzy otolitycznej jest podkreślana w pracach przeglądowych (Huang Qian, 2022; Thomas i Swearer, 2019).

1.5. Interdyscyplinarność badań biomineralizacyjnych

Wykorzystanie wyników badań płynących z eksperymentów nad macierzą organiczną biominerałów może pomóc w identyfikacji markerów chorobowych oraz molekularnych mechanizmów stojących za różnymi schorzeniami. Z drugiej strony, projektowanie funkcjonalnych materiałów w oparciu o znajomość mechanizmów biomineralizacyjnych może być wykorzystane w tworzeniu biokompatybilnych materiałów z zastosowaniem medycznym lub o szczególnych parametrach mechanicznych. Niezwykle interesującym aspektem badań biomineralizacyjnych są badania skupiające się na strukturach biomineralnych wymarłych organizmów, które przetrwały jako skamieniałości w osadach fanerozoiku.

Danio rerio jest organizmem modelowym w badaniach biologii rozwoju oraz używany jest do rozwoju modeli chorobowych ze względu na swój niewielki rozmiar oraz łatwość hodowli. Dokładne poznanie mechanizmów wzrostu otolitów ryby, mimo wielu różnic, może przyczynić się do poznania przyczyn ludzkich chorób (Söllner Nicolson, 2004). Łagodne położeniowe zawroty głowy (BPPV) są chorobą najczęściej dotykającą ludzi w starszym wieku (Tabtabai et al., 2017). Objawia się zawrotami głowy na skutek zmiany położenia ciała. Zawroty te wywołane są degeneracją otokoniów i ich swobodnym przemieszczaniem w kanałach półkolistych. Obecność otoliny-1 w osoczu jest markerem tej choroby (Iruğu et al., 2021). Otolina-1 może być również użyta jako wskaźnik mechanicznych uszkodzeń ucha wewnętrznego. Jako rezultat mastoidektomii, wewnątrzczaszkowej operacji, również zaobserwowano obecność otoliny-1 w osoczu, a jej stężenie przekładało się na nasilenie uszkodzeń mechanicznych ucha powstałych w wyniku zabiegu (Doğan et al., 2019).

Naśladowanie naturalnie zachodzących procesów mineralizacji w organizmach żywych, kierowanie nukleacją i wzrostem kryształów oraz tworzenie materiałów kompozytowych pochodzenia biologicznego jest jednym z podejść używanych przy projektowaniu zaawansowanych materiałów. To podejście badawcze zwane biomimetyką, wykorzystywane jest w materiałoznawstwie do otrzymywania materiałów o zorganizowanej sieci nanoczątek, wybranych właściwościach mechanicznych stojących m.in. za konkretnymi odmianami polimorficznymi (Nudelman, 2012). Otrzymanie kolagenu zmineralizowanego hydroksyapatytem o poprawnie zorientowanych kryształach wewnątrz włókien z użyciem polimeru poliAsp przyczyniło się do otrzymania biokompatybilnych implantów kości. Mineralizacja kolagenu została skierowana do ścieżki PILP (Rozdział 1.1) (Jee et al., 2011).

Ciekawym aspektem badań nad biomineralizacją są zagadnienia związane z paleontologią. Mimo, że badania skamieniałości skupiają się z reguły na fazie mineralnej, badanie zachowanej w biominerale macierzy organicznej lub jej fragmentów może przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat synergicznego współdziałania materii organicznej z nieorganiczną (Pérez-Huerta et al., 2018).

Zwrócenie uwagi na zachowanie macierzy organicznej w skamieniałościach stało się początkiem rozwoju paleontologii molekularnej (Abelson, 1954). Jedną z przełomowych prac w tej dziedzinie opisywała zachowane przez 80 milionów lat glikoproteiny muszli mięczaków (Weiner et al., 1976). Dalszy rozwój technik analitycznych i dostępność nowoczesnych metod poznawczych przyczynił się do identyfikacji szeregu białek zachowanych w skamieniałościach, co wiąże się z oddziaływaniem białko-minerał (Cappellini et al., 2012; Drake et al., 2020; Sakalauskaite et al., 2020; Wadsworth, 2014, Demarchi et al., 2016). Co niezwykle ciekawe, ze względu na zachowanie względnie długich fragmentów białek w skamieniałościach, w badaniach z dziedziny paleontologii molekularnej wykorzystuje się obecnie również podejście paleoproteomiczne (Schroeter et al., 2022; Warinner et al., 2022). Uzyskanie sekwencji białek zachowanych w minerałach niesie za sobą szczególną informację biologiczną, pozwalającą na głębsze poznawanie szlaków ewolucyjnych.

2. Cel pracy

Nadrzędnym celem pracy było poznanie właściwości molekularnych otoliny-1 oraz jej roli w mineralizacji węgla wapnia. Praca została poświęcona w głównej mierze badaniom rekombinowanych homologów otoliny-1 z danio pręgowanego (*Danio rerio*) i człowieka. Druga część pracy skupiła się na otolitach wyizolowanych z karpia *Cyprinus carpio* w celu identyfikacji otoliny-1, jej potencjalnych izoform i białek podobnych oraz na poszukiwaniu zachowanych fragmentów macierzy organicznej kopalnych otolitów ślepiora *Gadiculus argenteus*.

Główne cele pracy zostały podzielone na cele szczegółowe:

1. Opracowanie metody nadekspresji w *E.coli* i oczyszczania rekombinowanej otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*
2. Dokonanie charakterystyki właściwości molekularnych otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*, badania wpływu jonów wapnia na jej właściwości
3. Zbadanie wpływu otoliny-1 na powstawanie kryształów węgla wapnia w eksperymentach bioinspirowanej mineralizacji
4. Identyfikacja proteomu otolitów *Cyprinus carpio* oraz kopalnych *Gadiculus argenteus* z użyciem spektrometrii mas LC-MS/MS

3. Materiały

3.1. Odczynniki, zestawy komercyjne

Tabela 3. Spis odczynników używanych do wykonania eksperymentów przedstawionych w pracy.

ODCZYNNIK	PRODUCENT	NUMER KATALOGOWY
2-merkaptoetanol (C ₂ H ₆ OS)	Roth	4227.3
Aceton	Warchem	30112
Acetonitryl (C ₂ H ₃ N)	Fluka	34967
Agar	Invitrogen	30391-023
Agaroza	Roth	2267.4
Albumina wołowa	Sigma	A-7517
ATTO-488 NHS	Sigma	41698
Azotan srebra (AgNO ₃)	Warchem	057385
Błękit bromofenolowy (C ₁₉ H ₁₀ O ₅ Br ₄ S)	Merck Millipore	108122
Bromek etydyny	Roth	2218.3
BS ³	Thermo Fisher Scientific	21580
Chlorek potasu (KCl ₂)	Merck	4938
Chlorek sodu (NaCl)	Merck Millipore	106404
Chlorek wapnia (CaCl ₂)	Merck	2382
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva	35051
Cytrynian sodu (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	POCH S.A.	795790730
Deoksyrybonukleaza I (DNaza I)	Novazym	DN-10000
Ditiotreitol (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ , DTT)	Sigma	D9163
Diwodorofosforan (V) potasu (KH ₂ PO ₄)	Chempur	427420201
Diwodorofosforan (V) sodu (NaH ₂ PO ₄)	Roth	4984.1
Dodecylsulfian sodu (C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na, SDS)	Roth	2326.2
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	POCH S.A.	396420113
Fluorek fenylometylosulfonylu (C ₇ H ₇ FO ₂ S, PMSF)	Sigma-Aldrich	P7626
Formaldehyd (HCHO)	Chempur	424321733
Fosfataza alkaliczna FastAP	Thermo Fisher Scientific	EF0654
Fosforan sodu (Na ₂ PO ₄)	Merck	S7907
Gentamycyna	Gibco	11558616
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Roth	3783.2
Glicyna (C ₂ H ₅ NO ₂)	Merck Millipore	G8898
Imidazol (C ₃ H ₄ N ₂)	Roth	X998.4
Izopropylotiogalaktozyd (C ₉ H ₁₈ O ₅ S, IPTG)	Roth	2316.4
Kanamycyna	Calbiochem	420111
Karbenicylina	Roth	6344.2
Kwas octowy (CH ₃ COOH)	POCH S.A.	568780693
Kwas mrówkowy CH ₂ O ₂	Roth	1EKH
Kwas solny (HCl)	POCH S.A.	575283115
Kwas wersenowy (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ , EDTA)	Roth	8043.1
Ligaza DNA faga T4	Fermentas	EL0011
Lizozym	Sigma	L6876

Materiały

Luria broth (LB)	Invitrogen	12795-084
Metanol (CH ₄ O)	POCH S.A.	621990110
Mieszanina akryloamid/bisakryloamid Rothiphorese (37,5:1)	Roth	3029.1
Mleko w proszku, Blotting grade	Roth	T145.3
Mrówczan amonu (NH ₄ HCO ₂)	Roth	5093
N, N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED)	Merck Millipore	1107320100
Nadsiarczan amonu ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , APS)	Biokom	13375.01
Nadtlenek wodoru (H ₂ O ₂)	Warchem	060596
Ni-NTA His-Bind Resin	Merck Millipore	70666
Odczynnik Folina	Sigma	F9252
Podchloryn sodu rr 15% (NaClO)	Warchem	56011
Polimeraza Phusion High Fidelity	New England Biolabs	F-5305
Ponceau-S	Sigma	P7170
Proteaza HRV3C	Sino Biological	S3CP01
Końskie przeciwciała IgG, anty-mysie IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową (HAMPO)	Vector Laboratories	PI-2000
Koźie przeciwciała IgG, anty-królicze IgG skoniugowane z peroksydazą chrzanową (GARPO)	Vector Laboratories	PI-1000-1
Królicze przeciwciała poliklonalne, anty-OTOL1	Biorbyt	orb185689
Mysie przeciwciała IgG, anty-HisTag (anty-His)	Clontech	631212
Restryktaza BamHI	Thermo Fisher Scientific	ER0051
Restryktaza HindIII	Thermo Fisher Scientific	ER0501
Restryktaza XhoI	Thermo Fisher Scientific	ER0692
Rybonukleaza (RNaza A)	Roth	7156
Siarczan miedzi (II) (CuSO ₄)	POCH S.A.	658280114
Standard długości DNA FastRuler Middle Range	Thermo Fisher Scientific	SM1113
Standard długości DNA GeneRuler 100bp	Thermo Fisher Scientific	SM0243
Standard długości DNA GeneRuler 100bp plus	Thermo Fisher Scientific	SM0323
Standard masy białkowej Pierce Unstained Protein MW Marker	Thermo Fisher Scientific	26610
Substrat ECL Plus	Thermo Fisher Scientific	32132
TALON Metal Affinity Resin	Takara Bio	635503
Terrific broth (TB)	Thermo Fisher Scientific	22711022
Tiosiarczan sodu (Na ₂ S ₂ O ₃)	Thermo Fisher Scientific	450620010
Tris ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂)	Roth	4855.2
Trypsyna	Sigma	T1426
Tween20	Sigma	P9416
Węglan sodu (NaCO ₃)	Warchem	056666
Wodorofosforan potasu (K ₂ HPO ₄)	Roth	4984.1
Wodorofosforan sodu (Na ₂ HPO ₄)	Roth	T879.1
Wodorotlenek sodu (NaOH)	POCH S.A.	810925112
Wodorowęglan amonu (NH ₄ HCO ₃)	POCH S.A.	810560119
Wodorowęglan sodu (NaHCO ₃)	POCH S.A.	810981118
Zestaw białek standardowych	Sigma-Aldrich	69385-6X30MG

Tabela 4. Spis zestawów komercyjnych używanych do pracy z kwasami nukleinowymi.

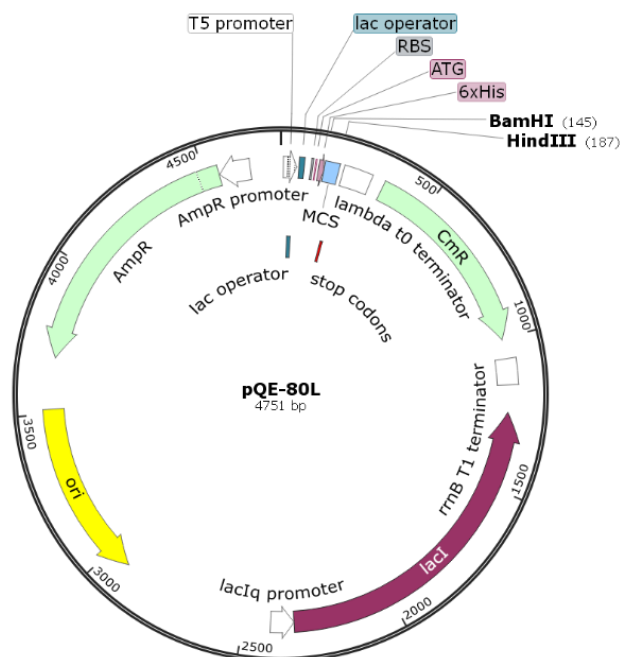
ZESTAW	PRODUCENT	NR KATALOGOWY
Clean-Up	AA Biotechnology	021-50
Gel-out	AA Biotechnology	23
Plasmid Mini Kit	Syngen	SY101011
NucleoBond	Macherey-Nagel	740 573.100

W eksperymentach wykorzystywana była ultraczysta woda H₂O_{mq} oczyszczana w aparacie Millipore Advantage A10 (Merck Millipore).

3.2. Plazmidy oraz oligonukleotydy

Sekwencje cDNA kodujące otolinę-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* zdeponowane w bazie NCBI RefSeq z identyfikatorami NM_001099741.1 i NM_001080440.1 zostały zoptymalizowane pod nadekspresję w komórkach *Escherichia coli* i zsyntetyzowane przez firmę GeneArt™ (Invitrogen).

W celu nadekspresji otoliny-1 z *Danio rerio* (dOtol1) oraz *Homo sapiens* (hOtol1), fragmenty zoptymalizowanego cDNA wykluczające peptyd sygnałowy zostały wklonowane do plazmidu pQE-80L (Qiagen) z użyciem miejsc restrykcyjnych *Bam*HI i *Hind*III (Rysunek 9). Plazmid pQE-80L umożliwia nadekspresję białka ze znacznikiem sześćohistydylowym (His-tag) na N-końcu białka. Plazmid pQE-80L posiada gen oporności na ampicylinę (*Amp*R), miejsce replikacji ColE1, a nadekspresja regulowana jest operonem laktozowym i podlega kontroli promotora faga T5.



Rysunek 9. Mapa plazmidu pQE-80L. *AmpR* – gen oporności na karbencylinę, *ori* – miejsce inicjacji replikacji, *lacI* – gen represora laktozowego, T5 – miejsce inicjacji transkrypcji, *lacO* – operator laktozowy, *MCS* – miejsce klonowania. bp oznacza długość plazmidu podaną w parach zasad.

Do przygotowania wymienionych plazmidów używano starterów do łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. *polymerase chain reaction*) oraz do ich sekwencjonowania. Oligonukleotydy zostały zsyntezowane przez firmę Genomed (Warszawa).

Tabela 5. Startery użyte do PCR oraz sekwencjonowania. Małe litery odpowiadają sekwencjom nukleotydowym pochodzącym z cDNA otoliny-1, wielkie litery odpowiadają sekwencjom dodanym w celu wklonowania cDNA białka do plazmidu.

NAZWA	RODZAJ STARTERA	SEWKENCJA
dOtol1-pQE-80L	PRZEDNI	5'-GCGCGCGGATCCagcattgataaaaccacca-3'
dOtol1-pQE-80L	WSTECZNY	5'-GCGCGCAAGCTTTAatcttgggtgcatctgcat-3'
hOtol1-pQE-80L	PRZEDNI	5'-GCGCGCGGATCCaaaaccacaccgcatacca-3'
hOtol1-pQE-80L	WSTECZNY	5'-GCGCGCAAGCTTTAcgggctaataaccgctg-3'
pQE_f	PRZEDNI	5'-cggataacaatttcacacag-3'
pQE_R	WSTECZNY	5'-ccagtaatgacctcagaac-3'

3.3. Szczepy bakteryjne

W pracach dotyczących manipulacji DNA wykorzystywane były komercyjne szczepy bakteryjne *Escherichia coli* One Shot™ TOP10 (Thermo Fisher Scientific), a w przypadku nadekspresji białek - szczep ArcticExpress (DE3) (Agilent Technologies). Tabela 6. zestawia genotypy bakterii.

Tabela 6 Genotypy bakterii użytych podczas realizacji pracy

SZCZEP	GENOTYP
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> ⁻ <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
ArcticExpress (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [cpn10 cpn60 Gent ^r]

3.4. Otolity oraz endolimfa

W trakcie realizacji pracy wykorzystywano otolity waterytowe (gwiazdki, łac. *asteriscus*) izolowane z głów karpia z gatunku *Cyprinus carpio* pochodzących z hodowli ze Stawów Milickich SA (Ruda Sułowska, Milicz). Metoda izolacji otolitów karpia zwyczajnego została opracowana przez dr inż. Martę Kalkę (Katedra Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii). W trakcie izolacji otolitów pobierano również zamrożoną endolimfę. Część badań wykonana została na otolitach kopalnych ślepiora z gatunku *Gadiculus argenteus* z rejonu Le-Puget-sur Argens, Francja, datowanych na dolny i środkowy pliocen, przekazanych z kolekcji Instytutu Paleobiologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie dzięki uprzejmości prof. dr hab. Jarosława Stolarskiego.

3.5. Podłoża hodowlane, antybiotyki

LB - podłoże płynne

Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)® - 25 g

Podłoże stałe LB z agarem

Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base)® - 25 g

Agar - 15 g

TB – podłoże hodowlane płynne

Terrific Broth - 47,6 g

Glicerol - 8 ml

Karbenicylina 100 mg/ml, rozpuszczono w H₂O_{mq}

Gentamycyna 10 mg/ml

Pożywki w objętości 1 litra sterylizowano w 121°C przez 20 min. Po wystudzeniu dodawano antybiotyki w stężeniu końcowym: LB – do hodowli wstępnej 100 µg/ml karbenicyliny oraz 100 µg/ml gentamycyny; TB – do hodowli głównej 50 µg/ml karbenicyliny. Podłoże stałe LB uzupełniano antybiotykiem po sterylizacji po ochłodzeniu do ok. 45 °C i wylewano około 10 ml na szalkę Petriego. Po zestaleniu przechowywano w temperaturze 4 °C i zużywano przez miesiąc.

3.6. Roztwory i bufony

Roztwory i bufony wykorzystane w pracy były przygotowywane w 20 °C.

Bufor TNa

Tris 10 mM
NaCl 100 mM
pH 7.5

Bufor TNaT

Tris 10 mM
NaCl 100 mM
Tween20 0.01 % (v/v)
pH 7,5

Bufor do elektroforezy białkowej SDS-PAGE x10

Tris 250 mM
Glicyna 1,92 M
SDS 1% (w/v)

Bufor TBE x10

Tris 890 mM
Kwas borny 890 mM
EDTA 20 mM
pH 8,3

Bufor do nanoszenia próbek białkowych 4xSB

Tris-HCl 248 mM
SDS 8% (w/v)
merkaptoetanol 20% (v/v)
glicerol 40% (v/v)
błękit bromofenolowy 0,01% (w/v)
pH 6,8

Roztwór Coomassie Brilliant Blue

Coomassie Brilliant Blue 1% (w/v)
R-250
metanol 20% (v/v)
kwas octowy 10% (v/v)

Materiały

Roztwór do odbarwienia Coomassie Brilliant Blue

metanol 40% (v/v)

kwask octowy 10% (v/v)

Roztwór do barwienia Ponceau S

Ponceau S 0.1% (w/v)

kwask octowy 5% (v/v)

Roztwór do transferu Western blot

Tris 25 mM

Glicyna 192 mM

Roztwór do transferu Western blot użyty do eksperymentu sieciowania chemicznego

Tris 25 mM

Glicyna 192 mM

Methanol 10 % (v/v)

SDS 1% (v/v)

Żele używane do elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) były wykonywane ze składników zestawianych w Tabeli 7.

Tabela 7 Skład żeli SDS-PAGE

SKŁADNIK	4%	7%	10%	12%
Rothiphorese akryloamid/bisakryloamid	4% (w/v)	7% (w/v)	10% (w/v)	12% (w/v)
Tris	125 mM	375 mM	375 mM	375 mM
SDS	0,1% (w/v)	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)	0,05% (w/v)
TEMED	0,01% (v/v)	0,01% (v/v)	0,01% (v/v)	0,01% (v/v)
	pH 6,8	pH 8,8	pH 8,8	pH 8,8

W trakcie oczyszczania białek były wykorzystywane następujące bufony, przygotowywane w temperaturze 20 °C:

Bufor A

Na₂HPO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

Glicerol 5% (v/v)

pH 7,4

Bufor L

Na₂HPO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

pH 7,4

Bufor B

Na₂HPO₄ 50 mM

NaCl 300 mM

imidazol 200 mM

Glicerol 5% (v/v)

pH 7,4

Bufor F

Tris 10 mM

NaCl 300 mM

Glicerol 5% (v/v)

pH 7,8

Materiały

Bufor C

Na ₂ HPO ₄	50 mM
Glicerol	5% (v/v)
	pH 7,4

Bufor EDTA

Tris	10 mM
NaCl	300 mM
EDTA	10 mM
Glicerol	5% (v/v)
	pH 7,8

Bufor D

Na ₂ HPO ₄	50 mM
NaCl	1000 mM
Glicerol	5% (v/v)
	pH 7,4

Bufor Ca²⁺

Tris	10 mM
NaCl	300 mM
CaCl ₂ *	0,1 - 100 mM
Glicerol	5% (v/v)
	pH 7,8

Bufor E

Tris	20 mM
NaCl	500 mM
Glicerol	5% (v/v)
	pH 7,8

RPC A

Mrówczan amonu	15 mM
Kwas mrówkowy	0,1% (v/v)

RPC B

Mrówczan amonu	15 mM
Kwas mrówkowy	0,1% (v/v)
Acetonitryl	70% (v/v)

Bufor PBS

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
	pH 7,5

*w zależności od warunków eksperymentu

4. Metody

4.1. Podstawowe techniki pracy z DNA i białkami

W Tabeli 8. przedstawiono standardowe techniki używane do pracy z DNA oraz białkami opisane w literaturze oraz w broszurach dostarczonych przez producentów. Samodzielnie opracowane metody pracy zostały przedstawione w dalszych rozdziałach.

Tabela 8. Lista standardowych technik używanych w pracy z DNA i białkami.

METODA	ODNOŚNIK
Amplifikacja cDNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy PCR	(Sambrook, 2001) i instrukcje producentów
Barwienie białek w żelu poliakrylamidowym barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250	(Fairbanks et al., 1971)
Barwienie srebrem białek w żelu poliakrylamidowym	(Wray et al., 1981)
Chemiczne ukompetentnianie komórek bakteryjnych	(Sambrook, 2001)
Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	(Sambrook, 2001)
Izolacja DNA z żelu agarozowego	Gel-Out, instrukcje producenta, AA Biotechnology
Izolacja plazmidowego DNA w skali midi	NucleoBond, instrukcje producenta, Machery-Nagel
Izolacja plazmidowego DNA w skali mini	Plasmid Mini Kit, instrukcje producenta, Syngen
Oczyszczanie DNA z mieszanin reakcyjnych	Clean-up, instrukcja producenta, AA Biotechnology
Pomiar stężenia białka metodą Lowry'ego	(Lowry, 1951)
Elektroforeza w warunkach denaturujących w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE	(Laemmli, 1970)
Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera	(Sambrook, 2001)
Transformacja komórek kompetentnych	(Hanahan, 1985)
Trawienie restrykcyjne, ligacja, defosforylacja plazmidów i cDNA do klonowania	(Sambrook, 2001) i instrukcje producentów
Znakowanie białka znacznikiem fluorescencyjnym ATTO-488 NHS	Instrukcja producenta, Sigma

Elektroforeza SDS-PAGE była używana w celu jakościowej analizy otrzymywanych preparatów białkowych. Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera było zlecane firmie Genomed, Warszawa.

Stężenia dOtol1 oraz hOtol1 zostały wyznaczone na podstawie pomiarów absorbancji korzystając z prawa Lamberta-Beera (Beer, 1852; Mäntele, 2017). Masowy współczynnik absorpcji i molowy ekstynkcji dla białek zostały wyliczone przy pomocy programu ProtParam (Gasteiger, 2005) i zostały przedstawione w Tabeli 9.

Tabela 9. Współczynniki absorpcji i molowy współczynnik ekstynkcji dOtol1 i hOtol1.

	$A_{280}^{0,1\%}$ [ml mg ⁻¹ cm ⁻¹]	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
dOtol1	0,88	45755
hOtol1	0,71	36035

4.2. Ekspresja i oczyszczanie otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*

4.2.1. Ekspresja białek w komórkach bakteryjnych

Komórki kompetentne *E.coli* ze szczepu Arctic Express (DE3) były transformowane odpowiednim plazmidem pQE-80L zawierającym cDNA kodujące otolinę-1 z *Danio rerio* (dOtol1) lub *Homo sapiens* (hOtol1). Zawiesina komórek była wysiewana na płytkę agarozową z podłożem LB z karbenicyliną w stężeniu końcowym 50 µg/ml. Płytki były inkubowane przez noc w 37°C. Następnie, 100 ml podłoża płynnego LB z karbenicyliną o stężeniu 50 µg/ml i gentamycyną o stężeniu 100 µg/ml, stanowiące hodowlę wstępną, zaszczepiano jedną kolonią z płytki i inkubowano przez noc w 37°C, z wytrząsaniem rotacyjnym 182 obrotów/min. Hodowlę właściwą, stanowiącą płynne podłoże TB z karbenicyliną o stężeniu 50 µg/ml, zaszczepiano hodowlą wstępną, tak by OD₆₀₀ wynosiło 0.05. Hodowlę właściwą prowadzono w 37°C z wytrząsaniem 182 obrotów/min do czasu osiągnięcia OD₆₀₀ równego 0,7-0,8. Następnie hodowla była schładzana do 16°C w zimnym pokoju. Po ochłodzeniu, ekspresję białek indukowano dodatkiem izopropylu-β-D-tiogalaktopiranozydu (IPTG) o stężeniu końcowym 1 mg/ml. Ekspresję kontynuowano w 16°C z wytrząsaniem 182 obrotów/min przez 20 godz. Po tym czasie, komórki bakteryjne oddzielano od podłoża hodowlanego przez wirowanie w wirówce Beckman Coulter Avanti J30I w 4 °C, 500 x g przez 15 min. Osad bakteryjny z 1 litra hodowli zawieszano w 30 ml buforu L (Rozdział 3.6). Tak przygotowane ekstrakty przechowywano w -80 °C.

4.2.2. Liza komórek bakteryjnych

Do wcześniej przygotowanego i rozmrożonego ekstraktu bakteryjnego (Rozdział 4.2.1) dodawano DNazę I i RNazę I w stężeniu końcowym 10 µg/ml, roztwór lizozymu w buforze L o stężeniu końcowym 50 µg/ml oraz świeży etanolowy roztwór inhibitora proteaz - fluorku fenylometylosulfonylu (PMSF) w stężeniu końcowym 200 µg/ml. W celu przeprowadzenia wydajnej lizy komórkowej ekstrakt był poddawany sonikacji w sonikatorze Cole Palmer ultrasonic procesor (IL) z amplitudą 30% i programem pulsacyjnym: 9.9 s ultradźwięków, 9.9 s przerwy. Liza komórkowa przebiegała przez maksymalnie 15 min na lodzie, nie pozwalając przekroczyć ekstraktowi temperatury 10 °C. Lizę komórek uznawano za zakończoną po subiektywnej ocenie zmniejszenia lepkości lizatu. Lizat wirowano w temperaturze 4 °C przy 18 500 x g przez 1 h w wirówce Eppendorf 5810R. Osad odrzucano, a supernatant poddawano dalszym czynnościom.

4.2.3. Techniki chromatograficzne

dOtol1 oraz hOtol1 zostały oczyszczane w dwuetapowej procedurze chromatograficznej w temperaturze pokojowej. Pierwszy etap - chromatografia powinowactwa do jonów metali (IMAC, ang. *immobilized metal affinity chromatography*) różnił się dla dOtol1 i hOtol1, natomiast kolejny – filtracja żelowa, był wspólny dla obu wariantów. Przepływ buforu na kolumnach był równy 0,5 ml/min i nie przekraczał ciśnienia maksymalnego, podanego przez producenta.

4.2.3.1. Chromatografia powinowactwa do jonów metali (IMAC)

Chromatografia dOtol1

2 ml złoża TALON Metal Affinity Resin w kolumnie grawitacyjnej ze spiekem przemywano 5-krotnym nadmiarem wody, a następnie 10-krotnym nadmiarem buforu A (Rozdział 3.6) w celu zrównoważenia złoża. Złoże inkubowano z klarownym supernatantem pochodzącym z 1 litra hodowli bakteryjnej przez 1 h w temperaturze 4-5°C z delikatnym mieszaniem na mieszadle rotacyjnym. Po inkubacji złoże wirowano w 4 °C, 500 x g przez 2 min. Supernatant odrzucano, a złoże TALON używano do wypełnienia pustej kolumny chromatograficznej Tricorn 5/50 (GE Healthcare). Przygotowaną kolumnę ze złożem TALON podłączano do systemu AKTA Avant (GE Healthcare) do szybkiej białkowej chromatografii cieczowej (FPLC, ang. *fast protein liquid chromatography*) i przepłukiwano buforem A w celu wypłukania białek niezwiązanych ze złożem do czasu ustabilizowania się absorbancji przy 280 nm (A_{280}) na niskim poziomie. Następnie, w celu pozbycia się białek niespecyficznie związanych, kolumnę płukano 10% gradientem buforu B w buforze A, automatycznie mieszanym przez system. Po ustabilizowaniu się A_{280} , białka związane z kolumną eluowano buforem B. Frakcje z poszczególnych etapów oczyszczania pobierano do analizy SDS-PAGE. Białka w buforze B zagęszczano i bezpośrednio przystępowano do dalszych etapów oczyszczania.

Chromatografia hOtol1

W przypadku homologa ludzkiego, procedura chromatografii powinowactwa została przeprowadzona z użyciem złoża Ni-NTA His-Bind Resin. 1 ml złoża Ni-NTA przepłukano na kolumnie grawitacyjnej ze spiekem 5-krotnym nadmiarem wody, a następnie 10-krotnym nadmiarem buforu A z dodatkiem imidazolu, w stężeniu końcowym 5 mM. Złoże inkubowano w 4 °C z delikatnym mieszaniem przez 30 min, a następnie wirowano w 4 °C, 500 x g przez 2 min. Supernatant odrzucano, a złoże przenoszono do kolumny Tricorn 5/50. Tak przygotowaną kolumnę podłączano do systemu AKTA Avant i płukano buforem A, aż do spadku A_{280} . Następnie, 1 ml złoża płukano gradientem liniowym NaCl (od buforu C do buforu D) przez 20 min. W celu elucji białka docelowego, kolumnę płukano buforem B. Tak, jak w przypadku IMAC dOtol1, frakcje z poszczególnych etapów oczyszczania pobierano do analizy, a próbka hOtol1 po pierwszym etapie w buforze B zagęszczano i poddawano bezpośrednio dalszej procedurze.

4.2.3.2. Filtracja żelowa

Kontynuacja pierwszego etapu oczyszczania jest wspólna dla obydwu białek. W celu pozbycia się agregatów i większych cząsteczek, białka zagęszczane na filtrze molekularnym Amicon Ultra 0,5 molecular weight cutoff (MWCO) 30 kDa wirowano w 4 °C przy 20 000 x g przez 10 min. Białka, w objętości 500 µl, nastrzykiwano na kolumnę Superdex200 Increase 10/300 (GE Healthcare) podłączoną do systemu AKTA Avant. Kolumna została wcześniej płukana jedną objętością odgazowanej wody, a następnie zrównoważona buforem E. Rozdział chromatograficzny przeprowadzany był przy przepływnie 0,5 ml/min. Zebrane frakcje, w których znajdowały się docelowe białka łączono, ponownie zagęszczano i nastrzykiwano na kolumnę HiTrap Desalting (GE Healthcare) zrównoważoną buforem F. Białka w buforze F dzielono na mniejsze objętości i przechowywano w -80 °C do badań.

Jakość preparatów była sprawdzana z użyciem SDS-PAGE po każdej preparacji.

4.3. Analizy bioinformatyczne

Analizy *in silico* zostały przeprowadzone dla sekwencji otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*, zdeponowanych w bazie UniProt pod identyfikatorami A5PN28 i A6NHN0. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek zostało wykonane w programie Clustal Omega (Sievers et al., 2011) z ustawieniami domyślnymi. Wynik porównania sekwencji posłużył wyznaczeniu stopnia podobieństwa i identyczności białek w narzędziu Ident and Sim (Stothard, 2000). Skład aminokwasowy był analizowany z użyciem programu Composition Profiler w odniesieniu do bazy danych SwissProt 51 (Vacic et al., 2007). Baza danych białek kolagenowych składała się z 75 białek o numerach: A2AX52, A6NMZ7, A8TX70, O75636, O88207, P02452, P02453, P02454, P02457, P02458, P02459, P02461, P02462, P02463, P02465, P02466, P02467, P05539, P05997, P08120, P08121, P08122, P08123, P08572, P11087, P12107, P12108, P12109, P12110, P12111, P13942, P20849, P20908, P20909, P25067, P25940, P27658, P28481, P29400, P39060, P53420, Q00780, Q01149, Q01955, Q02388, Q02788, Q03692, Q04857, Q05707, Q07092, Q14031, Q14050, Q14055, Q14993, Q17RW2, Q28084, Q3U962, Q5TAT6, Q61245, Q63870, Q7SIB2, Q80X19, Q8BLX7, Q8CG08, Q8IZC6, Q96A83, Q96CG8, Q99715, Q9BXS0, Q9JI03, Q9P218, Q9QZR9, Q9QZS0, Q9XSJ7, Q9Y215 w bazie UniProt. Wykres zależności średniego ładunku netto od średniej hydrofobowości został wykonany z użyciem programu PONDR (Xue et al., 2010).

Wszystkie parametry białek, takie jak teoretyczna masa cząsteczkowa, teoretyczny punkt izoelektryczny, czy współczynnik ekstynkcji zostały wyznaczone w programie ProtParam na podstawie sekwencji aminokwasowej białka (Gasteiger, 2005).

4.4. Wyznaczanie masy cząsteczkowej białek z użyciem spektrometrii mas

W celu wyznaczenia masy cząsteczkowej dOtol1 oraz hOtol1 przeprowadzono pomiar masy z wykorzystaniem spektrometru z jonizacją typu *elektrospray* i hybrydowym analizatorem typu kwadrupol-czasu przelotu (ESI-QTOF, ang. *electrospray ionisation – quadrupole time of flight*).

Próbkę białka o masie ok. 100 µg poddawano odsoleniu z użyciem chromatografii odwróconej fazy (RPC, ang. *reverse phase chromatography*). Kolumnę chromatograficzną Resource RPC (GE Healthcare) płukano 10-krotnym nadmiarem buforu RPC B (Rozdział 3.6) celem usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń, a następnie równoważono buforem RPC A. 100 µl roztworu nastrzykiwano na kolumnę i eluowano gradientem liniowym buforu RCP B w buforze RCP A w czasie 15 min w przepływie 1 ml/min. Otrzymany preparat poddawano liofilizacji.

Do pomiaru masy z użyciem spektrometru Synapt G2 (Waters) pobierano około 1 µg preparatu. Rozpuszczoną próbkę nastrzykiwano na kolumnę Waters ACQUITY ultra-performance liquid chromatography (UPLC) Protein C4, 300A, 1,7 µm, 1 mm × 50 mm i rozdzielano przy przepływie 0,1 ml/min. Białka poddane jonizacji ESI zostały zmierzone w trybie jonów dodatnich z użyciem następujących parametrów: napięcie na kapilarze – 2,5 kV, napięcie stożka próbkowania - 30 V, napięcie stożka rozdzielającego - 5 V, przepływ gazu suszącego - 650 l/godz. o temperaturze 150 °C. Pomiaru wykonywano w Laboratorium Spektrometrii Mas, Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

4.5. Techniki spektroskopowe użyte przy analizie właściwości dOtol1 i hOtol1

4.5.1. Spektroskopia dichroizmu kołowego

Widma dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism*) zostały zarejestrowane z użyciem spektropolarymetru Jasco J-815 z przystawką termostatuującą Jasco Peltier (CDF-426S/15) w celu utrzymania stałej temperatury 20 °C. W zależności od eksperymentu, widma były rejestrowane w buforze F, buforze EDTA lub buforze Ca²⁺ o stężeniu jonów wapnia 0,1, 1,0, 10,0 lub 100,0 mM (Rozdział 3.6).

Pomiary widm CD w dalekim ultrafiolecie zostały wykonane dla próbek dOtol1 lub hOtol1 o stężeniu 10 µM w kuwetach kwarcowych Suprasil, 100-OS (Hellma Analytics) o drodze optycznej wynoszącej 1 mm. Widma zostały zarejestrowane w zakresie 260 nm - 200 nm z szybkością skanowania 50 nm/min.

Pomiary CD w bliskim ultrafiolecie zostały wykonane dla białek o stężeniu 40 µM w kuwecie kwarcowej Suprasil, 105.202-QS (Hellma Analytics) o drodze optycznej 10 mm. Widma zostały zarejestrowane w zakresie 330 nm - 245 nm z szybkością skanowania 20 nm/min.

Każde widmo zostało zarejestrowane w trzech powtórzeniach, a na każde z powtórzeń składały się trzy akumulacje w czasie pomiaru. Dla każdej próbek i zostało również zarejestrowane widmo odpowiedniego buforu, które następnie odejmowano od widm białek. W trakcie analizy widma wyrażone w jednostkach eliptyczności zostały przekonwertowane na jednostki molowej resztowej eliptyczności (Kelly et al., 2005). Widma uzyskane w dalekim ultrafiolecie zostały poddane dekonwolucji w programie CDNN 2.1 celem oszacowania zawartości struktur drugorzędowych (Böhm et al., 1992).

4.5.2. *Pomiary emisji wewnętrznej fluorescencji białek*

Emisja fluorescencji reszt tryptofanowych została zarejestrowana z użyciem spektrofluorymetru Fluorolog-3 (HORIBA Jobin Yvon Inc.) w temperaturze pokojowej dla białek o stężeniu 2 μM w buforze EDTA lub buforze Ca^{2+} (Rozdział 3.6) o stężeniu jonów wapnia równym 1,0, 10,0 oraz 100,0 mM. Pomiary były prowadzone w kuwecie kwarcowej Suprasil 105.250-QS (Hellma Analytics). Fluorescencja była wzbudzana falą o długości 295 nm, a widma emisji były zbierane w zakresie 310 nm – 410 nm. Każde z widm zostało zarejestrowane w trzech powtórzeniach i skorygowane o sygnał pochodzący z buforów. Przedstawione widma zostały znormalizowane.

4.5.3. *Pomiary fluorescencji z użyciem sondy ANS*

Sonda rejonów hydrofobowych białek ANS (kwas 8-anilino-naftaleno-1-sulfonowy) została przygotowana przez rozpuszczenie w buforze F, a jej stężenie określano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego z użyciem molarnego współczynnika ekstynkcji $\epsilon_{\text{ANS}} (351 \text{ nm}) = 6240 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Ferguson et al., 1975). Próbkki białek o stężeniu 2 μM zostały przygotowane w buforach EDTA lub Ca^{2+} (Rozdział 3.6) z dodatkiem ANS o stężeniu końcowym 75 μM i inkubowane przez 1 godz. w temperaturze pokojowej. Widma emisji ANS zostały zarejestrowane z użyciem spektrofluorymetru Fluorolog-3 (HORIBA Jobin Yvon Inc.) po wzbudzeniu falą o długości 351 nm w zakresie 400 nm – 650 nm. Każdy z pomiarów został powtórzony trzykrotnie.

4.5.4. *Pomiary anizotropii fluorescencji*

dOtol1 oraz hOtol1 zostały znakowane fluorescencyjnie z użyciem estru ATTO-488 NHS (Rozdział 4.1). Stopień znakowania białka (DOL, ang. *degree of labelling*), będący stosunkiem ilości cząsteczek znacznika przypadających na cząsteczkę białka, został wyznaczony w oparciu o pomiary absorpcji (A_{280} i A_{max}) i wyznaczony z Równania 1. uwzględnieniem współczynników ekstynkcji białek (ϵ_{prot}) (Rozdział 4.14.1), współczynnika dla ATTO-488 NHS (ϵ_{max}) równego $90000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i współczynnika korekcyjnego (CF, ang. *correction factor*) równego 0,09.

$$DOL = \frac{A_{\text{max}} * \epsilon_{\text{prot}}}{(A_{280} - A_{\text{max}} * CF) * \epsilon_{\text{max}}} \quad (1)$$

Współczynniki DOL wynosiły 5,21 dla dOtol1 oraz 3,36 dla hOtol1.

Pomiary anizotropii fluorescencji (r) dOtol1 i hOtol1 w buforze EDTA lub Ca^{2+} o stężeniu jonów wapnia równym 0,1, 1,0, 10,0 i 100,0 mM (Rozdział 3.6) zostały wykonane na spektrofluorymetrze Jasco FP-8300 w kuwetach kwarcowych Suprasil 105.250-QS (Hellma Analytics) w temperaturze 25 °C. W badaniach użyto światło spolaryzowane o długości fali 501 nm do wzbudzenia fluorescencji, natomiast wartości r były rejestrowane przy 525 nm.

4.5.5. Skaningowa fluorymetria różnicowa

Przebieg denaturacji termicznej dOtol1 oraz hOtol1 został zarejestrowany z użyciem aparatu Prometheus NT.48 (NanoTemper) w kapilarach nanoDSF Grade Standard Capillaries (NanoTemper). Próbkę białek o stężeniu 4 μM w buforach EDTA lub Ca^{2+} (Rozdział 3.6) o stężeniach jonów wapnia równych 0,1, 1,0, 10,0 i 100,0 mM zostały umieszczone w kapilarach, które następnie zostały hermetycznie zaklejone na końcach. Przebieg denaturacji termicznej był monitorowany jako zmieniający się stosunek wartości intensywności wewnętrznej fluorescencji białek rejestrowanej przy 350 nm do wartości przy 330 nm. W trakcie eksperymentu próbki ogrzewano od temperatury 20 °C do 110 °C z postępowaniem wynoszącym 1 °C/min. Każdy pomiar był uśredniany z trzech pomiarów. Temperatura przejścia była wyznaczana na podstawie wartości minimum lokalnego pierwszej pochodnej krzywej denaturacji.

