



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROCESOS DE BIOMINERALIZACIÓN DE CARBONATO DE CALCIO Y  
PROTEÍNAS INTRAMINERALES DE CASCARÓN DE HUEVO DE AVES**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**RAYANA RAMONA RUIZ ARELLANO**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. ABEL MORENO CÁRCAMO**  
**(INSTITUTO DE QUÍMICA)**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DR. ROBERTO ARREGUÍN**  
**(INSTITUTO DE QUÍMICA)**

**DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA**  
**(INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**  
**Doctorado en Ciencias Biomédicas)**

**MÉXICO, D.F., Diciembre 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 5 del departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Abel Moreno Cárcamo.

Este trabajo fue apoyado por el programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través del Proyecto No. IN201811 de DGAPA UNAM y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Proyecto No. 175924.

Se agradecen los apoyos brindados por:

En la primera etapa de la tesis:

Centro Latino Americano de Física (CLAF) a través del Instituto de Ciencia y Tecnología del D.F. (ICyT) Actualmente Secretaria de Ciencia Tecnología e Innovación.

En la segunda etapa de la tesis:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Becario No. 289778.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Química por la oportunidad de realizar estos estudios de grado.

A los miembros del Honorable Jurado: Dr. Enrique Rudiño Piñera, Dr. Lauro Bucio Galindo, Dra. Nuria Sánchez Puig, Dr. Antonio Romero Garrido y Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda por la revisión del manuscrito de tesis y sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Abel Moreno por abrirme las puertas de la investigación, creer en mí, encaminarme y darme consejos y sugerencias para formarme en el camino de la ciencia.

Al comité tutor conformado por los Dres Roberto Arreguín y Juan Pablo Reyes Grajeda por sus sugerencias y asesoría.

Al Dr. Antonio Romero por brindarme su ayuda y apoyo en la realización de parte de este proyecto de tesis en su laboratorio.

Al Dr. Javier Medrano por su ayuda y apoyo en la purificación y cristalización de las proteínas.

A la Dra. Patricia Cano por ayudarme con el intento de la sobreexpresión de las proteínas SCA-1 y SCA-2.

Al Dr. Omar Novelo Peralta del Laboratorio Universitario de Microscopia electrónica de Instituto de Investigación en Materiales.

A todas aquellas personas maestros compañeros y amigos que de alguna manera contribuyeron a la elaboración de este proyecto.

A todos aquellos que de alguna manera colaboraron en este trabajo.

Quiero agradecer especialmente:

A mis padres Marisela Arellano Pacheco y Arsenio Ruiz Paredes, que aunque no estén cerca de mí, me han brindado su amor y apoyo.

A mi hermana Romina por ser me mejor amiga y apoyo.

A mi hermano Renny por ser tan especial y brillante.

A mi querido Tío Carlos Alarcón, sin su apoyo no lo hubiese logrado.

A Hugo Becerril por su apoyo

A Danai Montalván por su ayuda y amistad

A Alma Cortez por apoyo

## **Dedicatoria**

**A Zoraida Ruiz De Sosa**

**A Ramón Ruiz Paredes**

**A Arcadia Pacheco**

# Índice General

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>1.1. Biomineralización</b> .....	1
<b>1.2. Estructura del cascarón de huevo</b> .....	3
<b>1.2.1. Cutícula</b> .....	4
<b>1.2.3. Botones mamilares internos</b> .....	5
<b>1.2.4. Membranas</b> .....	5
<b>1.3. Condiciones necesarias para que ocurra la biomineralización en el huevo de aves</b> ...	5
<b>1.4. Componentes de la matriz orgánica</b> .....	6
<b>1.4.1. Proteínas específicas de la matriz orgánica en el cascarón del huevo</b> .....	7
<b>1.5. Aves estudiadas</b> .....	9
<b>1.5.1. Avestruz</b> .....	9
<b>1.5.2. Emú</b> .....	10
<b>1.5.3. Ganso</b> .....	11
<b>2. Justificación</b> .....	13
<b>3. Hipótesis</b> .....	15
<b>4. Objetivos</b> .....	15
<b>5. Metodología</b> .....	16
<b>5.1. Aislamiento y purificación de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA, DCA-1 y DCA-2</b> .....	16
<b>5.2. Geles de electroforesis desnaturante</b> .....	17
<b>5.3. Geles de isoelectroenfoque</b> .....	18
<b>5.4. Cuantificación de Proteína</b> .....	18
<b>5.5. Espectrometría de masas</b> .....	18
<b>5.6. Identificación de la secuencia de aminoácidos de la ANCA-2</b> .....	18
<b>5.7. Dicroísmo circular</b> .....	19
<b>5.8. Métodos cristalográficos</b> .....	20
<b>5.8.1. Crecimiento de cristales</b> .....	20
<b>5.8.2. Optimización de la cristalización</b> .....	21
<b>5.8.3. Determinación de crioprotectores</b> .....	22
<b>5.8.4. Recolección de datos</b> .....	22

5.8.5.	Procesamiento de los datos de difracción.....	23
5.8.6.	Resolución de estructuras.....	23
5.8.7.	Afinamiento de estructuras .....	24
5.9.	Predicción de estructura por técnicas bioinformáticas.....	24
5.10.	Voltaroamperometría cíclica.....	25
5.11.	Estudios de dispersión dinámica de luz.....	26
5.12.	Fluorescencia Intrínseca.....	27
5.13.	Ensayos de crecimiento de cristales.....	27
5.14.	Estudio de los cristales de CaCO <sub>3</sub> por medio de microscopia electrónica de barrido .....	28
5.15.	Espectroscopia Raman.....	29
6.	Resultados y discusión .....	30
6.1.1.	Aislamiento y purificación de la proteína SCA-1 y 2.....	30
6.1.2.	Aislamiento y purificación de la proteína Ansocalcina.....	35
6.2.	Caracterización de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2.....	43
6.2.1.	Dicroísmo Circular.....	43
6.3.	Caracterización estructural.....	50
6.3.1.	Recolección de datos.....	50
6.3.3.	Descripción del plegamiento de la proteína .....	54
6.4.	Estudio de interacción de las proteínas con los iones carbonato.....	60
6.4.2.	Análisis de estabilidad conformacional por medio de dispersión dinámica de luz.....	64
6.4.3.	Análisis del cambio conformacional de estructura por medio de fluorescencia intrínseca.....	70
6.4.4.	Estudio de la influencia de las proteínas SCA-1, SCA-2, DCA-1 y DCA-2 en la cristalización de calcita .....	77
6.4.4.1.	Estudio del efecto de diferentes sustratos en el crecimiento de los cristales esféricos de calcita + 100 µg/mL de SCA-1 .....	80
6.4.4.2.	Estudios de la composición de los cristales de calcita por medio de espectroscopia Raman.....	83
7.	Conclusiones .....	87
8.	Referencias.....	89
9.1.2.1.	Clonaje del gen de interés en los vectores de expresión seleccionados .....	96
9.1.2.2.	Generación e identificación de los clones de expresión positivos.....	96
9.1.3.	Resultados:.....	97
	Producción de proteínas recombinantes SCA-1 y SCA-2.....	97
9.2.	Predicción de la cristalización de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2.....	101

<b>9.3. Tabla 13. Resumen de parámetros de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1, y DCA-2.</b> .....	103
<b>9.4. Alineamiento de las secuencias de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2</b> .....	103
<b>9.5. Agentes Precipitantes utilizados en la pruebas de cristalización de las proteínas estudiadas</b> .....	105
<b>9.6. Estudio del N-terminal de la ANCA-2 para comprobar su existencia.</b> .....	114
<b>9.7. Artículos publicados</b> .....	122

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Polimorfos de la calcita. ....	2
<b>Figura 2 .</b> Micrografía de las capas del cascarón de huevo. a) Cáscara completa, b) Cutícula, c) Botones mamilares y d) Membranas (Nys et al., 2001). ....	4
<b>Figura 3.</b> Imágenes de a) Avestruz adulto y b) comparación de huevo de gallina con el huevo de avestruz.....	9
<b>Figura 4.</b> a) Emú adulto b) huevos de emú. ....	10
<b>Figura 5.</b> a) Imagen de un Ganso común u oca, b) huevo de oca.....	11
<b>Figura 6.</b> Equipo de cristalización por gota sedente con temperaturas controladas.....	21
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de la purificación de SCA-1 y SCA-2 por medio de desalting e intercambio iónico, usando un intercambiador mono Q. a) pH 8 b) pH 7. ....	31
<b>Figura 8.</b> Gel SDS-PAGE de la purificación de SCA-1 y 2 por medio de intercambio aniónico a pH 8. ....	31
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de la purificación de SCA-1 y SCA-2 por medio de desalting e intercambio iónico usando un intercambiador mono S. a) pH 3 b) pH 4.....	32
<b>Figura 10.</b> Gel SDS-PAGE de la purificación de SCA-1 y 2 por medio de intercambio aniónico a pH 4. ....	32
<b>Figura 11.</b> Gel SDS-PAGE de la precipitación escalonada efectuada desde 0% a 100% de sulfato de amonio. ....	33
<b>Figura 12.</b> Cromatograma de la purificación de SCA-1 y 2 por medio de exclusión molecular usando una columna sephadex G75. ....	34
<b>Figura 13.</b> Gel SDS-PAGE de la separación de SCA-1 y 2 por medio de exclusión molecular. ....	34
<b>Figura 14.</b> a) Cromatograma de la purificación de ANCA (sobrenadante) por medio de exclusión molecular. b) Gel SDS-PAGE de las fracciones colectadas en la purificación de la ANCA. ....	36
<b>Figura 15.</b> a) Cromatograma de la purificación de ANCA (precipitado) por medio de exclusión molecular. b) Gel de SDS-PAGE de las fracciones colectadas en la purificación de ANCA.....	36
<b>Figura 16.</b> a) Cromatograma de la purificación de la ANCA-1 y ANCA-2 por medio de fase reversa. b) Geles de SDS-PAGE de la purificación de la ANCA-1 y ANCA-2 por cromatografía de fase reversa. ....	37
<b>Figura 17.</b> a) Cromatograma de la purificación de la DCA-1 y DCA-2 por fase reversa, b) Gel de SDS-PAGE de las dos fracciones colectadas. ....	38
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas de la purificación de: a) SCA-1 y -2 b) ANCA-1 y 2- c) DCA-1 y -2.....	39
<b>Figura 19.</b> Espectros de masas de SCA-1 y SCA-2 a) Extracto antes de purificar, b) SCA-1 después de su purificación, c) SCA-2 después de su purificación. ....	41



<b>Figura 20.</b> Espectros de masas de ANCA-1 y ANCA-2 a) Extracto antes de purificar, b) ANCA-1 después de su purificación, c) ANCA-2 después de su purificación. ....	42
<b>Figura 21.</b> Espectros de masas de DCA-1 y DCA-2 a) Extracto antes de purificar, b) SCA-1 después de su purificación, c) SCA-2 después de su purificación. ....	43
<b>Figura 22.</b> Espectros de dicroísmo circular para: a) las proteínas SCA-1 y SCA-2, b) las proteínas ANCA-1 y ANCA-2, c) las proteínas DCA-1 y DCA-2. ....	45
<b>Figura 23.</b> Geles de isoelectroenfoque usados para determinar el pI de las proteínas. ....	46
<b>Figura 24.</b> Geles SDS-PAGE usando el kit de detección de glicoproteínas. a) Gel sin teñir iluminado con luz UV, b) Gel teñido con azul de Coomassie.....	48
<b>Figura 25.</b> Cristales de SCA-1 obtenidos por el método de gota sedente a 12°C en una semana. ....	48
<b>Figura 26.</b> Cristales de SCA-1 a una concentración de 4 mg/mL con la condición A4 -15 % w/v MPD 5 % w/v PEG 4000 100 mM Imidazol-HCl pH 8.0.....	49
<b>Figura 27.</b> Estructura tridimensional de la SCA-1. ....	55
<b>Figura 28.</b> Estructura de la SCA-1, está estabilizada por 3 puentes disulfuro. ....	55
<b>Figura 29.</b> Superposición de dos estructuras: a) SCA-1nat (morado) y SCA-1Hg (verde), b) SCA-1 (magenta) y la OC-17 (azul). ....	56
<b>Figura 30.</b> Superficie de carga de SCA-1 y OC-17.....	57
<b>Figura 31.</b> Estructuras tridimensionales de a) SCA-1, b) SCA-2, C) ANCA-1, d) ANCA-2, e) DCA-1 y f) DCA-2.....	59
<b>Figura 32.</b> Comparación de las estructuras de SCA-1 modelada (azul) y SCA-1 determinada experimentalmente (morado). ....	60
<b>Figura 33.</b> Voltamperograma cíclico (5 ciclos) de la proteína SCA-1 usando una celda electroquímica y un electrodo de pasta de carbono (60 µg de SCA-1 adsorbida en su superficie); LiClO <sub>4</sub> 0.1 M + adiciones sucesivas de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	61
<b>Figura 34.</b> Representación gráfica de la intensidad de corriente en el electrodo de trabajo en función de la concentración de iones carbonato, fosfato o sulfato añadida para todas las proteínas estudiadas. ....	62
<b>Figura 35.</b> Representación gráfica de la intensidad de corriente en el electrodo de trabajo en función de la concentración de carbonato de sodio añadida: a) SCA-1 y SCA-2, b) ANCA-1 y ANCA-2, c) DCA-1 y DCA-2 y d) para todas las proteínas estudiadas. ....	64
<b>Figura 36.</b> Gráficos de DLS los cuales muestra el comportamiento de las proteínas a) SCA-1, b) SCA-2 y c) SCA-1/SCA-2 a diferentes temperaturas y medios. Los medios utilizados fueron: Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 70mM. ....	65
<b>Figura 37.</b> Gráficos de DLS los cuales muestran el comportamiento de las proteínas ANCA-1 y -2 a diferentes temperaturas y medios. Los medios utilizados fueron agua, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 70mM. ....	67
<b>Figura 38.</b> Gráficos de DLS los cuales muestran el comportamiento de las proteínas DCA-1 y -2 a diferentes temperaturas y medios. Los medios utilizados fueron agua, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a 70mM. ....	68
<b>Figura 39.</b> Espectros de emisión de: a) SCA-1 b) SCA-2 c) DCA-1 d) DCA-2 con diferentes concentraciones de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	73
<b>Figura 40.</b> Graficas de los datos de la dependencia de la señal de fluorescencia a la máxima longitud de onda, en función de la concentración de iones carbonato para cada una de las proteínas estudiadas. ....	75
<b>Figura 41.</b> Gráficos de Hill para cada una de las proteínas estudiadas. ....	76
<b>Figura 42.</b> Cristal de calcita. ....	78
<b>Figura 43.</b> Micrografías electrónicas de cristales de calcita crecidos en presencia de diferentes concentraciones de proteína. a) CaCO <sub>3</sub> -SCA-1 (50 µg/mL), b) CaCO <sub>3</sub> -SCA-2 (50 µg/mL), c)	

CaCO <sub>3</sub> -DCA-1 (50 µg/mL), d) CaCO <sub>3</sub> -DCA-2 (50 µg/mL), e) CaCO <sub>3</sub> -SCA-1 (75 µg/mL), f) CaCO <sub>3</sub> -SCA-2 (75 µg/mL), g) CaCO <sub>3</sub> -DCA-1 (75 µg/mL), h) CaCO <sub>3</sub> -DCA-2 (75 µg/mL), i) CaCO <sub>3</sub> -SCA-1 (100 µg/mL), j) CaCO <sub>3</sub> -SCA-2 (100 µg/mL), k) CaCO <sub>3</sub> -DCA-1 (100 µg/mL), and l) CaCO <sub>3</sub> -DCA-2 (100 µg/mL).....	79
<b>Figura 44.</b> Micrografías electrónicas del crecimiento de cristales de calcita+SCA-1 100 µg/mL en diferentes sustratos: a) Vidrio, b) Membrana de huevo de gallina, c) Moscovita, d) Grafito.	82
<b>Figura 45.</b> Micrografías de a) Cascarón de huevo de gallina b) Membrana de cascarón de huevo de gallina, c) Cascarón de huevo de avestruz d) Membrana y conos mamilares del huevo de avestruz. ....	83
<b>Figura 46.</b> Espectros Raman promedio de a) Calcita comercial, b) Cristales de calcita crecidos sin proteína, c) Cristales de calcita + 50 µg/mL de proteína d) Cristales de calcita + 75 µg/mL de proteína e) Cristales de calcita + 100 µg/mL de proteína.....	85
<b>Figura 47.</b> Espectros Raman promedio de los cristales de calcita + 100 µg/mL de proteína. El inserto corresponde a una ampliación de la región de 1600 a 3300 cm <sup>-1</sup> .....	86
<b>Figura 48.</b> Geles de SDS-PAGE a) replegamiento por medio de diálisis escalonada de SCA-2 + tiorredoxina sobrenadante y precipitado. b) Gel comparativo de los sobrenadantes con carbonatos y los sobrenadantes sin carbonatos en el replegamiento de la SCA-1-tioredoxina...	99
<b>Figura 49.</b> Geles de corte de la SCA-2 replegada con enteroquinasa a diferentes concentraciones. ....	100
<b>Figura 50.</b> Grafico del Rh vs la intensidad de la proteína replegada con diálisis escalonada en presencia de carbonatos. a) Grafico de la variación del Rh con la temperatura de SCA-2 purificada de la fuente natural en Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 70mM. ....	100
<b>Figura 51.</b> Gel SCA-2 replegada en presencia de carbonato, precipitado y sobrenadante.....	101
<b>Figura 52.</b> Alineamiento de las proteínas estudiadas señalando los sitios conservados, las diferencias y los huecos.....	104

## Indicie de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Compuestos utilizados para el soaking de los cristales de SCA-1. ....	21
<b>Tabla 2.</b> Pruebas de precipitación a diferentes valores de pH. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Secuenciación de la ANCA-2 por medio de fragmentación proteolítica, a) usando tripsina y b) usando dos enzimas de corte: tripsina y proteinasa K.....	37
<b>Tabla 4.</b> Estimación de los Porcentajes de estructura secundaria calculados para cada una de las proteínas según los espectros de dicroísmo circular obtenidos con el programa K2D. ....	45
<b>Tabla 5.</b> Comparación de los pI teóricos y experimentales.....	47
<b>Tabla 6.</b> Estadística de la colecta de datos de difracción de rayos-X.....	51
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de recolección de datos y estadísticas. ....	53
<b>Tabla 8.</b> Tamaño de agregados en los ensayos de DLS .....	69
<b>Tabla 9.</b> Máximos de absorbancia en los experimentos de fluorescencia comparados con el número de triptófanos de cada una de las proteínas. ....	73
<b>Tabla 10.</b> Constantes de disociación proteína-ligando y valores de R <sup>2</sup> obtenidas a partir de un ajuste por regresión no lineal para un modelo de dos sitios de unión similares.....	75
<b>Tabla 11.</b> Vectores utilizados para la expresión de las proteínas SCA-1 y SCA-2. ....	97
<b>Tabla 12.</b> Resumen de resultados obtenidos tras sobreexpresar las proteínas SCA-1 y SCA-2. 98	
<b>Tabla 13.</b> Resumen de parámetros de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1, y DCA-2. ....	103



## Resumen

Este trabajo está enfocado en el estudio de las proteínas intraminerales que se encuentran en el cascarón de huevo de avestruz (struthiocalcina-1 y 2), ganso (ansocalcina) y emú (dromaiocalcina -1 y 2). Dichas proteínas se encuentran en la parte interna (mineral) del cascarón de huevo, son proteínas que pertenecen a la superfamilia de proteínas tipo lectina tipo-C y están directamente relacionadas con los procesos de formación y crecimiento de los cristales de calcita. En la primera parte de este trabajo se separaron y purificaron las proteínas antes mencionadas, usando técnicas cromatográficas. Su pureza se determinó por medio de geles de electroforesis desnaturante, espectrometría de masas y dicroísmo circular. En esta etapa se comprobó que, además de la ansocalcina, el cascarón de huevo de ganso posee otra proteína intramineral, la cual se denominó ansocalcina-2 (ANCA-2). Una vez que se obtuvieron las proteínas separadas, puras y plegadas, se realizaron una serie de pruebas de cristalización para poder determinar la estructura tridimensional de las mismas. Aunque fue difícil la obtención de cristales de estas proteínas debido a su inestabilidad, la Struthiocalcina-1 (SCA-1) fue cristalizada en su forma nativa y como derivados de mercurio. Los cristales obtenidos se difractaron por medio de rayos-X, a una resolución de 1.5Å. Con los datos obtenidos fue posible resolver la estructura tridimensional de la proteína Struthiocalcina-1. Seguidamente se realizó el modelado estructural por homología del resto de las proteínas estudiadas, comprobando que cada una de estas tiene un plegamiento similar, el cual consiste en una combinación de láminas- $\beta$  y  $\alpha$ -hélices. Este plegamiento concuerda con el de las proteínas que pertenecen al grupo de las lectinas tipo C.

En la segunda parte de este trabajo se hicieron estudios de interacción de las proteínas con iones carbonato para determinar la intervención de las proteínas en el proceso de formación de calcita. Con esta finalidad se utilizaron técnicas como, voltamperometría cíclica, dispersión dinámica de luz y fluorescencia. Se determinó que las proteínas tienen una alta selectividad pero baja afinidad por los iones carbonato. Finalmente se estudió la influencia de las proteínas intraminerales analizadas, sobre la cristalización de calcita, para ello se crecieron cristales de calcita (*in vitro*) en presencia de diferentes concentraciones de cada una de las proteínas. Al analizar los cristales por medio de

microscopía electrónica de barrido, se observó que las proteínas afectan tanto el proceso de crecimiento de los cristales como el hábito cristalino de los mismos, formando cristales esféricos de calcita.

## Abstract

This work is focused on the study of intramineral proteins found in ostrich (Struthiocalcin-1 and 2), goose (ansocalcin) and emu (Dromaiocalcina -1 and 2) eggshells. These proteins are located in the inner (mineral) part of the eggshell, they belong to the C-type lectin-like protein family and are directly related to the formation and growth processes of the calcite crystals in eggshells. In the first part of this work, each protein was purified using chromatographic techniques. Purity of proteins was determined by denaturing gel electrophoresis, mass spectrometry and circular dichroism. At this stage of the project, it was found that there was another intramineral protein in addition to ansocalcin in the goose eggshell and it was designated as ansocalcin-2 (ANCA-2). Once the proteins were obtained pure and folded proteins, a series of crystallization trials were conducted to determine their corresponding three-dimensional structure. Despite the difficulty to obtain reproducible crystals of these proteins, Struthiocalcin-1 (SCA-1) was crystallized both in the native form and as mercury derivative (X-ray diffraction, resolution of 1.5 Å). The three-dimensional structure of Struthiocalcin-1 was solved by two different ways SAD and MR. Next, the structural homology modeling was performed for the other studied proteins, ensuring that all of them have a similar fold, which corresponds to a combination of  $\beta$ -sheets and  $\alpha$ -helices. The predicted folding is similar to that of C-type lectin-like proteins.

In the second part of this work the interaction between the proteins and carbonate ions were studied to determine the participation of the proteins in the calcite formation process. Cyclic voltammetry, dynamic light scattering and fluorescence were used for this purpose. It was determined that the proteins are highly selectivity but have low affinity for carbonate ions. Finally, the influence of intramineral proteins on calcite crystallization was analyzed by growing them in the presence of different concentrations of each protein. It was observed that proteins affect the process growth as well as the crystal habit of the calcite crystals analyzed by scanning electron microscope (SEM).

## **Abreviaturas**

Å-Amstrong

ANCA-Ansocalcina

CD- dicroísmo circular

DLS-dispersión dinámica de luz

DCA-Dromaiocalcina

EDTA

ESI- Electrospray Ionization

Kd-Constante de disociación

MALDI Matriz-Assisted laser Desorption/Ionization, TOF-Time of Flight

SDS-Dodecil Sulfato de sodio

$\lambda$ -Longitud de onda

OC-17- Ovocleidina-17

PAGE-Electroforesis en el gel de poliacrilamida

PDB-Banco de datos de proteínas (Protein Data Bank)

PEG-polietilenglicol

R-Factor de decaimiento de intensidades equivalentes. Compara el valor de las intensidades de las difracciones equivalentes a diferentes dosis de radiación

Rfactor- medida de concordancia entre el modelo cristalográfico y los datos experimentales de difracción

Rfree- cantidad estadística que mide la concordancia entre las amplitudes del factor de estructura observado y el computado para un conjunto de reflexiones de prueba que se mantienen aparte del afinamiento.

Rmerge-indicador que mide la dispersión de un número n de mediciones independientes de la intensidad de una reflexión determinada sobre su promedio.

RCA- rheacalcina

SCA-Struthiocalcina

T-temperatura

UFLC- Ultra Fast Liquid Chromatographic

UV-ultravioleta

%-porcentaje

Rh-radio hidrodinámico

# 1. Introducción

## 1.1. Biomineralización

En la naturaleza existen organismos que desarrollan estructuras sólidas, las cuales son útiles para el desempeño de sus funciones. Todos los vertebrados, los moluscos, crustáceos, bacterias etc., desarrollan estructuras que son producidas a partir de la combinación de materiales orgánicos e inorgánicos (Addadi, 1992).

Los procesos de biomineralización en los sistemas biológicos se relacionan con la producción de sólidos inorgánicos a partir de carbonatos, fosfatos u oxalatos de calcio, sulfatos de metales del grupo IIA, óxidos de hierro y silicio. La estructura y propiedades de los sólidos inorgánicos, vienen dadas por la asociación de la fase mineral con una fase orgánica llamada matriz orgánica (Weiner & Dove, 2003; Weiner, 2008), la cual está compuesta en su mayoría por macromoléculas, que cumplen funciones importantes durante la formación de las microestructuras que suelen ser materiales altamente ordenados. Los biominerales en general confieren propiedades extraordinarias a nivel de protección, como ocurre con las conchas de algunos animales marinos y los cascarones de huevos de aves (Mann, 2001).

La matriz orgánica está constituida generalmente por proteínas, polisacáridos, lípidos y/o una mezcla de ellos, estos componentes dentro de la matriz orgánica están clasificadas en dos grupos: 1) macromoléculas estructurales insolubles en agua, las cuales se consideran los componentes mayoritarios y un soporte para la fase mineral, 2) macromoléculas ácidas, solubles en agua, éstas son un grupo heterogéneo de proteínas, fosfoproteínas y glicoproteínas que se caracterizan por poseer una gran cantidad de aminoácidos con grupos carboxílicos (Veis & Perry, 1967; Weiner & Traub, 1984). La matriz orgánica es usualmente, considerada como el compuesto íntimamente asociado al favorecimiento de la mineralización, las macromoléculas que están integradas en la estructura del mineral, juegan un papel funcional fundamental en el control y crecimiento del mismo.

En la naturaleza existen múltiples ejemplos de biomineralización, uno de ellos es la mineralización de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), presente en los seres vivos en diferentes



sus polimorfos: en mayor proporción, calcita y aragonito, aunque también se encuentra como vaterita (que es el tercer polimorfo) o en otros compuestos como monohidrocalcita, dolomita y carbonato de calcio amorfo [(Figura 1), (Lippman, 1973; Weiss et al., 2002)].



**Figura 1:** Polimorfos de la calcita.

Los procesos de biomineralización están regulados por factores fisicoquímicos como la sobresaturación, la temperatura, los valores de pH y la solubilidad entre otros. Estos factores rigen los procesos de precipitación inorgánica. De acuerdo a la regulación y control de estos procesos por los seres vivos se han descrito dos procesos de biomineralización, los cuales son:

- Biomineralización inducida biológicamente (Lowenstam, 1981): impulsada por los organismos como resultado de la interacción entre iones y metabolitos biológicos presentes en el medio ambiente, surge de interacciones secundarias entre varios procesos metabólicos y el entorno. Por lo general esta deposición es accidental por lo que este tipo de mineralización se incorpora a la clasificación patológica que incluye a los cálculos renales y biliares.
- Biomineralización mediada por matriz orgánica (Mann, 1983): es la formación de la fase mineral sobre un esqueleto estructural orgánico, es controlada por un sitio biológico, así la precipitación tiene lugar principalmente dentro de los espacios entre los paquetes celulares o dentro de una red macromolecular. Esta es una mineralización que puede ser no patológica y se observa en las conchas de moluscos, huesos, dientes, cristales de aragonito que crecen sobre proteínas insolubles y el cascarón de huevo de las aves (Nys et al., 1999).

Este trabajo está enfocado, específicamente en el estudio de la mineralización del carbonato de calcio en el cascarón de los huevos de algunas especies de aves y las proteínas intraminerales que intervienen en este proceso.

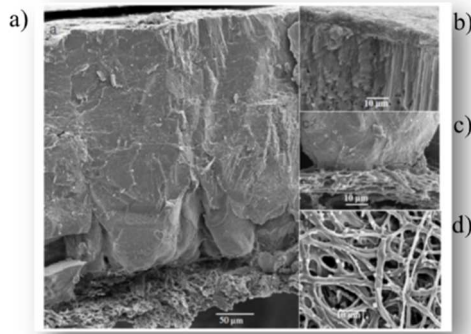
## 1.2. Estructura del cascarón de huevo

Un huevo es un cuerpo redondeado de tamaño y dureza variables, que las hembras de diversos grupos de animales producen, y que sirve de sostén y protección al embrión. Esta es la forma de reproducción de muchos peces, anfibios, reptiles y de todas las aves. Los huevos están rodeados por un cascarón que puede ser flexible o rígido y puede tener coloración, entre los pigmentos que se han detectado en el cascarón están protoporfirina, biliverdina y quelato de zinc de biliverdina, el pigmento es secretado en el oviducto y produce manchas en el cascarón inmediatamente antes de la oviposición (Miksik et al., 1996; Zhao, et al., 2006).

La mayoría de huevos de aves tienen una forma oval característica, con un extremo redondeado y el otro más aguzado, esta forma se da porque el huevo es empujado a través del oviducto por la contracción de los músculos por detrás del huevo. La forma oval tiene grandes ventajas, ya que ocupa más eficientemente el espacio dentro de un nido que una forma esférica; evita que los giros sean en posiciones muy aleatorias; generalmente el giro es lateral y es así suavizada su fuerza por el deslizamiento que posibilita la forma. La misma forma oval también aporta más resistencia a la cáscara en cuanto a las presiones en los polos.

