



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PROTEÍNA DEL CEMENTO 1  
(CEMP1) Y SU RELACIÓN CON LA FUNCIÓN BIOLÓGICA.**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA  
ENRIQUE ROMO ARÉVALO**

**TUTORES  
DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DR. HIGINIO ARZATE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos.**

A la Dra. Adela Rodríguez por todo su apoyo y amplia disposición para dirigir este trabajo. Además por compartir sus conocimientos y muy acertados comentarios de constante motivación que contribuyeron al desarrollo de este trabajo de investigación.

Mi más profundo reconocimiento y agradecimiento al Dr. Higinio Arzate por la confianza que ha tenido hacia mí para pertenecer a su equipo de trabajo, por su paciencia, su asesoría y sus múltiples consejos a lo largo de todo este proceso que me ayudaron a crecer personal y profesionalmente.

A la Dra. Patricia Cano, Dra. Deyanira Fuentes Silva, Dra. Alejandra Hernández Santoyo y Dra. Martha Contreras por todo su apoyo técnico para realizar muchos de los experimentos.

A los revisores de este trabajo de tesis: Dra. Marietta Tuena Sangri, Dra. Alejandra Hernández Santoyo, Dra. Elba Rosa Leyva Huerta y Dr. Javier Portilla Robertson que ayudaron en gran medida a enriquecer con sus comentarios y observaciones esta tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados: Lia, Janeth, Fabiola, Mercedes, Carmen, Adriana y Gonzalo por su fraternidad y valiosos consejos.

A mis compañeros del Laboratorio de Química de Biomacromoléculas: Siseth, Israel, Efrén, Christian y Ángel por toda su ayuda.

Al Laboratorio de Estructura de Proteínas del LANEM y a su personal por todas las facilidades para realizar las pruebas de difracción de cristales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado.

<b>ÍNDICE</b>	
<b>Lista de abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	2
<b>Abstract</b>	4
<b>Introducción</b>	6
<b>Marco Teórico</b>	
Periodonto	9
Proteínas que participan en el proceso de mineralización del cemento	13
Proteínas cemento específicas: CAP y CEMP1	15
Estudio de proteínas asociadas al proceso de biomineralización	19
<b>Planteamiento del Problema y Justificación</b>	21
<b>Hipótesis</b>	21
<b>Objetivos</b>	22
<b>Metodología</b>	23
<b>Resultados</b>	
Expresión y purificación de hrCEMP1	33
Identificación de glicosilaciones por SDS-PAGE	35
Determinación de masa molecular	36
Actividad Biológica	37
Microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDS)	39
Relación Calcio/Fósforo	40
Determinación de estructura secundaria por dicroísmo circular	41
Predicción de cristalización	45
Ensayos de desplazamiento térmico	46
Modelo tridimensional teórico de hrCEMP1	49
Hemaglutinación de eritrocitos	50
Análisis del comportamiento en solución de hrCEMP1	52
Pruebas de cristalogénesis	55
<b>Discusión</b>	56
<b>Conclusiones</b>	66
<b>Referencias</b>	67
<b>Apéndice</b>	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

6x-His	Bandera de seis histidinas.
ALP	Fosfatasa alcalina.
BMP	Proteína morfogenética de hueso.
BSA	Albumina de suero bovina.
BSP	Sialoproteína ósea.
CAP	Proteína de adhesión del cemento.
CEMP1	Proteína del cemento 1.
Con-A	Concanavalina A.
D.C.	Dicroísmo circular.
Da	Dalton.
DMP-1	Proteína de matriz de dentina 1.
EDS	Energía dispersiva de rayos X.
HEPES	Ácido (4-(2-Hidroxietil) piperazina-N-etanosulfónico.
hrCEMP1	Proteína del cemento 1 recombinante humana.
kDa	kilodalton.
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz – Tiempo de vuelo.
MAPK	Proteína cinasa 1 activada por mitógeno.
mg	Miligramo.
Mm	Milimolar.
Mr	Movilidad relativa.
MW	Peso molecular.
ng	Nanogramo.
nm	Nanómetro.
OCN	Osteocalcina.
OPN	Osteonectina.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pg	Picogramo.
RGD	Arginina – Glicina – Ácido aspártico.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio.
TBST	Amortiguador de TRIS salino adicionado con Tween 20.
Tm	Temperatura media de desnaturalización.
YNB	Base nitrogenada de levadura.

## RESUMEN

Este trabajo pretende contribuir al conocimiento de la proteína CEMP1, la relación que pueden tener sus características bioquímicas en el proceso de la biomineralización y mediante la caracterización bioquímica generar las condiciones iniciales para su cristalización. Para lograr lo anterior se requirió encontrar un sistema de expresión que permitiera obtener rendimientos de proteína aptos para los ensayos bioquímicos y estructurales, además de que se logró tener a la proteína hrCEMP1 glicosilada, como está la proteína nativa.

El interés de estudio de CEMP1 radica en que a la fecha se cuenta con información limitada sobre el mecanismo de acción de esta proteína, además de que a nivel de secuencia de aminoácidos no presenta homología significativa con ninguna otra proteína en las bases de datos. Por lo tanto, su caracterización bioquímica y estructural permitirá generar nuevos planteamientos de cómo conformaciones que no han sido descritas pueden contribuir a regular el proceso de la biomineralización.

Para cumplir nuestros objetivos se diseñó un sistema de expresión de proteínas recombinantes a partir de la levadura *Pichia pastoris* y del plásmido pPICZA-CEMP1. El resultado de la recombinación del plásmido con el genoma de la levadura y la posterior traducción produce una proteína de fusión formada por CEMP1 y dos banderas (myc-tag y 6x-His) unidas al carboxilo terminal. La purificación de la proteína se hizo mediante una cromatografía de afinidad a carbohidratos (concanavalina A) y la identidad de la proteína recombinante se confirmó mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos contra la bandera 6xHis y contra CEMP1. La masa molecular de hrCEMP1 determinada mediante espectrometría de masas (MALDI-tof) fue de 28,770 Da.

Mediante una tinción específica para proteínas glicosiladas se determinó la presencia de carbohidratos en hrCEMP1, lo que se confirmó por la diferencia en el peso molecular teórico con el resultado de la espectrometría de masas, indicando que hrCEMP1 incrementa un 2.45% en su peso molecular por adición de carbohidratos.

Las pruebas de actividad biológica utilizando el sistema de contradifusión en gel de silicato demostraron que hrCEMP1 tiene la capacidad de nucleación y regular el crecimiento y dirección de cristales de fosfato octacálcio. Además se demostró por primera vez que la proteína presenta actividad de lectina y que reconoce de manera específica y con alta afinidad al carbohidrato manopiranosido.

El contenido de estructura secundaria se determinó mediante dicroísmo circular, este análisis demostró que hrCEMP1 presenta 28.6% de estructura hélice alfa, 9.9% de láminas beta y 62.5% de estructura aleatoria. La generación de un modelo tridimensional teórico y la predicción *in silico* de la posibilidad de cristalización de hrCEMP1 indican que la proteína está mayormente desorganizada y que el contenido de estructura secundaria predicho corresponde con los resultados del análisis por dicroísmo circular.

Los ensayos de dispersión dinámica de luz revelaron que la forma monodispersa de hrCEMP1 (17.3nm) se presenta cuando la proteína está unida al carbohidrato manopiranosido, cuando dicho carbohidrato es separado de la proteína mediante exclusión molecular, hrCEMP1 se agrega en dos especies de mayor peso molecular (136.1 nm y 748.7nm).

Estudios de estabilidad y solubilidad de proteínas realizados con la técnica de Thermo fluor nos indican que hrCEMP1 aumenta su estabilidad cuando está en presencia de aminoácidos y péptidos principalmente de carga negativa y en pH ácidos favorecidos por fosfato y acetato de sodio.

Tomando en cuenta todos éstos resultados se han realizado pruebas de formación de cristales de proteína empleando diversos sistemas de cristalización.

Por estos resultados, podemos concluir que la información generada con esta caracterización bioquímica – estructural sienta un precedente que puede contribuir a la cristalización, caracterización tridimensional y entendimiento las funciones biológicas de CEMP1.

## ABSTRACT

This work aims to contribute to the knowledge of cementum protein 1 (CEMP1) and the relationship between its three-dimensional conformation and structure during the biomineralization process. Nowadays there is limited information about the mechanism of action of CEMP1 and the amino acid sequence has no significant homology with any other proteins in the databases. Thus, the structural characterization of CEMP1 could generate new knowledge about how this novel protein can help to regulate the biomineralization process.

In this work we performed a biochemical characterization with the purpose to optimize the crystallization conditions of the protein. To meet our objectives, an eukaryotic expression system was design from the yeast *Pichia pastoris* and pPICZA-CEMP1 plasmid. Protein purification was performed by carbohydrate affinity chromatography (concanavalin A) and the identity of the recombinant protein was performed by Western blot analysis using specific antibodies against CEMP1 and 6xHis flag. CEMP1 molecular mass was determined by mass spectrometry (MALDI-TOF). By specific staining for glycosylated proteins the presence of carbohydrates hrCEMP1 was determined, which was confirmed by the difference in the theoretical molecular weight to the result of the mass spectrometry and affinity to concanavalin A. Biological activity tests of CEMP1 were performed using the counter-diffusion silicate gel system. The results revealed that CEMP1 nucleates and regulates the growth of octacalcium phosphate crystals. Additionally, it was demonstrated for the first time that CEMP1 has a lectin-like activity and specifically recognizes mannopyranoside carbohydrate. The content of secondary structure was determined by circular dichroism. This analysis showed that CEMP1 presents a structure of alpha-helix 28.6%, beta-sheet 9.9% and random coil 62.5%. Generating a three-dimensional theoretical model and *in silico* prediction of protein crystallization propensity of CEMP1, the results indicate that CEMP1 is predominantly disorganized and the content of the predicted secondary structure, corresponds well with the results of circular dichroism analyzes. Dynamic light scattering analysis showed that monodisperse form of hrCEMP1 occurs when the protein is bound to mannopyranoside, however, when the carbohydrate is removed from the protein, this is aggregate in two higher molecular weight species. Stability and solubility studies of the protein using the technique of Thermo fluor indicate that CEMP1 increases its stability when amino acids and peptides mainly negatively charged are present. From our results we can conclude that the information generated by this biochemical and structural characterization rise a precedent that could contribute to the protein

crystallization, three-dimensional characterization and understanding the biological functions of CEMP1.

## INTRODUCCIÓN

El periodonto forma la estructura de soporte del diente, está constituido por dos tejidos blandos (encía y ligamento periodontal) y dos tejidos mineralizados (cemento radicular y hueso alveolar). Cada uno de los componentes del periodonto tiene una composición bioquímica y arquitectura distinta, sin embargo, funcionan como una unidad integral. La principal función del periodonto es anclar al diente y protegerlo de las fuerzas masticatorias debido a que sufre presión mecánica, así como también estrés bacteriano constante.<sup>1-3</sup>

La integridad estructural, el equilibrio en la flora microbiana bucal y el contacto fisiológico de los tejidos blandos y tejidos mineralizados controlan la homeostasis del periodonto.<sup>2,3</sup> Cuando se presenta una pérdida del equilibrio en estas condiciones se desarrolla la enfermedad periodontal.<sup>1-4</sup>

La enfermedad periodontal es una infección inflamatoria crónica que afecta a las estructuras de soporte del diente, dicha enfermedad es diagnosticada de forma cotidiana por la valoración de diversos parámetros entre los que se incluyen la pérdida de inserción de las fibras del ligamento periodontal al cemento radicular, la inflamación y sangrado gingival y la acumulación de película dentobacteriana. En la práctica clínica es evidente que estas variables contribuyen a una disminución en la inserción de las fibras del ligamento periodontal, la destrucción del hueso alveolar y cemento radicular, lo que conlleva a la movilidad y pérdida del órgano dentario.<sup>3-5</sup>

La terapia periodontal tiene como principal objetivo la regeneración del aparato de sostén del diente (cemento radicular, ligamento periodontal, encía y hueso alveolar).<sup>6-7</sup> La formación de los tejidos perdidos y la regeneración de la unión dentogingival requieren la acción concertada de distintos tipos celulares en el sitio de la lesión. Estos tipos celulares incluyen cementoblastos, fibroblastos, osteoblastos y células del epitelio sulcular y de unión.<sup>5</sup>

A la fecha, el mecanismo molecular de la regeneración periodontal no es claro, sin embargo, se tienen reportes que indican que el ligamento periodontal es esencial en la osteogénesis y cementogénesis y que células mesenquimales indiferenciadas son inducidas a diferenciarse en osteoblastos o cementoblastos por estimulación, debido al daño periodontal.<sup>6</sup> Otro tejido de suma importancia en la regeneración periodontal es el cemento radicular, este tejido tiene una función fundamental en la inserción de las fibras colágenas del ligamento periodontal que permiten la unión de la raíz del diente al hueso y ha demostrado tener proteínas que participan en procesos de proliferación celular.<sup>9</sup>

El cemento radicular, es un tejido mineralizado especializado y que es formado por cementoblastos y se localiza en la superficie radicular de los dientes.<sup>7, 9</sup> Este tejido mineralizado tiene características similares al hueso en cuanto a su composición orgánica e inorgánica sin embargo, el cemento radicular posee características únicas, ya que no presenta aporte sanguíneo directo, inervación, ni drenaje linfático y recientemente se han identificado dos proteínas específicas de este tejido, la proteína de adhesión del cemento (CAP)<sup>9, 43-46</sup> y la proteína del cemento 1 (CEMP1).<sup>9, 51</sup>

CEMP1 es una proteína de 247 aminoácidos con un peso molecular teórico de su secuencia de aminoácidos de 25.9 kDa, la cual inicialmente fue aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos (células derivadas del cultivo de un cementoblastoma humano) cultivados *in vitro*. Su expresión tanto a nivel de ARNm, como de proteína, se limita a cementoblastos, cementocitos, a subpoblaciones de células derivadas del ligamento periodontal con una localización paravascular y en los espacios endosteales del hueso alveolar cercanos al ligamento periodontal.<sup>51</sup> A la fecha, los análisis *in silico* no han demostrado que esta proteína tenga homología significativa en su secuencia de aminoácidos con ninguna otra proteína en las bases de datos.

La proteína CEMP1 expresada de forma recombinante en fibroblastos gingivales humanos ha sido caracterizada parcialmente a la fecha.<sup>52</sup> Dicha caracterización indica que la proteína presenta fosforilaciones y glicosilaciones que contribuyen en 48% al peso total de la proteína nativa (11 kDa por contribución de N-glicosilaciones y 13 kDa por contribución de fosforilaciones), la cual muestra una movilidad relativa (*Mr*) de aproximadamente 50,000 Da.<sup>52, 53.</sup>

No se ha detectado la expresión del ARNm ni de la proteína en otros tejidos humanos como cerebro, corazón, pulmón, hígado y aorta, por lo que constituye a la fecha como el único marcador biológico para el cemento radicular, cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal.<sup>51, 52, 55</sup> También se demostró que la transfección con el gen de CEMP1 y la sobreexpresión de ésta proteína en células con un fenotipo no mineralizante (fibroblastos gingivales humanos adultos) dio como resultado la diferenciación de dichas células hacia un fenotipo mineralizante.<sup>53</sup>

Mediante experimentos realizados con células en cultivo, se demostró que CEMP1 participa en el depósito y composición de cristales de hidroxiapatita así como en la regulación de la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de biomineralización como fosfatasa alcalina (ALP), osteopontina (OPN) y sialoproteína ósea (BSP) en cementoblastos putativos *in vitro*,<sup>22, 49</sup> por lo que

es probable que juegue un papel fundamental en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular del cemento.

Otro estudio demostró que células derivadas del folículo dental tratadas con extracto derivado de proteínas de matriz de esmalte se diferenciaron a un fenotipo cementoblástico expresando CEMP1 y CAP, activándose la fosforilación de Smad-1 y activando la vía de MAPK para la proliferación y diferenciación celular.<sup>55</sup> Aunque a la fecha no se conocen las vías de señalización intracelular involucradas en la diferenciación de los cementoblastos y la mineralización, mediante evidencia experimental se ha dilucidado que CEMP1 induce la fosforilación y translocación al núcleo de dos proteínas cinasas (JNK y p38) encargadas de vías de señalización intracelular relacionadas con la proliferación y diferenciación.<sup>57</sup>

Por otra parte, CEMP1 estimula la proliferación de células del ligamento periodontal en cultivos tridimensionales e induce la formación de estructuras semejantes a tejidos mineralizados como hueso y/o cemento radicular y material similar a cartílago<sup>58</sup>. La adición de la proteína a cultivos tridimensionales de células de ligamento periodontal incrementa la actividad específica de la fosfatasa alcalina (marcador temprano del proceso de biomineralización) e induce la expresión a nivel de ARNm y proteína de marcadores osteogénicos (sialoproteína ósea), cementogénicos (CEMP1 y CAP) y condrogénicos (colágena II, agregcano, colágena X y del factor de transcripción Sox9).<sup>58</sup>

Finalmente el uso terapéutico de CEMP1 ha sido probado en la regeneración de defectos de tamaño crítico en ratas wistar. Al incluir a CEMP1 en una matriz de gelatina y ser colocada en defectos de 9mm en calvarias de ratas, mediante cortes histológicos e imágenes de microtomografía se observó que después de 16 semanas CEMP1 es capaz de regenerar 97% del defecto óseo.<sup>59</sup>

Estos resultados abren la posibilidad de que CEMP1 tenga el potencial de ser utilizada en la ingeniería de tejidos para lograr la reconstrucción de los estructuras periodontales y/o cartílago. Es por este motivo, que la información generada a partir de la caracterización bioquímica y estructural adquiere relevancia, pues proporcionara nuevos elementos que ayudaran a comprender como CEMP1 lleva a cabo sus funciones biológicas.

## MARCO TEÓRICO

### Periodonto

El periodonto es el conjunto de tejidos dinámicos que cuyas principales funciones son el proporcionar soporte a los órganos dentales dentro de su alveolo, distribuir las fuerzas de la masticación, ayudar a la fonación, proveer un reservorio de células para la homeostasis y la regeneración o reparación del tejido, así como proteger a la raíz dental<sup>1</sup>. Está constituido por 4 tejidos; dos tejidos blandos: encía y ligamento periodontal y dos tejidos mineralizados: hueso alveolar y cemento radicular. En un individuo sano, éstos tejidos se desarrollan y funcionan como una unidad. Sin embargo, si alguno de estos cuatro tejidos presenta una alteración patológica sin tratamiento, la repercusión en los demás genera inestabilidad pudiendo llegar hasta la pérdida de los órganos dentales.<sup>2,3</sup>

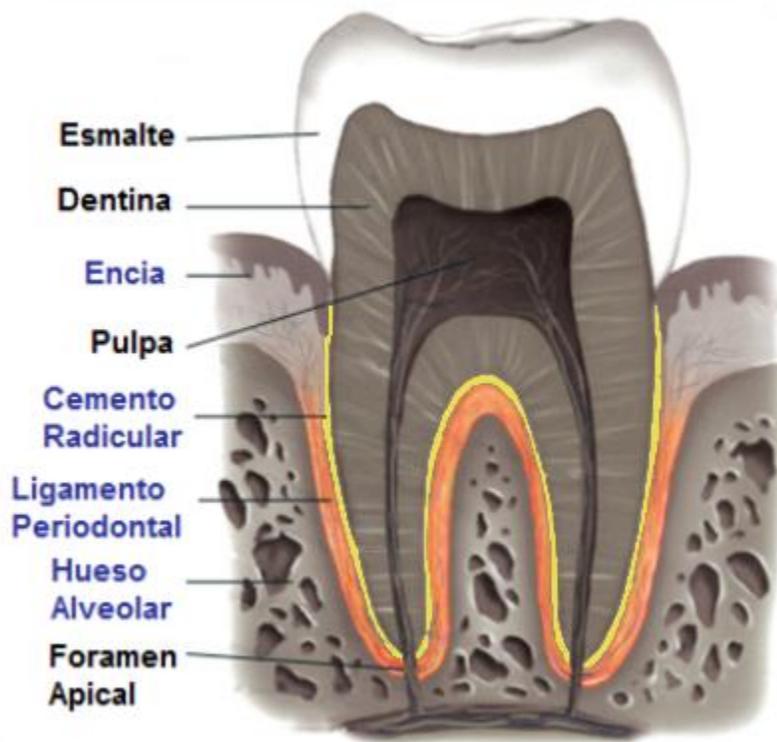


Figura 1. Representación de los tejidos periodontales.

## **Encía**

En este tejido los elementos celulares más abundantes son los fibroblastos y está constituida por epitelio gingival y tejido conectivo. Forma parte de la mucosa oral recubriendo los procesos alveolares de la mandíbula, la maxila y rodea los cuellos de los dientes. El tejido conectivo de la encía es muy similar al de la piel, compuesto principalmente de fibras colágenas, proteoglicanos, fibronectina, osteonectina, tenascina y elastina en proporciones variables, dependiendo de su localización. Su función principal es de protección para las estructuras profundas. La encía se encuentra firmemente adherida al hueso alveolar.<sup>4,5</sup>

## **Ligamento periodontal**

Es un tejido conectivo especializado con un recambio metabólico muy alto, que se localiza en el espacio entre el cemento radicular y el hueso alveolar. Sus principales funciones son: dar soporte al órgano dental manteniéndolo en su alveolo, soportar las fuerzas masticatorias y actúa como receptor sensorial, necesario para el posicionamiento oclusal.<sup>3</sup> Estructuralmente, los elementos más abundantes son las fibras periodontales las cuales están formadas de colágena tipo I y III, que son producidas por los fibroblastos. Las fibras de colágena que se insertan en uno de sus extremos al cemento radicular y por el otro extremo al hueso alveolar, son llamadas fibras de Sharpey. Los elementos celulares de este tejido son los fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos y osteoclastos.<sup>4,5</sup> Dentro de la población celular, la fibroblástica es la predominante y son éstos los que se encargan de sintetizar y remodelar la matriz extracelular del ligamento periodontal. Se ha demostrado que existen diferentes subpoblaciones o subtipos de fibroblastos, dentro de éstos, los que presentan el fenotipo mineralizante y enriquecidos en fosfatasa alcalina. Éstos últimos tienen la capacidad de diferenciarse a osteoblastos o cementoblastos y son responsables de la producción de cemento radicular acelular con fibras extrínsecas; también se encargan del mantenimiento del espacio del ligamento periodontal.<sup>2,6,7</sup>

## **Hueso alveolar**

Los procesos maxilares de los humanos se pueden subdividir en dos: a) el proceso alveolar que aloja las raíces de los órganos dentarios erupcionados y b) el cuerpo basal no involucrado en esta función. El proceso alveolar consiste del alvéolo que forma la pared de las criptas, la cortical interna, externa y el hueso esponjoso entre ambas corticales. Como los procesos alveolares se desarrollan y sufren remodelación de acuerdo a la formación y erupción dental, son estructuras

óseas dependientes de los órganos dentarios y la forma, localización y función de los dientes determina la morfología de los procesos alveolares.<sup>2</sup> Como en el resto de los tejidos periodontales, dentro del componente orgánico predominan las colágenas tipo I, III y contiene además proteínas no colágenas asociadas al proceso de biomineralización como son: osteocalcina, sialoproteína ósea, osteopontina, osteonectina y proteínas morfogenéticas de hueso (BMP's).<sup>8</sup>

El hueso alveolar presenta una fase mineral que representa el 50% de la composición total del tejido, ésta se encuentra constituida principalmente por calcio y fosfato en forma de cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ).<sup>5</sup>

### **Cemento radicular**

Es un tejido conectivo especializado, mineralizado, que cubre la superficie radicular de los órganos dentarios desde la unión cemento-esmalte, que regularmente se encuentra en el cuello del diente en la unión de la corona y la raíz dental hasta el ápice, que es la parte más distal de la raíz dental. El cemento radicular es un componente de suma importancia en el aparato de inserción del diente, debido a que es el sitio donde las fibras del ligamento periodontal provenientes del hueso alveolar se insertan. Histológicamente este tejido es muy parecido al hueso y la dentina, sin embargo, cuenta con características únicas que lo hacen diferente como son: la ausencia de vascularización directa, carece de inervación y drenaje linfático, tiene un bajo recambio metabólico y no sufre procesos de remodelación, sino que tiene un proceso de aposición constante durante toda la vida.<sup>5, 9, 10</sup>

### **Cementogénesis**

Durante la formación de la raíz, el mesénquima apical continúa proliferando para formar el periodonto, mientras el epitelio interno y externo se fusionan a nivel cervical formando una vaina epitelial llamada vaina epitelial de Hertwig (HERS)<sup>11</sup>. Las células de la vaina proliferan y migran hacia la zona apical, donde se dividen en la papila y el folículo dental. Las células de HERS migran de la raíz a la región del futuro ligamento periodontal donde se re-asocian para formar los restos epiteliales de Malassez que persisten en los adultos en una posición cercana a la superficie radicular. Una vez que se ha perdido la continuidad de las células de HERS, las células foliculares ecto-mesenquimatosas comienzan a depositar el cemento radicular sobre la dentina recién depositada y/o sobre la matriz secretada por las células de HERS. La región apical de la raíz en desarrollo contiene células ectomesenquimatosas progenitoras de fibroblastos, pre-odontoblastos

y pre-cementoblastos.<sup>11-13</sup> En los últimos años se ha postulado que la función de las células de HERS es producir una membrana basal con proteínas quimiotácticas que dirigen la migración de células pre-cementoblásticas e inducen su diferenciación a cementoblastos.<sup>13-15</sup> Dentro de las moléculas presentes hay proteínas de matriz extracelular, factores de crecimiento, proteínas de esmalte y moléculas de adhesión como la proteína de adhesión del cemento (CAP). Una vez que el órgano dental ocluye con su antagonista, la proliferación de células de HERS disminuye y algunas células quedan atrapadas en la matriz mineralizada. También se piensa que, las células de HERS sufren una transformación ecto-mesenquimatosa para convertirse en cementoblastos funcionales. Se ha propuesto que existen diferentes tipos de cementoblastos: los originados de la vaina epitelial de Hertwig vía transformación epitelio-mesénquima y los derivados del folículo dental que forman el cemento celular.<sup>13-17</sup> También se ha reportado que las células progenitoras del ligamento periodontal adoptan una localización paravascular en el ligamento periodontal, estas células exhiben algunas características de células troncales y pueden regenerar tejido funcional<sup>6, 18-21</sup>.