4.6. Pomiary parametrów hydrodynamicznych do analizy właściwości dOtol1 i hOtol1

4.6.1. Szybkościowe ultrawierowanie analityczne

Eksperymenty szybkościowego ultrawierowania analitycznego (SV-AUC, ang. *sedimentation velocity ultracentrifugation*) zostały przeprowadzone w ultrawirówce Beckman Coulter ProteomeLab XLI (Beckman Coulter Inc.) z rotorem AN-60 Ti w temperaturze 20 °C w kuwetach dwukanałowych z wypełnieniem węglowym z okienkami kwarcowymi Epon. Eksperyment był przeprowadzany dla próbek dOtol1 i hOtol1 w buforze F w warunkach redukujących (z dodatkiem 2mM 2-merkaptoetanolu) oraz w buforach EDTA i Ca^{2+} o stężeniu jonów wapnia równym 10 mM (Rozdział 3.6). Pomiary wykonywano w trzech powtórzeniach dla stężeń 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml oraz 1,0 mg/ml po trzech godzinach inkubacji w 20 °C przy 42000 obrotach na min (przyśpieszenie około 142000 \times g), a dane zbierano dla absorbancji mierzonej przy 280 nm przez cały czas trwania eksperymentu, a następnie analizowano w programie SEDFIT (<https://sedfitsedphat.github.io/sedfit.htm>, dostęp 12/19/2021) (Schuck, 2000) dla modelu rozkładu współczynnika sedymentacji $c(S)$ poprzez dopasowanie 300 współczynników sedymentacji dla wartości w zakresie od 0 do 30 S. Parametry dotyczące układu niezbędne do obliczeń, takie jak gęstość oraz lepkość dynamiczną buforów, obliczono przy użyciu programu SENDTERP (<http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>, dostęp 12/19/2021) (Laue, 1992). W wyniku przeprowadzonych analiz wyznaczano współczynniki

sedymantacji (S), współczynniki sedymantacji skorygowane na wodę ($\overline{S_{w,20}}$), stosunek współczynników tarcia (f/f_0) oraz masy cząsteczkowe (MW_{sv}). Jakość otrzymanych dopasowań została zatwierdzona na podstawie wartości średniej kwadratowej błędu (RMSD, ang. *root mean square deviation*). Eksperyment został wykonany we współpracy z dr inż. Rafałem Hołubowiczem z Katedry Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej.

4.6.2. Dynamiczne rozpraszanie światła

Badanie dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *dynamic light scattering*) przez dOtol1 i hOtol1 prowadzono z użyciem urządzenia Prometheus Panta (NanoTemper) w kapilarach Prometheus NT.48 Series nanoDSF Grade High Sensivity Capillaries w 20 °C przy ustawieniach 100% mocy światła lasera i 30% mocy wzbudzenia. Próbki dOtol1 oraz hOtol1 o stężeniach 0,17 mg/ml, 0,5 mg/ml oraz 1,0 mg/ml zostały sporządzone w buforze EDTA lub Ca^{2+} o stężeniu równym 10 mM (Rozdział 3.6). Przed pomiarem próbki wirowano przy przyspieszeniu 20000 x g przez 10 min i niezwłocznie umieszczano w kapilarach pomiarowych. Każdy pomiar został wykonany w pięciokrotnym powtórzeniu i analizowany programem PR. Panda Control (NanoTemper).

4.6.3. Analityczne sączenie molekularne

Analityczne sączenie molekularne (aSEC, ang. *analytical size exclusion chromatography*) przeprowadzono z użyciem kolumny chromatograficznej Superdex200 Increase 10/30 (GE Healthcare) podłączonej do systemu chromatograficznego AKTA Avant (GE Healthcare) dla próbek dOtol1 i hOtol1 o stężeniach 0,5 mg/ml o objętości naniesionej na kolumnę równej 200 μ l w buforze E (Rozdział 3.6) z dodatkiem EDTA lub $CaCl_2$ o stężeniu końcowym 10 mM. Kolumnę chromatograficzną równoważono buforem E z dodatkiem EDTA lub $CaCl_2$. Szybkość przepływu buforu przez kolumnę została ustawiona na 0,5 ml/min, profil elucji białek był rejestrowany poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm. Objętość zerowa kolumny (V_0) została wyznaczona z użyciem dekstranu z kowalencyjnie dołączonym barwnikiem Cibaron Blue (Blue Dextran) z zestawu Gel Filtration Marker Kit (Sigma-Aldrich).

4.7. Techniki mikroskopowe użyte przy analizie dOtol1 i hOtol1

4.7.1. Transmisyjna mikroskopia elektronowa z barwieniem negatywowym

Próbki dOtol1 i hOtol1 w buforze 10 mM Tris, 300 mM NaCl (pH 7,8) lub buforze PBS po sieciowaniu BS^3 nanoszono na miedzianą siatkę (Maxtaform Cu/Rh HR26) do transmisyjnej mikroskopii elektronowej z kontrastowaniem negatywowym (NS-TEM, ang. *negative staining transmission electron microscopy*), która wcześniej została potraktowana plazmą przez 20 sekund. Białka znajdujące się na siatkach zostały kontrastowane 2% (w/v) roztworem octanu uranylu. Obrazowanie przeprowadzono w mikroskopie JEM 1200 przy 100 kV, a wyniki analizowano

w programie ImageJ (Schneider et al., 2012). Obrazowania NS-TEM zostały wykonane jako etap poprzedzający eksperymenty wykorzystujące mikroskopię krioelektronową.

4.7.2. Mikroskopia krioelektronowa

Eksperymenty obrazowania zostały przeprowadzone wstępnie w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego przy pomocy mikroskopu elektronowego Glacios 200 kV (Thermo Fisher Scientific) w warunkach kriogenicznych, a następnie w Narodowym Centrum Promieniowania Synchrotronowego SOLARIS w Krakowie na podstawie wniosku o przyznanie czasu badawczego otrzymanego we współpracy z dr. inż. Mariuszem Czarnockim-Cieciurą z Laboratorium Struktury Białka Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Pomiary w centrum SOLARIS zostały zrealizowane przy użyciu mikroskopu elektronowego Titan Krios G3i (Thermo Fisher Scientific).

Próbki dOtol1 oraz hOtol1 o stężeniu 1,1 mg/ml znajdowały się w buforze 10 mM Tris (pH 7,8), 300 mM NaCl lub w PBS po sieciowaniu BS³. Siatkę Quantifoil R2/1 traktowano plazmą przez 80 sekund, a następnie witrifikowano w urządzeniu Vitrobot z czasem blottingu 4s. Przygotowane siatki sprawdzono w mikroskopie Glacios 200 kV (Thermo Fisher Scientific) wyposażonym w kamerę Falcon 3EC. Wybrane siatki posłużyły do rejestrowania danych z użyciem mikroskopu Titan Krios G3i (Thermo Fisher Scientific) wyposażonego w kamerę Gatan K3 z filtrem energii BioQuantum. Całkowita dawka elektronów przypadająca na próbkę wynosiła 40 e/Å². Próbkę obrazowano w powiększeniu 105000x, w defokusie wynoszącym -2.1, -1.8, -1.5, -1.2, -0.9 μm. Obrazy rejestrowano w trybie automatycznym. Do analizy obrazów wykorzystano programy RELION (wersja 3.1.2-commit-0e9e83) oraz cryoSPARC (v3.3.2).

4.8. Sieciowanie chemiczne

Eksperyment sieciowania chemicznego dOtol1 i hOtol1 przeprowadzano w buforze A (Rozdział 3.6) z użyciem odczynnika BS³ (suberynian bis-sulfosukcynimidanu), o stężeniu wyjściowym BS³ 2,5 mM również w buforze A.

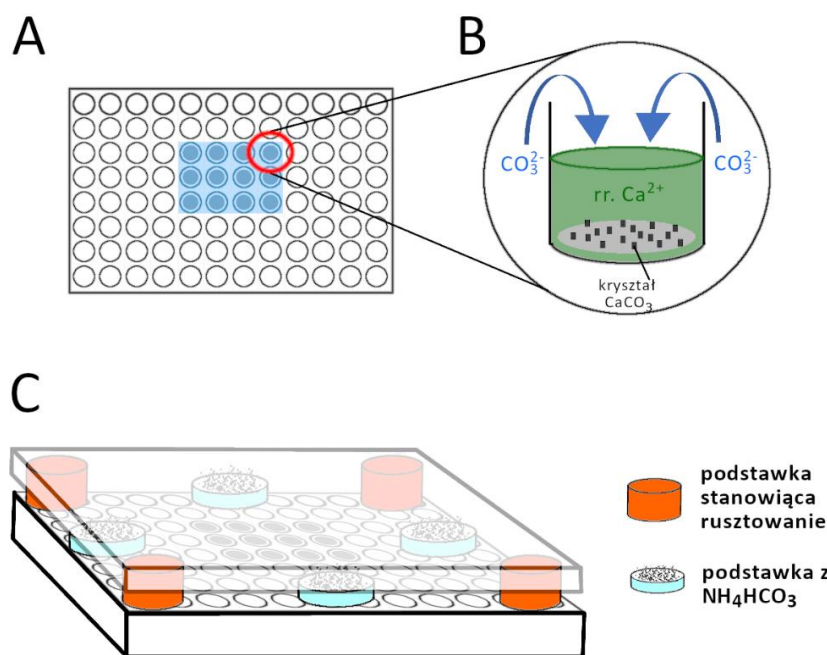
Reakcje w objętości 200 μl prowadzono w temperaturze pokojowej przy 15- oraz 30-molowym nadmiarze czynnika sieciującego do białka (200 μg na reakcję). Z reakcji pobierano próbki o objętości 50 μl (zawierające 50 μg białka) w odstępach czasowych: 1 min, 2,5 min, 5 min oraz 10 min, następnie przenosząc je do roztworu 1 M Tris (2,5 μl, do stężenia końcowego równego 50 mM) w celu zahamowania reakcji. Próbkę kontrolną stanowił roztwór białka przed dodaniem czynnika sieciującego, tj. 50 μl zawierającego dOtol1 lub hOtol1 o masie 50 μg w buforze A z dodatkiem 2,5 μl 1 M roztworu Tris. Po zakończeniu reakcji, próbki analizowano poprzez SDS-PAGE (Rozdział 4.1) w żelu 4%-7% przy 100 V oraz przez Western blotting (Rozdział 4.1) z użyciem błony z polifluorku winylidenu (PVDF). Transfer prowadzony był przy 10 V przez 75 min.

Białka i ich sieciowane pochodne wykrywano poprzez inkubację z przeciwciałami pierwszorzędowymi anti-His (rozcieńczenie 2000 w buforze TN), następnie drugorzędowymi HAMPO (rozcieńczenie 2000 w buforze TNT) i reakcją chemiluminescencyjną z użyciem odczynnika Pierce ECL (Rozdział 3.1 oraz 3.6).

4.9. Test aktywności biomineralizacyjnej *in vitro* dOtol1 i hOtol1

Badania nad aktywnością biomineralizacyjną dOtol1 oraz hOtol1 były prowadzone z użyciem metody powolnej dyfuzji (Silverman, Boskey, 2004; Wojtas et al., 2012). Na Rysunku 10. przedstawiono schemat używanego układu. Okrągłe szkiełka o średnicy 5 mm (o grubości 0,13 – 0,17 mm, CE Knittel Glaser) umieszczano w centralnie położonych studzienkach w płytce 96-dołkowej do hodowli komórkowych Nunclon (Sigma-Aldrich) (Rysunek 10A). Następnie dodawano mieszaninę mineralizacyjną w objętości 300 μ l, w skład której wchodziły: dOtol1 lub hOtol1 o stężeniu końcowym 30 μ g/ml, 150 μ g/ml lub 300 μ g/ml; bufor F (Rozdział 3.6) uzupełniany do 14% objętości mieszaniny po dodaniu roztworów białek; roztwór wodny CaCl_2 o stężeniu końcowym 2 mM, 10 mM lub 25 mM, oraz woda do uzyskania objętości końcowej. Dla eksperymentów mających na celu badanie lokalizacji dOtol1 i hOtol1 w kryształach dodawano białka znakowane znacznikiem ATTO-488 NHS (Rozdział 4.1) w stężeniu końcowym 200 nM, odejmując ich objętość od używanej objętości buforu F. Kontrole stanowiły roztwory pozbawione białek, uzupełnione buforem F. W przypadku kontroli dla eksperymentów z wykorzystaniem białek znakowanych, dodawano tylko wodny roztwór ATTO-488 NHS o stężeniu końcowym 250 nM.

Następnie dodawano po 0,25 g NH_4HCO_3 do czterech podstawek i umieszczano je na linii czterech przeciwstawnych krawędzi płytki (Rysunek 10C). W czterech rogach płytki ustawiono plastikowe podstawki celem utworzenia podpory dla pokrywy płytki. Po umieszczeniu pokrywy, górną i dolną część płytki scalano folią Parafilm izolując układ od otoczenia. Podczas rozkładania się NH_4HCO_3 uwalniane są jony CO_3^{2-} , które w zamkniętej przestrzeni powoli dyfundują do roztworu mineralizacyjnego, dzięki czemu powstają kryształy CaCO_3 (Rysunek 10B). Standardowo eksperyment przeprowadzany był w 20 °C przez 24 godz. lub dla eksperymentów czasowych przez 2,5, 6 i 8 godz. Po upływie czasu usuwano pozostałość mieszaniny reakcyjnej, a kryształy przyklepione do szkiełka przepłukiwano wodą a następnie suszono w temperaturze pokojowej.



Rysunek 10. Schemat układu eksperymentalnego systemu powolnej dyfuzji. Płytki 96-dołkowa (A) była wypełniana roztworem mineralizacyjnym (B), a pozostałe elementy układu były izolowane przez połączenie nakrywką z płytką folią Parafilm (C). Na podstawie: (Wojtas et al., 2012)

4.10. Techniki mikroskopowe użyte do analizy biominerałów oraz otolitów

4.10.1. Mikroskopia świetlna i fluorescencyjna

Podstawową technikę obserwacji i oceny krysztalów węgla wapnia stanowiła mikroskopia świetlna jasnego pola (BF, ang. *bright field*) oraz fluorescencyjna, z użyciem mikroskopu Carl Zeiss Axio Observer 7 wyposażonego w kamerę AxioCam 305. Krysztaly były obserwowane przy pomocy obiektywu LD Plan-Neofluar 20x. Fluorescencja wzbudzana była światłem o długości fali 500 nm pochodzącym z lampy HXP 120V, natomiast emisja była rejestrowana dla 525 nm. Obrazy były analizowane z użyciem oprogramowania ZEN 3.1 (Carl Zeiss).

4.10.2. Skaningowa mikroskopia elektronowa

Krysztaly węgla wapnia znajdujące się na szkiełku pokrywane były warstwą platyny o grubości 20 nm. Następnie były obrazowane z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, ang. *scanning electron microscope*) Philips/FEI XL-20 z napięciem przyspieszającym 25 kV i odległością roboczą wynoszącą 34 mm. Obrazy analizowano w programie ImageJ i na ich podstawie szacowano ilość krysztalów przypadającą na 1 mm^2 szkiełka i wielkość reprezentatywnych krysztalów. Obrazowanie przeprowadzone zostało we współpracy z prof. Jarosławem Stolarskim z Instytutu Paleobiologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Otolity karpia pokrywano warstwą złota. Ich powierzchnię obrazowano z użyciem mikroskopu SEM Tescan Vega-3 sprzężonego z systemem TEAM EDS Analysis (Coherent Scientific). Zdjęcia wykonywano przy napięciu przyspieszającym 20 kV i odległości roboczej 34,5 mm

lub napięciu 10 kV i odległości roboczej w zakresie 25-27 mm dla przybliżeń powierzchni. Procentowy skład pierwiastkowy (wagowy) otolitów szacowano przy pomocy spektroskopii z dyspersją energii (EDS, ang. *energy dispersive spectroscopy*) w trakcie obrazowania. Dla każdego z analizowanych otolitów wykonywano trzy pomiary przy ustawieniach napięcia przyspieszającego 20 kV i identycznego kąta odbioru: 49,86°. Pomiary wykonano podczas stażu naukowego w Departamencie Nauk o Atmosferze i Oceanie Uniwersytetu Kalifornijskiego pod opieką dr Jeany Drake.

4.10.3. *Mikroskopia konfokalna*

Obserwacje dystrybucji fluorescencyjnie znakowanej dOtol1 lub hOtol1 w kryształach węgla wapnia prowadzono z użyciem mikroskopii konfokalnej (CLSM, ang. *confocal laser scanning microscopy*) w Katedrze Chemii Biologicznej i Bioobrazowania Politechniki Wrocławskiej. Kryształy obserwowano na mikroskopie Leica TCS SP8 wyposażonym w obiektyw HC PL APO CS 40x/0,85. Fluorescencję wzbudzano światłem lasera OPAL o długości fali 488 nm o intensywności 0,5%, natomiast emisję rejestrowano przy 552 nm. Otrzymane obrazy analizowano w programie LAS X 3.5.2.18963.

4.10.4. *Mikroskopia fluorescencyjna wzbudzana dwufotonowo*

Podobnie jak w przypadku CLSM, obserwacje fluorescencyjnie znakowanej dOtol1 i hOtol1 w kryształach węgla wapnia prowadzone były z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej wzbudzonej dwufotonowo (2PEFM, ang. *two-photon excited fluorescence microscopy*) z użyciem mikroskopu Nikon Elipse Ti-U połączonym z laserem Sapphire (Chameleon, Coherent Inc.) zdolnym do emisji około 100 fs impulsów o częstotliwości 80 MHz. Wiązka lasera wzbudzającego została nakierowana na próbkę przy pomocy obiektywu Nikon Planar Fluor 40x/0,7, który posłużył również do rejestrowania emisji fluorescencji, która była wykrywana z użyciem fotodiod lawinowych IDQ id100. Na mapy intensywności fluorescencji składały się skany rastrowe próbek zamontowanych na piezoelektrycznym stoliku XYZ. Fluorescencja była wzbudzana przy 800 nm, natomiast emisja rejestrowana w przedziale 400-700 nm. Obrazowanie zostało wykonane we współpracy z mgr inż. Dominiką Benkowską-Biernacką z Instytutu Materiałów Zaawansowanych Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej.

4.10.5. *Spektroskopia mikro-Ramanowska*

Widma Ramana kryształów węgla wapnia rejestrowano z użyciem spektroskopu mikro-ramanowskiego InVia sprzężonego z mikroskopem konfokalnym Leica DM2500 (Renishaw). Pomiary były rejestrowane w przedziale od 100 do 1300 cm^{-1} po wzbudzeniu światłem lasera argonowego o długości fali 488 nm. Pomiary zostały wykonane we współpracy z dr hab. Maciejem Ptakiem z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

4.11. Analiza proteomu i identyfikacja białek otolitów

4.11.1. Preparacja macierzy organicznej otolitów

Przedstawione postępowanie było jednakowe dla otolitów *Cyprinus carpio* oraz kopalnych otolitów *Gadiculus argenteus*. Do oczyszczania użyto około 900 mg otolitów karpia zwyczajnego i około 230 mg otolitów ślepiora (Rozdział 3.4).

Pierwszym etapem prac było oczyszczenie otolitów z zanieczyszczeń zewnętrznych, m.in. pozostałości tkanek oraz obcych białek. W tym celu używano zmodyfikowanej metody opisanej przez Stoll i wsp., (2001), polegającej na czyszczeniu biominerałów roztworem podchlorynu sodu i nadtlenu wodoru. Do próbek zawierających otolity dodawano w pierwszej kolejności 1,5% (v/v) roztwór podchlorynu sodu, następnie wkraplano 30% (v/v) roztwór nadtlenu wodoru. Próbkę inkubowano godzinę w temperaturze pokojowej na kołyszce, następnie usuwano roztwór, a otolity płukano wodą. Czynność powtarzano trzykrotnie, po czym otolity pozostawiano do wyschnięcia. Suche otolity rozdrabniano w moździerzu i ponownie czyszczono z użyciem podchlorynu sodu i nadtlenu wodoru. Ze względu na rozdrobnienie materiału po każdym z etapów próbki wirowano przy 10 000 xg przez 3 min, usuwano supernatant i analogicznie płukano wodą. Oczyszczony proszek zostawiano do wyschnięcia. Z każdego etapu oczyszczania pobierano jeden otolit *Cyprinus carpio* do obrazowania SEM oraz oszacowania składu pierwiastkowego powierzchni z użyciem EDS, jako wyznacznika usunięcia białek z powierzchni otolitu.

Część mineralną otolitów usuwano poprzez dekalcyfikację z użyciem 0,5 M roztworu kwasu octowego. Do proszku dodawano kwas octowy porcjami o objętości 2-5 ml i pozostawiano do przereagowania. Gdy z roztworu przestał uwalniać się ditlenek węgla (brak pęcherzyków gazu), próbki wirowano przez 5 min przy 10 000 xg, supernatant przenoszono do świeżej próbki, a pozostały osad ponownie rozpuszczano kwasem octowym. Czynności te powtarzano, aż do momentu dodania porcji kwasu octowego, po której pozostały osad nie dawał oznak reakcji.

Próbkę z supernatantem zagęszczano do objętości 500 µl z użyciem koncentratorów Amicon Ultra lub Pall Corporation nieprzepuszczalnych dla cząsteczek o masie molekularnej powyżej 3 kDa, następnie rozcieńczano wodą do 5 ml, ponownie zagęszczano i przenoszono do próbki, w której białka wytrącano stężonym acetonem schłodzonym w -20 °C w 5-krotnym nadmiarze objętościowym. Próbkę inkubowano godzinę w -20 °C, następnie wirowano przez 30 min w temperaturze 4 °C przy 16 000 x g. Osad pozostały po dekalcyfikacji otolitów płukano 2 ml 80% (v/v) roztworu acetonu schłodzonego do -20 °C. Próbkę osadu z acetonem również inkubowano godzinę w -20 °C, a następnie wirowano przez 30 min w 4 °C przy 16 000 xg. Supernatant odrzucano, a próbkę płukano powtórnie.

Frację białek macierzy otolitycznej rozpuszczalnych w kwasie octowym (supernatant, *sup*) oraz frakcję nierozpuszczalną (osad) poddawano dodatkowej liofilizacji celem usunięcia pozostałości rozpuszczalników. Z otrzymanych preparatów pobierano niewielką ilość liofilizatu do analizy SDS-PAGE w żelu 4%-10% (Rozdział 4.1). Żel barwiono srebrem (AgNO_3) (Rozdział 4.1).

W celu uniknięcia zanieczyszczenia próbek, nigdy nie pracowano w tym samym czasie z otolitami *Cyprinus carpio* i *Gadiculus argenteus*. Do pracy używano każdorazowo świeżych odczynników, różnych zestawów pipet, moździerzy i produktów zużywalnych, różnych środków ochrony osobistej, a pracę wykonywano pod laminarem. Część badań przeprowadzono podczas stażu naukowego w Departamencie Nauk o Atmosferze i Oceanie Uniwersytetu Kalifornijskiego pod opieką dr Jeany Drake.

4.11.2. Tandemowa spektrometria mas

Identyfikacja białek macierzy organicznej otolitów została przeprowadzona w Laboratorium Spektrometrii Mas Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Wyizolowane składniki macierzy organicznej otolitów *Cyprinus carpio* oraz około 7 μg osadu macierzy otolitów kopalnych *Gadiculus argenteus* poddano identyfikacji z użyciem tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczową (LC-MS/MS, ang. *liquid chromatography, tandem mass spectrometry*).

Próbki były rozpuszczane w 20% trifluoroetanolu (TFE) w buforze 100 mM wodorowęglanu amonu (ABC) z użyciem sonikatora przez 30 min, następnie dwukrotnie rozcieńczane z użyciem buforu ABC, ponownie sonikowane i wytrząsane 30 min. Mostki disiarczkowe zostały zredukowane w obecności 5 mM Tris-(2-karboksyetylo) fosfiny (TCEP) przez 1 godz. w 37 °C, a następnie próbki inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej w obecności 15 mM metanotiosulfonianu metylu (MMTS) i kolejno rozcieńczano buforem ABC do stężenia końcowego TFE równego 5%. Następnie próbki trawiono 2 μg trypsyny w 37 °C przez noc. Po trawieniu próbki zakwaszono 0.1% kwasem mrówkowym.

Analizy prowadzono z użyciem chromatografu Evosep One (Evosep Biosystems) połączonego ze spektrometrem mas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). 40 μl próbek supernatantu, osadu, endolimfy lub 80 μl osadu kopalnego nakładano na jednorazowe kolumny C18 Evotips (Evosep Biosystems) według zaleceń producenta z drobnymi modyfikacjami. Złoże aktywowano przy pomocy 25 μl rozpuszczalnika B (0.1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu) poprzez wirowanie przez 1 min przy 600 x g, a następnie 2-minutową inkubację z izopropanolem. Po zrównoważeniu złoża buforem A, próbki umieszczano na złożu i ponownie płukano dwukrotnie 100 μl roztworu A i końcowo nakrapiano 200 μl buforu A. Rozdział chromatograficzny próbek na kolumnie analitycznej EV1106 (Dr Maisch C18 AQ, Evosep Biosystems) przebiegał przy prędkości przepływu 250 nl/min w gradiencie przez 88 min.

Dane zbierano w trybie jonów dodatnich z ustawieniami: rozdzielczość MS1 równa 60 000, automatyczny maksymalny czas nastrzyku i zakres skanowania od 300 do 1600 m/z; rozdzielczość MS2 15 000, automatyczny maksymalny czas nastrzyku. Wykluczanie dynamiczne zostało ustawione na 20 s z tolerancją masy ± 10 ppm. Zastosowano fragmentację typu HCD ze znormalizowaną energią kolizji wynoszącą 30%. Napięcie rozpylacza wynosiło 2.1 kV, poziom radioczęstotliwości dyszy wynosił 40 kHz, a temperatura kapilary 275 °C.

Surowe dane zostały początkowo przetworzone z użyciem oprogramowania Mascot Distiller (v. 2.4.2.0; Matrix Science), a otrzymane masy peptydów i widma fragmentacyjne zostały przypisane do bazy danych *Cyprinus carpio*/NCBIprot (118333 sekwencji) dla analiz supernatantu, osadu i endolimfy oraz gromady promieniopłetwych *Actinopterygii*/NCBIprot (6855345 sekwencji) dla próbki białek otolitów kopalnych z użyciem narzędzia Mascot (Mascot Daemon v. 2.4.0, Mascot Server v. 2.4.1, oraz Matrix Science). Wyszukiwanie w bazie zostało dostosowane do parametrów: specyficzność enzymu – trypsyna, tolerancja masy peptydu – 5 ppm, tolerancja masy fragmentu – 0,01 Da. Masa białka została pozostawiona bez ograniczeń, a wartości masy ustawione jako monoizotopowe z dozwolonymi dwoma miejscami błędnego trawienia. Metylacja reszt cysteinylowych została ustawiona jako stała modyfikacja, natomiast utlenianie reszt metioinylowych jako modyfikacja zmienna. Identyfikacja została przeprowadzona z użyciem wyszukiwarki Mascot z użyciem algorytmu opartego o prawdopodobieństwo. Algorytm *Decoy Mascot* został ustawiony tak, aby wskaźnik fałszywie pozytywnej identyfikacji nie przekraczał 1%. Do analizy danych użyto narzędzia STRING (Szklarczyk et al., 2019) oraz Clustal Omega (Sievers et al., 2011).

5. Wyniki

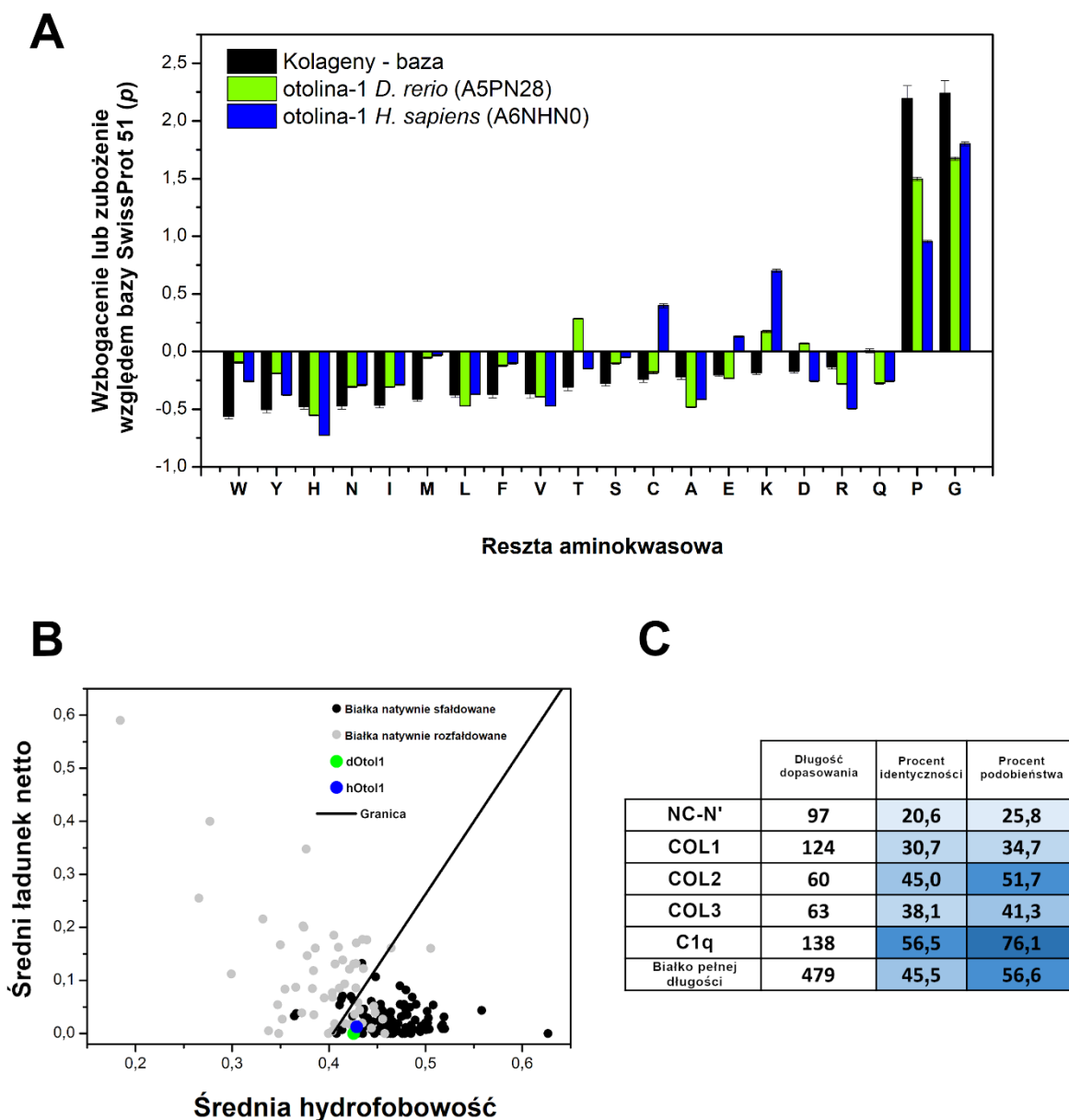
5.1. Analizy bioinformatyczne sekwencji otoliny-1

Sekwencje aminokwasowe otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* zostały przeanalizowane z użyciem narzędzi bioinformatycznych (Rozdział 4.3) celem pozyskania podstawowych informacji na temat białka. Skupiono się na analizach składu aminokwasowego białek, struktury oraz podobieństwa obu białek.

Sekwencje otoliny-1 z *Danio rerio* oraz *Homo sapiens* są identyczne w 45,4% i podobne w 56,6% (Rysunek 11C). Szczególnie zachowanymi w ewolucji częściami białka są drugi segment domeny kolagenowej - COL2 oraz C-końcowa domena C1q (Rysunek 6).

Rysunek 11. przedstawia wyniki przeprowadzonych analiz. Na Rysunku 11A zestawiono wzorce wzbogacenia i zubożenia w reszty aminokwasowe otoliny-1 oraz kolagenów względem sekwencji zdeponowanych w bazie SwissPro 51 (Rozdział 4.3.). Obydwa analizowane homologi otoliny-1 cechują się znacząco zwiększoną zawartością reszt Gly, Pro i Lys oraz spadek występowania His, Arg, Gln i reszt alifatycznych Ala, Leu, Val. W porównaniu do analizowanej bazy białek kolagenowych, otolina-1 posiada znacznie więcej reszt Gly oraz Pro, co jest typowe dla tej grupy białek (Rysunek 11A). W odniesieniu do kolagenów, obydwie homologie posiadają zwiększony udział reszt Lys, dla homologa z *Homo sapiens* – wzbogacenie w reszty Cys, a dla otoliny-1 z *Danio rerio* – w reszty Trp. Na podstawie wykresu Uversky'ego otolina-1 jest kwalifikowana do białek natywnie sfałdowanych (Rysunek 11B). Dodatkowo, elementem usztywniającym struktury trzecio- i czwartorzędowe obydwu białek mogą stanowić powtórzenia reszt Cys w N-terminalnej części białka (NC-N') (Dodatek) (Kishore, 2000).

Pełnej długości kolageny cechują się obecnością powtórzeń trzech aminokwasów: $(\text{Gly-X-Y})_n$, gdzie w pozycji X najczęściej występuje reszta prolilowa, a w Y – hydroksyprolilowa (Brodsky, 2005). Otolina-1 w obrębie domeny kolagenopodobnej również zawiera ciągi powtórzeń $(\text{Gly-X-Y})_n$, jednak na 72 reszty otoliny-1 z *Danio rerio* przypada 6 trójek Gly-Pro-Pro oraz 8 trójek, gdzie jedynie w pozycji X znajduje się Pro, a w pozycji Y inna reszta. W przypadku homologa ludzkiego na 75 powtórzeń pojawiają się dwa Gly-Pro-Pro oraz 7 posiadających jedynie Pro w pozycji X. Porównanie sekwencji aminokwasowych otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* znajduje się w Dodatku.



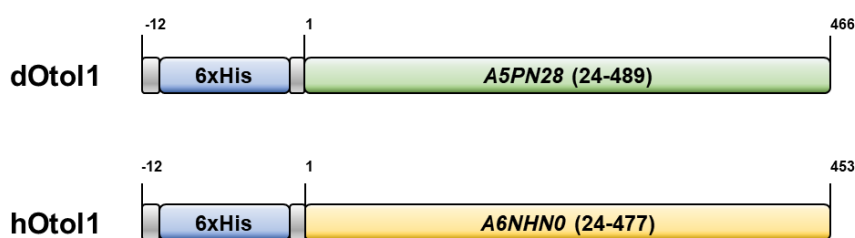
Rysunek 11. Analizy bioinformatyczne porównujące otolinę-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*. (A) wykres kolumnowy przedstawiający wzbogacenie lub zubożenie sekwencji aminokwasowej białka w dane reszty, w porównaniu do bazy danych kolagenów. (B) Wykres Uversky'ego, plasujący otolinę-1 w grupie białek natywnie sfałdowanych. (C) Porównanie podobieństwa i identyczności otoliny-1 oraz jej domen pomiędzy *Danio rerio* i *Homo sapiens*.

5.2. Otrzymanie preparatów rekombinowanej otoliny-1

Poznanie mechanizmów stojących za powstawaniem biominerałów skupia się w szczególności na badaniach białek zaangażowanych w proces. W przypadku otolitów i otokoniów, niewielka ilość macierzy organicznej, a także ogromna ilość białek, jest ograniczeniem bardzo utrudniającym prace z białkami izolowanymi ze źródła naturalnego w celu dokonania nawet podstawowych badań biochemicznych i biofizycznych. Z tego względu w celu dokonania charakterystyki właściwości molekularnych otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* posłużono się białkami rekombinowanymi ekspresjonowanymi w komórkach bakteryjnych (Rozdział 3.2 i 4.2).

5.2.1. Strategia preparacji dOtol1 oraz hOtol1

Plazmid pQE80L (Rozdział 3.2) został poddany trawieniu restrykcyjnemu, a następnie ligacji z fragmentem cDNA kodującym ludzką otolinę-1 (Identyfikator UniProt: A6NHN0) lub z *Danio rerio* (Identyfikator UniProt: A5PN28) (Rozdział 4.1). Poprawność otrzymanych konstruktów genetycznych została sprawdzona poprzez sekwencjonowanie (Rozdział 4.1). Plazmid do ekspresji rekombinowanej dOtol1 lub hOtol1 został zaprojektowany w sposób umożliwiający otrzymanie produktu pozbawionego sekwencji sygnałowej kodującej 23 aminokwasy z końca-N białka. Dodatkowo, ze względu na obraną strategię oczyszczania, białko zostało uzupełnione na końcu-N w metkę sześciohistydylową (6xHis). Schemat otrzymanych białek został przedstawiony na Rysunku 12. Obecność znacznika 6xHis posłużyła do oczyszczania białka na etapie chromatografii powinowactwa do jonów metali dwuwartościowych (IMAC) (Rozdział 4.2.3.1). Kolejnym etapem była filtracja żelowa (Rozdział 4.2.3.2).

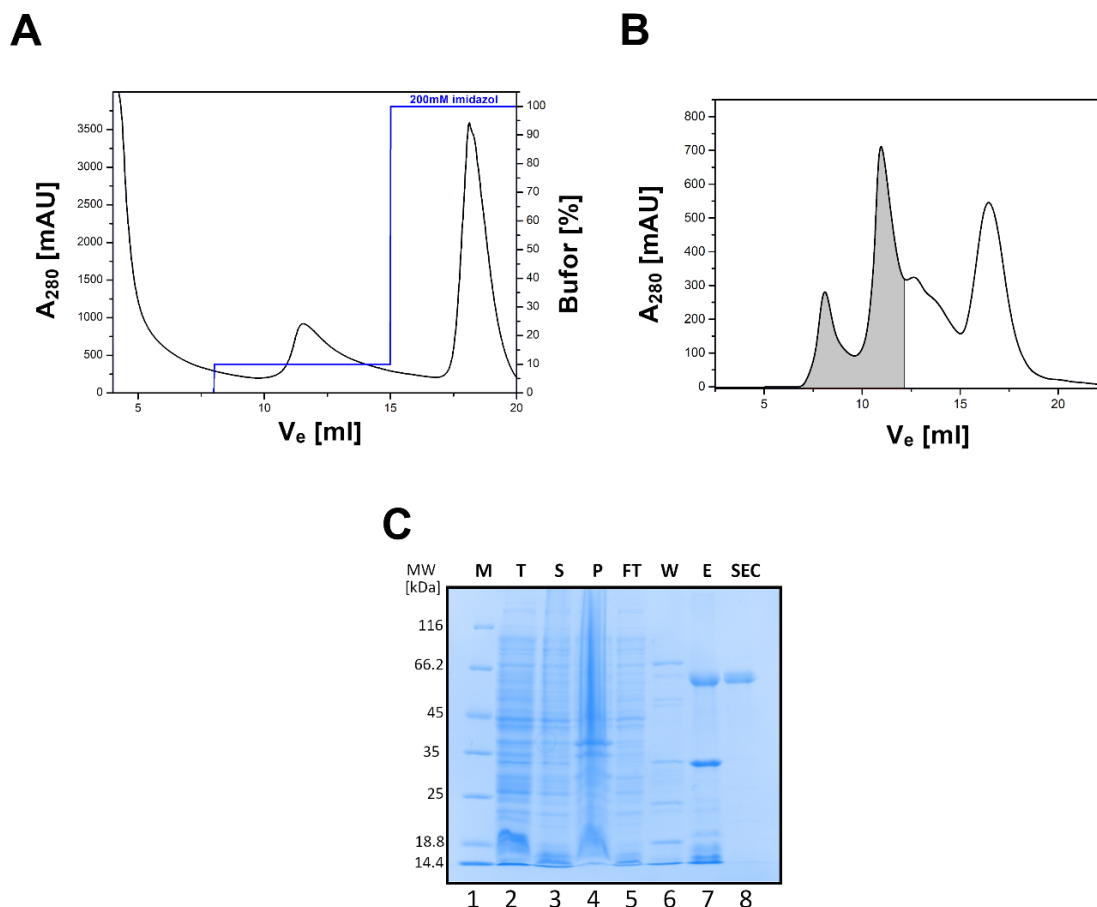


Rysunek 12. Schemat otrzymanych białek rekombinowanych. Liczba 1 oznacza pierwszy aminokwas sekwencji otoliny-1 zdeponowanej w bazie UniProt bez sekwencji sygnałowej. Liczby ujemne odnoszą się do aminokwasów dodanych, pochodzących z wektora ekspresyjnego.

5.2.2. Preparacja dOtol1

Analiza rozpuszczalności dOtol1 nadekspresjonowanej w komórkach ArcticExpress (Rozdział 4.2.1) wykazała, że białko znajduje się zarówno we frakcji białek rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych. Zoptymalizowana procedura nadekspresji białka w 16 °C była wystarczająca, aby oczyszczać je jedynie z frakcji białek rozpuszczalnych. Supernatant powstały po dezintegracji komórek i ich odwirowaniu posłużył bezpośrednio do pierwszego etapu oczyszczania – IMAC (Rozdział 4.2.3.1). Typowy chromatogram IMAC z oczyszczania dOtol1 z 1 litra hodowli bakteryjnej jest przedstawiony na Rysunku 13A. Białka po elucji ze złoża Talon (Rozdział 4.2.3.1) buforem zawierającym 200 mM imidazol były zagęszczane i nastrzykiwane na kolumnę Superdex 200 Increase (Rozdział 4.2.3.2). Profil elucji z kolumny został przedstawiony na Rysunku 13B. Na szaro zaznaczono zakres objętości elucji, w którym znajdowała się dOtol1. Obecność dwóch szczytów sugerowała możliwość występowania białka pod postacią co najmniej dwóch form oligomerycznych. Produkty procesu oczyszczania białka na poszczególnych etapach były monitorowane z użyciem elektroforezy

SDS-PAGE (Rozdział 4.1). Preparat dOtol1 cechował się czystością wynoszącą ponad 95%, szacowaną densytometrycznie z użyciem programu LabImage (BioRad). Wydajność opisanej metody nadekspresji i oczyszczania dOtol1 (Rozdział 4.2) wynosiła około 1 mg oczyszczonego białka z 1 litra hodowli bakteryjnej. Masa cząsteczkowa dOtol1 szacowana na podstawie sekwencji aminokwasowej z użyciem programu ProtParam wynosi 49,702 kDa (Rozdział 4.3) i jest zgodna z masą cząsteczkową oznaczoną przy pomocy spektrometrii mas ESI-QTOF wynoszącą 49,711 kDa (Rozdział 4.4).