El cascarón de huevo es un material nanoestructurado, que tiene un espesor de aproximadamente 300µm en aves pequeñas y un 2.5 mm en aves grandes (Mann & Siedler, 2004). Se compone de 95% de minerales (principalmente de calcita) y 3.5 % matriz orgánica y 1.6 % de agua (Leach et al., 1982). La función del huevo es proteger al embrión del ataque de microorganismos, además posee poros minúsculos que permiten controlar la dosificación de agua, gases e intercambio iónico, así como también es un reservorio de calcio que puede servir para la formación del esqueleto del embrión (Rose et al., 2009). La matriz orgánica en el fluido uterino actúa como un mediador de la mineralización, en múltiples casos se ha encontrado que está constituida por proteínas, lípidos, carbohidratos y glicoproteínas y se le atribuye funciones como nucleación, orientación y morfología del biomineral (Dauphin et al., 2006).

El cascarón de huevo de las aves se encuentra estructurados en capas: cutícula, empalizada mineral, botones mamilares internos y membranas (Figura 2), a continuación se describen brevemente.



**Figura 2** . Micrografía de las capas del cascarón de huevo. a) Cáscara completa, b) Cutícula, c) Botones mamilares y d) Membranas (Nys *et al.*, 2001).

### 1.2.1. Cutícula

Es la capa externa del cascarón, está compuesta principalmente de materia orgánica y tiene un grosor promedio de  $10\mu\text{m}$ , es responsable de la coloración del huevo. El espesor de los poros es mayor cerca de ella. La cutícula se deposita sobre toda la superficie del huevo, para resguardar al mismo de cualquier contaminación microbiana, en las primeras horas, después de la oviposición. Además existen grietas en esta superficie que permiten intercambios entre el interior del huevo y el medio ambiente externo (Nys *et al.*, 1991).

### 1.2.2. Empalizada mineral

La capa de empalizada es  $200\mu\text{m}$  de espesor, lo que equivale a dos tercios del espesor total de la cáscara. Se compone casi en su mayoría de minerales y una baja proporción de matriz orgánica (2-3%), es atravesada por numerosos poros, permitiendo el intercambio de gases entre el interior y exterior. Los poros son grandes, hay de 100 a 300 poros por  $\text{cm}^2$ . En esta zona, los cristales crecen y se desarrollan gradualmente por el plano cristalográfico del eje c, perpendicular a la dirección [001] en la superficie del huevo (Sharp *et al.*, 1984; Arias *et al.*, 1993; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2002). De este modo se establece una estructura de cristales de columna gradualmente con una orientación preferente. Sólo los cristales orientados perpendiculares al sustrato, continúan creciendo

en la parte de la capa más externa (García-Ruiz & Rodríguez-Navarro, 1994; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). Sin embargo, este modelo sólo es posible si hay un crecimiento anisotrópico de los cristales (mayor en una dirección) por la inhibición del crecimiento de ciertas superficies, debido a la interacción con la matriz orgánica. Por último, esta área contiene muchas cavidades (250-300 nm de diámetro) (Simons, 1971; Dennis *et al.*, 1996; Fraser, 1998; Boon, 2005).

### **1.2.3. Botones mamilares internos**

Los núcleos mamilares corresponden a una capa de aproximadamente 70µm de espesor y están depositados sobre la superficie de la membrana de la cáscara externa. Es a partir de estos sitios de nucleación donde se forman los cristales de carbonato de calcio. Por lo tanto. Son los sitios de iniciación de la mineralización (Robinson & King, 1963; Stemberger, 1977). La mineralización continúa con la formación de esférulos alrededor de estos núcleos. Esta zona se caracteriza por una estructura radial. Se inhibe por el interior y las membranas de la cáscara continúan hacia afuera formando una estructura en forma de conos característicos.

### **1.2.4. Membranas**

Las membranas contienen 95% de proteínas, 3% de lípidos y 2% de hidratos de carbono. Esta es una red de fibras finas, que constituye una membrana del cascarón interior (20 µm de espesor) en contacto con la parte mineral, y una membrana externa más gruesa de 50 µm aproximadamente. Estas dos capas forman una red tridimensional de fibras enredadas, paralelas a la superficie del cascarón y juegan un papel secundario en la capa mineralizada. (Baumgartner *et al.*, 1978; Chowdhury, 1990; Arias *et al.*, 1997).

## **1.3. Condiciones necesarias para que ocurra la biomineralización en el huevo de aves**

Para que la mineralización controlada en un organismo vivo se lleve a cabo, es necesario

tener un espacio biológicamente compartimentado (Mann, 1988; Weiner & Addadi, 2011). En el caso de los cascarones, el espacio extracelular está delimitado por las paredes del útero y la membrana del cascarón en formación (Hincke *et al*, 2012). El volumen de contacto entre estas dos entidades es llenado con un fluido libre de células al que se le denomina fluido uterino, que contiene todos los minerales y componentes orgánicos necesarios para la formación del cascarón.

Además del espacio compartimentado, también es preciso un medio de hipersaturación, ya que es necesario que el mineral se forme en condiciones de saturación (Robertson, 1982), puesto que en solución, los cationes ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y aniones ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) están en equilibrio con el complejo  $\text{CaCO}_3$ :  $\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow \text{CaCO}_{3\text{sal}}$ .

Finalmente para que ocurra la precipitación, es necesario tener agentes que propicien sitios de nucleación, pues sólo las condiciones de hipersaturación y la definición de un espacio no son suficientes para precipitar una sal. Se cree que las proteínas que conforman la matriz orgánica, juegan un papel importante en la nucleación y formación de los cristales de calcita.

#### **1.4. Componentes de la matriz orgánica**

Se han determinado 57 proteínas existentes en el fluido uterino, las cuales tienen diferentes funciones fundamentales: formación de proteoglicanos, proteínas chaperonas, proteasas/antiproteasas, antibacterianas y mineralización (Brionne *et al.*, 2014).

En el cascarón de huevo existe un porcentaje de matriz orgánica, en todas las capas del mismo, que desempeña un papel importante en el establecimiento de propiedades mecánicas y generalmente en las defensas antimicrobianas del huevo (Nys *et al*, 2004; Gautron & Nys, 2007a). Sin embargo, su contenido varía de acuerdo con los compartimentos. La matriz orgánica del cascarón es una mezcla compleja de proteínas y polisacáridos (Nys *et al*, 1999; Nys *et al*, 2001), se compone de 70 % de proteína y 11 % de proteoglicanos y polisacáridos (Tullet, 1987).

### 1.4.1. Proteínas específicas de la matriz orgánica en el cascarón del huevo

La identificación de las proteínas del cascarón inicio en la década de los 90, por técnicas convencionales de bioquímica y biología molecular. Estos enfoques permitieron la identificación de las principales proteínas de la matriz orgánica del cascarón de huevo, que se pueden dividir en tres grupos (Nys et al., 2004. Gautron & Nys, 2007c):

- Proteínas de la clara de huevo.
- Proteínas ubicuas en otros tejidos.
- Proteínas específicas del cascarón del huevo.

Las proteínas específicas del cascarón de huevo se han identificado sólo en los tejidos que participan en el proceso de mineralización, como son el istmo rojo y el útero. Estas proteínas fueron nombradas ovocleidinas, (Hincke *et al.*, 1995; Hincke *et al.*, 1999) y ovocalixinas (Gautron *et al.*, 2001; Gautron *et al.*, 2007). Entre ellas están la Ovocleidina-116, es un componente principal de la matriz del cascarón del huevo, se observa en toda la palizada mineral y abunda en el líquido uterino durante la intensa fase de calcificación del cascarón (etapa de crecimiento) (Hincke *et al.*, 1999; Mann *et al.*, 2002). Está presente en el fluido uterino y en los extractos del cascarón en dos isoformas de 200 y 116 kDa. Su ubicación la convierte en una candidata potencial involucrada en el crecimiento y en la orientación de los cristales de la capa de empalizada. Aunque aún continúa siendo incierto su papel en la mineralización. La ovocalixina-25 es otra proteína específica de la matriz orgánica del cascarón que se ha identificado y clonado exitosamente (Gautron *et al.*, 2007). El análisis de secuencia de la ovocalixina-25 ha mostrado una ovocalixina con un dominio tipo WAP inhibidor de serin-proteasa (Hennighausen & Sippel, 1982). La ovocalixina-25 contiene otro inhibidor de proteasa compuesto por un dominio llamado KUNITZ y correspondiente a un inhibidor de la tripsina pancreática en el ganado vacuno, aun no se ha determinado la función de esta proteína.

La ovocleidina 17 (OC-17) es la primera proteína intramineral específica del cascarón de huevo de gallina que se aisló, caracterizó (Hincke et al., 1995; Mann & Siedler, 1999) y se determinó estructuralmente (Reyes-Grajeda, 2002; Reyes-Grajeda, 2004). Presenta un peso molecular de 17 kDa y 142 aminoácidos, se expresa exclusivamente en las células tubulares del útero y la expresión ocurre en el fluido uterino durante la fase de crecimiento

de la calcificación de la cáscara de huevo (Gautron et al., 1997; Ajikumar et al., 2003). Se encuentra consistentemente en la capa de empalizada y de manera abundante en la capa mamilar (mineral).

En el cascarón de huevo de otras especies de aves se encuentran proteínas homologas a la OC-17, como la ansocalcina (ANCA) del cascarón de huevo de ganso (*Anser anser*) con 132 aminoácidos, (Lakshminarayanan *et al.*, 2002. Lakshminarayanan *et al.*, 2003). Esta proteína contiene siete cisteínas a diferencia de la OC-17 que tiene seis. En el huevo de avestruz (*Struthio camelus*), se encuentran las proteínas estruthiocalcina-1 y -2 (SCA-1 y SCA-2). Por último, en el emú (*Dromaius novaehollandiae*) y el ñandú (*Rhea americana*), se encuentran dos proteínas y denominadas respectivamente dromaiocalcinas-1 y -2 (DCA-1 y -2) y rheacalcinas-1 y 2 (RCA-1 y -2) (Mann & Siedler, 2006). Todas estas proteínas tienen una similitud de secuencia con la OC-17 que va de 40 a 70% con la OC-17.

El análisis de la secuencia de la OC-17, ayudó a identificar a estas proteínas como perteneciente a la superfamilia de las proteínas lectina tipo C, que son similares en sus motivos estructurales a lectinas dependientes de calcio (Mann & Siedler, 1999). Los miembros de esta superfamilia comparten un patrón común que consta de aproximadamente 110 a 140 aminoácidos (Drickamer & Homans, 1993; Drickamer, 1999). Los primeros miembros caracterizados de esta familia corresponden a lectinas calcio-dependiente (lectinas Tipo-C) (Lakshminarayanan *et al.*, 2002; Iovanna & Dagorn, 2005). ). Esta familia se conoce ahora como familia de proteínas similares a lectinas tipo-C (C-type lectin-like su expresión en inglés), puesto que se encontró la presencia de motivos tipo lectina en proteínas que no se unen al calcio (Mann & Siedler, 2006).

Las proteínas que se encuentran específicamente en el cascarón de huevo, o proteínas intraminerales, son de especial interés, ya que se cree que están directamente relacionadas con el proceso de nucleación, formación y crecimiento de los cristales de calcita. Debido a que han sido poco estudiadas, el presente trabajo se enfoca principalmente al estudio de este tipo de proteínas, provenientes de tres especies de aves: avestruz, ganso y emú.

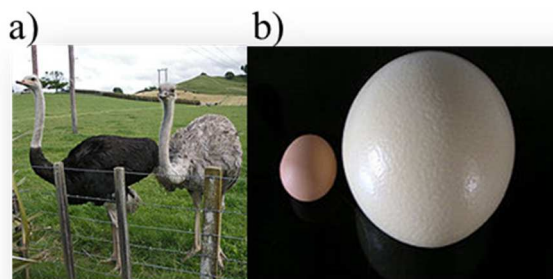
## 1.5. Aves estudiadas

El avestruz y el emú son aves *paleognatas*, del linaje de las ratites, son aves que tienen un gran tamaño y son incapaces de volar. Por otro lado, el ganso es un ave perteneciente al superorden de las *Neognathae*, al cual pertenecen la mayoría de las aves vivas.

### 1.5.1. Avestruz

El avestruz (*Struthio camelus*) es una especie de ave estrutioniforme de la familia *Struthionidae* (Figura 3). Es un ave grande no voladora propia de África, aunque anteriormente también habitaba en el Oriente Medio. Es el ave actual más grande y más pesada; puede alcanzar los 3 metros de altura, y pesar unos 180 kg. Un huevo de avestruz mide 25 cm de largo y tiene un color nácar o amarillento (posiblemente, para evitar el recalentamiento del huevo bajo el sol de la sabana).

En la naturaleza, como animal libre y salvaje, cada hembra puede poner desde 10 hasta 15 huevos. Sin embargo, en cautiverio cada hembra llega a poner unos 50 huevos por temporada. Una hembra madura tiene una producción anual promedio de 40 a 60 huevos durante la estación de postura que varía dependiendo del clima. Un huevo de avestruz pesa alrededor de 1.5 kg y equivale aproximadamente a 24 huevos de gallina (Figura 3b).



**Figura 3.** Imágenes de a) Avestruz adulto y b) comparación de huevo de gallina con el huevo de avestruz.

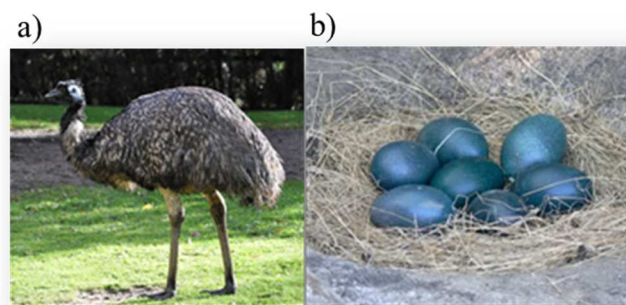
El cascarón de huevo de avestruz posee dos tipos de proteínas intraminerales, similar a lectina tipo C. El conocimiento estructural de estos dominios es de interés en función de



los procesos evolutivos y bioinorgánicos de los sitios de unión debido a que aparecen en otras especies (como por ejemplo en las proteínas anticongelantes de peces). Las dos proteínas intraminerales mayoritarias presentes en el cascarón de huevo de avestruz son la SCA-1 y la SCA-2 de 132 y 140 residuos de aminoácidos respectivamente (Mann, 2004).

### 1.5.2. Emú

Es un ave del Orden *Casuariformes*, casi tan grande como el avestruz y muy parecida a este, su plumaje es muy ralo y de un colorido grisáceo a pardo amarillento y generalmente habitan en las llanuras del continente Australiano en su hábitat natural. *Dromaius* es un género de aves estrutioniformes de la familia *Dromaiidae* conocidas como emú, son aves grandes que alcanzan los dos metros de altura, pesan unos 45 kg y no son voladoras (*ratitae*). En la actualidad sólo sobrevive una especie, el emú común (Figura 4a). Los huevos son de un color azul-verdoso oscuro (Figura 4b), probablemente debido a que los depredadores de estas aves son nocturnos, estos huevos son más pequeños que los del avestruz, no obstante son de buen tamaño.



**Figura 4.** a) Emú adulto b) huevos de emú.

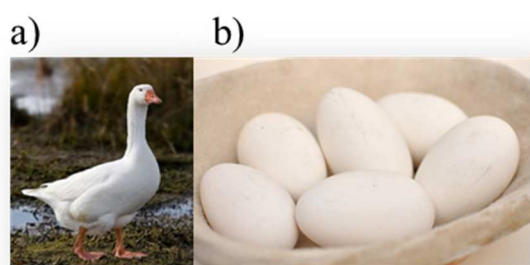
La hembra pone todos los días uno o dos huevos de cascarón grueso. Los huevos tienen dimensiones de 134 x 89 mm y pesan entre 700 y 900 g aproximadamente equivalen a 10 huevos de gallina.

La matriz orgánica del cascaron del huevo del emú presenta, como componente mayoritario, dos proteínas similares a lectinas tipo C, estas proteínas son DCA-1 y DCA-

2. Las proteínas SCA-1 y DCA-1 presentan entre sí un  $\approx 70$  % de identidad, mientras que la SCA-2 y la DCA2 presentan  $\approx 82$  % (Mann & Siedler, 2006).

### 1.5.3. Ganso

*Anser* es un género de aves anseriformes de la familia *Anatidae*, conocidos vulgarmente como ánsares o gansos. Dos de sus especies, *Anser anser* y *Anser cygnoides*, incluyen varias razas domesticadas que se conocen como ocas. (Figura 5a).



**Figura 5.** a) Imagen de un Ganso común u oca, b) huevo de oca.

Los gansos tienen la gran ventaja de poder ser criados únicamente a partir de proteínas provistas por la hierba y tienden a consumir más de lo necesario, y por esta razón, se vuelven demasiado pesados para volar. Ponen un huevo diario de un tamaño de 70 mm, equivalente a dos huevos de gallina (Figura 5b).

La ANCA es la proteína similar a lectina tipo C aislada y caracterizada del cascarón del huevo de ganso. En experimentos de cristalización *in vitro*, se ha demostrado que a bajas concentraciones de ANCA se induce la formación de cavidades en las caras romboedrales de la calcita. Esto indica una fuerte interacción entre los grupos ácidos presentes en la proteína y el crecimiento del cristal nucleado. Se cree que la ANCA juega un papel importante en la calcificación del cascarón del huevo de ganso y actúa como puente proteico que estabiliza a los cristales recién formados contra la fractura (Lakshminarayanan *et al.*, 2006).

Como se hizo mención anteriormente, este trabajo se enfocó en aislar y optimizar el método de purificación de las proteínas intraminerales que se encuentran en los cascarones de huevos de avestruz, emú y ganso. Posteriormente, una vez que se obtuvieron con grado de pureza aceptable ( $\geq 90\%$ ), se realizaron pruebas de cristalización

para su determinación estructural por cristalografía de Rayos-X, y se hicieron estudios de interacción proteína-carbonato, con el fin de determinar cuál es el papel que las proteínas intraminerales juegan en el crecimiento de los cristales de calcita y cuál es el mecanismo de formación del cascarón de huevo.

## 2. Justificación

El estudio de las estructuras biomineralizadas es un área de gran interés en el campo de la investigación en materiales. Esto se debe a múltiples razones, una de las principales es que estas son estructuras sumamente complejas con propiedades únicas, en muchos de los casos superiores a las de los materiales artificiales. Por otra parte, en la mayoría de los casos los organismos que desarrollan las estructuras son sumamente sencillos, desde el punto de vista evolutivo, y sin embargo desarrollan materiales con estructuras, arreglos y composiciones altamente sofisticados que hasta ahora no han sido reproducidos por el hombre.

Sin duda la complejidad del estudio y la síntesis de los compuestos orgánicos naturales no son tópicos triviales y por tanto es relevante un esfuerzo en esta dirección con el propósito de inferir los mecanismos que dominan cada sistema y lograr reproducir materiales de interés. Asimismo, resulta de gran importancia poder determinar y proponer los mecanismos de los procesos que suceden en estos sistemas (Chow et al, 1996).

Estos procesos forman parte de una nueva área de la química: la Química de Materiales Bioinorgánicos que ha inspirado la síntesis de nuevos materiales, basados en las microestructuras con alto grado de organización y las propiedades químicas de sólidos inorgánicos cristalográficamente relacionados con macromoléculas biológicas obtenidos en seres vivos ((Química Biomimética), (Julian, 2014)). La posibilidad de generar nuevos materiales a partir de biominerales tiene un impacto importante en diversas áreas como la medicina, geología, construcción, cristalografía, etc.

Por otra parte, las proteínas ocupan un lugar importante como biomoléculas en los seres vivos, debido a que tienen funciones diversas como la participación en procesos biocatalíticos (enzimas), entidades de protección (anticuerpos), son transportadoras de iones o moléculas (hemoglobina, mioglobina) o la formación de las cápsides de los virus. Asimismo, se ha encontrado que algunas proteínas, polímeros u otra clase de compuestos orgánicos podrían ser responsables de los procesos de nucleación y crecimiento de

crisales en la biomineralización o producción de sólidos inorgánicos controlados por sistemas biológicos.

Hasta el momento, diversas proteínas de la matriz orgánica del cascarón de huevo de algunas aves han sido purificadas y caracterizadas. Algunas de las proteínas reportadas hasta ahora son la Ovoalbúmina (McReinolds, 1978), la lisozima (Canfiel, 1963), la Ovotransferina (Gautron et al., 2001), la osteopontina (Pines et al., 1995), la ovocleidina-116 (Hincke et al., 1999), la ovocalixina-32 del cascarón de huevo de gallina (Gautron, 2001) y, como se mencionó anteriormente la primera proteína intramineral del cascarón de huevo de gallina determinada estructuralmente fue la Ovocleidina-17 (Reyes-Grajeda et al., 2004). Reyes-Grajeda *et al.* en este aporte propusieron que existe una interacción  $\text{CaCO}_3$ -proteína, con base a estructura 3D resuelta mediante cristalografía de rayos-X. De manera similar, Marín-García *et al.*, 2008, publicaron el aislamiento y purificación de las proteínas que se encuentran en el cascarón de avestruz e hicieron estudios sobre la interacción proteína-carbonato por vías electroquímicas. Aunque no se obtuvo la estructura en tridimensional, ni se hicieron los estudios con proteínas homólogas de otras aves de familias relacionadas.

En resumen, la mineralización del cascarón de huevo de aves es un modelo prominente para la biomineralización, no sólo debido a su importancia para la reproducción, sino también por el interés comercial asociado con la calidad del cascarón. Un análisis y comparación de las proteínas constituyentes de cascarones de huevo de varias especies contribuirían a una mejor comprensión del proceso de mineralización de la misma. A su vez el estudio de este proceso en los cascarones de huevo, es de interés, ya que se puede visualizar un impacto en la técnica y la tecnología futura, con el advenimiento de la formación de nuevas estructuras que presenten un ordenamiento cristalino y cuyo orden confiera propiedades especiales a los materiales.

### **3. Hipótesis**

Las proteínas intraminerales encontradas en el cascarón de huevo de aves, tales como avestruz, ganso y emú, están relacionadas con los procesos de nucleación, formación de fases minerales de carbonato de calcio y el control estructural de la misma. Por lo tanto, la determinación de la estructura tridimensional de las proteínas implicadas en estos procesos, y el estudio de la interacción de estas con el carbonato de calcio, permitirá proponer los posibles mecanismos y los fundamentos químicos que expliquen la función biológica.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. General**

- Realizar un estudio químico-estructural de las proteínas implicadas en procesos de mineralización de carbonato de calcio en cascarones de huevo de avestruz, ganso y emú.

#### **4.2. Específicos**

- Aislar y purificar las proteínas SCA-1 y SCA-2 del avestruz, ANCA del ganso y DCA-1 y DCA-2 del emú.
- Cristalizar las proteínas aisladas por métodos clásicos.
- Caracterizar la estructura 3D vía rayos-X.
- Realizar ensayos de interacción de las proteínas con carbonato de calcio.

## **5. Metodología**

### **5.1. Aislamiento y purificación de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA, DCA-1 y DCA-2**

El aislamiento y purificación se basó en la metodología desarrollada por Mann (Mann, 2004). En primera instancia, se lavaron los cascarones de huevo de cada especie, con agua, posteriormente se trataron con una disolución de EDTA al 5% por 45 minutos, para facilitar la eliminación de la membrana y la capa externa. El cascarón limpio se trituró en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo fino, el cual se disolvió en una solución de ácido acético al 10% (20 mL de ácido acético por 1g de huevo). Posteriormente el extracto se concentró en un amicón o por medio de centrifugación, en ambos casos usando una membrana de corte molecular de 3 kDa. La muestra fue dializada contra 5 veces con 10 volúmenes de ácido acético al 5%. Para precipitar la fase proteica, la solución se sobresaturó con sulfato de amonio (sigma 99.0 % de pureza), después de 24 horas se centrifugó a 64.500 r.p.m durante 30 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y el sólido fue resuspendido en ácido acético al 5 % (v/v), con este mismo compuesto se dializó contra 5x10 volúmenes para remover el sulfato de amonio.

Para la separación y paso final de purificación de las proteínas se hicieron pruebas con diferentes técnicas cromatográficas hasta optimizar el método. En primera instancia se usó cromatografía de intercambio iónico, en la que la separación de las proteínas, se basa en las diferencias en la carga de su superficie. El método se basa en la formación de interacciones iónicas entre los grupos polares cargados de la superficie de las proteínas y el gel de intercambio iónico. De esta forma, las proteínas neutras al pH utilizado no interaccionan con la columna y son eliminadas en el lavado. Las proteínas que interaccionan con la columna son eluidas con un tampón que o bien tenga una mayor fuerza iónica o un pH diferente. Se probó purificar a las proteínas estudiadas, mediante cromatografía de intercambio iónico columnas Mono Q y Mono S (Biorad, Madrid-España), no obstante no fue posible su separación por medio de este método.

Como segunda prueba se realizó la purificación de las proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular, la cual es una técnica que separa proteínas basándose en diferencias de su tamaño. El método se fundamenta en la utilización de una resina compuesta por partículas esféricas con poros de un tamaño adecuado a través de las cuales las proteínas difunden a una velocidad proporcional a su tamaño. Se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida Ultrarápida (UFLC, por sus siglas en inglés) y una columna Sephadex G75, el volumen de inyección fue de 500µL de muestra, y la fase móvil fue un tampón de citratos a pH 3.8. La separación de las proteínas por medio de esta técnica fue eficiente para la SCA-1 y -2 y la ANCA, no obstante la separación de las proteínas DCA-1 y -2 no fue posible por medio de este tipo de cromatografía, debido que estas proteínas poseen un peso molecular muy cercano de 16.370 kDa y 16.645 kDa respectivamente.

La purificación de las proteínas DCA-1 y -2 se realizó por medio de cromatografía de fase reversa, técnica que permite separar moléculas en base a su polaridad, las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que establecen con la sílica sin modificarse. Se usó una columna Júpiter C18 de UFLC fase reversa (250 x 10 mm; 5 µm). Se inyectaron 1500 µL de muestra, y la fase móvil fue acetonitrilo (Fluka, grado HPLC) de ácido trifluoroacético al 0.1 % (Sigma 99.9% de pureza), utilizando un gradiente lineal de 0-100 % en 45 minutos, con una velocidad de flujo de 1 mL/min.

## **5.2. Geles de electroforesis desnaturalizante**

La electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (*sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), se utilizó para la identificación y monitoreo del proceso de purificación de las proteínas, mediante la determinación de los patrones de bandas proteicas en las distintas fracciones obtenidas en las separaciones cromatográficas. Para SDS-PAGE se siguió el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Los geles se corrieron en un equipo de electroforesis vertical Mini-PROTEAN 3 (Biorad), se montaron sobre placas de cristal de tamaño 0.75mm x 10cm x 7cm. Las muestras se incubaron con el tampón de solubilización durante 10 min a 90°C. La intensidad de corriente constante fue de 20 mA durante aproximadamente 1h a temperatura ambiente. La tinción de los geles se realizó con Azul-Coomassie R-250 al 0.5% (p/V), a temperatura ambiente, en acético: isopropanol: H<sub>2</sub>O (1:3:6) durante 20 min. La decoloración se realizó con una disolución metanol: acético: H<sub>2</sub>O (2:1:10).



### **5.3. Geles de isoelectroenfoque**

Se determinó el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas purificadas por medio de isoelectroenfoque analítico en microgeles de acrilamida (LKB-Ampholine PAG-Plate, Sigma-Aldrich, 99.0% pureza), conteniendo anfolitos para un intervalo de pH de 3.5 a 9.5. Se utilizó un kit de calibración de isoelectroenfoque que incluye proteínas de pI conocido y se utilizó un equipo PhastSystem.

### **5.4. Cuantificación de Proteína**

Mediante espectroscopia en la región ultravioleta, se determinó la concentración de proteína a partir de los valores de absorbancia a 280 nm, para cada una de las fracciones obtenidas de la purificación a partir de cromatografía de líquidos de alta eficiencia, alícuotas de 0.5 mL de la fracción analizada. (ver coeficientes de extinción en el anexo 9.3)

### **5.5. Espectrometría de masas**

Los análisis de espectrometría de masas se efectuaron en un espectrómetro de masas Bruker Esquire, utilizando la técnica de MALDI-TOF (Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization) la cual implica ionización y desorción por láser inducida por matriz. La ionización de las moléculas de la muestra se consigue tras mezclar éstas con una matriz formada por una sustancia capaz de absorber a la longitud de onda del UV. La mezcla sólida formada se irradia con un láser cuya energía es absorbida por la matriz, lo que provoca su ionización y la de la proteína. Una vez ionizadas y en estado gaseoso, las moléculas se hacen pasar a un analizador donde se produce la separación en función de la relación masa/carga. Esta técnica se usó como un criterio de pureza basándose en el peso molecular de las proteínas. La matriz usada fue una mezcla de ácido sinapínico y ácido 2,5-dihidroxibenzoico.

### **5.6. Identificación de la secuencia de aminoácidos de la ANCA-2**

Se observó que después de ser purificado el extracto proteico del cascarón de huevo de ganso que este contenía más de una proteína. La identificación de la segunda proteína purificada, a la cual se le denominó ANCA-2, comenzó con la corrida de un gel de SDS-PAGE, el siguiente paso fue el recorte del gel y la posterior digestión de la muestra

mediante dos proteasas, las cuales fueron tripsina porcina y proteinasa-K, para hacer por duplicado la identificación, tras este paso se genera un conjunto de péptidos que fueron analizados por espectrometría de masas.

El espectrómetro de masas utilizado en el análisis de la proteína puede ser dividido en dos partes:

1) Fuente de iones que genera e introduce los iones analitos en el instrumento:

-Ionización ESI (Electrospray Ionisation): Ionización por electronebulización.

-Ionización MALDI: Esta fuente de ionización suele asociarse a un analizador de tiempo de vuelo (TOF, Time-Of-Flight) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico, y un segundo analizador TOF que proporciona un mejor enfoque.

En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ión padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

2) Detector para medir las masas de los iones generados.