#### **Composición orgánica e inorgánica del cemento radicular.**

El cemento radicular está constituido aproximadamente por un 50% de contenido inorgánico, formado principalmente por cristales de hidroxiapatita y un 50 % de contenido orgánico, de éste, el componente predominante es la colágena tipo I (90%), la colágena tipo III (5%) y en menor proporción colágena tipo XII, trazas de colágena V y VI en localización peri-celular y tipo XIV asociada a las fibras de Sharpey.<sup>1, 4, 11, 22</sup>

Se han localizado e identificado proteoglicanos (versicano, decorina, biglicano, fibromodulina y lumicano) que se asocian principalmente a la membrana celular de cementoblastos y cementocitos. Las proteínas no colágenas del cemento radicular en su mayoría también están presentes en el hueso incluyendo a la sialoproteína ósea (BSP), proteína de matriz dentinaria-1 (DMP-1), fibronectina, osteocalcina, osteonectina y osteopontina,<sup>4</sup> además de diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulínico.<sup>9</sup> A la fecha, solo se han reportado dos proteínas específicas del cemento radicular, la proteína del cemento 1 (CEMP1) y la proteína de adhesión del cemento radicular (CAP).<sup>23-26</sup>

### **Participación de proteínas colágenas y no colágenas en el proceso de biomineralización del cemento radicular.**

Como se mencionó anteriormente la colágena tipo I, es la proteína más abundante de la matriz orgánica del cemento radicular, representa el 90% del total de las proteínas en el cemento. La formación de cristales mineralizados se presenta inicialmente en los espacios de las fibras de colágena.<sup>27</sup> Las fibras de colágena proporcionan una estructura que funciona como andamio sobre el que se relacionan otras proteínas, las cuales cumplen diversas funciones. Algunas de ellas actúan como proteínas que favorecen la nucleación de cristales de fosfatos de calcio; que constituye el proceso por medio del cual, un número de moléculas se van agregando o depositando hasta formar núcleos de crecimiento mineral, a éstos núcleos se siguen agregando más moléculas hasta formar una nueva fase mineralizada. La nucleación puede ser homogénea si ocurre sin la participación de elementos externos, sólo con la saturación local de minerales que formarán la fase cristalina, o heterogénea si existe la participación de elementos externos como son las macromoléculas.<sup>28</sup> La nucleación en el proceso de biomineralización del cemento radicular es una nucleación heterogénea.

### **Fosfatasa alcalina (ALP)**

Está es una proteína glicosilada con actividad enzimática localizada en la porción externa de la membrana citoplasmática<sup>35</sup> y también se encuentra en las vesículas de matriz, que son organelos producidos por las células mineralizantes y están localizadas en la matriz extracelular. Dichas vesículas contribuyen a la mineralización de la matriz extracelular formando fosfatos de calcio amorfos y cristales de hidroxapatita.<sup>36</sup> La fosfatasa alcalina es responsable de regular las concentraciones extracelulares de fosfatos, desfosforilando diversas moléculas. La actividad de ésta molécula se incrementa cuando inicia el proceso de mineralización de la matriz extracelular, por lo que es un marcador temprano de la biomineralización.<sup>31</sup> Su actividad se ha localizado en placas de crecimiento de cartílago, en células endosteales, células de medula ósea, osteoblastos y cementoblastos. En hueso se ha identificado en el frente de mineralización<sup>32</sup>, y su participación en la biomineralización aunque no es completamente comprendida es muy significativa. En casos de hipofosfatasa, enfermedad metabólica caracterizada por una disminución en la actividad de ALP no-tejido-específica, la formación de cemento es deficiente o nula con la subsecuente exfoliación dental, por lo que se le atribuye un papel importante en la regulación de los niveles de pirofosfato.<sup>1, 33-35</sup> Su actividad también ha sido detectada en el ligamento periodontal, con una

distribución heterogénea en sitios adyacentes al hueso y cemento radicular (zonas de cementogénesis).<sup>36</sup>

### **Sialoproteína ósea (BSP)**

Constituye hasta el 15% del total de proteínas no colágenas del hueso y cemento radicular. Tiene un peso molecular teórico de 33.6 kDa, aunque al separarla por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), la proteína puede ser identificada como una proteína con una movilidad relativa de aproximadamente 80 kDa, esto por el alto contenido de modificaciones postraduccionales, las cuales son principalmente glicosilaciones y estar altamente fosforilada.<sup>37</sup> Se piensa que el contenido de ácido glutámico presente en ésta proteína tiene relación con su capacidad de unión a la hidroxiapatita así como en la nucleación de los cristales de dicho mineral. También posee una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) involucrada en la adhesión celular por medio de integrinas. Se le ha inmunolocalizado en hueso, dentina y cemento radicular asociándose a zonas con nueva formación de hueso, así como en algunos carcinomas que hacen metástasis hacia hueso (mama, próstata, pulmón y tiroides). El papel más destacado que se le atribuye es como nucleador de los cristales de hidroxiapatita, por lo que desempeña un papel importante en las etapas iniciales de la mineralización y se le considera como un marcador de diferenciación de osteoblastos y cementoblastos.<sup>10, 38</sup> Su participación en la cementogénesis se ha sugerido como el de una molécula promotora de la formación de mineral sobre la superficie radicular así como en la adhesión celular por su motivo RGD y su interacción con las integrinas.<sup>1</sup>

### **Osteocalcina (OCN)**

También se le conoce como proteína Gla de hueso. Está es una proteína de sólo 100 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 10.9 kDa. Fue la primera proteína derivada de hueso que fue caracterizada. Contiene tres residuos de ácido glutámico que están  $\gamma$ -carboxilados, los que se asocian con sus propiedades de unión a calcio y cristales de hidroxiapatita. La producen los osteoblastos y los osteoclastos completamente diferenciados y es secretada a la matriz en el frente de mineralización.<sup>10</sup> Se ha inmunolocalizado en hueso alveolar, cemento radicular y dentina. La función que desempeña es la de modular el crecimiento, tamaño y forma de los cristales de hidroxiapatita, también participa en el reclutamiento de osteoclastos y en la remodelación ósea.<sup>1, 39, 40</sup>

### **Osteopontina (OPN)**

También llamada sialoproteína ósea I (BSPI) o fosfoproteína secretada 1 (SPP1), es una fosfoproteína glicosilada con un peso molecular teórico de 35.4 kDa con un alto contenido de ácido aspártico, puede estar altamente fosforilada en los residuos de serina y treonina. Contiene sitios putativos de unión a calcio, lo que explica su afinidad a los cristales de hidroxiapatita. También presenta un dominio de adhesión celular RGD para interactuar con las integrinas  $\alpha\beta$  3,  $\alpha\beta$  1 y  $\alpha\beta$  5. La osteopontina se une además a colágena, fibronectina y osteocalcina. En el hueso se localiza en el frente de mineralización. Aunque se considera un componente fundamental del hueso, también se localiza en sitios no mineralizados como riñón, células de músculo liso arterial y en la superficie luminal de células epiteliales en tejidos ductales. También se encuentra en la mayoría de las secreciones corporales como orina, leche, saliva y bilis. En los tejidos mineralizados se han determinado al menos tres funciones para ésta proteína: 1) regulación de la adhesión celular, 2) regulación de la actividad osteoclastica y 3) regulación de la mineralización de la matriz extracelular. Se considera que juega un papel importante en la resorción ósea.<sup>10, 47</sup> Datos recientes sugieren que su papel en el proceso de biomineralización está asociado a la inhibición (regulación) del crecimiento de los cristales de hidroxiapatita, integrinas y factores de crecimiento.<sup>1</sup> Durante el proceso de biomineralización es necesario que las células interactúen con su sustrato por medio de integrinas, que son proteínas que actúan como receptores de membrana formando heterodímeros consistentes en una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ ; al ser proteínas transmembranales poseen una porción citoplasmática unida al citoesqueleto. Estas proteínas favorecen la organización del citoesqueleto además de activar diversos procesos celulares, como la proliferación y diferenciación. Esta interacción célula-sustrato propicia la expresión de numerosas moléculas por parte de las mismas células como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-I y II), proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento y diferenciación 5 (GDF-5), entre otros, que estimulan la proliferación y diferenciación celular.<sup>42</sup>

### **Proteína de adhesión del cemento (CAP)**

El gen de la proteína CAP se localiza en el cromosoma 10 p13-14, se considera un splicing alternativo (isoforma 2) del gen PTPLA (Protein-tyrosine phosphatase-like member A). Dicha proteína se expresa mayoritariamente en el desarrollo y etapas posnatales de músculo cardiaco y

en menor medida en músculo esquelético. La proteína CAP está formada por 140 aminoácidos y tiene un peso molecular teórico de 14.9 kDa, su punto isoeléctrico es de 7.78 y carece de péptido señal. Es una proteína con una movilidad relativa de 54 - 57 kDa que se ha aislado, caracterizado y purificado a partir de extractos de cemento maduro bovino y humano, mediante el empleo de un anticuerpo monoclonal anti-CAP bovina (3G9). Se ha inmunolocalizado en la matriz del cemento radicular, en espacios endosteales del hueso alveolar y en zonas paravasculares del ligamento periodontal.<sup>43 - 46</sup>

Se demostró que promueve la migración celular con mayor afinidad para las células del ligamento periodontal y del hueso alveolar que para fibroblastos gingivales hacia la superficie radicular, promueve la adhesión celular mediada por las integrinas  $\alpha\beta1$ ,<sup>47</sup> incrementa la actividad específica de la fosfatasa alcalina y promueve la condrogénesis y mineralización en células mesenquimatosas; es decir, induce la diferenciación celular.<sup>14</sup> También se ha demostrado que fibroblastos tratados con BMP-2 expresan CAP y ALP, por lo que BMP-2 puede reclutar progenitores e inducir la diferenciación celular por medio de la expresión de moléculas específicas de cemento radicular.<sup>48, 49</sup> Las vías de señalización intracelular involucradas que se han identificado y se propone que participan en la proliferación y diferenciación celular son la vía de Smad-1 (vía canónica de señalización de BMP) y MAPK.<sup>50</sup>

### **Proteína del cemento 1 (CEMP1)**

Es una proteína de 247 aminoácidos con un peso molecular teórico de 25.9 kDa, la cual inicialmente fue aislada a partir de una biblioteca derivada de cementoblastos putativos (células derivadas del cultivo de un cementoblastoma humano) cultivados *in vitro*. Su expresión tanto a nivel de ARNm, como de proteína, se limita a cementoblastos, cementocitos, a subpoblaciones de células derivadas del ligamento periodontal con una localización paravascular y en los espacios endosteales del hueso alveolar cercanos al ligamento periodontal. El gen de CEMP1 se localiza en el cromosoma 16 región p13.3. El gen está formado por 1374 nucleótidos que contiene un marco de lectura abierto de 741 nucleótidos. A la fecha, los análisis *in silico* no han demostrado que esta proteína tenga homología significativa en su secuencia de aminoácidos con ninguna otra proteína en las bases de datos.<sup>51</sup>

```

      10          20          30          40          50          60
MGTSSSTDSQQ AGHRRRCSTSN TSAENLTCLS LPGSPGKTAP LPGPAQAGAG QPLPKGCAAV

      70          80          90          100         110         120
KAEVGIPAPH TSQEVRIHIR RLLSWAAPGA CGLRSTPCAL PQALPQARPC PGRWFFPGCS

      130         140         150         160         170         180
LPTGGAQTIL SLWTWRHFLN WALQQREENS GRARRVPPVP RTAPVSKGEG SHPPQNSNGE

      190         200         210         220         230         240
KVKTITPDVG LHQSLTSDPT VAVLRKRAP EAHPPRSCSG SLTARVCHMG VCQGQGDTE

      247
GRMTLMG

```

### Secuencia de aminoácidos de CEMP1 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6PRD7>)

La proteína CEMP1 expresada de forma recombinante en fibroblastos gingivales humanos ha sido caracterizada parcialmente a la fecha. El análisis por dicroísmo circular realizado a dicha proteína recombinante mostró que la estructura secundaria es principalmente de hojas  $\beta$  (32.4%  $\beta$ -anti paralela, 16.7% giros- $\beta$  y 5.8%  $\beta$ -paralela), 10% de  $\alpha$ -hélice y 35% de conformación aleatoria.<sup>52</sup>

La presencia de fosforilaciones y glicosilaciones se han detectado en CEMP1 utilizando anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina, además la identificación de la N-glicosilación de la proteína se llevó a cabo mediante corte enzimático (PNGasa) y cambio en la movilidad relativa en geles de electroforesis SDS-PAGE, y aunque análisis *in silico* predicen sitios para O-glicosilaciones, ensayos experimentales demuestran que CEMP1 no presenta estas modificaciones.<sup>52</sup> Mediante comparaciones con el peso molecular teórico de CEMP1 basado en la secuencia de aminoácidos, se ha logrado deducir que las modificaciones pos-traduccionales contribuyen en 48% al peso total de la proteína nativa (11 kDa por contribución de N-glicosilaciones y 13 kDa por contribución de fosforilaciones), la cual muestra una movilidad relativa (*Mr*) de aproximadamente 50,000 Da.<sup>52, 53.</sup>

No se ha detectado la expresión del ARNm ni de la proteína en otros tejidos humanos como cerebro, corazón, pulmón, hígado y aorta, por lo que constituye a la fecha como el único marcador biológico para el cemento radicular, cementoblastos y los progenitores putativos en el ligamento periodontal.<sup>51, 52, 55</sup> También se demostró que la transfección con el gen de CEMP1 y la sobreexpresión de ésta proteína en células con un fenotipo no mineralizante (fibroblastos gingivales humanos adultos) dio como resultado la diferenciación de dichas células hacia un fenotipo mineralizante.<sup>53</sup>

Mediante experimentos realizados con células en cultivo, se demostró que CEMP1 participa en el depósito y composición de cristales de hidroxiapatita así como en la regulación de la expresión de

las proteínas ALP, OPN y BSP en cementoblastos putativos *in vitro*,<sup>22, 49</sup> por lo que es probable que juegue un papel fundamental en la regulación local de la diferenciación de los cementoblastos y en la mineralización de la matriz extracelular del cemento. Recientemente se utilizó como marcador de cementoblastos derivados de las superficies radiculares de humano y además se confirmó su expresión en cemento, cementoblastos y células derivadas del ligamento periodontal.<sup>56</sup>

Otro estudio demostró que células derivadas del folículo dental tratadas con extracto derivado de proteínas de matriz de esmalte se diferenciaron a un fenotipo cementoblástico expresando CEMP1 y CAP, activándose la fosforilación de Smad-1 y activando la vía de MAPK para la proliferación y diferenciación celular.<sup>55</sup> Aunque a la fecha no se conocen las vías de señalización intracelular involucradas en la diferenciación de los cementoblastos y la mineralización, mediante evidencia experimental se ha dilucidado que CEMP1 induce la fosforilación y translocación al núcleo de dos proteínas cinasas (JNK y p38) encargadas de vías de señalización intracelular relacionadas con la proliferación y diferenciación.<sup>57</sup>

Por otra parte, CEMP1 estimula la proliferación de células del ligamento periodontal en cultivos tridimensionales e induce la formación de estructuras semejantes a tejidos mineralizados como hueso y/o cemento radicular y material similar a cartílago.<sup>58</sup> La adición de la proteína a cultivos tridimensionales de células de ligamento periodontal incrementa la actividad específica de la fosfatasa alcalina (marcador temprano del proceso de biomineralización) e induce la expresión a nivel de ARNm y proteína de marcadores osteogénicos (sialoproteína ósea), cementogénicos (CEMP1 y CAP) y condrogénicos (colágena II, agregcano, colágena X y del factor de transcripción Sox9).<sup>58</sup>

Finalmente el uso terapéutico de CEMP1 ha sido probado en la regeneración de defectos de tamaño crítico en ratas wistar. Al incluir a CEMP1 en una matriz de gelatina y ser colocada en defectos de 9mm en calvarias de ratas, mediante cortes histológicos e imágenes de microtomografía se observó que después de 16 semanas CEMP1 es capaz de regenerar 97% del defecto óseo.<sup>59</sup> Estos resultados abren la posibilidad de que CEMP1 tenga el potencial de ser utilizada en la ingeniería de tejidos y para la reconstrucción de los tejidos periodontales y/o cartílago.

## Estudio de proteínas asociadas al proceso de biomineralización

La función de biomoléculas de matriz de los tejidos mineralizados en vertebrados y no vertebrados, generalmente han sido demostradas como se describe:

- 1) Las moléculas que se cree pueden influenciar el proceso de biomineralización son, primeramente aisladas del tejido mineralizado, purificadas, clonadas y expresadas en formas recombinantes para su estudio. Por otra parte, se analiza su distribución espacial y temporal en el tejido mineralizado, así como su ausencia o presencia en ciertas patologías relacionadas con los tejidos mineralizados y su ausencia en tejidos no mineralizados, además su inmunolocalización e hibridación *in situ* pueden sugerir su papel en la formación mineral.
- 2) La biomolécula bajo estudio puede ser asociada al proceso de biomineralización *in vivo*, mediante estudios en tejidos genéticamente modificados o en organismos enfermos donde la expresión o ausencia de la biomolécula de interés está alterada, inhibida o amplificada
- 3) Estudios de mineralización *in vitro* pueden ser usados para generar información sobre el mecanismo de acción de la biomolécula en cuestión y así dilucidar la función que tiene *in vivo*.
- 4) Ya que se cuenta con evidencia del papel de la proteína en el proceso de biomineralización, la caracterización bioquímica y estructural permitirá generar conocimiento de cómo la macromolécula lleva a cabo las funciones que han sido descritas y poder generar en un futuro alternativas terapéuticas predecibles y controladas que estén encaminadas a la regeneración de los tejidos óseos.

La elucidación de las características estructurales a nivel tridimensional de las macromoléculas biológicas ha dado una importante contribución a nuestro actual entendimiento de muchos mecanismos básicos involucrados en los procesos biológicos. Este enorme impacto resulta de la capacidad de la cristalografía de rayos X de proporcionar detalles estructurales precisos a una resolución atómica, que son un prerrequisito para tener una percepción más profunda de la forma en la cual las proteínas interactúan con otras, con otros complejos o moléculas y la forma tridimensional que adoptan para formar nano-maquinarias capaces de realizar funciones biológicas especializadas.<sup>60, 61</sup>

La determinación de la estructura 3D de una proteína por medio de cristalografía involucra esencialmente seis pasos: 1) Purificación a partir de la fuente nativa. Si no es abundante, entonces se sobreexpresa en sistemas recombinantes. 2) Caracterización bioquímica de la macromolécula. 3) Búsqueda de las condiciones iniciales de cristalización y optimización de la calidad del cristal.

4) Colectar los datos de difracción. 5) Resolver el problema de la fase y afinamiento del modelo 3D. 6) Análisis del modelo obtenido.<sup>60</sup>

La formación del cristal de proteína requiere de interacciones específicas, una alta organización de las moléculas de proteína y direccionalidad en una manera que es apropiada para la formación tridimensional de la red cristalina. Las tres etapas de cristalización comunes a todas las moléculas son la nucleación, el crecimiento del cristal y el cese del crecimiento. Durante la nucleación una cantidad adecuada de moléculas se asocian de igual manera y en forma repetitiva en tres dimensiones para formar un agregado termodinámicamente estable, esto proporciona una superficie apropiada para el crecimiento del cristal. La etapa de crecimiento, que sigue a la de nucleación, es dirigida por la difusión de moléculas a la superficie del núcleo y su ensamble ordenado dentro del crecimiento del cristal. El crecimiento del cristal termina cuando las moléculas de la proteína en la solución se han agotado.<sup>60-62</sup>

A pesar de que la cristalización de las proteínas se descubrió hace 150 años y que fue desarrollada en el siglo XIX como una herramienta que indicaba la purificación de una proteína, a la fecha, es una técnica que involucra para su ejecución de cantidades relativamente grandes de proteína con un alto grado de pureza, conformaciones estables de la proteína en solución, el uso de aditivos específicos para lograr la estabilidad y solubilidad, del uso de agentes precipitantes y de periodos en algunos casos de meses o inclusive años para que se propicien las condiciones iniciales de cristalización.<sup>62</sup>

Es por este motivo que la aplicación de técnicas complementarias que generen información bioquímica y estructural ha sido usada ampliamente y se consideran de gran valor para ayudar a establecer las condiciones iniciales de cristalización cuando no se tienen modelos de referencia y complementar la caracterización tridimensional cuando está se consiga.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

El cemento radicular fue descrito por primera vez en 1835 y hasta la fecha permanece como un tejido pobremente caracterizado a nivel celular y molecular. La investigación a través de los años ha demostrado histológicamente que el cemento es un tejido único, mientras que los estudios de las proteínas expresadas por las células que secretan el cemento radicular (cementoblastos) han identificado dos proteínas cemento-específicas: CAP y CEMP1. Las investigaciones realizadas sobre CEMP1 muestran que esta proteína es de suma importancia en el proceso de cementogénesis. Es por esto que la caracterización bioquímica - estructural de CEMP1 contribuirá al esclarecimiento del mecanismo de acción biológica, además de generar conocimientos asociados a la biología estructural del cemento radicular. El conocimiento generado a partir de la caracterización de CEMP1 proporcionará nuevos elementos que ayudarán a comprender el proceso de cementogénesis y a aplicar dichos conocimientos en el diseño de terapias encaminadas a lograr la regeneración de las estructuras periodontales y tejidos mineralizados.