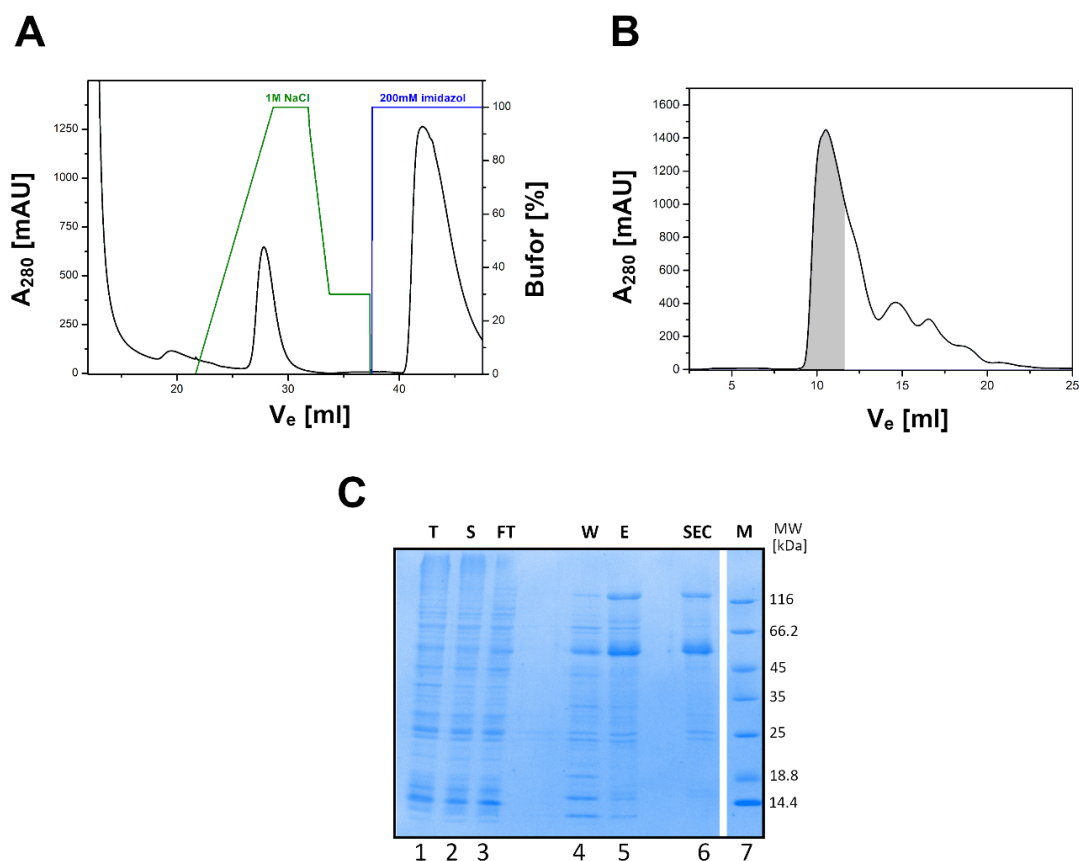
Rysunek 13. Etapy procesu oczyszczania dOtol1. (A) Chromatogram otrzymany po pierwszym etapie oczyszczania IMAC na złożu TALON. (B) Chromatogram filtracji żelowej preparatu po IMAC; na szaro zaznaczono frakcje, w których obecna była dOtol1. (C) wynik analizy SDS-PAGE frakcji po każdym z etapów oczyszczania. M – standard wagowy, T – frakcja wszystkich białek bakteryjnych po indukcji ekspresji, S – frakcja białek rozpuszczalnych po indukcji ekspresji, P – frakcja białek nierozpuszczalnych po indukcji ekspresji, FT – frakcja białek niezwiązanych do złoża TALON, W – frakcja białek wymytych w obecności 20 mM imidazolu, E – białka eluowane z kolumny TALON, SEC – preparat dOtol1 otrzymany w wyniku filtracji żelowej i wymiany buforu.

5.2.3. Preparacja hOtol1

Podobnie jak w przypadku dOtol1 (Rozdział 5.2.2), hOtol1 również była izolowana z frakcji białek rozpuszczalnych. W odróżnieniu do dOtol1, w pierwszym etapie procedury, białko zostało wiązane do złoża NiNTA (Rozdział 4.2.3.1). Rysunek 14A przedstawia typowy chromatogram IMAC dla oczyszczania hOtol1. Podczas filtracji żelowej na kolumnie Superdex200 Increase (Rozdział 4.2.3.2),

szczyt elucji białka przypada na objętość zerową kolumny (Rysunek 14). Szarym kolorem zaznaczone zostały frakcje zawierające preparat hOtol1 o wysokiej czystości. Podczas analizy przebiegu preparacji z użyciem SDS-PAGE zauważono (Rozdział 4.1), że pomimo denaturacji termicznej i redukcji mostków disiarczkowych obserwuje się dwa prążki na elektroforegramie - jeden odpowiadający masie około 50 kDa, a drugi ponad 116 kDa (Rysunek 14C). Ich tożsamość została potwierdzona z użyciem metody Western blot (Rozdział 4.1) z przeciwciałami skierowanymi zarówno do końca-N białka (anty-His) oraz końca-C białka (anty-C1q) (Rozdział 3.1).

Opisana procedura jest powtarzalna, a otrzymany preparat hOtol1 jest czysty w około 95%, co szacowano densytometrycznie (Rozdział 4.1). Z 1 litra hodowli bakteryjnej otrzymywano do 5 mg preparatu. Teoretyczna masa cząsteczkowa hOtol1 wynosi 48,255 kDa (analiza sekwencji w programie ProtParam (Rozdział 4.3) i jest zgodna z masą cząsteczkową otrzymaną w wyniku pomiarów ESI-QTOF 48,253 kDa (Rozdział 4.4).



Rysunek 14. Etapy oczyszczania hOtol1. (A) Chromatogram otrzymany po pierwszym etapie oczyszczania IMAC na złożu NiNTA. (B) Chromatogram filtracji żelowej preparatu po IMAC; na szaro zaznaczono frakcje, w których obecna była hOtol1. (C) Wynik analizy SDS-PAGE frakcji po każdym z etapów oczyszczania. M – standard wagowy, T – frakcja wszystkich białek bakteryjnych po indukcji ekspresji, S – frakcja białek rozpuszczalnych po indukcji ekspresji, FT – frakcja białek niezwiązanych do złoża TALON, W – frakcja białek wymytych w gradiencie NaCl, E – białka eluowane z kolumny NiNTA, SEC – preparat hOtol1 otrzymany w wyniku filtracji żelowej i wymiany buforu.

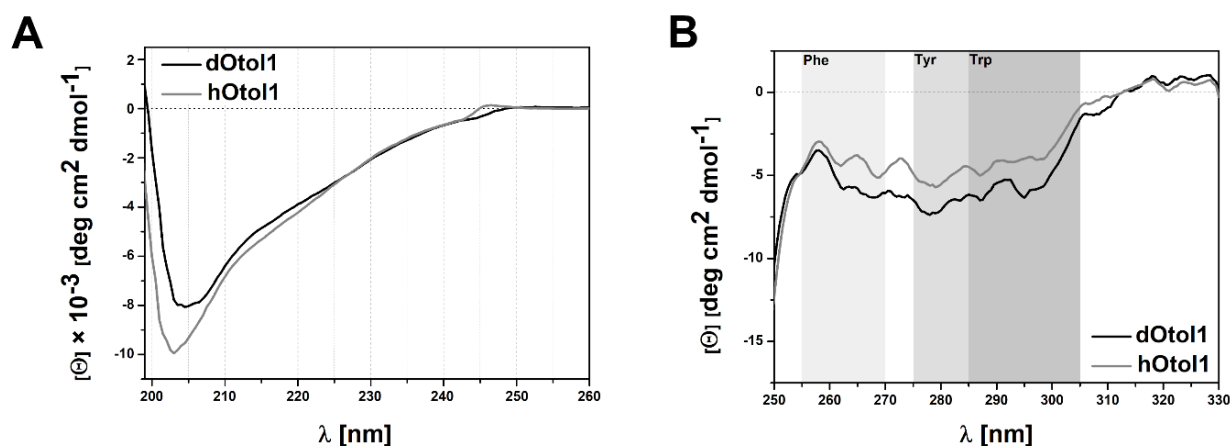
5.3. Badania właściwości molekularnych otoliny-1

Wydajność opracowanych metod nadekspresji i oczyszczania oraz jakość preparatów dOtol1 i hOtol1 były wystarczające do pracy mającej na celu zbadanie relacji struktura-funkcja otoliny-1.

5.3.1. Porównanie struktury drugo- i trzeciorzędowej otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*

Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD, ang. *circular dichroism spectroscopy*) jest jedną z niskorozdzielczych metod badań strukturalnych białek opierającą się na różnicach w absorpcji światła prawo- lub lewoskrętnie spolaryzowanego. Widma CD rejestrowane w dalekim ultrafiolecie odpowiadają na pytania dotyczące zawartości struktur drugorzędowych białka, natomiast widma CD w bliskim ultrafiolecie dostarczają informacji na temat struktury trzeciorzędowej białka w odniesieniu do ułożenia przestrzennego reszt aminokwasów aromatycznych (Kelly et al., 2005).

Widmo CD obu białek (Rysunek 15) jest wypadkową widm charakterystycznych dla białek kolagenowych z ujemnym maksimum ok. 198 nm i dodatnim maksimum ok. 222 nm (Greenfield, 2006) i antyrównoległej struktury β domeny C1q z ujemnym maksimum ok. 218 nm i dodatnim maksimum między 230 nm, a 240 nm (Hołubowicz et al., 2017). Duże podobieństwo zawartości struktur drugorzędowych otolin pokazane na widmach CD w dalekim UV, znajduje również odzwierciedlenie w widmach CD w bliskim ultrafiolecie (Rysunek 15B). Obecność mostków disiarczkowych w białkach wnosi niewielki wkład do widma (Li, 2017). W odróżnieniu od sygnału pochodzącego od reszt aromatycznych, obecność mostków disiarczkowych cechuje się szerokim pasmem pomiędzy 350- 240 nm. Mając to na uwadze, pasmo między ok. 310 a 255 nm w widmie dOtol1 i hOtol1 w bliskim UV najprawdopodobniej jest również wynikiem obecności mostków disiarczkowych w białku.



Rysunek 15. Widma CD dOtol1 i hOtol1. (A) Widma CD dOtol1 i hOtol1 w dalekim ultrafiolecie zarejestrowane dla białek o stężeniu 10 μM w buforze F. (B) Widma CD w bliskim ultrafiolecie zarejestrowane dla dOtol1 i hOtol1 o stężeniu 40 μM w buforze F. Odcieniami szarości zaznaczono rejony widma odpowiadające obecności reszt Phe, Tyr oraz Trp.

Udziały procentowe poszczególnych struktur drugorzędowych zostały zebrane w Tabeli 10. Obydwa białka cechują się ich podobną zawartością. Biorąc pod uwagę bardzo przybliżony charakter analizy, można przypuszczać, że ze względu na podobieństwa chirooptyczne kłębka statystycznego, helisy poliprolilowej II i potrójnej helisy, na wartość "inne" może przypadać częściowo udział wymienionych struktur lub/ oraz nieuporządkowanie (Fasman, 2013).

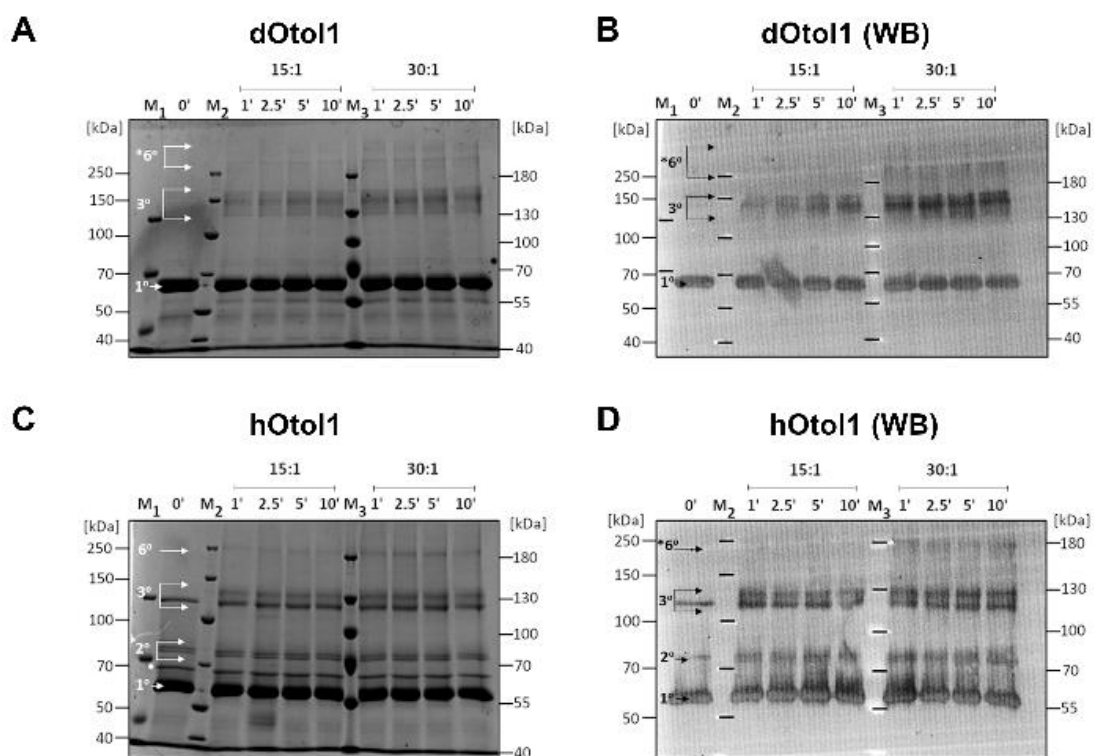
Tabela 10. Wynik dekonwolucji widm CD dOtol1 i hOtol1. Widma CD zostały zarejestrowane w dalekim ultrafiolecie, a analiza wykonana z użyciem programu CDNN.

[%] STRUKTURY				
BIĄŁKO	α -HELISA	β -HARMONIJKA	ZWROT	INNE
dOtol1	17.8 \pm 0.5	25.8 \pm 0.3	18.5 \pm 0.1	37.9 \pm 0.2
hOtol1	15.0 \pm 0.2	27.7 \pm 0.2	18.6 \pm 0.1	38.8 \pm 0.1

5.3.2. Oligomeryzacja otoliny-1

Ze względu na zauważoną już przy etapie oczyszczania (Rozdział 5.2) skłonność dOtol1 i hOtol1 do oligomeryzacji, przeprowadzono badania mające na celu zweryfikowanie tej obserwacji. W pierwszym etapie wykonano eksperyment sieciowania chemicznego (Rozdział 4.8), w którym odczynnik sieciujący BS³ tworzy wiązania amidowe z wolnymi resztami aminowymi na końcu-N oddziałujących ze sobą białek (Mattson et al., 1993). Rysunek 16. przedstawia elektroforegramy dOtol1 i hOtol1 otrzymane przy dwóch nadmiarach molowych BS³ i w różnych odstępach czasowych. Już po minucie trwania reakcji sieciowania można zaobserwować formy oligomeryczne dOtol1 i hOtol1 dla 15-krotnego nadmiaru BS³. W odniesieniu do standardu mas cząsteczkowych można przypuszczać, że obydwie homologii występują pod postacią mono- tri- i heksamerów. Co więcej, hOtol1 również występuje jako dimer (dimer i trimer obecne są przed reakcją sieciowania i nie ulegają denaturacji w warunkach SDS-PAGE). Obecność form oligomerycznych potwierdzono poprzez Western blotting (Rozdział 3.1 i 4.1).

Aby przyjrzeć się dokładniej oligomeryzacji otoliny-1 i jej właściwościom hydrodynamicznym, przeprowadzono eksperymenty ultrawierowania analitycznego (SV-AUC) w warunkach redukujących i nieredukujących (Rozdział 4.6.1). Metoda ta rejestruje sedymentację makrocząstek obecnych w analizowanej próbce pod wpływem działającej na nie siły odśrodkowej. Na podstawie danych z eksperymentu szybkościowego można określić masy cząsteczkowe białek, ich przybliżony kształt oraz współczynniki sedymentacji (Brown i Schuck, 2006).

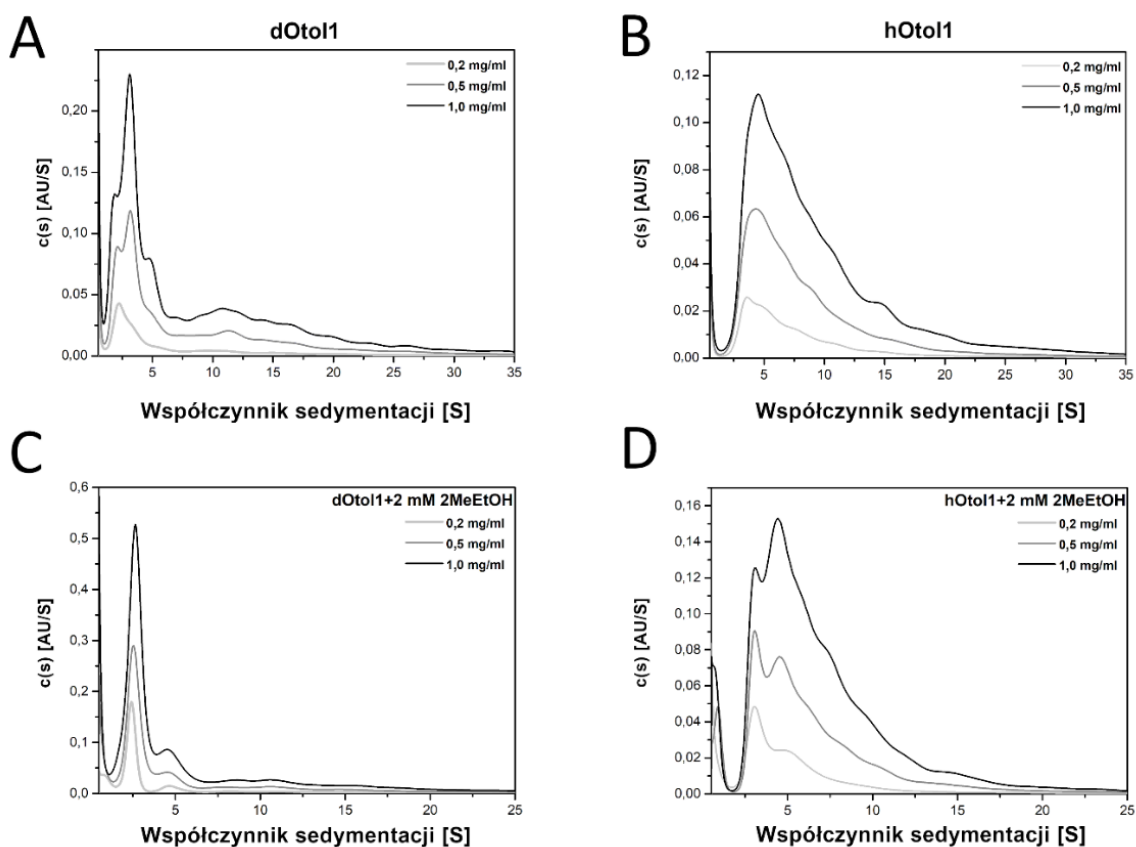


Rysunek 16. Wynik reakcji sieciowania dOtol1 i hOtol1 czynnikiem BS³. Elektroforegramy SDS-PAGE dOtol1 (A) i hOtol1 (C) oraz wyniki Western blottingu uwidocznione z użyciem przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciw znacznikowi 6xHis, odpowiednio (B) oraz (D) dla dOtol1 i hOtol1. Reakcja prowadzona była w odstępach czasowych wynoszących 1, 2,5, 5 oraz 10 min w dwóch nadmiarach molowych BS³ – 15:1 i 30:1.

Profile sedymentacji dOtol1 i hOtol1 zostały przedstawione na Rysunku 17. Obydwa białka występują pod postacią oligomerów oraz w niewielkiej części agregatów. Profile są szerokie dla każdego z badanych stężeń białka. Dopiero po dodaniu czynnika redukującego, 2-merkaptoetanolu, można zauważyć wyraźnie zaznaczone pasma. W warunkach nieredukujących, w przeważającej większości, dOtol1 występuje w postaci dimeru i undekameru dla najniższego badanego stężenia, a dla stężenia 0,5 i 1,0 mg/ml w postaci mono- tri-, hekso-, okta- i oktadekameru w odniesieniu do masy monomeru ustalonej z użyciem ESI-QTOF (Rozdział 4.4 oraz 5.2). Dodatkowo dla każdego z warunków występują agregaty o masie powyżej 1000 kDa. W przypadku dOtol1 w warunkach redukujących, populacja cząsteczek jest zróżnicowana i składają się na nią mono-, tri-, hekso-, nona- heksadekamery i oktadekamery oraz agregaty powyżej 1000 kDa. Co ciekawe, populacja dOtol1 w warunkach redukujących posiada większy odsetek agregatów w odniesieniu do dOtol1 w warunkach nieredukujących.

W przypadku hOtol1 w warunkach nieredukujących, jego główną populację stanowią najprawdopodobniej heksamery (Rozdział 4.4 oraz 5.2). W przypadku warunków redukujących w każdym z przypadków pojawiały się monomery, tetramery i agregaty. Populacja hOtol1 w porównaniu do dOtol1 jest bardziej homogeniczna zarówno w warunkach nieredukujących jak

i redukujących. Obecność czynnika redukującego zmniejsza rzędowość oligomerów dOtol1 i hOtol1. Ta obserwacja jest dodatkowo potwierdzona spadkiem wartości uśrednionego współczynnika sedymentacji $\overline{s_{20w}}$ dla warunków redukujących w odniesieniu do nieredukujących. Dane dotyczące masy molekularnej cząsteczek oraz współczynników sedymentacji zostały zebrane w Tabeli 11. Dokonane szacunki są dość przybliżone ze względu na m.in. kształt dOtol1 i hOtol1 odbiegający od sferycznego, potwierdzony wartością współczynnika tarcia f/f_0 powyżej 1,3. Takie wartości są charakterystyczne dla cząsteczek wydłużonych (Unzai, 2018). Uśrednione współczynniki sedymentacji $\overline{s_{20w}}$ wzrastają wraz ze stężeniem w obrębie badanych warunków (z wyjątkiem dOtol1 w warunkach redukujących, Tabela 11). Profile sedymentacji, dane dotyczące mas cząsteczkowych i $\overline{s_{20w}}$ pokazują dynamicznie zmieniające się kształty oligomerów oraz przesuwanie ich rzędowości w stronę cięższych form.



Rysunek 17 Profile sedymentacji otoliny-1 uzyskane w wyniku eksperymentu SV-AUC. Górny panel odpowiada profilowi sedymentacji dOtol1 (A) oraz hOtol1 (B) w warunkach nieredukujących, w trzech stężeniach białka – 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml oraz 1 mg/ml. Dolny panel odpowiada eksperymentowi przeprowadzonemu w warunkach redukujących z użyciem 2-merkaptoetanolu odpowiednio dla dOtol1 (C) oraz hOtol1 (D) w tych samych stężeniach białka.

Wyniki

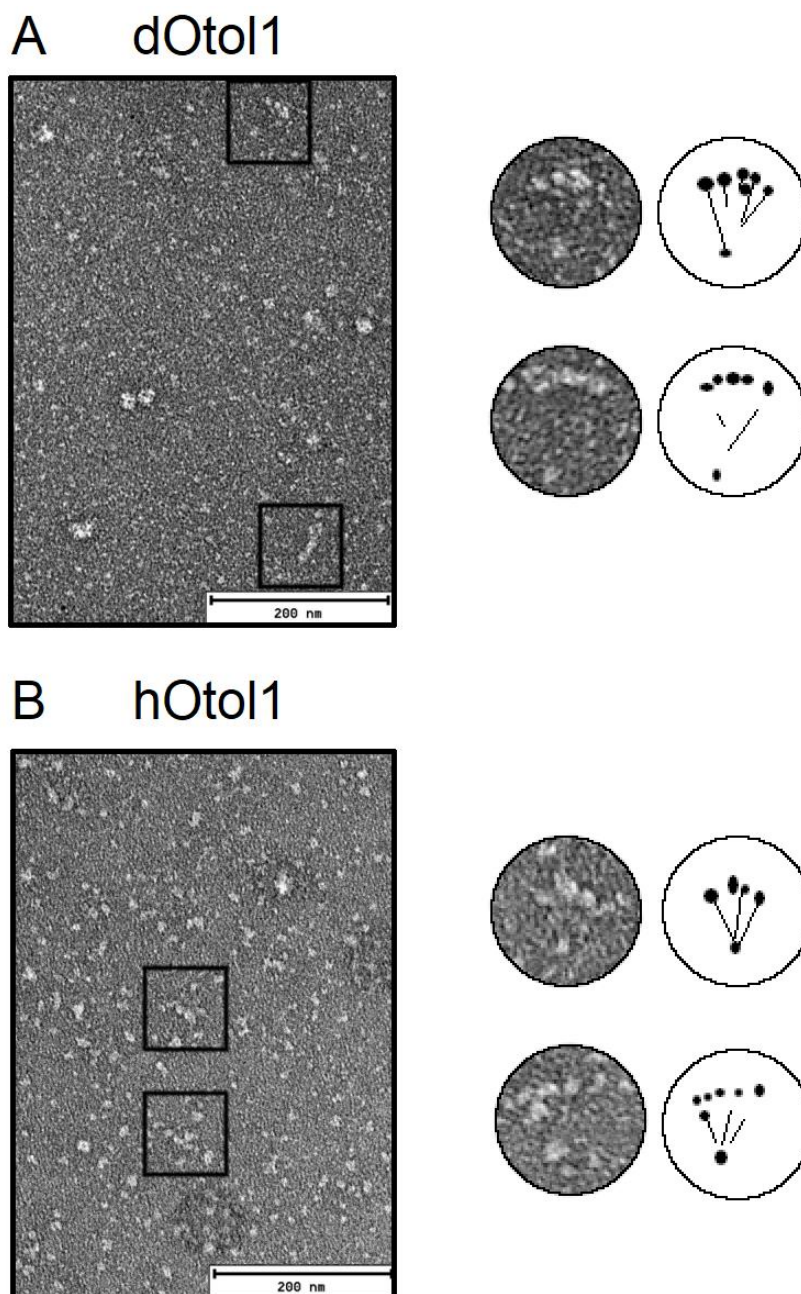
Tabela 11. Podsumowanie parametrów uzyskanych w wyniku eksperymentu SV-AUC. Parametry zostały pogrupowane ze względu na badane białko, jego stężenie oraz obecność czynnika redukującego. MW_{sv} – masa cząsteczkowa oszacowana na podstawie danych eksperymentalnych, Sygnał – procent cząstek w odniesieniu do całości, s – współczynnik sedimentacji, \overline{s}_{20w} - uśredniony współczynnik sedimentacji skorygowany o wodę, f/f_0 – współczynnik tarcia, RMSD – wartość średniej kwadratowej błęd

dOto1												
	-						W obecności 2 mM 2MeEtOH					
C [mg/ml]	MW_{sv} [kDa]	Sygnał [%]	s [S]	\overline{s}_{20w} [S]	f/f_0	RMSD	MW_{sv} [kDa]	Sygnał [%]	s [S]	\overline{s}_{20w} [S]	f/f_0	RMSD
0.2	90	67.1	3.30	10.45	1.74	0.0061	36.91	53.7	2.41	9.72	1.32	0.0066
	511	15.4	10.50				108.87	10.4	4.95			
	1010	8.7	16.54				237.42	4.6	8.33			
	2164	8.1	27.49				537.87	11.4	14.36			
	1546.99	4.6	29.05				2490.22	1.0	39.89			
0.5	41	14.4	1.96	12.36	1.74	0.0065	50.74	50.7	2.62	9.68	1.50	0.0069
	117	42.9	3.94				131.16	12.2	4.93			
	319	3.8	7.68				267.71	5.4	7.93			
	399	4.5	8.90				449.06	8.2	11.19			
	887	29.0	15.17				793.02	6.8	16.35			
	3610	1.6	38.66				1721.94	7.1	27.42			
1.0	34	9.8	1.70	12.84	1.75	0.0073	60.05	50.7	2.63	9.68	1.67	0.0080
	86	32.9	3.19				162.12	14.5	5.10			
	186	10.8	5.32				345.99	5.9	8.46			
	297	4.1	7.26				586.55	9.4	12.02			
	546	18.7	10.90				1204.71	9.0	19.43			
	2264	4.3	28.15				2363.56	3.2	30.44			
	3338	2.6	36.46				3478.10	1.0	39.39			
hOto1												
	-						W obecności 2 mM 2MeEtOH					
C [mg/ml]	MW_{sv} [kDa]	Sygnał [%]	s [S]	\overline{s}_{20w} [S]	f/f_0	RMSD	MW_{sv} [kDa]	Sygnał [%]	s [S]	\overline{s}_{20w} [S]	f/f_0	RMSD
0.2	261	94.6	7.66	11.99	1.50	0.0061	48.10	41.3	3.31	8.62	1.12	0.0067
	2913	2.0	38.22				180.10	45.5	7.99			
0.5	302	96.9	8.46	12.27	1.50	0.0063	51.86	20.7	3.16	9.78	1.24	0.0070
	2943	1.7	38.57				199.98	71.6	7.78			
1.0	341	96.6	9.44	13.64	1.45	0.0069	59.51	13.0	3.03	10.09	1.42	0.0075
	2926	1.7	39.58				237.98	81.0	7.63			
							2187.85	1.1	33.48			

5.3.3. Próba otrzymania modeli struktury otoliny-1 z użyciem mikroskopii krioelektronowej

Dzięki pracom Dubocheta, Franka i Hendersona (Nogales, 2018) i otrzymaniu przez nich Nagrody Nobla w dziedzinie chemii w 2017 roku, badania strukturalne białek z użyciem mikroskopii elektronowej pojedynczej cząsteczki w warunkach kriogenicznych (CryoEM, ang. *cryogenic electron microscopy*) zyskały miano kluczowej metody badań struktury białek i ich kompleksów. Niewielka ilość preparatu oraz obrazowanie białka w relatywnie prostych warunkach (brak potrzeby znakowania izotopowego czy używania cząsteczek kontrastujących) są bezspornymi zaletami CryoEM. Jednym z warunków ograniczających swobodne używanie metody jest masa molekularna cząsteczki – im większa molekula lub kompleks tym większe szanse na uzyskanie lepszych danych i wysokorozdzielczej rekonstrukcji struktury (Renaud et al., 2018). Wyniki badań dotyczących właściwości molekularnych otoliny-1 (Rozdział 5.3) przedstawiły białko jako cząsteczkę tworzącą oligomery wysokiego rzędu, o kształcie odbiegającym od sferycznego (Rozdział 5.3.2) stąd decyzja o podjęciu badań kolejnymi metodami, w tym CryoEM. W wyniku wstępnych obrazowań dOtol1 i hOtol1 z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej NS-TEM (Rozdział 4.7) udało się zaobserwować obiekty o wielkości nadającej się do dalszych analiz (Rysunek 18). Rekonstrukcja struktury czwartorzędowej otoliny-1 była niezwykle interesująca zarówno pod kątem klasycznych badań biochemicznych, jak również badań nad jej aktywnością biomineralizacyjną. Model strukturalny otoliny-1 mógł nieść odpowiedź na pytanie w jaki sposób białko jest przystosowane do pełnienia funkcji rusztowania biominerału.

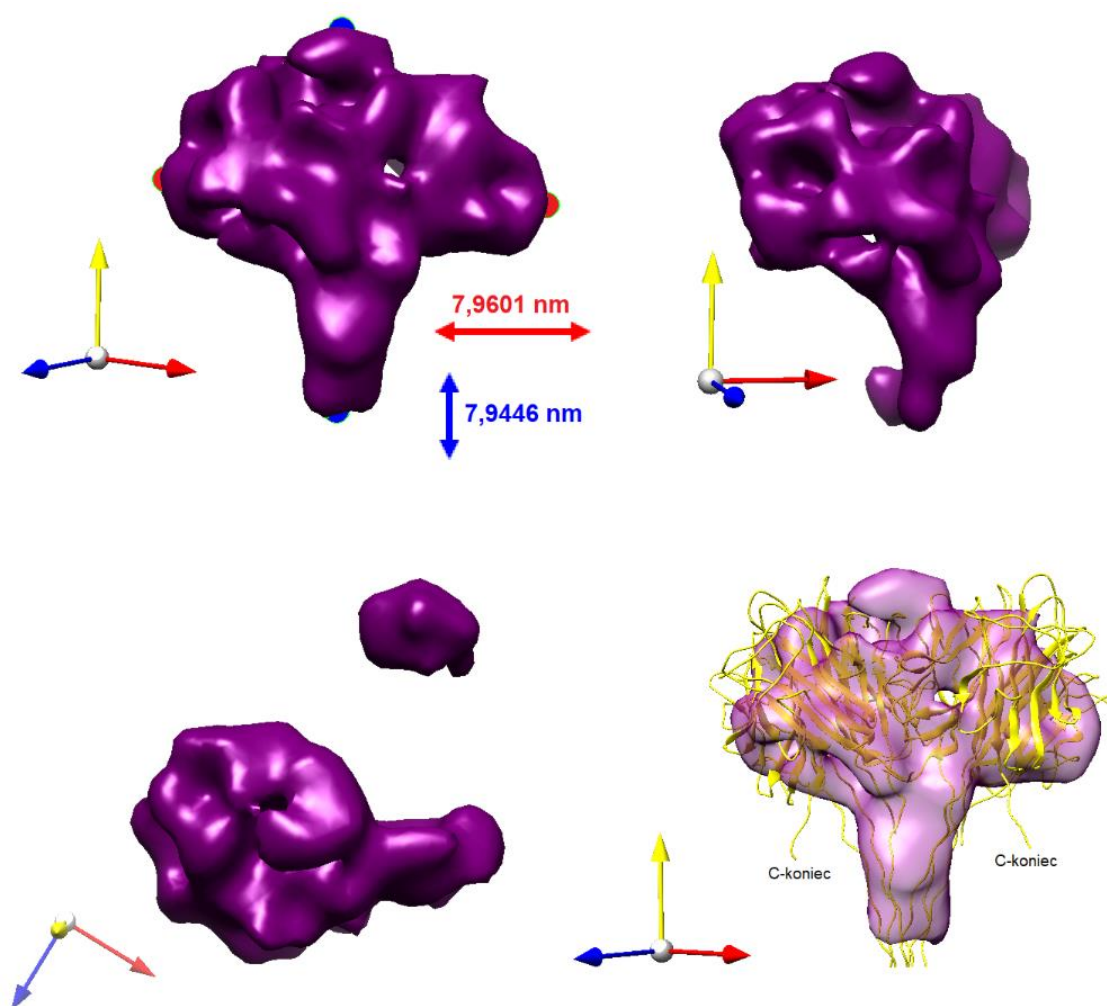
W wyniku eksperymentów NS-TEM otrzymano obrazy dOtol1 oraz hOtol1 sieciowanej BS³. Próbkę w niektórych rozcieńczeniach cechowały się wysoką heterogenicznością i dalej się nimi nie zajmowano. Rysunek 18. przedstawia zdjęcia NS-TEM (Rozdział 4.7.1) dla dOtol1 (A) oraz hOtol1 sieciowanej BS³ (B). Pośród kulistych, silnie wyróżniających się cząsteczek, można zauważyć rozgałęzione struktury. Kwadratami (92 nm x 92 nm) zaznaczono elementy przypominające adiponektynę, białko należące do nadrodziny C1q - przyjmujące konformację wachlarza (*fan-shaped*) (Radjainia et al., 2008). W okręgach zestawiono wybrane fragmenty i zarysowano ich kształty w celu ułatwienia odbioru. Cząsteczki cechują się rozgałęzioną częścią o indywidualnych kulistych kształtach, z których odchodzą słabo widoczne pasma skupiające się we wspólnym punkcie. Średnia długość cząsteczki zmierzona dla 4 wybranych struktur pomiędzy ich najdalszymi punktami wynosi 51,83 +/- 2,36 nm (Rysunek 18).



Rysunek 18. Wynik obrazowania dOtol1 (A) oraz hOtol1 (B) z użyciem NS-TEM. Oligomery białek kontrastowane roztworem octanu uranylu zostały zaobserwowane w konformacji przypominającej wachlarz oraz zaznaczone czarnymi kwadratami o wymiarach 92 x 92 nm. Prócz widocznych oligomerów, zauważalne są również drobne, kuliste cząsteczki prawdopodobnie odpowiadające trimerom domeny C1q otoliny.

W wyniku obrazowania zebrano zestaw danych (1) dla próbki dOtol1 w buforze 10 mM Tris (pH 7,8), 300 mM NaCl, (2) dOtol1 dializowanej do wody oraz (3) hOtol1 sieciowanej BS³ (Rozdział 4.7). Zestaw danych zawierał zdjęcia odpowiednio (1) 1 272 535 cząsteczek, (2) 1 223 014 cząsteczek oraz (3) – 298 516 cząsteczek. Obrazy cząsteczek posłużyły do utworzenia ich klas – pogrupowanych pod kątem ułożenia w płaszczyźnie celem wzmocnienia sygnału w stosunku do tła. W trakcie dwuwymiarowej (2D) klasyfikacji cząsteczek (Rozdział 4.7) odrzucono klasy stanowiące zanieczyszczenia, a pozostawione posłużyły do rekonstrukcji klas trójwymiarowych (3D). Klasy 3D

zostały zebrane i pokazane w Dodatku. W odniesieniu do struktur innych białek z rodziny C1q (Radjainia et al., 2008) wytypowano jedną klasę 3D dla zestawu (2) mogącą reprezentować częściową strukturę heksameru dOtol1 (Rysunek 19). Otrzymana rekonstrukcja odpowiada cząsteczce o wymiarach 7,96 nm x 7,95 nm pomiędzy punktami zaznaczonymi na Rysunku 19 i może reprezentować C-końcową część heksameru dOtol1. W celu zweryfikowania tego przypuszczenia nałożono na rekonstrukcję dwa modele *in silico* odpowiadające trimerowi dOtol1 (Rysunek 8) (Bielak et al., 2022). Centralna część rekonstrukcji danych w 3D odpowiada wielkością dwóm trimerom globularnych głów domeny C1q. Fragmenty domeny kolagenowej odpowiadające segmentowi trzeciemu (Rysunek 8) wypełniają pozostały fragment mapy gęstości elektronowej uzyskanej rekonstrukcji (Rysunek 19).



Rysunek 19. Wybrana klasa 3D fragmentu dOtol1 uzyskana za pomocą obrazowania CryoEM. Klasa 3D gęstości elektronowej została zaprezentowana pod różnymi kątami oraz z nałożonym modelem trimerów dOtol1 (żółty). Na rysunku zostały zaznaczone wymiary mapy w wybranych punktach.

5.3.4. Wpływ jonów wapnia na właściwości molekularne otoliny-1

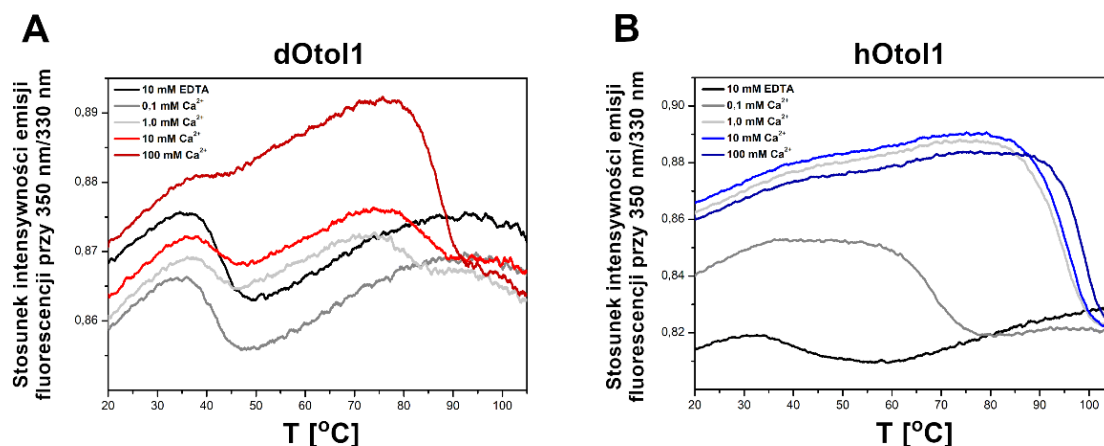
Obecność jonów wapnia w endolimfie ucha wewnętrznego (do stężenia 2 mM u ryb (Payan et al., 1999), od 0,1 do 1 mM u ssaków (Ferrary et al., 1988; Salt et al., 1989)) stanowi

naturalny składnik środowiska otoliny-1. Na podstawie struktury krystalicznej wykazano, że w płaszczyźnie trimeryzacji domeny C1q ludzkiego białka C1q układu dopełniacza obecny jest jon wapnia (Gaboriaud et al., 2003), a potwierdzono w badaniach domeny C1q otoliny-1 *Danio rerio* i człowieka (Hołubowicz et al. 2017). W związku z powyższym wydaje się, że jony wapnia mogą posiadać znaczący wpływ na właściwości molekularne otoliny-1. Aby zbadać tą hipotezę skupiono się na wpływie jonów wapnia na stabilność białka, jego strukturę drugorzędową, zmiany w strukturze trzeciorzędowej oraz wpływ na oligomeryzację białka.

5.3.4.1. Stabilność termiczna otoliny-1 w obecności jonów wapnia

Jedną z metod określania stabilności termicznej białek w obecności różnych czynników, takich jak pH, ligandy czy partnerzy białkowi, jest skaningowa fluorymetria różnicowa (DSF, ang. *differential scanning fluorimetry*) (Huynh, 2015). W przebiegu eksperymentu (Rozdział 4.5.5), zmiana stabilności białka w procesie jego rozfałdowywania monitorowana była jako stosunek intensywności emitowanej wewnętrznej fluorescencji rejestrowanej przy 350 nm do jej wartości przy 330 nm w zależności od temperatury. Temperatura przejścia określana jest w oparciu o punkt przegięcia krzywej denaturacji. Krzywe denaturacji dla dOtol1 i hOtol1 w obecności jonów wapnia oraz EDTA, stanowiącego kontrolę, zostały przedstawione na Rysunku 20, a temperatury przejścia zestawione w Tabeli 12.

Zarówno dOtol1, jak i hOtol1 są silnie stabilizowane przez obecność jonów wapnia, jednak dOtol1 wymaga wyższego stężenia jonów wapnia, aby osiągnąć wyższą temperaturę przejścia (Rysunek 20A). Zarówno w obecności 10 mM EDTA, jak i 0,1 mM stężenia jonów wapnia, temperatura przejścia dOtol1 jest równa ok. 43 °C. W obecności 1,0 mM Ca^{2+} można rozróżnić dwa przejścia o $T_m = 42,8$ °C oraz 86,7 °C. Dla stężenia powyżej 1,0 mM jonów wapnia dalej obecne są dwa przejścia, a wyznaczone dla nich temperatury są zbliżone (Tabela 12). W przypadku hOtol1, obecność jonów wapnia posiada znaczący wpływ na stabilność białka (Rysunek 20B). W warunkach kontrolnych, temperatura przejścia hOtol1 wynosi 41,2 °C. Już po dodaniu 0,1 mM jonów wapnia pojawia się drugie przejście o temperaturze 68,1 °C. Dla wyższych stężeń, temperatura przejścia dla hOtol1 przewyższa 90 °C (Tabela 12). Obecność dwóch temperatur przejścia dla homogenicznego preparatu białka może być przejawem indywidualnej utraty struktury domen białka lub denaturacji białka posiadającego strukturę czwartorzędową (Huynh, 2015).