## **5.7. Dicroísmo circular**

Las proteínas presentan actividad óptica en la zona del UV-lejano (180-240 nm), debido al carácter quiral que adquiere el enlace peptídico al encontrarse en un entorno rígido y, asimétrico en la estructura proteica. Por tanto, en esta zona, la técnica de CD es muy sensible a la estructura secundaria que adopta una proteína y cada elemento de estructura secundaria ( $\alpha$ - hélice, hoja- $\beta$ , giros y otros) tiene un espectro de CD característico (Woody, 1995).

Se utilizó la técnica de dicroísmo circular para determinar el plegamiento correcto o el contenido de estructura secundaria de las proteínas. Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro Perkin Elmer 34. Se tomaron espectros en la región del UV lejano (190-240 nm) para cada una de las proteínas. El porcentaje de estructura secundaria se calculó a través de software K2D.

El programa K2D es uno de los pocos programas, de redes neuronales, que realiza cálculos de dicroísmo circular. Una red neuronal es un programa que permite detectar

modelos y correlaciones en los datos. El programa K2D permite determinar conformaciones de hélices  $\alpha$  y estructura  $\beta$ . Este programa sólo utiliza los datos obtenidos entre 200 y 240 nm y proporciona mejores estimaciones de lámina  $\beta$  cuando dispone de datos con un limitado rango de longitud de onda. (Sreerema, 1999).

## **5.8. Métodos cristalográficos**

### **5.8.1. Crecimiento de cristales**

El objetivo de la cristalización de proteínas es obtener cristales bien ordenados y de un tamaño adecuado ( $>0.05$  mm; idealmente de unos 0.3 mm). Estos cristales se producen a partir de una disolución sobresaturada de proteína. Para que la proteína se considere apta para cristalización se toman en cuenta los siguientes requisitos:

- Concentración adecuada (5-20 mg/ml)
- Pureza adecuada ( $>95\%$ ),
- Ser homogénea y estable

Se usaron las estrategias de cristalización tradicionales, que se basan en alcanzar la sobresaturación mediante difusión en fase vapor. Esta técnica consiste en que una pequeña gota compuesta por la proteína y por el agente precipitante en proporciones iguales, se mantiene dentro de una cámara hermética, la cual está formada por un reservorio que contiene un volumen mucho mayor de agente precipitante. En estas condiciones la gota pierde agua poco a poco, hasta que la concentración en la gota y el reservorio son iguales. Existen dos modalidades de esta técnica, en gota colgante y en gota sedente. La técnica de preferencia empleada fue la de gota sedente a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Todos los ensayos de cristalización se realizaron en placas de 96 pozos Compact Clover (Jena Biosciences, Jena, Alemania). Para localizar las condiciones iniciales de cristalización se utilizaron las soluciones comerciales *Crystal Screen I*, *Crystal Screen II*, *Crystal Screen*, (Hampton Research, CA, USA), Jena Bioscience I-X (Jena Bioscience GmbH, Alemania) y Emerald Biosystem Wizard I-III (Rigaku Reagents, Inc., USA), cuyos contenidos se pueden encontrar en el anexo 9.5.

Se determinó el tiempo y temperatura adecuada para la cristalización mediante un dispositivo de control de temperatura (CENTEO BioSciences TG40, Figura 6)



**Figura 6.** Equipo de cristalización por gota sedente con temperaturas controladas.

### 5.8.2. Optimización de la cristalización

Para optimizar la cristalización de la proteína SCA-1, se repitieron las pruebas con las condiciones en las que hubo indicios de cristalización, en composición 1:1 y 1:2 de agente precipitante/proteína y se adicionaron diferentes compuestos que pudieran ayudar al mejoramiento de los cristales, se usó el kit de aditivos de Hampton Research (anexo 9.5). Posteriormente, a algunos de los cristales obtenidos, se les hizo un *soaking* (remojado) con metales pesados (átomos con elevados números atómicos, como son Hg y Pt (tabla 1).

**Tabla 1.** Compuestos utilizados para el *soaking* de los cristales de SCA-1.

METAL	Compuesto	Formula química
Hg	Ácido Mersalico (Mersalyl)	$C_{13}H_{18}HgNO_6$
Hg	Etil (2-mercaptobenzoato-(2-)-O,S) mercurato (1-) de sodio (Thiomersal)	$C_9H_9HgNaO_2S$
Hg	Acido <i>p</i> -clorometilbenzoto	$C_7H_4HgO_2$
Pt	Ter-Piridina de platino	$C_{15}H_{11}ClN_3Pt$

Pt	Potasio hexachloroplatinato(IV)	$K_2PtCl_6$
----	------------------------------------	-------------

### 5.8.3. Determinación de crioprotectores

Una vez que se obtuvieron varios cristales de SCA-1, se hicieron las pruebas para encontrar el crioprotector adecuado montando un cristal y difractándolo durante pocos minutos (Los cristales difractaron a 2.2 Å de resolución). Los crioprotectores adecuados fueron una composición de 25% y 20 % de MPD para las condiciones del kit de Jena Bioscience y finalmente para la condición 26 de Hampton Research se usó como crioprotector glicerol 30%.

Los cristales se sumergieron en cada solución crioprotectora y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Para su transporte se utilizaron contenedores Dewar.

### 5.8.4. Recolección de datos

La colecta de datos de difracción para el cristal de SCA-1 que creció en 26-Hamtomp Research, se realizó en un equipo de rayos-X de ánodo rotatorio MicroMax-007 con detector RAXIS IV para macromoléculas. Para obtener la estadística se empleó el software Rigaku Crystal Clear 2.0 r4 © 1998-2009 (Rigaku, Inc.), con un límite de resolución de 50.000- 2.000 Å. Los datos fueron tomados a 2.3 Å de resolución.

Para la difracción del resto de los cristales de SCA-1, se utilizó la radiación de sincrotrón; un conjunto de datos nativos completo fueron recolectados en un detector de píxel PILATUS en el ALBA, instalación de sincrotrón situado en Barcelona (España) y en Grenoble (Francia).

### 5.8.5. Procesamiento de los datos de difracción

El procesamiento de los datos de difracción es el paso en el cual, a partir de las imágenes de difracción se obtiene una lista de reflexiones, cada una con sus intensidades y sus desviaciones estándar. Fundamentalmente este proceso se puede dividir en tres etapas, en la primera etapa se determina la orientación del cristal, los parámetros de celda y su posible grupo espacial. En la segunda etapa se genera un conjunto de reflexiones (*data set*) y se integran todas las imágenes, es decir a cada señal (*spot*) de cada una de las imágenes se le asigna un índice de Miller y una intensidad/desviación estándar. Finalmente en la tercera etapa se escalan las reflexiones medidas en cada imagen y se mezclan. Los datos fueron procesados usando los siguientes programas del paquete CCP4: MOSFLM (Battye et al., 2011) y SCALA (Winn et al., 2011).

### 5.8.6. Resolución de estructuras

El objetivo de un estudio de difracción de rayos-X es determinar la densidad electrónica  $\rho(x, y, z)$  para cada punto de la celda unidad y a partir de esta poder construir un modelo de la proteína cristalizada entre el espacio real y el recíproco.

Los módulos de los factores de estructura que representan las amplitudes de los haces difractados, se obtienen directamente a partir de las intensidades medidas en el detector. En cambio las fases no se pueden obtener experimentalmente, por lo que hay que recurrir a distintos métodos para resolver lo que se ha denominado el problema de las fases. No existe ninguna relación formal entre las amplitudes y las fases a excepción de la que está en la función de densidad electrónica. Esto implica que si se puede tener algún conocimiento *a priori* de la estructura o la densidad electrónica se podría obtener un valor para las fases, este es el fundamento de todos los métodos para resolver el problema de la fase. (Taylor, 2010)

En este trabajo se usaron dos de los métodos más comunes para resolver el problema de las fases, el primero de ellos fue el reemplazo molecular (MR), en este método se dispone de una proteína parecida (>25% de identidad de secuencia por lo que probablemente tenga una estructura muy similar) de estructura conocida, esta se puede utilizar como si fuera la proteína que va a determinarse y sirve como un primer modelo que posteriormente será afinado. El segundo método utilizado fue el de dispersión anómala simple (SAD), el cual está basado en la introducción de átomos pesados en el cristal, para utilizar rayos-X a una

frecuencia próxima a la frecuencia natural de oscilación de los electrones de estos átomos pesados. Bajo estas condiciones se produce la denominada dispersión anómala que produce diferencias en las intensidades entre las denominadas reflexiones de Friedel (parejas de reflexiones que en condiciones normales deberían tener la misma amplitud e idénticas fases, pero con signos opuestos). A partir de estas diferencias se puede hacer una primera estimación de las fases con las que se puede calcular un mapa de densidad electrónica sobre el que se puede construir el modelo. Los programas usados para resolver el problema de las fases fueron PHASER (McCoy et al., 2007) y Crank (Ness, 2004).

### **5.8.7. Afinamiento de estructuras**

El Afinamiento de una estructura es el proceso por el cual se ajustan los parámetros de la estructura, es decir las coordenadas de cada átomo (x y z) y sus factores térmicos (B, los cuales son una estimación de la vibración de cada átomo alrededor de su posición central) para optimizar el acuerdo entre las observaciones y la predicción a partir del modelo. El refinamiento fue realizado utilizando el programa REFMAC (Murshudov *et al.*, 2011). Finalmente la validación de la estructura fue realizada usando MolProbity (Davis *et al.*, 2007).

## **5.9. Predicción de estructura por técnicas bioinformáticas**

Para tener una idea cercana de cómo es la estructura tridimensional de las proteínas que no pudieron ser cristalizadas, se hizo un modelado por homología, el cual se basa en la suposición razonable de que dos proteínas homólogas compartirán unas estructuras muy similares (Rost & Valencia, 1996). Puesto que un plegado proteico está evolutivamente más conservado que su secuencia de aminoácidos, una secuencia objetivo puede ser modelada con una precisión razonable sobre una plantilla relacionada muy distante, siempre que la relación entre objetivo y plantilla sea perceptible en el alineamiento de sus secuencias. En las predicciones se utilizó siempre la secuencia de aminoácidos de cada una de las proteínas como guía. Esta secuencia se obtuvo de la base de datos SWISSPROT (Gasteiger *et al.*, 2001).

El proceso consta de 4 pasos básicos: identificación de las posibles proteínas-molde, alineamiento proteína-problema y proteína(s)-molde, construcción del modelo y evaluación del mismo. Para el caso específico de las proteínas estudiadas el modelado se realizó por medio del servidor Robetta (full\_chain protein structure prediction server <http://www.robetta.bakerlab.org>), que provee herramientas automatizadas tanto para la predicción de estructura de proteínas como para su análisis.

Para la predicción de estructuras, las secuencias de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2 se enviaron al servidor donde se arreglaron en dominios y modelos estructurales usando los métodos de modelamiento comparativo y en el caso de la ANCA-2 se el servidor hizo una predicción de estructura *de novo* ya que no se encontraron proteínas homologas, finalmente Robetta genero modelos 3-D.

## **5.10. Voltaroamperometría cíclica**

La voltamperometría cíclica es un método analítico basado en propiedades eléctricas de una solución de analito, cuando forma parte de una celda electroquímica. El análisis de voltamperometría cíclica proporciona los valores de intensidad del potencial, por esta razón resulta una herramienta útil para detectar el estado oxidante general del analito.

Para llevar a cabo un experimento de voltamperometría cíclica, se requieren al menos dos electrodos. El electrodo de trabajo, que hace contacto con el analito, debe aplicar el potencial deseado de una manera controlada y facilitar la transferencia de electrones desde y hacia el analito. Un segundo electrodo actúa como la otra semicelda, este segundo electrodo debe tener un potencial conocido con el que medir el potencial del electrodo de trabajo.

Tomando en cuenta las ventajas del método se realizaron determinaciones electroanalíticas de respuesta a iones carbonato, con cada una de las proteínas estudiadas, con el fin de determinar si estas proteínas son selectivas a estos iones (Marín et al., 2008), los ensayos se realizaron a una velocidad de barrido de  $100 \text{ mVs}^{-1}$  en un potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 30. Se usó un sistema de tres electrodos, electrodo de referencia: calomel saturado (EG&G PAR),  $E = 0.241 \text{ V versus NHE}$ , electrodo auxiliar: alambre de platino y el electrodo de trabajo elaborado a base de carbón vítreo con superficie de  $0.03 \text{ cm}^2$ .



El electrodo de carbono está constituido por una columna de 0.8 g de polvo de grafito, con un tamaño de partícula entre 1-2  $\mu\text{m}$  y una pureza del 99.99 % y 0.2 mL de aceite de silicona. Las soluciones de cada proteína a estudiar (SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 o DCA-2; 4  $\mu\text{L}$  a 1mg/mL) se adicionaron a la superficie del electrodo de pasta de carbono y se esperó a que se evaporara el agua en su totalidad (30 minutos aproximadamente). Se utilizó como electrolito de soporte  $\text{LiClO}_4$  (0.1 mol  $\text{L}^{-1}$ ), el cual fue desoxigenado por burbujeo de  $\text{N}_2$  (g) (INFRA, de alta pureza, 99.9 %) durante 15 minutos. Las adiciones estándar de iones carbonato fueron realizadas por medio de una micropipeta (Eppendorf).

### **5.11. Estudios de dispersión dinámica de luz**

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), permite medir las fluctuaciones en la intensidad de dispersión con respecto al tiempo, a través de la ecuación de Stokes-Einstein la cual permite derivar el radio hidrodinámico. Tomando el radio hidrodinámico. Tomando en cuenta que la intensidad de luz dispersada es proporcional a la masa molecular y concentración, es posible determinar el tamaño de moléculas y nanopartículas. Como esta técnica es sensible a la presencia de pequeñas cantidades de agregados, es ideal para identificar la polidispersidad (homogeneidad) de las proteínas. Para cada una de las proteínas estudiadas, se realizaron experimentos de DLS con el fin de estudiar los estados de agregación de las proteínas en función de la temperatura. Se usaron diferentes concentraciones de disoluciones de carbonato de sodio, utilizando el equipo Malvern Nano S con tecnología láser NIBS (Non Invasive Back Scattering), con un controlador Peltier de temperatura, la disolución se filtró con una malla de 0.02  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, esta disolución se introdujo inmediatamente en el equipo de DLS que cuenta con un diodo láser de longitud de onda de 633nm. Una vez introducida la muestra en diferentes concentraciones de soluciones amortiguadoras se realizó un barrido de temperaturas entre 5 y 30°C. La concentración de carbonato de sodio de cada una de las disoluciones utilizadas fue de 10 mM, 70 mM y 100 mM, debido a que estas concentraciones se asemejan las que se encuentran en el fluido uterino de las aves (sistema biológico donde se forma el cascarón, (Gautron et al., 1997)).

## **5.12. Fluorescencia Intrínseca**

La técnica de espectroscopia de fluorescencia, es muy útil en estudios de dinámica conformacional de biomoléculas por su alta sensibilidad y su capacidad de respuesta a cambios en el microentorno de la sonda fluorescente tanto a nivel local, como global, en tiempo real. Las proteínas con fluorescencia intrínseca poseen un espectro de emisión característico, reflejo del contenido de residuos aromáticos y de la posición de éstos dentro de su estructura. Esta fluorescencia puede ser utilizada para determinar los cambios conformacionales en las proteínas.

Las proteínas estudiadas poseen en su estructura de 6 a 8 triptófanos, este aminoácido contiene un grupo indol sustituido en posición C3, y presenta un comportamiento fotofísico complejo, características que lo hacen un buen punto de partida en la caracterización de las proteínas, ya que la posición del máximo del espectro de emisión del triptófano en la proteína es muy sensible a cambios en la polaridad del entorno, esta resulta una herramienta muy útil para detectar cambios conformacionales en las proteínas en presencia de los iones carbonato.

La determinación del espectro de fluorescencia de la proteína fue hecha con un espectrofotómetro de fluorescencia (Cary Eclipse) usando una cubeta de cuarzo (10 mm), este fue medido con una excitación de 295 nm y se registraron los espectros de emisión de 300 a 450 nm. Se tomó el espectro de fluorescencia para la mezcla de la proteína con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Sigma, pureza 99.9 %) a diferentes concentraciones crecientes.

## **5.13. Ensayos de crecimiento de cristales**

Con la finalidad de determinar el efecto de las proteínas intraminerales en la morfología de cristales de carbonato de calcio, se sintetizaron cristales de calcita en presencia de las proteínas. Los cristales de calcita fueron crecidos mediante la técnica de difusión en fase vapor, utilizando un sistema diseñado *ad hoc* (champiñón de cristalización, diseñado para

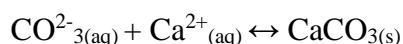
crystalización por difusión en fase vapor, Dominguez-Vera et al., 2000) para que la síntesis de los cristales se diese con una presión de vapor homogénea, producto de la descomposición del carbonato de amonio ( $\sigma$ ; 0.1 mol L<sup>-1</sup>). En el mismo sistema se montaron pruebas control (sin influencia de las proteínas) y con la influencia de diferentes concentraciones de proteínas, las cuales fueron 50, 75 y 100  $\mu$ g/mL. Las gotas de solución de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), a la cual se adicionaron las proteínas y se colocaron sobre un cubreobjetos siliconizado, se mantuvieron a una concentración constante final, en todos los casos de 0.1M. El sistema se selló perfectamente para evitar fugas. El volumen total de las gotas fue de 4 $\mu$ L y todos los experimentos se realizaron a 18 °C.

Después de tres días aparecieron los cristales de calcita, según el mecanismo descrito a continuación.

Al difundirse el amonio se produce un incremento del pH necesario para que se produzca la precipitación de CaCO<sub>3</sub>, según la reacción (Hernández- Hernández et al., 2008a):



Luego, en presencia de iones calcio en la disolución de la gota se produce la reacción de precipitación de carbonato cálcico:



#### **5.14. Estudio de los cristales de CaCO<sub>3</sub> por medio de microscopia electrónica de barrido**

En un microscopio electrónico de barrido (SEM, Scanning Electron Microscope por sus siglas en inglés), se utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen ampliada de la superficie de un objeto. Es un instrumento que permitió la observación y caracterización superficial de los cristales obtenidos como resultado de estudios de cristalización *in vitro*, debido a que tiene una gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y permite que se enfoque a la vez una gran parte de la muestra.

El microscopio electrónico de barrido está equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados

que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image).

Los cristales fueron analizados usando un microscopio TESCAN VEGA3 SB con presión variable. Los cristales fueron crecidos en un cubre objetos de vidrio de 18 mm (5.13) y posteriormente fueron cubiertos con una capa de oro para darle propiedades conductoras a la muestra, y se utilizó un voltaje de 12 a 18 keV a bajo vacío.

### **5.15. Espectroscopia Raman**

La espectrometría Raman es una técnica espectroscópica utilizada para el estudio de los modos vibracionales, rotacionales y otros de baja frecuencia en un sistema. Se basa en la dispersión inelástica, o dispersión Raman, de la luz monocromática, que por lo general procede de un láser en el rango visible. La espectrometría Raman se utiliza comúnmente en química, ya que la información vibracional es muy específica para los enlaces químicos de las moléculas. Por lo tanto, proporciona una huella dactilar de la molécula que puede ser identificada. La región de huella digital de las moléculas orgánicas está en el rango de 500-2000  $\text{cm}^{-1}$  (Dietzek, 2011).

La espectrometría Raman ofrece varias ventajas para el análisis microscópico. Dado que se trata de una técnica de dispersión, las muestras no necesitan ser fijadas o seccionadas. Los espectros Raman pueden ser obtenidos a partir de un volumen muy bajo ( $<1 \mu\text{m}$  de diámetro); estos espectros permiten la identificación de especies presentes en ese volumen. El agua no interfiere de manera apreciable. Por lo tanto, la espectroscopia Raman es adecuada para el examen microscópico de minerales, tomando en cuenta las características de la técnica, esta fue idónea para el análisis de composición de los cristales de calcita obtenidos.

Los espectros Raman se obtuvieron utilizando el microscopio Raman DXR (Thermo Scientific) equipado con un diodo-bombeado, de estado sólido (DPSS) 532 nm láser. Una placa de vidrio de 18 mm con los cristales se colocó en un recipiente de  $\text{CaF}_2$  en el soporte del microscopio.

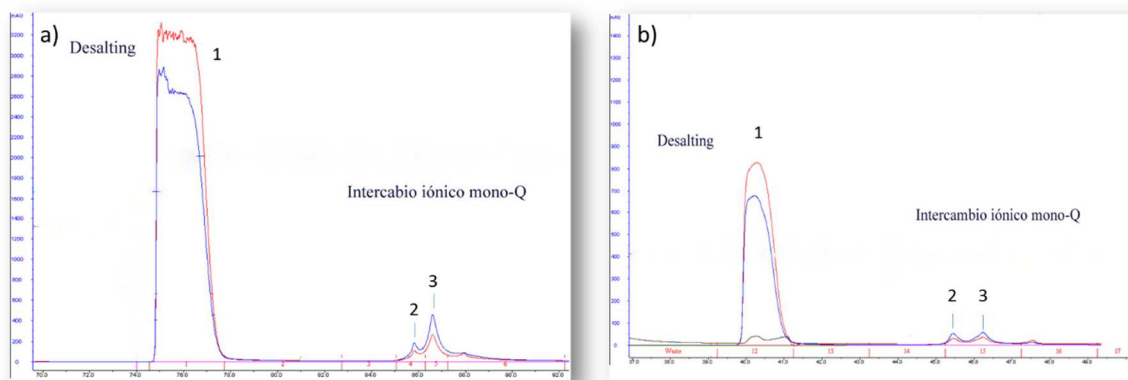
## **6. Resultados y discusión**

### **6.1. Optimización de la purificación de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA, DCA-1 y DCA-2**

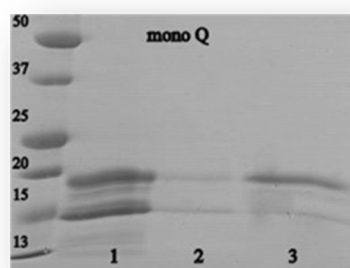
#### **6.1.1. Aislamiento y purificación de la proteína SCA-1 y 2**

Una vez realizada la primera etapa del aislamiento de las proteínas SCA-1 y SCA-2 (ver metodología), en la cual se logró la extracción de ambas proteínas del cascarón, se procedió a purificarlas. Dado que la separación de estas proteínas es compleja, por lo tanto se hicieron pruebas con diferentes procedimientos que a continuación se explican.

En primera instancia se utilizó una columna de desalado (*desalting*) para remover el ácido acético del extracto proteico, seguidamente se procedió a separar la muestra por medio de cromatografía de intercambio iónico, primero se usó una columna aniónica (intercambiador mono Q). Las soluciones utilizadas para la fase móvil fueron: solución A 50 mM tris pH 8, 50 mM de NaCl y solución B 50mM tris pH 8, 1 M de NaCl. A este valor de pH la proteína se precipitó, por lo que se prepararon los amortiguadores a valores de pH más bajos (pH 7 y 7.5), no obstante la proteína se quedó retenida en la columna y precipitó causando la pérdida de más del 80% de la muestra que se inyectó. En la Figura 7 se muestran los cromatogramas de la purificación por medio de intercambio aniónico, en ambos cromatogramas se observan dos picos, señalados como 1 y 2, los cuales se recolectaron por separado. En el gel de electroforesis desnaturizante de la Figura 8, se observan varias bandas que prueban que las proteínas no están puras, por ende se concluyó que no era posible la separación de la proteína por medio de intercambio aniónico, ya que a pesar de que se observan dos picos que pertenecen a cada una de las proteínas estas presentan trazas de la otra.

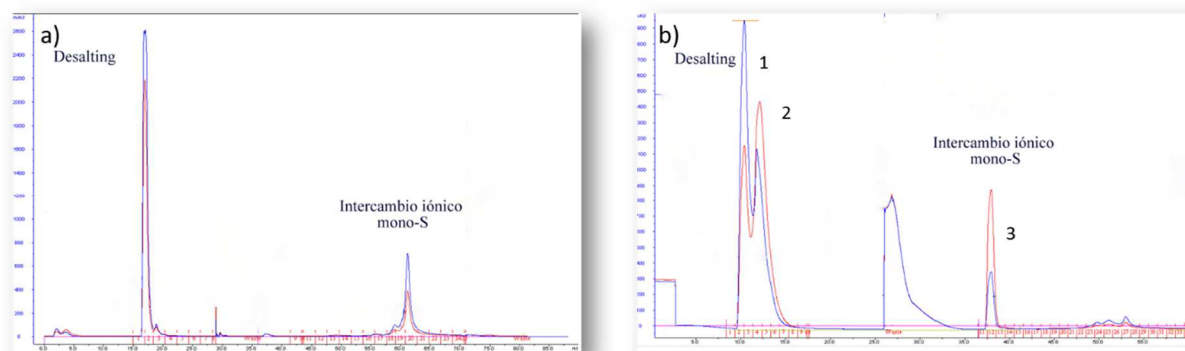


**Figura 7.** Cromatograma de la purificación de SCA-1 y SCA-2 por medio de *desalting* e intercambio iónico, usando un intercambiador mono Q. a) pH 8 b) pH 7.

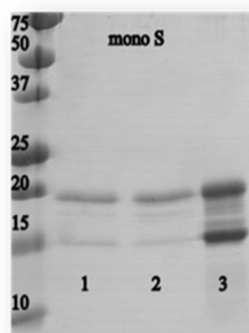


**Figura 8.** Gel SDS-PAGE de la purificación de SCA-1 y 2 por medio de intercambio aniónico a pH 8.

Una vez descartada la posibilidad de purificar la proteína usando cromatografía de intercambio aniónico se hicieron pruebas con una columna de intercambio catiónico utilizando una columna mono S. Las fases móviles utilizadas fueron: solución A 50 mM citratos pH 3, NaCl 50 mM y solución B 5 mM citratos pH 3, NaCl 1M. Al igual que con el método anterior en el cromatograma (Figura 9), se observó que la concentración de proteína que se obtuvo era muy baja, ya que las bandas presentan una absorbancia pequeña en comparación con la cantidad de proteína que se inyectó. Además se observó que aparecía una sola banda, lo que indica que una de las dos proteínas no salió de la columna, por lo que se infiere que las proteínas precipitan dentro de la columna a estos valores de pH, al hacer el gel de SDS-PAGE (Figura 10) de la única fracción colectada se observa que es una mezcla de las dos proteínas nuevamente por lo que se puede concluir que las proteínas SCA-1 y 2 del cascarón de huevo de avestruz no pueden ser separadas por medio de cromatografía de intercambio iónico.



**Figura 9.** Cromatograma de la purificación de SCA-1 y SCA-2 por medio de *desalting* e intercambio iónico usando un intercambiador mono S. a) pH 3 b) pH 4.



**Figura 10.** Gel SDS-PAGE de la purificación de SCA-1 y 2 por medio de intercambio aniónico a pH 4.

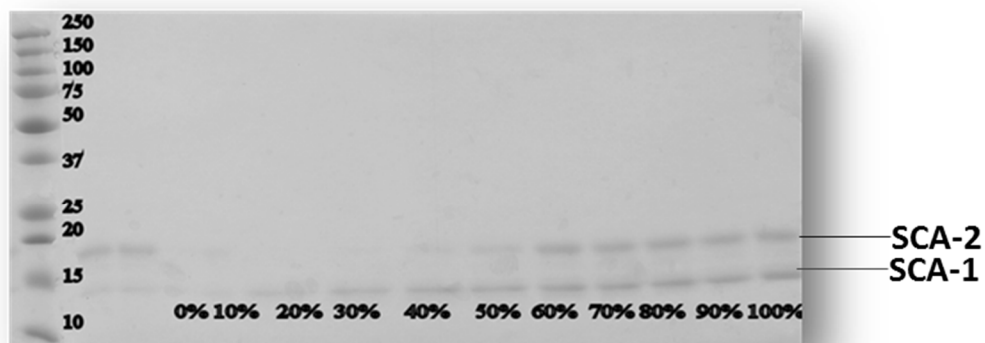
Al analizar los resultados de la separación de la proteína por medio de intercambio iónico se concluyó que las proteínas tienen comportamientos diferentes a distintos valores de pH, basándose en esto, se hicieron pruebas de precipitación utilizando amortiguadores con cuatro distintos valores de pH (ver tabla 2) y por medio de diálisis se hizo el intercambio lento del amortiguador. Se asumió que si una sola proteína precipitaba a un valor determinado de pH esta podía ser una manera sencilla de separar las dos proteínas.

**Tabla 2.** Pruebas de precipitación a diferentes valores de pH.

VALOR DE pH	SOLUCIÓN AMORTIGUADORA	RESULTADO
3	Ácido Cítrico	Precipita SCA-1 y SCA-2

3.5	Ácido Cítrico	Precipita SCA- 2 abundantemente y SCA-1 en menor proporción
4	Ácido Cítrico	Precipita SCA-2 abundantemente
7	Tris	Precipitan SCA-1 Y SCA-2
7.5	Tris	Precipitan SCA-2 y SCA-1
8	Tris	Precipitan SCA-1 y SCA-2

A un valor de pH de 4 sólo la proteína SCA-2 precipita, con base en este resultado se propuso dializar el extracto en una solución tampón de citratos a pH 4, para precipitar la SCA-2 y permitiendo que la SCA-1 quedara pura. No obstante para complementar esta prueba con diferentes pH, se realizó una precipitación escalonada con sulfato de amonio, se observó que con una concentración del 30% de sulfato de amonio la proteína SCA-1 puede obtenerse pura en el precipitado (Figura 11). Proponer una estrategia de purificación con estas pruebas resulto difícil, ya que se pierde una cantidad grande la muestra en esta etapa, y sólo es posible obtener soluble a la SCA-1.



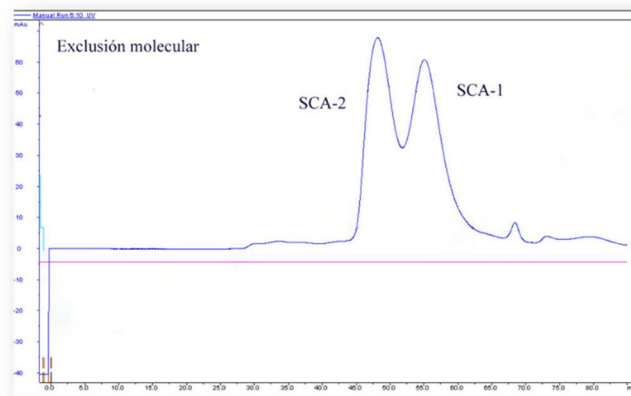
**Figura 11.** Gel SDS-PAGE de la precipitación escalonada efectuada desde 0% a 100% de sulfato de amonio.