## **HIPÓTESIS**

Las características bioquímicas y estructurales de la proteína del cemento 1 (CEMP1) están altamente asociadas en el proceso de mineralización de cristales de fosfato octacálcico e influyen en su actividad biológica.

## **OBJETIVOS**

**Objetivo General:** Caracterizar bioquímica - estructuralmente a la proteína del cemento 1 utilizando técnicas analíticas.

### **Objetivos específicos**

- Generar un sistema de expresión recombinante que permita obtener rendimientos adecuados para los posteriores estudios bioquímicos – estructurales.
- Establecer un protocolo de purificación de la proteína del cemento 1 recombinante humana (hrCEMP1).
- Realizar la caracterización bioquímica de la proteína del cemento 1.
- Obtener las condiciones iniciales de cristalización de la proteína.
- Determinar la estructura tridimensional utilizando técnicas de SAD (*single anomalous dispersión*) o SULFUR SAD para resolver el problema de las fases debido a que a la fecha no existe alguna estructura homóloga a esta proteína.
- En el caso de no obtener cristales de proteína, generar un modelo tridimensional teórico utilizando servidores informáticos.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Clonación y expresión de la proteína CEMP1 en el sistema *Pichia pastoris*.**

#### **Cepa y plásmido.**

La cepa de expresión *Pichia pastoris* GH115 genotipo his 4, fenotipo his 5, Mut+ y el vector pPICZA (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), fueron usados para la expresión del gen CEMP1. *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen Carlsbad CA, USA), fue usada como receptor para la manipulación del ADN. La secuencia codificante de CEMP1 se obtuvo a partir del plásmido pDEST-CEMP1 que previamente se había construido y almacenado en el laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados.

#### **Construcción del vector de expresión pPICZA-CEMP1.**

La secuencia de 741 pares de bases que codifica para los 247 aminoácidos que forman a CEMP1 fue amplificada a partir de la construcción pDEST42-CEMP1. Los cebadores usados para la amplificación del gen contenían los sitios de restricción para EcoR1 y Nco1 fueron nombrados como CEMP1F y CEMP1R.

Al producto de PCR se le realizó una doble digestión, usando las enzimas de restricción EcoR1 y Nco1, entonces fue ligado al vector pPICZA, el cual había sido digerido con las mismas enzimas, formando el plásmido de expresión pPICZA-CEMP1. El plásmido pPICZA-CEMP1 codifica para una proteína de fusión formada por CEMP1 unida a dos banderas (myc-tag y 6x-His) unidas al carboxilo terminal de la proteína. El peso molecular predicho para esta proteína de fusión es de 28kDa. El plásmido ligado pPICZA-CEMP1 fue transformado en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y seleccionadas a partir de placas de agar Luria Bertani (10g/L triptona, 5g/L extracto de levadura, 10g/L NaCl pH 7.0) conteniendo 100  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las células que se transformaron positivamente y que contenían el plásmido de expresión pPICZA-CEMP1 fueron seleccionadas. La secuencia y direccionalidad del plásmido fue verificada mediante doble digestión y secuenciación.

#### **Transformación y selección de *P. pastoris* con alta capacidad de expresión.**

El plásmido pPICZA-CEMP1 fue digerido con la enzima de restricción EcoR1 y Nco1. El plásmido en forma lineal fue transfectado en células de *P. pastoris* GS115 mediante pulsos de electroporación bajo las siguientes condiciones: 1500 volts, 5 ms. Las células electroporadas fueron cultivadas en

placas de agar MD (1M sorbitol, 13,4 g/L YNB, 0.04g/L histidina,  $4 \times 10^{-4}$  g/L biotina, pH 7.0). Después de un periodo de incubación de 28°C durante 48 – 72 hrs, se seleccionaron colonias al azar y el gen de CEMP1 fue detectado mediante ensayos de PCR. Las colonias seleccionadas fueron resuspendidas en 100ml de medio BMGY (10 g/L extracto de levadura, 20 g/L peptona, 100 mM fosfato de potasio, pH 6.0, 13.4 g/L YNB,  $4 \times 10^{-4}$  gr/L biotina y 2% glicerol v/v) e incubadas a 28 °C hasta que la densidad óptica del cultivo alcanzo una  $OD_{600} = 6 - 8$  (fase logarítmica de crecimiento). Posteriormente estas células fueron colectadas mediante centrifugación a 1800 g durante 6 minutos a temperatura ambiente. Para inducir la expresión de la proteína CEMP1, los botones celulares fueron resuspendidos en 500 ml medio BMMY (medio BMGY con 2.0% metanol en lugar de glicerol), y se crecieron a 28°C durante 48 hrs en una incubadora orbital a 230 rpm. Una concentración final de 2% de metanol fue agregada en intervalos de 24hrs hasta el tiempo final de inducción.

### **Inmunodetección**

La detección e identificación de la proteína hrCEMP1 en todos los pasos de purificación se realizó por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), e inmunodetección por medio de Western blot. Una vez realizada la electroforesis en condiciones desnaturizantes, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Nitrocellulose-1, Gibco BRL) durante 1 hora. La membrana se bloqueó para evitar sitios inespecíficos de unión de los anticuerpos (50 ml de TBST, 2.5 gr de leche descremada). Posteriormente se incubó durante 24 horas con un anticuerpo policlonal anti-CEMP1 y con un anticuerpo anti-6xHis (His-probe H-15 Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:5000 cada uno. Transcurrido el periodo de incubación del primer anticuerpo se realizaron 3 lavados de 10 minutos a las membranas con TBST y se incubó el anticuerpo secundario anti conejo durante 2 horas a una dilución de 1:3000. Pasado el periodo de incubación del anticuerpo secundario se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBST y la inmunodetección se llevó a cabo mediante precipitación de diaminobenzidina.

### **Extracción y Purificación de hrCEMP1.**

Una vez completado el periodo de inducción, las células se colectaron por medio de centrifugación en ciclos de 10 min a 2000 rpm en temperatura ambiente. El botón celular fue resuspendido en amortiguador de lisis (Tris HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, inhibidores de proteasas (Complete Roche, una

tableta por cada 50 ml de amortiguador), 4ml de amortiguador por cada gramo de biomasa). Una vez resuspendidas las células, éstas fueron sometidas a vibración ultrasónica para extraer las proteínas al medio extracelular. Los restos insolubles fueron separados por un ciclo de centrifugación de 15 minutos a 30,000 rpm, 4°C. La fase soluble se filtró usando una membrana de nitrocelulosa con un punto de corte de 0.22 µm y se cuantificó la concentración de proteína usando la técnica de Bradford (Bio-Rad Protein Assay).

La purificación de la proteína CEMP1 se realizó por medio de una cromatografía de afinidad a carbohidratos (Con A Sepharose 4B, GE Healthcare Sweden). El extracto crudo de proteínas se cargó en la columna y se circuló en ésta durante dos horas a 4°C para permitir la interacción de CEMP1 con la concanavalina. Transcurrido este periodo de tiempo se hizo un lavado con una solución de metil α-D-manopiranosido 10mM, NaCl 100mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7.2 usando cinco volúmenes de columna. Se realizaron eluciones escalonadas usando las siguientes concentraciones de metil α-D-manopiranosido: 20mM, 50mM, 100mM, 200mM y 500mM (todas las eluciones adicionadas de NaCl 100mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7.2). La visualización de la purificación se llevó a cabo mediante lecturas de espectrofotometría a 280 nm y electroforesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

## **CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA CEMP1**

### **Determinación de la masa molecular**

La determinación de la masa molecular de CEMP1 fue obtenida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption / Ionization-time of flight). Esta técnica está basada en la formación de una red de cristales producidos por matrices sólidas que favorecen la desabsorción e ionización del analito a través de pulsos de láser rápidos. En los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF), los iones positivos se producen periódicamente por bombardeo de la muestra con impulsos de electrones, de iones secundarios o de fotones generados por láser. Los instrumentos de MALDI-TOF tienen un “espejo de iones”, el cual desvía los iones con un campo eléctrico, modificando la trayectoria de vuelo del ion y aumentando la resolución. La muestra de CEMP1 pura se preparó a una concentración de 1mg/ml, utilizando como matriz ácido 2' 5' - Dihidroxibenzoico. Los controles que se utilizaron para calibrar el equipo son proteínas estándar

como: aldosa reductasa (36,020 Da) y Mioglobina (16,950 Da). La relación masa/carga (m/z) para el ion molecular se obtuvo utilizando un espectrómetro MALDI -TOF Microflex Bruker Daltonics.

### **Determinación del contenido de estructura secundaria**

El contenido de estructura secundaria se determinó por Dicroísmo Circular (D.C.) en el UV lejano (190-260nm). La muestra se preparó dializando la proteína pura contra amortiguador de fosfato de sodio 20 mM pH 7.2 y ajustando su concentración a 0.2 mg/ml. El espectro se obtuvo en un espectropolarímetro Jasco J -710, a temperatura constante de 25°C, utilizando una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso óptico. El espectro final representa el promedio de tres acumulaciones individuales realizadas cada 1 nm a una velocidad de barrido de 20 nm/min. El resultado se expresa en valores de elipticidad ( $\Theta$ ) molar, (grado\*cm<sup>2</sup>/dmol) considerando una masa molecular promedio por residuo de 110 g/mol utilizando la siguiente ecuación:

$$\Theta \text{ Molar} = \frac{\Theta_{\text{obs}} * \text{MW}}{[\text{P}] * d}$$

Donde  $\Theta$  molar es la elipticidad molar,  $\Theta_{\text{obs}}$  es el valor de la elipticidad en mdeg (miligrados), MW es el peso molecular promedio de los aminoácidos, [P] es la concentración de proteína en mg /cm<sup>3</sup> y d es el paso óptico en cm. El procesamiento de los datos se realizó con el software Dicroprot que utiliza un método de deconvolución de datos basado en el algoritmo de Hennessey y Johnson.

### **Prueba de Actividad Biológica.**

Formación de cristales de fosfato de calcio.

Los estudios de mineralización *in vitro* pueden ser usados para generar información sobre el mecanismo de acción de la biomolécula en cuestión y así dilucidar la función que tiene *in vivo*. Recientemente se han introducido técnicas libres de células que utilizan precipitación en geles para ayudar a dilucidar como las proteínas no colágenas y otras biomoléculas actúan en el proceso de biomineralización.

Se utilizó el sistema de contradifusión en gel de silicato para determinar si hrCEMP1 tiene la capacidad de actuar como un nucleador y/o regulador de cristales de fosfato de calcio. Este sistema permite incorporar a la proteína en el gel a temperatura y pH fisiológicos (37°C y 7.4 respectivamente) y que ésta permanezca estable durante el tiempo que dura el experimento. El gel no interacciona con el proceso; lo que permite conocer el efecto de la biomolécula por sí sola, además de permitir el estudio de la nucleación de cristales de *novo*, la nucleación heterogénea y la regulación del crecimiento de los cristales.

El sistema para la formación de cristales de fosfato de calcio consistió en un aditamento formado por dos vidrios de 7 cm x 9 cm x 3 mm, separados por un marco de neopreno de 3 mm de grosor. El marco se ajustó a los vidrios, se selló con silicón de vacío y sujetadores metálicos para evitar fugas. Se preparó la solución que formaría el gel (2 ml de metasilicato de sodio 1.06 gr/ml, 1.8 ml de HEPES 10 mM pH 7.4, 0.2 ml de HEPES buffer 10mM pH 7.4 adicionado con azida de sodio 1% y 1.08 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M), en estado líquido se agregó 5 ml al interior del sistema. Posterior a la gelificación de éste, se llenó el aditamento con la solución de cloruro de calcio 100mM pH 7.4 (5 ml) y se selló el sistema incubándolo durante 14 días a 37°C. Las pruebas del grupo experimental se realizaron agregando 20 µg de la proteína purificada hrCEMP1 por cada mililitro de solución de gel de silicato, un grupo control negativo utilizando 20 µg albúmina de suero bovino (BSA Sigma St Louis MO) por cada mililitro de solución de gel de silicato y un grupo control sin agregar proteína. Transcurrido el periodo de tiempo para el crecimiento de los cristales, éstos se recuperaron del gel de silicato manualmente con MicroMounts de 150 µm (MiTeGen Ithaca, NY) y almacenados en tubos eppendorf de 1.5 ml para su posterior procesamiento y análisis con microscopía electrónica de barrido y análisis EDS.

### **Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de energía dispersiva de Rayos X**

La composición elemental de los cristales que se formaron en el sistema de contradifusión en gel de silicato, así como la determinación de su morfología fue realizada con el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM) Leica-Cambridge Modelo StereoScan 440, el cual está equipado con una microsonda Pentafet para microanálisis de energía dispersiva de rayos X (EDS). Todos los análisis se hicieron a 20 kV durante 300 segundos. La relación Ca/P se calculó mediante el análisis de porcentajes atómicos de los elementos identificados en el espectro.

### **Tinción de glicoproteínas SDS-PAGE.**

Los proteoglicanos son tradicionalmente teñidos con pigmentos catiónicos como son el azul de Alciano y el azul de Toluidina, que se unen a las cadenas laterales cargadas negativamente de los glicosaminoglucanos, mientras las glicoproteínas mas neutrales pueden ser visualizadas mediante variaciones de la reacción de Schiff – base que involucran una oxidación inicial de los carbohidratos por el ácido periódico y una tinción subsecuente con el reactivo de Schiff, azul de Alciano o derivados de hidracina. Teniendo en cuenta éstos antecedentes se decidió hacer una tinción a partir de un gel de electroforesis SDS-PAGE para identificar si hrCEMP1 presenta azúcares unidos covalentemente.

Después de realizar la electroforesis SDS-PAGE, se colocó el gel en la solución de fijado (ácido tricloroacético al 20%) durante 10 minutos a 30 °C. Transcurrido el tiempo de fijado el gel se lavó dos veces en intervalos de dos minutos con ácido acético al 5% y se incubó el gel en una solución oxidante (ácido periódico 1%) durante 20 minutos a 30°C. El gel se lavó durante dos minutos con ácido acético al 5% y se incubó con una solución reductora (metabisulfito de potasio 0.5%) por 12 minutos a 30°C. Después el gel se lavó con una solución de etanol 25% y ácido acético 10% dos veces con intervalos de dos minutos entre cada lavado a 50°C. Posterior a éstos lavados el gel se incubó en la solución de teñido (azul de alciano 0.125% diluido en una solución de etanol 25% y ácido acético 10%) durante 15 minutos a 50°C. El gel se lavó nuevamente con etanol 25% y ácido acético 10% en intervalos consecutivos de 1, 4 y 5 minutos y después se incubó con una solución de etanol 10% y ácido acético 5% en intervalos de 2 y 4 minutos a 50°C. El gel se incubó en glutaraldehído 5% durante 6 minutos a 50°C y se lava con etanol 10% y ácido acético 5% en periodos de 3 y 5 minutos seguidos de dos lavados con agua destilada en intervalos de dos minutos a 50°C. Una vez realizados los lavados se colocó el gel en una solución de plata (nitrato de plata 0.4%) durante 7 minutos a 40°C seguidos de dos lavados de treinta segundos con agua destilada a 30°C. Se colocó al gel en la solución de revelado (carbonato de sodio 2.5% y formaldehído 0.013%). Una vez obtenida la intensidad de señal la reacción se detiene agregando 5 ml de solución de paro (ácido acético 10% y glicerol 10%). La tinción es positiva cuando en el gel se observan bandas de color café que indican que los pigmentos han interactuado con los carbohidratos y la plata se ha precipitado sobre éstos.

### **Ensayos de desplazamiento térmico de hrCEMP1. (Aditivos, amortiguadores y pH).**

La búsqueda de aditivos y amortiguadores que permitiera una solubilidad y estabilidad mayor de la proteína hrCEMP1 se llevaron a cabo usando el fluoróforo SYPRO Orange (Life Technologies). La relación de volumen proteína/fluoróforo fue de 1:50. La búsqueda del amortiguador y aditivos se realizó con el sistema Wizard pH Buffer Screen y el Solubility and Stability Screen (Hampton Research), respectivamente.

Para realizar los ensayos de desplazamiento térmico, se utilizó una microplaca de 96 pozos de RT-PCR donde se cargaron 10  $\mu$ l a cada pozo con una de las 96 soluciones del sistema Solubility and Stability Screen, y otra caja donde se cargaron 14 pozos con 10  $\mu$ l de cada una de las 14 condiciones utilizadas del sistema Wizard pH buffer. A estos pozos, se les agregó a cada uno 10  $\mu$ l de una solución de hrCEMP1 (0.5mg/ml en amortiguador de citrato de sodio 10mM, pH 6.5), adicionada con el fluoróforo SYPRO Orange dye a un volumen final de 1:1000. Una vez realizadas las mezclas se selló la microplaca con una película plástica y se centrifugó a 500xg durante un minuto a 25°C. La medición de la T<sub>m</sub> se llevo a cabo en un termociclador donde se utilizó un ciclo de calentamiento para cada condición de 25°C a 96°C. El sistema cuanta con un control de dilución donde solo se utiliza agua ultra pura como diluyente y ácido tricloroacético como control de agregación. El aumento en la estabilidad será comparado con los valores del control de dilución y de precipitación.

En ambos estudios, la fluorescencia del compuesto SYPRO Orange incrementa significativamente cuando el fluoróforo se une a las áreas hidrofóbicas internas de la proteína que empiezan a ser expuestas tras la desnaturalización ocasionada por el incremento en la temperatura. La estabilidad de la proteína o temperatura media de desnaturalización (T<sub>m</sub>), puede ser medida dependiendo la intensidad de fluorescencia. La incorporación de aditivos que se unen e interaccionan con la proteína, las variaciones de pH y amortiguadores que favorecen la estabilidad y solubilidad de hrCEMP1 fueron identificados en función de un aumento en la T<sub>m</sub>.

### **Predicción de cristalización de hrCEMP1.**

El análisis de la predicción de la posibilidad de cristalización de hrCEMP1 se realizó mediante el servidor informático XtalPred-RF server (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>). Este servidor web compara características bioquímicas y biofísicas de la proteína (región desordenada

más extensa, índice de inestabilidad, longitud de proteína, porcentaje de estructuras aleatorias, punto isoeléctrico, índice de inserción) con la correspondiente distribución de probabilidad obtenida a partir un objetivo en la base de datos. Se genera una gráfica para cada característica de la proteína y muestra la distribución de fallos y éxitos extraídos de la base de datos y se muestra la posición de la proteína blanco en estas distribuciones.

La predicción de la cristalización está hecha combinando las probabilidades de cristalización individual dentro de una gráfica única donde se le otorga una calificación. Con base a esta calificación, a la proteína se le asigna una de las cinco clases de cristalización: óptima, sub-óptima, promedio, difícil y muy difícil. Cada clase representa diferentes radios de logros observados en la base de datos.

#### **Construcción del modelo tridimensional teórico hrCEMP1.**

La construcción del modelo tridimensional teórico de hrCEMP1 se realizó mediante el servidor informático I-TASSER (<http://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/I-TASSER/>). Este es una plataforma en línea para realizar predicciones de estructura y función de proteínas. Los modelos 3D son construidos con métodos *Ad Initio* y con base en múltiples alineamientos de la secuencia de aminoácidos de la proteína a estudiar con estructuras de proteínas depositadas en el PDB (Protein Data Bank).

#### **Dispersión Dinámica de Luz.**

Se utilizó el equipo de Dispersión Dinámica de Luz “Zetasizer Nano” (Malvern Co) y el programa informático Zetasizer Family Vol 7 para la visualización y el análisis de los datos. Para el estudio se emplearon 400  $\mu\text{L}$  de CEMP1 pura a una concentración 0.5 mg/ml resuspendida en diferentes amortiguadores (fosfato de sodio 10mM pH 7.4, citrato de sodio 50mM pH 6.5 y fosfato de sodio 10mM + 1mM de cloruro de calcio pH 7.4), previo a realizar las mediciones tanto los amortiguadores como las muestras de proteína se filtraron utilizando membranas con un tamaño de poro de 0.22 $\mu\text{m}$  (Millipore).

Las moléculas en solución se desplazan debido al movimiento browniano. Este movimiento se relaciona con el coeficiente de difusión y éste con el radio de la molécula, ya que se sabe que las moléculas pequeñas se mueven más rápido que las de mayor tamaño. Se hace incidir sobre la molécula un rayo láser, la intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado puede ser seguida en intervalos de tiempo. Como la partícula se mueve, la señal medida fluctúa y midiendo dichas fluctuaciones y el cambio en éstas en intervalos de tiempo, se puede calcular el coeficiente de difusión traslacional de las moléculas ( $D_T$ ); con la ecuación de Stokes-Einstein.

$$D_T = k_B T / 6\pi\eta R_H$$

Donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $\eta$  es la viscosidad de la solución,  $T$  es la temperatura absoluta y  $R_H$  el radio hidrodinámico

Además, es posible determinar el peso molecular por medio de la ecuación de Mark Houwink  $D_T = A_0 M^b$ . Ésta ecuación considera la relación directamente proporcional del coeficiente de difusión traslacional ( $D_T$ ) con el peso molecular ( $M$ ), elevado a una potencia específica. Así, la constante de proporcionalidad que surge de esta ecuación toma en cuenta las propiedades del disolvente ( $A_0$ ). Esta ecuación requiere de una estimación adecuada del factor de estructura ( $b$ ), que para el caso particular de proteínas esféricas tiene un valor de 0.33 y se aplica también a modelos cuasi-esféricos.

De esta manera mediante la dispersión dinámica de luz es posible determinar: el coeficiente de difusión, el radio hidrodinámico, el peso molecular y la polidispersidad de la proteína en solución.

### **Pruebas de actividad aglutinante**

En esta técnica se observó la aglutinación de eritrocitos de conejo formalizados por la proteína hrCEMP1. En una placa de microtitulación de 96 pozos de fondo cóncavo, se llenó una fila de pozos con 50  $\mu$ L de amortiguador de Tris HCl a una concentración de 0.5M, pH 7.4 y otra fila con 50  $\mu$ L del mismo amortiguador adicionado con cloruro de calcio 5mM, pH 7.4. Se agregó en el primer pozo de cada fila 50  $\mu$ L de la proteína CEMP1 a una concentración de 0.1 mg/mL y se hizo una dilución seriada de la proteína en cada pozo de la fila. A cada pozo que ya contenía el amortiguador y la proteína se le agregaron 50  $\mu$ L de una suspensión al 2% de eritrocitos formalinizados de conejo. La placa de microtitulación se incubó a 37°C durante una hora y la

actividad aglutinante se evaluó por medio de visualización directa, teniendo como control de aglutinación positivo a una lectina de alta actividad y como control negativo solo agua. La actividad aglutinante positiva se observa como una fina capa de color rojo –pardo en la superficie del pozo, que está formada por el entrecruzamiento de los eritrocitos y la proteína. La ausencia de actividad se observa por la formación de un botón o un halo de color rojo en el fondo del pozo, formado por los eritrocitos precipitados.