Rysunek 20. Krzywe denaturacji termicznej otoliny-1. Krzywe dla (A) dOtol1 oraz (B) hOtol1 zarejestrowane zostały dla roztworów o 4 μM stężeniu badanych białek i 10 mM stężeniu EDTA lub w czterech stężeniach CaCl_2 . Denaturacja obserwowana była jako stosunek zmiany wartości intensywności emisji fluorescencji przy 350 nm do 330 nm.

Tabela 12. Wartości temperatury przejścia wyznaczone na podstawie krzywych denaturacji dOtol1 oraz hOtol1. Wartości zostały wyznaczone w oparciu o pierwszą pochodną otrzymanych krzywych.

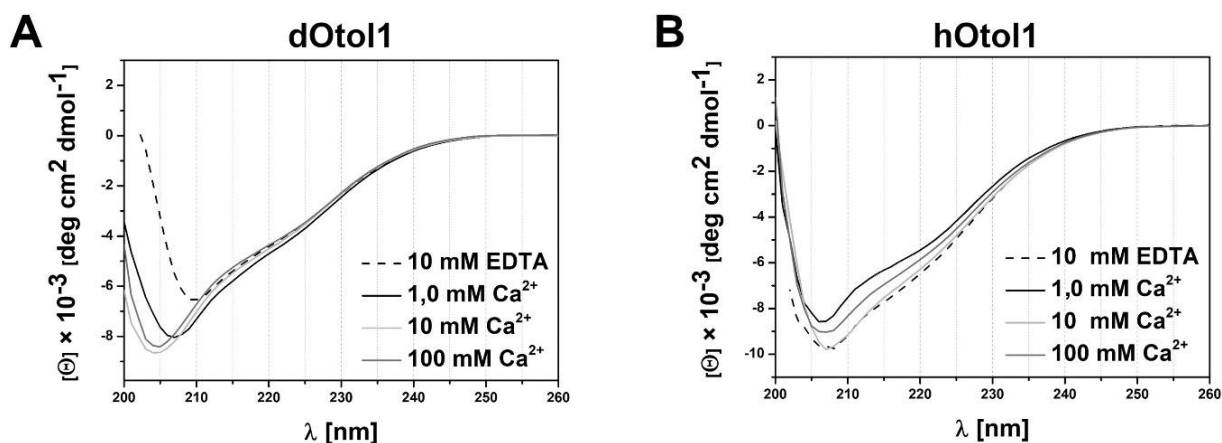
BIAŁKO	WARUNEK	1. TEMPERATURA PRZEJŚCIA [°C]	2. TEMPERATURA PRZEJŚCIA [°C]
dOtol1	10 mM EDTA	43	-
	0,1 mM Ca^{2+}	41,7	-
	1 mM Ca^{2+}	42,8	86,7
	10 mM Ca^{2+}	43,1	85
	100 mM Ca^{2+}	41,8	86,9
hOtol1	10 mM EDTA	41,2	-
	0,1 mM Ca^{2+}	43,1	68,1
	1 mM Ca^{2+}	-	94,6
	10 mM Ca^{2+}	-	95,6
	100 mM Ca^{2+}	-	98,6

5.3.4.2. Wpływ jonów wapnia na strukturę drugo- i trzeciorzędową otoliny-1

Jony wapnia wywierają silnie stabilizujący wpływ na dOtol1 i hOtol1 (Rozdział 5.3.4.1). Naturalnie w takim przypadku nasuwa się pytanie *jakie zmiany strukturalne towarzyszą takiemu efektowi?* Aby zbadać wpływ jonów wapnia na strukturę drugo- i trzeciorzędową dOtol1 i hOtol1, przeprowadzono eksperymenty z użyciem CD w dalekim UV (Rozdział 4.5.1), pomiary emisji wewnętrznej fluorescencji (Rozdział 4.5.2) oraz uzupełniające badanie zmian konformacji białka z użyciem fluorescencyjnej sondy domen hydrofobowych białek - ANS (Rozdział 4.5.3).

Przestawione na Rysunku 21. widma CD dOtol1 i hOtol1 zostały zarejestrowane w buforze uzupełnionym EDTA (warunki kontrolne) oraz wzrastających stężeniach jonów wapnia (1,0 mM, 10 mM i 100 mM). W obecności EDTA (Rysunek 21A), widmo dOtol1 charakteryzuje się minimum

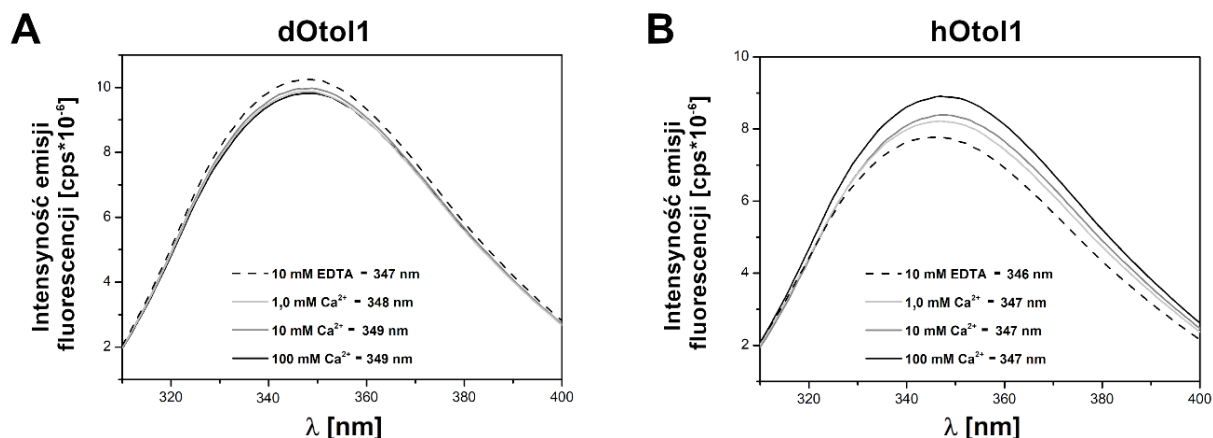
ok. 210 nm, natomiast w obecności jonów wapnia wraz ze wzrostem ich stężenia minimum widma przesuwa się w stronę fali o długości ok. 205 nm, jak w przypadku widm rejestrowanych w buforze bez jonów wapnia (Rozdział 5.3.1). Wyeliminowanie jonów wapnia z buforu dla dOtol1 posiada niewątpliwie, chociaż trudny do oszacowania, wpływ na strukturę drugorzędową białka. W przypadku hOtol1 (Rysunek 21B) widmo CD wraz ze wzrastającym stężeniem jonów wapnia nie zmienia znacząco swego kształtu. Niewielkiej zmianie ulega jedynie wartość molarnej eliptyczności resztkowej.



Rysunek 21 . Wpływ jonów Ca^{2+} na otolinę-1 – widma CD. Widma (A) dOtol1 i (B) hOtol1 zarejestrowane zostały dla roztworów białka o stężeniu $10 \mu\text{M}$ i w obecności 10 mM EDTA lub 3 stężeniach jonów wapnia: 1 mM, 10 mM oraz 100 mM.

W kolejnym kroku badań zarejestrowano widma emisji reszt tryptofanowych dOtol1 i hOtol1 w obecności jonów wapnia lub buforze z dodatkiem EDTA (Rozdział 4.5.2). Zmiany emisji reszt tryptofanowych są podatne na zmiany polarności ich mikrootoczenia. Ekspozycja reszt tryptofanowych do rozpuszczalnika skutkuje przesunięciem maksimum emisji do dłuższych długości fali w okolicie 350 nm (Ladokhin, 2000).

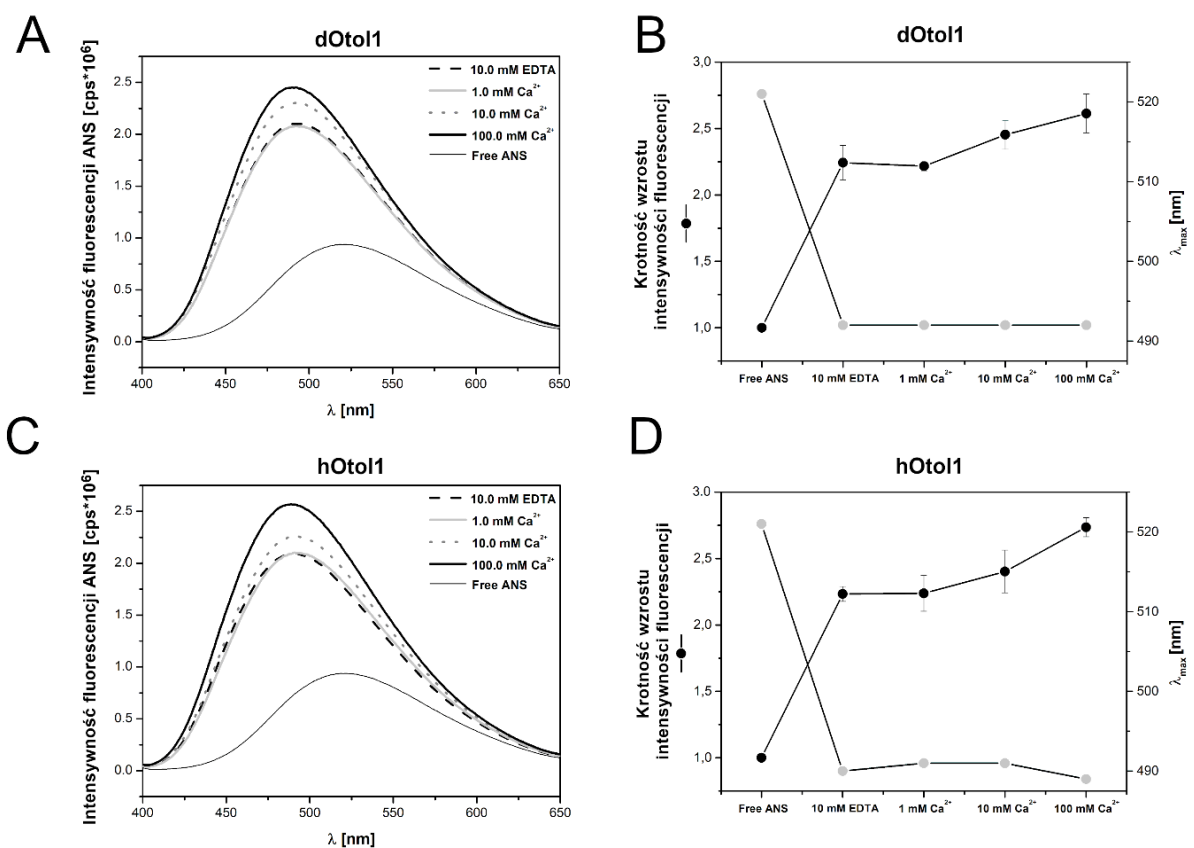
Przedstawione na Rysunku 22. widma pokazują, że reszty Trp w obu białkach są eksponowane (Vivian Callis, 2001). W przypadku dOtol1, wpływ jonów wapnia na zmiany intensywności czy maksimum emisji jest znikomy i wynosi 2 nm pomiędzy warunkami granicznymi. W przypadku hOtol1 można zaobserwować niewielki wzrost intensywności fluorescencji wraz ze wzrostem stężenia jonów wapnia.



Rysunek 22. Widma emisji fluorescencji wewnętrznej otoliny-1. Widma (A) dOtol1 oraz (B) hOtol1 zostały zarejestrowane dla białek o stężeniu 2 μM w obecności EDTA lub jonów wapnia. Fluorescencja została wzbudzona falą o długości 295 nm. Przy każdym z warunków podano maksimum emisji.

Ze względu na brak znaczących zmian w widmach fluorescencji dOtol1 i hOtol1 (Rysunek 22) wykonano badanie uzupełniające z wykorzystaniem kwasu 8-anilinonaftaleno-1-sulfonowego (ANS) (Rozdział 4.5.3). ANS jest sondą fluorescencyjną, która podczas wiązania do fragmentów hydrofobowych białek wykazuje przesunięcie maksimum emisji fluorescencji w stronę krótszych fal z jednoczesnym zwiększeniem intensywności fluorescencji. Dzięki temu ANS jest swoistym indykátorem zmian konformacyjnych białek (Matulis et al., 1999).

Rysunek 23. przedstawia widma emisji samego ANS oraz po związaniu z dOtol1 (A) lub hOtol1 (B) w obecności EDTA oraz wobec wzrastającego stężenia jonów wapnia. Analiza zmian położenia maksimum oraz intensywności emisji została przedstawiona odpowiednio na panelu B i D (Rysunek 23). W porównaniu do widma zarejestrowanego dla wolnej sondy, intensywność fluorescencji dla obydwu białek wzrosła około 2,25-krotnie dla próby z EDTA i utrzymała się na podobnym poziomie dla najniższego stężenia jonów wapnia równego 1.0 mM. Nastąpiło również przesunięcie maksimum emisji fluorescencji z 521 nm do 492 i 489 nm odpowiednio dla dOtol1 i hOtol1. Dla stężenia jonów wapnia równego 10mM i 100 mM nastąpił stopniowy wzrost intensywności fluorescencji. W obecności 100 mM Ca^{2+} odpowiednio 2,6 i 2,7-krotny dla dOtol1 i hOtol1 w stosunku do intensywności wolnej sondy ANS. Ze względu na zmiany w widmach ANS związanego z dOtol1 lub hOtol1, można wnioskować, że obecność jonów wapnia indukuje niewielkie zmiany konformacyjne obu białek.



Rysunek 23. Widma emisji fluorescencji ANS w obecności otoliny-1. Widma ANS w obecności 2 μM (A) dOtol1 i (C) hOtol1 zostały zarejestrowane po wzbudzeniu falą o długości fali 351 nm. dOtol1 i hOtol1 były inkubowane w obecności EDTA lub szeregu stężeń jonów wapnia. Zmiany intensywności fluorescencji ANS oraz przesunięcia maksimum emisji zostały zaprezentowane na wykresach B i D odpowiednio dla dOtol1 i hOtol1.

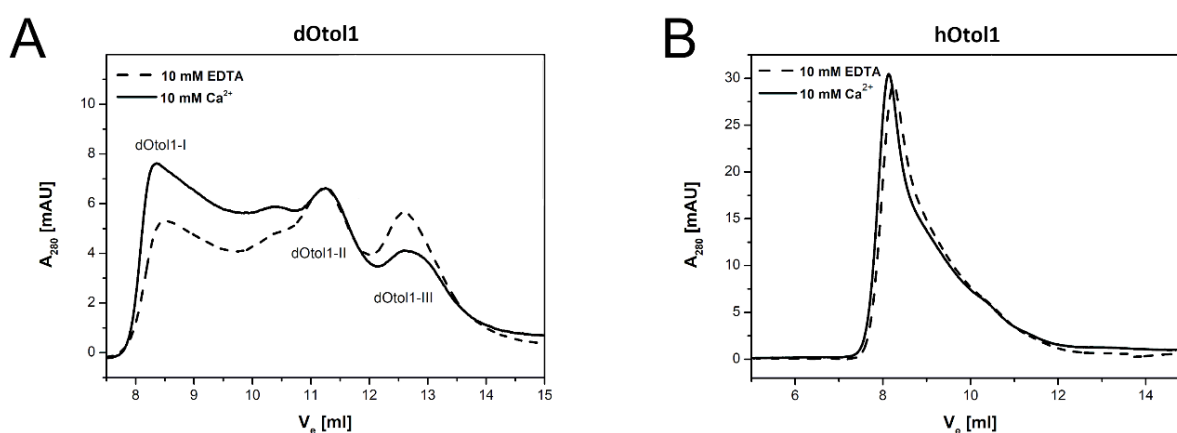
5.3.4.3. Wpływ jonów wapnia na oligomeryzację otoliny-1

Badania nad wpływem jonów wapnia na strukturę drugo- i trzeciorzędową otoliny-1 wykazały nieznaczne zmiany konformacyjne zachodzące w białku. Mając na uwadze występowanie otoliny-1 pod postacią oligomerów, wykonano szereg analiz skupionych na wpływie jonów wapnia na tworzone struktury czwartorzędowe. W tym celu przeprowadzono wstępne badanie z użyciem metody analitycznego sączenia molekularnego (Rozdział 4.6.3), a następnie eksperymenty ultrawiwowania (Rozdział 4.6.1), dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. *dynamic light scatterig*) (Rozdział 4.6.2) oraz pomiary anizotropii fluorescencji dOtol1 i hOtol1 znakowanych fluorescencyjnie (Rozdział 4.5.4).

Analityczne sączenie molekularne (Rozdział 4.6.3) jest prostą metodą używaną do wstępnego oszacowania właściwości hydrodynamicznych białka. Porównując profile elucji białka w różnych warunkach można zaobserwować różnice w objętościach elucji odpowiadające m.in. zmianom promienia Stokesa białek, tworzonym oligomerom i ich masom cząsteczkowym (Ó'Fágáin et al., 2011). Dla białek globularnych szacunki dotyczące parametrów hydrodynamicznych oparte o profile elucji białek standardowych dobrze odzwierciedlają stan rzeczywisty.

Dla białek odbiegających swoim kształtem od globularnego (jak dOtol1 i hOtol1 – Rozdział 5.3.2) raczej nie ma zasadności szacowania promieni hydrodynamicznych i masy cząsteczkowej (Erickson, 2009).

Profile elucji dOtol1 i hOtol1 w obecności jonów wapnia i EDTA zostały przedstawione na Rysunku 24. Każda z próbek nastrzyknięta na kolumnę Superdex200 Increase zawierała białko o tym samym stężeniu i objętości. Profil elucji dOtol1 charakteryzuje się trzema wyraźnymi szczytami (Rysunek 24A), odpowiadającymi oligomerom o różnej masie cząsteczkowej. W przeciwieństwie do wyniku eksperymentu dla dOtol1, obydwie próbki hOtol1 charakteryzują się jedną wartością V_e (Rysunek 24B). Zmiany absorbancji poszczególnych szczytów w profilu elucji dOtol1 mogą świadczyć o różnym wpływie jonów Ca^{2+} na oba białka. Efekt ten nie jest zauważalny w przypadku hOtol1.



Rysunek 24. Profile elucji otoliny-1 z kolumny Superdex200 Increase. dOtol1 (A) oraz hOtol1 (B) zostały nastrzyknięte na kolumnę w stężeniu 0,5 mg/ml i objętości 50 μl w obecności 10 mM stężenia jonów wapnia lub 10 mM stężenia EDTA.

Niezwykle interesujące, chociaż wstępne wyniki dotyczące wpływu jonów wapnia na zachowanie dOtol1 i hOtol1 w odniesieniu do struktury czwartorzędowej wykazały, że oligomeryzacja dOtol1 jest znacznie bardziej uzależniona od obecności jonów Ca^{2+} , niż w przypadku hOtol1. Ze względu małą precyzję metody sączenia analitycznego, do pogłębionej analizy wpływu jonów wapnia na oligomeryzację otoliny-1 wykorzystano porównanie uśrednionych współczynników sedymentacji $\overline{s_{20w}}$ uzyskanych w przebiegu eksperymentu SV-AUC.

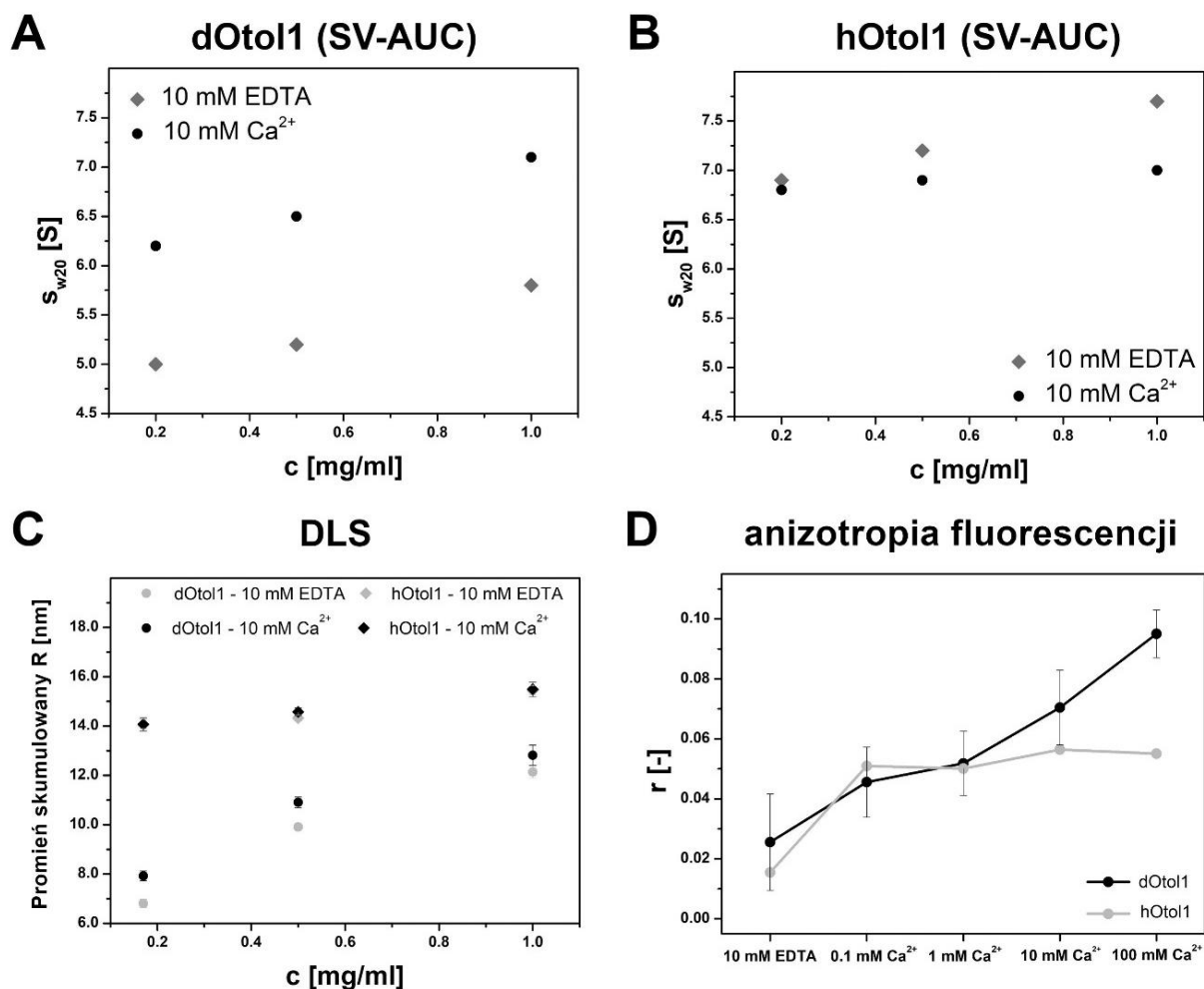
Rysunek 25. przedstawia wykres zależności $\overline{s_{20w}}$ od stężenia białek w rozróżnieniu na warunki prowadzonego eksperymentu (bufor z dodatkiem 10 mM EDTA lub 10 mM Ca^{2+}). $\overline{s_{20w}}$ jest wyznacznikiem ogólnej tendencji badanej makrocząsteczki do zmiany właściwości hydrodynamicznych, na skutek zmiany kształtu lub masy. W porównaniu do wcześniej uzyskanych wyników SV-AUC (Rozdział 5.3.2) w próbkach badanych w obecności EDTA i jonów wapnia nie zarejestrowano agregatów, dlatego też otrzymane wartości $\overline{s_{20w}}$ są mniejsze. Szczegółowe dane

otrzymane w wyniku eksperymentu zestawiono w Dodatku w Tabeli 16, a przykład wykresu pierwotnego na Rysunku 37 (Dodatek).

W przypadku dOto1 (Rysunek 25A) $\overline{s_{20w}}$ wzrasta wraz ze wzrostem stężenia białka. Zależność ta jest zgodna ze wcześniej zaobserwowaną (Rozdział 5.3.2). W obecności EDTA, $\overline{s_{20w}}$ dla każdego stężenia białka jest jednak niższy niż dla ich stężenia w obecności jonów wapnia o wartość bezwzględną równą 1,21, 1,23 i 1,35 odpowiadającą stężeniu białka 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml i 1 mg/ml. W przypadku hOto1 (Rysunek 25B) wzrost $\overline{s_{20w}}$ jest również uzależniony od wzrastającego stężenia białka, jednak wyższe wartości $\overline{s_{20w}}$ uzyskane zostały dla prób w obecności EDTA. Bezwzględna różnica w $\overline{s_{20w}}$ dla prób w obecności EDTA i jonów wapnia wynosiła 0,12, 0,8 i 0,7 odpowiednio dla białek o stężeniu 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml i 1 mg/ml. Różnice te są mniejsze niż w przypadku dOto1. Warto odnotowania jest zachowanie hOto1 w obecności jonów wapnia - wartości $\overline{s_{20w}}$ dla 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml i 1 mg/ml białek są podobne i wynoszą odpowiednio 6,77, 6,92 i 7,08.

Co więcej, otrzymane w wyniku analizy współczynniki tarcia f/f_0 (Tabela 16, Dodatek) dla dOto1 w obecności EDTA są większe od wcześniej otrzymanych (Rozdział 5.3.2), jednak w obecności jonów wapnia maleją wraz ze wzrostem stężenia białka. Natomiast współczynniki f/f_0 dla hOto1 w przypadku obecności EDTA są porównywalne do otrzymanych w poprzednim badaniu (Rozdział 5.3.2), a w obecności jonów wapnia są stałe dla każdego z badanych stężeń hOto1.

Zmiany $\overline{s_{20w}}$ oraz f/f_0 w przypadku dOto1 świadczą o powstawaniu cząsteczek o większej masie i bardziej zwartej strukturze w obecności jonów wapnia. W przypadku hOto1, wartości $\overline{s_{20w}}$ i f/f_0 w obecności jonów wapnia świadczą o ich stabilizacji wobec względnie zbliżonych wartości w odniesieniu do wzrastającego stężenia białka. Natomiast hOto1 w nieobecności jonów wapnia wraz ze wzrostem stężenia białka tworzy cząsteczki o podobnym kształcie i wzrastającym współczynniku sedymentacji. Ze względu na niejednoznaczność wyników eksperyment SV-AUC został dodatkowo uzupełniony o dwa kolejne.



Rysunek 25. Zestawienie wyników pomiarów parametrów hydrodynamicznych otoliny-1. $\overline{s_{20w}}$ dla dOtol1 (A) oraz hOtol1 (B) dla trzech stężeń białek: 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml oraz 1,0 mg/ml w obecności 10 mM EDTA lub 10 mM CaCl₂. Panel C zestawia wyniki DLS dla dOtol1 i hOtol1 o stężeniu 0,17 mg/ml, 0,5 mg/ml oraz 1,0 mg/ml w obecności 10 mM EDTA i 10 mM CaCl₂. Panel D przedstawia wartości anizotropii fluorescencji uzyskane dla 2 μM roztworów dOtol1 i hOtol1 znakowanych fluorescencyjnym znacznikiem ATTO-488. Wartości anizotropii zostały zarejestrowane dla roztworów białek wobec 10 mM EDTA, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM oraz 100 mM CaCl₂.

Aby otrzymać dodatkowe dane dotyczące zmian struktury czwartorzędowej otoliny-1 pod wpływem jonów wapnia, przeprowadzono badanie z użyciem techniki DLS, która wykorzystuje rozpraszanie światła przez makromolekuły w roztworze. W trakcie eksperymentu monitoruje się ruch badanych molekuł, w rezultacie czego otrzymywane są współczynniki dyfuzji przy założeniu kulistego kształtu cząsteczki. Współczynniki te służą do obliczenia promieni hydrodynamicznych cząsteczek w danej populacji lub uśrednionych (skumulowanych) promieni wszystkich cząsteczek (Stetefeld et al., 2016).

Zestawienie zależności skumulowanego promienia hydrodynamicznego (R) od stężenia białka dla obydwu białek (0,17 mg/ml, 0,5 mg/ml oraz 1,0 mg/ml) w obecności 10 mM EDTA lub 10 mM jonów wapnia (Rozdział 4.6.2) zostało pokazane na Rysunku 25C. Wraz ze wzrostem stężenia dOtol1 zwiększa się R zarówno w obecności EDTA jak i jonów wapnia, jednak w obecności jonów wapnia

wartości R są większe o 1,1 nm dla stężenia 0,17 mg/ml, 1,0 nm dla 0,5 mg/ml i 0,7 nm dla 1 mg/ml w porównaniu do wartości R w obecności EDTA. W przypadku hOtol1 (Rysunek 25C), różnice te są stosunkowo niewielkie (0,01 nm dla 0,17 mg/ml, 0,25 nm dla 0,5 mg/ml i 0,05 nm dla 1,0 mg/ml) i równe lub mniejsze od rzędu wielkości odchylenia pomiędzy powtórzeniami pomiarów.

Ostatnią z serii analiz były pomiary anizotropii fluorescencji (r) znakowanej ATTO-488 dOtol1 lub hOtol1 w obecności EDTA lub wzrastającego stężenia jonów wapnia (Rozdział 4.5.4). Zmiany wartości r odpowiadają zmianom swobody rotacyjnej chromoforu w roztworze (Gijsbers et al., 2016). Zmiany r w roztworach o stałej lepkości i temperaturze związane są najczęściej ze zmianą wielkości badanych cząsteczek - im większe cząsteczki tym większa wartość anizotropii fluorescencji.

Rysunek 25D. przedstawia wynik pomiarów r dla dOtol1 i hOtol1. Początkowo, zarówno dla dOtol1, jak i hOtol1, wartość r w obecności EDTA jest niska w porównaniu do próbek mierzonych w obecności jonów wapnia. Wartość r w obecności 0,1 mM Ca^{2+} rośnie o ok. 0,05 w stosunku do próbki bez jonów (10 mM EDTA), natomiast wobec 100 mM Ca^{2+} r rośnie o ok. 0,07. W przypadku próbki hOtol1 początkowy wzrost r pomiędzy próbą z EDTA, a 0,1 mM Ca^{2+} wynosił 0,036. Wzrost stężenia jonów wapnia w próbce nie zmienia znacząco r , jak w przypadku dOtol1. Różnica pomiędzy r zmierzonym w obecności 0,1 mM Ca^{2+} , a 100 mM Ca^{2+} jest równa jedynie 0,004 i jest w granicach odchylenia standardowego.

Opisane wyniki SV-AUC, DLS i anizotropii fluorescencji wskazują, że szczególnie dOtol1 zmienia właściwości hydrodynamiczne wraz ze wzrostem stężenia jonów wapnia. Właściwości te, jak uśredniony współczynnik sedymentacji $\overline{s_{20w}}$, współczynnik tarcia f/f_0 , skumulowany promień hydrodynamiczny R oraz anizotropia fluorescencji r , wskazują, że dOtol1 oligomeryzuje wraz ze wzrostem stężenia jonów wapnia. Właściwości hOtol1 w niewielkim stopniu zależą od stężenia jonów wapnia, jednak w ich nieobecności wydaje się mniej stabilna, a ewentualnie powstające oligomery są stabilizowane przez nawet niewielkie stężenia Ca^{2+} .

5.4. Badania aktywności biomineralizacyjnej otoliny-1

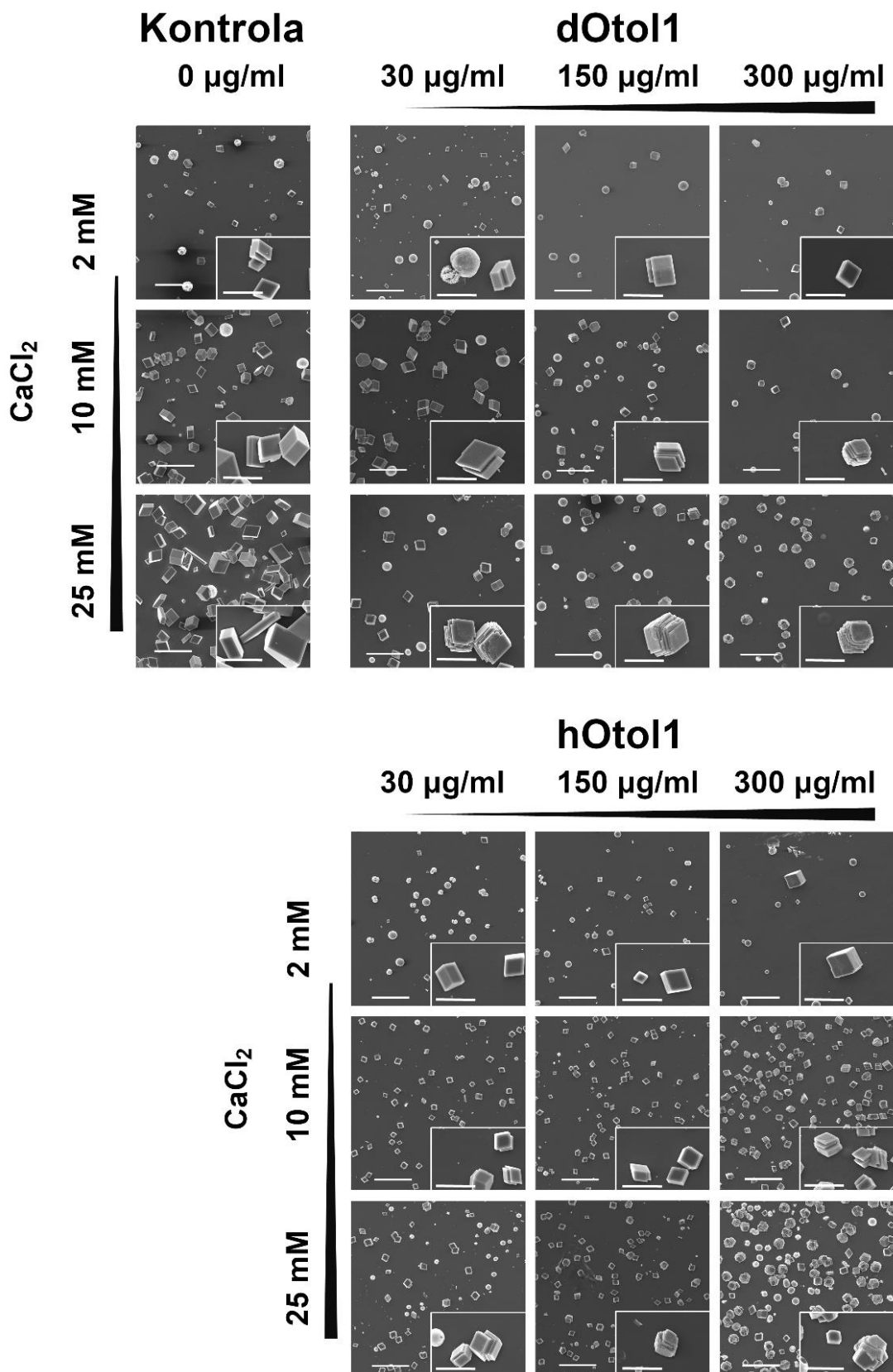
Jednym z głównych celów pracy było poznanie wpływu otoliny-1 na mineralizację węgla wapnia. Do tej pory dwie prace dotyczące wpływu białek macierzy otolitycznej na powstawanie węgla wapnia *in-vitro* skupiły się na roli otoliny-1 w procesie biomineralizacji (Moreland et al., 2014; Tohse et al., 2009). Pomimo ich dużego wkładu w tematykę, nie odpowiedziały na dwa kluczowe pytania: *Jaka jest rola otoliny-1; czy jest ona nukleatorem, czy inhibitorem wzrostu węgla wapnia; gdzie jest zlokalizowana w minerale?* Aby odpowiedzieć na te pytania, scharakteryzowano kryształy węgla wapnia otrzymane metodą powolnej dyfuzji (Rozdział 4.9).

5.4.1. Wpływ otoliny-1 na morfologię i wzrost kryształów

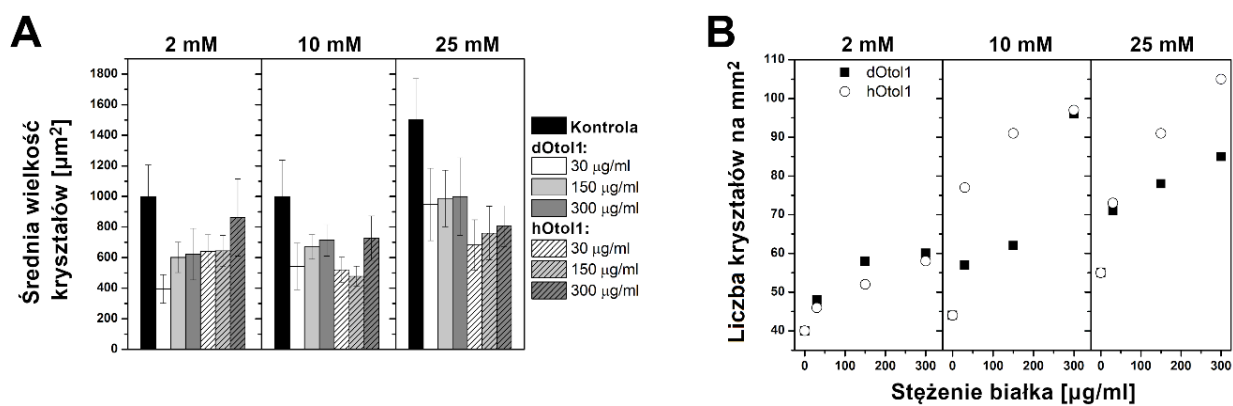
Badania *in vitro* procesu biomineralizacji często wykonywane są z użyciem metody powolnej dyfuzji (Boskey, 2004). Dzięki zastosowaniu tej metody bioinspirowanej mineralizacji *in vitro*, kryształy wzrastają wolniej ze względu na ograniczenia w tempie rozkładu wodorowęglanu amonu. W następstwie rozkładu powstający ditlenek węgla dyfunduje w postaci jonów węglanowych do roztworu mineralizacyjnego. Zastosowanie opisanej metodologii pozwala na ograniczenie swobodnego i gwałtownego kontaktu przeciwjonów, co jest zasadnicze w badaniu aktywności białka w procesie biomineralizacji.

Na Rysunku 26 przedstawione zostały zdjęcia SEM kryształów węglanu wapnia otrzymanych w eksperymencie biomineralizacyjnym w metodzie powolnej dyfuzji. Eksperyment trwał 24 godziny. Kryształy węglanu wapnia wzrastające w obecności dOtol1 oraz hOtol1 różnią się morfologią w porównaniu do kryształów kontrolnych wzrastających bez białka. Większość populacji kryształów kontrolnych wzrastających zarówno w obecności 2 mM, 10 mM jak i 25 mM stężenia CaCl_2 stanowią typowe kryształy romboedryczne. W zależności od stężenia dOtol1 lub hOtol1, romboedryczne kryształy stopniowo zmieniają swoją morfologię na wydłużoną wzdłuż osi krystalograficznej *c*. Zmiana morfologii jest również uzależniona od stężenia jonów wapnia w roztworze, gdzie dla stężenia 2 mM brak jest zauważalnych zmian kryształów w porównaniu do kontroli, a przy wyższych stężeniach Ca^{2+} wpływ białka jest zauważalny. Kryształy węglanu wapnia wzrastające w obecności 10 mM lub 25 mM CaCl_2 w roztworze o stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$ lub 300 $\mu\text{g/ml}$ dOtol1 lub hOtol1 charakteryzują morfologią podobną do szybko wzrastających kryształów oraz posiadających wiele warstw (Zaquin et al., 2022).

Zdjęcia SEM zostały przeanalizowane pod kątem średniej wielkości i ilości kryształów otrzymanych w obecności dOtol1 lub hOtol1 (Rysunek 27). W odniesieniu do kryształów kontrolnych, kryształy otrzymane w obecności białka są mniejsze, jednak zmiana średniej wielkości kryształów o zaburzonej morfologii romboedrycznej w analizowanej populacji nie jest ściśle powiązana ze stężeniem białka (Rysunek 27A). Analiza liczby kryształów przypadających na mm^2 centralnej części szkiełka biomineralizacyjnego wykazała, że wraz ze wzrostem stężenia dOtol1 lub hOtol1 wzrasta liczba powstających kryształów w odniesieniu do warunków kontrolnych (Rysunek 27B).

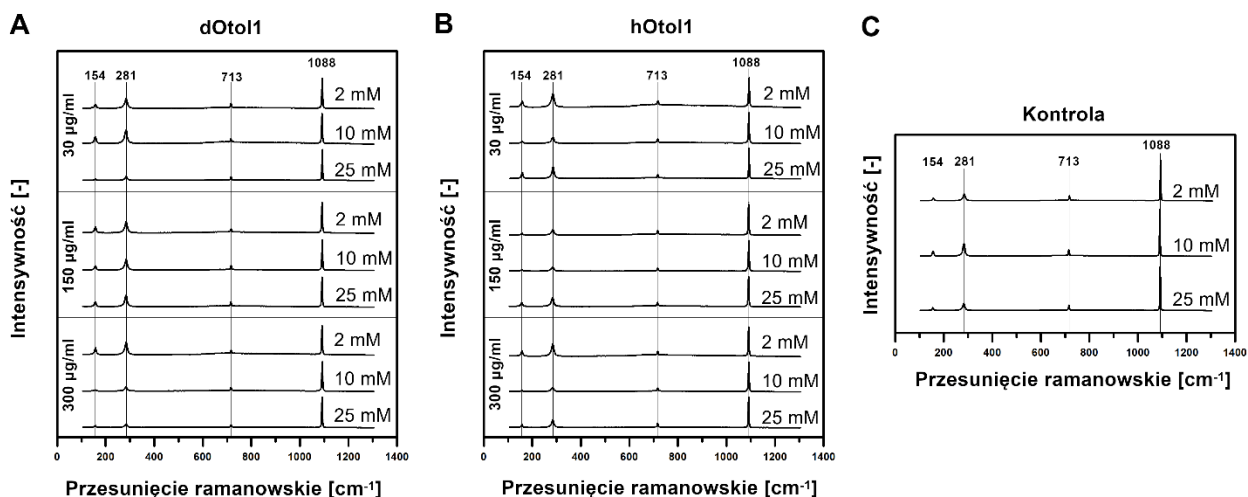


Rysunek 26. Zdjęcia SEM kryształów węgla wapnia uzyskanych z eksperymentów biomineralizacji *in vitro*. Kryształy zostały otrzymane przy użyciu metody wolnej dyfuzji w obecności dOtol1 i hOtol1 o stężeniu 30 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$ oraz 300 $\mu\text{g/ml}$ w buforach o stężeniu 2 mM, 10 mM lub 25 mM CaCl₂ w ciągu 24 godz. Skala na panelach głównych odpowiada 200 μm , natomiast skala zdjęć wewnętrznych odpowiada 50 μm .