Como última prueba, el extracto de las proteínas en solución tampón de citratos a pH 3.8 se inyectó en una columna de exclusión molecular Sephadex G75 en el cromatograma se obtuvieron dos picos (Figura 12) cuyas correspondientes fracciones fueron recolectadas

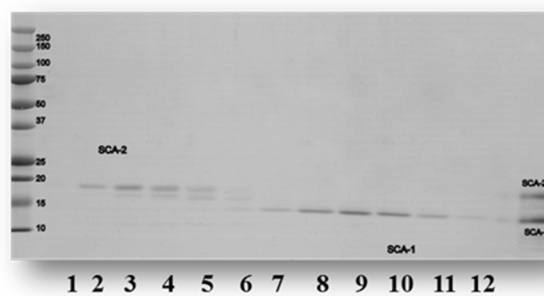


por separado. En gel de electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), cada banda pertenece a cada una de las fracciones colectadas (Figura 13), se observó que las fracciones 2, 3 y 4 contenían únicamente la proteína SCA-2 pura, mientras que las fracciones 8, 9 10 y 11 pertenecen totalmente a la SCA-1 pura, por lo se determinó que usando una columna de exclusión molecular se logró la separación satisfactoria de las proteínas SCA-1 y SCA-2.

Una vez optimizado el método de aislamiento y purificación de las proteínas intraminerales en el cascarón de huevo de avestruz, se purificaron 100 g de cascarón molido obteniendo 4 mg/mL de SCA-1 y 3 mg/mL de SCA-2.



**Figura 12.** Cromatograma de la purificación de SCA-1 y 2 por medio de exclusión molecular usando una columna sephadex G75.

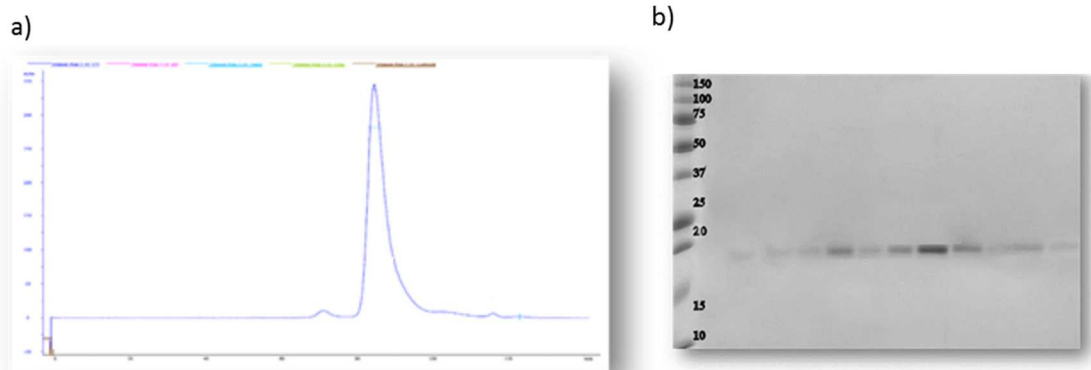


**Figura 13.** Gel SDS-PAGE de la separación de SCA-1 y 2 por medio de exclusión molecular.

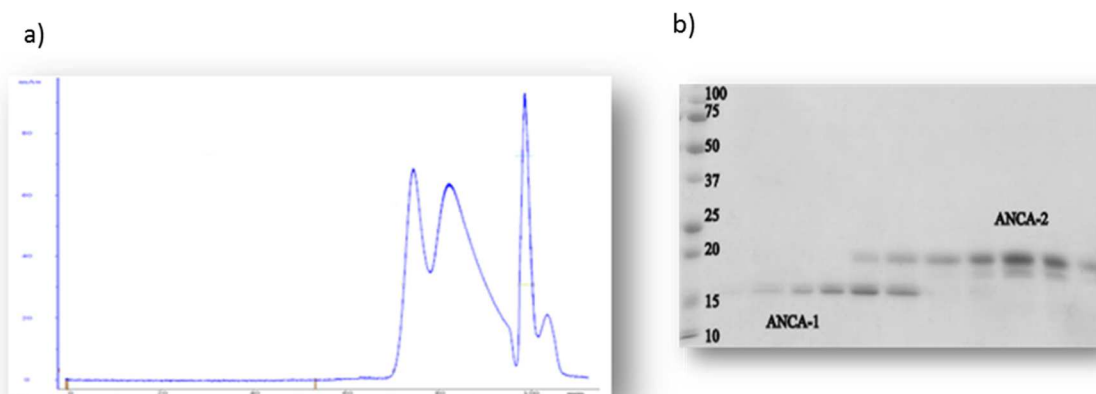
### 6.1.2. Aislamiento y purificación de la proteína Ansocalcina

La proteína intramineral encontrada en el cascarón del huevo de ganso ANCA fue aislada y separada con el método implementado para la purificación de las proteínas SCA-1 y SCA-2. Tras dializar con un amortiguador de citratos a pH 4 la muestra precipitó, el precipitado fue resuspendido en la misma solución amortiguadora a un valor de pH de 3.8 y se inyectaron por separado ambas muestras (sobrenadante y precipitado resuspendido). En el cromatograma del sobrenadante (Figura 14a) se mostró solo un pico, en el gel de las fracciones recolectadas en esta purificación (Figura 14b) se observa que efectivamente hay una sola proteína, que podría ser la ANCA, mientras que en el cromatograma del precipitado (Figura 15a) se observaron dos picos, lo que sugiere que existe otra proteína intramineral además de la ANCA en el huevo de ganso. En el gel de SDS-PAGE de la Figura 15b se observa en los primeros carriles las bandas concuerdan con al peso de la ANCA-1, en los carriles del medio se observan dos bandas que pertenecen a la combinación de ambas proteínas y en los últimos carriles una banda que puede ser otra proteína diferente. Se observa una doble banda para la segunda proteína, este fenómeno se asocia a la separación de la estructura cuaternaria de la proteína posiblemente a algunas modificaciones postraduccionales.

Para corroborar la existencia de una segunda proteína se hizo secuenciación del N-terminal al extracto total y a una de las dos proteínas (ANCA, anexo 9.6). Se observó que, al igual que en el caso de los huevos de avestruz y emú, existen dos proteínas implicadas en el proceso de mineralización del cascarón de huevo de ganso. Se denominó ANCA-1 a la proteína ya conocida y ANCA-2 a la segunda proteína encontrada en el cascarón de huevo de ganso.

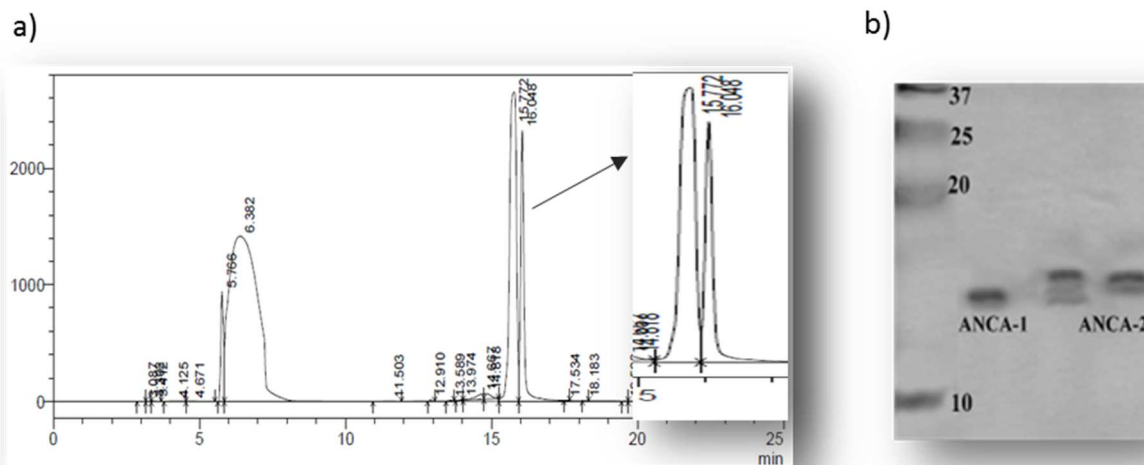


**Figura 14.** a) Cromatograma de la purificación de ANCA (sobrenadante) por medio de exclusión molecular. b) Gel SDS-PAGE de las fracciones colectadas en la purificación de la ANCA.



**Figura 15.** a) Cromatograma de la purificación de ANCA (precipitado) por medio de exclusión molecular. b) Gel de SDS-PAGE de las fracciones colectadas en la purificación de ANCA.

Como criterio para corroborar la existencia de las dos proteínas en el cascarón de huevo de ganso se utilizó cromatografía de fase reversa usando una columna C18. En el cromatograma del extracto del huevo de ganso se observaron dos picos que corresponden a dos proteínas diferentes, (ANCA-1 y ANCA-2, Figura 16a), lo cual se corroboró con un gel de SDS-PAGE (Figura 16b).



**Figura 16.** a) Cromatograma de la purificación de la ANCA-1 y ANCA-2 por medio de fase reversa. b) Geles de SDS-PAGE de la purificación de la ANCA-1 y ANCA-2 por cromatografía de fase reversa.

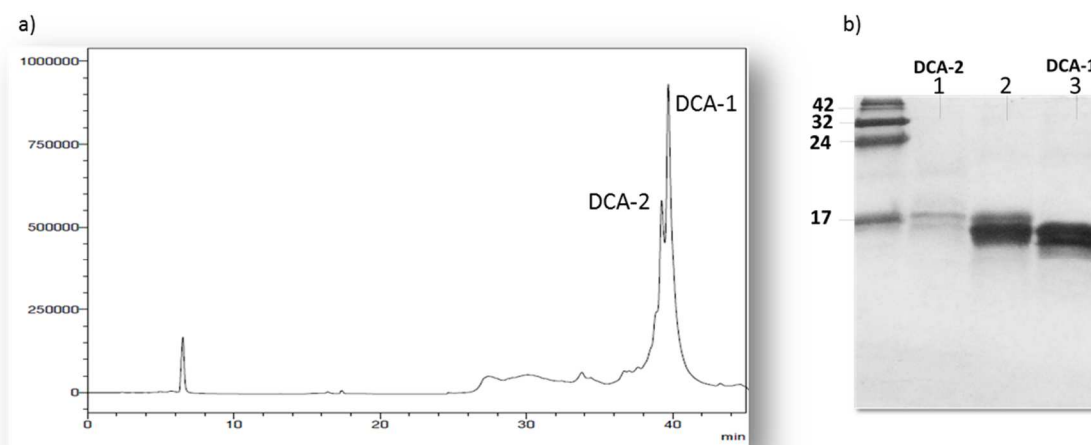
La existencia de más de una proteína intramineral en el cascarón de huevo de ganso es novedosa, por ello se determinó la secuencia de la proteína ANCA-2 por medio de fragmentación proteolítica (Tabla 3), los resultados de la secuenciación de esta proteína mostraron que, efectivamente, es una nueva macromolécula no estudiada, además no se encontró referencia de ella en ninguna base de datos.

**Tabla 3.** Secuenciación de la ANCA-2 por medio de fragmentación proteolítica, a) usando tripsina y b) usando dos enzimas de corte: tripsina y proteinasa K.

<b>Corte con Tripsina</b>			
<b>Peso molecular:</b> 14379			
<b>Composicion de aminoacidos:</b> A15 C6 D8 E13 F2 G13 H3 I4 K8 L7 N7 P5 Q3 R10 S12 T2 V3 W5 Y4			
ADEKCKGWIR	DNPSGRCYGF	ILPQEAHWAG	RKACVASRGA
RCTHLPEALS	WDEEGLHNQR	LGVIDGSKKA	DFDELPGKNE
RNADSKYSAR	EEIGKYQARY	CASLESWGST	ASWEDNASGE
GCSERNAPVN			
<b>Corte con Tripsina y Proteinasa K</b>			
<b>Peso molecular:</b> 14379			
<b>Composicion de aminoacidos:</b> A15 C6 D8 E13 F2 G13 H3 I4 K8 L7 N7 P5 Q3 R10 S12 T2 V3 W5 Y4			
ADEKCKGWIR	DNPSGRCYGF	ILPQEAHWAG	RKACVASRGA
RCTHLPEALS	WDEEGLHNQR	LGVIDGSKKA	DFDELPGKNE
RNADSKYSAR	EEIGKYQARY	CASLESWGST	ASWEDNASGE
GCSERNAPVN			

### 6.1.3. Aislamiento y purificación de la DCA-1 y -2

Las proteínas DCA-1 y -2 fueron separadas siguiendo el método utilizado con las proteínas anteriores. Cabe mencionar que, debido a que el peso molecular de las dos proteínas es muy cercano (16.370 y 16.645 kDa respectivamente (Mann & Siedler, 2006)) para la purificación, se utilizó cromatografía de fase reversa en vez de cromatografía por exclusión molecular, con la finalidad de separar las moléculas en función de su hidrofobicidad. En el cromatograma del extracto de huevo de emú (Figura 17a) se observaron dos picos juntos, los cuales fueron colectados por separado. Posteriormente se hizo el gel SDS-PAGE de las tres fracciones recolectadas (Figura 17b), en el carril 1 se encuentra a la DCA-2, en el carril 2 una mezcla de ambas proteínas y en el carril 3 la DCA-1. Las proteínas se obtuvieron con un nivel de pureza aceptable ( $\approx 85\%$ ), aunque la DCA-2 se obtuvo en menor proporción.

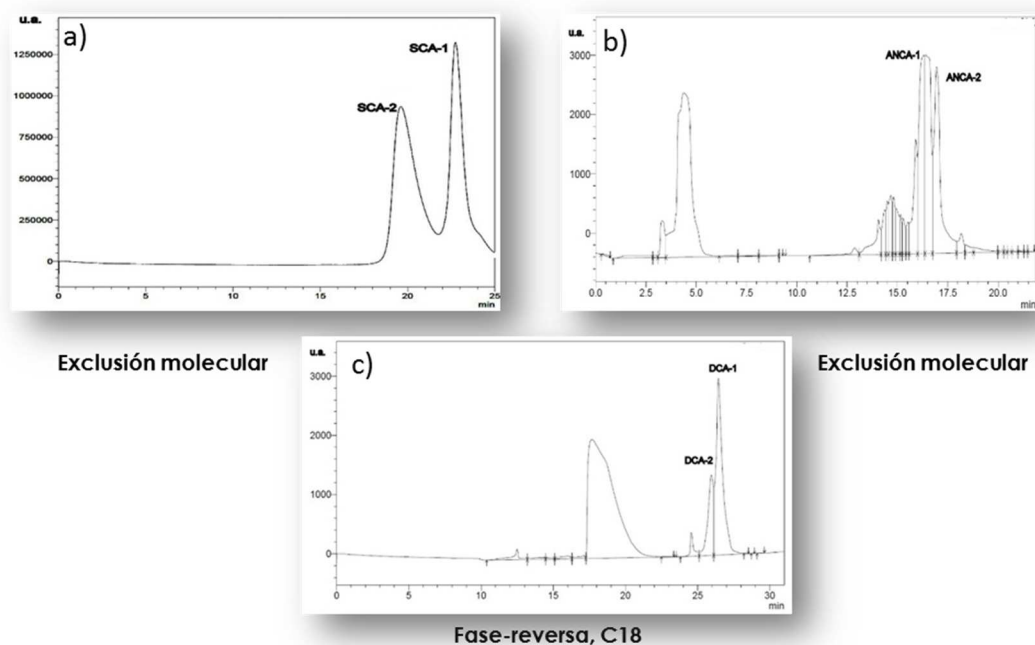


**Figura 17.** a) Cromatograma de la purificación de la DCA-1 y DCA-2 por fase reversa, b) Gel de SDS-PAGE de las dos fracciones colectadas.

### 6.1.3. Purificación de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2

Una vez que se purificaron las proteínas a partir de su fuente natural, se decidió probar si era posible su sobreexpresión, comenzando con las proteínas SCA-1 y 2 (ver anexo 9.1). Tras estos ensayos se determinó que hacer la extracción y purificación de las proteínas de

su fuente natural era el método con mayor rendimiento y que daba como resultado proteínas con mayor estabilidad, por esta razón, una vez optimizado el método de purificación para cada de las proteínas se procesaron 100 g de cada uno de los huevos (avestruz, ganso y emú), los cromatogramas de cada una de las purificaciones se muestran en la Figura 18.



**Figura 18.** Cromatogramas de la purificación de: a) SCA-1 y -2 b) ANCA-1 y 2- c) DCA-1 y -2.

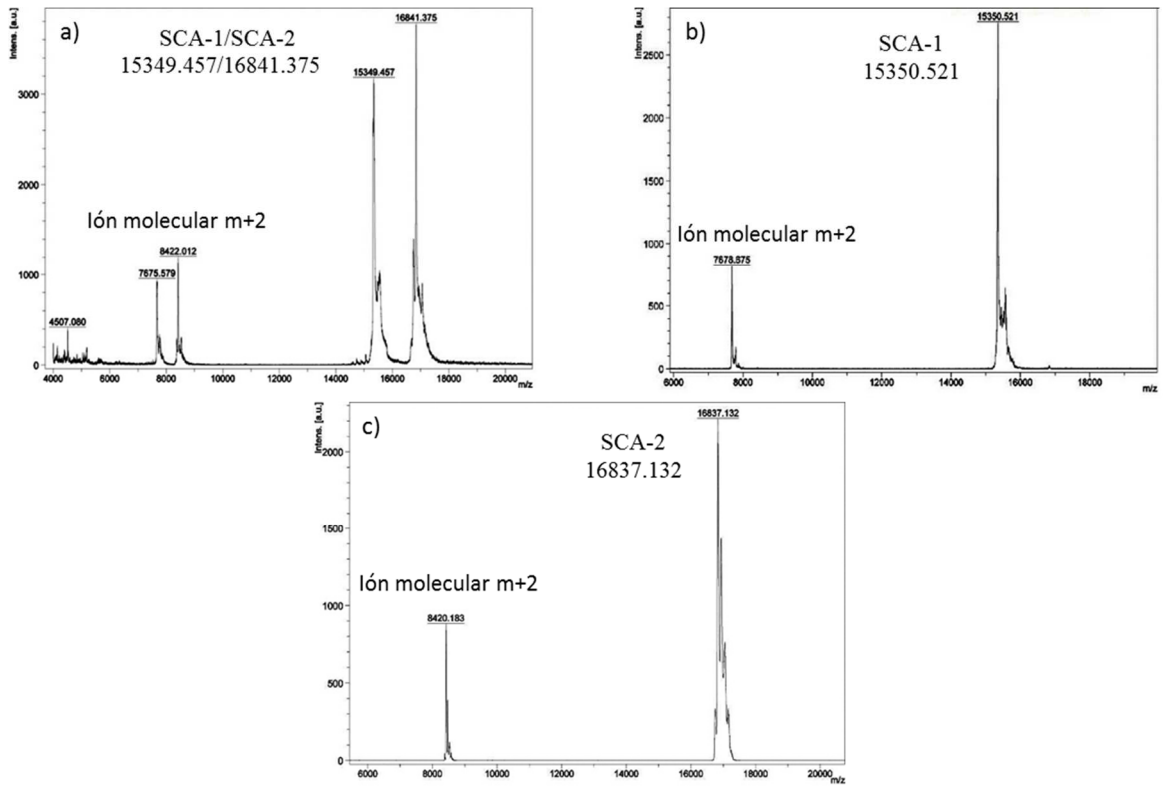
Para corroborar que todas las proteínas fueron separadas se utilizó espectrometría de masas, (Creel, 1993), como se puede observar en las Figuras 19, 20 y 21 en todos los casos se analizó el extracto y las fracciones de cada proteína.

En el extracto se observaron dos picos (Figura 19a) que corresponden a las proteínas SCA-1 y SCA-2, en cambio, se observa que las proteínas se encuentran puras en las fracciones correspondientes (Figura 19b y c) el peso molecular de cada una (15350 y

16837 Da, respectivamente) se aproximan al peso molecular teórico (15300 y 16601 Da) reportado por Mann & Siedler (2004).

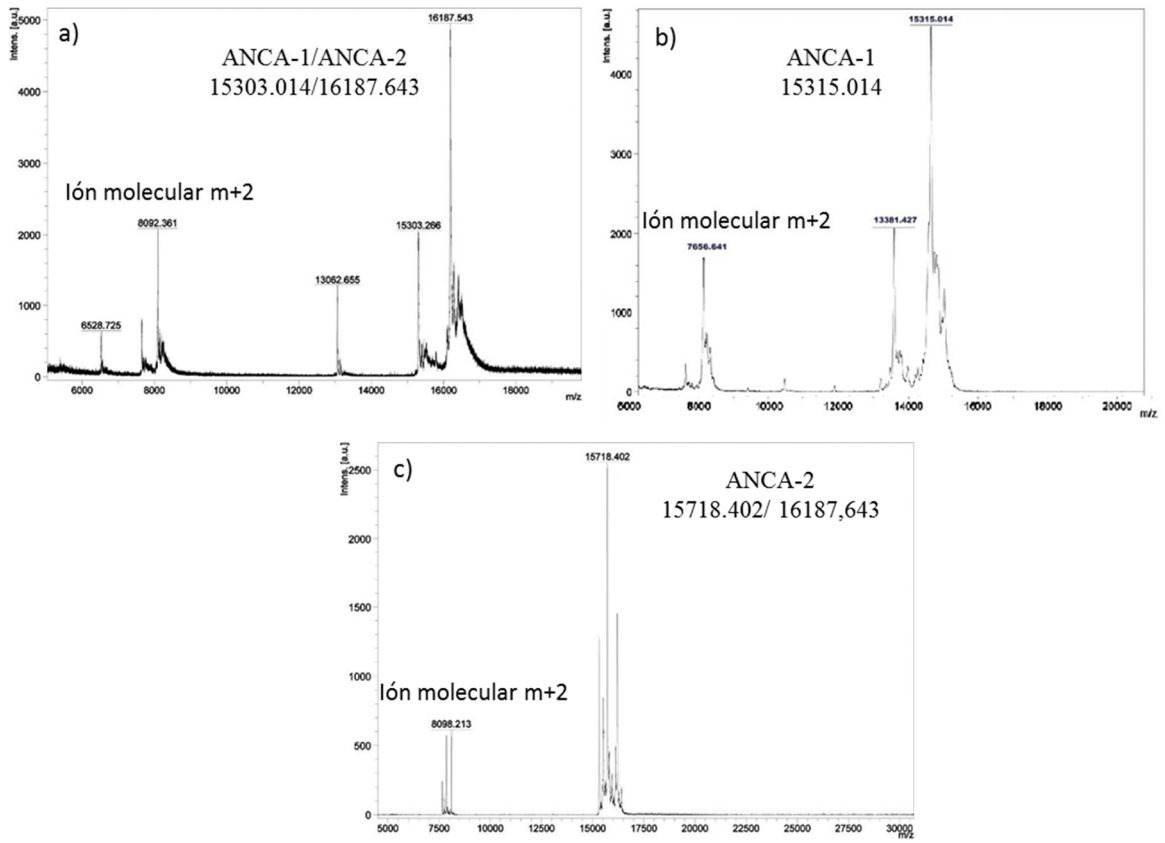
En la Figura 20a se muestra el espectro de masas del extracto de huevo de ganso, el cual sugiere que existen más de dos proteínas en la muestra. En el espectro de masas correspondiente a ANCA-1, (Figura 20b) se observa una banda alrededor de 15315 Da que corresponde a dicha proteína pero, además, una banda que se encuentra a 13381 Da por su tamaño esta puede ser una proteína desconocida o el ion molecular M+2 de una proteína más grande. Debido a lo anterior, se considera que la proteína ANCA-1 tiene una pureza de un 85%. Asimismo, en el espectro de masas de ANCA-2, se observa la banda correspondiente de 15718 Da, aunque también se observan bandas con pesos moleculares similares, sugiriendo que ANCA-2 aún no se encuentra pura al 100%. Las pequeñas diferencias en peso molecular de estas proteínas puede deberse a modificaciones postraduccionales o incluso a isoformas de las mismas.

Finalmente, en los espectros de las proteínas DCA-1 y -2, se observan dos picos cercanos con diferente intensidad, los cuales señalan un peso molecular de 16370 y 16611 Da, respectivamente, (Figura 21b y c). Como se señaló anteriormente, estas proteínas tienen pesos moleculares muy similares, no obstante, según los espectros de masas la separación fue exitosa, en la Figura 21b se aprecia un pico de 16379 Da mientras que en la Figura 21c, uno de 16836 Da. Al comparar los resultados se puede inferir que las proteínas se lograron separar adecuadamente con un porcentaje de pureza mayor al 90%.

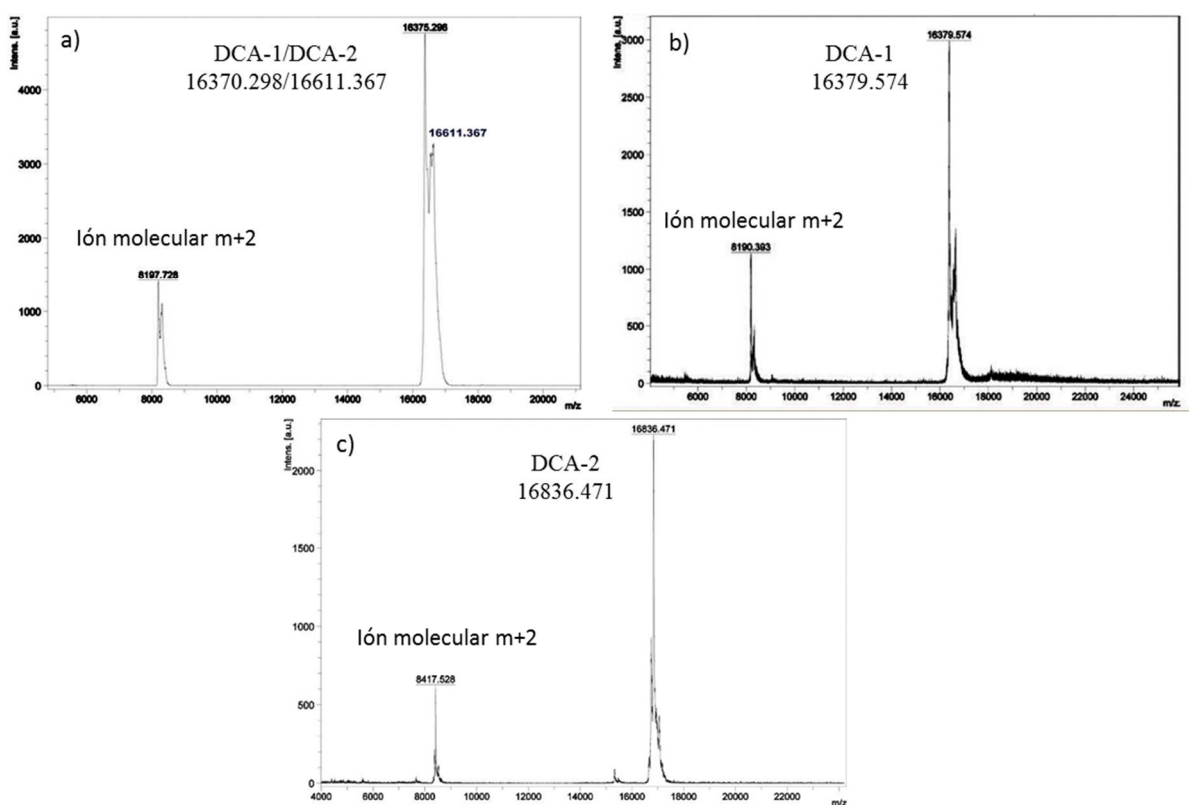


**Figura 19.** Espectros de masas de SCA-1 y SCA-2 a) Extracto antes de purificar, b) SCA-1 después de su purificación, c) SCA-2 después de su purificación.





**Figura 20.** Espectros de masas de ANCA-1 y ANCA-2 a) Extracto antes de purificar, b) ANCA-1 después de su purificación, c) ANCA-2 después de su purificación.



**Figura 21.** Espectros de masas de DCA-1 y DCA-2 a) Extracto antes de purificar, b) SCA-1 después de su purificación, c) SCA-2 después de su purificación.