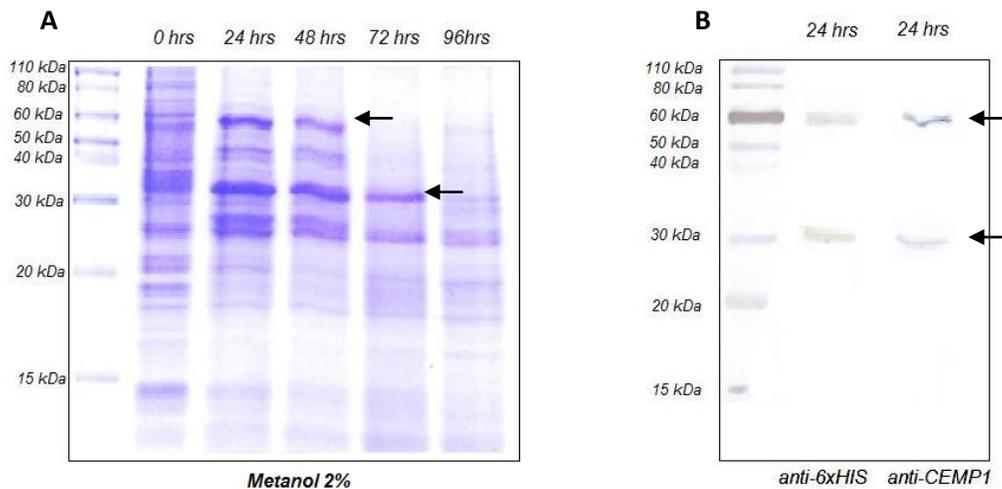
### **Ensayos de cristalización de proteína**

Los ensayos para establecer la condición inicial de cristalización se utilizaron las condiciones establecidas en los sistemas de cristalización Crystal screen I, II y PEG-Ion de *Hampton research*. La proteína purificada hrCEMP1 fue utilizada a una concentración de 5 mg/ml, dializada contra amortiguador de HEPES 50mM pH 7.2, citrato de sodio 50mM pH 6.5 y citrato de sodio 50mM adicionado de sulfato de cadmio 2mM pH 6.5 y filtrada por una membrana de un tamaño de poro de 0.22 $\mu$ m. La metodología que se empleó fue la de difusión en fase vapor, en la modalidad de gota colgante, usando placas de 24 pozos e incubando las pruebas a 18°C. Las pruebas de cristalización se observaron a partir de las dos semanas y en periodos regulares de dos semanas mediante un microscopio de luz polarizada.

## RESULTADOS

### EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CEMP1

La inducción de la expresión de hrCEMP1 se realizó añadiendo al cultivo de *Pichia pastoris* metanol a una concentración final del 2% cada 24hrs hasta completar 48 horas de incubación a 28°C en agitación. La expresión diferencial de hrCEMP1 en *Pichia pastoris* se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE. A partir de muestras de cultivo, tomadas a los tiempos 0, 24, 48, 72 y 96 horas de inducción, se realizó la extracción de las proteínas citoplasmáticas y se realizó una electroforesis SDS-PAGE 12%. La expresión diferencial se observó a partir de las 24 horas con respecto al tiempo cero de dos bandas predominantes con una movilidad relativa de 30 kDa y 60 kDa (Figura 2-A). Al realizar análisis de Western blot a estas muestras, utilizando anticuerpos dirigidos contra la proteína y contra la bandera de histidinas de la proteína recombinante, se logro identificar como CEMP1 a las especies de 30 y 60 kDa, representando éstas posiblemente a la proteína en forma mono y dimérica (Figura 2-B).

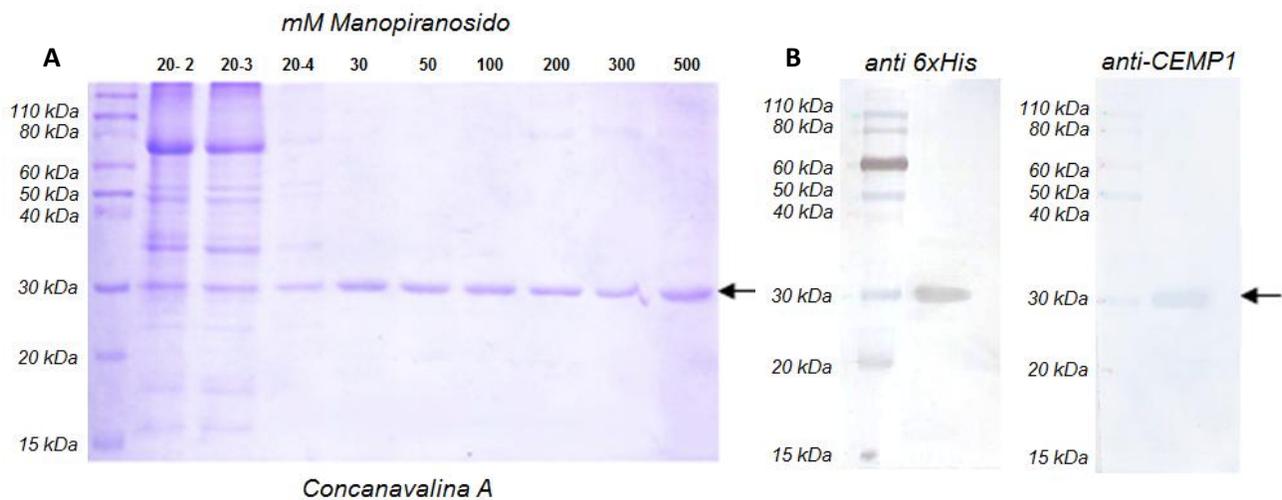


**Figura 1 A.** Gel de electroforesis SDS-PAGE donde se observa la cinética de expresión de hrCEMP1 en diferentes periodos de tiempo inducida con metanol 2%. **B.** Western blot del periodo de 24 horas de la cinética de expresión hrCEMP1, los anticuerpos dirigidos contra la bandera de histidinas que tiene la proteína recombinante y el anticuerpo contra CEMP1 identifican a dos especies de 30 y 60 kDa como positivas a CEMP1.

Una vez establecido que el tiempo óptimo de inducción es el periodo comprendido entre las 24 y 48 horas de inducción, el cultivo se centrifugó para colectar las células (ciclos de 10 minutos a 2,000 rpm, 4°C, 554 g). Las células colectadas se resuspendieron en amortiguador de lisis (4 ml por cada gramo de biomasa) y se realizó la lisis de éstas mediante vibración ultrasónica. Los restos insolubles fueron separados por centrifugación y el extracto soluble se filtró usando membranas con un poro de 0.22  $\mu$ m.

La purificación de CEMP1 se realizó mediante una columna de afinidad a lectina (Concanavalina Con A sheparose, GE). El extracto de proteínas solubles se circuló por la columna de cromatografía durante dos horas, posteriormente se realizaron cuatro lavados utilizando metil  $\alpha$ -D manopiranosido 20mM, y eluciones escalonadas con las siguientes concentraciones de metil  $\alpha$ -D manopiranosido: 30mM, 50mM, 100mM, 200mM, 300mM y 500mM. El proceso de purificación de hrCEMP1 fue visualizado mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% y tinción con azul de coomassie (Figura 3-A)

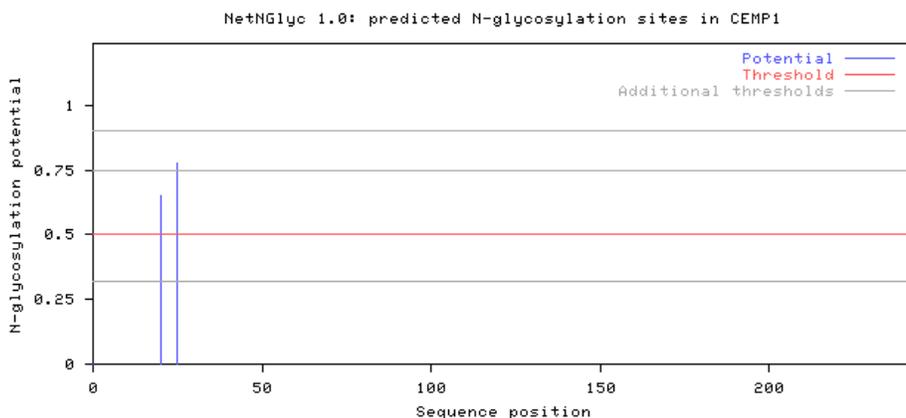
La identidad de la proteína purificada se confirmó mediante análisis de Western blot, los anticuerpos contra la bandera de histidinas y contra CEMP1 reconocieron a la especie purificada de 30 kDa (Figura 3-B).



**Figura 3.** **A.** Purificación de la proteína hrCEMP1 utilizando cromatografía de afinidad a carbohidratos (Con A sheparose), se visualiza una purificación homogénea en las fracciones de 30mM a 100mM de metil  $\alpha$ -D manopiranosido. **B.** Western blot anti 6xHis y anti-CEMP1 de la proteína purificada, ambos anticuerpos confirman la identidad de la proteína purificada como CEMP1.

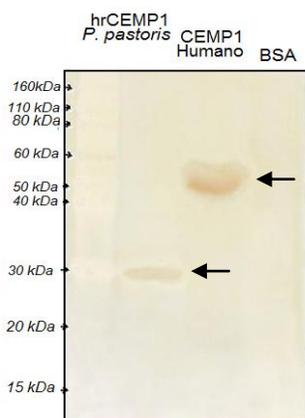
## IDENTIFICACIÓN DE GLICOSILACIONES SDS-PAGE

Mediante análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de CEMP1 en el servidor informático NetN Glyc 1.0 Server, se predicen dos sitios para N-glicosilación en las asparaginas de las posiciones 20 y 25 (Figura 4).



**Figura 4.** Predicción de los posibles sitios de N – glicosilación en la proteína CEMP1. El servidor informático identifica a las asparaginas de las posiciones 20 y 25 como posibles sitios de N – glicosilación. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

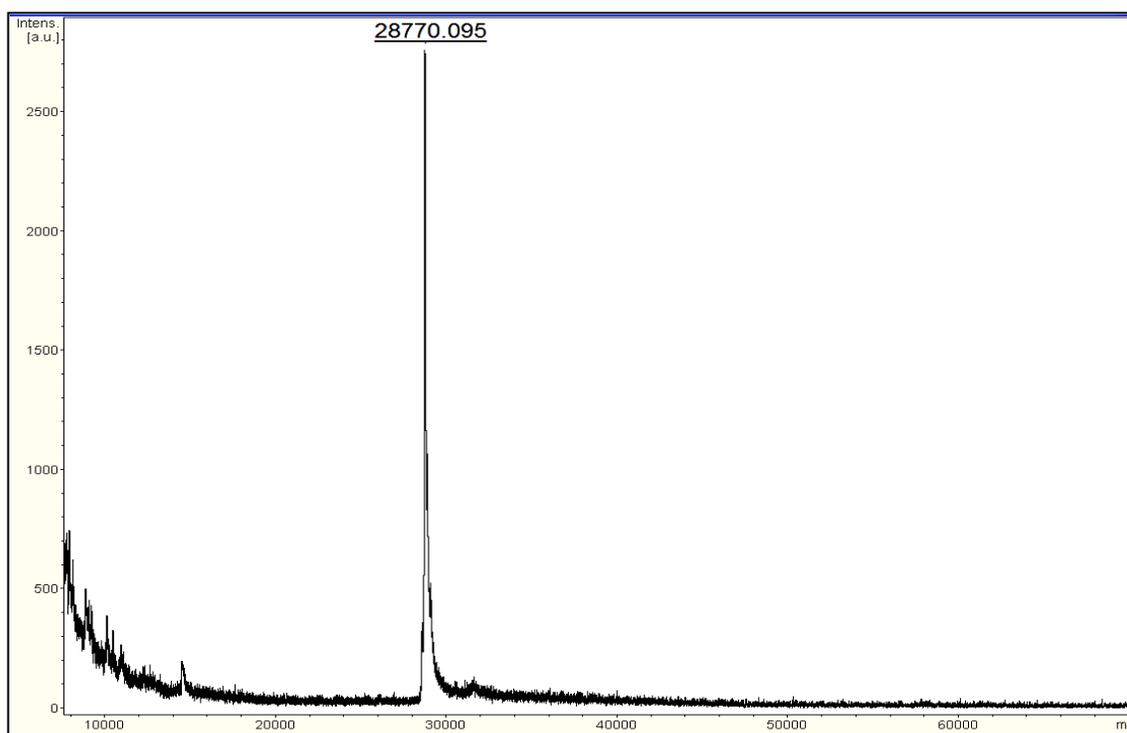
Con la finalidad de confirmar si hrCEMP1 expresada en *Pichia pastoris* presenta glicosilaciones se hizo una tinción específica para este fin a partir de un gel SDS-PAGE con 20 µg de hrCEMP1 de *Pichia pastoris*. Se utilizó como control positivo 20 µg de CEMP1 nativa purificada, que se ha reportado como una proteína altamente glicosilada y como control negativo 20 µg de albúmina de suero bovino (Figura 5).



**Figura 5.** La tinción fue positiva a hrCEMP1 de *Pichia pastoris* y a CEMP1 nativa, la tinción fue negativa a la albúmina. Está tinción demuestra que hrCEMP1 expresada en *Pichia pastoris* es una glicoproteína.

## DETERMINACIÓN DE LA MASA MOLECULAR

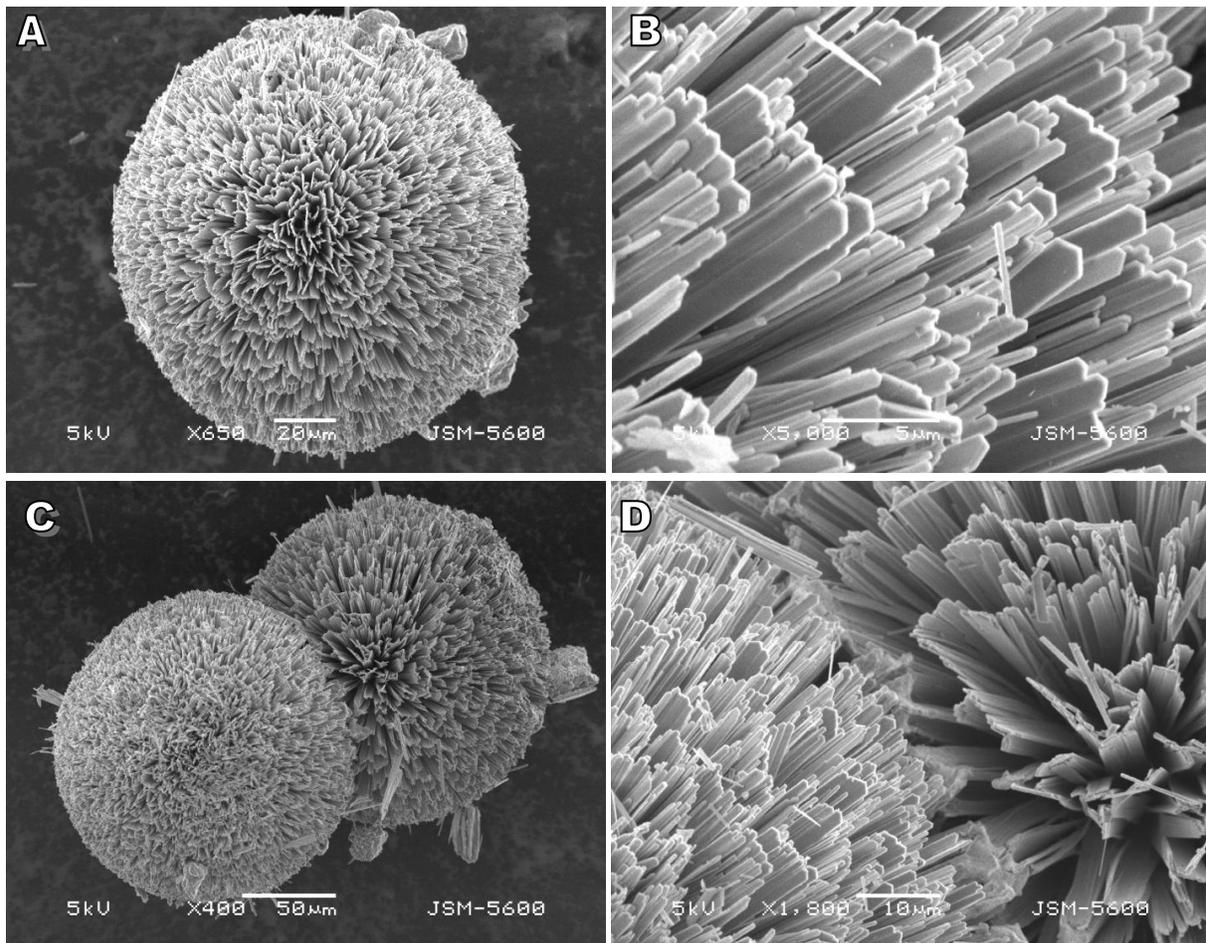
Para determinar el peso molecular de hrCEMP1 expresada en *Pichia pastoris* se decidió realizar espectrometría de masas a la proteína hrCEMP1 purificada. El peso molecular teórico de los 247 aminoácidos de CEMP1 mas las banderas myc-tag y 6xHis-tag que presenta la proteína recombinante es de 28,081 Da. En la Figura 6 se muestra el resultado de la espectrometría de masas donde se observa que hrCEMP1 tiene una masa de 28,770 Da (100%), que representa a hrCEMP1 en estado de monómero. Esto indica una diferencia de 689 Da (2.4%), con el peso molecular teórico de la secuencia de aminoácidos de hrCEMP1. Esta diferencia de peso es causada por las glicosilaciones que están presentes en la proteína expresada en *Pichia pastoris*.



**Figura 6.** Espectrometría de masas MALDI-TOF de la proteína purificada hrCEMP1. La señal que se observa corresponde con una molécula con un peso de 28,770 Da. La diferencia del peso teórico esperado con el peso experimental se debe a la presencia de glicosilaciones que tiene hrCEMP1.

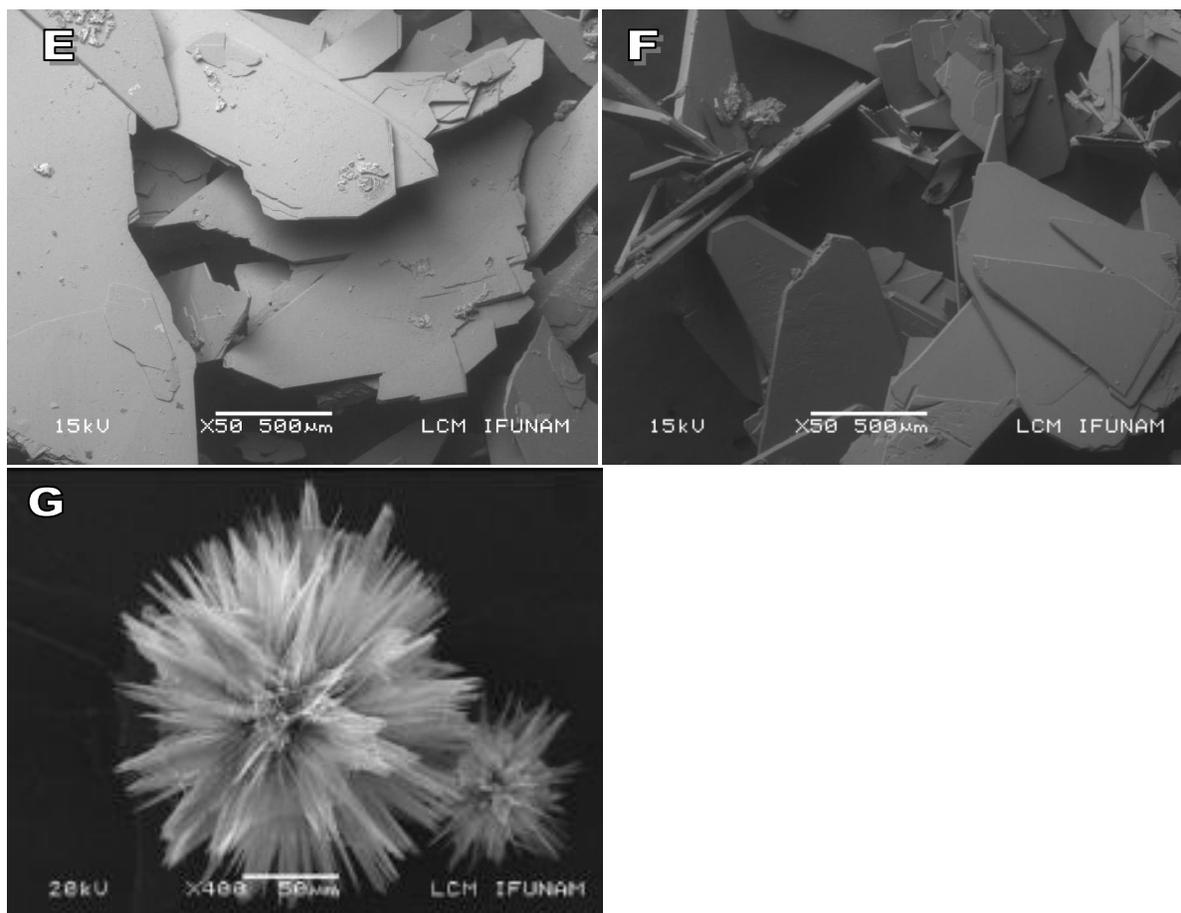
## ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Con la finalidad de determinar si la proteína hrCEMP1 expresada en *Pichia pastoris* tiene actividad biológica se llevaron a cabo los ensayos de formación de cristales de fosfato de calcio en el sistema de contradifusión en gel de silicato, este ensayo se emplea para determinar la función de proteínas asociadas a la biomineralización. Los cristales que se formaron después de 14 días de incubación fueron colectados y se les realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de barrido a diferentes aumentos. Esta herramienta permitió determinar la morfología tridimensional de los cristales formados en presencia de hrCEMP1 y de los grupos controles con BSA y sin proteína.



**Figura 7.** Microfotografías de los cristales obtenidos en el sistema de contradifusión en gel de silicato inducidos con hrCEMP, imágenes obtenidas con microscopía electrónica de barrido.

En las microfotografías A y C de la Figura 7 se observa la morfología de esférulas de 130 a 150 $\mu$ m de diámetro que adquieren los cristales formados en presencia de hrCEMP1 a los 14 días de incubación. En las microfotografías B y D se distingue la superficie de las esférulas (A y C respectivamente), la cual está formada por múltiples placas alargadas de 0.5 a 1  $\mu$ m de grosor, que tienen un origen en común en el centro de la esférula.



**Figura 8.** E. Microfotografía de las estructuras obtenidas en el sistema de contradifusión en gel de silicato sin el uso de proteína y F, estructuras formadas en presencia de una proteína que no participa en el proceso de biomineralización (BSA). G, Cristales de fosfato octacálcico formados en presencia de hrCEMP1 expresada en fibroblastos gingivales humanos.