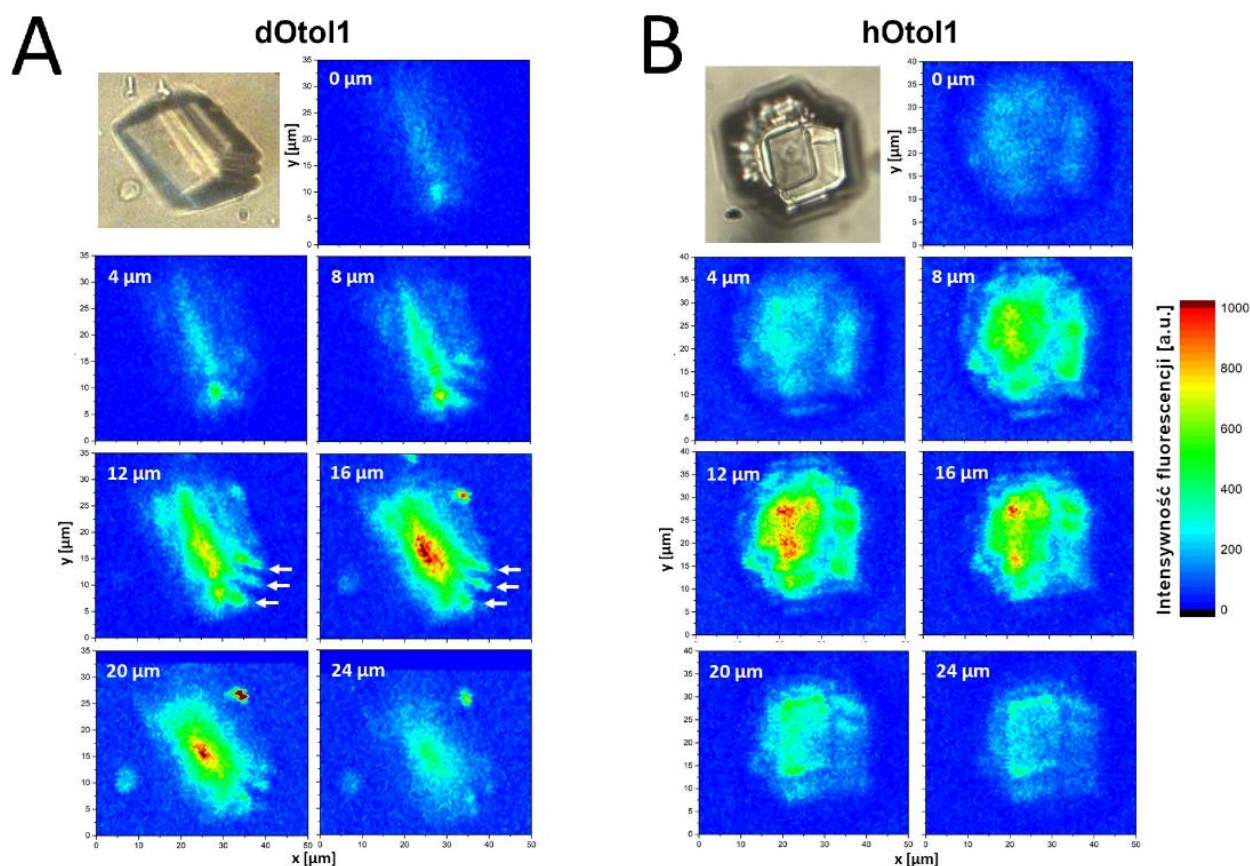
Rysunek 27. Analiza średnich rozmiarów (A) i liczby (B) kryształów węgla wapnia. Kryształy zostały otrzymane w obecności 30 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ dOtol1 lub hOtol1 eksperymentach mineralizacji trwających 24h dla roztworów o stężeniach 2 mM, 10 mM i 25 mM jonów wapnia wraz z warunkami kontrolnymi.

Pomimo zmian morfologicznych kryształów węgla wapnia w obecności dOtol1 i hOtol1, białka te nie wpływają na odmianę polimorficzną węgla wapnia. Analiza otrzymanych kryształów z użyciem spektroskopii Ramana (Rozdział 4.10.5) wykazała, że romboedryczne kryształy kontrolne, jak również kryształy wzrastające w obecności dOtol1 i hOtol1 o zaburzonej morfologii romboedrycznej mają widma charakterystyczne dla kryształów kalcytowych (Rysunek 28) (Behrens et al., 1995). W wyniku mineralizacji węgla wapnia w każdym z badanych warunków powstawała również niewielka populacja waterytowych kryształów sferycznych (wyniki niepokazane). Ze względu na ich niewielką liczbę, niezmienną morfologię pomiędzy próbkami i warunkami - nie zostały one ujęte w analizie.



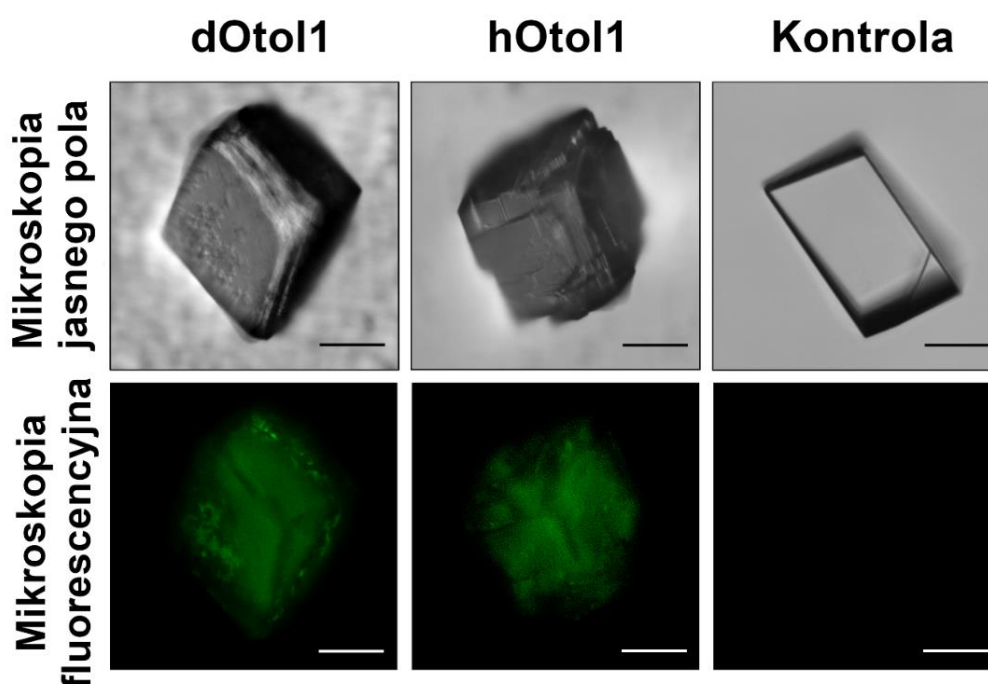
Rysunek 28. Widma mikro-Ramana wybranych kryształów węgla wapnia. Widma kryształów otrzymanych w obecności dOtol1 (A) i hOtol1 (B) w stężeniach 30 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ białka i stężeniach 2 mM, 10 mM i 25 mM CaCl_2 oraz kryształy kontrolne uzyskane bez białka.

W celu określenia lokalizacji dOtol1 lub hOtol1 w obrębie kryształu wykorzystano technikę mikroskopii fluorescencyjnej wzbudzonej dwufotonowo (2PEFM) (Rozdział 4.10.4), pozwalającą na otrzymanie serii zdjęć pokazujących przekroje kryształu na wybranej wysokości. Wynik obrazowania kryształów w płaszczyźnie x-y co 4 μm wzdłuż osi z, wzrastających w mieszaninie mineralizacyjnej o 25 mM stężeniu jonów wapnia i 150 $\mu\text{g/ml}$ białka został przedstawiony na Rysunku 30. Zmiany koloru od niebieskiego przy niskiej emisji, poprzez zielony do czerwonego, odpowiadają wzrostowi stężenia białka. Wybrane kryształy węglanu wapnia charakteryzują się najwyższą intensywnością emisji w centralnej części kryształu na wysokości 12-16 μm , zmniejszającej się w kierunku ścian. Co interesujące, dla kryształu węglanu wapnia wzrastającego w obecności dOtol1 (Rysunek 30A) można zauważyć charakterystyczne warstwy emitujące fluorescencję (zaznaczone białymi strzałkami). Kryształy kontrolne, wzrastające w obecności niemodyfikowanej dOtol1 lub hOtol1 oraz w nieobecności białka, nie wykazują fluorescencji (Dodatek, Rysunek 39).



Rysunek 30. Zdjęcia przekroju kryształów węglanu wapnia uzyskane z pomocą mikroskopii fluorescencyjnej wzbudzonej dwufotonowo. Kryształy wzrastały w obecności 150 $\mu\text{g/ml}$ dOtol1 (A) lub hOtol1 (B) z 200 nM fluorescencyjnie znakowanego dOtol1 lub hOtol1 w roztworze 25 mM CaCl_2 . Charakterystyczne stopnie, będące wynikiem powstawania nowych płaszczyzn wzrostu spowodowanych osadzeniem się białka zaznaczono białymi strzałkami.

W celu lepszego zobrazowania powierzchni otrzymywanych kryształów w mieszaninie mineralizacyjnej o stężeniu 10 mM Ca^{2+} i 150 $\mu\text{g/ml}$ białka użyto skaningowego mikroskopu konfokalnego (CLSM, ang. *confocal laser scanning microscopy*) (Rozdział 4.10.3). Rysunek 31. przedstawia zestawienie obrazów kryształów otrzymanych w obecności znakowanej ATTO-488 dOtol1 lub hOtol1 oraz kryształów kontrolnych (Rozdział 4.9). Kryształy wzrastające w obecności znakowanego białka emitują fluorescencję w całej objętości kryształu, w odróżnieniu do kryształu kontrolnego. Zwraca uwagę obecność depozytów dOtol1 na powierzchni kryształu. W przypadku kryształów wzrastających w obecności hOtol1 nie obserwuje się ich obecności.



Rysunek 31. Zdjęcia CLMS kryształów węgla wapnia. Kryształy wzrastały w obecności 150 $\mu\text{g/ml}$ dOtol1 lub hOtol1 i 200 nM białka znakowanego ATTO-488, a w przypadku warunków kontrolnych - 250 nM wolnym ATTO-488 w 10 mM roztworze CaCl_2 . Zdjęcia przedstawiają obraz jasnego pola (panel górny) oraz zdjęcia fluorescencyjne (panel dolny). Skala: 20 μm .

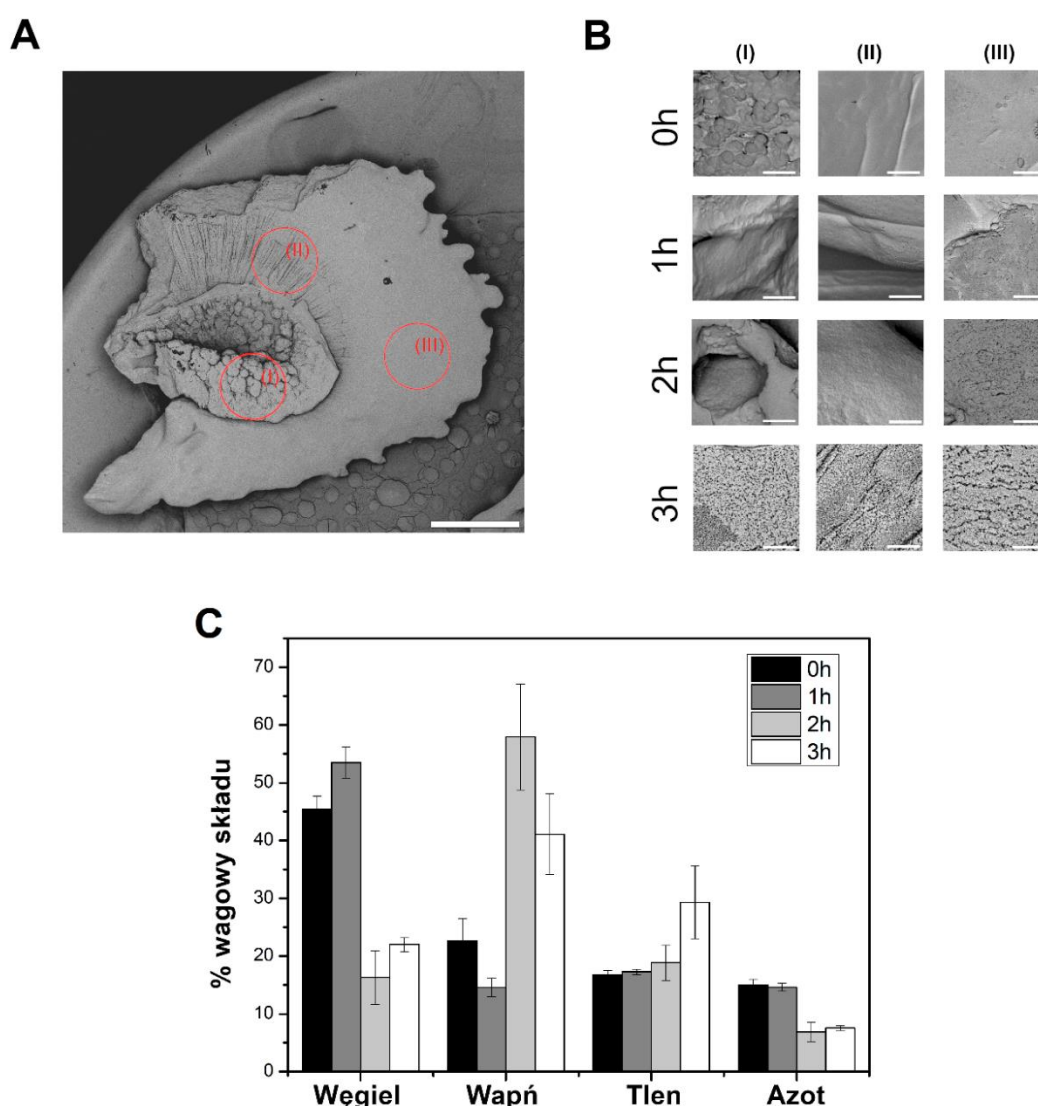
5.5. Badania proteomiczne otolitów *Cyprinus carpio* oraz *Gadiculus argenteus*

5.5.1. Przygotowanie otolitów i macierzy otolitycznej

Badania z użyciem spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią ciekłą (LC-MS/MS), mające na celu identyfikację białek z mieszaniny w oparciu o podejście *bottom-up*, stanowią niezwykle czułą metodą badawczą proteomu. Niewielka ilość materiału potrzebnego do badania i możliwość pomiaru złożonych próbek jest jej atutem, biorąc pod uwagę ilość macierzy organicznej znajdującej się w otolitach (do 5% masy otolitu, w zależności od gatunku ryb (Kang et al., 2008)).

Analizie poddano dwie grupy otolitów, pochodzące z karpia *Cyprinus carpio* oraz otolity kopalne ślepiora *Gadiculus argenteus*, datowane na epokę pliocenu (2 – 5 milionów lat temu) (Rozdział 3.4). Macierz organiczną rozdzielono na dwie frakcje - supernatant (składniki macierzy

rozpuszczalne w kwasie octowym użytym do dekalcyfikacji) oraz osad (składniki nierozpuszczalne w kwasie octowym). W literaturze opisującej badania nad otolitami wykorzystywany jest taki podział (Murayama et al., 2004), chociaż istnieje możliwość zanieczyszczenia jednej części frakcji drugą. Co ważne, składniki zawarte w obydwu frakcjach są wyłącznie zlokalizowane wewnątrz otolitu. W celu wydajnego pozbycia się makromolekuł z powierzchni otolitu prowadzono ich czyszczenie z mieszaniną podchlorynu sodu i nadtlenku wodoru (Rozdział 4.11.1). Na podstawie zdjęć SEM oraz analizy EDS (Rozdział 4.10.2) oceniono, że procedura trwająca 3 godz. jest optymalna, czego wyrazem są zmiany powierzchni otolitów i zmniejszający się udział azotu, będący wyznacznikiem obecności m.in. białek na powierzchni otolitu (Rysunek 32). Opisaną procedurę wykorzystano również do oczyszczania otolitów kopalnych.

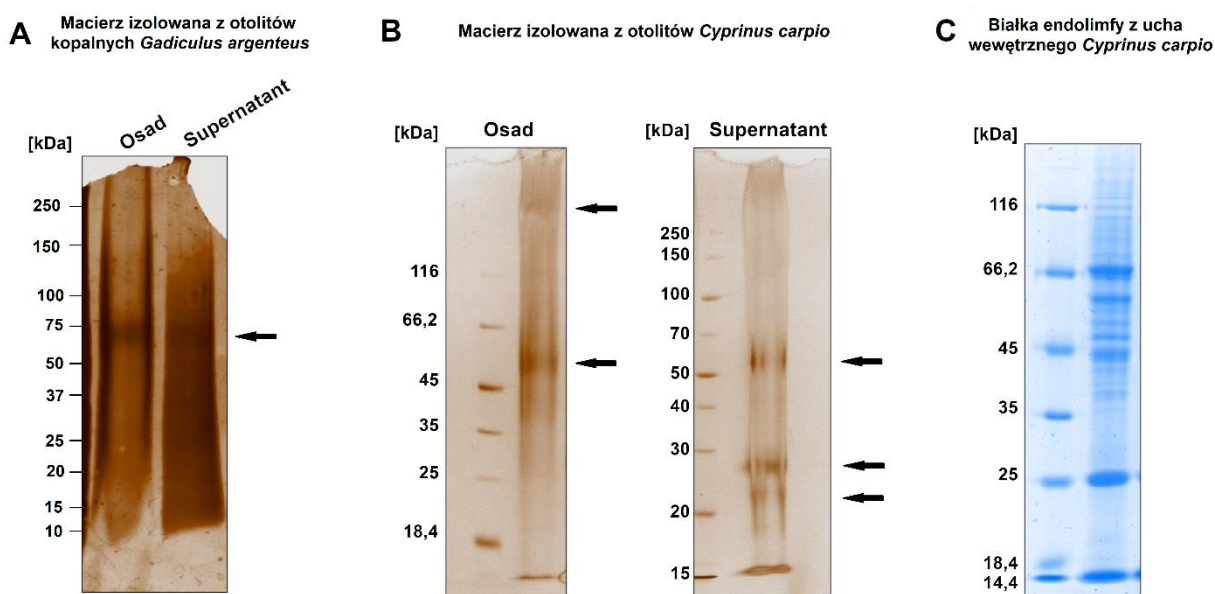


Rysunek 32. Wynik czyszczenia otolitów *Cyprinus carpio*. (A) Zdjęcie SEM otolitu typu gwiazdka wraz z obszarami obserwowanymi podczas czyszczenia. Skala odpowiada 1 mm. (B) Powierzchnia otolitów w wybranych rejonach obserwowana w trakcie czyszczenia otolitu po 0, 1, 2 i 3 godz. Skala odpowiada 10 μ m (C) Wykres przedstawiający wynik analizy EDS składu wagowego powierzchni otolitów wskazujący na ubytek azotu wraz z czasem czyszczenia otolitu.

Wyniki

W celu potwierdzenia powodzenia izolacji składników macierzy organicznej, wykonano elektroforezę SDS-PAGE (Rozdział 4.11.1) (Rysunek 33). Charakterystyczną cechą żeli obrazujących białka otolityczne są rozmazane pasma, wskazujące na zaburzony przebieg elektroforezy. Taki efekt może być następstwem silnej agregacji białek, ich degradacji lub reakcji Maillard'a pod wpływem denaturacji termicznej białek glikozylowanych (Fayle et al., 2001).

Panel A (Rysunek 33) pokazuje elektroforegram macierzy izolowanej z otolitów kopalnych. Prócz rozmazań, dobrze widoczny jest również jeden prążek, zarówno dla próbki osadu jak i supernatantu, mogący odpowiadać zachowanemu długiemu peptydowi. W przypadku macierzy izolowanej z otolitów *Cyprinus carpio* (Rysunek 33B), dla próbki osadu można wyszczególnić pasmo odpowiadające masie około 55 kDa. Dla próbki supernatantu, dodatkowo można zaobserwować pasmo odpowiadające około 25 kDa. Przeanalizowano również skład białkowy endolimfy *Cyprinus carpio* pobranej w trakcie izolacji otolitów (Rozdział 3.4). Rysunek 33C przedstawia wynik elektroforezy próbki endolimfy z widocznymi pasmami, wskazującymi na dużą ilość dobrze rozdzielonych białek. Wyniki elektroforezy były wystarczającym argumentem za kontynuacją badań z użyciem LC-MS/MS.



Rysunek 33. Zdjęcia żeli SDS-PGE macierzy otolitów. (A) Składniki macierzy otolitów kopalnych *Gadidulus argenteus* oraz (B) *Cyprinus carpio*, żele barwione azotanem srebra. (C) wyniki SDS-PAGE dla próbki endolimfy *Cyprinus carpio*, żel barwiony błękitem Coomassie.

5.5.2. Identyfikacja białek macierzy kopalnych otolitów *Gadidulus argenteus*

Do identyfikacji białek macierzy organicznej kopalnych otolitów *Gadidulus argenteus* wykorzystano jedynie około 7 μ g osadu macierzy. Ze względu na brak bazy danych proteomu ślepiora *Gadidulus argenteus* oraz nierozbudowanej bazy danych dla jego bliskiego krewnego, dorsza *Gadus*

morhua, identyfikację białek przeprowadzono na podstawie homologii białek z bazy sekwencji zdeponowanych w NCBI dla gromady ryb promieniopłetwych (*Actinopterygii*).

Wyniki pomiarów LC-MS/MS z użyciem analizy Mascot zidentyfikowały 64 białka, z czego 24 stanowiły zanieczyszczenia pochodzenia ludzkiego. Dodatkowo z analizy wykluczono 16 białek, co do których były wątpliwości, czy są rybimi czy zanieczyszczeniami ludzkimi. Wśród pozostałych 24 zidentyfikowanych białek znaleziono dwa białka bezpośrednio zaangażowane w proces biomineralizacji otolitów: białko homologiczne do białka hipotetycznego *hypothetical protein cypCar_00010099* z *Cyprinus carpio* (KAF7668332.1) oraz białko macierzy otolitycznej homologiczne do *Otolith matrix protein 1* (OMP1) z *Acipenser ruthenus* (RXN00013.1). Najprawdopodobniej, białko zidentyfikowane na podstawie homologii do KAF7668332.1 jest białkiem podobnym do Starmaker. Zidentyfikowane peptydy zostały przypisane do białek na podstawie minimum jednego unikalnego peptydu, szczegółowe informacje na temat wyników zostały zestawione w Tabeli 13.

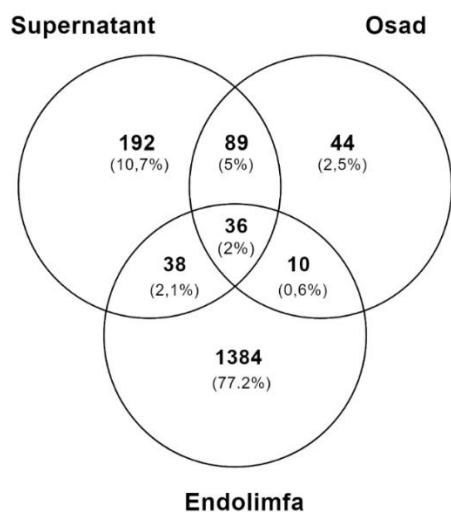
Tabela 13. Peptydy zidentyfikowane w wyniku analizy proteomu macierzy kopalnych otolitów *Gadiculus argenteus*. Tabela zestawia identyfikatory NCBI białek, do których zostały przypisane peptydy na zasadzie homologii w trakcie analizy Mascot.

IDENTYFIKATOR NCBI	ORGANIZM	WSKAŹNIK MASCOT	LICZBA ZIDENTYFIKOWANYCH PEPTYDÓW	SEKWENCJE PEPTYDÓW
KTF88849.1	<i>Cyprinus carpio</i>	91	2	ETSETPDKSDTDSDDTDEVK (unikalny) EMDEMMQNLPSRPSEMEK (+2 oksydacja reszty M)
RXN00013.1	<i>Acipenser ruthenus</i>	57	1	CVAENLGDVAFVK (unikalny)

5.5.3. Identyfikacja białek macierzy otolitów i endolimfy *Cyprinus carpio*

Badania proteomiczne odkrywają złożoność procesu mineralizacji otolitów i regulacji procesów zaangażowanych w ich wzrost. W wyniku badań skupiających się nad poznaniem proteomu *Acanthopagrus butcheri* z rodziny prażmowatych, Thomas i wsp. (2019), zidentyfikowali około 380 białek znajdujących się wewnątrz otolitu. W przypadku otolitów *Danio rerio* udało się zidentyfikować 52 białka wyłącznie zaangażowanych w mineralizację (Kalka et al., 2019).

Fracje macierzy organicznej wyizolowane z otolitów *Cyprinus carpio* oraz endolimfa z ucha wewnętrznego zostały zbadane pod kątem ich proteomu. W wyniku pomiarów LC-MS/MS udało się zidentyfikować 179 białek osadu, 355 białek supernatantu i 1468 endolimfy, po odjęciu białek stanowiących zanieczyszczenie (Rozdział 4.11). Część białek była wspólna dla badanych frakcji (Rysunek 34). Analiza ich sekwencji aminokwasowych z użyciem narzędzia STRING (Szkłarczyk et al., 2019) wykonana osobno dla osadu, supernatantu i endolimfy oraz ich wspólnych elementów, wykazała zaangażowanie białek w szereg procesów biologicznych.



Rysunek 34. Wykres Venna dla białek zidentyfikowanych w otolitach *Cyprinus carpio*. Wykres pokazuje liczbę białek i ich udział w zidentyfikowanych frakcjach supernatantu lub osadu, oraz w endolimfie ucha wewnętrznego.

Białka zidentyfikowane w osadzie, w głównej mierze zostały przypisane do procesów biologicznych powiązanych z regulacją estryfikacji i transportu cholesterolu i fosfolipidów, tworzenia cząsteczek lipoprotein HDL i LDL, odpowiedzi immunologicznej ostrej fazy, organizacji włókien kolagenu i organizacji macierzy zewnątrzkomórkowej, procesowania białek i ich proteolizy, rozwojem tkanki zmineralizowanej oraz rozwojem ucha wewnętrznego. Z kolei białka supernatantu zostały powiązane z mineralizacją i wzrostem otolitów, rozwojem tkanki zmineralizowanej, regulacją cholesterolu, fosfolipidów i lipoprotein, morfogenezą chondrocytów, rozwojem chrząstki i kości, organizacją włókien kolagenu, detekcją bodźców mechanicznych, metabolizmem glikozaminoglikanów oraz o-glikozylacją białek, procesowaniem białek i ich degradacją oraz krzepnięciem krwi. Białka z endolimfy zostały powiązane z biosyntezą fosfokreatyny, regulacją cholesterolu, fosfolipidów i lipoprotein, szeregiem procesów metabolicznych – glikolizą, cyklem Krebsa, glukoneogenezą, katabolizmem węglowodanów, metabolizmem ATP i fosforylacją nukleozydów oraz ścieżką aktywacji układu dopełniacza. Wspólnymi rolami biologicznymi dla białek osadu oraz supernatantu były: regulacja aktywności peptydaz oraz organizacja macierzy zewnątrzkomórkowej. W przypadku pary supernatant-endolimfa były to regulacja estryfikacji cholesterolu i lipoprotein oraz regulacja aktywności peptydaz. Z kolei białka wspólne dla osadu i endolimfy były powiązane z organizacją włókien kolagenu. Białka wspólne zarówno dla osadu, supernatantu i endolimfy zostały zakwalifikowane jako cząsteczki lipoprotein oraz białka zewnątrzkomórkowe.

Z perspektywy relacji struktura-funkcja, białka osadu zostały przypisane do transferyn, kolagenów, inhibitorów proteaz serynowych, alfa-2-makroglobulin, białek filamentu pośredniego oraz zawierały domeny brichos, GLA, domeny czynnika von Willebranda (vwf) typu c oraz domeny podobne do EGF. Podobnie jak w przypadku osadu, białka supernatantu zostały przypisane do transferyn, kolagenów, białek zawierających domenę c czynnika von Willebranda, domenę brichos, GLA, EGF, inhibitorów serynowych, alfa-2-makroglobulin oraz białek podobnych do cystatyn. Białka endolimfy zostały przyporządkowane do rodziny łańcuchów alfa/beta fibrynogenu, homologów 14.3.3., białek z motywem EF, alfa-2-makroglobulin, C-końcowej domeny netryny, białek filamentu

pośredniego, serpin oraz białek podobnych do cystatyny. Wspólnymi cechami białek osadu i supernatantu były serpiny oraz białka zawierające resztę GLA. Dla osadu i endolimfy były to C-końcowa domena kolagenów oraz domena czynnika von Willebranda typu c, natomiast dla pary supernatant i endolimfa były to C-końcowa domena netryny oraz kolagenów, alfa-2-makroglobuliny i domena Kringle.

5.5.4. Identyfikacja otoliny-1 z *Cyprinus carpio* oraz jej potencjalnych izoform

Liczba zidentyfikowanych białek w otolitach i endolimfie karpia oraz przypisane im różnorodne role biologiczne stanowią podstawę do dyskusji na temat biologicznej różnorodności potrzebnej do powstania otolitów. Złożoność proteomu rybich otolitów, ale również ssaczych otokoniów, jest również ciekawa ze względu na występowanie wielu białek homologicznych i ich izoform.

W wyniku analizy proteomu macierzy organicznej otolitów *Cyprinus carpio* (Rozdział 4.11) zidentyfikowano otolinę-1 - izoformę A, o numerze NCBI XP_042626436.1 oraz białko podobne do otoliny-1-A o numerze XP_042573819.1. Dane dotyczące identyfikacji zostały przedstawione w Tabeli 14. Dodatkowo, w trakcie analizy z użyciem narzędzia STRING, białka hipotetyczne KTF91234.1, KTG32917.1 oraz białko XP_042626674.1 (*inner ear-specific protein-like*), zidentyfikowane w otolitach karpia zostały powiązane z izoformą B otoliny-1 z *Danio rerio* (identyfikator: E7FAJ7). Zestawienie sekwencji zidentyfikowanych w programie Clustal Omega białek z izoformami A oraz B otoliny-1 z *Danio rerio* oraz analiza identyczności ich sekwencji została przedstawiona w Tabeli 15. Wszystkie znalezione białka wykazują względem siebie wysoki poziom podobieństwa oraz charakteryzują się obecnością krótkiej domeny podobnej do kolagenu zlokalizowanej w centralnej części sekwencji aminokwasowej oraz C-końcowej globularnej domenie C1q (sekwencje zostały zestawione w Dodatku). Co ciekawe, białko podobne do otoliny-1-A z *Cyprinus carpio* (XP_042573819.1) zachowuje wysoki poziom podobieństwa do otoliny-1-A z *Cyprinus carpio* oraz *Danio rerio*, w odróżnieniu od innych zidentyfikowanych białek macierzy otolitów *Cyprinus carpio*. Białko podobne do otoliny-1-A zostało zidentyfikowane w supernatancie z pokryciem sekwencji 10%, natomiast otolina-1-A we frakcji osadu, z pokryciem sekwencji 9%. Obydwie sekwencje różnią się peptydem *MQFSLKRRERRRGVTQVQRLATCT* na końcu-N oraz pojedynczymi substytucjami reszt aminokwasowych. Możliwe zatem, że obydwa białka odpowiadają otolinie-1-A z różnicą dotyczącą zawartości sekwencji sygnałowej.

Wyniki

Tabela 14. Otolina-1 i jej potencjalne izoformy zidentyfikowane w otolitach *Cyprinus carpio*. Tabela przedstawia podsumowanie najważniejszych danych po analizie Mascot, w rozróżnieniu na frakcję osadu i supernatantu.

RODZINA	NR. NCBI	NAZWA	WYNIK MASCOT	M _w [KDA]	LICZBA PEPTYDÓW (SEKWENCJE)	SEKWENCJE	
						ZNACZĄCE	UNIKALNE
OSAD							
1	XP_042626436.1	otolin-1-A	333	54,378	9 (4)	4	4
	KTF91234.1	hypothetical protein cypCar_00022286	3186	57,465	96 (9)	9	3
2	XP_042626674.1	Inner ear-specific collagen-like	2705	50,907	93 (9)	3	1
	KTG32917.1	hypothetical protein cypCar_00011378	597	43,573	46 (5)	2	2
SUPERNATANT							
1	XP_042573819.1	otolin-1-A-like	623	51,824	15 (5)	5	5
	KTF91234.1	hypothetical protein cypCar_00022286	1859	57,465	65 (10)	10	3
2	XP_042626674.1	inner ear-specific collagen-like	1594	50,907	66 (9)	2	1
	KTG32917.1	hypothetical protein cypCar_00011378	472	43,573	44 (4)	1	1

Tabela 15. Macierz podobieństwa sekwencji aminokwasowych otoliny-1 z *Cyprinus carpio* i jej potencjalnych izoform. Macierz przedstawiona została w formie procentu podobieństwa między danymi sekwencjami.

	E7FAJ7	A5PN28	XP_042626436.1	KTF91234.1	XP_042626674.1	KTG32917.1	XP_042573819.1
E7FAJ7 (otolin-1-B, <i>D. rerio</i>)	100,00	80,00	77,53	86,63	86,11	83,30	53,78
A5PN28 (otolin-1-A, <i>D. rerio</i>)	80,00	100,00	87,93	80,77	80,25	85,89	85,89
XP_042626436.1 (otolin-1-A, <i>C. carpio</i>)	77,53	87,93	100,00	78,05	74,16	91,14	94,56
KTF91234.1 (hypothetical protein cypCar_00022286, <i>C. carpio</i>)	86,63	80,77	78,05	100,00	93,38	90,25	55,34
XP_042626674.1 (inner ear-specific collagen-like, <i>C. carpio</i>)	86,11	80,25	74,16	93,38	100,00	93,53	55,39
KTG32917.1 (hypothetical protein cypCar_00011378, <i>C. carpio</i>)	83,30	85,89	91,14	90,25	93,53	100,00	47,91
XP_042573819.1 (otolin-1-A-like, <i>C. carpio</i>)	53,78	85,89	94,56	55,34	55,39	47,91	100,00

6. Dyskusja

Macierz organiczna otolitów i otokoniów to bogata mieszanina makromolekuł odpowiedzialna za precyzyjne formowanie biominerałów węglanu wapnia w określonym czasie i miejscu. Badania nad procesami biomineralizacji są zagadnieniami interdyscyplinarnymi. W kontekście kontroli makromolekularnej, różnorodność proteomu jest jedynie jedną z wielu zmiennych wpływających na proces biomineralizacji. Na przykład sama ilość białek identyfikowanych w strukturach biomineralnych może się radykalnie różnić między różnymi organizmami: u koralowca z gatunku *Stylophora pistillata* zidentyfikowano *jedynie* 36 białek macierzy organicznej biominerału (Drake et al., 2013), a w przypadku badań proteomicznych nad małżami z gatunku *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* i *Pecten maximus* udało się zidentyfikować odpowiednio 55, 46, oraz 46 białek macierzy rozpuszczalnej muszli (Arivalagan et al., 2017). Znacznie więcej białek znaleziono w otolitach *Acanthopagrus butcheri* (380 białek) (Thomas et al., 2019). Wydaje się więc, że biomineralizacja jest procesem wielopoziomowym i niezwykle skomplikowanym. Wstępnym etapem jego zrozumienia są badania prowadzone z wykorzystywaniem modeli biomineralizacji *in vitro*, które m.in. stanowiły główną wykorzystywaną metodykę w tej pracy.

Głównym celem pracy było poznanie właściwości molekularnych otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*. Praca została wykonana w oparciu o badania biochemiczne i biofizyczne rekombinowanych białek, ekspresjonowanych w komórkach bakteryjnych. Zachowanie otoliny-1 w procesie bioinspirowanej mineralizacji węglanu wapnia *in vitro* zostało przebadane w oparciu o system powolnej dyfuzji. Szereg badań został uzupełniony o analizę proteomu otolitów *Cyprinus carpio* skierowaną na poszukiwanie izoform otoliny-1, oraz w części na badania proteomiczne nad otolitami kopalnymi *Gadiculus argenteus*.

Pierwsze doniesienia na temat otoliny-1 ukazały się w pracy Davisa i wsp. (1995), w której zidentyfikowano białko kolagenowe, specyficzne dla ucha wewnętrznego ryby *Lepomis macrochirus*. Siedem lat później, w 2002 roku, Murayama i wsp. dokonali wstępnej charakterystyki białka z *Oncorhynchus keta*, nazywając je otoliną-1. Pomimo identyfikacji ważnego składnika macierzy organicznej otolitów, wykazującego wysokie podobieństwo do homologa ludzkiego, do tej pory nie została wykonana dogłębna charakterystyka biofizyczna białka, a badania z zakresu aktywności biomineralizacyjnej otoliny-1 potrzebowały uzupełnienia. Zaprezentowane w pracy badania rozwijają tematykę badań podstawowych nad procesem biomineralizacji, w szczególności relacje struktura-funkcja otoliny-1.

6.1. Analiza bioinformatyczna sekwencji i preparacja otoliny-1

Otolina-1 jest krótkim białkiem podobnym do kolagenu, które należy do rodziny białek C1q. W swojej budowie, podobnie jak inne białka z rodziny, posiada trzy domeny - N-końcową domenę niekolagenową (NC-N'), centralnie położoną domenę kolagenopodobną posiadającą trzy segmenty COL1, COL2 i COL3, oraz C-końcową domenę globularną C1q. Jako białko sekrecyjne, otolina-1 posiada 23-aminokwasowy peptyd sygnałowy, który zostaje usunięty z białka. Otolina-1 wykazuje wysoki poziom homologii między gatunkami, oraz zachowane w toku ewolucji sekwencje w obrębie domeny kolagenopodobnej i C1q. Otolina-1 jest białkiem bezpośrednio zaangażowanym w proces biomineralizacji. Analiza ładunku netto białka i jego hydrofobowości plasuje otolinę-1 w grupie białek natywnie sfałdowanych.

Analiza sekwencji aminokwasowej otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* z użyciem narzędzi bioinformatycznych potwierdziła wysoki poziom ich podobieństwa. Poznanie własności molekularnych białek może dostarczyć interesujących informacji także w kontekście prac nad terapiami chorób takich jak BPPV (Wu et al., 2020; Irugu et al., 2021).

Porównanie sekwencji aminokwasowej dwóch homologów wykazało, że białko wykazuje najwyższy poziom podobieństwa w obrębie domeny C1q oraz rejonie COL2 domeny kolagenopodobnej, co może świadczyć o szczególnym znaczeniu tych części dla zachowania struktury i funkcji białka. W rzeczywistości, domena C1q jest elementem stabilizującym trimery białek należących do rodziny C1q (Ressl et al., 2015). Zwracają również uwagę ciągi powtórzeń reszt cysteinyłowych obydwu homologów w obrębie domeny NC-N'. Dla białek rodziny C1q powtórzenia te są szczególnie istotne ze względu na tworzenie stabilnych oligomerów wysokiego rzędu (Ressl et al., 2015).

Otolina-1 charakteryzuje się nadreprezentacją reszt Gly i Pro w sekwencji w odniesieniu do bazy białek SwissProt 51, przewyższając nawet kolageny pełnej długości (Ramshaw et al., 1998). Kolejną cechą wspólną dla kolagenów pełnej długości i krótkim białkiem podobnym do kolagenu, jakim jest otolina-1, jest występowanie powtórzeń (Gly-X-Y)_n. Powtórzenia te różnią się częstotliwością występowania trójek Gly-Pro-Pro i Gly-Pro-Y pomiędzy homologami, oraz między ludzką otoliną-1, a ludzkimi kolagenami pełnej długości. Częstotliwość powtórzeń Gly-Pro-Pro i Gly-Pro-Y wynosi 8,3% i 11,1% oraz 2,7% i 9,3% odpowiednio dla otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* w porównaniu do szacowanej na 10,4% i 17,6% dla kolagenów ludzkich (Ramshaw et al., 1998). Biorąc pod uwagę powyższe dane można przyjąć założenie, że otolina-1 nie jest typowym kolagenem, i może czynić z niej unikalne białko kolagenopodobne, występujące jedynie w uchu wewnętrznym.

Wstępne analizy bioinformatyczne przedstawiły otolinę-1 jako białko mogące stanowić wyzwanie pod względem nadekspresji. W literaturze można znaleźć prace, w których

nadekspresjonowana była domena C1q otoliny-1 w komórkach bakteryjnych (Hołubowicz et al., 2017) oraz mysia i ludzka otolina-1 - w komórkach prokariotycznych (Moreland et al., 2014). Przygotowując się do wybrania metody nadekspresji rozważono wiele opcji. Otolina-1 jest białkiem wyłącznie zwierzęcym, które w wyniku ekspresji jest modyfikowane potranslacyjnie - potencjalnie hydroksylowane i glikozylowane. W pracy Murayamy i wsp. (2002) zidentyfikowano potencjalne miejsca glikozylacji w obrębie domeny NC-N¹ i C1q, które według autorów mogłyby przyczyniać się do agregacji białka. Wprowadzenie grup hydroksylowych na resztach prolilowych w natywnych kolagenach jest związane z zapewnieniem stabilności białka (Rappu et al., 2019). Modyfikacja ta jest z reguły wprowadzana na miejscu Y w powtórzeniach Gly-X-Y. Ze względu na wymienione modyfikacje rozważano nadekspresję otoliny-1 w komórkach prokariotycznych, jednak po konsultacji z K. Morelandem, autorem pracy o otolinie-1, zdecydowano się na próbę nadekspresji białka w komórkach bakteryjnych po optymalizacji sekwencji nukleotydowej do użycia w komórkach *Escherichia coli*. Decyzja ta została umocniona doniesieniem o nadekspresji adiponektyny w komórkach bakteryjnych, która również należy do rodziny C1q (Rothan et al., 2012; Yamauchi et al., 2001). Dodatkowo, fragment podobny do kolagenu otoliny-1 jest stosunkowo krótki (około 200 aminokwasów) w porównaniu do 662 aminokwasów łańcucha $\alpha 1$ kolagenu X lub 3152 aminokwasów łańcucha $\alpha 3$ kolagenu VI (Ricard-Blum, 2011). Podobnie udział procentowy powtórzeń, w których mogłaby występować hydroksyprolina jest mniejszy niż w kolagenach. W literaturze opisane zostały krótkie bakteryjne białka kolagenowe, które z powodzeniem były nadekspresjonowane w komórkach *Escherichia coli* (Yu et al., 2014). Ze względu na planowane eksperymenty wymagane było uzyskiwanie białka z wysoką wydajnością, możliwie szybką procedurą hodowli komórkowej i oczyszczania, co udało się uzyskać w komórkach bakteryjnych. Opracowana procedura ekspresji i oczyszczania białka okazała się skuteczna, a jej słuszność została potwierdzona badaniami nad właściwościami otoliny-1, a prace nad otrzymaniem hydroksylowanego białka trwają.