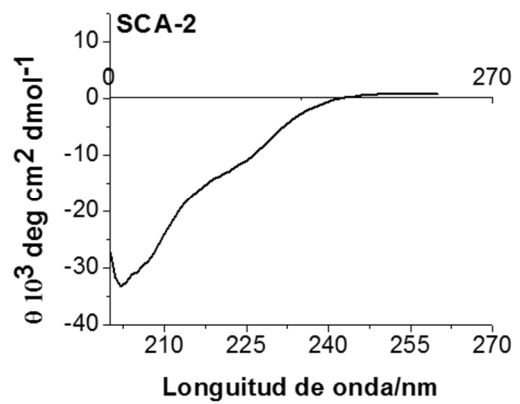
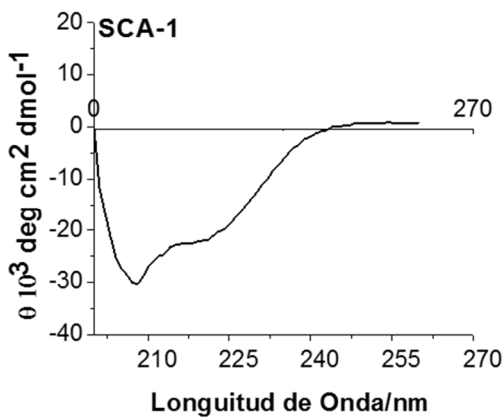
## 6.2. Caracterización de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2

### 6.2.1. Dicroísmo Circular

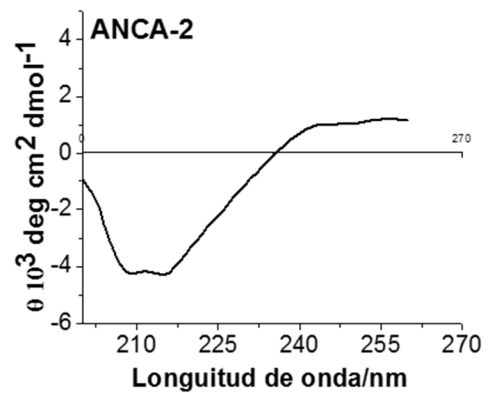
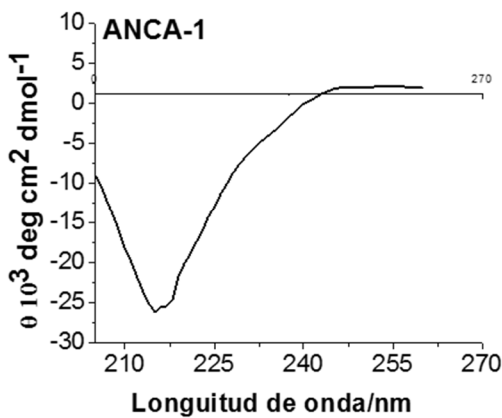
Una vez que las proteínas se obtuvieron separadas y puras, se utilizó la técnica de dicroísmo circular, para comprobar el correcto plegamiento de las proteínas tras sufrir todos los pasos de purificación. Según los resultados obtenidos (Figuras 22 a, b, y c), las proteínas cuentan con una estructura correcta con una señal correspondiente a láminas- $\beta$ . Los resultados se encuentran reflejados en las Figuras 22 a, b, y c, con estos resultados se permitió tener una medida empírica de la estructura correcta y la señal para cada una de las proteínas, la cual fue correspondiente a láminas- $\beta$ . Los espectros muestran una banda negativa intensa sobre los 216 nm, y una banda positiva entre los 195 y 200 nm, de la misma manera en los espectros se observa una tendencia de estructura secundaria de hélices  $\alpha$  (banda negativa a 220nm, banda negativa 209 y banda positiva a 190 nm),

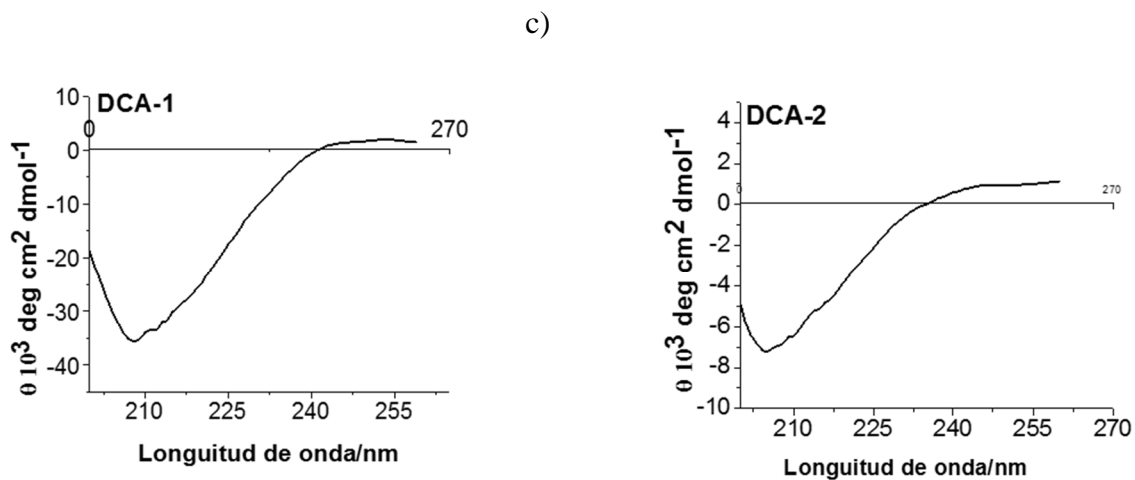
este hecho sugiere una mezcla de conformaciones. Para analizar el porcentaje de hélice  $\alpha$  y lamina  $\beta$ , se realizó la deconvolución de los datos usando el programa K2D (tabla 4). De acuerdo a los resultados, las seis proteínas presentan una mezcla de conformaciones del tipo lamina  $\beta$  y hélice  $\alpha$ , el cual es el plegamiento esperado para estas proteínas según su homología con la OC-17 (Reyes-Grajeda et al., 2007), de igual forma estos resultados muestran que las proteínas están plegadas en solución después de su purificación.

a)



b)





**Figura 22.** Espectros de dicroísmo circular para: a) las proteínas SCA-1 y SCA-2, b) las proteínas ANCA-1 y ANCA-2, c) las proteínas DCA-1 y DCA-2.

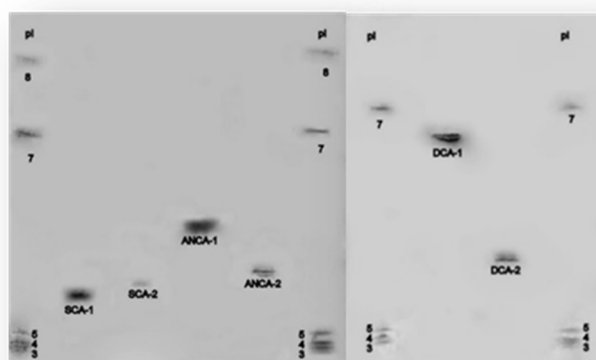
**Tabla 4.** Estimación de los Porcentajes de estructura secundaria calculados para cada una de las proteínas según los espectros de dicroísmo circular obtenidos con el programa K2D.

Proteína	Porcentaje de estructura secundaria %
SCA-1	% $\alpha$ hélice 45.01
	% $\beta$ lamina 20.97
SCA-2	% $\alpha$ hélice 47.13
	% $\beta$ lamina 18.26
ANCA-1	% $\alpha$ hélice 32.65
	% $\beta$ lamina 27.35
ANCA-2	% $\alpha$ hélice 52.63
	% $\beta$ lamina 17.47
DCA-1	% $\alpha$ hélice 57.13
	% $\beta$ lamina 25.38
DCA-2	% $\alpha$ hélice 40.47
	% $\beta$ lamina 26.68

### 6.2.2. Punto Isoeléctrico

El punto isoeléctrico (pI) de la SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2 se determinó por medio de geles de isoelectroenfoque (ver Figura 23). En la Tabla 5 se muestran los datos obtenidos experimentalmente en comparación con los que se calcularon teóricamente por medio del servidor EXPASY (Expert Protein Analysis System). Se observa que no existe una gran diferencia entre el pI teórico y el experimental.

El pI está definido como el pH en el cual las cargas positivas igualan a las cargas negativas y no existe movimiento en un campo eléctrico. Las proteínas, exhiben una conducta anfotérica debido a la presencia de grupos funcionales de aminoácidos y grupos amino y carboxil terminales. En medios ácidos, es decir con altas concentraciones de iones  $H^+$ , tienen carga positiva Mientras que en medios alcalinos, es decir en presencia de iones  $OH^-$ , tienen carga negativa. En el pI, las cargas positivas de los radicales  $NH_3^+$  igualan a las cargas negativas de los radicales  $COO^-$ . A este valor de pH la solubilidad es casi nula. Este tipo de información es básico para establecer las condiciones óptimas para cristalización de proteínas, particularmente el intervalo de pH que puede ser utilizado que generalmente se establece en una unidad de pH por abajo y una por arriba del pI (Kantardjieff & Rupp, 2004).



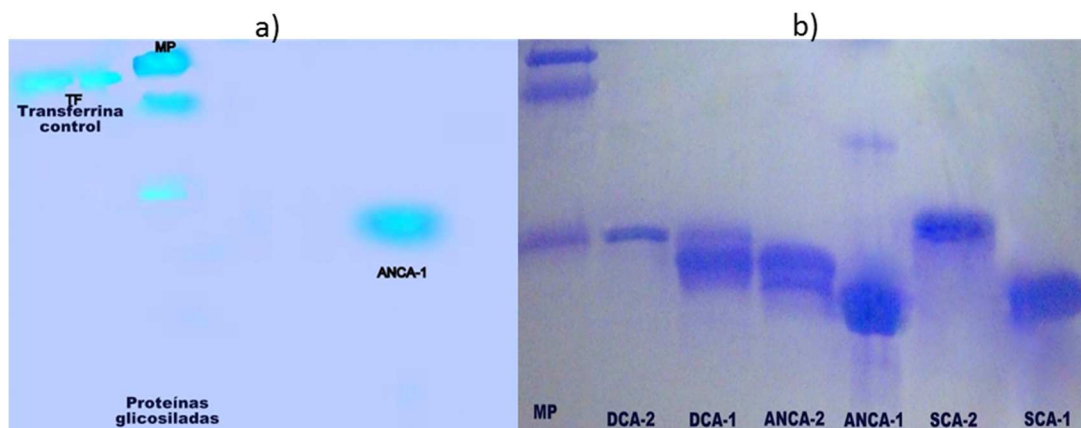
**Figura 23.** Geles de isoelectroenfoque usados para determinar el pI de las proteínas.

**Tabla 5.** Comparación de los pI teóricos y experimentales.

	<b>Punto Isoelectrico exp.</b>	<b>Punto isoelectrico teórico</b>
<b>SCA-1</b>	5.8	5.96
<b>SCA-2</b>	5.9	5.41
<b>ANCA-1</b>	6.5	7.14
<b>ANCA-2</b>	6.0	5.7
<b>DCA-1</b>	6.8	6.4
<b>DCA-2</b>	5.5	4.48

### **6.2.3. Detección de glicosilaciones**

Se ha determinado que algunas de las proteínas estudiadas presentan fosforilaciones (Anexo 9.3, Mann & Siedler, 2004; Mann & Siedler, 2006). Para determinar la existencia de otro tipo de modificaciones postraduccionales tales como glicosilaciones, se utilizó el kit fluorescente de detección de glicoproteínas de sigma GlycoProfile III, usando un gel de electroforesis SDS-PAGE. La proteína es fijada en el gel con ácido acético y metanol los carbohidratos en las proteínas son oxidados a aldehídos con ácido peryódico y un tinte de hidracida que reacciona con los aldehídos para formar un conjugado fluorescente estable. En la Figura 24a se observa como utilizando luz UV sólo se pueden ver las proteínas que se encuentran glicosiladas, por ende sólo se observan las proteínas glicosiladas del marcador usado, la apotransferrina (usada como control) y la ANCA-1, por lo tanto se infiere que la ANCA-1 presenta glicosilaciones como una modificación postraducional. En la Figura 24b el gel fue teñido con azul de Coomassie para comprobar que cada una de las proteínas estaba presente en el mismo y se divisan todas las macromoléculas fijadas perfectamente.



**Figura 24.** Geles SDS-PAGE usando el kit de detección de glicoproteínas. a) Gel sin tñir iluminado con luz UV, b) Gel tñido con azul de Coomassie.

#### 6.2.4. Pruebas de cristalización

Basándose en estudios previos realizados por Reyes-Grajeda et al. (2008) en los cuales se reportó la estructura preliminar de la SCA-1, se cristalizó a la proteína SCA-1 empleando como agente precipitante el compuesto #26 de Crystal Screen I de Hampton Research, constituido por 0.2 M de acetato de amonio, 0.1 M de citrato de sodio pH 5.6 y 30% de 2- Metil-2,4-pentenediol (MPD) [26HS1]. La concentración de proteína que se utilizó fue de 4mg/mL, y se obtuvieron cristales pequeños (Figura 25).



**Figura 25.** Cristales de SCA-1 obtenidos por el método de gota sedente a 12°C en una semana.

Se hicieron nuevas pruebas de cristalización, para tratar de obtener más cristales en otras condiciones. Consecutivamente estas pruebas para la determinación de condiciones de cristalización, permitieron realizar un rastreo de condiciones mediante la combinación de aditivos (sales) y precipitantes (polímeros y disolventes orgánicos) en un amplio rango de pH.

Las gotas fueron de 1 $\mu$ L hechas en proporción 1:1 agente precipitante: proteína y las concentraciones de proteína usadas fueron: 4 mg/mL de SCA-1, 3mg/mL de SCA-2, 9 mg/mL de ANCA-1, 4mg/mL de ANCA-2, 5mg/mL de DCA-1 y 3 mg/mL de DCA-2. Después de transcurrida una semana se observaron cristales de SCA-1 (ver Figura 26) en las siguientes condiciones de cristalización:

- **Jena Bioscience-7**

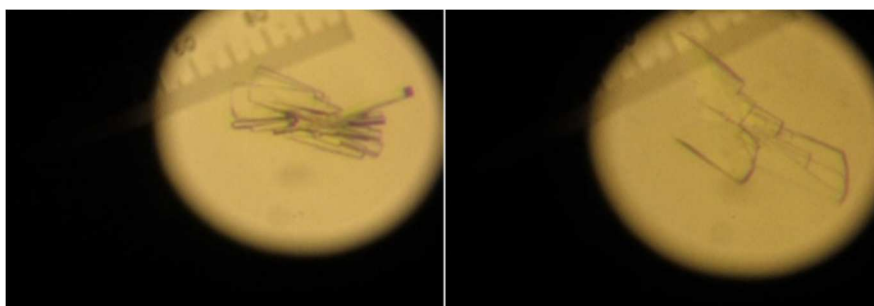
A2- 0.1 M Tris pH 8.5 / 12 % MPD / 50 mM Cloruro de magnesio. (A2JB7)

A4 -15 % w/v MPD 5 % w/v PEG 4000 100 mM Imidazol-HCl pH 8.0. (A4JB7)

F4 -20 % MPD / 4 % Glicerol / 0.2 M Cloruro de sodio. (F4JB7)

- **Jena Bioscience-9**

A10- 0.1M Tris pH 8.5 / 25 % ter-Butanol / 0.1 M Cloruro de calcio. (A10JB9)



**Figura 26.** Cristales de SCA-1 a una concentración de 4 mg/mL con la condición A4 - 15 % w/v MPD 5 % w/v PEG 4000 100 mM Imidazol-HCl pH 8.0.

Hasta ahora sólo se ha visualizado en las placas de las pruebas de cristalización, la formación de precipitados cristalinos en la mayoría de los pozos. Debido a lo anterior se decidió hacer pruebas con diferentes concentraciones de proteína, sin embargo, no se han obtenido cristales de las demás proteínas estudiadas. Para tener una idea de la dificultad de la cristalización de estas proteínas, se emplearon programas de predicción de probabilidad de cristalización [(Sánchez-Puig et al., 2012), los resultados se muestran en



los anexos 9.2], y se determinó que estas proteínas son difíciles de cristalizar. Los algoritmos utilizados para estas predicciones toman en cuenta las características de las proteínas, tales como la secuencia de aminoácidos de las proteínas, el punto isoeléctrico, promedio de hidrofobicidad (Kyte & Doolittle, 1982), entre otros. Debido a la dificultad que representa cristalizar este tipo de proteínas, se recomienda en un futuro utilizar matrices de diferentes compuestos y una vez que se tenga un agente precipitante adecuado tratar de cristalizar por métodos no convencionales de crecimiento de cristales, a concentraciones altas de proteínas, puesto que la nucleación comienza con la formación de un pequeño agregado de iones y/o moléculas en la disolución que crece hasta que se forma el núcleo cristalino como una fase sólida diferenciada. La formación de estos núcleos depende en gran medida de factores intrínsecos relativos a la propiedad del sólido en formación, pero en líneas generales a mayor concentración más favorable será la formación de núcleos.

Por otra parte a algunos cristales de SCA-1 se les hizo “remojado” (Peter et al., 2002) con metales pesados (átomos con elevados números atómicos) como son Hg y Pt para tener la posibilidad de difractar y resolver la estructura por medio de dispersión anómala (Taylor, 2010), los cristales bañados no sufrieron daños y todos pudieron ser difractados.

### **6.3. Caracterización estructural**

#### **6.3.1. Recolección de datos**

Cada uno de los cristales obtenidos fueron sumergidos en una solución crioprotectora (ver materiales y métodos) durante 10 segundos. En cada caso los monocristales difractaron a un intervalo de resolución máxima de 1.4 a 2.5Å. Los cristales derivados de átomos pesados que permitieron la mejor calidad en la recolección fueron aquellos que habían sido sumergidos en  $\rho$ -Cloromercuribenzoato y los del cristal nativo crecido en la condición A10- 0.1M Tris pH 8.5 / 25 % ter-Butanol / 0.1 M Cloruro de calcio (Jena Bioscience). Los datos de difracción se procesaron utilizando XDS (Kabsch, 2010) exceptuando la serie de datos obtenida para los cristales de SCA-1 crecidos en A10-JB9 (SCA-1 nativa) y A4-JB7 (SCA-1 derivado de Hg), que fueron integrados utilizando el programa MOSFLM (Battye et al., 2011), y se escalaron mediante SCALA (Evans, 2006)

y en el caso específico del cristal derivado de Hg, los datos se procesaron con Aimless (Evans, 2011) generando el Patterson anómalo, los tres últimos dentro de la suite de programas CCP4 (Winn et al., 2011). Un resumen de las estadísticas de recopilación y procesamiento de datos se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Estadística de la colecta de datos de difracción de rayos-X.

	Condición en la que se obtuvo el cristal			
	26HR1 <sup>a</sup>	A2-JB7 <sup>b</sup>	A4-JB7 <sup>c</sup>	A10-JB9 <sup>d</sup>
<b>Resolución máxima de difracción</b>	2.3	1.9-2.2	1.5-2.0	1.4
<b>Fuente de rayos-X</b>	Rigaku, MicroMax-007 HF, Ánodo rotatorio <sup>e</sup>	Línea de Sincrotrón Soliel <sup>f</sup>	Línea de Sincrotrón <sup>f</sup>	Línea de Sincrotrón <sup>f</sup>
<b>Longitud de onda (Å)</b>	1.5418	1.0056	1.0715	1.0056
<b>Numero de Reflexiones</b>	21060	8912	21799	28317
<b>Grupo espacial</b>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 (Nº 18)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (Nº 19)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> (Nº 19)	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 (Nº 18)
<b>Sistema cristalino</b>	Ortorrómbico	Ortorrómbico	Ortorrómbico	Ortorrómbico
<b>Parámetros de celda (Å)</b>	a = 55.53 b = 68.60 c = 97.55	a=32.79 b=52.22 c=69.98	a = 32.67 b = 55.91 c = 72.06	a= 55.44 b = 72.60 c = 37.10
<b>Límite de Resolución (Å)</b>	40.21-2.3	43.72-1.9	44.17-1.5	44-31-1.44
<b>Volumen de la celda unitaria (cm<sup>3</sup>)</b>	371742.139	104850.421	131623.328	149684.547
<b>Completeness</b>	96.3	98.9	99.8	99.9
<b>Multiplicidad</b>	2.9	5.8	15.3	5.5
<b>R merge (%)</b>	5.8	2.5	0.17	0.09
<b>Número de moléculas en ASU</b>	3	1	1	1
<b>Mosaicity:</b>	1.01	0.71	0.70	0.46
<b>I/sigma</b>			1.60	3.90
<b>B factor (Å)</b>			18.0	29.0

<sup>a</sup>26HR1: 0.2 M acetato de amonio, 0.1 M citrato de sodio pH 5.6 y 30% de 2- Metil-2,4-pentanediol (MPD)

<sup>b</sup>A2-JB7: 0.1 M Tris pH 8.5 / 12 % MPD / 50 mM cloruro de magnesio

<sup>c</sup>A4-JB7: 15 % w/v MPD 5 % w/v PEG 4000 100 mM Imidazol-HCl pH 8, (bañados con metales pasados)

<sup>d</sup>A10-JB9: 0.1M Tris pH 8.5 / 25 % *ter*-Butanol / 0.1 M cloruro de calcio

<sup>e</sup>Instituto de Química UNAM

<sup>f</sup>ALBA

### 6.3.2. Resolución Estructural

Como se mencionó en la sección anterior, se obtuvieron conjuntos de datos de los diferentes cristales, para determinar su estructura correspondiente. Para la proteína SCA-1, se utilizaron los datos de los cristales de las condiciones 26HR1 y A2-JB7. La estructura se determinó mediante reemplazo molecular, usando como molécula modelo a la proteína OC-17 del cascarón de huevo de gallina y el programa PHASER (McCoy et al., 2007). El proceso de afinamiento se inició con una resolución de 2.5 Å, usando el programa REFMAC (Murshudov et al., 2011). El mapa de densidad electrónica obtenido fue de baja calidad y los valores de la estadística no mejoraron ( $\approx 0.46$ ), pese a que la homología con la molécula modelo fue bastante buena, probablemente debido a que los cristales presentaron un porcentaje de *twinning* (macla) y simetría pseudo-traslacional de aproximadamente  $\frac{1}{2}$  a lo largo del eje c: Es por esta razón, que los intentos de determinar la estructura de la proteína mediante reemplazo molecular utilizando estos cristales fueron infructuosos, esta pseudo-simetría trasnacional ha obstaculizado la solución de la estructura completa y en particular el proceso de refinamiento con factores R inadecuadamente altos ( $R_{\text{factor}} = 34\%$ ;  $R_{\text{free}} = 46\%$ ).

Posteriormente la determinación de la estructura de la SCA-1, se hizo por medio de dispersión anómala simple (SAD), usando los datos de un cristal derivado de Hg, para evitar el sesgo del modelo. La posición de un solo sitio de Hg se determinó con el programa SHELXD (Sheldrick, 2010). El afinamiento de este sitio se realizó con SHARP (Bricogne et al., 2003) a un límite de resolución de 1.5 Å. Se obtuvo un mapa de densidad electrónica de calidad excelente, exhibiendo límites claros adecuados para la construcción de un modelo, con el programa ARP/Warp (Langer et al., 2008) se obtuvo un modelo casi completo, de 120 aminoácidos. Este modelo inicial fue mejorado con ciclos sucesivos de afinamiento, los cuales fueron realizados con REFMAC (Murshudov et al., 2011), y rondas alternas de construcción con COOT y PHENIX (Emsley et al., 2010; Adams,

2010). Las moléculas de disolvente fueron incluidas durante las etapas finales del afinamiento. Los  $R_{\text{factor}}$  y  $R_{\text{free}}$  finales fueron de 0.188 y 0.213 respectivamente (tabla 7).

Asimismo la estructura del cristal de SCA-1 nativa se determinó por reemplazo molecular, usando el programa MOLREP (Vagin & Teplyakov, 2010) y las fases iniciales se determinaron usando como modelo la proteína SCA-1 en su primera forma cristalina derivada de Hg. El proceso de afinamiento se realizó de la misma manera descrita anteriormente, los  $R_{\text{factor}}$  y  $R_{\text{free}}$  sugieren que la estrategia de afinamiento utilizada fue la correcta con valores finales de 0.213 y 0.232 respectivamente. El modelo final de la SCA-1 incluye residuos Asp1-Asp93 y Lys96-Ala132. La calidad estereoquímica del modelo de SCA-1 fue muy buena. Los residuos Asp94 - Pro95, que corresponden a una ruta ácida de la molécula en una región de bucle flexible, no se construyeron debido a la falta de densidad de electrones.

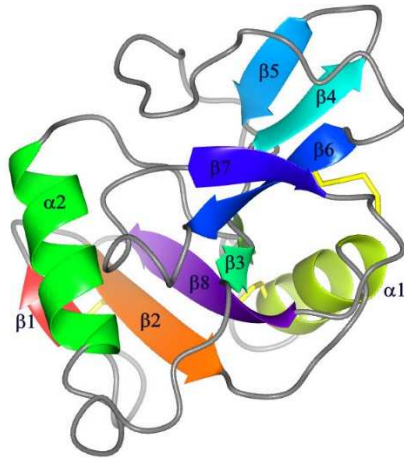
Detalles del modelo de afinamiento se dan en la Tabla 6. La validación estereoquímica del modelo final se realizó con MOLPROBITY (Chen et al., 2010).

**Tabla 7.** Parámetros de recolección de datos y estadísticas.

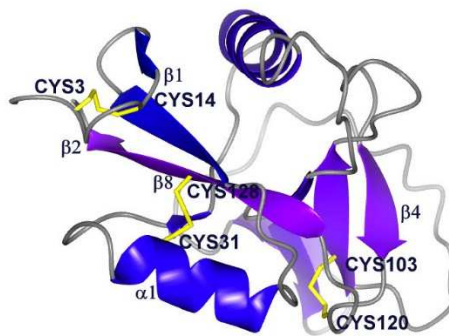
<b>Parámetros</b>	<b>SCA-1/Hg</b>	<b>SCA-1/nativa</b>
<b>R.m.s.</b>		
<b>Longitud de enlace (Å)</b>	0.009	0.022
<b>Ángulo de enlace (°)</b>	1.152	1.764
<b>%solvente</b>	43.97	46.01
<b>Número de átomos</b>	1225	1169
<b>R factor (%)</b>	0.188	0.213
<b>Rfree (%)</b>	0.213	0.232
<b>Gráfico de Ramahandran</b>		
<b>Favorable (%)</b>	94.57	91.47
<b>Permitidos (%)</b>	4.65	6.20
<b>No. De valores anómalos</b>	0.78	2.33
<b>Determinación de fases</b>		
<b>Átomos de Hg</b>	1	-
<b>Correlación anómala</b>	2.45	-
<b>Valor global de la figura de merito</b>	0.478	-
<b>Multiplicidad anómala</b>	8.7 (6.4)	-

### 6.3.3. Descripción del plegamiento de la proteína

Las dimensiones aproximadas de la SCA-1 son 35 x 36 x 40 Å y estructuralmente es correspondiente a un dominio compacto de 132 residuos, la topología general de la proteína SCA-1 está comprendida por dos  $\alpha$  hélices y 8 hojas  $\beta$  con orientación antiparalela, que implica una combinación de plegamiento  $\alpha/\beta$  (Figura 27) este plegamiento se sugiere también en los ensayos de dicroísmo circular y es plegamiento característico del tipo lectina tipo C (Cummings & McEver, 2009; Gabius et al., 2011). La molécula puede ser dividida en dos regiones separadas, una  $\beta$  y una mezcla  $\alpha/\beta$  que contiene los residuos de amino- y carboxi-terminales. Como se muestra en la Figura 27, la mitad inferior de la estructura contiene dos  $\alpha$ -hélice  $\alpha_1$  (Trp24 - Ile34) y  $\alpha_2$  (Ser46 - Tyr59), que están orientadas casi perpendicularmente entre sí, y que rodea a una conformación de hojas  $\beta$  central, compuesta por cuatro laminas- $\beta$  antiparalelas:  $\beta_1$  (Trp7 - Phe10),  $\beta_2$  (Asn13 - Phe18),  $\beta_8$  (Phe126 - Thr131) y  $\beta_3$  (Ala38 - Leu40). La parte superior de la molécula está compuesta por la segunda mitad de cuatro laminas- $\beta$  antiparalelas:  $\beta_7$  (Trp115-Asp118),  $\beta_6$  (His102 - Leu106),  $\beta_4$  (Leu72 - Trp75) y  $\beta_5$  (Val78 - Trp81), que cubre el  $\alpha/\beta$  subdominio. La estructura está estabilizada por 3 puentes disulfuro conservados: Cys3-Cys14, Cys31-Cys128, Cys103-Cys120 (Figura 28), estos se conservan en la forma larga de la familia de lectina tipo-C (Cummings & McEver, 2009). Debido a los puentes disulfuro, las láminas  $\beta_1$  y  $\beta_2$  están conectados a través de la Cys3-Cys14 enlace disulfuro mientras que Cys31 - Cys128 se une hélice  $\alpha_1$  y el lamina  $\beta_8$  ambos ubicados en el lóbulo inferior de la molécula. En la mitad superior de la estructura, Cys103 - Cys120 conecta la lámina  $\beta_4$  al bucle anterior a  $\beta_8$ .



**Figura 27.** Estructura tridimensional de la SCA-1.

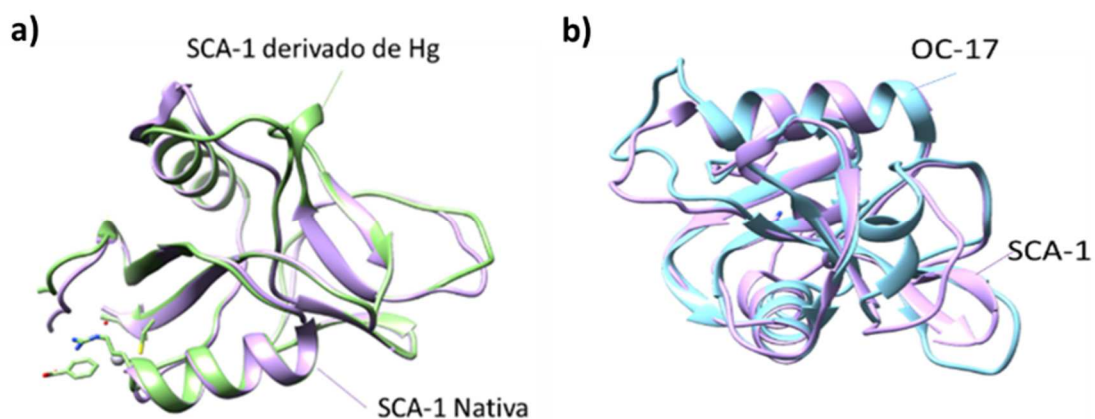


**Figura 28.** Estructura de la SCA-1, está estabilizada por 3 puentes disulfuro.

En la Figura 29a se hace una superposición de la proteína SCA-1 nativa y derivada de Hg, se puede observar que no hay diferencias en el plegamiento. Las únicas diferencias radican en un pequeño desplazamiento de los bucles, no obstante este hecho es normal ya que los bucles están en constante movimiento. De igual manera, se observa el  $\rho$ -Cloromercuribenzoato que se encuentra interaccionando con la Cys-130, esta cisteína libre puede ser importante para el cumplimiento de la función de la proteína. En la Figura 29b se muestra la superposición de la estructura de la SCA-1 sobre la OC-17, se comprueba que el plegamiento, de estas dos proteínas homologas, es muy similar,

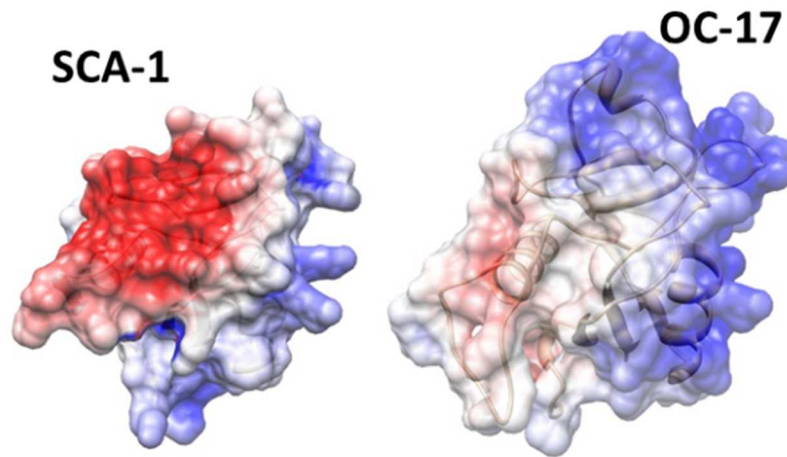
exceptuando por los bucles o asas, el asa que está conectando a los dos subdominios en la OC-17 es más larga que en la SCA-1, esta última tiene un asa con cinco aminoácidos menos, y que puede tener una función característica importante ya que lo componen residuos de glutamato (Glu63-Glu64-Glu65-Asp67), lo que lo hace de carácter ácido.