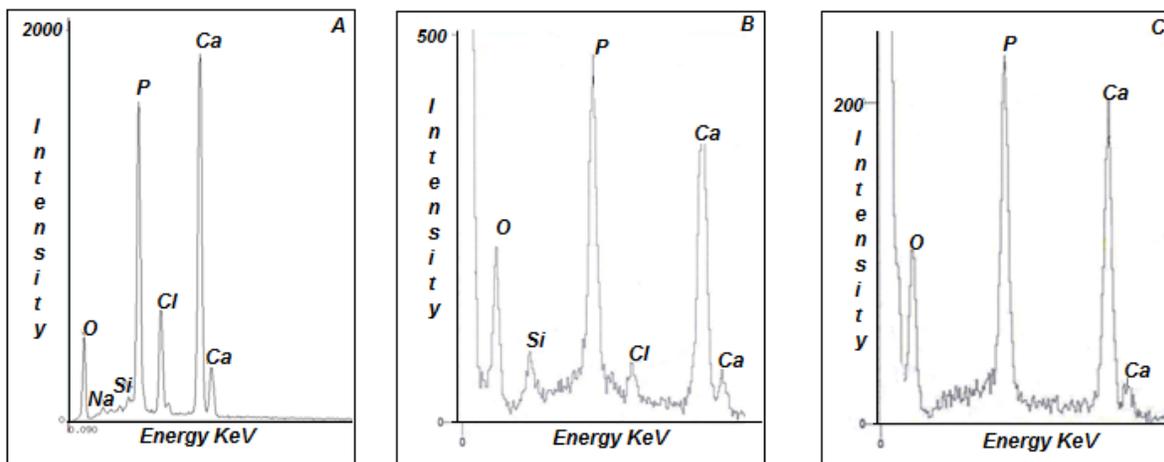
Las microfotografías E y F de la figura 8 muestran la morfología de las estructuras formadas después de 14 días de incubación (sin proteína y con BSA, respectivamente). En ambos casos se observan placas de un grosor promedio de 10  $\mu$ m y una longitud variable con bordes irregulares. La microfotografía G muestra los cristales de fosfato octacálcico formados después de 7 días incubación en el sistema de contradifusión en tubo capilar en presencia de hrCEMP1 expresada en fibroblastos gingivales humanos.<sup>52</sup>

## MICROANÁLISIS DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAYOS X (EDS)

Con la finalidad de conocer la composición elemental de las estructuras formadas por la interacción de hrCEMP1 en el sistema de contradifusión en gel de silicato y de las condiciones sin el uso de proteína y con BSA, y posteriormente relacionar dicha composición a una fase mineralizada, estas estructuras fueron analizadas mediante microanálisis de energía dispersiva electrónica de rayos X (EDS).

Dicho análisis mostró que los cristales formados en presencia de hrCEMP1 están constituidos principalmente por calcio y fósforo. Al analizar el porcentaje atómico de cada elemento presente en la muestra, se observó que el calcio es el elemento presente en mayor porcentaje, seguido del fósforo (Figura 9-A). Este tipo de relación es un indicador de una fase con un grado mayor de mineralización.

En los controles sin proteína (Figura 9-B) y en presencia de BSA (Figura 9-C), las estructuras que se formaron están constituidas de calcio y fósforo, pero en ambos casos el porcentaje de calcio disminuyó a un porcentaje muy similar al del fósforo. Esto indica una fase con un menor grado de mineralización comparada con el experimental de hrCEMP1.



**Figura 9.** Espectros de energía dispersiva de rayos X realizada a la superficie de las estructuras formadas en el sistema de contradifusión en gel de silicato. **A.** Relación de elementos presentes en el grupo experimental hrCEMP1 donde se observa que el elemento más abundante es el calcio seguido en proporción por el fosfato. **B.** Relación de elementos presentes en el grupo control sin proteína. **C.** Relación de elementos presentes en el grupo control BSA. En ambos grupos control el elemento más abundante es el fósforo seguido de calcio.

## RELACIÓN CALCIO/FÓSFORO

La relación Ca/P es un indicador del estado de mineralización, dicha relación fue calculada a partir de los conteos de intensidad presentes en el espectro de EDS. Se tomó al calcio y al fósforo como el 100% de los elementos presentes en la muestra para poder obtener la relación Ca/P. El porcentaje atómico de los dos elementos se utilizó para determinar la fase de mineralización de las estructuras formadas en la prueba de actividad biológica (Tabla 2) y se comparó con la relación Ca/P de referencia para los fosfatos de calcio de relevancia biológica en mamíferos (Tabla 1).

Relación Ca/P de referencia		
Relación Ca/P	Formula	Fase Mineralizada
1	CaHPO <sub>4</sub>	Monetita (Fosfato dicálcico).
1	CaHPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	Brushita (Fosfato dicálcico dihidratado).
1.33	Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	Fosfato octacálcico.
1.43	Ca <sub>10</sub> HPO <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub>	Whitlockita
1.67	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Hidroxiapatita

**Tabla 1.** Relación Ca/P de referencia de los fosfatos de calcio de relevancia biológica en mamíferos.

La relación Ca/P del grupo de hrCEMP1 es de 1.58 y corresponde a una fase mineralizada termodinámicamente estable y poco soluble comprendida entre fosfato octacálcico (precursor de la hidroxiapatita en los sistemas biológicos) e hidroxiapatita (componente inorgánico mayoritario en huesos y dientes). Esto indica que hrCEMP1 además de tener un papel en la regulación de la morfología también es un regulador de la composición de cristales de fosfato de calcio. La relación Ca/P para ambos grupos es de 0.9, esto corresponde a una fase de fosfato dicálcico, que es poco estable termodinámicamente y altamente soluble.

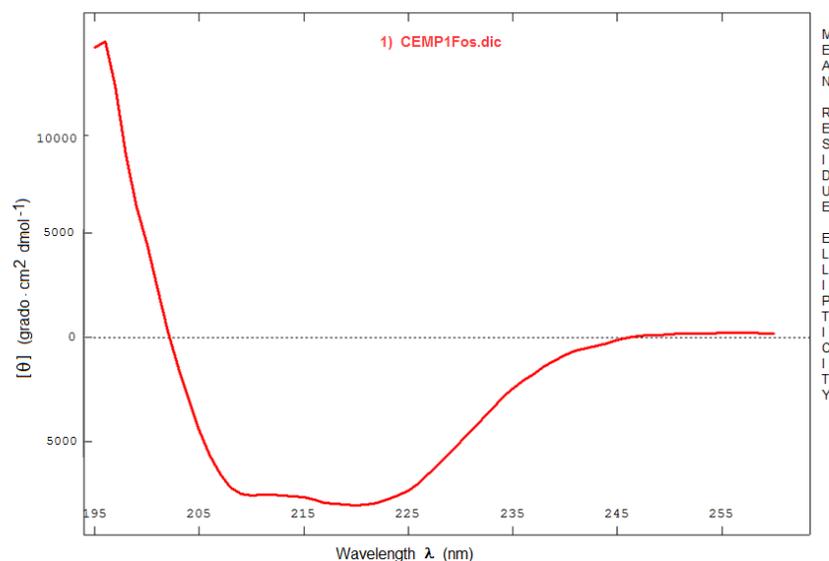
Porcentajes atómicos de Calcio y Fósforo obtenidos por EDS				
Condición	Ca % Atómico	P % Atómico	Relación Ca/P	Fase Mineralizada
hrCEMP1	61.38	38.62	1.58	Hidroxiapatita
BSA	52.27	47.73	0.91	Fosfato dicálcico
Sin Proteína	51.13	48.87	0.95	Fosfato dicálcico

**Tabla 2.** Porcentajes atómicos de Calcio y Fósforo presentes en las muestras de los tres grupos del sistema de contradifusión en gel de silicato.

## DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURA SECUNDARIA

### Dicroísmo Circular

Una vez establecido que hrCEMP1 es biológicamente activa, se decidió establecer el contenido de estructura secundaria mediante dicroísmo circular. En la Figura 10 se muestra el espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de hrCEMP1 en un amortiguador de fosfato de sodio 20mM, pH 7.4. El espectro muestra un perfil con dos valores negativos máximos a 220 y 208 nm aproximadamente, que es similar a los que se han observado en proteínas con un contenido mayoritario de hélices alfa. La deconvolución de los datos y el análisis con el algoritmo de Hennessey-Johnson, que estima el contenido de estructura secundaria indica que hrCEMP1 tiene un contenido de estructura secundaria formado por 28.6% de hélices alfa, 9.9 % de hoja beta y 62.5% de estructura aleatoria (Tabla 3).

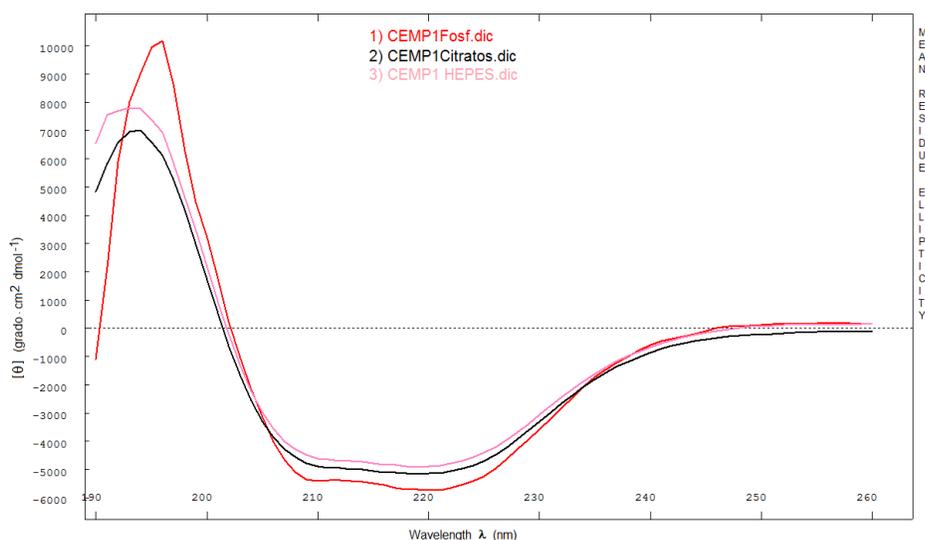


**Figura 10.** Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de hrCEMP1, amortiguador de fosfato de sodio 20mM, pH 7.4.

Una vez que se determinó el contenido de estructura secundaria de hrCEMP1, se decidió hacer nuevos análisis de dicroísmo circular utilizando amortiguadores que han favorecido la cristalización de proteínas glicosiladas como son el citrato de sodio pH 6.5 y HEPES pH 7.4 (Figura 11). Además de agregar dos diferentes aditivos en la solución de la proteína, en primer lugar se utilizó sulfato de cadmio a una concentración de 10mM (Figura 12); el cadmio se ha usado como aditivo en pruebas de cristalización de proteínas como coordinador de partes móviles como son

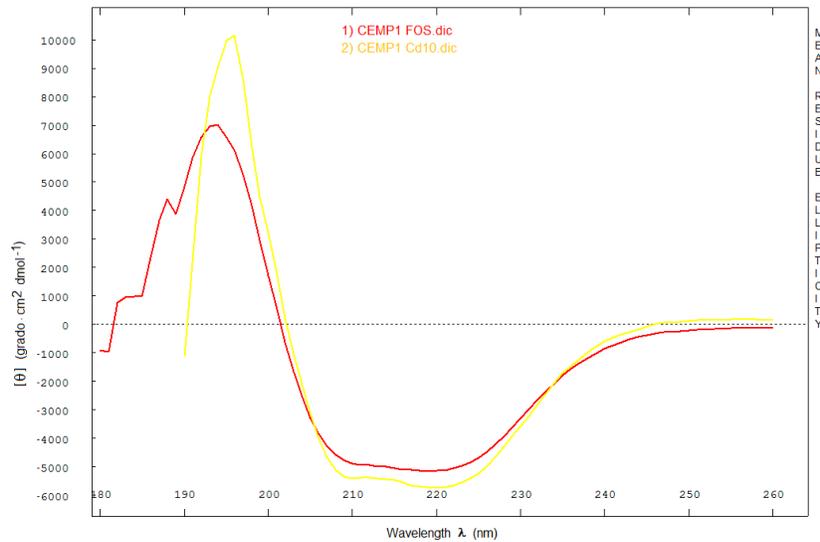
las banderas de histidinas en las proteínas recombinantes y en segundo lugar se utilizó cloruro de calcio, tomando en consideración que el calcio es uno de los elementos más abundantes en su fuente nativa. Todos estos análisis de dicroísmo circular y la deconvolución de los datos fueron comparados con los resultados iniciales (Figura 10) para determinar si se presentaban cambios en el contenido de estructura secundaria (Tabla 3).

El espectro de dicroísmo circular de hrCEMP1 utilizando amortiguador de citrato de sodio 10mM pH 6.5 y HEPES 10mM pH 7.4 no mostró diferencias en relación al espectro inicial de hrCEMP1 (Figura 11). Así mismo en la deconvolución de los datos, estos no mostraron diferencias marcadas en el contenido de estructura secundaria (Tabla 3).

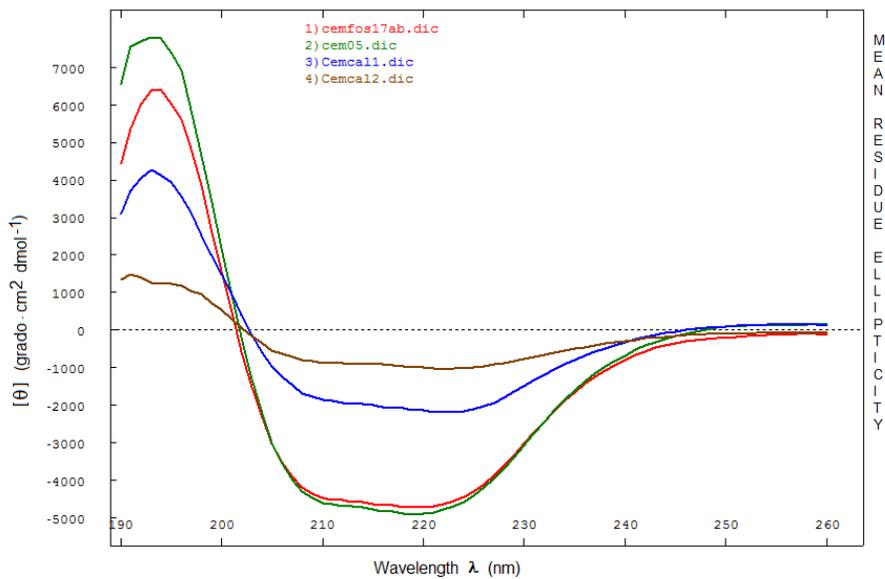


**Figura 11.** Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de hrCEMP1 utilizando diferentes amortiguadores. Línea rosa: hrCEMP1 en amortiguador HEPES 10mM pH 7.4. Línea negra: hrCEMP1 en amortiguador de Citrato de sodio 10mM pH 6.5. Línea roja: hrCEMP1 en amortiguador de fosfato de sodio 20mM pH 7.4.

El espectro de dicroísmo circular de hrCEMP1 usando de sulfato de cadmio 10mM adicionado en amortiguador de fosfato de sodio 20mM pH 7.4 se muestra en la Figura 12. No se observan diferencias significativas en el espectro de dicroísmo circular ni en el contenido de estructura secundaria (Tabla 3) al utilizar cadmio.



**Figura 12.** Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de hrCEMP1 adicionada con 10mM de sulfato de cadmio. Línea roja: hrCEMP1 en amortiguador de fosfato de sodio 20mM. Línea amarilla: hrCEMP1 adicionando 10mM de sulfato de cadmio.



**Figura 13.** Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de hrCEMP1 adicionada con cloruro de calcio. Línea roja: hrCEMP1 en 10mM de fosfato de sodio. Línea verde: hrCEMP1 adicionando 0.5mM de cloruro de calcio. Línea azul: hrCEMP1 adicionando 1mM de cloruro de calcio. Línea café: hrCEMP1 adicionando 2mM de cloruro de calcio.

Al utilizar cloruro de calcio partir de la concentración de 1mM el espectro de dicroísmo cambio, se redujo la intensidad de la señal en relación al incremento de la concentración de cloruro de calcio (este fenómeno indica agregación de la proteína), haciéndose muy marcado en la concentración de 2mM (Figura 13 línea café).

El contenido de estructura secundaria no cambió al utilizar el amortiguador de citrato de sodio 10mM pH 6.5, HEPES 10mM pH 7.4, fosfato de sodio 20mM pH 7.4 adicionado con 10mM de sulfato de cadmio y cloruro de calcio 0.5mM (Tabla 3). Por lo que estos amortiguadores y aditivos pueden ser utilizados en un futuro sin alterar la estructura secundaria de hrCEMP1.

<b>Porcentajes de estructura secundaria de hrCEMP1</b>			
<b>Amortiguador</b>	<b>Hélice alfa (%)</b>	<b>Hoja beta (%)</b>	<b>Estructura aleatoria (%)</b>
Fosfato de sodio 20mM, pH 7.4	28.6	9.9	62.5
Citrato de sodio 10mM, pH 6.5	28.1	9.9	60.9
HEPES 10mM, pH 7.4	28.4	9.8	59.9
Fosfato de sodio 20mM, pH 7.4 + sulfato de cadmio 10mM	28.8	9.8	61.2
Cloruro de calcio 0.5mM pH 7.4	27.9	10.9	59.5
Cloruro de calcio 1mM pH 7.4	24.3	10.7	62.2
Cloruro de calcio 2mM pH 7.4	21.2	11.1	65.1

**Tabla 3:** Contenido de estructura secundaria de hrCEMP1 obtenido mediante dicroísmo circular y utilizando diferentes amortiguadores y aditivos.

## PREDICCIÓN DE CRISTALIZACIÓN

Sabiendo que hrCEMP1 esta plegada, ya que el análisis por difracción circular indicó que tiene elementos de estructura secundaria. Se decidió llevar a cabo el análisis de predicción de la posibilidad de formación de cristales de proteína de hrCEMP1 mediante el servidor informático XtalPred-RF server (<http://ffas.burnham.org/XtalPred-cgi/xtal.pl>). El programa informático dio como resultado una clase de cristalización tipo 5 (expectativa de cristalización muy difícil). Esto se debe a que se identificaron varias regiones desordenadas en la posible estructura de CEMP1, teniendo como principal región desorganizada una zona de 43 aminoácidos en el centro de la secuencia de la proteína. La comparación de los resultados experimentales del contenido de estructura secundaria de hrCEMP1 obtenidos mediante difracción circular y la predicción de estructura secundaria obtenida *in silico* son similares (tabla 4).

Predicciones Xtal Pred-RF		Estructura secundaria de hrCEMP1 obtenida mediante Difracción circular
Índice de inestabilidad	58.1 %	
Mayor área desorganizada.	43 aa	
Residuos desorganizados	45%	
Hélice alfa	23%	28.6%
Laminas beta	13%	9.9 %
Estructura aleatoria	63%	62.5 %

**MGTSSTDSQQAGHRRCTSNTSAENLTCLSLPGSPGKTAPLPGPAQAGAGQPLPKGCAAVKAEVGIPAPHTSQEVRIHIR  
RLLSWAAPGACGLRSTPCALPQALPQARPCPGRWFFPGCSLPTGGAAQTILSLWTWRHFLNVALQGREENSGRARRVPP  
VPRAPVSKGEGSHPPQNSNGEKVKTITPDVGLHQSLTSDPTVAVLRAKRAPEAHPPRSCSGSLTARVCHMGVCQGQG  
DTEDGRMTLMG EQLISEEDLNHHHHH**

**Estructura aleatoria. Hélice alfa. Laminas beta.**

**Tabla 4.** Resultado de la predicción de la posibilidad de obtener un cristal de hrCEMP1. El alto índice de inestabilidad y las regiones desorganizadas a lo largo de la proteína indican una pobre expectativa de cristalización. La secuencia de aminoácidos que se muestra debajo de la tabla 4 corresponde a hrCEMP1 y muestra la predicción de las regiones desorganizadas (áreas subrayadas), en color rojo las zonas con posibilidad de estructura secundaria hélice alfa y las zonas en azul las posibilidades de laminas beta.

## ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO TÉRMICO.

### PRUEBAS DE ESTABILIDAD Y SOLUBILIDAD DE hrCEMP1.

Con la finalidad de encontrar una condición que favoreciera la solubilidad y estabilidad de hrCEMP1 se realizó el ensayo de desplazamiento térmico utilizando 96 diferentes aditivos químicos, los cuales están divididos en diferentes grupos químicos. El sistema cuenta con dos controles: agua, en donde se observa el efecto de diluir la proteína y ácido tricloroacético al 75%, que muestra el efecto de una precipitación total de la proteína (pérdida de solubilidad) y pérdida de la estabilidad conformacional de la misma.

Los resultados indican que la temperatura media de desnaturalización en el control de dilución (agua) es de 73°C, esto demuestra que hrCEMP1 es una proteína termoestable, mientras hrCEMP1 en el control de agregación (ácido tricloroacético 75%) tiene una T<sub>m</sub> de 37°C.

Es de destacar, que cuando hrCEMP1 esta en presencia del aminoácido con carga positiva arginina, la T<sub>m</sub> de la proteína disminuye a 36°C (valor similar al control de agregación), indicando que la proteína pierde su estabilidad y capacidad de ser termoestable y sufre una desnaturalización. Sin embargo este fenómeno es inhibido cuando se agrega el aminoácido ácido glutámico en la misma concentración que la arginina. En ésta condición, la T<sub>m</sub> de hrCEMP1 incrementa a 75°C (valor superior al control de dilución).

Los aditivos que incrementan la T<sub>m</sub> de hrCEMP1 sobre el valor del control de agua son principalmente aminoácidos ácidos (ácido glutámico), polares sin carga (glicina y serina), péptidos formados por glicina (GGG) y péptidos derivados de la caseína (triptona). Además de compuestos ácidos como el ácido aminovalerico, ácido málico, la taurina y sales como el cloruro de amonio, acetato de amonio, sulfato de sodio y el fosfato de sodio y potasio.

La tabla 5 muestra los aditivos que incrementaron la T<sub>m</sub> de hrCEMP1 sobre el valor del control de dilución y los que disminuyeron la T<sub>m</sub> con valores cercanos al control de agregación, la tabla completa se muestra en el apéndice.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD			
Concentración	Aditivo	T <sub>m</sub>	Grupo químico
100 % v/v	Agua	73	Control
75 % w/v	Ácido tricloroacético	37	Control
250 mM	L-Arginina	36	Aminoácido
250 mM	L-Arginina + L-ácido glutámico 250mM	75	Aminoácido
500 mM	Glicina	75	Aminoácido
500 mM	L-Serina	76	Aminoácido
200 mM	Gly-gly-gly	75	Péptido
5 % w/v	Triptona	78	Péptido
500 mM	5-ácido Aminovalerico	78	Linker
150 mM	TCEP hidrociorhídrico	44	Reductor
500 mM	Taurina	76	Ácido orgánico
25 % w/v	Bromuro tetraetilamonio	43	Líquido iónico
25 % w/v	1-butil-3-metil cloruro de imidazol	40	Líquido iónico
500 mM	Cloruro de amonio	75	Sal
500 mM	DL-ácido málico pH 7.0	75	Sal
250 mM	Acetato de amonio	75	Sal
700 mM	Fosfato de sodio monobásico + Fosfato de potasio 1.3M	79	Sal
1,000 mM	Sulfato de sodio decahidratado	76	Sal
5 % w/v	Polietilenglicol monometil éter 750	76	Poliol
25 % v/v	Etoxilato pentaeritriol (15/4 EO/OH)	31	Poliol
100 mM	6-O- $\alpha$ -D-Maltosil- $\beta$ -ciclodextrina	28	Ciclodextrina
10 mM	(2-Hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina	46	Ciclodextrina
80 mM	$\alpha$ -Ciclodextrina	42	Ciclodextrina
10 mM	$\beta$ -Ciclodextrina	44	Ciclodextrina
50 mM	Metil- $\beta$ -ciclodextrina	28	Ciclodextrina

**Tabla 5.** Aditivos que mostraron incrementar la T<sub>m</sub> de hrCEMP1 y aditivos donde se observó los valores de T<sub>m</sub> más bajos. La lista completa con los 96 aditivos se muestra en el apéndice 1.