Na opracowanie metody nadekspresji i oczyszczania otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* w komórkach bakteryjnych składało się wiele godzin pracy i nieudanych prób. Początkowo testowano konstrukt genetyczny w plazmidzie pCold-TF (TaKaRa), pozwalający na nadekspresję białka fuzyjnego z białkiem *trigger factor* (TF) na końcu-N białka docelowego (Qing et al., 2004). Obecność TF pozwala na zwiększenie rozpuszczalności białek rekombinowanych. Mimo korzyści wynikających z metody, jakimi były wysoki poziom ekspresji i obecność białka we frakcji białek rozpuszczalnych, napotkano problemy przy oczyszczaniu preparatu. Z tego względu zdecydowano się na kontynuowanie pracy z konstrukcjami w plazmidzie pQE80-L i dobrania satysfakcjonujących warunków nadekspresji. W wyniku optymalizacji metody udało się znaleźć warunki ekspresji w komórkach *E. coli* ArcticExpress (DE3), w których białka były ekspresjonowane ze stosunkowo wysoką wydajnością oraz w przeważającej większości w formie rozpuszczalnej. Komórki ArcticExpress (DE3) pozwalają

na ekspresję białek trudno rozpuszczalnych. Nadekspresja w niskiej temperaturze, rzędu 12-16°C wpływa na szybkość wzrostu bakterii i spowolnienie tempa nadekspresji białka, które wraz z obecnością czaperonin Cpn10 i Cpn60 wpływają na poprawne fałdowanie białka i jego rozpuszczalność (Ferrer et al., 2003).

Opracowana dwuetapowa metoda oczyszczania dOtol1 i hOtol1 pozwala na uzyskanie dużych ilości białka w krótkim czasie. Początkowo do lizy komórek bakteryjnych używano cyklu rozmrażania, zamrażania i ponownego rozmrażania komórek oraz dodatkiem do ekstraktu lizozymu, jednak metoda ta nie była wystarczająco wydajna. Użycie ultradźwięków pozwoliło na szybką dezintegrację komórek, bez uszczerbku dla jakości otrzymywanego preparatu. W trakcie oczyszczania zauważono, że podczas drugiego etapu - sączenia molekularnego, dOtol1 jak i hOtol1 opuszczają kolumnę w formie najlepiej zdefiniowanych szczytów w obecności wysokiego stężenia NaCl równego 600 mM. Mając na uwadze, że tak wysoka siła jonowa mogłoby wpływać na wyniki przyszłych badań biofizycznych znaleziono najniższe stężenie NaCl, przy którym białko nie traciło swoich właściwości i rozpuszczalności, równe 300 mM. Już na początkowych etapach pracy można było zauważyć skłonność białek do oligomeryzacji. Co ciekawe, homolog ludzki wykazywał mocniejszą tendencję od rybiego.

6.2. Badania roli otoliny-1 w biomineralizacji węglanu wapnia

Opracowanie wydajnej i powtarzalnej metody oczyszczania dOtol1 i hOtol1 było przełomowym momentem pracy. Pozwoliło ono na realizację jej głównych celów, na które składały się analiza właściwości molekularnych otoliny-1, określenie jej funkcji w tworzeniu kryształów węglanu wapnia w procesie bioinspirowanej mineralizacji *in vitro* oraz szeregu analiz proteomu otolitów. Badania biofizyczne wykorzystane do realizacji pierwszego celu skupiały się na poznaniu podstawowych właściwości białka i zostały rozwinięte w kontekście wpływu jonów wapnia na jego właściwości. W głównej mierze badania zostały wykonane w oparciu o techniki spektroskopowe jakimi są CD i fluorymetria oraz w oparciu o techniki określające właściwości hydrodynamiczne białka - ultrawierowanie analityczne, dynamiczne rozpraszanie światła czy sączenie analityczne. Jedną z najnowocześniejszych i silnie rozwijanych technik użytych w pracy było obrazowanie otoliny-1 przy pomocy kriomikroskopii elektronowej. Pomimo połowicznego sukcesu tej ostatniej, zaprezentowane wyniki są interesujące i dobrze rokują na przyszłość. Warto nadmienić, że otolina-1 była pierwszym białkiem w Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej, które zostało poddane obrazowaniu z użyciem tej metody.

Druga część badań dotyczyła roli otoliny-1 w mineralizacji węglanu wapnia. Wykorzystana metoda powolnej dyfuzji opisana przez Albecka i wsp. (1996) została zaadaptowana do pracy

w mniejszej skali (Wojtas, et al., 2012). Otrzymywane w jej wyniku syntetyczne kryształy węglanu wapnia wzrastające w obecności otoliny-1 były charakteryzowane z użyciem metod mikroskopowych.

Ostatnia część pracy prezentowała wyniki badań proteomicznych macierzy organicznej otolitów. Badania nad identyfikacją białek otolitów kopalnych *Gadidulus argenteus* wpisują się w dziedzinę badań nazwaną paleoproteomiką (Warinner et al., 2022). Pomimo rozkładu białek po śmierci zwierzęcia (okres półtrwania wiązania peptydowego wynosi ok. 600 lat (Radzicka Wolfenden, 1996)), w odpowiednich warunkach część białek może zostać zachowana przez setki, tysiące, czy nawet miliony lat (Schroeter et al., 2022). W literaturze opisywane są badania mające ustalić zachowany przez lata skład białkowy tkanek i organizmów zmineralizowanych, jak badania nad około 7000-letnimi muszlami małży *Pseudunio auricularius* (Sakalauskaite et al., 2020), kopalnymi koralowcami z gatunku *Orbicella annularis* datowanymi na plejstocen (Drake et al., 2020), czy kośćmi mamuta *Mammuthus primigenius* również datowanymi na erę plejstocenu (około 43 000 lat temu) (Cappellini et al., 2012). W badaniach kopalnych otolitów *Gadidulus argenteus* podjętych w tej pracy zidentyfikowano dwa białka niewątpliwie związane z biomineralizacją otolitów, niestety nie otoliny-1. Pracę zamykają badania nad otolitami *Cyprinus carpio*, będące kontynuacją badań prowadzonych już wcześniej w Laboratorium przez dr inż. Martę Kalkę (niepublikowane). W tej części skupiono się na globalnej analizie zidentyfikowanych białek oraz poszukiwaniu potencjalnych izoform otoliny-1.

Wykonane w trakcie pracy badania pogłębiły wiedzę o otolinie-1 jako białku aktywnie uczestniczącym w biomineralizacji węglanu wapnia. Poniżej przedstawiono dyskusję wyników eksperymentalnych.

6.3. Właściwości molekularne rybiej i ludzkiej otoliny-1 – podobieństwa i różnice

Pomimo podkreślanej roli otoliny-1 w biomineralizacji otolitów i otokoniów (Thomas et al., 2019) pytania dotyczące struktury i funkcji białka pozostawały bez odpowiedzi. Wstępne analizy z użyciem spektroskopii dichroizmu kołowego oraz ultrawirowania analitycznego pokazały wspólne cechy dOtol1 i hOtol1, tym samym potwierdzając wcześniej zaobserwowane podczas analiz bioinformatycznych podobieństwa. Spektroskopia CD wykazała, że oba białka wykazują podobieństwa w strukturze drugo- i trzeciorzędowej. Ze względu na budowę domeną otoliny-1 charakterystyczną dla białek z rodziny C1q, widma CD dOtol1 i hOtol1 są wypadkową struktur domeny podobnej do kolagenu oraz domeny globularnej C1q. W wyniku dekonwolucji widma z użyciem programu CDNN, wykazano, że około 26-28% białka stanowią struktury β , główny element domeny C1q oraz struktury zakwalifikowane jako "przypadkowe" lub "inne" (38-39%). Ze względu na podobieństwo widm CD helisy poliprolilowej, potrójnej helisy kolagenowej oraz konformacji kłęбка statystycznego (Fasman, 2013), na konformację dOtol1 i hOtol1

najprawdopodobniej przypadają udziały tych struktur, niezależnie od struktury β . Widmo CD w zakresie bliskiego ultrafioletu cechuje się szerokim pasmem przejścia pomiędzy 350-240 nm, które może być rezultatem obecności mostków disiarczkowych w domenie NC-N', jak również sporą obecnością reszt aromatycznych w białkach.

Białka z rodziny C1q tworzą oligomery wysokiego rzędu, które ze względu na globularne głowy C1q i domeny kolagenopodobne przypominają kształtem bukiet kwiatów (Kishore, 2000). Adiponektyna, wielofunkcyjne białko hormonalne zaangażowane w szereg procesów metabolicznych należy do białek z rodziny C1q. Występuje w formie oligomerów różnych rzędów (Bobbert et al., 2005). Otolina-1 posiada również elementy charakterystyczne dla białek z rodziny C1q. Jej zdolność do oligomeryzacji została zauważona już na etapie oczyszczania. Eksperymenty z użyciem sieciowania chemicznego wykazały, że białko współwystępuje w wielu formach oligomerycznych. Szczegółowe badania z użyciem ultrawirowania potwierdziły te przypuszczenia i rzuciły więcej światła na proces oligomeryzacji. hOtol1 tworzy oligomery wyższych rzędów niż dOtol1, które wydają się być mniej podatne na działanie warunków środowiska. Obydwa białka odbiegają kształtem od sferycznego. Rzędowość oligomerów dOtol1 i hOtol1 w obecności czynnika redukującego mostki disiarczkowe (2-merkaptoetanolu) zmniejsza się, co sugeruje istotną rolę reszt Cys w utrzymaniu struktury oligomerów. W porównaniu do innych białek z rodziny C1q, otolina-1 również posiada zachowany w toku ewolucji ciąg powtórzeń reszt cysteinyłowych w domenie NC-N', który odpowiada za scalanie trimerów białka w heksamery i w struktury wyższego rzędu.

Tworzone przez otolinę-1 oligomery wysokiego rzędu, przekraczające 300 kDa były argumentem przemawiającym za powodzenie obrazowania białka z użyciem CryoEM. W literaturze można znaleźć prace dotyczące obrazowania NS-TEM adiponektyny - białka o masie około 30 kDa (Pascolutti et al., 2020; Radjainia et al., 2008; Suzuki et al., 2007; Tsao, 2014) oraz zdjęcia EM mysiej otoliny-1 (Moreland et al., 2014). Otrzymane obrazy oraz wysokorozdzielcze klasy 2D adiponektyny były dodatkowym argumentem przemawiającym za podjęciem badań CryoEM. Ze względu na uzyskanie czasu pracy w centrum Solaris (Kraków) na wysokiej kasy mikroskopie Titan Krios G3i na podstawie wniosku, została podjęta próba obrazowania otoliny-1 techniką mikroskopii krioelektronowej. Przedstawiona w pracy klasa 3D najprawdopodobniej odpowiada fragmentowi C-końca białka. Wymiary uzyskanej klasy oraz nałożenie dwóch modeli trimerów dOtol1 uzyskanych na drodze modelowania molekularnego (Bielak et al., 2022), przemawiają za hipotezą, że uzyskana klasa 3D odpowiada części heksameru, wpisującemu się w strukturę oligomerów białek należących do rodziny C1q. Oligomery te przypominają bukiet kwiatów, gdzie domena podobna do kolagenu reprezentuje łodygi, natomiast domena C1q - kwiaty. Niemniej, ograniczone powodzenie tej części badań, może być przypisane prawdopodobnej swobodzie konformacyjnej oligomerów wyższych rzędów zawdzięczanej domenie kolagenowej białka (Tsao, 2014).

Rozwinięciem badań nad strukturą i właściwościami otoliny-1 były eksperymenty dotyczące wpływu jonów wapnia, które naturalnie występują w endolimfie ucha wewnętrznego, u ryb w stężeniu ok. 2 mM (Payan et al., 1999). Jony wapnia zostały zlokalizowane w płaszczyźnie trimeryzacji domeny C-końcowej białka C1q (Gaboriaud et al., 2003), a ich znaczący wpływ na strukturę domeny C1q otoliny-1 *Danio rerio* i *Homo sapiens* został zbadany (Hołubowicz et al., 2017). Ze względu na obecność domeny podobnej do kolagenu, zachowanie otoliny-1 pełnej długości mogło być inne. Przeprowadzone analizy zmian struktury drugo-, trzecio- i czwartorzędowej białka w obecności jonów wapnia, oraz w próbkach ich pozbawionych poprzez chelatowanie przez EDTA, wykazały stabilizujący wpływ jonów na oligomeryzację białka, przy czym nie zaobserwowano znaczących zmian w strukturze drugo- i trzeciorzędowej.

Jony wapnia stabilizują termicznie otolinę-1. W ich nieobecności, temperatura przejścia zarówno dla dOtol1 jak i hOtol1 wynosi ok. 42 °C. W obecności jonów wapnia białko ulega stabilizacji - niskie stężenie jonów wapnia wywiera znaczący wpływ na przesunięcie temperatury przejścia dla homologa ludzkiego (68,1°C dla 0,1 mM Ca²⁺), ale efekt stabilizujący zachodzi zarówno dla dOtol1 jak i hOtol1 już przy stężeniach jonów wapnia zbliżonych do fizjologicznych 0,1-1 mM (Ferrary et al., 1988; Takagi, 2002). Co interesujące, obydwie białka wykazują dwa przejścia, co jest charakterystyczne dla białek o budowie domenowej lub oligomerycznej. Wykorzystane metody spektroskopowe nie do końca potwierdziły wcześniej zaobserwowanego wpływu stabilizującego jonów wapnia. Niemniej, w przypadku dOtol1, brak jonów wapnia wpłynął na przesunięcie minimum widma CD z 205 nm do 210 nm. W porównaniu do hOtol1, dOtol1 posiada więcej reszt prolinowych w sekwencji domeny podobnej do kolagenu, przez co przesunięcie to może być związane z usunięciem jonów wapnia oddziałujących z resztami Pro, zdefiniowanych jako miejsca oddziaływania z jonami wapnia dla syntetycznych peptydów posiadających motyw Gly-X-Y (Fasman, 2013; Renugopalakrishnan et al., 1981).

Pomimo znikomego wpływu jonów wapnia na strukturę drugo- i trzeciorzędową otoliny-1, zbadano jej wpływ na tworzenie oligomerów wyższego rzędu. Obrazy TEM adiponektyny pokazały, że oligomery wyższych rzędów wykazują pewną swobodę konformacyjną (Tsao, 2014). Wstępne obserwacje z użyciem analitycznego sączenia molekularnego pokazały, że w przypadku dOtol1 dochodzi do zmiany proporcji między oligomerami wyższych rzędów, a niższych w zależności od obecności jonów wapnia. W przypadku hOtol1 nie zaobserwowano takiej zależności. Kontynuując te badania, zauważono, że oligomeryzacja dOtol1 jest zależna od obecności jonów wapnia i stężenia białka, natomiast hOtol1 pozostaje względnie niezależna od tych czynników. Zależność współczynnika tarcia f/f_0 i stałej sedymentacji $\overline{s_{20w}}$ od obecności jonów wapnia dla dOtol1 pokazuje, że jony wapnia pozytywnie wpływają na tworzenie oligomerów, które wraz ze wzrostem stężenia białka przybierają bardziej skompaktowany kształt. W przypadku hOtol1, $\overline{s_{20w}}$ i f/f_0 nie zmieniają się znacząco

w obecności jonów wapnia niezależnie od stężenia białka, natomiast po usunięciu jonów z roztworu, dochodzi do agregacji białka wraz ze wzrostem jego stężenia. Badanie ruchliwości białka w warunkach stałego stężenia i wzrastającego stężenia jonów wapnia wykazało, że wyższe stężenia jonów wapnia zmniejszają swobodę rotacji białka związaną ze wzrastającą wielkością cząsteczki. W przypadku hOtol1, efekt ten jest osiągnięty już przy niskim stężeniu wapnia i nie zmienia się wraz ze wzrostem ich stężenia, a co za tym idzie - wielość cząsteczki pozostaje stała.

Jony wapnia zdają się pełnić znaczącą rolę w stabilizacji oligomerów dOtol1, natomiast homolog ludzki nie jest podatny na zmiany stężeń jonów wapnia, jednak nawet niskie stężenia jonów wapnia są wystarczające by wpłynąć na hOtol1. Jony wapnia przesuwają równowagę oligomeryzacji w stronę wyższych form, usztywniają powstałe oligomery, ograniczają ich swobodę i elastyczność konformerów w porównaniu do obserwacji dotyczących oligomerów adiponektyny (Tsao, 2014).

Stabilizujący wpływ jonów wapnia lub destabilizujący efekt ich braku, na otolinę-1 pełnej długości może stanowić ważny element w etiologii chorób układu równowagi. Doniesienia z ostatnich lat łączą poziom otoliny-1 w surowicy ze schorzeniami i urazami ucha wewnętrznego, jak choroba Meniere'a czy jako rezultat mastoidektomii, operacji chirurgicznej przeprowadzanej na uchu wewnętrznym celem usunięcia wyrostka sutkowatego ucha (*processus mastoideus*) (Avallone et al., 2022; Doğan et al., 2019). Zaobserwowano również wzrost stężenia otoliny-1 w surowicy u osób w podeszłym wieku (Avallone et al., 2022). Obecność otoliny-1 w surowicy jest szeroko wykorzystywana jako marker diagnostyczny położeniowych zawrotów głowy BPPV (Irugu et al., 2021). Dodatkowo, zaburzenia gospodarki wapniowej zostały powiązane z degeneracją otokoniów (McKenna et al., 2020). W przebiegu pierwotnej nadczynności przytarczyc - schorzeniu wpływającym na metabolizm wapnia, zauważono korelację pomiędzy podwyższonym poziomem parathormonu (PTH) i jonów wapnia, a otoliną-1 w surowicy (Walker, Silverberg, 2018). Pierwotna nadczynność przytarczyc i powstająca w jej wyniku hiperkalcemia posiada wpływ na biomineralizację kości (Walker Silverberg, 2018). W jej wyniku dochodzi osteoporozy. Możliwe zatem, że wysnuta przez autorów hipoteza na temat BPPV znajduje również wytłumaczenie w wynikach przedstawionych w niniejszej pracy. Destabilizacja otoliny-1 wynikająca ze zmniejszenia stężenia jonów wapnia w uchu wewnętrznym i degeneracji otokoniów może być przyczyną BPPV, a obecność otoliny-1 w surowicy nie jest jedynie następstwem choroby. Zauważono, że u starzejących się myszy dochodzi do zmian w homeostazie potencjału redoks ucha wewnętrznego (Jiang et al., 2007). W odpowiedzi na stres oksydacyjny zaobserwowano wzmożoną glutationylację białek ze ślimaka ucha wewnętrznego (*cochlea*). Hipotetycznie, brak równowagi redoks w uchu wewnętrznym związany ze starzeniem może wpływać na rozpad oligomerów otoliny-1 i może potęgować degenerację otokoniów.

6.4. Rola otoliny-1 w bioinspirowanej mineralizacji węgla wapnia

Otolina-1 w uchu wewnętrznym *Danio rerio* zlokalizowana jest w otolicie, jak również w błonie otolitycznej i komórkach nabłonka (Murayama et al., 2002). W przebiegu badań nad bioinspirowaną mineralizacją *in vitro* wykazano, że ludzka otolina-1 posiada wpływ na morfologię powstających kryształów węgla wapnia oraz jest w stanie tworzyć heksagonalne siatki, podobnie jak białka należące do rodziny kolagenu X (Moreland et al., 2014). Otolina-1 izolowana z *Oncorhynchus mykiss* zwiększa ilość otrzymywanych kryształów kalcytu *in vitro* (Tohse et al., 2009). Uzupełnieniem doniesień dotyczących wpływu otoliny-1 na tworzenie kryształów węgla wapnia *in vitro* są badania przedstawione w niniejszej pracy.

Wyniki bioinspirowanej mineralizacji węgla wapnia przedstawione w pracy są zbieżne z dotychczasowymi doniesieniami literaturowymi na temat mineralizacji węgla wapnia w obecności otoliny-1 izolowanej z *Oncorhynchus mykiss* i ekspresjonowanej w komórkach eukariotycznych. Zmiany morfologii otrzymywanych kryształów są uzależnione od wzrastającego stężenia białka oraz jonów wapnia w mieszaninie mineralizacyjnej, a charakterystyczne odstępstwa od morfologii romboedrycznej kryształów kalcytowych zauważalne są już dla 10 mM stężenia CaCl_2 i 30 $\mu\text{g/ml}$ stężenia białka w próbie. Kryształy węgla wapnia otrzymywane w próbie podlegają anizotropowemu wzrostowi. Pojawiają się kryształy przerośnięte i wielowarstwowe, opisywane w literaturze odpowiednio *kinked-like* oraz *stepped-like* (Kristensen et al., 2004), będące podstawą powstawania nowych płaszczyzn mineralizacji wzdłuż krystalograficznej osi c (Shen et al., 2002).

Obecność dOtol1 i hOtol1 w mieszaninie mineralizacyjnej skutkuje powstaniem większej ilości mniejszych kryształów w porównaniu z warunkami kontrolnymi, podobnie jak w przypadku otoliny-1 izolowanej z otolitów *Oncorhynchus mykiss* (Tohse et al., 2009). Obserwacja fluorescencyjnie znakowanych dOtol1 i hOtol1 wzbudzonych dwufotonowo w kryształach węgla wapnia wskazuje, że białka te są wbudowywane w kryształy już na wczesnym etapie mineralizacji. Dodatkowo, dla dOtol1 oraz w niewielkim stopniu dla hOtol1, udało się zaobserwować z użyciem mikroskopu konfokalnego również akumulację białka na powierzchni kryształów. Co interesujące, rybnie białko pojawia się także w kolejnych warstwach kryształów (Rysunek 30A). Opisane powyżej obserwacje wskazują na zaangażowanie białka w proces nukleacji kryształu jako wyraz obecności białka wewnątrz kryształów oraz w kontroli ilości powstających kryształów i ich wielkości, co wskazuje na właściwości hamujące ich rozrost.

Podobny wpływ na mineralizację węgla wapnia zauważono dla kolagenu typu I (Shen et al., 2002). Autorzy zbadali metodą powolnej dyfuzji zależność morfologii otrzymywanych kryształów od stężenia izolowanego kolagenu. Podobnie jak w przypadku kryształów otrzymanych w obecności dOtol1 i hOtol1, zauważono charakterystyczne zmiany morfologiczne przypominające przerośnięte

romboedryczne kryształy kalcytowe oraz kryształy wielowarstwowe. Stężenia kolagenu używane we wspomnianej pracy przewyższają o rząd wielkości stężenia dOtol1 i hOtol1 użyte w przedstawionych eksperymentach, dla których odnotowano zmiany w morfologii kryształów. Mając to na uwadze, możliwe, że potencjał biomineralizacyjny otoliny-1, białka posiadającego stosunkowo krótką domenę kolagenową, znacznie przewyższa potencjał kolagenów pełnej długości.

Rola kolagenów w procesach mineralizacyjnych została dobrze poznana w mineralizacji m.in. kości - tkanki mineralizowanej hydroksyapatytem (Sorokina et al., 2021). Mechanizm mineralizacji fosforanu wapnia w obecności włókien kolagenu rozpoczyna się poprzez oddziaływanie jonów wapnia z łańcuchami bocznymi ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych. Analogicznie, mechanizm mineralizacji CaCO_3 w obecności dOtol1 i hOtol1 jest najprawdopodobniej zbliżony do mechanizmu mineralizacji indukowanej przez kolageny i polega na wiązaniu jonów wapnia przez reszty Pro oraz kwasowe reszty Glu i Asp, zjonizowane do COO^- w środowisku endolimfy (pH równe 7.5). Z kolei, oddziaływanie białka z powierzchnią kształtujących się kryształów przyczynia się do powstawania nowych płaszczyzn mineralizacji. Obecność białka na powierzchni kryształu ma dwójaki wpływ na jego wzrost - z jednej strony pojawienie się białka na powierzchni ogranicza dalszy wzrost danej płaszczyzny, jednak tym samym stwarza możliwość wzrostu kolejnej. Dlatego też, dOtol1 i w mniejszym stopniu hOtol1 pełnią zarówno rolę nukleatorów jak i swoistych inhibitorów wzrostu kryształów.

Właściwości hamujące wzrost kryształów w mineralizacji otolitów zostały przypisane kwasowym białkom inherentnie nieuporządkowanym, jak białku Starmaker i jego homologom (Różycka et al., 2014, 2019; Wojtas et al., 2012, 2015). W przeciwieństwie do mechanizmu inhibicji wzrostu kryształów przez Stm, gdzie białko ogranicza dostęp jonów wapnia do miejsca mineralizacji przez ich związanie, mechanizm działania otoliny-1 jest ściśle związany z interakcją z kryształem. Depozycja dOtol1 na kryształach kalcytu otrzymanych w trakcie eksperymentu jest ewidentna, w odróżnieniu od homologa ludzkiego, gdzie ilość agregatów na powierzchni kryształu jest znikoma. Odkładanie materii organicznej na kryształach węglanu wapnia zostało wcześniej przypisane funkcji ochronnej przed rozpuszczaniem warstw węglanu wapnia kokolitów - biominerałów na powierzchni kokolitoforów (Henriksen et al., 2004; Kristensen et al., 2004). Mając to na uwadze, możliwe, że odkładanie warstw dOtol1 na kryształach węglanu wapnia mogłoby pełnić podobną rolę. Hipoteza ta jest niezwykle ciekawa biorąc pod uwagę fizjologiczną różnicę pomiędzy rybimi otolitami, a ssaczymi otokoniami. Otolity podlegają ciągłemu wzrostowi i odkładaniu się nowych warstw mineralnych w trakcie życia ryby, w przeciwieństwie do otokonów, które nie rosną oraz nie podlegają regeneracji w czasie życia (Lundberg et al., 2015; Morales-Nin, 2000; Walther, Blödw, et al., 2014).

6.5. Badania proteomiczne i paleoproteomiczne otolitów *Cyprinus carpio* i *Gadiculus argenteus*

Badania proteomu otolitów służyły identyfikacji i poznaniu białek zaangażowanych w proces ich mineralizacji. W ostatnich latach zauważono wzrost zainteresowania składnikami macierzy organicznej otolitów i publikacjami na ich temat (Thomas i Swearer, 2019). Łączone badania nad transkryptomem i proteomem otolitów *Acanthopagrus butcheri* zidentyfikowały ponad 380 białek i zwróciły uwagę na dotąd nieznaną zależność między nimi. Badania otolitów *Danio rerio* zidentyfikowały białka typowe dla ich mineralizacji (Kalka et al., 2019), a ich rozszerzenie o otolity karpia po raz pierwszy pokazało białka otolitów tego gatunku (Kalka, 2020). Kontynuacją tych badań jest dokonana w niniejszej pracy analiza globalna białek zidentyfikowanych w otolitach i endolimfie *Cyprinus carpio* ze szczególnym uwzględnieniem otoliny-1.

Globalna analiza zidentyfikowanych białek wykazała, że frakcja białek nierozpuszczalnych, rozpuszczalnych oraz białka obecne w endolimfie różnią się pod kątem ich zaangażowania w procesy biologiczne. W puli białek zidentyfikowanych w osadzie najbardziej charakterystyczne są białka związane z regulacją estryfikacji i transportu cholesterolu, fosfolipidów oraz tworzenia cząsteczek lipoprotein. Do tej pory nie opisano wpływu pochodnych lipidów i cholesterolu na wzrost otolitów i otokoniów. Jedynie w wyniku badań proteomicznych zidentyfikowano apolipoproteinę A1 w otolitach *Danio rerio* (Kalka et al., 2019) i w kości mątwy *Sepia pharaonis* (Liu et al., 2021). Zwiększone występowanie tej grupy białek na tle innych stawia kolejne pytania o ich rolę w procesie biomineralizacji otolitów i otokoniów. W przypadku białek frakcji rozpuszczalnej są one głównie związane z procesami mineralizacyjnymi. Endolimfa natomiast wyróżnia się wzmożonym występowaniem białek powiązanych z biosyntezą fosfokreatyny, jak również regulacją poziomu cholesterolu i lipidów oraz procesami metabolicznymi. Obecność wspomnianych białek najprawdopodobniej jest związana z pochodzeniem endolimfy wywodzącej się z surowicy. W endolimfie również zidentyfikowano obecność apolipoproteiny A1 i przypisano jej rolę ochronną błon ucha wewnętrznego (Thalman, 1999). Ciekawa natomiast jest obecność białek związanych z biosyntezą fosfokreatyny, będącej prekursorem ATP.

Białka biomineralizacyjne niezależnie od pochodzenia cechują się zachowaniem charakterystycznych elementów struktury. Liu oraz Zhang (2021) przypisali białka biomineralizacyjne do siedmiu grup: (1) o niskiej złożoności sekwencji, (2) posiadających domeny zewnątrzkomórkowe, (3) posiadających domeny immunologiczne, (4) posiadających domeny oddziałujące z polisacharydami, (5) enzymów, (6) inhibitorów proteaz oraz (7) innych białek, takich jak histony, globuliny, tubuliny itp. Większość opisanych białek mieści się w wymienionej klasyfikacji. Najczęściej występującymi domenami w białkach zarówno osadu, jak i supernatantu to domeny transferynowe

i kolagenowe. Najprawdopodobniej, białkiem posiadającym domenę transferyny jest OMP-1 - białko macierzy otolitów, które co ciekawe nie wiąże jonów żelaza, jak transferyna (Lambert, 2012). Na szczególną uwagę zasługuje natomiast domena brichos. Brichos jest charakterystyczna dla białek czaperonowych, które regulują formowanie fibryli oraz amyloidów (Chen et al., 2022). Możliwe, że białka posiadające domenę brichos mogą regulować odkładanie się macierzy organicznej w otolitach. Do tej pory można znaleźć jedno doniesienie o niescharakteryzowanym białku posiadającym tę domenę, zidentyfikowanym u ostrygi *Pinctada maxima* i zaangażowanym w biomineralizację (Whaite et al., 2022).

Badania proteomiczne zidentyfikowały otolinę-1 w otolitach *Cyprinus carpio*. Co ciekawe, w podobnych badaniach w otolitach tilapii mozambijskiej *Oreochromis mossambicus* nie stwierdzono obecności szeregu białek biomineralizacyjnych charakterystycznych dla innych gatunków, ale wśród 8 zidentyfikowanych białek ucha wewnętrznego były otolina-1 i OMP-1 (Weigele et al., 2016). Wydaje się, że otolina-1 obecna jest międzygatunkowo z dobrze zachowaną sekwencją w toku ewolucji. Początkowo w literaturze otolina-1 była nazywana kolagenem specyficznym dla ucha wewnętrznego (*inner ear collagen*) lub kolagenem woreczka ucha wewnętrznego (*saccular collagen*) (Davis et al., 1995). W wyniku przedstawionych badań proteomicznych zidentyfikowano izoformę A otoliny-1. Sekwencje peptydowe zarejestrowane dla otolitów *Cyprinus carpio* przyporządkowano do dwóch białek hipotetycznych zidentyfikowanych na podstawie transkryptomu ryby (Kolder et al., 2016) oraz białka podobnego do kolagenu specyficznego dla ucha wewnętrznego (*Inner ear-specific collagen-like*). Ich sekwencja została przewidziana na podstawie genomu i przypisana do otoliny-1 za sprawą porównania do sekwencji białek z *Danio rerio* z użyciem narzędzia STRING. W wyniku analizy, białka te określono jako izoformy otoliny-1B z *Danio rerio*, która w bazach danych (ZFIN: otol1b, UniProt: E7FAJ7, NCBI: NP_001296385.1) występuje jako białko „przewidywane”. Izofорма B otoliny-1 została zidentyfikowana w komórkach rzęskowych przez Thiessena w doktoracie (2019), jednak informacje te nie zostały opublikowane. Możliwe, że zidentyfikowane białka hipotetyczne przez wzgląd na duże podobieństwo sekwencji do otoliny-1A z *Cyprinus carpio* i *Danio rerio*, są otoliną-1B, jednak konieczne są dalsze prace, aby potwierdzić lub zaprzeczyć tej hipotezie.

Ostatnim elementem analizy relacji struktura-funkcja otoliny-1 w biomineralizacji otolitów i otokoniów, były badania proteomiczne otolitów kopalnych. Paleoproteomika, silnie rozwijana w ostatnich latach, ma szansę odpowiedzieć na niezwykle ciekawe pytania dotyczące ewolucji organizmów, diagenety twardej tkanki, możliwości zachowania informacji biologicznej po śmierci oraz stawiać chemiczne wyzwania dotyczące m.in. stabilności wiązania peptydowego. Wbrew pozorom białka, w odróżnieniu od kwasów nukleinowych, mają czasem szansę być stabilniejszym medium kodującym nieprzerwaną informację biologiczną na podstawie sekwencji aminokwasowej

(Demarchi et al., 2016). Często powodzenie badań paleoproteomicznych nie leży w gestii eksperymentatora, tylko warunków w jakich znajdował się materiał na przestrzeni lat oraz zmianom chemicznym zachodzącym w obrębie samego białka. W badaniu porównawczym proteomu współczesnych otolitów widłaka z gatunku *Phycis phycis* oraz kopalnych z gatunku *Phycis tenuis*, datowanych na epokę miocenu, zidentyfikowano odpowiednio 132 i 11 białek. Pośród białek otolitów *Phycis tenuis* znalazły się α - i β -tektoryna, otogelina i białko jej podobne oraz białko podobne do otoliny-1. To ostatnie zostało zidentyfikowane na podstawie aż 11 peptydów, z których sekwencja jednego jest unikalna (Stolarski et al., 2023) .

Zachowanie części macierzy organicznej w badanych otolitach *Gadiculus argenteus* umożliwiło zarejestrowanie 3 peptydów i przypisanie ich do dwóch białek na podstawie podobieństwa do białek innych organizmów z gromady *Actinopterygii*. Uważa się, że największe szanse na zachowanie w materiale kopalnym biominerałów mają białka kolagenowe lub te których jest najwięcej (Wadsworth i Buckley, 2014). Wprawdzie nie udało się zidentyfikować białka kolagenowego lub jego fragmentu, jednak udało się zidentyfikować peptydy dla białka homologicznego do OMP1 o identyfikatorze RXN00013.1 oraz białka hipotetycznego podobnego do Starmaker o identyfikatorze KTF88849.1. Obydwa białka w otolitach stanowią główne części białkowej macierzy organicznej (Thomas et al., 2019). Białko OMP1 stabilizowane jest obecnością minimum 7 mostków disiarczkowych, których obecność może mieć kluczowe znaczenie na przetrwanie białka w skamieniałości (Murayama et al., 2000). Białko Starmaker natomiast posiada wysokie powinowactwo do jonów wapnia, a jego homolog funkcjonalny, Starmaker-like, jest wbudowywany do siatki krystalicznej (Różycka et al., 2019; Wojtas et al., 2012). Takie zachowanie białka również może być kluczowe dla zachowania w biominerale. Przypisanie peptydów do konkretnych białek nie oznacza obecności białka pełnej długości zachowanego w otolitach. Co więcej, zastosowana metoda analizy identyfikowanych peptydów może stanowić ograniczenie dla przypisania pozostałych do białek ryby z gatunku *Gadiculus argenteus* ze względu na brak danych w bazach. Z tego powodu wykorzystano sekwencje proteomu najbliższych krewnych z gromady *Actinopterygii*, a nie bezpośredniej bazy odnoszącej się do proteomu otolitów ryby. Możliwe, że zastosowanie zaawansowanych algorytmów bioinformatycznych pozwalających na utworzenie hipotetycznej bazy danych na podstawie m.in. genomu ryby, pozwoliłoby na uzyskanie lepszych rezultatów identyfikacji.

7. Podsumowanie i perspektywy dalszych badań

Pomimo wciąż rosnącego zainteresowania badaniami macierzy organicznej biominerałów, stan wiedzy na temat roli poszczególnych jej składników jest ograniczony. Opisane w pracy wyniki badań skupiają się na przybliżeniu roli otoliny-1 w mineralizacji węglań wapnia. Podejście zaproponowane w pracy w głównej mierze skupiało się na poznaniu właściwości molekularnych białka, jak również charakterystyki kryształów węglań wapnia otrzymywanych w obecności białka. Dodatkowo, część dotyczy badań proteomicznych otolitów *Cyprinus carpio* oraz identyfikacji białek z otolitów kopalnych. Przedstawione wyniki dla otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* spełniają rolę badań porównawczych, mogących mieć znaczenie dla zrozumienia postaw molekularnych chorób ucha wewnętrznego, a wybór *Danio rerio* potraktowany został jako model odpowiednika ludzkiego.

Głównymi osiągnięciami pracy są:

- Opracowanie wydajnej metody nadekspresji otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* w komórkach bakteryjnych i metody jej oczyszczania w postaci rozpuszczalnego i funkcjonalnego białka
- Określenie wpływu jonów wapnia na otolinę-1 oraz dokonanie analizy porównawczej homologów otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens*, w wyniku której:
 - określono tendencję otoliny-1 do tworzenia oligomerów i zaangażowania w ich stabilizację domeny N-końcowej białka; zaobserwowano, że otolina-1 z *Homo sapiens* tworzy oligomery wysokiego rzędu mniej podatne na zmiany środowiska
 - zaobserwowano pozytywny wpływ jonów wapnia na stabilizację termiczną białek oraz ich oligomeryzację; homolog ludzki wykazuje stabilność przy niższym stężeniu jonów wapnia w porównaniu do białka rybiego
 - wywnioskowano, że otolina-1 z *Homo sapiens*, w porównaniu do białka z *Danio rerio*, podlega mniejszym zmianom konformacyjnym w obecności jonów wapnia
- Zaobserwowanie otoliny-1 w postaci oligomerów wysokiego rzędu z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz uzyskanie częściowego, niskorozdzielczego modelu otoliny-1 z *Danio rerio* na podstawie obrazów uzyskanych z użyciem kriomikroskopii elektronowej.
- Określenie roli otoliny-1 w bioinspirowanej mineralizacji węglań wapnia jako czynnika nukleacyjnego oraz ukierunkowanego inhibitora wzrostu ścian kryształu poprzez:
 - obserwacje charakterystycznych zmian morfologii i populacji kryształów wzrastających w obecności białka
 - określenie dystrybucji białka w kryształach i na jego powierzchni

- Identyfikacja potencjalnych izoform otoliny-1 w otolitach *Cyprinus carpio* w oparciu o badania proteomiczne
- Identyfikacja fragmentów białka podobnego do Starmaker oraz OMP1 w otolitach kopalnych *Gadiculus argenteus*

Otolina-1 i inne składniki macierzy organicznej stanowią niezwykle ciekawy obiekt badawczy. Zaproponowane poniżej nowe kierunki badań nad rolą białek w procesie biomineralizacji oraz zadane pytania, na które wciąż brak odpowiedzi, mogą być szczególnie inspirujące dla prac prowadzonych w Laboratorium Biochemii i Biologii Molekularnej Politechniki Wrocławskiej, ze względu na doświadczenie w tematyce oraz szeroką bazę dostępnych już rekombinowanych białek biomineralizacyjnych - OMM-64 z *Oncorhynchus mykiss* (Poznar et al., 2017, 2020), Starmaker oraz pochodnych białka z *Danio rerio* (Kalka et al., 2019; Kapłon et al., 2009; Wojtas et al., 2012, 2015;), Starmaker-like z *Oryzias latipes* (Różycka et al., 2014, 2019) , DMP1 z *Homo sapiens* (Porębska et al., 2020) oraz domeny C1q otoliny-1 z *Danio rerio* i *Homo sapiens* (Hołubowicz et al., 2017, 2021a, 2021b), ale również rozwinięcie trwającej współpracy z Instytutem Paleobiologii Polskiej Akademii Nauk poprzez wspólne granty i publikacje.

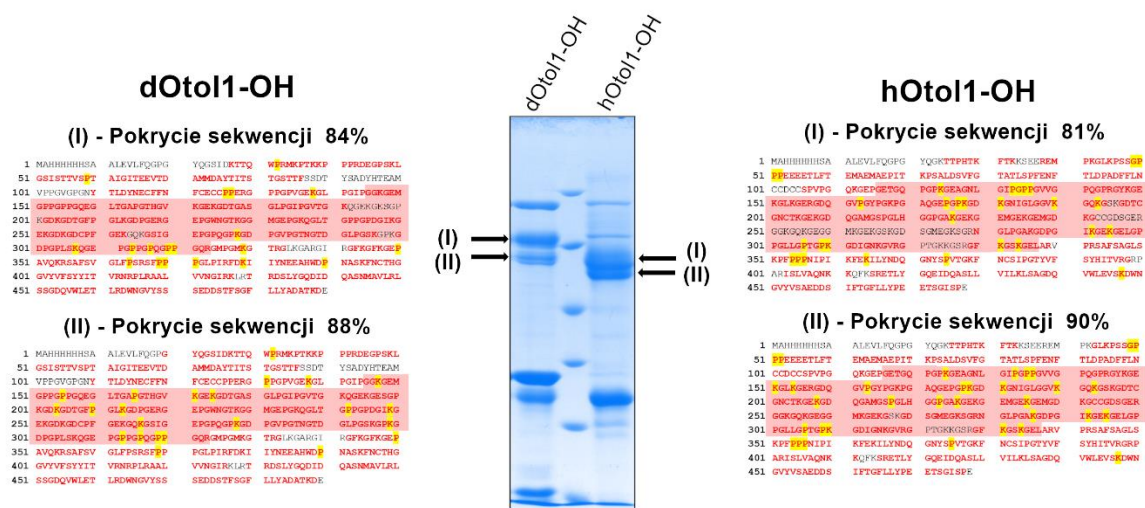
Perspektywy dalszych badań:

1. *Jaki wpływ na konformację i stabilność otoliny-1 posiadająby wprowadzenie hydroksylowych reszt prolilowych i lizylowych?*

Otolina-1 jest białkiem z centralnie położoną domeną podobną do kolagenu. Kolageny posiadają charakterystyczne powtórzenia Gly-X-Y, gdzie Y najczęściej stanowi hydroksyprolina (Gjaltema et al., 2017). Obecność grup hydroksylowych wpływa znacząco na stabilność potrójnej helisy kolagenów. Otolina-1 ekspresjonowana w systemie bakteryjnym nie posiada tej modyfikacji. Pomimo ograniczonej ilości potencjalnych miejsc hydroksylacji otoliny-1 w porównaniu do kolagenów pełnej długości (Rozdział 5.1), intrygujące jest znalezienie odpowiedzi na wyżej postawione pytanie.

Punktem wyjściowym do znalezienia odpowiedzi na to pytanie może być podejście użyte w pracy Rutschmanna i wsp. (2014), w której ludzki kolagen III został koekspresjonowany z hydroksylazami prolilową i lizylową z mimiwirusa, w wyniku czego udało się otrzymać białko hydroksylowane w komórkach bakteryjnych. Hydroksylowany kolagen charakteryzował się zwiększoną stabilnością termiczną w porównaniu do niehydroksylowanej formy białka. W trakcie realizacji pracy skontaktowano się z Thierryem Hennetem, jednym z autorów publikacji i otrzymano plazmid ekspresyjny kodujący hydroksylazę lizylową L230 i hydroksylazę-4 prolilową L593 z mimiwirusa w wektorze

pET-16b (Novagen). Podjęta próba nadekspresji białka według protokołu opisanego w wymienionej publikacji przyniosła rezultat w postaci wstępnie podczyszczonego (IMAC) preparatu dOtol1 i hOtol1 (-OH) wraz ze wprowadzonymi grupami -OH reszt proliłowych i lizyłowych, potwierdzonymi analizą z użyciem spektrometrii mas. Odtworzenie procedury zaproponowanej przez autorów napotkało trudności z powodu nieścisłości w opisie polegającej na obecności tej samej sekwencji *ori* dla obydwu wektorów ekspresyjnych. W związku z tym plazmid kodujący hydroksylazy był wybierany przez komórki częściej niż plazmid kodujący dOtol1 lub hOtol1, przez co w zależności od hodowli otrzymywano różne, niekiedy śladowe, ilości hydroksylowanej otoliny-1. Mimo wszystko, w wyniku analizy MS zidentyfikowano miejsca hydroksylacji dOtol1-OH i hOtol1-OH (Rysunek 35), chociaż część znajdowała się poza obrębem domeny podobnej do kolagenu. Prace nad koekspresją otoliny-1 wraz z hydroksylazami powinny skupić się na wypracowaniu stabilnego systemu nadekspresji białek, pozbawionego niekompatybilności plazmidów oraz regulacji specyficzności hydroksylacji.