Otra diferencia notable es la segunda asa, que se posa sobre la parte superior de la región de hojas  $\beta$  de los residuos Asp94-Pro 98, en SCA-1 está más desordenado, esta asa está en constante movimiento y puede adoptar varias conformaciones.



**Figura 29.** Superposición de dos estructuras: a) SCA-1nat (morado) y SCA-1Hg (verde), b) SCA-1 (magenta) y la OC-17 (azul).

En última instancia en la figura 30 se observa la superficie de carga de las dos proteínas de cascarón de huevo de aves que han sido resueltas SCA-1 y OC-17 (Figura 29b). La estructura ácida de la SCA-1 revela la distribución de zonas con residuos cargados negativamente en la superficie, mientras que la OC-17 tiene una superficie con la mayoría de las zonas cargadas positivamente, por ello las superficies de las dos estructuras señalan una polaridad contrastante.



**Figura 30.** Superficie de carga de SCA-1 y OC-17.

Al comparar las superficies de las proteínas SCA-1 y OC-17, se observan algunas diferencias significativas en la carga, puesto que el potencial electrostático en la superficie molecular de SCA-1, revela una región ácida en la parte superior de la molécula, además de una interface extendida entre los dos lóbulos. Residuos cargados negativamente (Glu63, Glu64, Glu65, Glu66 y Asp67), situados en interface, junto con Asp93, Asp94, Asp95 y Asp96, en el lado superior de la molécula, conforman un grupo de residuos ácidos expuestos en la superficie de SCA-1. Contrariamente a la SCA-1, la OC-17, muestra una distribución regular de residuos cargados positivamente en la región lateral superior que incluye residuos Arg103, Lys106, Arg108, Arg109 y Arg117. Curiosamente, los cascarones de huevo de avestruz y emú poseen dos proteínas intraminerales tipo lectina de tipo C, y aunque hasta ahora se pensaba que en el huevo de ganso había una sola proteína intramineral (Lakshminarayanan, 2005), no obstante en este trabajo se ha encontrado la existencia de más de una proteína, en contraste con el cascarón de huevo de gallina. Se ha sugerido que SCA-1, ANCA-1 y DCA-1 son homologas, compartiendo aproximadamente el  $\approx 65\%$  de identidad de secuencia (Mann & Siedler, 2006), y la presencia de una cisteína no apareada o libre. Por otra parte, la presencia de dos grupos de aminoácidos ácidos conservados en SCA-1 (Glu63-Glu64-Glu65-Glu66-Asp67 y Asp93-Asp94-Asp95-Asp96) y en ANCA-1 y DCA-1 (Glu63-Glu64-Glu65-Asp66-Asn67 y Asp93 -Asp94-Asp95-Glu96) refuerza la idea de que estas tres proteínas son altamente homólogas. Mientras, SCA-2 y DCA-2 están estrechamente relacionadas con la OC-17. Dos de las serinas fosforiladas de SCA-2 y DCA-2 se localizaron en las mismas

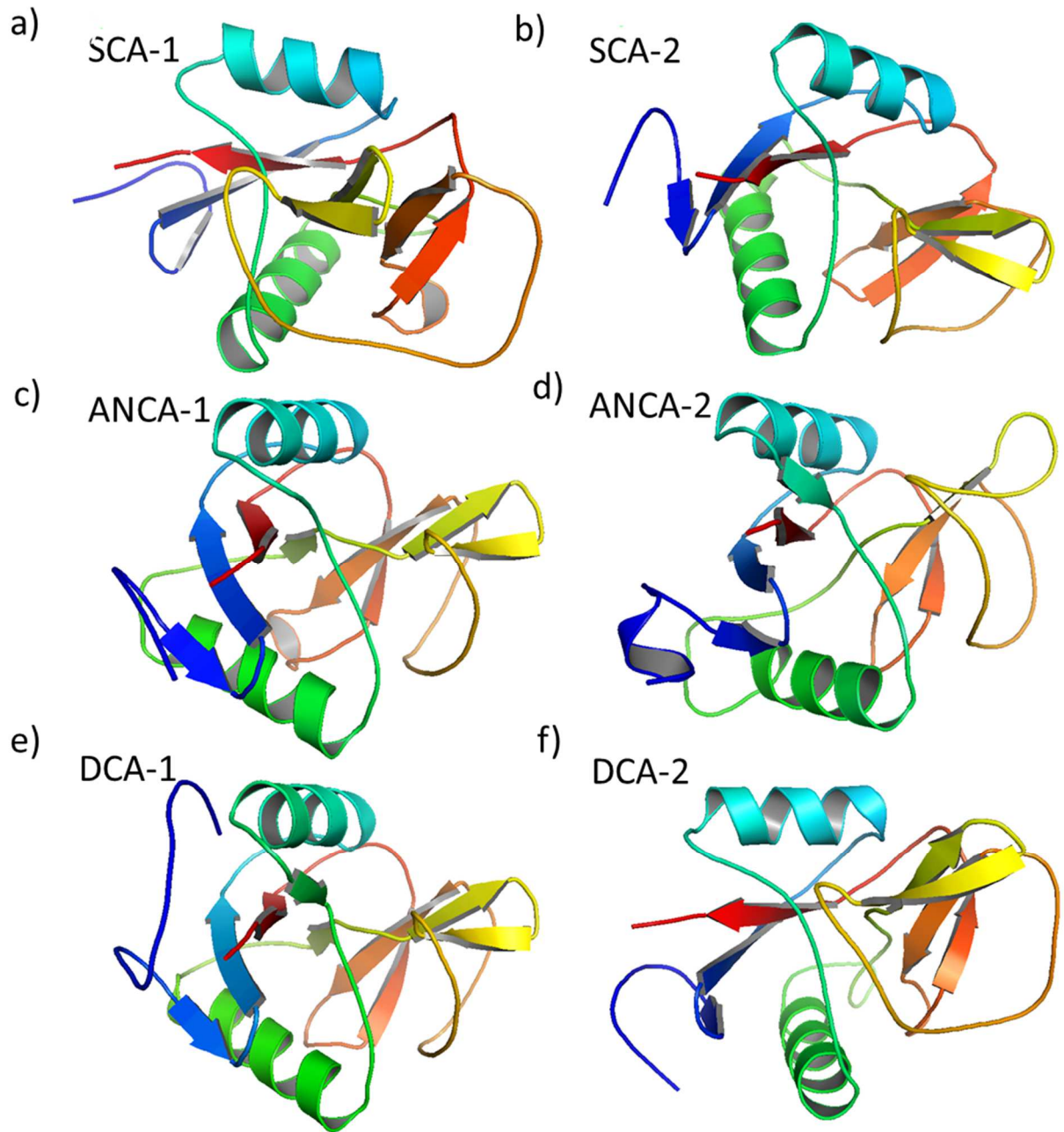


posiciones que en OC-17. Además, SCA-2 y DCA-2 tiene los tres enlaces disulfuro altamente conservados sin cisteínas libres, y la longitud de la secuencia es idéntica a la de OC-17 y DCA-2. Por último la distribución de carga de ambas proteínas debe ser altamente polarizada con áreas de residuos cargados negativamente (Glu69-Glu70-Glu71-Ala-72-Gly73-Glu74-Glu75) y DCA-2 (Glu69-Glu70-Gln71-Glu72-Ala-73Gly74-Glu75), presente en ambas estruthiocalcinas, junto con residuos cargados positivamente para SCA-2 y DCA-2 (Arg103, Arg108, Arg109 y Arg110), como en OC-17. La ANCA-2 posee tres puentes conservados al igual que SCA-2 y DCA-2, pero dos de las cisteínas no se conservan en el mismo sitio.

Aunque no queda claro si las características estructurales de estas proteínas podrían tener un impacto en las propiedades mecánicas del cascarón de huevo, y explicar la presencia de dos proteínas diferentes de tipo lectina tipo C en las tres aves a diferencia de una presente en los huevos de la gallina, las diferencias y similitudes sugieren que estas proteínas a pesar de que pertenecen a la familia de proteínas denominadas tipo lectina tipo C y son homologas, interactúan de forma diferente en el útero del ave, para la formación de la calcita, esto puede deberse a que el huevo de gallina es mucho más débil y pequeño que el huevo de la avestruz, el emú e inclusive el de ganso.

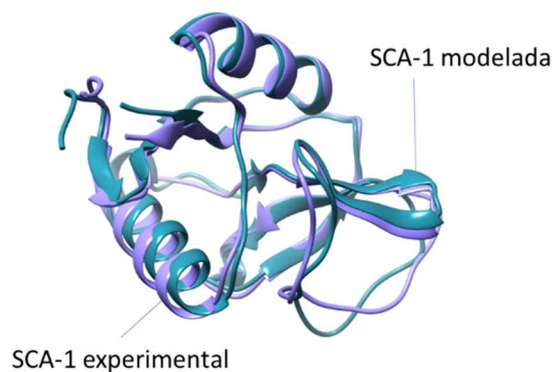
#### **6.3.4. Modelado estructural de las proteínas**

Usando estrategias básicas de predicción descritas anteriormente en la sesión de materiales y métodos, se modelaron las estructuras de las proteínas estudiadas. Los modelos obtenidos se encuentran en la Figura 31 a, b, c, d, e y f. En todos los casos las proteínas intraminerales de los diferentes cascarones tienen un plegamiento análogo con diferencias mínimas entre ellas, exceptuando a la ANCA-2 que tiene discrepancias significativas, puesto que posee una hélice más que las otras proteínas, además de los bucles tienen una conformación espacial diferente.



**Figura 31.** Estructuras tridimensionales de a) SCA-1, b) SCA-2, c) ANCA-1, d) ANCA-2, e) DCA-1 y f) DCA-2

En la Figura 32 se hace una comparación del modelo de la SCA-1 con la estructura determinada experimentalmente para comprobar la eficacia del modelado, como se puede observar las dos estructuras son iguales por lo que se infiere que efectivamente el modelado es confiable.



**Figura 32.** Comparación de las estructuras de SCA-1 modelada (azul) y SCA-1 determinada experimentalmente (morado).

## 6.4. Estudio de interacción de las proteínas con los iones carbonato

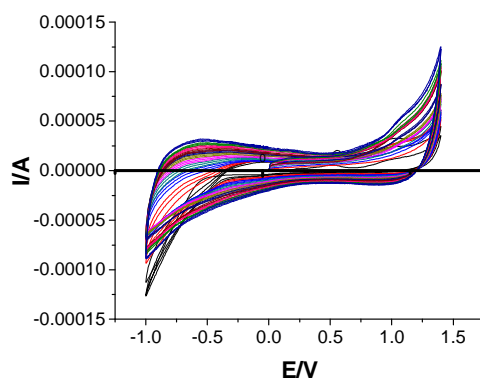
### 6.4.1. Análisis de la interacción de las proteínas con los iones carbonato por voltamperometría cíclica

Las interacciones de las proteínas SCA-1 y SCA-2 con los iones carbonato, fueron estudiadas por Marín et al. (2008), por medio de voltamperometría cíclica. En estos experimentos se usaron diferentes soluciones salinas de metales alcalinotérreos ( $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{SrCl}_2$ ,  $\text{BaCl}_2$ ),  $\text{NaCl}$  y carbonato de sodio para medir la selectividad de las proteínas OC-17, SCA-1 y SCA-2 por cada uno de los iones, las proteínas no dieron respuesta significativa a los cationes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , ni  $\text{Na}^+$ . Sin embargo, con los aniones, sí hubo respuesta por lo que se determinó la selectividad e interacción de SCA-1 y SCA-2 con los iones carbonato.

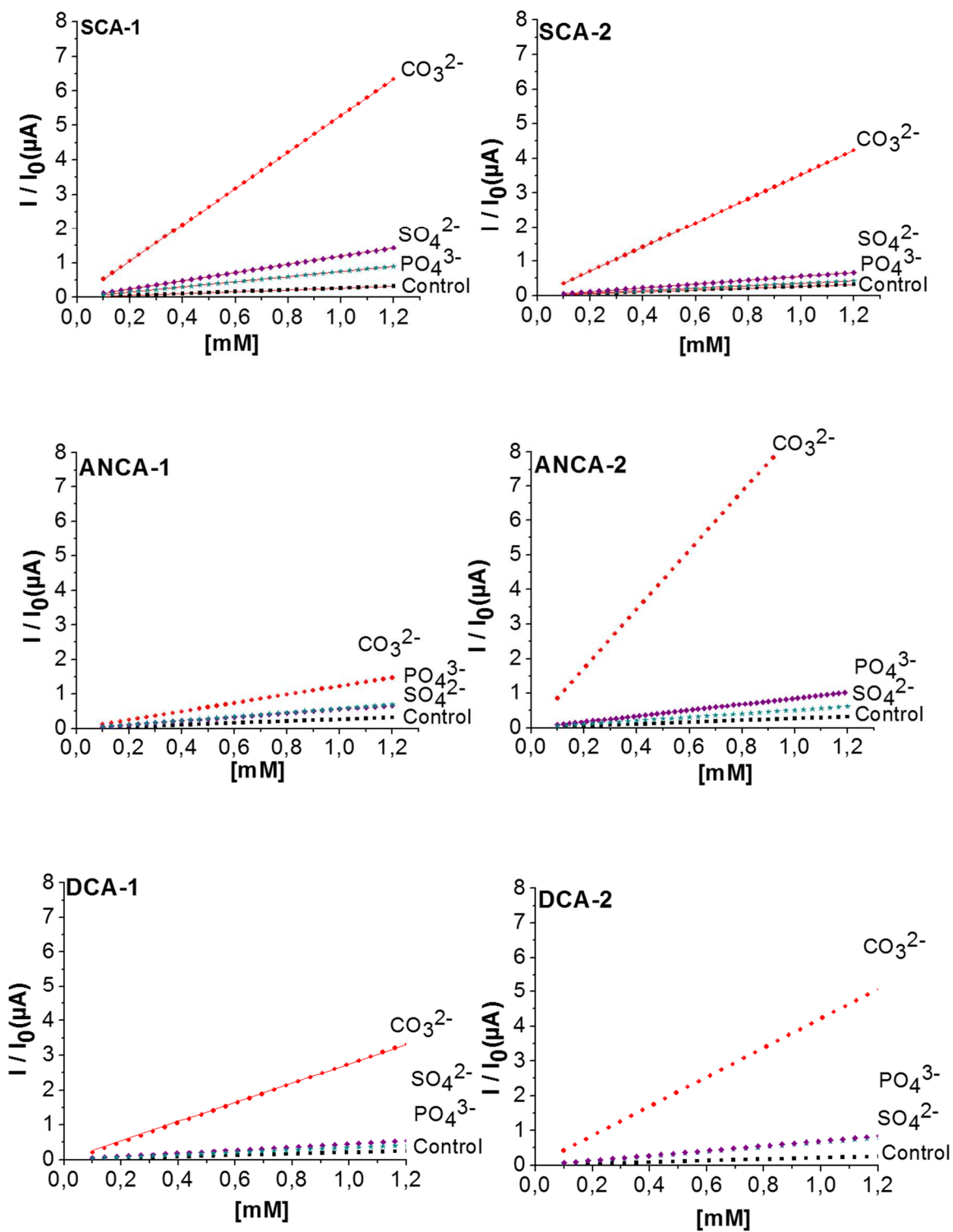
Con base en estos experimentos electroquímicos, se determinó que la voltamperometría cíclica, es un método conveniente para analizar la interacción de las proteínas con diferentes iones, por su alta sensibilidad y bajo límite de detección, además de dar respuestas concretas (variación de los picos) que se puede utilizar como una prueba de la interacción. Para ello se desarrollaron ensayos con las cuatro proteínas estudiadas, usándolas como biosensores en el reconocimiento de iones carbonato, sulfato y fosfato.

Se utilizó como electrolito inerte o de soporte una solución de  $\text{LiClO}_4$  1M, la cual no mostró ninguna interacción con las proteínas analizadas. La proteína fue depositada en el

electrodo de trabajo, y tras averiguar que no había cambio en las mediciones por un tiempo razonable, se agregaron alícuotas de los iones, la respuesta fue un incremento en intensidad, (como ejemplo del resultado obtenido en cada caso se muestra la respuesta de la SCA-1 en la Figura 33, en todos los casos las respuestas fueron similares) lo que se traduce como un aumento de la corriente anódica con la presencia de la proteína. Este hecho sugiere que hay una interacción química, ya que la voltamperometría cíclica es capaz de detectar el estado oxidante general de la reacción redox. Este fenómeno se observa en cada uno de los ensayos con las diferentes proteínas, para el análisis de los resultados se graficaron las respuestas electroquímicas, en términos de corriente anódica con respecto a la concentración de cada anión (Figura 34), las pendientes representan una medida del grado de selectividad o preferencia de cada proteína por los iones, desde el punto de vista electroquímico. Se observa que en cada caso, la preferencia de las proteínas es mayor por los iones carbonatos que por los iones fosfato o sulfato.



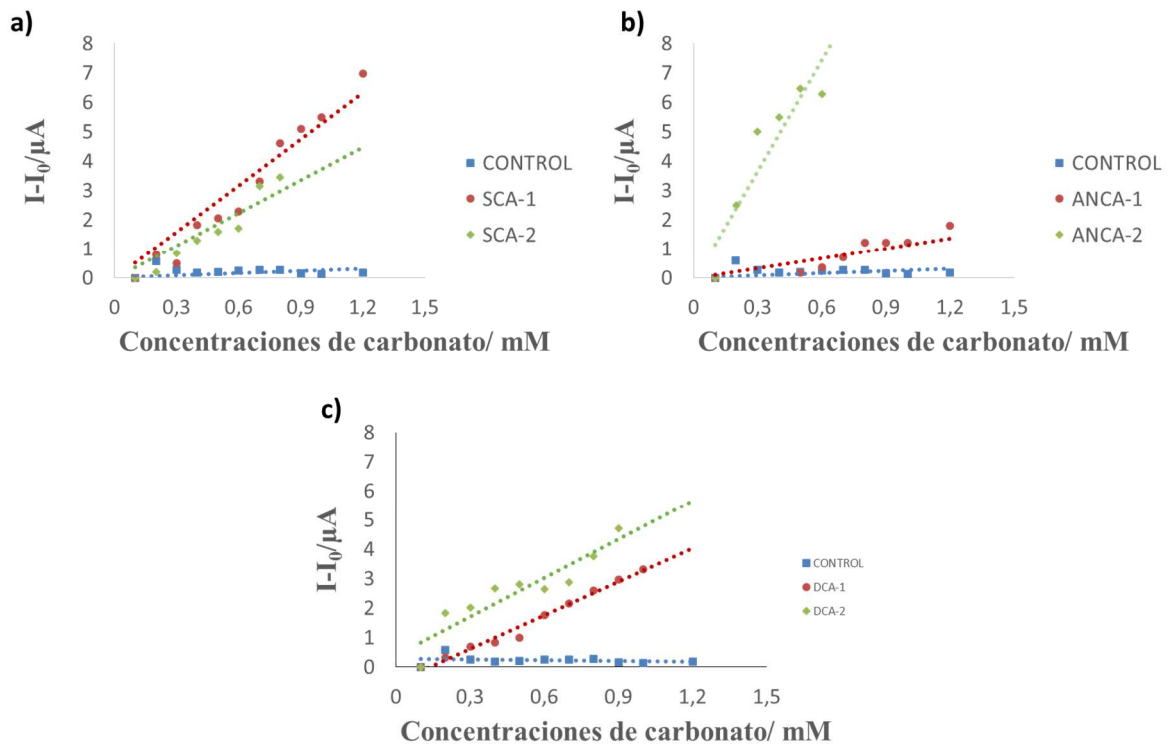
**Figura 33.** Voltamperograma cíclico (5 ciclos) de la proteína SCA-1 usando una celda electroquímica y un electrodo de pasta de carbono (60  $\mu$ g de SCA-1 adsorbida en su superficie); LiClO<sub>4</sub> 0.1 M + adiciones sucesivas de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

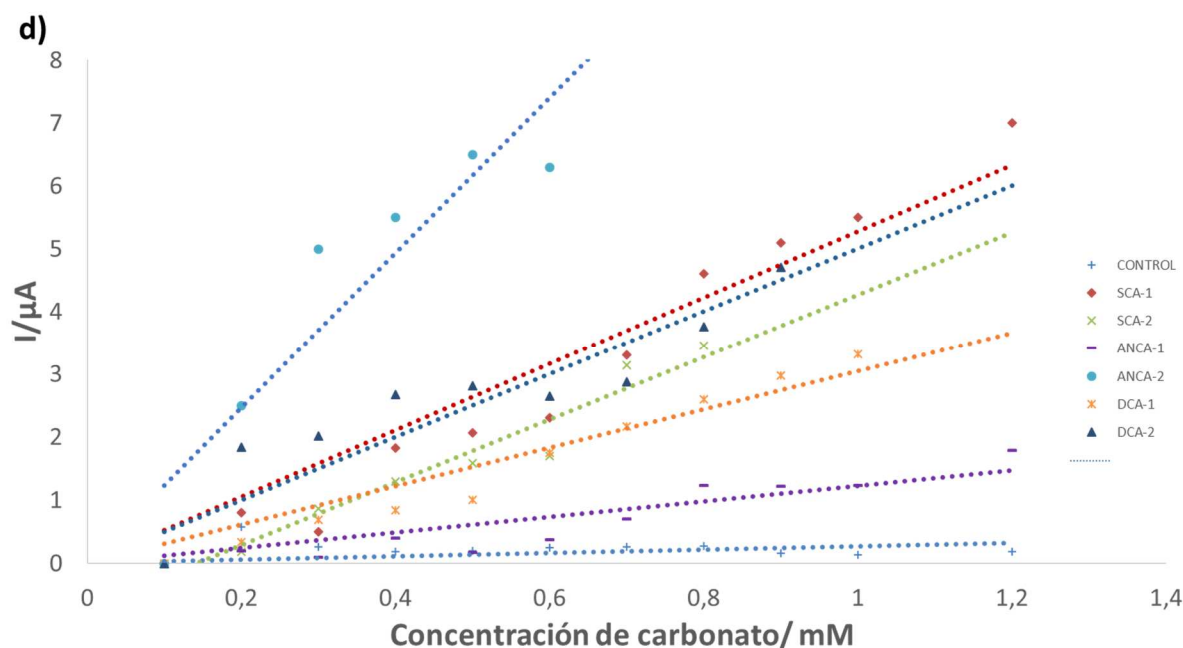


**Figura 34.** Representación gráfica de la intensidad de corriente en el electrodo de trabajo en función de la concentración de iones carbonato, fosfato o sulfato añadida para todas las proteínas estudiadas.

Al analizar y comparar los valores de la pendiente de estas proteínas (Figura 35 a, b, c), se observó que un electrodo que contiene a la proteína SCA-1 es más sensible que uno con SCA-2, la DCA-2 es más sensible que la DCA-1 y la ANCA-2 es más sensible que la ANCA-1. El control es el electrodo de carbono sin proteína absorbida, al hacer una comparación de todas las pendientes (Figura 35d), se observa que la proteína que tiene una mayor selectividad por el carbonato es la ANCA-2, seguida por la SCA-1 y la DCA-2.

La interacción de las proteínas se estudió a concentraciones muy pequeñas, en comparación con la concentración de ligando (carbonato), semejando al proceso *in vivo*, donde la proteína se encuentra en un medio rico en  $\text{CaCO}_3$ , este hecho se puede explicar debido a que la biomineralización debe llevarse a cabo en condiciones de hipersaturación (Robertson, 1982; Nys et al., 1991), por lo tanto las proteínas tienen que interaccionar con cantidades grandes de carbonato.



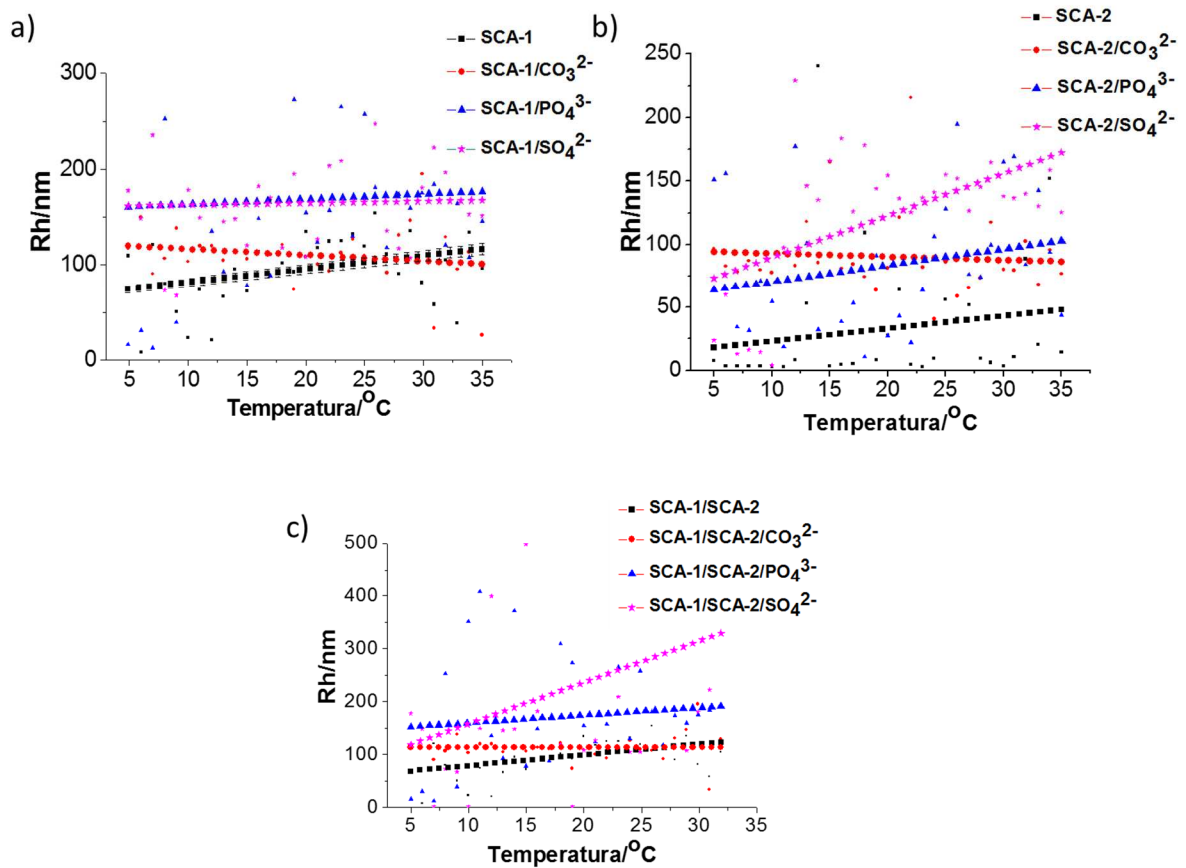


**Figura 35.** Representación gráfica de la intensidad de corriente en el electrodo de trabajo en función de la concentración de carbonato de sodio añadida: a) SCA-1 y SCA-2, b) ANCA-1 y ANCA-2, c) DCA-1 y DCA-2 y d) para todas las proteínas estudiadas.

#### 6.4.2. Análisis de estabilidad conformacional por medio de dispersión dinámica de luz

Una vez establecida la preferencia de las proteínas por los iones carbonato en solución, se retomaron estudios de DLS previamente publicados (Ruiz-Arellano et al., 2011), donde se estudió el tamaño y distribución de SCA-1 y SCA-2, y se analizó la estabilidad de la proteína en función de su radio hidrodinámico ( $R_h$ ). Basándose en estos resultados, se diseñaron nuevos ensayos usando tres diferentes medios, tales como carbonatos, fosfatos y sulfatos, para poder hacer una comparación del comportamiento de la proteína en los diferentes iones. La concentración de los iones fue de 70 mM, que es la concentración promedio a la que se encuentran el fluido uterino, y se utilizó además un intervalo de temperaturas de 5-35 °C, de igual forma, se realizaron ensayos de las proteínas separadas y en mezcla simulando las condiciones *in vivo*.

Al analizar los resultados se observó, que la SCA-1 en presencia de carbonatos se mantiene estable y de tamaño homogéneo (100nm) durante el intervalo de temperatura utilizado. (Figura 36a), el tamaño de agregados en fosfatos y sulfatos es mayor ( $\geq 150$ nm). La SCA-2 (Figura 36b) en carbonatos muestra un comportamiento estable, formando agregados de tamaño invariable (80nm), mientras que en fosfatos y sulfatos forma agregados mayores a 100 nm que van en crecimiento con el aumento de la temperatura. En la mezcla SCA-1/SCA-2 (figura 36c) para todos los casos se observan agregados de alrededor de los 100 nm, con excepción del medio de carbonatos que forma agregados de menos de 100nm y que con el aumento de la temperatura estos no sufrieron modificaciones.