### ESTABILIDAD DE hrCEMP1 EN FUNCIÓN DEL pH Y DE LA COMPOSICIÓN DEL AMORTIGUADOR.

Evaluamos la estabilidad y solubilidad de hrCEMP1 en función de la variación del pH y de la composición del amortiguador. Se utilizaron variaciones de pH desde 3.4 hasta 6.6 y 8 diferentes amortiguadores. El amortiguador de acetato de sodio pH 3.4 es en donde se observó el valor de Tm más alto de toda la prueba. Mientras que el amortiguador de imidazol con un pH de 6.6 dio el valor más bajo de Tm.

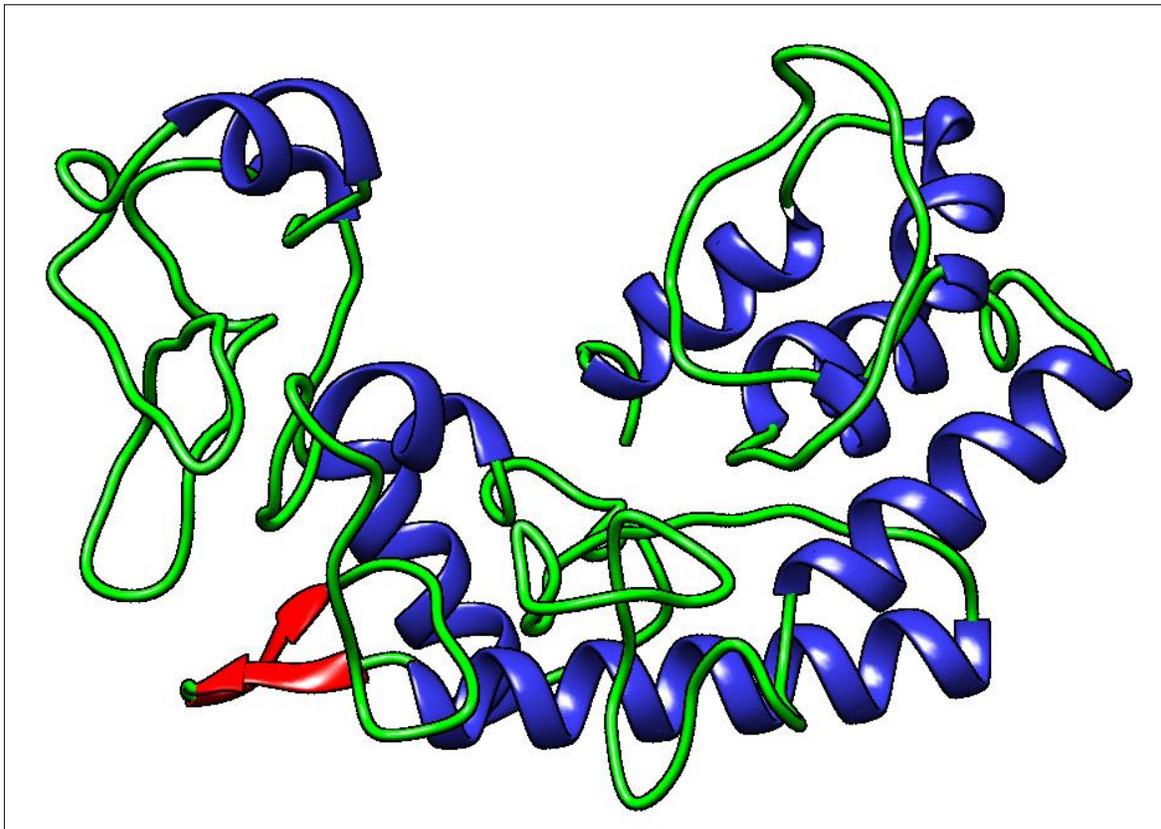
Wizard pH Buffer Screen			
Concentración	Amortiguador	pH	Tm
0.5 M	Acetato de sodio / ácido acético	3.4	71
0.5 M	MES / NaOH	4.6	55
0.5 M	Acetato de sodio / ácido acético	4.6	59
0.5 M	Lactato de sodio / HCl	4.4	59
0.5 M	Imidazol / HCl	5.4	51
0.5 M	BisTris / HCl	5.6	55
0.5 M	MES / NaOH	5.4	62
0.5 M	Acetato de sodio / ácido acético	5.4	60
0.5 M	Tris / HCl	6.6	59
0.5 M	HEPES / NaOH	6.4	64
0.5 M	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.6	59
0.5 M	BisTris / HCl	6.4	50
0.5 M	Imidazol / HCl	6.6	44
0.5 M	MES / NaOH	6.6	64

**Tabla 6.** Prueba de estabilidad y solubilidad de hrCEMP1 en función del pH y composición del amortiguador.

## MODELO TRIDIMENSIONAL TEÓRICO

Mediante el uso del programa informático *i-tasser* ([zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/](http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/)), y utilizando la secuencia de aminoácidos de hrCEMP1 se elaboró un modelo tridimensional teórico de la proteína. Dicho modelo se generó mediante métodos *Ad Initio* y homología de secuencia de aminoácidos con proteínas ya caracterizadas tridimensionalmente.

El modelo teórico está constituido por un 35% de estructura hélice alfa, un 2% de hojas beta y un 62% de estructura aleatoria (Figura 14).

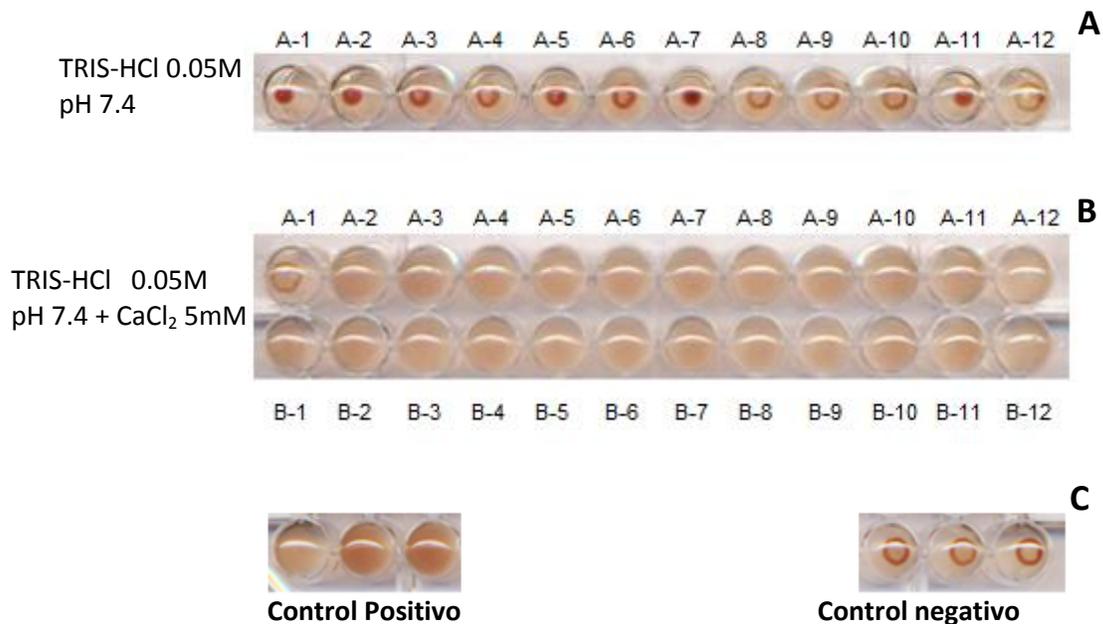


**Figura 14.** Modelo de la proteína hrCEMP1 obtenido a través del servidor I-Tasser. Representación de la estructura secundaria. Las zonas en azul representan la estructura hélice alfa, la zona en rojo representa la estructura de hojas beta y en verde las zonas aleatorias.

## HEMAGLUTINACIÓN DE ERITROCITOS

Dado que algunas proteínas involucradas en el proceso de mineralización unen azúcares, decidimos usar el ensayo de aglutinación de eritrocitos de conejo para saber CEMP1 comparte esta característica. Se determinó que en presencia de amortiguador de TRIS-HCl 0.05M, pH 7.4 la proteína hrCEMP1 no muestra una actividad aglutinante, ya que los eritrocitos en todas las diluciones de proteína (pozo A-1 0.05  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  – pozo A-12 0.012ng/ $\mu\text{l}$ ) se precipitaron al fondo del pozo (Figura 15-A).

Cuando la proteína se encuentra incubada con calcio (amortiguador de TRIS-HCl 0.05M pH 7.4 adicionado con 5mM de  $\text{CaCl}_2$ ), está muestra actividad aglutinante desde la segunda dilución de proteína (pozo A-2, 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), hasta la última dilución realizada (pozo B-24 0.003 pg/ $\mu\text{l}$ ). Este resultado demuestra que hrCEMP1 es una lectina calcio dependiente y con una actividad muy elevada, ya que aun a muy bajas concentraciones ésta sigue teniendo actividad hemaglutinante (Figura 15-B).

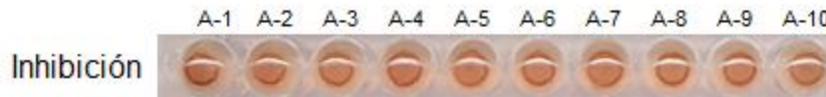


**Figura 15.** Prueba de aglutinación de eritrocitos de conejo en presencia de hrCEMP1. Se muestra en la parte superior de la Figura, la precipitación de los eritrocitos al fondo del pozo cuando son incubados con hrCEMP1 y TRIS-HCl 0.05M, pH 7.4 (A). En la parte central de la Figura (B) se observa la aglutinación de los eritrocitos cuando son incubados con hrCEMP1 y TRIS-HCl 0.05M

pH 7.4 + CaCl<sub>2</sub> 5mM. Parte inferior de la imagen (C) se muestra la actividad aglutinante de una lectina como control positivo y un control negativo de aglutinación sin proteína.

### INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN DE ERITROCITOS

En la Figura 16 se muestra la prueba de inhibición de aglutinación, dicha prueba nos permitió conocer que hrCEMP1 reconoce al carbohidrato manopiranosido y que tiene una alta afinidad a éste, ya que bloquea la actividad aglutinante en todas las diluciones realizadas de este carbohidrato (pozo A-1 66.6mM – pozo A-10 3.3µM de manopiranosido).



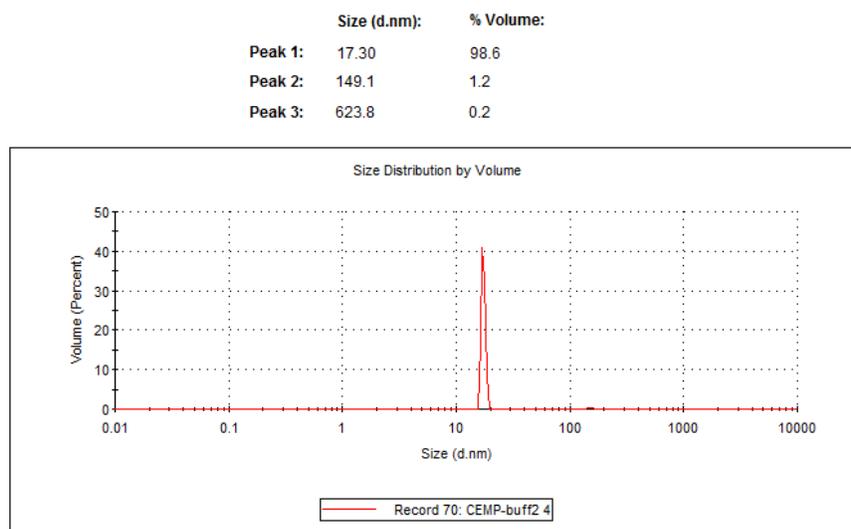
**Figura 16.** Inhibición de la actividad aglutinante de hrCEMP1 mediante la adición del carbohidrato manopiranosido.

## ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO EN SOLUCIÓN DE hrCEMP1

### Dispersión dinámica de luz (DLS).

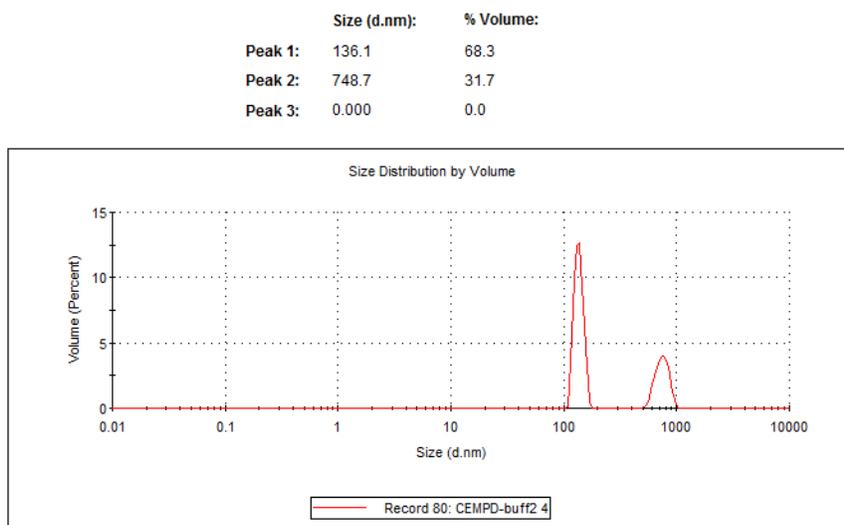
Para conocer el comportamiento de la proteína en solución y su conducta de agregación (interacción proteína-proteína), lo cual se vería reflejado en un incremento en su radio hidrodinámico por la formación de monómeros, dímeros o grandes oligómeros se realizó un análisis de dispersión dinámica de luz. Se utilizó una solución de proteína hrCEMP1 0.5mg/ml en amortiguador de citrato de sodio 50mM, pH 6.5. A la proteína en la misma concentración, amortiguador y dializada mediante una columna de filtración molecular Sephadex G-25 para eliminar moléculas de manopiranosido y a la proteína dializada en el mismo amortiguador de citrato de sodio 50mM pH 6.5 adicionado con una concentración de 2mM de cloruro de calcio.

En la Figura 17 se muestra el análisis del comportamiento en solución de hrCEMP1 en amortiguador de citrato de sodio 50mM sin dializar mediante dispersión dinámica de luz. Se observa una señal en relación a la distribución de tamaño en volumen, con un diámetro de 17.3nm que representa el 98.6% de las moléculas en relación al volumen, hay otras dos señales que representan el 1.2% (149.1nm) y 0.2% (623.8nm),



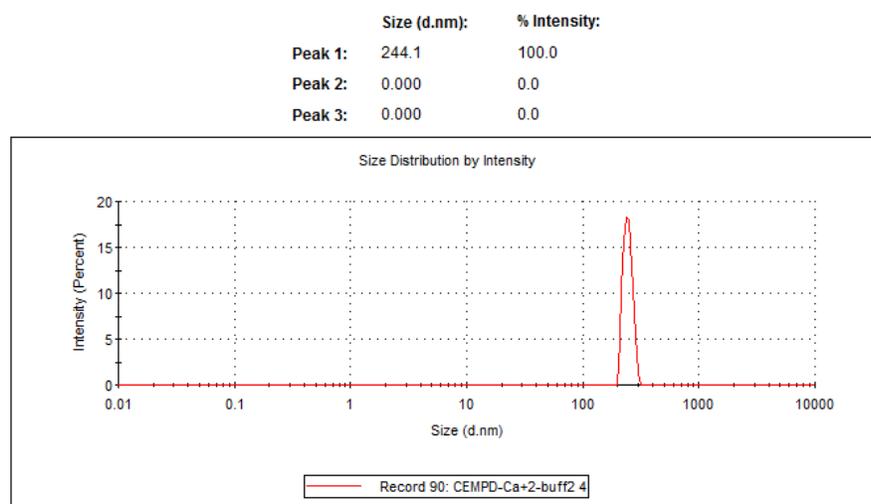
**Figura 17.** Análisis de dispersión dinámica de luz de la proteína hrCEMP1 en amortiguador de citrato de sodio 50mM, pH 6.5.

En el análisis de hrCEMP1 dializada (sin la presencia del manopiranosido) se observó que la distribución del tamaño de las moléculas se modificó en relación a la proteína sin dializar. Se presentan dos moléculas con diámetros de 136.1nm (68.3 %) y 748.7nm (31.7%), este resultado indica que la proteína sin el carbohidrato se oligomeriza (Figura 18).



**Figura 18.** Análisis de dispersión dinámica de luz de la proteína hrCEMP1 dializada en amortiguador de citrato de sodio 50mM, pH 6.5.

En el análisis de la proteína dializada contra el amortiguador de citrato de sodio 50mM, pH 6.5 adicionado con cloruro de calcio 2mM (Figura 19), la distribución es de una sola molécula de un diámetro de 241.1 nm que representa el 100% de las moléculas en el volumen.

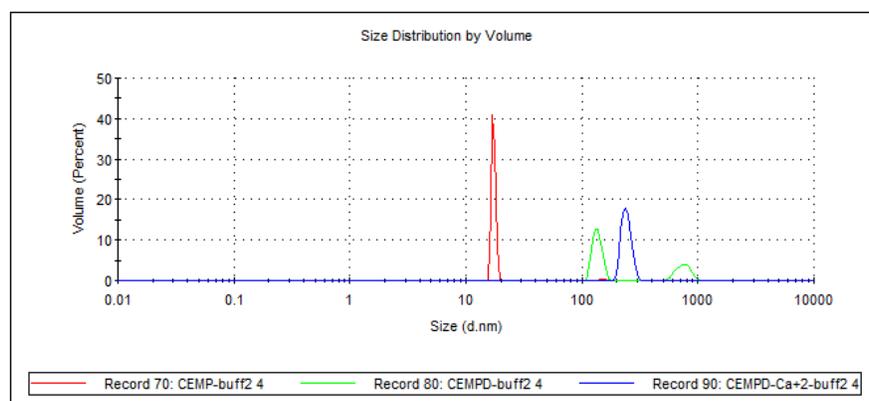


**Figura 19.** Análisis de dispersión dinámica de luz de la proteína hrCEMP1 dializada en amortiguador de citrato de sodio 50mM, pH 6.5 adicionada con 2mM de cloruro de calcio.

La polidispersidad nos indica cuantas especies están presentes en la solución de proteína, siendo una solución monodispersa cuando sólo una especie se encuentra presente (un solo peso molecular). Observamos que esta proteína tiene fuertes tendencias a interactuar con ella misma formando diferentes estados de oligomerización. En la Figura 20 se muestra el análisis de dispersión dinámica de luz en las tres condiciones que se valoraron para hrCEMP1.

La línea roja representa una especie de un radio hidrodinámico de 17.3 nm (hrCEMP1 en amortiguador de citratos). Las líneas verdes representan a hrCEMP1 cuando se le retira el manopiranosido por medio de diálisis y la proteína sufre un proceso de oligomerización en dos especies con radios hidrodinámicos de 136 y 748nm. La línea azul representa a hrCEMP1 sin el manopiranosido pero en presencia de cloruro de calcio. El radio hidrodinámico para esta última condición es de 244nm.

Al realizar la medición del modelo teórico de hrCEMP1, se observó que esta molécula tiene un diámetro aproximado de 6nm (especie monomérica). Cuando se hace la comparación de este diámetro con los radios hidrodinámicos obtenidos a partir de los análisis de DLS, podemos inferir que hrCEMP1 en amortiguador de citratos tiene tres veces el diámetro del modelo teórico. La proteína dializada tiene un diámetro 22 y 124 veces mayor al del modelo teórico y la proteína dializada y en presencia de cloruro de calcio tiene un diámetro 40 veces mayor que la especie monomérica.



**Figura 20.** Análisis de dispersión dinámica de luz de hrCEMP1. Línea roja: hrCEMP1 en amortiguador de citrato de sodio. Línea verde: hrCEMP1 dializada. Línea azul: hrCEMP1 dializada y con la adición de 2mM de cloruro de calcio.

## **PRUEBAS DE CRISTALOGÉNESIS.**

A la fecha se han realizado múltiples pruebas de cristalogénesis con la finalidad de encontrar las condiciones iniciales de cristalización para hrCEMP1. Se han utilizados los sistemas de cristalización Crystal screen I y II (Hampton Research) empleando como amortiguadores HEPES pH 7.2 y Citrato de sodio pH 5.6 y la adición de Sulfato de Cadmio (10mM, 2mM y 1mM).

Además se ha utilizado además el sistema de cristalización PEG-Ion screen (Hampton Research) empleando amortiguador de citrato de sodio pH 6.5 y el uso de aditivos: 1mM sulfato de cadmio, trehalosa, acetato de amonio y fosfato de sodio.

Aún cuando el programa informático X-Tal Pred indica poca probabilidad para lograr obtener cristales de hrCEMP1, confiamos que la presencia del ligando específico dado por las pruebas de actividad de lectina y los aditivos que incrementan la estabilidad de la proteína obtenidos mediante experimentos de desplazamiento térmico, se logre estabilizar una conformación de la proteína que dé lugar a la formación de cristales adecuados para estudios estructurales.

Las condiciones de cristalización utilizadas, las adaptaciones que se han realizado de las mismas con el uso de aditivos, los periodos de incubación y las condiciones que se han difractado se muestran en el apéndice 2.

## DISCUSIÓN

Existen pocos estudios sobre la caracterización bioquímica de proteínas presentes en los tejidos mineralizados, y en lo que respecta a proteínas específicas del cemento radicular, la información es muy limitada ya que a la fecha no se cuenta con la caracterización de ninguna de estas proteínas. Tampoco se sabe cuál es su función, ni como la llevan a cabo. Los análisis realizados a este tipo de proteínas se han enfocado principalmente a dilucidar el papel que desempeñan en la formación y mantenimiento de los tejidos a los cuales pertenecen. Con relación a esto, la función de biomoléculas presentes en tejidos mineralizados de vertebrados e invertebrados como son la osteopontina,<sup>63, 64, 65-67</sup> osteonectina,<sup>66, 70</sup> amelogenina,<sup>69, 70</sup> sialoproteína ósea,<sup>64, 65, 68, 71</sup> y una variedad de proteínas de conchas,<sup>72-73</sup> han sido demostradas experimentalmente. De este modo, las biomoléculas que se cree pueden tener influencia en el proceso de mineralización han tenido que ser identificadas, aisladas, purificadas, clonadas, expresadas en formas recombinantes, efectuado pruebas de actividad biológica y finalmente caracterizadas para determinar cómo es que cumplen con su función. Esta información ha sido empleada para entender el papel de dichas proteínas en sus tejidos y así poder diseñar terapias de medicina regenerativa. En todos estos casos, es importante determinar la distribución espacial y temporal de estas proteínas en tejidos mineralizados, así como su presencia o ausencia en tejidos no mineralizados y patológicos asociados a la formación de tejido mineral, además de realizar su inmunolocalización y/o hibridación *in situ*. Esto puede sugerir su papel en la formación de biominerales. Asimismo, la molécula en estudio puede ser asociada con el proceso de mineralización *in vivo*, mediante estudios en tejidos y en organismos genéticamente modificados, donde la expresión de la molécula de interés esté alterada, disminuida o incrementada. Finalmente, los estudios de mineralización pueden ser empleados con sistemas libres de células, esto tiene como finalidad esclarecer el mecanismo de acción (regulador, inhibidor o nucleador) de las moléculas de matriz de los tejidos mineralizados y así dilucidar su función en los sistemas biológicos.

En el caso de CEMP1 los estudios previos no han permitido establecer las características que posee esta molécula y como éstas pueden regular las funciones biológicas que se han reportado, por esto y con la intención de aportar conocimiento sobre las proteínas del cemento radicular, en este trabajo se ha realizado la caracterización bioquímica – estructural de la proteína hrCEMP1 y aportar información que ayude a dilucidar el papel de esta proteína en el cemento radicular.