Rysunek 35. Nadekspresja hydroksylowanej otoliny-1. Zdjęcie SDS-PAGE przedstawia preparaty otoliny-1 ekspresjonowanej wraz z hydroksylazami lizylową L230 i hydroksylazą-4 proliłową L593 z mimiwirusa, po usunięciu części zanieczyszczeń na drodze IMAC. Zaznaczone prążki zostały wycięte z żelu i przeanalizowane z pomocą LC-MS/MS w celu identyfikacji miejsc hydroksylacji. Przedstawione sekwencje posiadają zaznaczone czerwoną czcionką pokrycie identyfikacji, na żółto zaznaczono miejsca hydroksylacji. Czerwone tło odpowiada sekwencji domeny podobnej do kolagenu.

2. W jaki sposób otolina-1 oddziałuje z homologami białka Starmaker? Czy możliwe jest określenie regionów białek odpowiadających za potencjalne tworzenie płaszczyny oddziaływania?

Otolina-1 izolowana była z otolitów pstrąga tęczowego *Oncorhynchus mykiss* w postaci agregatów wraz z białkiem OMM-64, homologiem białka Starmaker (Tohse et al., 2009). W eksperymentach mineralizacyjnych *in vitro* w obecności agregatów otrzymywane były aragonitowe kryształy węgla wapnia (Tohse et al., 2009). Wynik ten wskazuje na synergiczną rolę OMM-64 i otoliny-1

w powstawaniu mniej stabilnej odmiany węgla wapnia. Z molekularnego punktu widzenia kluczowe zatem jest znalezienie odpowiedzi na postawione wyżej pytania.

W przebiegu realizacji pracy podjęto próbę badania oddziaływania otoliny-1 i Starmaker z *Danio rerio* z użyciem metody pull-down, far-Western blot, sieciowania chemicznego i termoforezy, jednak nie wykazano oddziaływania między białkami (nie pokazano). Możliwe, że wykorzystane metody nie były wystarczająco dopasowane do obiektów badawczych. Być może wykorzystanie powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, *ang. surface plasmon resonance*), czulej metody badania interakcji białko-białko, mogłoby potwierdzić, lub zaprzeczyć postawionej tezie.

3. Czy otolina-1 posiada potencjał do tworzenia odrębnej fazy z roztworu?

Separacja faz jest zjawiskiem, w którym białka i inne molekuly są w stanie wytworzyć osobną fazę z medium, w którym się znajdują (Boeynaems et al., 2018). Zjawisko to jest szczególnie badane w kontekście bezbłonowych organelli. W wyniku analiz bioinformatycznych zauważono wysoki potencjał białek biomineralizacyjnych do separacji (Tarczewska et al., 2022). W trakcie wielokrotnie powtarzanych procesów oczyszczania dOtol1 zaobserwowano, że podczas zagęszczania roztworu po elucji z IMAC do wyjątkowo małych objętości, preparat po pierwszym etapie przechodził w żel. Możliwe, że dOtol1 w warunkach wysokiej siły jonowej i wysokiego zagęszczenia może ulegać zjawisku separacji faz. Mając na uwadze rolę otoliny-1 w mineralizacji węgla wapnia, jej tendencja do formowania osobnej fazy jest niezwykle intrygująca, szczególnie w odniesieniu do wstępnych etapów krystalizacji i amorficznych form CaCO₃ (PILP oraz ACC).

4. Czy otolina-1 wykazuje powinowactwo do lipidów?

W odniesieniu do wyników proteomicznych, wartym uwagi jest powiązanie zaangażowania białek z rodziny C1q w możliwość oddziaływania z lipidami (Ye et al., 2020), szczególnie w kontekście zidentyfikowanej wcześniej w otolitach *Danio rerio* apolipoproteiny A (Kalka et al., 2019) oraz wyróżniającej się obecności białek zaangażowanych w procesowanie cholesterolu i lipidów w populacji białek izolowanych z otolitów. Możliwość wiązania lipidów przez otolinę-1 może stanowić dodatkowy element roli białka w procesach mineralizacyjnych. Ciekawym podejściem byłoby przeanalizowanie produktów oddziaływania szeregu lipidów z białkiem za pomocą m.in. spektrometrii mas.

8. Spis rysunków i tabel

Rysunek 1. Biomineralizacja i jej zastosowanie.	13
Rysunek 2. Różnorodne formy biominerałów.....	14
Rysunek 3 Procesy zarodkowania i wzrostu kryształów węglanu wapnia.	15
Rysunek 4. Schemat ucha wewnętrznego.....	24
Rysunek 5 Porównanie morfologii otolitów oraz otokoniów.....	25
Rysunek 6. Porównanie sekwencji otoliny-1 z różnych gatunków.....	29
Rysunek 7. Budowa domenowa białek z nadrodziny C1q.....	30
Rysunek 8. Model in silico fragmentu trimeru otoliny-1.	31
Rysunek 9. Mapa plazmidu pQE-80L.....	38
Rysunek 10. Schemat układu eksperymentalnego systemu powolnej dyfuzji.	53
Rysunek 11. Analizy bioinformatyczne porównujące otolinę-1 z <i>Danio rerio</i> i <i>Homo sapiens</i>	59
Rysunek 12. Schemat otrzymanych białek rekombinowanych.....	60
Rysunek 13. Etapy procesu oczyszczania dOtol1.	61
Rysunek 14. Etapy oczyszczania hOtol1.....	62
Rysunek 15. Widma CD dOtol1 i hOtol1.	63
Rysunek 16. Wynik reakcji sieciowania dOtol1 i hOtol1 czynnikiem BS ³	65
Rysunek 17 Profile sedymentacji otoliny-1 uzyskane w wyniku eksperymentu SV-AUC.....	66
Rysunek 18. Wynik obrazowania dOtol1 (A) oraz hOtol1 (B) z użyciem NS-TEM.....	69
Rysunek 19. Wybrana klasa 3D fragmentu dOtol1 uzyskana za pomocą obrazowania CryoEM.....	70
Rysunek 20. Krzywe denaturacji termicznej otoliny-1.....	72
Rysunek 21 . Wpływ jonów Ca ²⁺ na otolinę-1 – widma CD.....	73
Rysunek 22. Widma emisji fluorescencji wewnętrznej otoliny-1.	74
Rysunek 23. Widma emisji fluorescencji ANS w obecności otoliny-1.....	75
Rysunek 24. Profile elucji otoliny-1 z kolumny Superdex 200 Increase.....	76
Rysunek 25. Zestawienie wyników pomiarów parametrów hydrodynamicznych otoliny-1.	78
Rysunek 26. Zdjęcia SEM kryształów węglanu wapnia uzyskanych z eksperymentów biomineralizacji in vitro.	81
Rysunek 27. Analiza średnich rozmiarów (A) i liczby (B) kryształów węglanu wapnia.	82
Rysunek 28. Widma mikro-Ramana wybranych kryształów węglanu wapnia.....	82
Rysunek 29. Kryształy węglanu wapnia otrzymane w różnych przedziałach czasowych.....	83
Rysunek 30. Zdjęcia przekroju kryształów węglanu wapnia uzyskane z pomocą mikroskopii fluorescencyjnej wzbudzonej dwufotonowo..	84
Rysunek 31. Zdjęcia CLMS kryształów węglanu wapnia..	85
Rysunek 32. Wynik czyszczenia otolitów <i>Cyprinus carpio</i>	86
Rysunek 33. Zdjęcia żeli SDS-PAGE macierzy otolitów.	87
Rysunek 34. Wykres Venna dla białek zidentyfikowanych w otolitach <i>Cyprinus carpio</i>	89
Rysunek 35. Nadekspresja hydroksylowanej otoliny-1.....	107
Rysunek 36. Porównanie sekwencji otoliny-1 z <i>Danio rerio</i> (UniProt A5PN28) i <i>Homo sapiens</i> (UniProt A6NHN0).....	114
Rysunek 37. Wykres przebiegu ultrawirowania analitycznego próbki dOtol1 o stężeniu 1,0 mg/ml jako rozkład stężenia białka wzdłuż kuwety..	115
Rysunek 38. Modele 3D otoliny-1 otrzymane w trakcie analizy danych z CryoEM.	116
Rysunek 39. Zdjęcia 2PEFM kontrolnych kryształów węglanu wapnia.....	118

Tabela 1 Przykłady biominerałów.....	17
Tabela 2. Główne składniki białkowe macierzy otolitów i otokoniów.	28
Tabela 3. Spis odczynników używanych do wykonania eksperymentów przedstawionych w pracy....	36
Tabela 4. Spis zestawów komercyjnych używanych do pracy z kwasami nukleinowymi.....	38
Tabela 5. Startery użyte do PCR oraz sekwencjonowania.....	39
Tabela 6 Genotypy bakterii użytych podczas realizacji pracy	39
Tabela 7 Skład żeli SDS-PAGE	41
Tabela 8. Lista standardowych technik używanych w pracy z DNA i białkami.....	43
Tabela 9. Współczynniki absorpcji i molowy współczynnik ekstynkcji dOtol1 i hOtol1.....	44
Tabela 10. Wynik dekonwolucji widm CD dOtol1 i hOtol1..	64
Tabela 11. Podsumowanie parametrów uzyskanych w wyniku eksperymentu SV-AUC.	67
Tabela 12. Wartości temperatury przejścia wyznaczone na podstawie krzywych denaturacji dOtol1 oraz hOtol1.....	72
Tabela 13. Peptydy zidentyfikowane w wyniku analizy proteomu macierzy kopalnych otolitów Gadiculus argenteus.	88
Tabela 14. Otolina-1 i jej potencjalne izoformy zidentyfikowane w otolitach Cyprinus carpio.	91
Tabela 15. Macierz podobieństwa sekwencji aminokwasowych otoliny-1 z Cyprinus carpio i jej potencjalnych izoform.....	91
Tabela 16. Podsumowanie parametrów uzyskanych w wyniku eksperymentu SV-AUC w obecności jonów wapnia i EDTA.	117

9. Dorobek naukowy

1. Publikacje

w czasopismach z wykazu MEiN posiadających Impact Factor

1. **Bielak, K.**, Benkowska-Biernacka, D., Ptak, M., Stolarski, J., Kalka, M., Ożyhar, A., Dobryczycki, P., (2023), *Otolin-1, an otolith- and otoconia-related protein, controls calcium carbonate bioinspired mineralization*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1867(5), 130327; **IF: 4,011; MEiN: 100**
2. Tarczewska, A., **Bielak, K.**, Zoglowek, A., Sołtys, K., Dobryczycki, P., Ożyhar, A., Różycka, M. (2022). *The Role of Intrinsically Disordered Proteins in Liquid–Liquid Phase Separation during Calcium Carbonate Biomineralization*. *Biomolecules*, 12(9), 1266.; **IF: 6,064; MEiN: 100**
3. **Bielak, K.**, Hołubowicz, R., Zoglowek, A., Żak, A., Kędzierski, P., Ożyhar, A., Dobryczycki, P. (2022). *N'-terminal-and Ca²⁺-induced stabilization of high-order oligomers of full-length Danio rerio and Homo sapiens otolin-1*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 1032-1047.; **IF: 8,025; MEiN: 100**
4. **Bielak, K.**, Różycka, M. O., Zoglowek, A., Ożyhar, A., Dobryczycki, P. (2021). *Counter-Diffusion System as an in Vitro Model in the Investigation of Proteins Involved in the Formation of Calcium Carbonate Biominerals*. *Crystal Growth Design*, 21(3), 1389-1400. **IF: 4,01; MEiN: 100**

Inne

1. Tarczewska, A., **Bielak, K.**, Zoglowek, A., Sołtys, K., Dobryczycki, P., Ożyhar, A., Różycka, M. (21.09.2022). *Role of Proteins and Divalent Ions in LLPS*. W *Encyclopedia*. <https://encyclopedia.pub/entry/27410>
2. Różycka, M.O., **Bielak, K.**, Ptak, M., Jost, B., Rodriguez, G.M., Schoelkopf, J., Stolarski, J., Dobryczycki, P., Ożyhar, A. *The effect of gel exposition on calcium and carbonate ions determines the Stm-I effect on the crystal morphology of calcium carbonate*, publikacja przesłana do redakcji *Biomaterials Advances* (2023)

2. Doniesienia konferencyjne

Konferencje o zasięgu międzynarodowym

1. **Bielak, K.**, Różycka, M., Zoglowek, A., Ożyhar, A., Dobryczycki P., *Counter-diffusion system as an in vitro calcium carbonate biomineralization method.*, ChemBiotIC, Chemistry Biotechnology International Conference, **24-25.06.2021**, Wrocław, *doniesienie w postaci posteru*

2. Kazimierz M., **Bielak K.**, Zoglowek A., *The preparation of DNA vector for the expression of the zebrafish protein omp-1 in a bacterial system.* ChemBiotIC, Chemistry Biotechnology International Conference, **24-25.06.2021**, Wrocław, *doniesienie w postaci posteru*
3. **Bielak, K.**, Hołubowicz, R., Zoglowek, A., Dobryczycki, P., *Biochemical characterization of short collagen-like otolin-1 involved in otoliths and otoconia formation*, 20th Young Scientist Forum oraz The 45th FEBS Congress, **15-18.06.2021** oraz **03-08.07.2021**, Chorwacja oraz Słowenia (online), *doniesienie w postaci posteru*, streszczenie w: FEBS Open Bio. 2021, vol. 11, suppl. 1, s. 169-169
4. **Bielak, K.**, Zoglowek, A., Dobryczycki, P., Preliminary view on *Danio rerio* and *Homo sapiens* otolin-1., 4th International Wrocław Scientific Meetings, **09-10.10.2020**, Wrocław, *doniesienie w postaci posteru*
5. **Bielak, K.**, Zoglowek, A., Dobryczycki, P. Otolin-1 - expression and purification of the structural protein of fish otoliths and vertebrate otoconia. 3rd Wrocław Scientific Meetings, **01-02.03.2019**, Wrocław, *doniesienie w postaci prezentacji*
6. **Bielak, K.**, Zoglowek, A., Dobryczycki, P., Otolin-1 – the expression and purification of the calcium carbonate protein-scaffold of fish otoliths and vertebrate otoconia, The 44th FEBS congress, **6-11.07.2019**, Kraków, *doniesienie w postaci posteru*, streszczenie w: FEBS Open Bio. 2019, vol. 9, suppl. 1, s. 250-250
7. **Bielak, K.**, Zoglowek, Stolarski, J., Ożyhar, A., Dobryczycki, P., Calcium carbonate crystals formation under the influence of otolithic and otoconial matrix collagen-like protein otolin-1., BIOMIN XV: 15th International Symposium on Biomineralization, **9-13.09.2019**, Monachium, Niemcy, *doniesienie w postaci posteru*

Konferencje o zasięgu krajowym

1. **Bielak K.**, Zoglowek A., Otolina-1 jest wrażliwa na obecność jonów wapnia. XIII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL 2021: "Interdyscyplinarność kluczem do rozwoju", Lublin, Fundacja na rzecz Promocji Nauki i Rozwoju TYGIEL, **2021**. s. 274-275, *doniesienie w postaci posteru*

3. Staże, szkolenia

15.04-17.07.2022

Department of Atmospheric and Oceanic Sciences, University of California, Los Angeles

Staż naukowy finansowany z projektu BioTechNan, obejmował izolację, identyfikację białek oraz analizę proteomu otolitów współczesnego *Cyprinus carpio* oraz otolitów kopalnych *Gadiculus argenteus*

29-30.09.2021: Szkolenie: Measure *binding affinities, protein stability and size with NanoTemper Technologies* (NanoTemper oraz Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław)

12-16.06.2019: Kurs: ProtXRD *Workshop on data collection and structure solving in macromolecular X-ray diffraction* (Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN oraz Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków)

4. Udział w projektach badawczych

2021 – 2023: Grant OPUS 20: Paleoproteomika otolitów ryb kopalnych, 2020/39/B/ST10/01253, Narodowe Centrum Nauki, **rola: wykonawca grantu**

5. Nagrody i stypendia

2018-2022: Stypendystka Projektu BioTechNan – Programu Interdyscyplinarnych Środowiskowych Studiów Doktoranckich KNOW z obszaru Biotechnologii i Nanotechnologii

2020 - Stypendium Federacji Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS) umożliwiające udział w 20. Forum Młodych Naukowców (20th Young Scientists' Forum)

6. Inna działalność

Członkostwo w stowarzyszeniach

2019 – 2021 – członkostwo w Stowarzyszeniu Boost Biotech Polska, związanego z szeroko pojętą biotechnologią oraz popularyzacją nauki

od 2018 – członkostwo w Polskim Towarzystwie Biochemicznym (PTBioch)

Działalność organizacyjna

2021 – organizacja międzynarodowej konferencji ChemBiotIC – Chemistry Biotechnology International Conference na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej

Inne

01.2023 – recenzowanie artykułu naukowego w czasopiśmie Scientific Reports

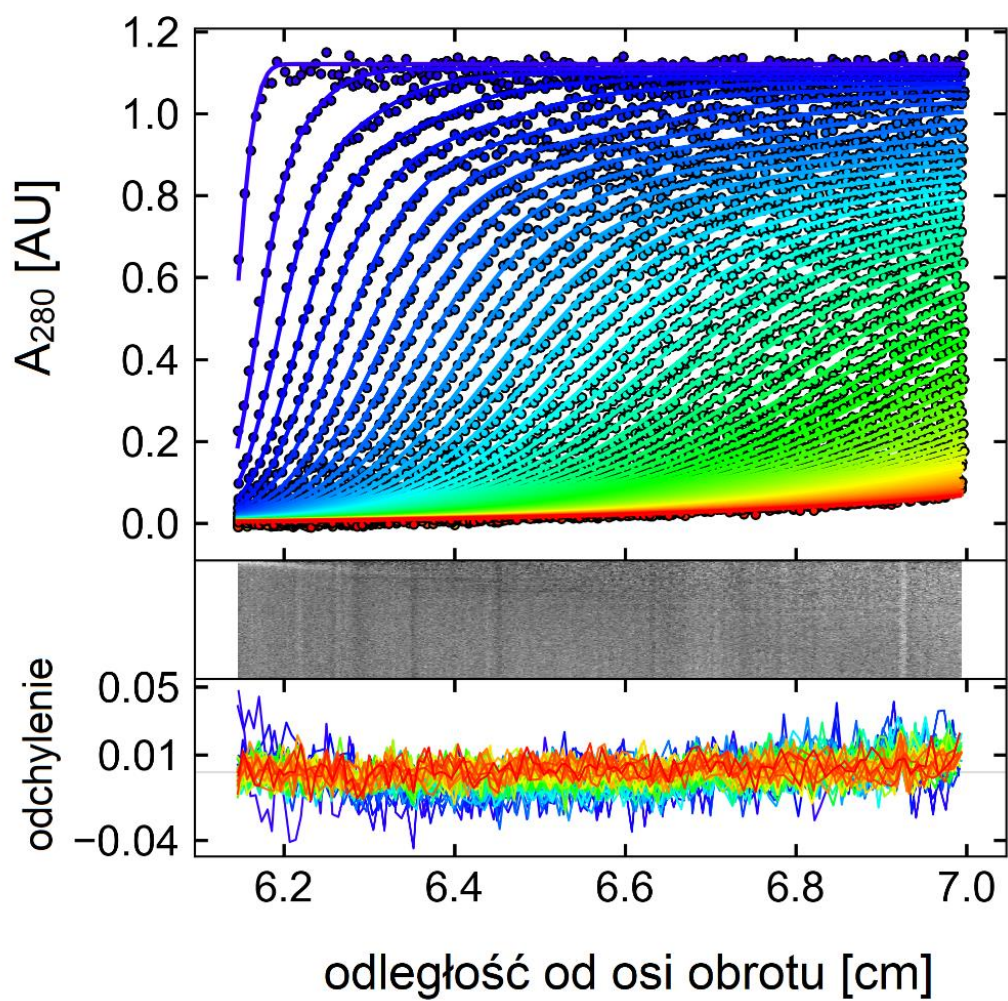
10. Dodatek

drOtolin1	--MPNILHPFIIIMTLLVVATGNQASIDKTTQWP-----RMKPTKKPPPDE	45
hsOtolin1	MWMFSQLCAIIL----AIAGMNTIAKTTPHTKFTKKSEEREMPKGLKPSSGPPPEE	55
	* . * : : * : * . . : * * * : * * * : * * * : * * * : *	
drOtolin1	GPSKLGSIISTTVSPTAIGITEEVDAMMDAYTITSTGSTTFSSDTSADYHTEAMVPPGV	105
hsOtolin1	ETL-FTEMA-----E---MAEPITKPSALDSVF-----GTATL----S	85
	: . : : * * : * * : . : * * : * : :	
drOtolin1	GPGNYTLDYNECFFNFCECCPPERGPPGPVGEKGLPGIPGGKGEKGGPPGPPQEGLTGAP	165
hsOtolin1	PFENFTLDPADFFLNCCDCCSPVPGQKGEPEGTEGQPPGKGEAGNLGIPGPPGVVGPQGP	145
	* : * * * : * : * * : *	
drOtolin1	GTHGVKGEKGDGTGASGLPGIPGVTKGQGEKGESGPKGDKGDTGFPGLKGDPPERGEKPGWN	225
hsOtolin1	GYKGEKGLKGERD---QGVPGYPGKPGAQGEKPKGDKGNIGLVGKQKGSKGDTCGN	202
	* : * * * * : *	
drOtolin1	GTKGGMGE--PGKQGLTGPPGPDGIKGE-----KGDKGDGP---FGEKQKGSIGEP	272
hsOtolin1	CTKGEKGDQAMGSPGLHGGPQAKGEKGEKGEKGEKGDGKCCGDSGERGGKQKGEKGMK	262
	* * * * : * . * * * * . *	
drOtolin1	GPQGPKGDPGVPGTNGTDGLPGSKGPKGDPGPLSKQGEPPGPPGQGPQGQRMGPMKGR	332
hsOtolin1	GEKGSKGDGSMGEGKSGRNGLPGA--KGDPGIKGEKGEKGLGPPGLLPPTGPKGDIGNKGV	319
	* : * * * * : * . * * : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * *	
drOtolin1	GLKGARGIRGFKGFKGEPVQKRSAFSVGLFPSRSFPPPLPIRFDKIIYNEEAHDPNA	392
hsOtolin1	GPTGKGSRGFKGSKGELARVPSAFSAGL--SKPFPPNIPKFEKILYNDQGNYSVPT	377
	* . * : *	
drOtolin1	SKFNCTHGGVYVFSYYITVRNRPLRAALVVGIRKLRTRDSLYGQDIDQASNMAVLRSS	452
hsOtolin1	GKFNCISPGTYVFSYHITVGRPARISLVAQNKKQFKSRETLYGQEIDQASLLVILKLSA	437
	. * * * * : * . * * * * : *	
drOtolin1	GDQVLETLRDNNGVYSSSEDDSTFSGFLLYADATKD---	489
hsOtolin1	GDQVLEVSKDNNGVYSAEDDSIFTGFLLYPEETSGISP	477
	* * * * * . : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * : * . .	

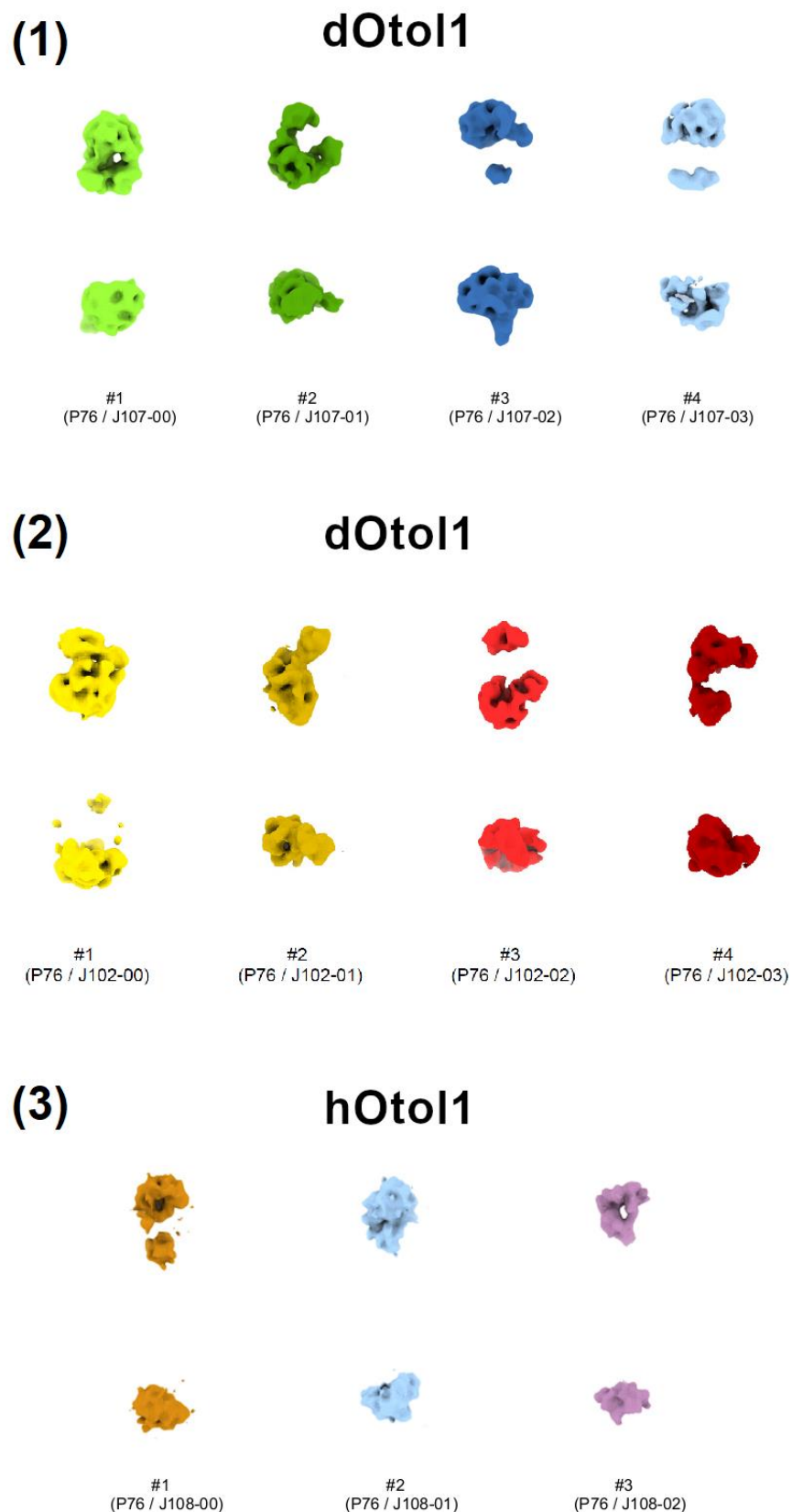
Rysunek 36. Porównanie sekwencji otoliny-1 z *Danio rerio* (UniProt A5PN28) i *Homo sapiens* (UniProt A6NHN0).

Sekwencja peptydu sygnałowego zaznaczona jest na żółto, NC-N' na jasnoszaro, domeny kolagenopodobnej na czarno, a domena C1q zaznaczona jest na ciemnoszaro. Reszty Cys z regionu NC-N' są zaznaczone na czerwono, reszty Trp na żółto,

a Pro domeny kolagenopodobnej na pomarańczowo.



Rysunek 37. Przykładowy wykres przebiegu ultrawiwrowania analitycznego próbki dOtol1 o stężeniu 1,0 mg/ml jako rozkład stężenia białka wzdłuż kuwety. Skany oznaczono kolorami od niebieskiego (początek) po czerwony (koniec wirowania).



Rysunek 38. Modele 3D otoliny-1 otrzymane w trakcie analizy danych z CryoEM. Przedstawione mapy gęstości elektronicznej zostały uzyskane po odrzuceniu klas 2D białek stanowiących zanieczyszczenie.

Dodatek

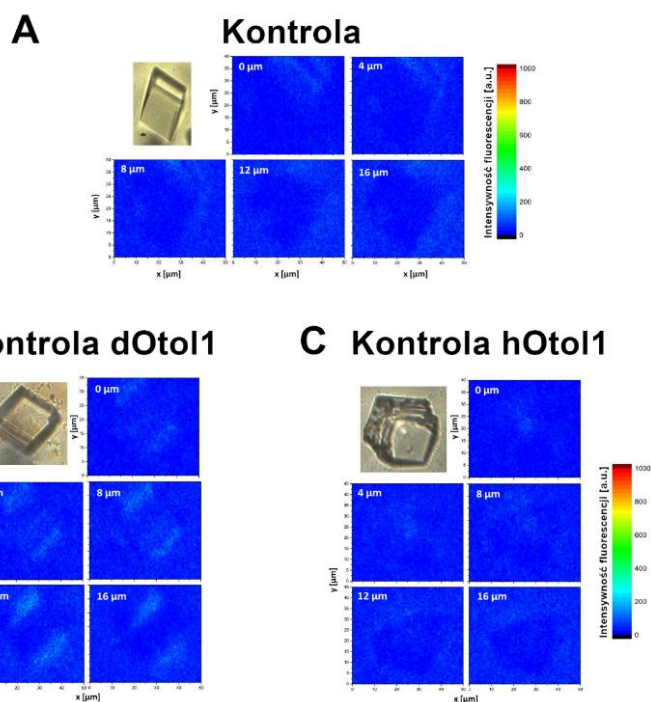
Tabela 16. Podsumowanie parametrów uzyskanych w wyniku eksperymentu SV-AUC w obecności jonów wapnia i EDTA.

Parametry zostały pogrupowane ze względu na badane białko, jego stężenie oraz obecność czynnika redukującego.

MW_{sv} – masa cząsteczkowa obiektu oszacowana na podstawie danych eksperymentalnych, Sygnał – procent oligomeru odniesieniu do całości, s – współczynnik sedimentacji, \overline{s}_{20w} - uśredniony współczynnik sedimentacji skorygowany o wodę, f/f_0 – współczynnik tarcia, RMSD – wartość średniej kwadratowej błędów

dOtol1							
PRÓBKA	Cbiałko [mg/ml]	MW_{sv} [kDa]	SYGNAŁ [%]	s [S]	\overline{s}_{20w} [S]	f/f_0	RMSD
10 mM EDTA	0,2	31,47	15,8	1,4	4,95	2,03	0,0047
		94,03	51,3	2,9			
		377,93	1,2	7,32			
		615,2	1,4	10,12			
	0,5	29,33	13,3	1,33	5,24	2,03	0,0053
		66,56	23,3	2,3			
		105,09	21,4	3,12			
		198,27	10,7	4,77			
		428,62	1,1	7,97			
		637,29	1,2	10,38			
	1	30,16	11,5	1,36	5,75	2,03	0,0073
		69,02	18,2	2,36			
		106,38	20,3	3,14			
		180,58	9,8	4,48			
		295,88	2,1	6,22			
		432,52	1,4	8,01			
656,63		1,6	10,58				
942,63		1	13,47				
10 mM Ca ²⁺	0,2	32,88	11,8	1,25	6,16	2,36	0,0052
		78,55	11,8	2,24			
		178,22	24,9	3,86			
		682,23	2,6	9,45			
	0,5	29,32	10,2	1,25	6,47	2,18	0,0067
		71,52	11,1	2,27			
		158,73	23,4	3,86			
	1	379,05	4,2	6,9	7,1	2,03	0,0113
		27,69	9	1,3			
		69,09	9,9	2,38			
		200,23	26,9	4,84			
			633,27	2,4	10,43		

hOtol1							
PRÓBKA	Cbiałko [mg/ml]	MW _{SV} [kDa]	SIGNAL [%]	s [S]	$\overline{s_{20w}}$ [S]	f/f ₀	RMSD
10 mM EDTA	0,2	132,54	83,9	4,31	6,89	1,69	0,0047
		474,95	6,4	10,09			
		819,17	4,9	14,51			
	0,5	125,61	86,7	4,61	7,72	1,52	0,0049
		418,25	7	10,28			
		697,89	4,6	14,47			
	1	134,35	82,7	4,9	7,78	1,5	0,0056
		393,79	9,3	10,03			
		694,93	0,1	14,65			
10 mM Ca ²⁺	0,2	88,741	53,9	3,28	6,77	1,72	0,0045
		202,93	27,6	5,69			
		425,49	9,4	9,33			
	0,5	805,34	5,1	14,27	6,92	1,72	0,0049
		135,22	80,2	4,33			
		455,71	8,9	9,74			
	1	850,72	5,2	14,77	7,08	1,74	0,0059
		92,248	44,4	3,31			
		251,99	48,8	6,48			
		787,98	5,2	13,85			



Rysunek 39. Zdjęcia 2PEFM kontrolnych kryształów węgla wapnia. Kryształy wzrastały w obecności 250 nM wolnego barwnika ATTO-488 NHS (A) oraz 150 µg/ml nieznakowanej dOtol1 (B) lub hOtol1 (C) w roztworze 25 mM CaCl₂. Wartości w µm oznaczają wysokości próbek, na których wykonano skany.

Dodatek

Sekwencje otoliny-1 i białek homologicznych zidentyfikowanych w otolitach karpia. Kolorem czerwonym zaznaczono fragmenty sekwencji aminokwasowej odpowiadające domenie potrójnej helisy kolagenowej, natomiast na żółto zaznaczono domeny C1q (na podstawie analizy z użyciem InterProScan).

>XP_042626436.1 otolin-1-A

```
121 YSTDYHTEAM VPPGVGPGNY TLDYNECFN FCECCPPERG PPGLVGEKGL PGIPGEKGEI
181 GPPGPPGQDG LTGAPGPHGG KGEKGDGPGVS GLPGIPGVGT KQGEKEMGL KGDKGDTGLM
241 GLKGDGDRG EPGWNGTKGE VGEPIQGAA GPPGPDGTKG EKGDKGDCPF GEKQKGSMSG
301 EPGPQGPQGD MGVPGLNGTD GLPGAQPKG DPGPQKQGE PGPPGPHGPP GQRGMPGKMG
361 TRGLKGARGV RGFKGLKGEP AVQKRSAFSV GLFPSRSFPP PGLPIKFDKI IYNEEGHWDP
421 HASKFNCTHG GVVVFSYYIT VRNRPLRAAL VVNGIRKLRT RDSLYGQDID QASNMAVLRL
481 SSGDQVWLET LRDWNGVYSS SEDDSTFSGF LLYADATKD
```

>KTF91234.1 hypothetical protein cypCar_0002286

```
1 MAEPRLVPTR RQDGSHTAY NTSGSPVANP TETRSPARYG TPTQNGGNFR PLKPYLLFLY
61 RQKMGMIFFER ALFITVIALT FINLCDTIK TQRPKYQYTK KPPRELVQTT VYVGKPTVTA
121 RIVDFTKTRE RFPVHVTEST TVPADSYIDY PTDTTASPT AKDNYTLDYN ECFYFNCECC
181 PPEKGPQGFK GDIGLSGPPG EKGAPGPKGM PGPIGPKGFS GSKGDKGEKG DQGNIGLTGY
241 PGIQKAGMK GEMGIKGEKG AAGLQGFKGS KGEKGDPNLN VSKGDQGEPE KDGQPGPQGM
301 TGEKGEKGRD GECGLLGERG QKGEPEGDPG PGVRGDPGPS GQHGMMHTPG IAGERGEPGI
361 PGAKGEPGAR GPAGVKGIRG LRGMKDRGP QGKHGDRGLQ GMKGSMSGQSG SRVRSAFSVG
421 LYPSKSFPPS GLPVRFDKVF YNGENHYDVV TSKFNCTYSG VYVFSYQITV RNKPLRASLV
481 VNGVRKVRSR DTLQGQDIDQ ASNLVILKLD VGDQVWVETL RDWNGVYSSS EDDSTFS
```

>KTG32917.1 hypothetical protein cypCar_00011378 [Cyprinus carpio]

```
1 MSFERAIFII VIALTFITLC DTIKPTQRPK YQYTKKPPRE VVQTTVYVGK PTVTARIVDY
61 TTKKERFPAH VTESTTVPAD SYIDYPTDT ASPTMAKDNY TLDYNECYFN FCECCPPEKG
121 PQGFKGDIGF PGPPGEKQAP GPKGTPGPTG PKGFTGSKGD KGEKGDQGNT GFTGSPGIQG
181 KAGMKGEMGI KGEKGAAGLP GFKGSKGEKG DPNLNVSARGD QGEPGKDGPP GPQGMTGDKG
241 EKGDRGECGL LGEQGQKGEF GDPGPPGVRG DPGPSGQHG HGTPIGAGER GEPGIPGAKG
301 EPGARGPAGV KGIRGLRGMK GDRGPQKRG DRGLRGLKGS MGQNGSRLRS AFSVGLNPSK
361 SFPPSGFPVR FDKVFYNGEH HYDIVTNKFN CTYSKPPCF SGGVECVSTFE RHL
```

>XP_042626674.1 inner ear-specific collagen-like [Cyprinus carpio]

```
1 MSFERAIFIT VIALTFITLC DTIKPTQRPK YQYTKKPPRE VVQTTVYVGK PTVTARIVDY
61 TTKKERFPAH VTESTTVPAD SYIDYPTDT ASPTTAKDNY TLDYNECYFN FCECCPPEKG
121 PQGFKGDIGL PGPPGEKQAP GPKGTPGPTG PKGFTGSKGD KGEKGDQGNT GFTGSTGIQG
181 KAGMKGEIGL KGEKGAAGFA GFKGSKGEKG DPNLNVSARGD QGEPGKDGPP GPQGMTGDKG
241 EKGDRGECGL LGEQGQKGEF GDPGPPGVRG DPGPSGQHG HGTPIGAGER GEPGIPGAKG
301 EPGARGPAGV KGIRGLRGMK GDRGPQKRG DRGLRGLKGS MGQNGSRLRS AFSVGLYPSK
361 SFPPSGFPVR FDKVFYNGEH HYDIVTSKFN CTYSGVYVFS YQITVRNKPL RASLVVNGVR
421 KVRSRDTLQG QDIDQASNLV ILKLDVGDQV WVETLRDWN VYSSSEDDST FSGFLLYPD
```

>XP_042573819.1 otolin-1-A-like [Cyprinus carpio]

```
1 MPNIVHPVIL LMALLVVTAG NQASLPKTH WPLLKPTKP VPRDEGGPPQ PPGRGLGSHPI
61 TTTVSPTASG ITEEVTDSMM DAYSTSPTDS TTYSSDAYSA DYHTEAMLPP RVGPGNYTMD
121 YNECFNFCE CCPPERPLG PVGEKGLPGI PGEKEMGPP GPPGQNGLTG AQGPHGGKGE
181 KGDPGVSGLS GISGVTGKQG EKGEMGLKGD KGDTGLIGLK GDPDRGEPG WNGTKGEVGE
241 PGIQGPAGPP GPDGIKGEKG DKGECPYGEK GQKGIMGEPG PQGPKGDMGV PGLNGTDGLP
301 GAKGSKGDPG PPGKQGEPEP PGPHGPPGQR GMPGMKTRG LKGARGVRGF KGFKGEPAVQ
361 KRSAFSVGLF PSRSFPPGL PIKFDKVIYN EEGHWDPHAS KFNCTHGGVY VFSYYITVRN
421 RPLRAALVVN GIRKLRTDS LYGQDIDQAS NMAVLRSSG DQVWLETLRD WNGVYSSSED
481 DSTFSGFLLY ADAIKD
```


11. Bibliografia

- Abelson, P. H. (1954). Organic constituents of fossils. *Carnegie Inst. Year Book*, 53, 97–101.
- Addadi, L., & Weiner, S. (1992). Control and Design Principles in Biological Mineralization. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 31(2), 153–169.
- Albeck, S., Weiner, S., & Addadi, L. (1996). Polysaccharides of Intracrystalline Glycoproteins Modulate Calcite Crystal Growth In Vitro. *Chemistry – A European Journal*, 2(3), 278–284.
- Alelign, T., & Petros, B. (2018). Kidney Stone Disease: An Update on Current Concepts. *Advances in Urology*, 2018, 3068365.
- Andrade, L. R., Lins, U., Farina, M., Kachar, B., & Thalmann, R. (2012). Immunogold TEM of otoconin 90 and otolin – relevance to mineralization of otoconia, and pathogenesis of benign positional vertigo. *Hearing Research*, 292(1), 14–25.
- Arakaki, A., Shimizu, K., Oda, M., Sakamoto, T., Nishimura, T., & Kato, T. (2015). Biomineralization-inspired synthesis of functional organic/inorganic hybrid materials: organic molecular control of self-organization of hybrids. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(4), 974–989.
- Arivalagan, J., Yarra, T., Marie, B., Sleight, V. A., Duvernois-Berthet, E., Clark, M. S., Marie, A., & Berland, S. (2017). Insights from the Shell Proteome: Biomineralization to Adaptation. *Molecular Biology and Evolution*, 34(1), 66–77.
- Athanasiadou, D., Jiang, W., Reznikov, N., Rodríguez-Navarro, A. B., Kröger, R., Bilton, M., González-Segura, A., Hu, Y., Nelea, V., & McKee, M. D. (2020). Nanostructure of mouse otoconia. *Journal of Structural Biology*, 210(2), 107489.
- Avallone, E., Schmitt, H., Lilli, G., Warnecke, A., Lesinski-Schiedat, A., Lenarz, T., & Willenborg, K. (2022). A potential serological biomarker for inner ear pathologies: OTOLIN-1. *ACTA Otorhinolaryngologica Italica*, 42, 364–371.
- Azuma, T., Ryuji, A., Hideaki, S., Kazushi, A., Long-Fei, W., & Yoshihiro, F. (2006). Spatial Localizations of Mam22 and Mam12 in the Magnetosomes of *Magnetospirillum magnetotacticum*. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 3805–3812.
- Baht, G. S., O'Young, J., Borovina, A., Chen, H., Tye, C. E., Karttunen, M., Lajoie, G. A., Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (2010). Phosphorylation of Ser136 is critical for potent bone sialoprotein-mediated nucleation of hydroxyapatite crystals. *Biochemical Journal*, 428(3), 385–395.
- Balch, W. M. (2018). The ecology, biogeochemistry, and optical properties of coccolithophores. *Annual Review of Marine Science*, 10, 71–98.
- Baxendale, S., & Whitfield, T. T. (2016). Methods to study the development, anatomy, and function of the zebrafish inner ear across the life course. *Methods in Cell Biology*, 134, 165–209.
- Beer, A. (1852). Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten. *Ann. Physik*, 162, 78–88.
- Behrens, G., Kuhn, L. T., Ubc, R., & Heuer, A. H. (1995). Raman Spectra of Vateritic Calcium Carbonate. *Spectroscopy Letters*, 28(6), 983–995.
- Beniash, E., Aizenberg, J., Addadi, L., & Weiner, S. (1997). Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 264(1380), 461–465.
- Bielak, K., Hołubowicz, R., Zoglowek, A., Żak, A., Kędzierski, P., Ozyhar, A., & Dobryszycy, P. (2022). N'-terminal- and Ca²⁺-induced stabilization of high-order oligomers of full-length *Danio rerio* and *Homo sapiens* otolin-1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 1032–1047.
- Bobbert, T., Rochlitz, H., Wegewitz, U., Akpulat, S., Mai, K., Weickert, M. O., Mohlig, M., Pfeiffer, A. F. H., & Spranger, J. (2005). Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes*, 54(9), 2712–2719.
- Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N. L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., & van den Bosch, L. (2018). Protein phase separation: a new phase in cell biology. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 420–435.
- Böhm, G., Muhr, R., & Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Engineering, Design and Selection*, 5(3), 191–195.
- Boskey, A. L. (1998). Biomineralization: Conflicts, challenges, and opportunities. *Journal of Cellular Biochemistry*, 72(S30-31), 83–91.
- Boskey, A. L., & Villarreal-Ramirez, E. (2016). Intrinsically disordered proteins and biomineralization. *Matrix Biology*, 52–54, 43–59.
- Bouropoulos, N., Weiner, S., & Addadi, L. (2001). Calcium Oxalate Crystals in Tomato and Tobacco Plants: Morphology and in Vitro Interactions of Crystal-Associated Macromolecules. *Chemistry – A European Journal*, 7(9), 1881–1888.
- Brahmi, C., Kopp, C., Domart-Coulon, I., Stolarski, J., & Meibom, A. (2012). Skeletal growth dynamics linked to trace-element composition in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 99, 146–158.
- Brodsky, B., & Persikov, A. V. B. T.-A. in P. C. (2005). Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. In *Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers* (Vol. 70, pp. 301–339). Academic Press.