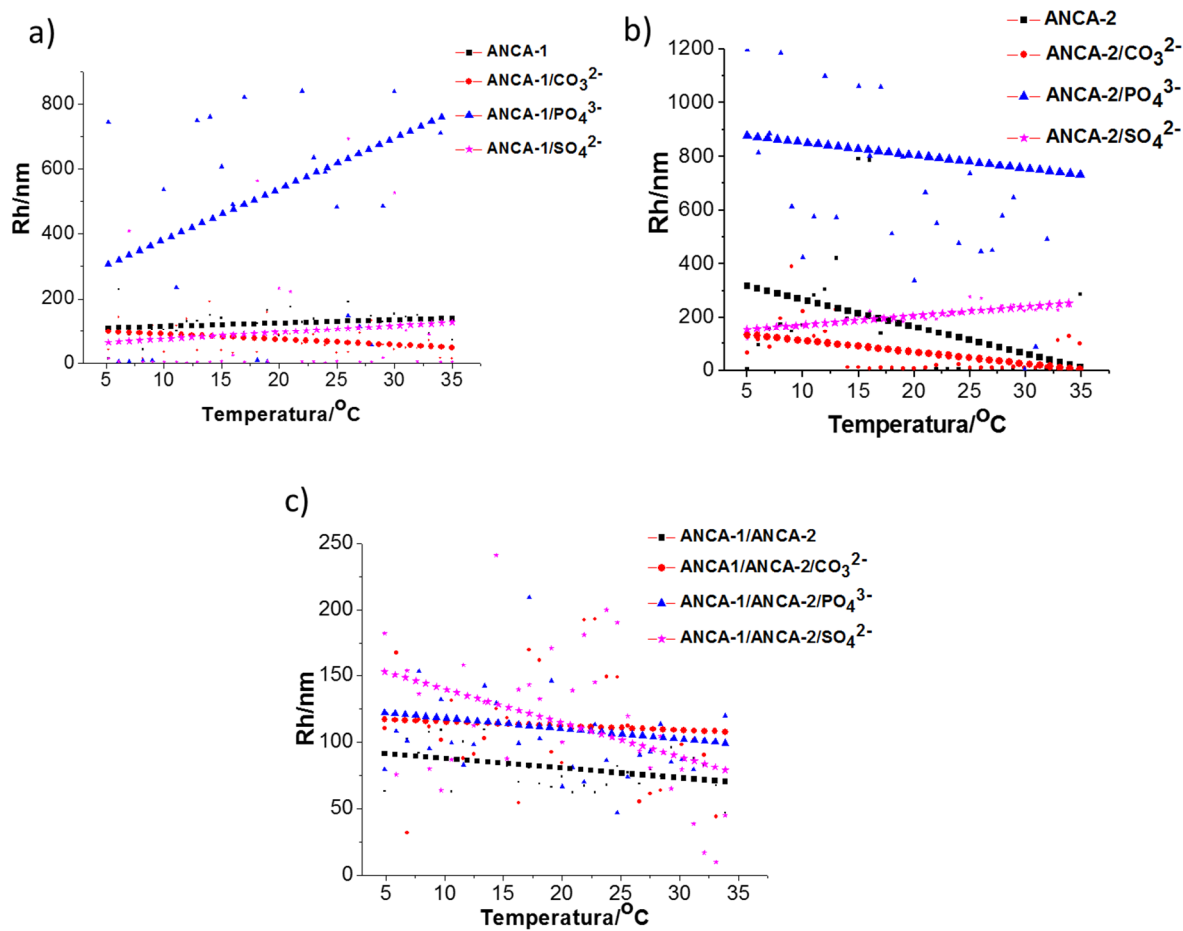


**Figura 36.** Gráficos de DLS los cuales muestra el comportamiento de las proteínas a) SCA-1, b) SCA-2 y c) SCA-1/SCA-2 a diferentes temperaturas y medios. Los medios utilizados fueron:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 70mM.



Se observó que la ANCA-1 (Figura 37a), en presencia de carbonatos, forma agregados con un Rh menor a 100nm, con una disminución pequeña del tamaño a lo largo del intervalo de temperatura mientras que, en presencia de sulfatos, la proteína forma agregados de 100 nm en promedio, que no varían mucho en el intervalo de temperatura. En fosfatos, la proteína tiende a formar agregados grandes mayores a 500 nm.

La ANCA-2 (Figura 37b), en presencia de carbonatos, forma agregados pequeños, de 80 nm en promedio, presentaron disminución del tamaño a medida que la temperatura disminuía, en presencia de fosfatos, los agregados de ANCA-2 son grandes (800 nm) y con variaciones grandes en el tamaño conforme la temperatura aumenta, mientras que en sulfato los agregados son de un tamaño promedio de 150nm. En cuando a la mezcla de las dos proteínas (Figura 37c), estas se comportan con mayor estabilidad, pues en todos los casos forman agregados de un tamaño que va de los 100 a 150 nm, y en el medio de carbonatos la proteína no sufre modificaciones en el tamaño a la largo del intervalo de temperatura.

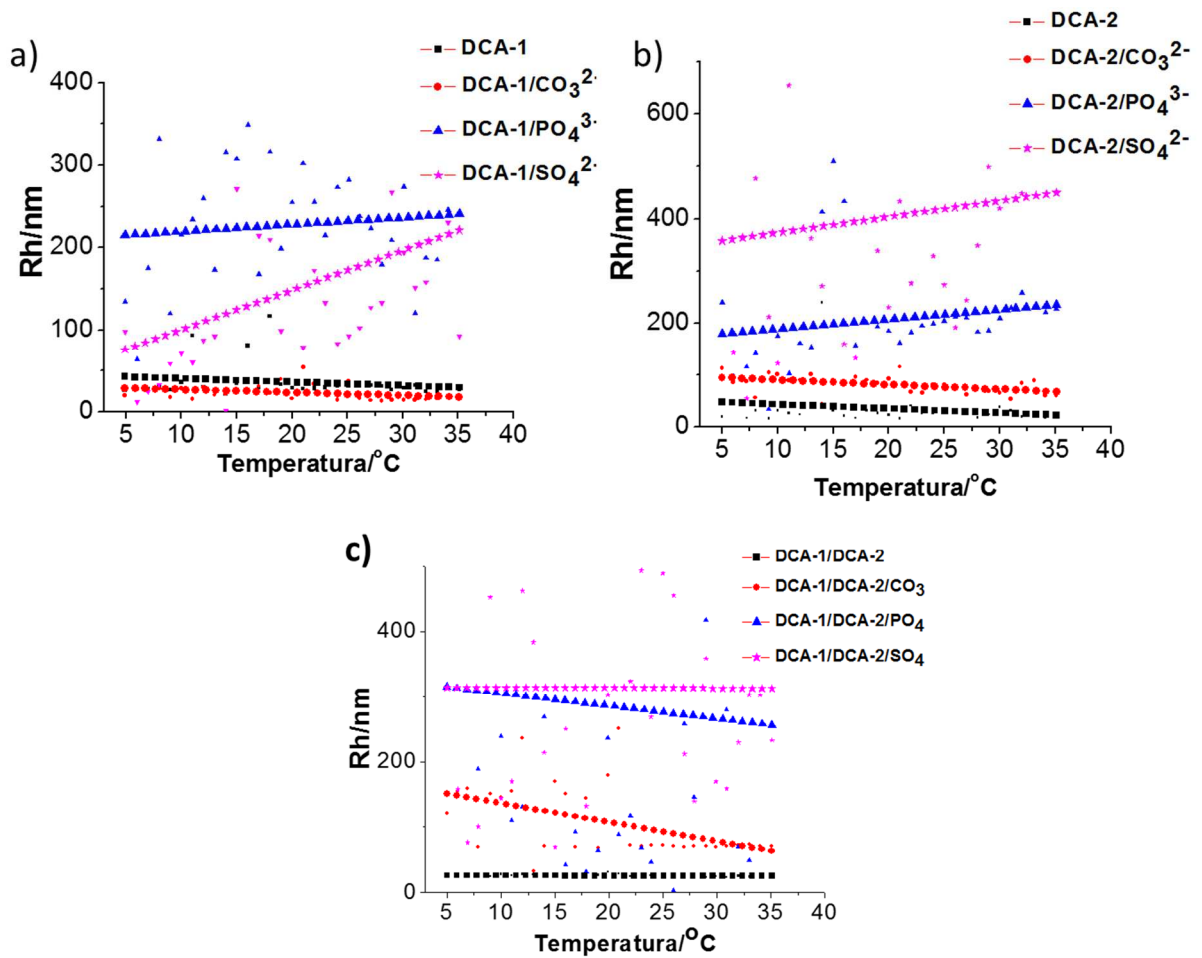


**Figura 37.** Gráficos de DLS los cuales muestran el comportamiento de las proteínas ANCA-1 y -2 a diferentes temperaturas y medios. Los medios utilizados fueron agua,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 70mM.

Los resultados de los experimentos de la DCA-1 (Figura 38) muestran que en el medio de carbonatos, la proteína tiende a formar agregados pequeños de 50 nm en promedio, que disminuyen en tamaño a medida que decrece la temperatura, mientras que en presencia de fosfatos y sulfatos los agregados son de 200 y 250 nm aproximadamente y estos van en aumento con el aumento de la temperatura. La DCA-2 tiene un comportamiento similar al de la DCA-1, en carbonatos se comporta estable, formando agregados de 90 nm en promedio, mientras que en fosfatos y sulfatos forma agregados grandes de 200 y 400 nm respectivamente, cuyo tamaño aumenta con la temperatura.

La mezcla de la DCA-1 y DCA-2 nuevamente muestra un comportamiento más estable que las proteínas por separado, en iones carbonato la proteína forma agregados de 80 nm

que van disminuyendo con la temperatura, en medio de fosfatos y sulfatos las proteínas forman agregados de aproximadamente 300 nm que no varían con el aumento de la temperatura.



**Figura 38.** Gráficos de DLS los cuales muestran el comportamiento de las proteínas DCA-1 y -2 a diferentes temperaturas y medios. Los medios utilizados fueron agua,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 70mM.

De acuerdo con estos resultados (ver tabla 8) en todos los casos, las proteínas en medio de carbonatos, muestran mayor estabilidad. La tendencia general del comportamiento de agregación de estas proteínas, indica que en presencia de sulfatos las proteínas se encuentran más agregadas. En acuerdo con la mayoría de los experimentos de

cristalización realizados hasta ahora, ya que sales de sulfato son por lo general, agentes de precipitación en la purificación y cristalización de proteínas.

**Tabla 8.** Tamaño de agregados en los ensayos de DLS

	<b>Tamaño de agregado en nm</b>			
	<b>Agua</b>	<b>CO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b>	<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>
<b>SCA-1</b>	80	100	150	150
<b>SCA-2</b>	25	80	80	100
<b>SCA-1/SCA-2</b>	60	100	150	160
<b>ANCA-1</b>	100	100	500	100
<b>ANCA-2</b>	200	60	150	800
<b>ANCA-1/ANCA2</b>	80	140	140	140
<b>DCA-1</b>	50	50	200	150
<b>DCA-2</b>	50	90	180	350
<b>DCA-1/DCA-2</b>	40	80	300	300

Asimismo los resultados sugieren que en presencia de iones carbonato la estabilidad de ambas proteínas mezcladas es mayor, mientras que las proteínas por separado tienen una mayor tendencia a formar agregados. Este resultado es congruente con el hecho de que ambas proteínas están mezcladas en su medio natural, por lo que se infiere que en el fluido uterino trabajan en conjunto, una frente a la otra como un cofactor necesario para realizar su función. En el huevo de gallina sólo existe una proteína (OC-17), lo que contrasta con el hecho de que los huevos de las aves estudiadas necesiten dos proteínas, para la formación del cascarón del huevo.

Por otra parte, los resultados experimentales muestran un comportamiento de agregación en cualquier medio, que se cree necesario en este tipo de proteínas, pues esta tendencia a formar agregados observada en las proteínas intraminerales tipo lectina tipo- C y a las altas concentraciones que se encuentran dentro del cascarón, puede indicar que *in vivo*

estas forman una red proteica durante la formación del cascarón, en la cual se posan los núcleos cristalinos de carbonato de calcio y sirve como un andamio que mecánicamente restringe y dirige el crecimiento de la calcita durante la mineralización. (Hincke et al., 1995; Mann, 1999; Lakshminarayanan et al., 2005).

#### **6.4.3. Análisis del cambio conformacional de estructura por medio de fluorescencia intrínseca**

Se sugirió un cambio en la conformación de las estructuras al interactuar con el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , para comprobarlo se monitoreó el cambio en la emisión de fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano presentes en la estructura primaria de cada proteína.

La técnica de espectroscopia de fluorescencia es muy útil para estudios de dinámica conformacional de biomoléculas por su alta sensibilidad y su capacidad de respuesta. Las proteínas con fluorescencia intrínseca poseen un espectro de emisión característico, resultado del contenido de residuos aromáticos y de la posición de éstos dentro de su estructura. Esta fluorescencia puede ser utilizada para determinar los cambios conformacionales en dichas proteínas, ya que la posición del máximo del espectro de emisión del triptófano en la proteína es muy sensible a cambios en la polaridad del entorno, por lo que resulta una herramienta muy útil para detectar cambios conformacionales en las proteínas estudiadas en presencia de los iones carbonato.

Se obtuvieron los espectros de emisión para SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2 en un medio sin iones carbonato, excitando a la longitud de onda que absorbe específicamente el triptófano (295 nm) y se observó su emisión en el intervalo 300-450 nm. Se observó un máximo de emisión a 345nm el cual es característico de la emisión fluorescente de los triptófanos.

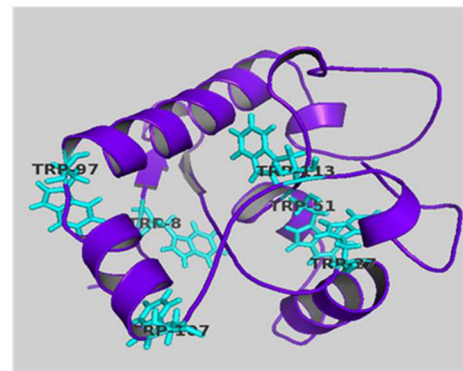
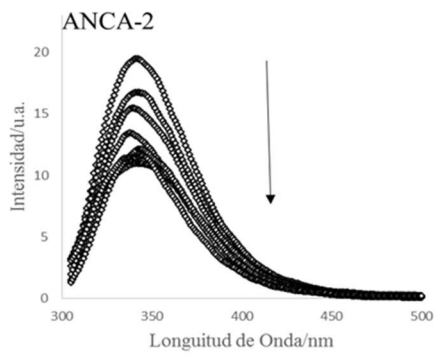
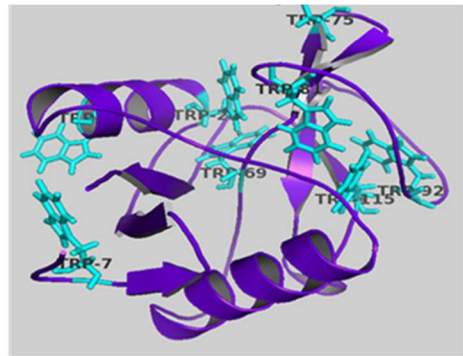
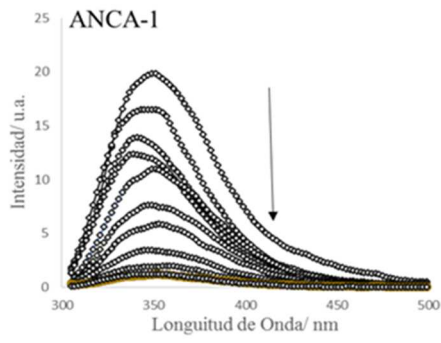
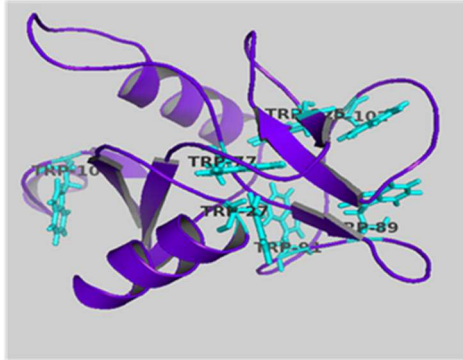
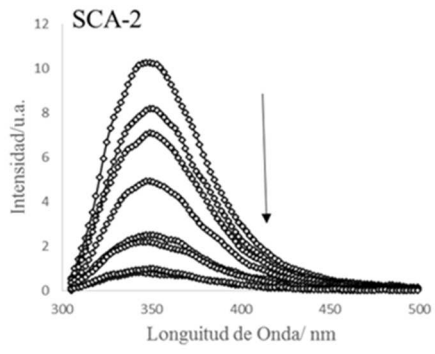
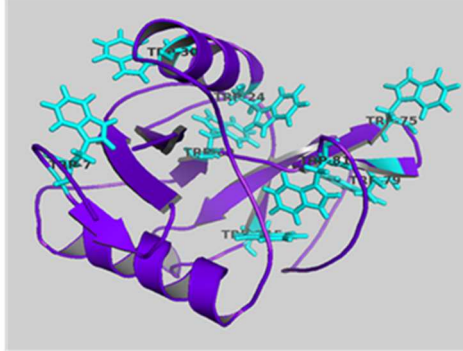
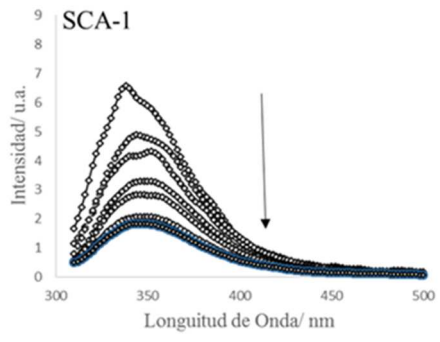
Subsiguientemente se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia de cada proteína en presencia de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , incrementando la concentración tras cada medición hasta la saturación, es decir una vez que no cambio la señal al agregar  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Este último paso se realizó para poder comprobar sí en el entorno de los residuos de triptófano, habían algunas variaciones de estructura terciaria. Todos los espectros fueron adquiridos para soluciones de proteína con concentración constante ( $3\mu\text{M}$ )

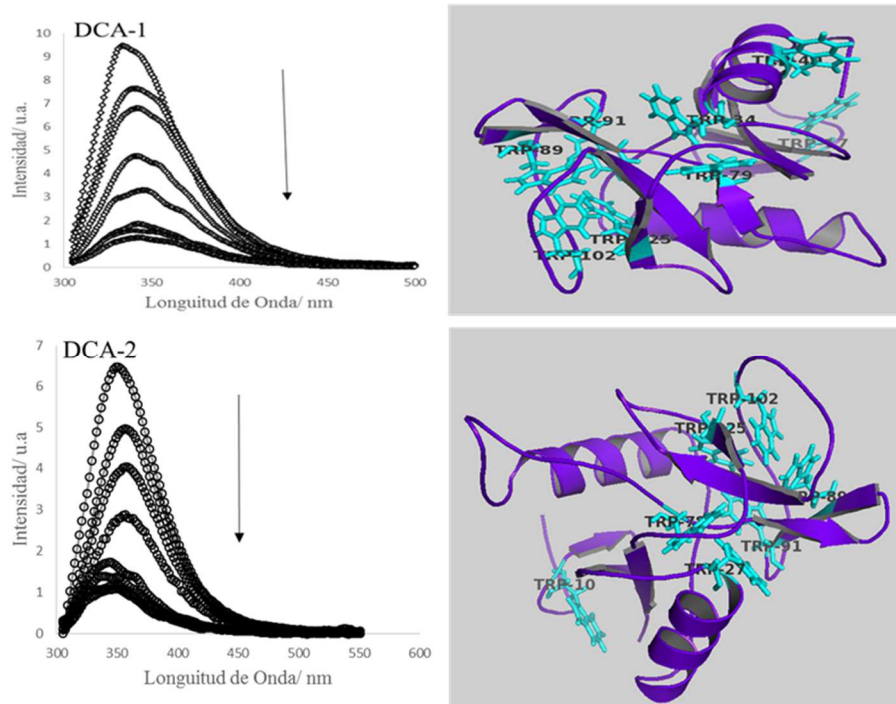
Los espectros en presencia y en ausencia de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  se compararon, (ver Figura 39). Dado que el carbonato de sodio no muestra absorción ni a longitud de onda de excitación, ni a la de emisión, la disminución en la intensidad de los espectros de emisión no puede deberse a un fenómeno de filtro interno, por lo que las señales pueden asociarse a cambios conformacionales en las proteínas al interactuar con el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . En todos los espectros la emisión disminuye, sin cambiar en la longitud de onda (350 nm) salvo en el caso de la proteína DCA-2, donde se observa que a concentraciones mayores de 3 mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  existe un corrimiento hacia el azul (340nm), esto sugiere que uno o varios residuos triptófano se vuelven menos accesibles al solvente, es decir que el cambio en la conformación de esta proteína es mayor, como ya se había visto en los experimentos hechos con dicroísmo circular.

Como se hizo mención, se observan cambios en la posición del máximo, como consecuencia de un proceso de desexcitación no radiactiva provocado por una molécula ajena al fluoróforo en este caso el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , que es el desactivador o quencher. De esta manera se puede observar que estructuralmente el ligando se puede acoplar a cada una de las proteínas, provocando así estos cambios conformacionales y el cambio en el ambiente químico de los fluoróforos que se encuentran cerca del sitio activo.

En la Figura 39 se muestran las estructuras de las proteínas (modeladas en el capítulo anterior), resaltando los residuos triptófano que presentan en su secuencia; en la tabla 8 se pueden encontrar los máximos de absorbancia para cada una de las señales de las proteínas, el número de triptófanos que presenta en su estructura y el número de triptófanos que están expuestos al solvente.

La diferencia de los valores máximos de fluorescencia en cada una de las proteínas, se puede correlacionar algunas veces con la estructura por el número de triptófanos que se encuentran expuestos, ya que la fluorescencia aumenta a medida que aumenta el número de triptófanos expuestos en cada proteína. Se observa que para la SCA-1 y DCA-2 los máximos son los menores valores observados (6.4681 y 6.7579 u.a.), esto puede ser porque tienen sólo 3 y 2 triptófanos expuestos respectivamente, mientras que para la ANCA-1 y -2 el máximo de absorbancia es mucho mayor (19.725 y 19.417) ya que tienen más de la mitad de los triptófanos expuestos.





**Figura 39.** Espectros de emisión de: a) SCA-1 b) SCA-2 c) DCA-1 d) DCA-2 con diferentes concentraciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

**Tabla 9.** Máximos de absorbancia en los experimentos de fluorescencia comparados con el número de triptófanos de cada una de las proteínas.

	Máximos de absorbancia	Número de Triptófanos	Numero de Triptófanos expuestos
SCA-1	6.4681	8	3
SCA-2	10.222	7	4
ANCA-1	19.725	8	5
ANCA-2	19.417	6	4
DCA-1	9.420	8	3
DCA-2	6.7579	7	2

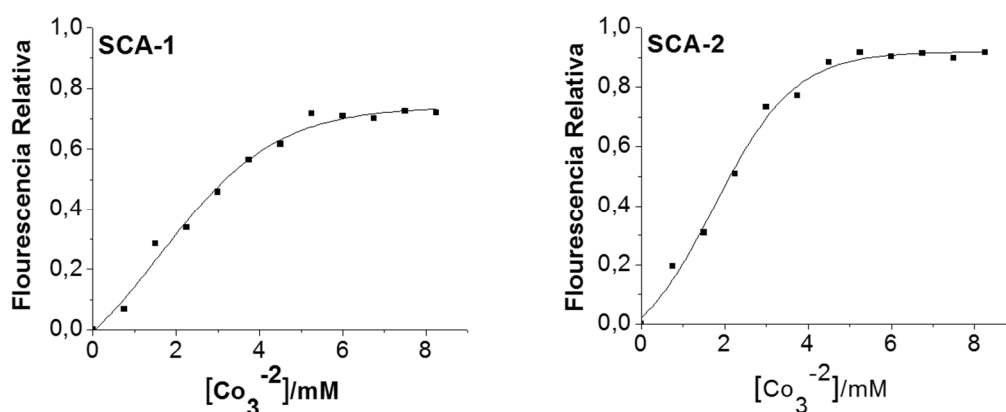
A continuación se graficaron los datos de la dependencia de la señal de fluorescencia a la máxima longitud de onda, en función de la concentración de iones carbonato, para los seis casos (ver Figura 40), la curva se ajusta de una manera coherente a un modelo

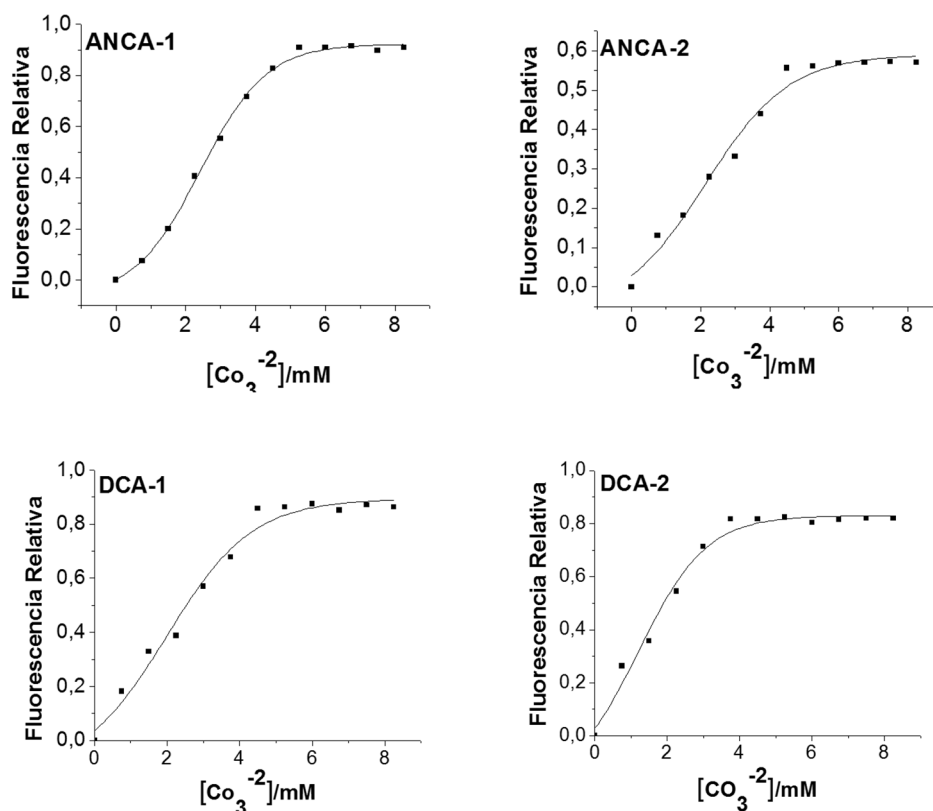


matemático de dos sitios similares de unión al ligando (ver  $R^2$  en la tabla 10) (Eftink, 1976; Eftink, 1981). El modelo de dos sitios de unión para estas proteínas concuerda con el análisis teórico de interacción realizado por Freeman et al. (2011) en el que se propone que la proteína OC-17 puede interactuar con varios iones simultáneamente, por lo que se puede inferir que en el proceso de mineralización, estas proteínas intraminerales interactúan con una estequiometría de 1:2 (proteína:ligando).

Además se hizo el cálculo de la constante de disociación ( $K_d$ ), obteniendo resultados razonables para los sitios de unión de cada una de las proteínas (tabla 10), estos valores de  $K_d$  son grandes lo que indica que existe una baja afinidad para la unión a carbonato. Se puede inferir que las proteínas intraminerales que participan en la mineralización del  $\text{CaCO}_3$  son selectivas a los iones carbonato, pero tienen una afinidad baja por los mismos, este hecho se puede explicar tomando en cuenta que en el útero del ave existen altas concentraciones de  $\text{CaCO}_3$ , por lo que las proteínas no necesitan tener una alta afinidad por los iones carbonato que están en exceso en su entorno.

De los resultados de  $K_d$  se infiere que la proteína con mayor afinidad es la DCA-2, seguida de la SCA-2 y ANCA-2, de este resultado puede sugerir que las proteínas marcadas como “-2” de cada par de proteínas, interactúan primero con el carbonato de calcio siendo apoyada por la proteína “-1”. Este resultado es coherente puesto que se ha encontrado que en el sistema biológico existe una menor cantidad de “-2” de cada par de proteínas, por lo que se puede deducir que estas necesitan mayor afinidad por el ligando.



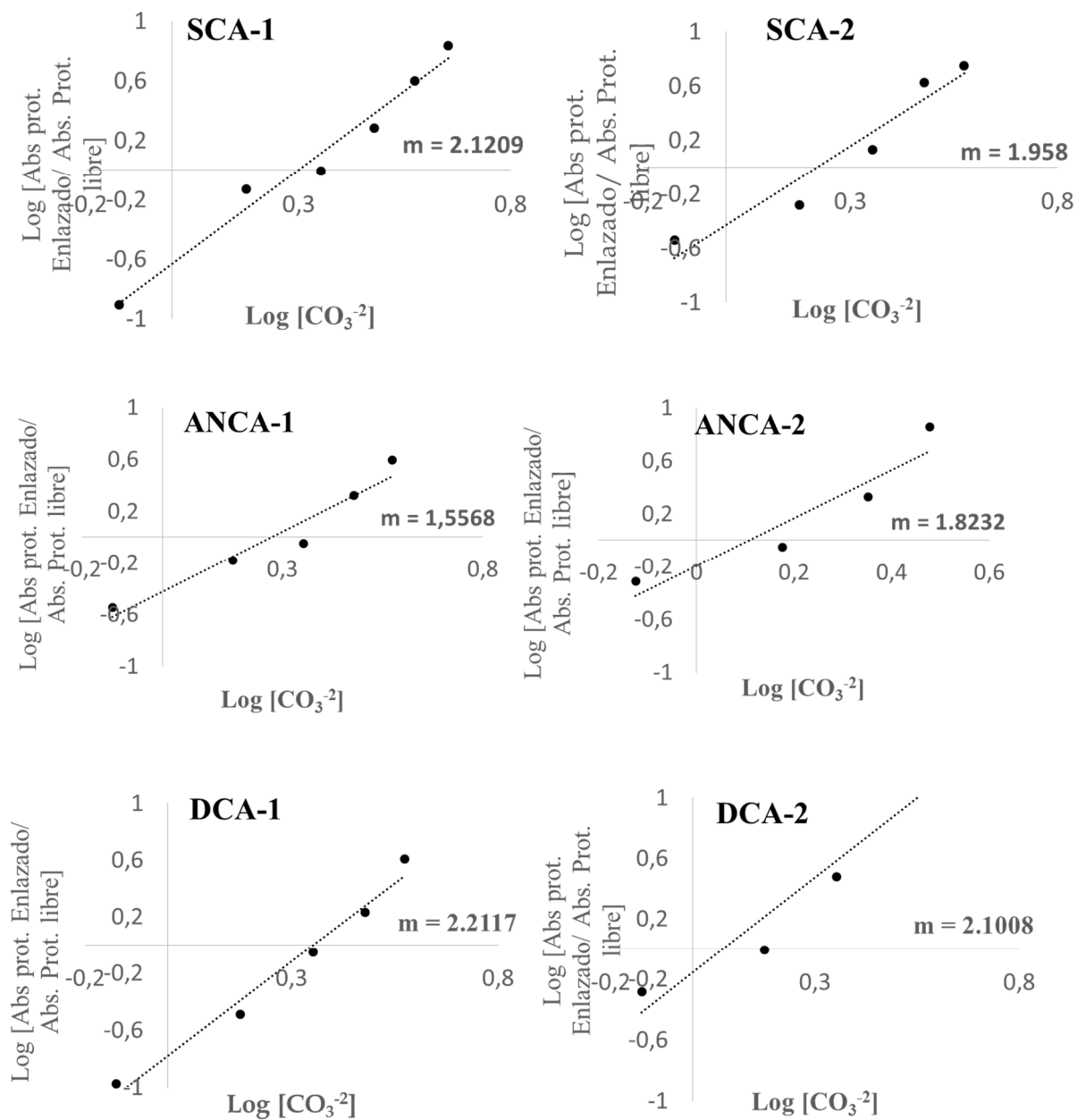


**Figura 40.** Graficas de los datos de la dependencia de la señal de fluorescencia a la máxima longitud de onda, en función de la concentración de iones carbonato para cada una de las proteínas estudiadas.