La proteína del cemento 1 utilizada en este trabajo se obtuvo mediante la clonación del gen y la recombinación del mismo en el sistema de expresión eucarionte *Pichia pastoris*. Se decidió el uso de la proteína recombinante como estrategia experimental, pues, la cantidad de CEMP1 que es expresada en su fuente nativa es insuficiente para realizar las pruebas de caracterización bioquímica – estructural. El uso del sistema de expresión *Pichia pastoris* favorece un correcto plegamiento de las proteínas heterólogas eucariontes al proporcionar un microambiente, procesamiento de proteína y modificaciones pos-traduccionales similares a los presentes en los eucariontes superiores, el crecimiento del cultivo es rápido (comparable con la velocidad de crecimiento de *E. coli*), el cultivo se puede escalar a grandes volúmenes y es menos costoso que otros sistemas de expresión eucarionte (células de mamífero), además de que este sistema de expresión permitió la glicosilación de hrCEMP1, tal como se presenta en su forma nativa.<sup>74–76</sup>

La cinética de expresión demostró la presencia de hrCEMP1 en el cultivo a partir de las 24 horas de inducción con metanol, manteniéndose constante en cantidad a las 48 horas y disminuyendo su cantidad a las 72 y 96 horas, esto puede deberse a que el cultivo alcanza una saturación de células a las entre las 24 y 48 horas e inicia a decaer después de este tiempo, siendo menor el número de células activas conforme transcurre el tiempo (Figura 1 A).

La purificación de hrCEMP1 se realizó mediante la cromatografía de afinidad a carbohidratos<sup>77, 78</sup> Con A sheparose, ya que se tenía el antecedente de que CEMP1 nativa es una proteína N – glicosilada<sup>52</sup> y que la expresión en *Pichia pastoris* proporciona modificaciones pos-traduccionales.<sup>79</sup> La unión de hrCEMP1 a la lectina concanavalina y la posterior identificación de glicosilaciones confirmaron la glicosilación pos-traduccionales de hrCEMP1. El rendimiento de proteína purificada fue de aproximadamente 940µg por cada litro de cultivo, este rendimiento es similar a lo reportado al usar fibroblastos gingivales humanos para expresar CEMP1.<sup>52</sup> Sin embargo, el costo que representa el mantenimiento de los cultivos de células de mamífero y sus velocidades de crecimiento hacen que la expresión de hrCEMP1 en *Pichia pastoris* el mejor modelo a la fecha para obtener cantidades elevadas de CEMP1 con actividad biológica.

En este trabajo demostramos la presencia de glicosilaciones en hrCEMP1 mediante la técnica de tinción con azul de alcian/acido peryódico de Shiff y visualización en geles SDS-PAGE.<sup>80, 81</sup> La presencia de dichas glicosilaciones explica la afinidad de hrCEMP1 a la lectina concanavalina. La unión de glicanos a residuos de asparagina es una modificación pos-traduccionales abundante, esencial y altamente conservada en eucariontes. El proceso de N-glicosilación incluye dos fases principales: el ensamble de un oligosacárido unido a un lípido (dolicol) y la transferencia de este

oligosacárido al residuo de asparagina seleccionado en la cadena polipeptídica. La biosíntesis del oligosacárido unido al lípido tiene lugar en ambos lados de la membrana del retículo endoplasmático e involucra a una serie de glicosiltransferasas específicas que catalizan el ensamble de la ramificación del oligosacárido en una manera altamente definida. Oligosacariltransferasas seleccionan la secuencia Asn-X-Ser/Thr en la cadena polipeptídica y generan la unión N-glicosídica entre la amida de la cadena lateral de la asparagina y el oligosacárido, el procesamiento final de la glicosilación tiene lugar en el aparato de Golgi de la célula que cataliza modificaciones a las N-glicosilaciones, generando un N-glicoproteoma muy diverso en células eucariontes.<sup>82, 83, 84</sup> La presencia de glicanos en las proteínas tiene una influencia en la estabilidad, solubilidad y pueden contribuir al proceso de plegamiento.<sup>85</sup>

La masa molecular de hrCEMP1 determinada mediante espectrometría de masas fue de 28,770 Da (Figura 6), mientras que el peso teórico calculado *in silico* para la proteína recombinante es de 28,081 Da, esto indica una diferencia de 689 Da. Esta diferencia en el peso molecular puede explicarse por la presencia de N-glicosilaciones (dos N – acetilglucosaminas y dos residuos de manosa 800 Da) unidas posiblemente a la asparagina de la posición 20 o 25 en CEMP1. La diferencia en el grado de glicosilación entre la especie nativa y la recombinante en *Pichia pastoris* puede deberse a un procesamiento diferente en el aparato de Golgi de la levadura o que la longitud del dolicol en las levaduras es menor tamaño que el que se presenta en humanos.<sup>83</sup>

En los últimos años se han diseñado técnicas libres de células que utilizan precipitación de calcio en geles para dilucidar como las proteínas no colágenas y otras biomoléculas actúan en el proceso de biomineralización.<sup>86</sup> En éstos sistemas experimentales, la proteína en estudio es incorporada al gel a temperatura ambiente, por lo que permanece estable y sin desnaturalizarse durante el tiempo que dura el experimento, el sistema permite el estudio de la nucleación y regulación de cristales de fosfato de calcio de *novo*, el gel es translúcido y el proceso puede visualizado con un microscopio óptico. Los compuestos formados son fácilmente recolectados del gel, sin contaminación, al ser experimentos libres de células y que la matriz no interacciona con el proceso, se puede conocer el efecto de la biomolécula por si sola en el proceso de biomineralización.

En este trabajo se utilizó el sistema de contradifusión en gel de silicato para determinar si hrCEMP1 posee actividad biológica relacionada con la nucleación y regulación de cristales de fosfato de calcio. Nuestros resultados demuestran que en el experimental con hrCEMP1, la formación de estructuras esféricas de 150 a 200µm de diámetro compuestas por múltiples placas

alargadas con una orientación definida y que tienen su origen en el centro de la esfera. Este tipo de estructuras es característico de proteínas que participan en el proceso de biomineralización como la proteína de matriz de dentina 1 (hrDMP1), amelogenina (AMEL), sialoproteína ósea (BSP), la proteína de adhesión del cemento (CAP) y la proteína del cemento 1 (hrCEMP1) expresada en fibroblastos gingivales humanos. Al realizar el análisis elemental mediante energía dispersiva de rayos x (EDS) se determinó que las estructuras formadas en presencia de hrCEMP1 están compuestas principalmente por calcio y en menor proporción por fósforo (Tabla 2).

La relación Ca/P, la cual estima la fase mineralizada de los fosfatos de calcio, fue calculada tomando en cuenta al calcio y fósforo como el 100% de los elementos presentes en la muestra y se comparó con la relación Ca/P de referencia para los fosfatos de calcio de relevancia biológica (Tabla 1). La relación Ca/P para los cristales inducidos con hrCEMP1 fue de 1.58, esta relación es cercana a la de la hidroxiapatita (1.67). La relación Ca/P obtenida en ensayos de contadifusión en gel donde se utilizó hrCEMP1 expresada en fibroblastos gingivales humanos indica que la fase mineral que se formó fue hidroxiapatita.<sup>52</sup> Estos resultados contrastan con los observados en los controles sin proteína y con una proteína que no participa en el proceso de mineralización (BSA). En ambos casos la morfología observada fue de placas con bordes irregulares y con una relación Ca/P menor a 1 en ambos casos. Los resultados de los ensayos de contadifusión revelan que CEMP1 participa en la nucleación de los cristales de hidroxiapatita y regula el crecimiento ordenado de estos.

La caracterización de las proteínas no colágenas asociadas a la formación de cristales de fosfato de calcio ha mostrado que comparten características en común, tales como: a) Son proteínas ácidas (contienen regiones ricas en ácido aspártico, ácido glutámico y serina), estas regiones reconocen y dirigen el crecimiento del cristal en un plano específico.<sup>57,63</sup> b) Estas proteínas están fosforiladas y/o glicosiladas, c) Presentan tirosina-sulfatos y d) Tienen alta afinidad por la hidroxiapatita.<sup>57, 59</sup>

La caracterización bioquímica de hrCEMP1 reveló que esta proteína comparte algunas de las características antes mencionadas: es una proteína que está glicosilada y tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita<sup>52</sup>; sin embargo, no es una proteína ácida, ya que posee un punto isoeléctrico de 9.1. Al analizar la secuencia de aminoácidos de CEMP1, identificamos regiones con aminoácidos ácidos y ricas en serina: SSTDS (residuos 4-8), STSNTSAE (residuos 17-24), EENS (residuos 147-150) y SCSGS (residuos 217-221). CEMP1 es una proteína de 247 aminoácidos, de éstos, 5 residuos son ácido aspártico (2%), 9 residuos de ácido glutámico (3.6%) y 22 residuos de serina (8.9%). Estas regiones pueden estar asociadas a la unión de calcio y junto con la serina, regular la morfología de esférulas formadas por placas alargadas que crecen de un centro en

común. Los residuos de ácido glutámico y ácido aspártico pueden interactuar fuertemente con la superficie de la hidroxiapatita. En contraste, es posible que la serina interactuó con la superficie de la hidroxiapatita de dos cristales y entonces se formen campos de esférulas densas.<sup>57</sup> Eiden-Abmann y colaboradores, demostraron que la presencia de ácido glutámico, ácido aspártico y serina en el sistema de contradifusión en gelatina induce la formación de cristales de hidroxiapatita en forma de esférulas<sup>57</sup>. La serina induce el crecimiento de esférulas densas, formadas por múltiples agujas que se originan de un centro en común. El ácido glutámico favorece el crecimiento de esférulas conectadas hechas de agujas que se originan de un centro en común, mientras que el ácido aspártico crea esférulas conectadas por algunas placas con un origen común. En otra investigación Gen He y colaboradores,<sup>87</sup> realizaron ensayos de nucleación de cristales de fosfato de calcio inducidos con la proteína DMP1 (proteína de matriz de dentina 1). Al analizar la secuencia de aminoácidos de esta proteína localizaron cuatro regiones ácidas: ESNES (residuos 376-380), ESQES (residuos 386-390), DSQDS (residuos 431-435) y QESQSEQDS (residuos 414-422). Durante las primeras horas después de iniciada la nucleación solo se observaron fosfatos de calcio amorfos. A partir del primer día y hasta el tercer día se observaron una serie de fases cristalinas intermedias o de transición. Después de una semana de incubación se formaron estructuras semejantes a esférulas hechas de placas cuya composición fue hidroxiapatita.

Muchas proteínas asociadas a los tejidos mineralizados (dientes y hueso) o involucradas en la estabilización de los fosfatos de calcio en los fluidos corporales (leche y saliva), han sido identificadas a nivel de genes en el cromosoma 4. Estas incluyen a las proteínas de dentina/hueso sialofosfoproteína de dentina (DSPP), proteína de matriz de dentina 1 (DMP1), sialoproteína ósea (BSP), fosfoglicoproteína de matriz extracelular, osteopontina (OPN), enamulina, ameloblastina, caseínas de leche, estaterina salival y proteínas ricas en prolina. Se han propuesto diversas funciones para cada una de estas proteínas multifosforiladas y glicosiladas, estas funciones incluyen la estabilización de los fosfatos de calcio en solución (caseína, estaterina), prevención de la precipitación espontánea de iones y tener actividad de nucleadoras y reguladoras del crecimiento de cristales de fosfato de calcio (BSP), promoción de la biomineralización (DSPP), así como la activación de vías de señalización intracelular para el control de la expresión genética. La flexibilidad para desempeñar múltiples funciones depende de la plasticidad para adoptar diversas conformaciones que tienen estas proteínas las cuales han sido caracterizadas como intrínsecamente desorganizadas.<sup>67</sup>

En este sentido y con la finalidad aportar información estructural de la proteína CEMP1 y conocer el contenido de estructura secundaria se realizó el análisis de diroísmo circular. El procesamiento de los datos de diroísmo circular indican que hrCEMP1 tiene un 28.6% de estructura alfa hélice, 9.9% de laminas beta y un 62.5 estructura aleatoria (Tabla 4), lo que demuestra que hrCEMP1 es una proteína intrínsecamente desorganizada. El uso de diferentes aditivos, amortiguadores y variaciones de pH (10mM de sulfato de cadmio, HEPES pH 7.4 y citrato de sodio pH 6.5 respectivamente), no tuvieron influencia en el contenido de estructura secundaria de hrCEMP1. Sin embargo, la adición de 1 y 2mM de cloruro de calcio disminuyó la intensidad de señal del espectro de diroísmo, incrementando el contenido de estructura aleatoria (Tabla 4). Esto puede deberse al efecto de CEMP1 en la precipitación de fosfatos de sodio y de calcio y la subsecuente formación de agregados que lleva a la disminución de proteína en estado soluble.

La predicción de la factibilidad de cristalizar hrCEMP1 se llevó a cabo con el programa *in silico* X-talPrep, este análisis se basa en la comparación de nueve características bioquímicas y biofísicas de la proteína con la correspondiente distribución de probabilidad obtenida a partir un objetivo en la base de datos. La predicción indica que hrCEMP1 tiene la expectativa de cristalización más baja que el análisis otorga. Esto se debe a que se identifican múltiples regiones desorganizadas (1-24, 34-56, 205-220, 252-264) y principalmente una región de 43 aminoácidos en la parte central de la proteína (141–184). El contenido de estructura secundaria predicho es de 23% de alfa hélice, 13% laminas beta y 63% de contenido aleatorio. Los resultados del contenido de estructura secundaria obtenidos experimentalmente por diroísmo circular son similares a los obtenidos *in silico*.

El modelo tridimensional teórico de hrCEMP1 reveló que está proteína es globular, formada principalmente por un 35% de alfa hélice con siete regiones, 62% de estructura aleatoria y 2% de láminas beta. Éstos resultados son consistentes con los observados en la predicción de cristalización, que indica que hrCEMP1 es una proteína intrínsecamente desorganizada. Se sabe que múltiples proteínas que participan en el proceso de biomineralización están intrínsecamente desorganizadas (tienen múltiples regiones desorganizadas en su conformación tridimensional).

Las pruebas de desplazamiento térmico realizadas a hrCEMP1 mediante el empleo de diferentes aditivos, variaciones del pH y composición del amortiguador se realizaron con la intención de poder establecer las condiciones que favorecieran la estabilidad y solubilidad de hrCEMP1. La solubilidad y estabilidad de las proteínas es un requisito universal en un amplio intervalo de aplicaciones como son los estudios bioquímicos, preparación de fármacos, biología estructuras y pruebas de cristalografía.<sup>88</sup> La solubilidad y estabilidad es afectada por diversos factores como son

el pH, el tipo de aditivos o co-solutos y el amortiguador. El ensayo de ThermoFluor (fluorescencia basada por cambio térmico), utiliza un fluoróforo que monitorea la desnaturalización de una proteína con respecto al incremento de la temperatura y de la presencia de aditivos. El punto medio de la transición a la desnaturalización, es determinada por el análisis de la curva de calentamiento. Cualquier cambio en la  $T_m$  bajo diferentes condiciones es indicativo de un cambio en la estabilidad de la proteína. Un desplazamiento positivo en la  $T_m$ , indica un aumento en la estabilidad de la proteína por un incremento en el orden estructural y una reducción en la flexibilidad conformacional, mientras un cambio negativo en la  $T_m$  indica una desestabilización. La comparación de la  $T_m$  en la presencia de ligandos particulares puede dar un estimado de la afinidad y posible interacción en sus fuentes nativas.<sup>89</sup> El análisis de ThermoFluor realizado a hrCEMP1 demuestra que esta proteína es termoestable a altas temperaturas ( $T_m$  en agua 73°C). Uno de los valores más bajos en la  $T_m$  se presentó cuando la proteína está en presencia del aminoácido con carga positiva arginina, la  $T_m$  para esta condición fue de 36°C (valor comparable con el control de desnaturalización, ácido tricloroacético 37°C), esto indica que la proteína está totalmente desnaturalizada. Cuando a dicha condición se la adiciona el aminoácido ácido glutámico, el valor de la  $T_m$  incrementa a 75°C. La glicina, serina y triptona también incrementan la  $T_m$  (75°C, 76°C y 78°C respectivamente). El valor más alto de  $T_m$  corresponde a la incubación con el aditivo fosfato de sodio monobásico 700mM + fosfato de potasio 1.3 M. La prueba de estabilidad en función del pH y composición del amortiguador mostro que el valor de  $T_m$  más elevado corresponde a el acetato de sodio pH 3.4 ( $T_m$  71°C), mientras que el valor más bajo corresponde para el Imidazol pH 6.6 ( $T_m$  44°C). Esto puede indicar que CEMP1 depende de la interacción con otras proteínas principalmente con regiones de aminoácidos ácidos, glicina y la interacción con altas concentraciones de fosfatos (ligandos) para lograr una estabilidad conformacional, posiblemente protegiendo regiones inestables o adoptando un cambio de estructura más favorable que evite que la proteína pierda el plegamiento.

Las proteínas generalmente contienen numerosos grupos ionizables, los cuales tienen una variedad de pKas. Como consecuencia, la solubilidad puede cambiar dramáticamente cuando se altera el pH y en algunos casos esta variación se da por cambios muy pequeños de pH (0.1 unidades). El pH afecta la naturaleza específica de las interacciones proteína – proteína modificando la posibilidad de formar puentes salinos y enlaces de hidrogeno que son cruciales para la formación de contactos específicos. Las interacciones electroestáticas, que dependen del estado de protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos, juegan un papel fundamental

en la afinidad de la unión de la proteína por su sustrato, la hidratación de la proteína y las interacciones con moléculas pequeñas y iones.<sup>60</sup>

En este trabajo demostramos por primera vez que CEMP1 es una lectina. Las lectinas, son proteínas que se unen a carbohidratos y no despliegan actividad enzimática hacia los azúcares que reconocen, ni alteran en modo alguno su estructura covalente.<sup>90</sup> Se encuentran en todos los seres vivos, desde las bacterias y plantas, hasta animales e incluso virus. El reconocimiento a carbohidratos se da en un gran número de contextos biológicos diferentes. Por lo tanto, las lectinas son un grupo altamente diverso de proteínas, que está formado de varias familias no relacionadas.

Las interacciones lectina-ligando pueden ser divididas en dos grupos generales: aquellas que involucran N- y O-glicanos,<sup>91</sup> y aquellas que involucran cadenas de glicosaminoglicanos (GAG). Los principios básicos de las primeras interacciones son que los sitios de unión son de relativa baja afinidad y se localizan en cavidades poco profundas de la superficie de las proteínas, la selectividad se da mayoritariamente por medio de una combinación de puentes de hidrógeno (que involucran a los grupos hidroxilo de los azúcares) y por empaquetamiento originado por fuerzas tipo Van der Waals de la cara hidrofóbica de los anillos de monosacáridos contra las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos y que la selectividad también puede ser otorgada por los puentes de hidrógeno entre moléculas de agua o de iones divalentes. Finalmente, la región de contacto real entre el sacárido y el polipéptido involucra típicamente a sólo un residuo de monosacárido. Como consecuencia de ello, estos sitios de unión de las lectinas tienden a tener una afinidad relativamente baja, pero son de gran especificidad.

La identificación de la actividad de lectina de una proteína generalmente se lleva a cabo mediante una cromatografía de afinidad con glicoconjugados o con el uso de células rojas sanguíneas fijadas químicamente. El aislamiento y fijación de eritrocitos tiene las siguientes ventajas, (1) los eritrocitos de diferentes especies de vertebrados tienen varios glicoconjugados en su superficie y representan un amplio intervalo de matrices naturales para la absorción de lectinas. (2) Las lectinas con una especificidad de unión a carbohidratos desconocida pueden ser aisladas e identificadas con esta técnica. (3) Los eritrocitos son económicos y viables para su uso.<sup>92</sup> En este trabajo se identificó que hrCEMP1 es una lectina mediante la aglutinación de eritrocitos de conejo formalinizados. Se determinó que hrCEMP1 es una lectina dependiente de iones divalentes (calcio) para llevar a cabo su actividad, siendo ésta muy elevada, pues aún en concentraciones muy bajas de proteína (0.003pg/ $\mu$ l), esta sigue teniendo actividad aglutinante. La actividad de aglutinación de

hrCEMP1 fue inhibida al incubar a la proteína en presencia de un carbohidrato (manopiranosido), esto indica que los sitios de reconocimiento de carbohidratos de hrCEMP1 son ocupados por el manopiranosido impidiendo la aglutinación de los eritrocitos. A pesar de contar con concentraciones bajas del carbohidrato ( $3.3\mu\text{M}$ ), hrCEMP1 tiene una afinidad muy alta a éste. Todas las lectinas conocidas tienen dos o más sitios de unión para azúcares, lo cual explica su capacidad de aglutinar, es decir, establecer enlaces cruzados con los azúcares presentes en la superficie de eritrocitos y otras células. Las lectinas multivalentes (lectinas que pueden unir dos o más moléculas de carbohidratos) pueden formar complejos entrecruzados con epítomos de carbohidrato multivalentes que se clasifican en dos tipos distintos (Brewer, 1996): Los entrecruzados lineales, llamados de tipo I, que son la mayoría solubles y ocurren entre una lectina divalente y un carbohidrato divalente y los entrecruzados no lineales, de dos o tres dimensiones, llamados de tipo II, que son la mayoría insolubles y que ocurren cuando las lectinas y/o los carbohidratos involucrados tienen una valencia mayor a dos. La formación de complejos entrecruzados de tipo II confiere especificidad adicional a las lectinas, ya que los complejos homogéneos entrecruzados se forman incluso en presencia de mezclas de lectinas y carbohidratos o glicoproteínas (Gupta et al. 1994). hrCEMP1 presenta un entrecruzamiento complejo tipo II, confirmado por la aglutinación de eritrocitos. Se piensa que esta especificidad adicional llega a ser importante cuando una lectina entrecruza glicoconjugados en la superficie celular, lo que comúnmente lleva a efectos de transducción de señales.<sup>93</sup> Este efecto podría estar relacionado con el reporte que indica que CEMP1 induce la fosforilación y translocación a núcleo de dos proteínas cinasas (JNK y p38) encargadas de vías de señalización intracelular relacionadas con la proliferación y diferenciación de cementoblastos *in vitro*<sup>57</sup> posiblemente por la interacción de esta proteína con un receptor en la membrana celular por interacción lectina.

Otro punto a considerar dentro de la caracterización son los análisis de los estados de monodispersidad y agregación de hrCEMP1 mediante dispersión dinámica de luz (DLS). Se emplearon tres condiciones para este estudio, la proteína hrCEMP1 unida al carbohidrato manopiranosido en amortiguador de citrato de sodio, la proteína sin el carbohidrato en amortiguador de citrato de sodio y la proteína sin el carbohidrato en amortiguador de citrato de sodio mas una concentración de 2mM de cloruro de calcio.