Bibliografia

- Brown, P. H., & Schuck, P. (2006). Macromolecular Size-and-Shape Distributions by Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation. *Biophysical Journal*, *90*(12), 4651–4661.
- Brownlee, C., Wheeler, G. L., & Taylor, A. R. (2015). Coccolithophore biomineralization: New questions, new answers. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *46*, 11–16.
- Cai, Y., & Tang, R. (2008). Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. *Journal of Materials Chemistry*, *18*(32), 3775–3787.
- Cappellini, E., Jensen, L. J., Szklarczyk, D., Ginolhac, A., da Fonseca, R. A. R., Stafford, T. W. Jr., Holen, S. R., Collins, M. J., Orlando, L., Willerslev, E., Gilbert, M. T. P., & Olsen, J. v. (2012). Proteomic Analysis of a Pleistocene Mammoth Femur Reveals More than One Hundred Ancient Bone Proteins. *Journal of Proteome Research*, *11*(2), 917–926.
- Carey, J., & Amin, N. (2006). Evolutionary changes in the cochlea and labyrinth: Solving the problem of sound transmission to the balance organs of the inner ear. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *288*(4), 482–490.
- Chen, G., Andrade-Talavera, Y., Zhong, X., Hassan, S., Biverstål, H., Poska, H., Abelein, A., Leppert, A., Kronqvist, N., & Rising, A. (2022). Abilities of the BRICHOS domain to prevent neurotoxicity and fibril formation are dependent on a highly conserved Asp residue. *RSC Chemical Biology*, *3*(11), 1342–1358.
- Christy, A. G. (2017). A Review of the Structures of Vaterite: The Impossible, the Possible, and the Likely. *Crystal Growth & Design*, *17*(6), 3567–3578.
- Chun, Y.-H. P., Yamakoshi, Y., Kim, J.-W., Iwata, T., Hu, J. C.-C., & Simmer, J. P. (2006). Porcine SPARC: isolation from dentin, cDNA sequence, and computer model. *European Journal of Oral Sciences*, *114*(s1), 78–85.
- Davis, J. G., Oberholtzer, J. C., Burns, F. R., & Greene, M. I. (1995). Molecular cloning and characterization of an inner ear-specific structural protein. *Science*, *267*(5200), 1031–1034.
- de Paula, S. M., & Silveira, M. (2009). Studies on molluscan shells: Contributions from microscopic and analytical methods. *Micron*, *40*(7), 669–690.
- de Yoreo, J. J., & Vekilov, P. G. (2003). Principles of crystal nucleation and growth. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, *54*(1), 57–93.
- Deans, M. R., Peterson, J. M., & Wong, G. W. (2010). Mammalian Otolin: A Multimeric Glycoprotein Specific to the Inner Ear that Interacts with Otoconial Matrix Protein Otoconin-90 and Cerebellin-1. *PLOS ONE*, *5*(9), e12765.
- Demarchi, B., Hall, S., Roncal-Herrero, T., Freeman, C. L., Woolley, J., Crisp, M. K., Wilson, J., Fotakis, A., Fischer, R., Kessler, B. M., Rakownikow-Jersie-Christensen, R., Olsen, J. v, Haile, J., Thomas, J., Marean, C. W., Parkington, J., Presslee, S., Lee-Thorp, J., Ditchfield, P., ... Collins, M. J. (2016). Protein sequences bound to mineral surfaces persist into deep time. *ELife*, *5*, e17092.
- Dhami, N. K., Reddy, M. S., & Mukherjee, A. (2013). Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 314.
- Doğan, M., Şahin, M., & Kurtuluş, Y. (2019). Otolin-1, as a potential marker for inner ear trauma after mastoidectomy. *The Journal of International Advanced Otolaryngology*, *15*(2), 200.
- Drake, J. L., Mass, T., Haramaty, L., Zelzion, E., Bhattacharya, D., & Falkowski, P. G. (2013). Proteomic analysis of skeletal organic matrix from the stony coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(10), 3788–3793.
- Drake, J. L., Whitelegge, J. P., & Jacobs, D. K. (2020). First sequencing of ancient coral skeletal proteins. *Scientific Reports*, *10*(1), 19407.
- Erickson, H. P. (2009). Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online*, *11*(1), 32.
- Fairbanks, G., Steck, T. L., & Wallach, D. F. H. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, *10*(13), 2606–2617.
- Falini, G., & Fermani, S. (2017). Nucleation and growth from a biomineralization perspective. *New Perspectives on Mineral Nucleation and Growth: From Solution Precursors to Solid Materials*, 185–197.
- Fasman, G. D. (2013). *Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules*. Springer Science & Business Media.
- Fayle, S. E., Healy, J. P., Brown, P. A., Reid, E. A., Gerrard, J. A., & Ames, J. M. (2001). Novel approaches to the analysis of the Maillard reaction of proteins. *ELECTROPHORESIS*, *22*(8), 1518–1525.
- Ferguson, R. N., Edelhoch, H., Saroff, H. A., Robbins, J., & Cahnmann, H. J. (1975). Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin. *Biochemistry*, *14*(2), 282–289.
- Ferrary, E., Huy, P. T. B., Roinel, N., Bernard, C., & Amiel, C. (1988). Calcium and the inner ear fluids. *Acta Oto-Laryngologica*, *105*(sup460), 13–17.
- Ferrer, M., Chernikova, T. N., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., & Timmis, K. N. (2003). Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nature Biotechnology*, *21*(11), 1266–1267.

Bibliografia

- Frankel, R. B., & Bazylinski, D. A. (2003). Biologically induced mineralization by bacteria. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 95–114.
- Fujisawa, R., & Tamura, M. (2012). Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 17(5), 1891–1903.
- Gaboriaud, C., Juanhuix, J., Gruez, A., Lacroix, M., Darnault, C., Pignol, D., Verger, D., Fontecilla-Camps, J. C., & Arlaud, G. J. (2003). The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 46974–46982.
- Gadd, G. M., Bahri-Esfahani, J., Li, Q., Rhee, Y. J., Wei, Z., Fomina, M., & Liang, X. (2014). Oxalate production by fungi: significance in geomycology, biodeterioration and bioremediation. *Fungal Biology Reviews*, 28(2), 36–55.
- Garnero, P. (2015). The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcified Tissue International*, 97(3), 229–240.
- Gasteiger, E. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*.
- Gebauer, D., & Cölfen, H. (2011). Prenucleation clusters and non-classical nucleation. *Nano Today*, 6(6), 564–584.
- Gebauer, D., Raiteri, P., Gale, J. D., & Cölfen, H. (2018). On classical and non-classical views on nucleation. *American Journal of Science*, 318(9), 969–988.
- Gebauer, D., Volkell, A., & Colfen, H. (2008). Stable prenucleation calcium carbonate clusters. *Science*, 322(5909), 1819–1822.
- Gericke, A., Qin, C., Spevak, L., Fujimoto, Y., Butler, W. T., Sørensen, E. S., & Boskey, A. L. (2005). Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcified Tissue International*, 77, 45–54.
- Ghai, R., Waters, P., Roumenina, L. T., Gadjeva, M., Kojouharova, M. S., Reid, K. B. M., Sim, R. B., & Kishore, U. (2007). C1q and its growing family. *Immunobiology*, 212(4), 253–266.
- Gijssbers, A., Nishigaki, T., & Sánchez-Puig, N. (2016). Fluorescence anisotropy as a tool to study protein-protein interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(116), 1–9.
- Gjaltema, R. A. F., & Bank, R. A. (2017). Molecular insights into prolyl and lysyl hydroxylation of fibrillar collagens in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(1), 74–95.
- Gorski, J. P. (2011). Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 16, 2598.
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876–2890.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature*, 315(6015), 115–122.
- Henriksen, K., Young, J. R., Bown, P. R., & Stipp, S. L. S. (2004). Coccolith biomineralisation studied with atomic force microscopy. *Palaeontology*, 47(3), 725–743.
- Hołubowicz, R., Hołubowicz, R., Wojtas, M., Taube, M., Kozak, M., Ożyhar, A., & Dobryszycy, P. (2017). Effect of calcium ions on structure and stability of the C1q-like domain of otolin-1 from human and zebrafish. *The FEBS Journal*, v. 284(24), 20-4297–2017 v.284 no.24.
- Hołubowicz, R., Ożyhar, A., & Dobryszycy, P. (2021a). Molecular mechanism of calcium induced trimerization of C1q-like domain of otolin-1 from human and zebrafish. *Scientific Reports*, 11(1), 12778.
- Hołubowicz, R., Ożyhar, A., & Dobryszycy, P. (2021b). Natural Mutations Affect Structure and Function of gC1q Domain of Otolin-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16).
- Hołubowicz, R., Porębska, A., Poznar, M., Różycka, M., & Dobryszycy, P. (2015). Biomineralizacja–kontrolowana przez białka precyzja kształtu, struktury i właściwości. *Postępy Biochemii*, 61(4), 364–380.
- Hong, M., Moreland, K. T., Chen, J., Teng, H. H., Thalmann, R., & de Yoreo, J. J. (2015). Effect of otoconial proteins fetuin A, osteopontin, and otoconin 90 on the nucleation and growth of calcite. *Crystal Growth & Design*, 15(1), 129–136.
- Huang, S., & Qian, S. (2022). Advances in otolith-related protein research. *Frontiers in Neuroscience*, 16.
- Hüssy, K., Limburg, K. E., de Pontual, H., Thomas, O. R. B., Cook, P. K., Heimbrand, Y., Blass, M., & Sturrock, A. M. (2021). Trace Element Patterns in Otoliths: The Role of Biomineralization. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(4), 445–477.
- Huynh, K., & Partch, C. L. (2015). Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay. *Current Protocols in Protein Science*, 79(1), 28.9.1-28.9.14.
- Inoue, H., Ohira, T., & Nagasawa, H. (2007). Significance of the N- and C-terminal regions of CAP-1, a cuticle calcification-associated peptide from the exoskeleton of the crayfish, for calcification. *Peptides*, 28(3), 566–573.
- Irugu, D. V. K., Singh, A., Yadav, H., Verma, H., Kumar, R., Abraham, R. A., & Ramakrishnan, L. (2021). Serum otolin-1 as a biomarker for benign paroxysmal positional vertigo: a case-control study. *The Journal of Laryngology & Otology*, 135(7), 589–592.
- Jackson, A. P., Vincent, J. F. v., & Turner, R. M. (1988). The mechanical design of nacre. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 234(1277), 415–440.

Bibliografia

- Jain, G., Pendola, M., Rao, A., Cölfen, H., & Evans, J. S. (2016). A model sea urchin spicule matrix protein self-associates to form mineral-modifying protein hydrogels. *Biochemistry*, 55(31), 4410–4421.
- Jee, S. S., Kasinath, R. K., DiMasi, E., Kim, Y.-Y., & Gower, L. (2011). Oriented hydroxyapatite in turkey tendon mineralized via the polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. *CrystEngComm*, 13(6), 2077–2083.
- Jiang, H., Talaska, A. E., Schacht, J., & Sha, S.-H. (2007). Oxidative imbalance in the aging inner ear. *Neurobiology of Aging*, 28(10), 1605–1612.
- Kalka, M. (2020). *Relacja struktura - funkcja inherentnie nieuporządkowanego białka Starmaker w procesie biomineralizacji węglanu wapnia*. Politechnika Wrocławska.
- Kalka, M., Markiewicz, N., Ptak, M., Sone, E. D., Ozyhar, A., Dobryszczycki, P., & Wojtas, M. (2019). In vivo and in vitro analysis of starmaker activity in zebrafish otolith biomineralization. *The FASEB Journal*, 33(6), 6877–6886.
- Kang, Y.-J., Stevenson, A. K., Yau, P. M., & Kollmar, R. (2008). Sparc Protein Is Required for Normal Growth of Zebrafish Otoliths. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 9(4), 436–451.
- Kapłon, T. M., Michnik, A., Drzazga, Z., Richter, K., Kochman, M., & Ozyhar, A. (2009). The rod-shaped conformation of Starmaker. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(11), 1616–1624.
- Karen, G., Eva-Christina, M., Albrecht, O., Regina, R., Dietmar, L., Michael, K., Richard, R., & Dirk, S. (2004). Biochemical and Proteomic Analysis of the Magnetosome Membrane in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 1040–1050.
- Kawasaki, K., Buchanan, A. v., & Weiss, K. M. (2009). Biomineralization in Humans: Making the Hard Choices in Life. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 119–142.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119–139.
- Kishore, U., & Reid, K. B. M. (2000). C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacology*, 49(1), 159–170.
- Kniep, R. (2015). Otoconia: Mimicking a calcite-based functional material of the human body. From basic research to medical aspects. *Pure and Applied Chemistry*, 87(8), 719–736.
- Knoll, A. H. (2003). Biomineralization and Evolutionary History. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 329–356.
- Kolder, I. C. R. M., van der Plas-Duivesteyn, S. J., Tan, G., Wiegertjes, G. F., Forlenza, M., Guler, A. T., Travin, D. Y., Nakao, M., Moritomo, T., Irnazarow, I., den Dunnen, J. T., Anvar, S. Y., Jansen, H. J., Dirks, R. P., Palmblad, M., Lenhard, B., Henkel, C. v., & Spaink, H. P. (2016). A full-body transcriptome and proteome resource for the European common carp. *BMC Genomics*, 17(1), 701.
- Kristensen, R., Stipp, S. L. S., & Refson, K. (2004). Modeling steps and kinks on the surface of calcite. *The Journal of Chemical Physics*, 121(17), 8511–8523.
- Kumar, S., Natalio, F., & Elbaum, R. (2021). Protein-driven biomineralization: Comparing silica formation in grass silica cells to other biomineralization processes. *Journal of Structural Biology*, 213(1), 107665.
- Ladokhin, A. S. (2000). Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry R.A. Meyers (Ed.)*, 5762–5779.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Laipnik, R., Bissi, V., Sun, C.-Y., Falini, G., Gilbert, P. U. P. A., & Mass, T. (2020). Coral acid rich protein selects vaterite polymorph in vitro. *Journal of Structural Biology*, 209(2), 107431.
- Lambert, L. A. (2012). Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 244–255.
- Laue, T. M. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science.*, 90–125.
- Li, J., Zhang, H., Yang, C., Li, Y., & Dai, Z. (2016). An overview of osteocalcin progress. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 34(4), 367–379.
- Li, X., Zhang, D., Lynch-Holm, V. J., Okita, T. W., & Franceschi, V. R. (2003). Isolation of a Crystal Matrix Protein Associated with Calcium Oxalate Precipitation in Vacuoles of Specialized Cells. *Plant Physiology*, 133(2), 549–559.
- Li, Z., & Hirst, J. D. (2017). Quantitative first principles calculations of protein circular dichroism in the near-ultraviolet. *Chemical Science*, 8(6), 4318–4333.
- Liu, C., Ji, X., Huang, J., Wang, Z., Liu, Y., & Hincke, M. T. (2021). Proteomics of Shell Matrix Proteins from the Cuttlefish Bone Reveals Unique Evolution for Cephalopod Biomineralization. *ACS Biomaterials Science & Engineering*.
- Liu, C., & Zhang, R. (2021). Biomineral proteomics: A tool for multiple disciplinary studies. *Journal of Proteomics*, 238, 104171.
- Loh, H.-C., Divoux, T., Gludovatz, B., Gilbert, P. U. P. A., Ritchie, R. O., Ulm, F.-J., & Masic, A. (2020). Nacre toughening due to cooperative plastic deformation of stacks of co-oriented aragonite platelets. *Communications Materials*, 1(1), 77.

Bibliografia

- Lowenstam, H. A., & Weiner, S. (1989). *On biomineralization*. Oxford University Press on Demand.
- Lowry, O. H. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*, 265–275.
- Lu, W., Zhou, D., Freeman, J. J., Thalmann, I., Ornitz, D. M., & Thalmann, R. (2010). In vitro effects of recombinant otoconin 90 upon calcite crystal growth. Significance of tertiary structure. *Hearing Research*, *268*(1–2), 172–183.
- Łukowiak, M. (2020). Utilizing sponge spicules in taxonomic, ecological and environmental reconstructions: a review. *PeerJ*, *8*, e10601.
- Lundberg, Y. W., Xu, Y., Thiessen, K. D., & Kramer, K. L. (2015). Mechanisms of otoconia and otolith development. *Developmental Dynamics*, *244*(3), 239–253.
- Mann, S. (2001). *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, 5.
- Mäntele, W., & Deniz, E. (2017). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. In *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (Vol. 173, pp. 965–968). Elsevier.
- Mass, T., Drake, J. L., Haramaty, L., Kim, J. D., Zelzion, E., Bhattacharya, D., & Falkowski, P. G. (2013). Cloning and Characterization of Four Novel Coral Acid-Rich Proteins that Precipitate Carbonates In Vitro. *Current Biology*, *23*(12), 1126–1131.
- Mattson, G., Conklin, E., Desai, S., Nielander, G., Savage, M. D., & Morgensen, S. (1993). A practical approach to crosslinking. *Molecular Biology Reports*, *17*(3), 167–183.
- Matulis, D., Baumann, C. G., Bloomfield, V. A., & Lovrien, R. E. (1999). 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers*, *49*(6), 451–458.
- McKenna, K., Rahman, K., & Parham, K. (2020). Otoconia degeneration as a consequence of primary hyperparathyroidism. *Medical Hypotheses*, *144*, 109982.
- Monje, P. v., & Baran, E. J. (2002). Characterization of Calcium Oxalates Generated as Biominerals in Cacti. *Plant Physiology*, *128*(2), 707–713.
- Moradian-Oldak, J., & George, A. (2021). Biomineralization of enamel and dentin mediated by matrix proteins. *Journal of Dental Research*, *100*(10), 1020–1029.
- Morales-Nin, B. (2000). Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research*, *46*(1), 53–67.
- Moreland, K. T., Hong, M., Lu, W., Rowley, C. W., Ornitz, D. M., de Yoreo, J. J., & Thalmann, R. (2014). In vitro calcite crystal morphology is modulated by otoconial proteins Otolin-1 and Otoconin-90. *PLoS ONE*, *9*(4), 1–8.
- Murat, D., Falahati, V., Bertinetti, L., Csencsits, R., Körnig, A., Downing, K., Faivre, D., & Komeili, A. (2012). The magnetosome membrane protein, MmsF, is a major regulator of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *Molecular Microbiology*, *85*(4), 684–699.
- Murayama, E., Herbomel, P., Kawakami, A., Takeda, H., & Nagasawa, H. (2005). Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae. *Mechanisms of Development*, *122*(6), 791–803.
- Murayama, E., Okuno, A., Ohira, T., Takagi, Y., & Nagasawa, H. (2000). Molecular cloning and expression of an otolith matrix protein cDNA from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *126*(4), 511–520.
- Murayama, E., Takagi, Y., & Nagasawa, H. (2004). Immunohistochemical localization of two otolith matrix proteins in the otolith and inner ear of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: comparative aspects between the adult inner ear and embryonic otocysts. *Histochemistry and Cell Biology*, *121*(2), 155–166.
- Murayama, E., Takagi, Y., Ohira, T., Davis, J. G., Greene, M. I., & Nagasawa, H. (2002). Fish otolith contains a unique structural protein, otolin-1. *European Journal of Biochemistry*, *269*(2), 688–696.
- Nogales, E. (2018). Profile of Joachim Frank, Richard Henderson, and Jacques Dubochet, 2017 Nobel Laureates in Chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(3), 441–444.
- Nudelman, F., Lausch, A. J., Sommerdijk, N. A. J. M., & Sone, E. D. (2013). In vitro models of collagen biomineralization. *Journal of Structural Biology*, *183*(2), 258–269.
- Nudelman, F., & Sommerdijk, N. A. J. M. (2012). Biomineralization as an Inspiration for Materials Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, *51*(27), 6582–6596.
- Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M., & O'Connor, B. F. (2011). Gel-Filtration Chromatography. In D. Walls & S. T. Loughran (Eds.), *Protein Chromatography: Methods and Protocols* (pp. 25–33). Humana Press.
- Pachoensuk, T., Fukuyo, T., Rezanujjaman, M., Wanlada, K., Yamamoto, C., Maeno, A., Rahaman, M. M., Ali, M. H., & Tokumoto, T. (2021). Zebrafish stm is involved in the development of otoliths and of the fertilization envelope. *Reproduction & Fertility*, *2*(1), 7.
- Pamirsky, I. E., & Golokhvast, K. S. (2013). Silaffins of diatoms: from applied biotechnology to biomedicine. *Marine Drugs*, *11*(9), 3155–3167.
- Pascolutti, R., Erlandson, S. C., Burri, D. J., Zheng, S., & Kruse, A. C. (2020). Mapping and engineering the interaction between adiponectin and T-cadherin. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(9), 2749–2759.

Bibliografia

- Patino, M. G., Neiders, M. E., Andreana, S., Noble, B., & Cohen, R. E. (2002). Collagen: An Overview. *Implant Dentistry*, 11(3).
- Payan, P., Edeyer, A., de Pontual, H., Borelli, G., Boeuf, G., & Mayer-Gostan, N. (1999). Chemical composition of saccular endolymph and otolith in fish inner ear: lack of spatial uniformity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277(1), R123–R131.
- Pearlman, A., Rahman, M. T., Upadhyay, K., Loke, J., & Ostrer, H. (2019). Ectopic Otoconin 90 expression in triple negative breast cancer cell lines is associated with metastasis functions. *PLOS ONE*, 14(2), e0211737-.
- Pérez-Huerta, A., Coronado, I., & Hegna, T. A. (2018). Understanding biomineralization in the fossil record. *Earth-Science Reviews*, 179, 95–122.
- Petko, J. A., Millimaki, B. B., Canfield, V. A., Riley, B. B., & Levenson, R. (2008). Otoc1: A novel otoconin-90 ortholog required for otolith mineralization in zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 68(2), 209–222.
- Pfaff, C., Schultz, J. A., & Schellhorn, R. (2019). The vertebrate middle and inner ear: A short overview. *Journal of Morphology*, 280(8), 1098–1105.
- Popper, A. N., Ramcharitar, J., & Campana, S. E. (2005). Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology. *Marine and Freshwater Research*, 56(5), 497–504.
- Porębska, A., Różycka, M., Hołubowicz, R., Szewczuk, Z., Ożyhar, A., & Dobryczycki, P. (2020). Functional derivatives of human dentin matrix protein 1 modulate morphology of calcium carbonate crystals. *The FASEB Journal*, 34(5), 6147–6165.
- Poznar, M., Stolarski, J., Sikora, A., Mazur, M., Olesiak-Bańska, J., Brach, K., Ożyhar, A., & Dobryczycki, P. (2020). Fish Otolith Matrix Macromolecule-64 (OMM-64) and Its Role in Calcium Carbonate Biomineralization. *Crystal Growth & Design*, 20(9), 5808–5819.
- Poznar, M., Wojtas, M., Gapi, J., Banachowicz, E., Patkowski, A., Ożyhar, A., & Dobryczycki, P. (2017). Structural properties of the intrinsically disordered, multiple calcium ion-binding otolith matrix macromolecule-64 (OMM-64). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(August), 1358–1371.
- Prasad, M., Butler, W. T., & Qin, C. (2010). Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connective Tissue Research*, 51(5), 404–417.
- Qing, G., Ma, L.-C., Khorchid, A., Swapna, G. V. T., Mal, T. K., Takayama, M. M., Xia, B., Phadtare, S., Ke, H., & Acton, T. (2004). Cold-shock induced high-yield protein production in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(7), 877–882.
- Radjainia, M., Wang, Y., & Mitra, A. K. (2008). Structural Polymorphism of Oligomeric Adiponectin Visualized by Electron Microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 381(2), 419–430.
- Radzicka, A., & Wolfenden, R. (1996). Rates of Uncatalyzed Peptide Bond Hydrolysis in Neutral Solution and the Transition State Affinities of Proteases. *Journal of the American Chemical Society*, 118(26), 6105–6109.
- Ramshaw, J. A. M., Shah, N. K., & Brodsky, B. (1998). Gly-XY tripeptide frequencies in collagen: a context for host–guest triple-helical peptides. *Journal of Structural Biology*, 122(1–2), 86–91.
- Rao, A., Vásquez-Quitral, P., Fernández, M. S., Berg, J. K., Sánchez, M., Drechsler, M., Neira-Carrillo, A., Arias, J. L., Gebauer, D., & Cölfen, H. (2016). pH-dependent schemes of calcium carbonate formation in the presence of alginates. *Crystal Growth & Design*, 16(3), 1349–1359.
- Rappu, P., Salo, A. M., Myllyharju, J., & Heino, J. (2019). Role of prolyl hydroxylation in the molecular interactions of collagens. *Essays in Biochemistry*, 63(3), 325–335.
- Renaud, J.-P., Chari, A., Ciferri, C., Liu, W., Rémygy, H.-W., Stark, H., & Wiesmann, C. (2018). Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(7), 471–492.
- Renugopalakrishnan, V., Druyan, M., Ramesh, S., & Bhatnagar, R. S. (1981). Molecular mechanisms in the mineralization of collagen. *The Chemistry and Biology of Mineralized Connective Tissue-Developments in Biochemistry*, 22, 293–298.
- Ressl, S., Vu, B. K., Vivona, S., Martinelli, D. C., Südhof, T. C., & Brunger, A. T. (2015). Structures of C1q-like Proteins Reveal Unique Features among the C1q/TNF Superfamily. *Structure*, 23(4), 688–699.
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1).
- Roman-Naranjo, P., Gallego-Martinez, A., Soto-Varela, A., Aran, I., del Carmen Moleon, M., Espinosa-Sanchez, J. M., Amor-Dorado, J. C., Batuecas-Caletrio, A., Perez-Vazquez, P., & Lopez-Escamez, J. A. (2020). Burden of rare variants in the OTOG gene in familial Meniere's disease. *Ear and Hearing*, 41(6), 1598–1605.
- Rothan, H. A., Teh, S. H., Haron, K., & Mohamed, Z. (2012). A comparative study on the expression, purification and functional characterization of human adiponectin in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3549–3562.
- Różycka, M., Coronado, I., Brach, K., Olesiak-Bańska, J., Samoć, M., Zarębski, M., Dobrucki, J., Ptak, M., Weber, E., Polishchuk, I., Pokroy, B., Stolarski, J., & Ożyhar, A. (2019). Lattice Shrinkage by Incorporation of Recombinant Starmaker-Like Protein within Bioinspired Calcium Carbonate Crystals. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 25(55), 12740–12750.

Bibliografia

- Rózycka, M., Wojtas, M., Jakób, M., Stigloher, C., Grzeszkowiak, M., Mazur, M., & Ozyhar, A. (2014). Intrinsically Disordered and Pliable Starmaker-Like Protein from Medaka (*Oryzias latipes*) Controls the Formation of Calcium Carbonate Crystals. *PLOS ONE*, *9*(12), e114308.
- Russell, D. W., & Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.
- Rutschmann, C., Baumann, S., Cabalzar, J., Luther, K. B., & Hennet, T. (2014). Recombinant expression of hydroxylated human collagen in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(10), 4445–4455.
- Sakagami, M. (2000). Role of osteopontin in the rodent inner ear as revealed by in situ hybridization. *Medical Electron Microscopy*, *33*, 3–10.
- Sakalauskaite, J., Marin, F., Pergolizzi, B., & Demarchi, B. (2020). Shell palaeoproteomics: First application of peptide mass fingerprinting for the rapid identification of mollusc shells in archaeology. *Journal of Proteomics*, *227*, 103920.
- Salt, A. N., Inamura, N., Thalmann, R., & Vora, A. (1989). Calcium gradients in inner ear endolymph. *American Journal of Otolaryngology*, *10*(6), 371–375.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675.
- Schroeter, E. R., Cleland, T. P., & Schweitzer, M. H. (2022). Deep Time Paleoproteomics: Looking Forward. *Journal of Proteome Research*, *21*(1), 9–19.
- Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophysical Journal*, *78*(3), 1606–1619.
- Schulz-Mirbach, T., Ladich, F., Plath, M., & Heß, M. (2019). Enigmatic ear stones: what we know about the functional role and evolution of fish otoliths. *Biological Reviews*, *94*(2), 457–482.
- Schulz-Mirbach, T., & Reichenbacher, B. (2006). Reconstruction of Oligocene and Neogene freshwater fish faunas—an actualistic study on cypriniform otoliths. *Acta Palaeontologica Polonica*, *51*(2).
- Shen, F. H., Feng, Q. L., & Wang, C. M. (2002). The modulation of collagen on crystal morphology of calcium carbonate. *Journal of Crystal Growth*, *242*(1), 239–244.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., & Söding, J. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, *7*(1), 539.
- Silverman, L., & Boskey, A. L. (2004). Diffusion Systems for Evaluation of Biomineralization. *Calcified Tissue International*, *75*(6), 494–501.
- Sivaguru, M., Saw, J. J., Wilson, E. M., Lieske, J. C., Krambeck, A. E., Williams, J. C., Romero, M. F., Fouke, K. W., Curtis, M. W., Kear-Scott, J. L., Chia, N., & Fouke, B. W. (2021). Human kidney stones: a natural record of universal biomineralization. *Nature Reviews Urology*, *18*(7), 404–432.
- Skeffington, A., Fischer, A., Sviben, S., Brzezinka, M., Gorka, M., Bertinetti, L., Woehle, C., Hüttel, B., Graf, A., & Scheffel, A. (2022). A multifaceted proteomics strategy in combination with an updated proteome provides insights into the mechanism of calcification in *coccolithophores*. Research Square.
- Söllner, C., Burghammer, M., Busch-Nentwich, E., Berger, J., Schwarz, H., Riekkel, C., & Nicolson, T. (2003). Control of crystal size and lattice formation by starmaker in otolith biomineralization. *Science*, *302*(5643), 282–286.
- Söllner, C., Burghammer, M., Busch-Nentwich, E., Berger, J., Schwarz, H., Riekkel, C., & Nicolson, T. (2003). Control of Crystal Size and Lattice Formation by Starmaker in Otolith Biomineralization. *Science*, *302*(5643), 282–286.
- Söllner, C., & Nicolson, T. (2004). The zebrafish as a genetic model to study otolith formation. *Biomineralization: From Biology to Biotechnology and Medical Application*, 229–242.
- Sorokina, L. v, Shahbazian-Yassar, R., & Shokuhfar, T. (2021). Collagen biomineralization: pathways, mechanisms, and thermodynamics. *Emergent Materials*, *4*(5), 1205–1224.
- Stetefeld, J., McKenna, S. A., & Patel, T. R. (2016). Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, *8*(4), 409–427.
- Stolarski, J., Drake, J., Coronado, I., Vieira, A. R., Radwańska, U., Heath-Heckman, E. A., Mazur, Guo, J. & Meibom, A. (2023). First paleoproteome study of fossil fish otoliths and the pristine preservation of the biomineral crystal host. *Scientific Reports*, *13*(1), 3822.
- Stoll, H. M., Ruiz Encinar, J., Ignacio Garcia Alonso, J., Rosenthal, Y., Probert, I., & Klaas, C. (2001). A first look at paleotemperature prospects from Mg in coccolith carbonate: cleaning techniques and culture measurements. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, *2*(5).
- Stooke-Vaughan, G. A., Obholzer, N. D., Baxendale, S., Megason, S. G., & Whitfield, T. T. (2015). Otolith tethering in the zebrafish otic vesicle requires Otogelin and γ -Tectorin. *Development*, *142*(6), 1137–1145.
- Stothard, P. (2000). The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, *28*(6), 1102–1104.

Bibliografia

- Sugawara-Narutaki, A., Nakamura, J., & Ohtsuki, C. (2021). Polymer-induced liquid precursors (PILPs) and bone regeneration. In A. Osaka & R. Narayan (Eds.), *Bioceramics* (pp. 391–398). Elsevier.
- Sumper, M., & Brunner, E. (2008). Silica biomineralisation in diatoms: the model organism *Thalassiosira pseudonana*. *ChemBioChem*, 9(8), 1187–1194.
- Suzuki, S., Wilson-Kubalek, E. M., Wert, D., Tsao, T.-S., & Lee, D. H. (2007). The oligomeric structure of high molecular weight adiponectin. *FEBS Letters*, 581(5), 809–814.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., & Bork, P. (2019). STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D607–D613.
- Tabtabai, R., Haynes, L., Kuchel, G. A., & Parham, K. (2017). Age-Related Increase in Blood Levels of Otolin-1 in Humans. *Otology & Neurotology: Official Publication of the American Otological Society, American Neurotology Society [and] European Academy of Otology and Neurotology*, 38(6), 865–869.
- Takagi, Y. (2002). Otolith formation and endolymph chemistry: a strong correlation between the aragonite saturation state and pH in the endolymph of the trout otolith organ. *Marine Ecology Progress Series*, 231, 237–245.
- Takagi, Y., Tohse, H., Murayama, E., Ohira, T., & Nagasawa, H. (2005). Diel changes in endolymph aragonite saturation rate and mRNA expression of otolith matrix proteins in the trout otolith organ. *Marine Ecology Progress Series*, 294, 249–256.
- Takeuchi, T., Sarashina, I., Iijima, M., & Endo, K. (2008). In vitro regulation of CaCO₃ crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein. *FEBS Letters*, 582(5), 591–596.
- Tarczewska, A., Bielak, K., Zoglowek, A., Sołtys, K., Dobryszczycki, P., Ożyhar, A., & Różycka, M. (2022). The Role of Intrinsically Disordered Proteins in Liquid–Liquid Phase Separation during Calcium Carbonate Biomineralization. *Biomolecules*, 12(9), 1266.
- Thalmann, I., Hughes, I., Tong, B. D., Ornitz, D. M., & Thalmann, R. (2006). Microscale analysis of proteins in inner ear tissues and fluids with emphasis on endolymphatic sac, otoconia, and organ of Corti. *Electrophoresis*, 27(8), 1598–1608.
- Thalmann Isolde, R. T. (1999). Source and Role of Endolymph Macromolecules. *Acta Oto-Laryngologica*, 119(3), 293–296.
- Thiessen, K. D. (2019). *Novel Mechanisms in Zebrafish Otolith Nucleation, Tethering, and Dysfunction*. Creighton University.
- Thomas, O. R. B., Richards, K. L., Petrou, S., Roberts, B. R., & Swearer, S. E. (2020). In situ 3D visualization of biomineralization matrix proteins. *Journal of Structural Biology*, 209(3), 107448.
- Thomas, O. R. B., & Swearer, S. E. (2019). Otolith Biochemistry—A Review. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 27(4), 458–489.
- Thomas, O. R. B., Swearer, S. E., Kapp, E. A., Peng, P., Tonkin-Hill, G. Q., Papenfuss, A., Roberts, A., Bernard, P., & Roberts, B. R. (2019). The inner ear proteome of fish. *FEBS Journal*, 286(1), 66–81.
- Tohse, H., Saruwatari, K., Kogure, T., Nagasawa, H., & Takagi, Y. (2009). Control of polymorphism and morphology of calcium carbonate crystals by a matrix protein aggregate in fish otoliths. *Crystal Growth and Design*, 9(11), 4897–4901.
- Tohse, H., Takagi, Y., & Nagasawa, H. (2008). Identification of a novel matrix protein contained in a protein aggregate associated with collagen in fish otoliths. *The FEBS Journal*, 275(10), 2512–2523.
- Tsao, T.-S. (2014). Assembly of adiponectin oligomers. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 15(2), 125–136.
- Unzai, S. (2018). Analytical ultracentrifugation in structural biology. *Biophysical Reviews*, 10(2), 229–233.
- Vacic, V., Uversky, V. N., Dunker, A. K., & Lonardi, S. (2007). Composition Profiler: a tool for discovery and visualization of amino acid composition differences. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 1–7.
- Vivian, J. T., & Callis, P. R. (2001). Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins. *Biophysical Journal*, 80(5), 2093–2109.
- Wadsworth, C., & Buckley, M. (2014). Proteome degradation in fossils: investigating the longevity of protein survival in ancient bone. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 28(6), 605–615.
- Walker, M. D., & Silverberg, S. J. (2018). Primary hyperparathyroidism. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(2), 115–125.
- Walther, L. E., Blödown, A., Bloching, M. B., Buder, J., Carrillo-Cabrera, W., Roseeva, E., Borrmann, H., Simon, P., & Kniep, R. (2014). The inner structure of human Otoconia. *Otology and Neurotology*, 35(4), 686–694.
- Walther, L. E., Wenzel, A., Buder, J., Bloching, M. B., Kniep, R., & Blödown, A. (2014). Detection of human utricular otoconia degeneration in vital specimen and implications for benign paroxysmal positional vertigo. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 271(12), 3133–3138.
- Warinner, C., Korzow Richter, K., & Collins, M. J. (2022). Paleoproteomics. *Chemical Reviews*, 122(16), 13401–13446.
- Weigele, J., Franz-Odenaal, T. A., & Hilbig, R. (2015). Spatial Expression of Otolith Matrix Protein-1 and Otolin-1 in Normally and Kinetotically Swimming Fish. *The Anatomical Record*, 298(10), 1765–1773.

Bibliografia

- Weigele, J., Franz-Odenaal, T. A., & Hilbig, R. (2016). Not All Inner Ears are the Same: Otolith Matrix Proteins in the Inner Ear of Sub-Adult Cichlid Fish, *Oreochromis Mossambicus*, Reveal Insights Into the Biomineralization Process. *The Anatomical Record*, 299(2), 234–245.
- Weiner, S. (2008). Biomineralization: A structural perspective. *Journal of Structural Biology*, 163(3), 229–234.
- Weiner, S., & Dove, P. M. (2003). An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 54(1), 1–29.
- Weiner, S., Lowenstam, H. A., & Hood, L. (1976). Characterization of 80-million-year-old mollusk shell proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(8), 2541–2545.
- Whaite, A., Klein, A., Mitu, S., Wang, T., Elizur, A., & Cummins, S. (2022). The byssal-producing glands and proteins of the silverlip pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson, 1901). *Biofouling*, 38(2), 186–206.
- Wojtas, M., Dobryszczycki, P., & Ożyhar, A. (2012). Intrinsically Disordered Proteins in Biomineralization. *Advanced Topics in Biomineralization, February*.
- Wojtas, M., Hołubowicz, R., Poznar, M., Maciejewska, M., Ożyhar, A., & Dobryszczycki, P. (2015). Calcium Ion Binding Properties and the Effect of Phosphorylation on the Intrinsically Disordered Starmaker Protein. *Biochemistry*, 54(42), 6525–6534.
- Wojtas, M., Wołczyr, M., Ożyhar, A., & Dobryszczycki, P. (2012). Phosphorylation of Intrinsically Disordered Starmaker Protein Increases Its Ability To Control the Formation of Calcium Carbonate Crystals. *Crystal Growth & Design*, 12(1), 158–168.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P., & Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 118(1), 197–203.
- Wu, Y., Han, W., Yan, W., Lu, X., Zhou, M., Li, L., Guan, Q., & Fan, Z. (2020). Increased Otolin-1 in serum as a potential biomarker for idiopathic benign paroxysmal positional vertigo episodes. *Frontiers in Neurology*, 11, 367.
- Xu, Y., Zhang, H., Yang, H., Zhao, X., Lovas, S., & Lundberg, Y. (Yesha) W. (2010). Expression, functional, and structural analysis of proteins critical for otoconia development. *Developmental Dynamics*, 239(10), 2659–2673.
- Xue, B., Dunbrack, R. L., Williams, R. W., Dunker, A. K., & Uversky, V. N. (2010). PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1804(4), 996–1010.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Akanuma, Y., Gavrilova, O., Vinson, C., Reitman, M. L., Kagechika, H., Shudo, K., Yoda, M., Nakano, Y., ... Kadowaki, T. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine*, 7(8), 941–946.
- Ye, J. J., Bian, X., Lim, J., & Medzhitov, R. (2020). Adiponectin and related C1q/TNF-related proteins bind selectively to anionic phospholipids and sphingolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(29), 17381–17388.
- Yu, Z., An, B., Ramshaw, J. A. M., & Brodsky, B. (2014). Bacterial collagen-like proteins that form triple-helical structures. *Journal of Structural Biology*, 186(3), 451–461.
- Zaquin, T., Pinkas, I., di Bisceglie, A. P., Mucaria, A., Milita, S., Fermani, S., Goffredo, S., Mass, T., & Falini, G. (2022). Exploring Coral Calcification by Calcium Carbonate Overgrowth Experiments. *Crystal Growth & Design*, 22(8), 5045–5053.
- Zhang, G., Brion, A., Willemin, A., Piet, M., Moby, V., Bianchi, A., Mainard, D., Galois, L., Gillet, P., & Rousseau, M. (2017). Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(2), 662–671.
- Zhao, X., Yang, H., Yamoah, E. N., & Lundberg, Y. W. (2007). Gene targeting reveals the role of Oc90 as the essential organizer of the otoconial organic matrix. *Developmental Biology*, 304(2), 508–524.
- Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 82, 42–49.