El resultado de la dispersión dinámica de luz demostró que la proteína unida al manopiranosido presenta una especie mayoritaria de un diámetro de 17.3nm (98.6% de las moléculas en la solución) y dos agregados de mayor tamaño de diámetro, 149nm (1.2%) y 623nm (0.2%). Al

realizar la diálisis de la proteína y eliminar la asociación con el manopiranosido, se presenta una agregación de hrCEMP1 en dos especies, una de 136nm (68.3% de las moléculas en la solución) y otra de 748nm (31.7%). Cuando a la proteína se le retira el carbohidrato, pero se adiciona una concentración de calcio en solución (2mM CaCl<sub>2</sub>), se presenta solo una especie de un diámetro de 241nm (100% de las moléculas en la solución). Estos datos indican que la especie con el menor grado de agregación es cuando la proteína está estabilizada con el manopiranosido (17.3nm). La proteína pierde estabilidad y aumenta el estado de agregación cuando pierde la interacción con el carbohidrato, esto es visible por la formación de dos especies de mayor diámetro, una de 136nm y otra de 748nm, (7.8 y 44 veces de mayor diámetro comparadas con la especie de 17.3nm). La adición de calcio a la proteína dializada favorece la monodispersidad, posiblemente por una coordinación en los sitios de unión a carbohidratos. Se observa una especie de 241nm (14 veces el diámetro de la especie de 17.3nm).

A la fecha se han realizado múltiples pruebas con la finalidad de encontrar las condiciones iniciales de cristalización de hrCEMP1 y aunque se han formado cristales, estos han difractado como sal o no han difractado. Sin embargo, ya que se cuenta con la caracterización bioquímica de esta proteína, se pueden optimizar las condiciones con el uso de aditivos como son la glicina, el ácido glutámico, el manopiranosido y pH ácidos que favorezcan la estabilidad estructural y generar las condiciones optimas para la cristalización de esta proteína de alto interés biológico.

## CONCLUSIONES

La proteína hrCEMP1 expresada en *Pichia pastoris* está glicosilada y plegada con un porcentaje de estructura hélice alfa de 28.6%, hojas beta 9.9% y estructura aleatoria 62.5%.

Mediante este sistema de expresión se ha logrado purificar a hrCEMP1 con un rendimiento de cerca de 1mg de proteína por litro de medio de cultivo.

El análisis de contenido de estructura secundaria indica que hrCEMP1 es una proteína con un alto contenido de estructura desordenada (62.5% de estructura aleatoria, regiones: 1-6, 16-20, 28-30, 33-56, 66-73, 87-124, 155-176, 184-197, 209-214 y 216-247), compartiendo esta característica con muchas otras proteínas asociadas al proceso de biomineralización.

hrCEMP1 expresada en *Pichia pastoris*, participa en la nucleación y regulación del crecimiento y composición de cristales de fosfato de calcio en una fase mineralizada próxima a la hidroxiapatita.

Se generó un modelo tridimensional teórico de hrCEMP1 que es consistente con el contenido de estructura secundaria obtenido a nivel experimental mediante dicróismo circular y de predicción *in silico* mediante el servidor XtalPred.

Se demostró que hrCEMP1 tiene actividad de lectina con una alta afinidad por el carbohidrato manopiranosido, siendo este el único ligando específico reportado a la fecha para esta proteína.

La estabilidad de hrCEMP1 se ve favorecida por la presencia de aminoácidos ácidos, glicina, péptidos derivados de fosfoproteínas como la tripona y una alta concentración de fosfatos y pH ácidos.

La información generada con esta caracterización bioquímica – estructural sienta un precedente que puede contribuir a la cristalización, caracterización tridimensional y entendimiento las funciones biológicas de CEMP1.

## Referencias:

1. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissue in health and disease. *Periodontology* 2000 2006; 40: 11-28.
2. Cho M-I, Garant PR. Development and general structure of periodontum. *Periodontology* 2000. 2000 24: 9-27.
3. Nanci, A. Ten cate's oral histology: Development, structure, and function. Editorial Mosby E.U.A 2007.
4. Carranza FA, Neuman MG. Clinical periodontology 8th edition. Section one. The Normal Periodontum. W.B. Saunders Company 1996.
5. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006; 40: 29-49.
6. McCulloch CAG, Lekic P, McKee MD. Role of physical forces regulating the form and function of the periodontal ligament. *Periodontology* 2000. 2000; 24:56-72.
7. Lindhe J. Periodontología clínica e implantología odontológica. En: Karting K, Lang KP, Editorial Médica Panamericana. España 2003: pp 19-67.
8. Nakae H, Narayanan AS, Raines E, Page RC. Isolation and partial characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry* 1991; 20: 7047-7052.
9. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000 2000; 24: 73-98.
10. Bartold PM and Narayanan AS. Biology of the periodontal connective tissues. Quintessence Publishing Co, Inc. 1998 Carol Stream, Illinois, USA.
11. Garant PR. Oral Cells and Tissues. Quintessence Books Chapter 7: Root formation and cementogenesis. Quintessence Publishing Co, Inc 2003.
12. Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. Histología y embriología bucodental Capítulo 4. Editorial médica panamericana. España 1999.
13. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: Cementogenesis revisited. *Periodontology* 2000. 2006; 41:196-217.
14. Arzate H, Portilla-Robertson J, Aguilar-Mendoza ME. Recombination of epithelial root sheath and dental papilla cells in vitro . *Arch Med Res* 1996; 27: 573-577.
15. Bosshardt DD. Are cementoblast a subpopulation of osteoblast or a unique phenotype? *J Dent Res* 2005: 84; 390-406.
16. Kagayama M, Sasano Y, Zhu JX, Hirata M, Mizohuchi I, Kamakura S. Epithelial rest colocalize with cementoblast forming acellular cementum but not with cementoblast forming cellular cementum. *Acta Anat* 1998; 163; 1-9.
17. Thomas HF. Root formation. *Int J Dev Biol* 1995; 38: 231-237.
18. McCulloch CA. Origins and functions of cells essential for periodontal repair: the role of fibroblasts in tissue homeostasis. *Oral Dis* 1995; 1: 271-278
19. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976; 47: 256-260.
20. Melchor AH. Cells of periodontum: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl* 1985; 67: 130-131.
21. Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res* 1994; 29; 81-94.
22. Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernández-Lagunas L, Díaz de León L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontol Res* 1996; 31: 144-148
23. Arzate H, Jiménez-García LF, Álvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of human cementoblastoma-conditioned medium derived protein. *J Dent Res* 2002; 81; 541-6
24. Wu D-Y, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan SA. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment. *J Bone Mineral Res* 1999; 11; 686-692.
25. Saito M, Iwase M, Maslan N, Nozaki N, Yamamuchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Terenaka T, Narayanan S. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 2001; 29: 242-248.
26. Arzate H, Olson SW, Page RC, Narayanan S. Isolation of human tumor cells that produce cementum proteins in cultura. *Bone and Mineral Res* 1992; 18: 15-30.

27. Weiner S, Traub W. Organization of hydroxyapatite crystals within collagen fibrils. *FEBS Lett* 1986; 206: 262-266.
28. Bonucci E. *Calcification in biological systems*, Florida Estados Unidos. CRC press 1992.
29. Low MG. The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 1989; 988; 427-454
30. Sela J, Schwartz Z, Swain LD, Boyan BD. The role of matrix vesicles in calcification. En Bonucci E. *Calcification in biological systems*. Florida, Estados Unidos CRC press 1992.
31. Whyte MP, Peck WA Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatasia. *Bone and mineral research*. Amsterdam Holanda Elsevier 1989; 6: 175-218.
32. Miao D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. *The Journal of histochemistry & cytochemistry* 2002; 50: 333-340.
33. Nociti FH, Berry JE, Foster BL, Gurley KA, Kingsley DM, Takata T, Miyauchi M, Somerman MJ. Cementum: A phosphate-sensitive tissue. *J Dent Res* 2002; 81: 817-821
34. van den Boss T, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament: age effect relation to cementum growth rate. *J Period Res* 1999; 34: 1-6.
35. van den Boss T, Handoko G, Niehof A, Ryan LM, Coburn SP, Whyte MP, Beertsen W. Cementum and dentin in hypophosphatasia. *J Dent Res* 2005; 84: 1021-1025.
36. Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. Alkaline phosphatase activity in the periodontal ligament and gingiva of the rat molar: Its relation to cementum formation. *J Dent Res* 1995; 74: 1374-1381.
37. Wuttke M, Muller S, Nitsche P, Paulsson M, Hanisch FG. Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. *J Biol Chem* 2001; 276: 36839- 36848.
38. Ganss B, Him RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999; 10: 79-98.
39. Lian BJ, Stein GS, Stein J, van Winjen AJ. Osteocalcin gene promoter: Unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *J Cell Bio Supplements* 1998; 30/31: 62-72.
40. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of bone. *Periodontology* 2000 2000; 24: 99-126.
41. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology* 2000; 19: 615-622.
42. Gehrion P. Cell-mediated calcification in vitro . En: Bonucci E. *Calcificación in biological systems*. Florida, Estados Unidos CRC press 1992.
43. Arzate H, Jiménez-García LF, Alvarez Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of a human cementoblastoma-conditioned medium-derived protein. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):541-6.
44. Arzate H, Olson SW, Page RC, Gown AM, Narayanan AS. Production of a monoclonal antibody to an attachment protein derived from human cementum. *FASEB J*. 1992 Aug;6(11):2990-5.
45. Saito M, Iwase M, Maslan S, Nozaki N, Yamauchi M, Handa K, Takahashi O, Sato S, Kawase T, Teranaka T, Narayanan AS. Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone*. 2001 Sep;29(3):242-8.
46. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res*. 1996 May; 11(5): 686-92.
47. Ivanovski S, Komaki M, Bartold PM, Narayanan AS. Periodontal-derived cells attach to cementum attachment protein via  $\alpha 5 \beta 1$  integrin. *J Period Res* 1999; 34: 154-159
48. Pitaru S, Pritzki A, Bar-Kana I, Grosskopf A, Savion N, Narayanan AS. Bone morphogenetic protein 2 induces the expression of cementum attachment protein in human periodontal ligament clones. *Connect Tissue Res* 2002; 43; 257-64.
49. Álvarez-Pérez MA, Pitaru S, Álvarez-Fregoso O, Reyes Gasga J, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struct Biol* 2003; 143: 1-13.
50. Komaki M, Kang M, Narayanan AS. Role of MAP Kinases  $p42^{erk-2}/p44^{erk-1}$  in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J Dent Res*. 2000; 79: 1789-1793.
51. Álvarez-Pérez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Carmona-Rodríguez B, Arzate H. Molecular cloning, expresión and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP23). *Bone* 2006; 38: 409-419.
52. Villareal-Ramírez E, Moreno A, Mas-Oliva J, Chávez-Pacheco J, Narayanan AS, Gil-Chavarría I, Zeichner-David M, Arzate H. Characterization of recombinant human cementum protein 1 (hrCEMP1): Primary role in biomineralization. *BBRC* 2009; 384: 49-54.

53. Carmona-Rodríguez B, Álvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández A, Suárez-Franco J, Chavarría I, Villareal E, Arzate H. Human cementum protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblast. *BBRC* 2007; 358: 763-769.
54. Arzate H, Jiménez-García LF, Álvarez-Pérez MA, Landa A, Bar-Kana I, Pitaru S. Immunolocalization of human cementoblastoma-conditiones médium derived protein. *J Dent Res* 2002; 81: 541-6.
55. Kémoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J, Farges JC, Gennero I, Cote-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brundel G, Salles J P. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel Matrix derivates (EMD) in vitro. *Cell Tiss Res* 2006; 329: 283-94.
56. Kitagawa M, Kudo Y, Ogawa I, Abiko Y, Miyauchi M, Takata T. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *BBRC* 2006; 309: 1050-1056.
57. Silvia Maldonado, Enrique Romo, Janeth Serrano, Adriana Pérez, Christian Guerra, Margarita Zeichner-David, Gabriela Mercado, Higinio Arzate. Cementum protein 1 (CEMP1) activates p38 and JNK during the mineralisation process by cementoblast-like cells in vitro. *Cell Biology International Reports* ISSN 2041-5346
58. Lia Hoz, Enrique Romo, Margarita Zeichner-David, Mariano Sanz, Javier Nuñez, Luis Gaitán, Gabriela Mercado, Higinio Arzate. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol. Int.* (2012) 36, 129–136
59. Janeth Serrano, Enrique Romo, Mercedes Bermúdez, A. Sampath Narayanan, Margarita Zeichner-David, Leticia Santos, Higinio Arzate. Bone Regeneration in Rat Cranium Critical-Size Defects Induced by Cementum Protein 1 (CEMP1). *PLoS ONE* 8(11): e78807. doi:10.1371/journal.pone.0078807.
60. Krauss Russo Irene, Merlino Antonello. An Overview of Biological Macromolecule Crystallization. *Int Journal of Molecular Sciences*, May 2013.
61. Malcolm W. MacArthur, Paul C. Driscoll and Janet M. Thornton. NMR and crystallography complementary approaches to structure determination. *TIBTFCH* MAY 1994, VOL 12.
62. McPherson A, Jose A. Gavirab. Introduction to protein crystallization. *Acta Cryst.* (2014). F70, 2–20
63. Hunter G, Goldberg H. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8562-8565.
64. Boskey AL, Maresca M, Ulrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite Interactions in vitro. Inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner.* 1993; 22: 147-159.
65. Boskey AL. Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. *Ann NY Acad Sci.* 1995; 760: 249-256.
66. Termine JD, Kleinman K, Whitson SW. Osteonectin a bone specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981; 26: 99-105.
67. Hunter GK, Goldberg HA. The inhibitory activity of osteopontin on hydroxyapatite formation in vitro. *Ann NY Acad Sci.* 1995; 760: 305-308.
68. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996; 317: 59-64.
69. Iijima M, Moriwaki Y, Wen HB, Fincham AG, Moradian-Oldak. Elongated growth of octacalcium phosphate crystals in recombinant amelogenin gels under controlled ionic flow. *J Dent Res* 2002; 81: 69-73.
70. Hunter GK, Curtis HA, Grynpas MD, Simmer JP, Fincham AG. Effects of recombinant amelogenin on hydroxyapatite formation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1999; 65: 226-231.
71. Tye CE, Rattray KR, Warner KJ, Gordon JA, Sodek J, Hunter GK, Goldberg HA. Delineation of the hydroxyapatite nucleating domains of bone sialoprotein. *J Biol Chem.* 2003; 278: 7949-55.
72. Arias JL, Fink DJ, Xiao SQ, Heuer AH, Caplan AI. Biomineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Int Rev Cytol.* 1993; 145: 217-250.
73. Gotliv BA, Addadi L, Weiner S. Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions. *Chem-Biochem.* 2003; 4: 522-529.
74. Buckholz, R. G., and Gleeson, M. A. G. (1991). Yeast Systems for the Commercial Production of Heterologous Protein. *Bio/Technology* 9, 1067-1072.
75. Romanos, M. A., Scorer, C. A., and Clare, J. J. (1992). Foreign Gene Expression in Yeast: A Review. *Yeast* 8; 423-488.

- 76 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition New York 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
77. GE Healthcare. *Affinity Chromatography Principles and Methods*. 18-1022-29. [www.gelifsciences.com/protein-purification](http://www.gelifsciences.com/protein-purification)
78. GE Healthcare. Con A Shearose 4B Affinity media. Instructions 71-7077-00AF.
79. EasySelect Pichia Expression Kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZa in *Pichia pastoris*. K1740-01. Invitrogen.
80. Moller Holger, Poulsen Jorgen. Staining of Glycoproteins/Proteoglycans in SDS-Gels. *The Protein Protocols Handbook*, 2<sup>nd</sup> Edition. Pag 773 – 777.
81. Zacharius, R. M., Zell, T. E., Morrison, J. H., and Woodlock, J. J. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analyt. Biochem* 1969: 30; 148–152.
- 82 Sean P. Ferris, Vamsi K. Kodali, Randal J. Kaufman. Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Disease Models & Mechanisms* 2014: 7; 331-341.
- 83 Jörg Breitling, Markus Aebi. N-Linked Protein Glycosylation in the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, 2013; 1-15.
84. Yu-Chieh Wang, Suzanne E Peterson, Jeanne F Loring. Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Research* 2014 24:143-160.
- 85 Shental-Bechor D, Levy Y. 2008. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proc Natl Acad Sci* 105: 8256–8261.
86. Silverman L, Boskey A. Diffusion systems for evaluation of biomineralization. *Calc Tiss Int* 2004 75; 494-501.
87. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nature*. 2003; 2: 552- 558.
88. Solubility and stability screen. Hampton Research. HR2-072 [https://hamptonresearch.com/documents/product/hr004320\\_2-072\\_user\\_guide.pdf](https://hamptonresearch.com/documents/product/hr004320_2-072_user_guide.pdf)
89. Pantoliano et al. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery., *Journal of Biomolecular Screening*, Volume 6, Number 6, 2001
90. Kocourek, J., Horejsi, V. 1983. A note on the recent discussion on the definition of the term “lectin”. En: Bog-Hansen, T. C. Y Spengler, G. A. (eds.) *Lectins. Biology, biochemistry, clinical biochemistry*. Vol. 3. DeGruyter, Berlin/Nueva York. Págs. 3-6.
91. Varki, A. 1997. Sialic acid as ligands in recognition phenomena. *FASEB journal*. 11: 248-255.
92. G.A. Fragkiadakis. Isolation of lectins from hemolymph of decapods crustaceans by adsorption on formalinized erythrocytes. *J. Biochem. Biophys Methods*. 2000; 44: 109–114.
93. Heldin, C. H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*. 80: 213-223.

## APÉNDICE

Prueba de estabilidad y solubilidad de hrCEMP1.

<b>Solubility and stability screen Hampton Research.</b>			
<b>Concentración</b>	<b>Aditivo</b>	<b>T<sub>m</sub></b>	<b>Grupo químico</b>
100 % v/v	Agua	73	Control
75 % w/v	Ácido tricloroacético	37	Control
250 mM	L-Arginina	36	Aminoácido
250 mM	L-Arginina + L-ácido glutámico 250mM	74.9	Aminoácido
500 mM	Glicina	75	Aminoácido
500 mM	L-Prolina	71	Aminoácido
120 mM	L-Histidina	72	Aminoácido
500 mM	β-Alanina	73	Aminoácido
500 mM	L-Serina	76	Aminoácido
500 mM	L-Arginina etil éter dihidroclorhídrico	64	Aminoácido
500 mM	L-Arginina dihidroclorhídrico	66	Aminoácido
500 mM	Ácido 6-aminohexanoico	71	Aminoácido
500 mM	Gly-gly	68	Péptido
200 mM	Gly-gly-gly	75	Péptido
5 % w/v	Triptona	78	Péptido
2,500 mM	Betaina monohidratado	70	Osmolito
750 mM	D-(+)-Trehalosa dihidratado	70	Osmolito
2,000 mM	Xilitol	71	Osmolito
2,000 mM	D-Sorbitol	72	Osmolito
2,000 mM	Sacarosa	73	Osmolito
500 mM	Hidroxiectoina	71	Osmolito
2,500 mM	Trimetilamina N-óxido dihidratado	69	Osmolito
2,000 mM	Metil-α-D-glucopiranosido	72	Osmolito
10 % v/v	Trietilen glicol	70	Osmolito
500 mM	Espermina tetrahidroclorhídrico	68	Poliamina
500 mM	Espermidina	54	Poliamina
500 mM	Ácido 5-aminovalérico	78	Linker
500 mM	Ácido glutárico	50	Linker
80 mM	Ácido Adípico	67	Linker
500 mM	Etilenediamina dihidroclorhídrico	68	Linker
500 mM	Hidrocloruro de guanidina	70	Caotrópico
500 mM	Urea	68	Caotrópico
500 mM	N-Metilurea	69	Caotrópico
200 mM	N-Etilurea	69	Caotrópico
30 % w/v	N-Metil formamida	57	Caotrópico
3 % w/v	Hipotaurina	68	Caotrópico

150 mM	TCEP hidrocloclorhídrico	44	Reductor
20 mM	GSH (L-Glutationa reducida) + GSSG 20mM	68	Reductor
5 % w/v	Benzamidina hidrocloclorhídrico	67	Inhibidor
50 mM	EDTA sal de sodio dihidratada	69	Quelante
100 mM	Cloruro de magnesio hexahidratado + Cloruro de calcio 100mM	69	Metal
100 mM	Cloruro de Cadmio hidratado + Cloruro de Cobalto 100mM	64	Metal
1,000 mM	No Detergente sulfobetaina 195 (NDSB-195)	72	No detergente
1,000 mM	No Detergente sulfobetaina 201 (NDSB-201)	66	No detergente
1,000 mM	No Detergente sulfobetaina 211 (NDSB-211)	73	No detergente
1,000 mM	No Detergente sulfobetaina 221 (NDSB-221)	69	No detergente
800 mM	No Detergente sulfobetaina 256 (NDSB-256)	44	No detergente
500 mM	Taurina	76	Ácido orgánico
500 mM	Acetamina	71	Ácido orgánico
500 mM	Ácido oxálico dihidratado	52	Ácido orgánico
500 mM	Manolato de sodio pH 7.0	73	Ácido orgánico
500 mM	Ácido succínico pH 7.0	74	Ácido orgánico
5 % v/v	Tacsimato pH 7.0	73	Ácido orgánico
25 % w/v	Bromuro tetraetil amonio	43	Líquido iónico
25 % w/v	Cholin acetato	70	Líquido iónico
25 % w/v	1-Etil-3-metilimidazol acetato	64	Líquido iónico
25 % w/v	1-Butil-3-metilimidazol cloruro	40	Líquido iónico
25 % w/v	Nitrato de etilamonio	64	Líquido iónico
500 mM	Sulfato de amonio	72	Sal
500 mM	Cloruro de amonio	75	Sal
500 mM	Sulfato de magnesio hidratado	71	Sal
500 mM	Tiocinato de potasio	71	Sal
250 mM	Gadolinio(III) cloruro hexahidratado	48	Sal
250 mM	Cloruro de cesio	71	Sal
250 mM	Ácido gamma-aminobutírico (GABA)	71	Sal
500 mM	Nitrato de Litio	72	Sal
500 mM	DL-Ácido málico pH 7.0	75	Sal
500 mM	Citrato de litio tribásico tetrahidratado	73	Sal
250 mM	Acetato de amonio	75	Sal
250 mM	Bencenosulfonato de sodio	71	Sal
250 mM	Toluenosulfonato de sodio	69	Sal
1,000 mM	Cloruro de sodio	75	Sal
1,400 mM	Cloruro de potasio	74	Sal
700 mM	Fosfato de sodio monobásico + Fosfato de potasio 1.3M	79	Sal
1,000 mM	Sulfato de sodio decahidratado	76	Sal

1,400 mM	Cloruro de litio	72	Sal
1,000 mM	Bromuro de sodio	74	Sal
40 % v/v	Glicerol + Cloruro de litio 400mM	69	Poliol – sal
50 % v/v	Glicerol	50	Poliol
10 % v/v	Etilen glicol	68	Poliol
10 % v/v	Polietilen glicol 200	69	Poliol
5 % v/v	Polietilenglicol monometil éter 550	71	Poliol
5 % w/v	Polietilenglicol monometil éter 750	76	Poliol
50 % v/v	Formamida	53	Poliol
50 % v/v	Polipropilenglicol P 400	48	Poliol
25 % v/v	Pentaeritritol etoxilato (15/4 EO/OH)	31	Poliol
10 % w/v	1,2-Propanediol	67	Poliol
3 % w/v	Polietilenglicol monometil éter 1,900	70	Polímero
3 % w/v	Polietilenglicol 3,350	71	Polímero
3 % w/v	Polietilenglicol 8,000	71	Polímero
2 % w/v	Polivinilpirrolidona K15	72	Polímero
100 mM	6-O- $\alpha$ -D-Maltosil- $\beta$ -ciclodextrina	28	Ciclodextrina
10 mM	(2-Hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina	46	Ciclodextrina
80 mM	$\alpha$ -Ciclodextrina	42	Ciclodextrina
10 mM	$\beta$ -Ciclodextrina	44	Ciclodextrina
50 mM	Metil- $\beta$ -ciclodextrina	28	Ciclodextrina