**Tabla 10.** Constantes de disociación proteína-ligando y valores de  $R^2$  obtenidas a partir de un ajuste por regresión no lineal para un modelo de dos sitios de unión similares.

	<b>Kd (mM)</b>	<b>R<sup>2</sup> del ajuste</b>
SCA-1	6.968 ± 1.316	0.993
SCA-2	4.852 ± 0.929	0.986
ANCA-1	8.878 ± 1.194	0.997
ANCA-2	6.589 ± 1.662	0.990
DCA-1	7.462 ± 2.141	0.988
DCA-2	2.951 ± 0.772	0.997

Finalmente como las proteínas se ajustaron a un modelo con dos sitios de unión iguales, se procedió a hacer un gráfico de Hill (según la ecuación de Hill de la forma  $\text{Log } Y/Y_0 = \log [A]$ , donde Y es la absorbancia y A la concentración de ligando) para cada uno de las proteínas con el propósito de determinar la cooperatividad de los sitios de unión (Verjovski-Almeida & Silva, 1980) y al observar las gráficas (Figura 41) y analizar los datos de las pendientes de cada una de ellas se puede inferir que existe una cooperatividad positiva, pues el valor de la pendiente en todos los casos es alrededor de dos.



**Figura 41.** Gráficos de Hill para cada una de las proteínas estudiadas.

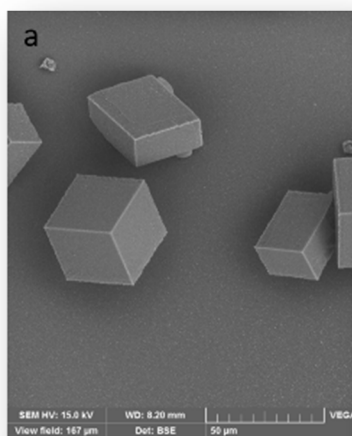
#### **6.4.4. Estudio de la influencia de las proteínas SCA-1, SCA-2, DCA-1 y DCA-2 en la cristalización de calcita**

Una vez estudiada la interacción de los iones carbonato, se decidió desarrollar ensayos desde un punto de vista diferente, estudiando la interacción de la calcita con las proteínas. Se han realizado estudios previos del efecto de las fracciones de matrices de proteína (Hernández-Hernández, 2008b), del fluido uterino de gallina (Dominguez-Vera, 2000; Hernández-Hernández, 2008a), de la lisozima (Jiménez-López et al., 2003), de la OC-17 (Reyes-Grajeda et al., 2004), y de la ANCA (Laksminarayanan, 2003) sobre el crecimiento de los cristales de calcita, sin embargo no hay antecedentes de ninguna proteína del cascarón de huevo de las ratites (avestruz y emú) por lo que mediante ensayos de crecimiento de cristales *in vitro* se analizó el efecto de estas proteínas sobre la morfología y formación de los cristales de  $\text{CaCO}_3$ .

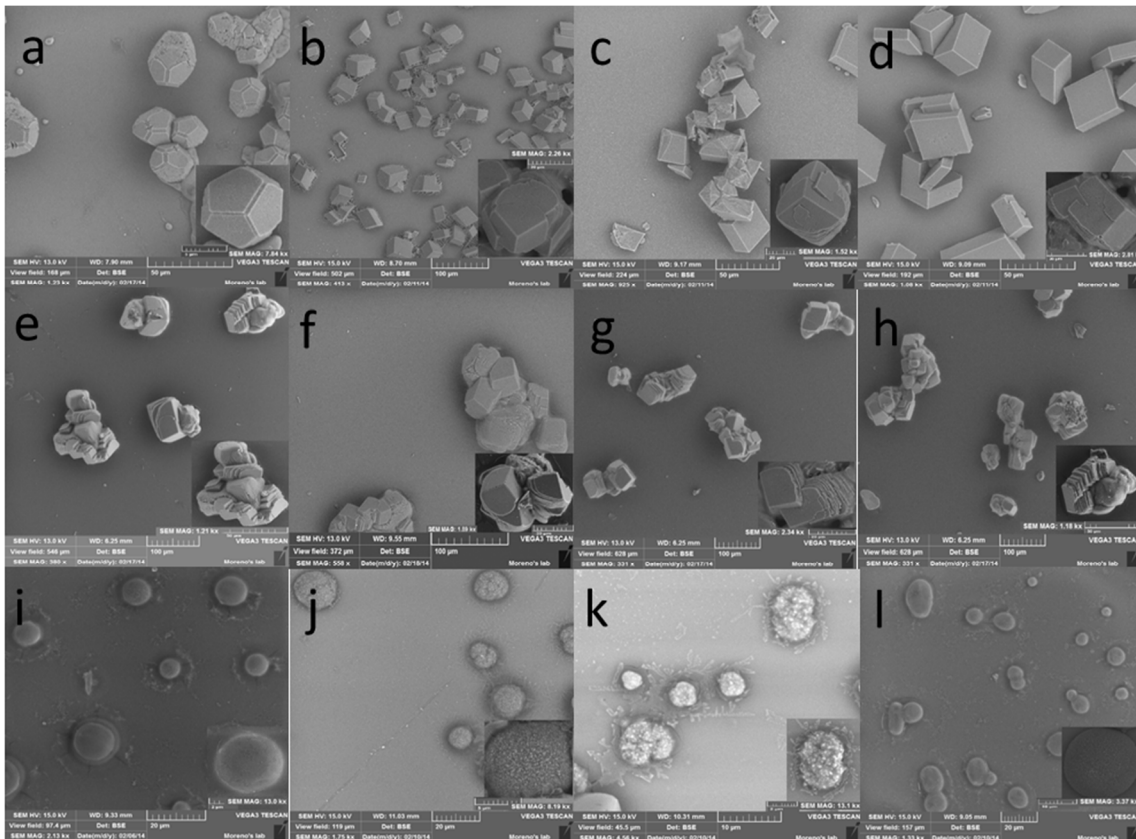
En primera instancia se sintetizaron cristales de calcita en ausencia de proteínas y con tres diferentes concentraciones de cada una. Los cristales obtenidos se visualizaron mediante SEM, en la Figura 42 se muestran cristales de calcita romboédrica {104} (Sharp et al., 1986) los cuales se crecieron como control sin proteína.

Al agregar las proteínas a una concentración de  $50\mu\text{g/mL}$  (Figura 43a, b, c y d) la morfología de los cristales se ve afectada. En la Figura 43a, se observa el efecto de la proteína SCA-1 sobre el crecimiento del cristal de calcita, ahora la morfología es de un octaedro truncado con vértices redondeados y aparentemente lisos. Los cristales que contienen SCA-2, DCA-1 y DCA-2 (Figura 43b, c y d) se ven afectadas en menor medida, ya que estos crecen en maclas pero siguen manteniendo la forma de cristales romboedrales {104}. Al aumentar la concentración de proteína a  $75\mu\text{g/mL}$ , se observa un crecimiento anisotrópico (Figura 43e, f, g y h), puesto que se inhibe el crecimiento de ciertas superficies debido a la interacción con el  $\text{CaCO}_3$  y en todos los casos las proteínas promueven el crecimiento de maclas con formas escalonadas en las caras (crecimiento por capas). De nuevo, la SCA-1 tiene mayor influencia en la deformación del cristal (Figura 44e). Finalmente, cuando la concentración de proteína se incrementa a  $100\mu\text{g/mL}$  (Figura 44i, j, k y l), los cristales con SCA-1 crecieron como agregados policristalinos esféricos con una superficie en la cual no se distinguen sus componentes (Figura 44i), en

presencia de SCA-2 y DCA-1 (Figura 43j y 43k) se forman agregados policristalinos y la superficie de las partículas esféricas exhibe una forma irregular de clúster resultantes de orientaciones al azar en los nanocompuestos que conforman el material. Finalmente con DCA-2 (Figura 43l) se observa la aparición de agregados policristalinos elipsoidales con partículas mucho más pequeños que las encontradas en los cristales con la influencia de SCA-2 y DCA-1. La SCA-1 tiene un efecto muy marcado en la morfología de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  desde bajas concentraciones, seguida por la DCA-2, hecho que concuerda con los experimentos de voltamperometría cíclica, donde la SCA-1 tiene una mayor selectividad por los iones carbonato seguida por la DCA-2.



**Figura 42.** Cristal de calcita.



**Figura 43.** Micrografías electrónicas de cristales de calcita crecidos en presencia de diferentes concentraciones de proteína. a)  $\text{CaCO}_3\text{-SCA-1}$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ), b)  $\text{CaCO}_3\text{-SCA-2}$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ), c)  $\text{CaCO}_3\text{-DCA-1}$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ), d)  $\text{CaCO}_3\text{-DCA-2}$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ), e)  $\text{CaCO}_3\text{-SCA-1}$  (75  $\mu\text{g/mL}$ ), f)  $\text{CaCO}_3\text{-SCA-2}$  (75  $\mu\text{g/mL}$ ), g)  $\text{CaCO}_3\text{-DCA-1}$  (75  $\mu\text{g/mL}$ ), h)  $\text{CaCO}_3\text{-DCA-2}$  (75  $\mu\text{g/mL}$ ), i)  $\text{CaCO}_3\text{-SCA-1}$  (100  $\mu\text{g/mL}$ ), j)  $\text{CaCO}_3\text{-SCA-2}$  (100  $\mu\text{g/mL}$ ), k)  $\text{CaCO}_3\text{-DCA-1}$  (100  $\mu\text{g/mL}$ ), and l)  $\text{CaCO}_3\text{-DCA-2}$  (100  $\mu\text{g/mL}$ ).

Las modificaciones del hábito cristalino son el resultado de la adsorción de las proteínas en diferentes caras del cristal, la formación de aglomerados redondeados indica que esta adsorción no es específica, puesto que se une a la superficie del cristal bloqueando el crecimiento del mismo por todas las caras.

Al correlacionar los resultados obtenidos en los experimentos de crecimiento de cristales con los obtenidos para la ANCA-1 por Lakshminarayanan (2006), se nota que esta proteína influye de la misma manera, cambiando el mecanismo de crecimiento de la calcita con la obtención de cristales redondeados. Cuando el mismo ensayo se llevó a cabo con la OC-17 (Reyes- Grajeda et al., 2004; Lakshminarayanan, 2006) se observa que esta proteína influye de una manera diferente sobre el crecimiento de la calcita, pues no hay cambios significativos con el aumento en la concentración de proteína, lo que

indica que hay más interacciones de la calcita con el resto de las proteínas estudiadas en este trabajo, que con la OC-17. La influencia en el crecimiento de los cristales es menos notoria, y a concentraciones de proteína mayor sólo se forman maclas de cristales, estos resultados sugieren que la función de OC-17 es diferente en el proceso de formación del cascarón.

#### **6.4.4.1. Estudio del efecto de diferentes sustratos en el crecimiento de los cristales esféricos de calcita + 100 µg/mL de SCA-1**

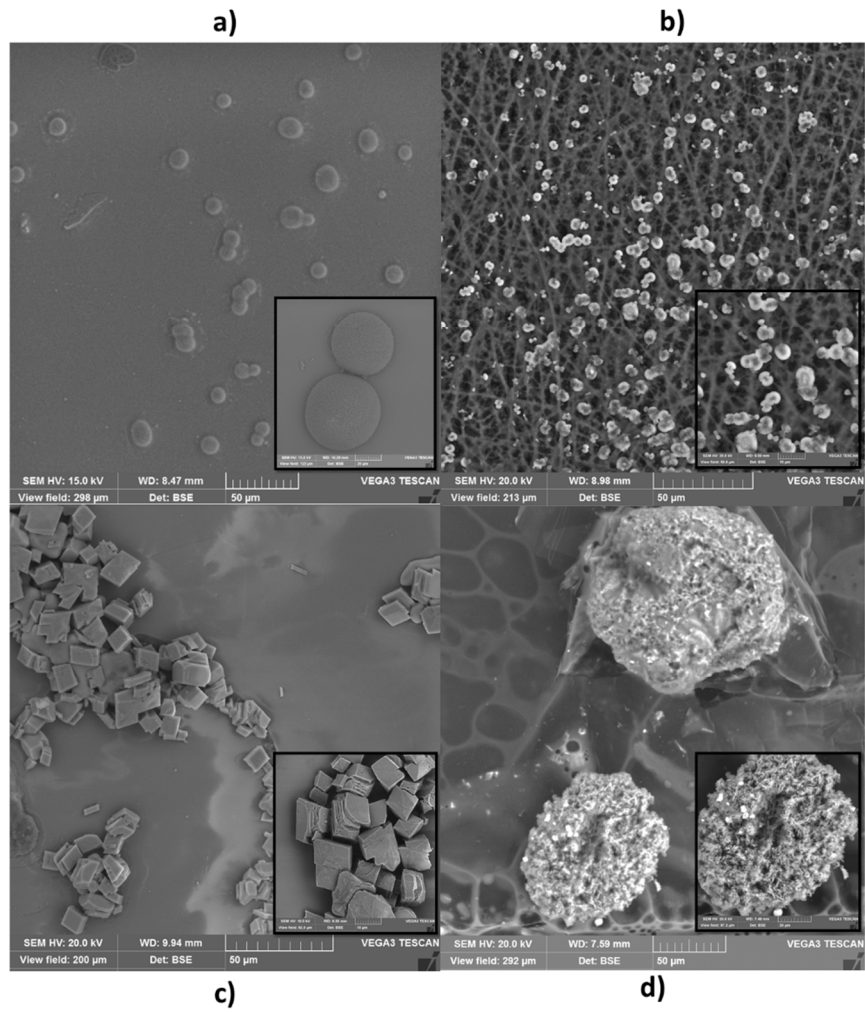
Para determinar sí el crecimiento de cristales esféricos estaba influenciado por el sustrato en el cual se realizó el experimento y se hicieron crecer nuevamente cristales de calcita en diferentes sustratos. En presencia de 100 µg/mL de SCA-1, que fue la proteína que tuvo mayor influencia en la formación de cristales esféricos. Los diferentes sustratos utilizados fueron vidrio siliconizado, (Figura 44a) membrana de huevo de gallina (Figura 44b), moscovita (Figura 44c) y grafito (Figura 44d).

Al analizar los resultados mediante SEM, se observó que el caso más peculiar fue en el que se utilizó la moscovita como sustrato, ya que se formaron octaedros truncados con vértices redondeados y maclas con formas escalonadas como se observó en el caso donde se agrega 10 µg/mL en la parte 6.4.4., esto puede deberse a que parte de la proteína fue absorbida por el material. En cuanto a los cristales crecidos sobre grafito, estos presentan formas redondeadas compuestos por nanopartículas irregulares que forman clústers resultantes de orientaciones al azar de los mismos, estos son de  $\approx 20 \mu\text{m}$ , mientras que los crecidos en vidrio siliconizado son de un tamaño de alrededor de  $10 \mu\text{m}$  y se observan en mayor cantidad (Figura 44a). Por otra parte el crecimiento sobre la membrana de huevo fue diferente, puesto que crecieron muchos cristales esféricos de un tamaño aproximado de  $2 \mu\text{m}$  y no se puede distinguir los nanocompuestos que lo forman. Se concluyó que el sustrato sí afecta el crecimiento de los cristales de calcita+proteína. No obstante, el vidrio es el material en que el los cristales crecieron de forma semejante a los crecidos sobre la membrana, que se consideraría el material idóneo pues es donde realmente comienza el proceso de cristalización.

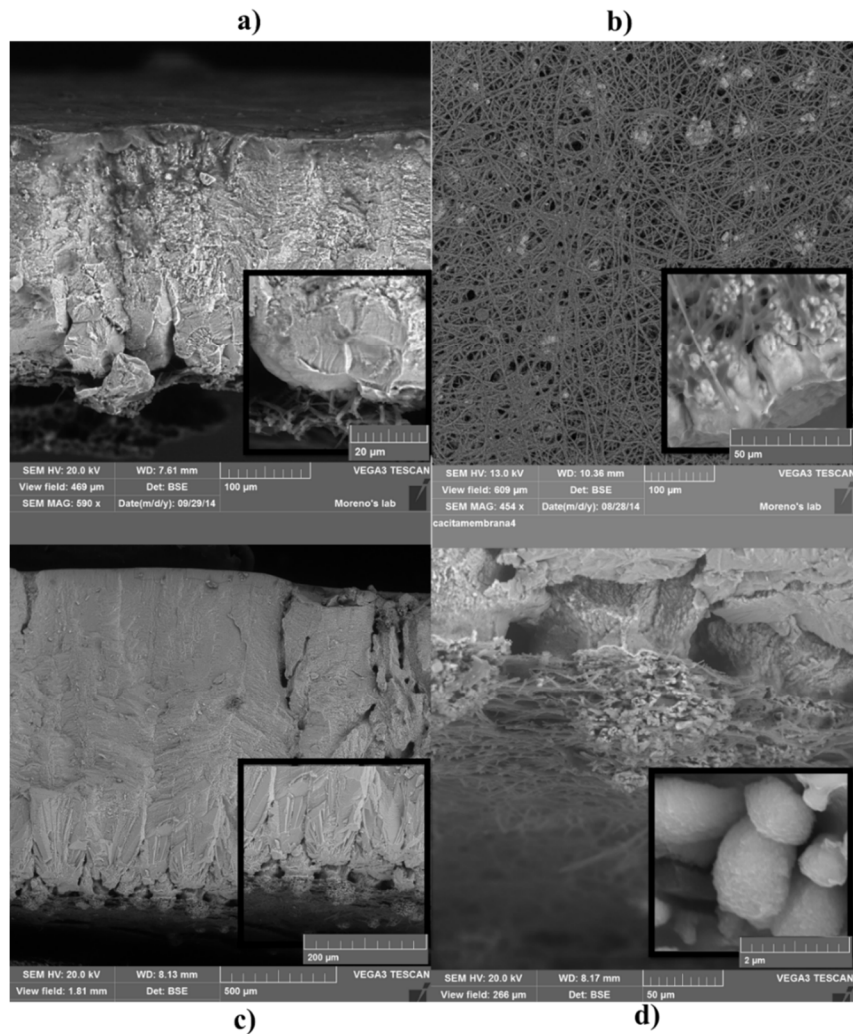
Estos experimentos sugieren que dentro del útero de la gallina, en el proceso de formación del cascarón de huevo, la calcita comienza a crecer y depositarse sobre la membrana como

crisales esféricos inducidos por las proteínas intraminerales, por ende estos son los sitios de iniciación o núcleos (Figura 45 a, b, c y d), y posteriormente existe una transformación a la forma más estable del carbonato de calcio (lakshminarayanan et al 2006), tal y como se observa en la Figura 45d (micrografía del cascarón de huevo de avestruz) sobre la membrana se formaron aglomerados redondeados de calcita y a medida que se va alejando de la membrana estos agregados se van transformando en capas de calcita romboédrica, es decir que en el útero se propician las condiciones de estabilidad termodinámica para que los agregados cristalinos den lugar a la calcita estable.





**Figura 44.** Micrografías electrónicas del crecimiento de cristales de calcita+SCA-1 100  $\mu\text{g/mL}$  en diferentes sustratos: a) Vidrio, b) Membrana de huevo de gallina, c) Moscovita, d) Grafito.



**Figura 45.** Micrografías de a) Cascarón de huevo de gallina b) Membrana de cascarón de huevo de gallina, c) Cascarón de huevo de avestruz d) Membrana y conos mamilares del huevo de avestruz.

#### 6.4.4.2. Estudios de la composición de los cristales de calcita por medio de espectroscopia Raman

Una vez obtenidos y analizados los cristales de calcita sin proteína y en presencia de las proteínas SCA-1 y -2 y DCA-1 y-2 a tres diferentes concentraciones, surgió la duda de si realmente estos cristales al cambiar su hábito cristalino seguían siendo cristales de calcita o era otro polimorfo del  $\text{CaCO}_3$  (vaterita o aragonita).

Para resolver esta duda se eligió la técnica de espectroscopia Raman, la cual es una técnica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural

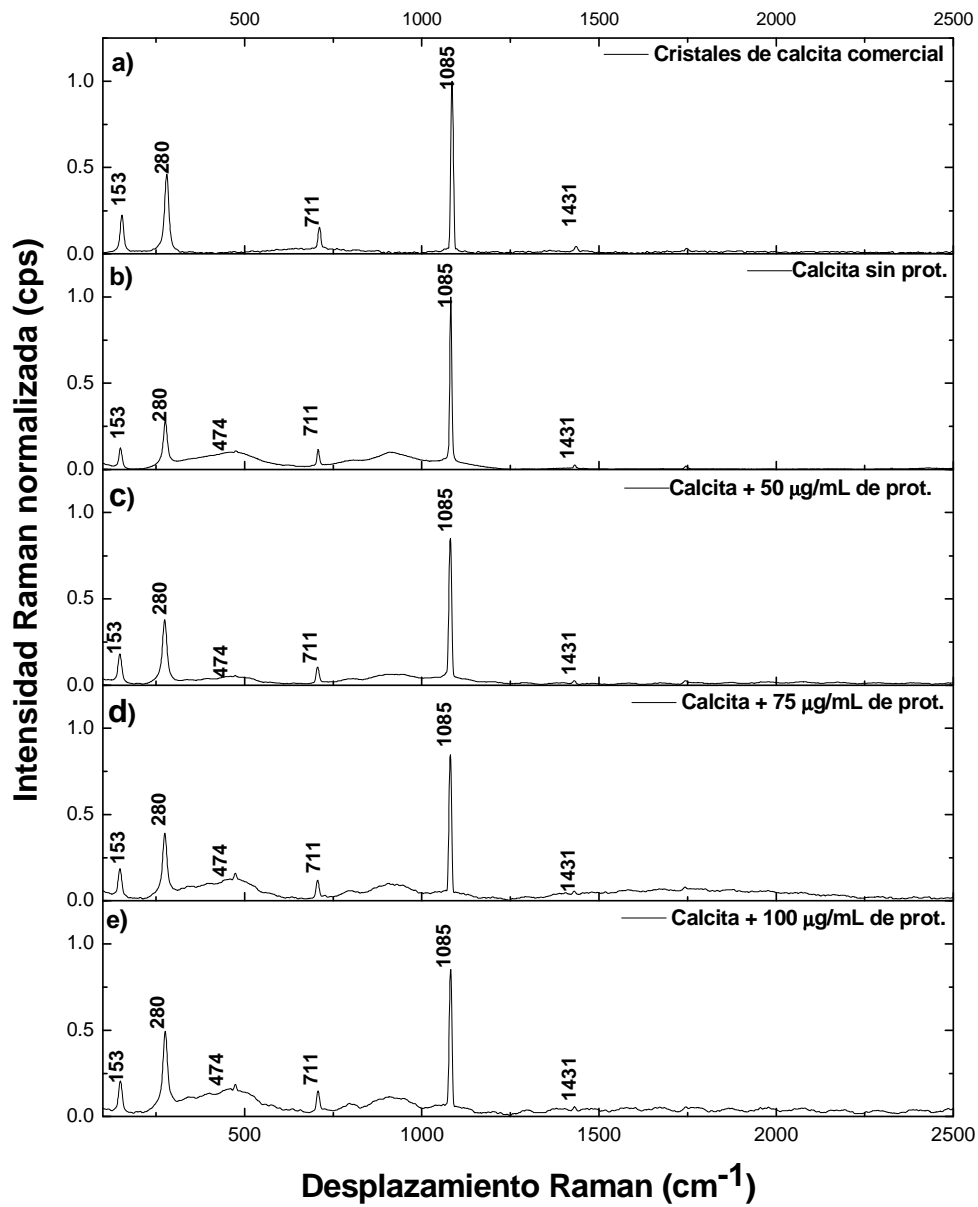
de un material. Tomando en cuenta que los cristales no son muy manipulables por su tamaño, esta técnica permitió el análisis directamente sobre los cristales, sin ningún tipo de preparación especial de los mismos, lo cual aseguro que no se diera ninguna alteración de la superficie.

En primera instancia se analizó un cristal de una muestra de calcita comercial como control (Figura 46a), posteriormente se analizaron los cristales de calcita que crecieron sin proteína (Figura 46b), y luego cada una de los cristales que crecieron a 50, 75 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de cada una de las proteínas estudiadas (Figura 46c, d y e). Al comparar cada uno de los espectros se observó que el material estudiado en todos los casos es el mismo, ya que las bandas características aparecen en las mismas frecuencias.

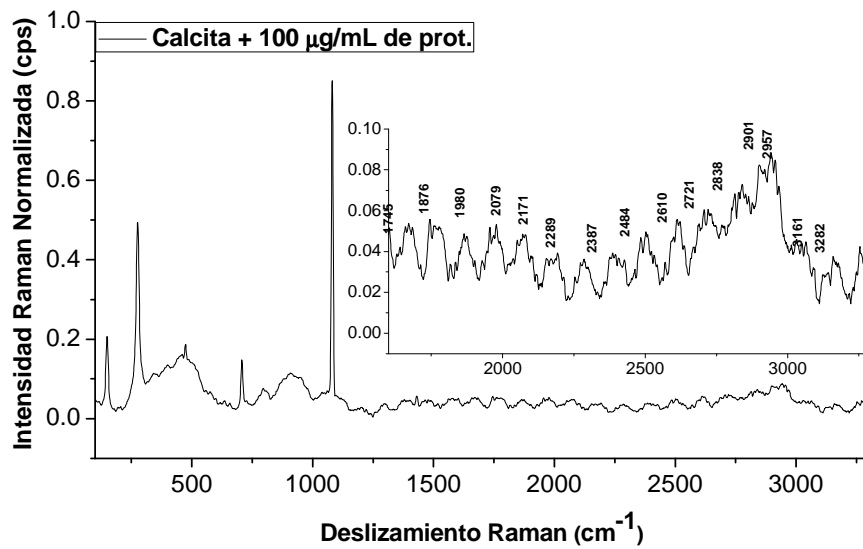
Para el cristal de calcita comercial las principales posiciones frecuenciales se encuentran a 1435, 1085, 711, 280, 159  $\text{cm}^{-1}$ , estas señales están relacionadas con vibraciones de  $\text{CO}_2$ -,  $\text{C}=\text{O}$  y  $\text{C}-\text{O}-\text{O}$  las cuales son esperadas para el  $\text{CaCO}_3$ . Sí se observa detalladamente cada uno de los espectros estas bandas se repiten en todos los casos a las mismas frecuencias, la única diferencia que existe entre el espectro de calcita comercial y el resto de los espectros es una banda a los 474  $\text{cm}^{-1}$  que pertenece a una vibración de  $\text{CO}$ , esta diferencia puede deberse a las condiciones experimentales en las que se sintetizaron los cristales. Como en todos los casos las bandas se repiten a las mismas frecuencias, se puede inferir que los cristales son el mismo polimorfo de  $\text{CaCO}_3$ . Estos resultados corroboran que los cristales que crecieron en presencia de una concentración mayor de proteína son cristales de calcita con una forma esférica.

Es de notarse que en los tres espectros de los cristales que crecieron en presencia de proteína se presentaron bandas adicionales en la zona que va desde los 1600 a 3300  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 46c, d y e), estas señales se acentúan a medida que la concentración de proteína aumenta. En la Figura 47a se hace un acercamiento para analizar a que vibraciones pertenecen y se puede observar que hay bandas a 1744, 1874, 1980, 2019, 2171, 2289 2387, 2484, 2610, 2721, 2838, 2901, 2957, 3162, 3282  $\text{cm}^{-1}$  estas bandas pertenecen a vibraciones relacionadas con  $\text{CO}_2$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $\text{C}=\text{C}$ ,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ,  $\text{C}-\text{N}$ ,  $\text{C}\equiv\text{O}$ ,  $\text{S}-\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}-\text{H}$ ,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{OH}$  y  $\text{NH}$  respectivamente. Todas estas vibraciones pertenecen a los constituyentes de la proteína (Stöberg et al., 2014), por lo tanto se prueba que la proteína esta absorbida en el cristal de calcita. Este resultado concuerda con estudios hechos por Lammie (2005),

donde se determina que existe proteína intercrystalina e intracrystalina en los cristales de calcita que conforman al cascarón de huevo.



**Figura 46.** Espectros Raman promedio de a) Calcita comercial, b) Cristales de calcita crecidos sin proteína, c) Cristales de calcita + 50  $\mu\text{g/mL}$  de proteína d) Cristales de calcita + 75  $\mu\text{g/mL}$  de proteína e) Cristales de calcita + 100  $\mu\text{g/mL}$  de proteína.



**Figura 47.** Espectros Raman promedio de los cristales de calcita + 100 µg/mL de proteína. El inserto corresponde a una ampliación de la región de 1600 a 3300 cm<sup>-1</sup>.

## 7. Conclusiones

Fue posible la separación y purificación de las proteínas intraminerales similar a lectina tipo C del cascarón de huevo de avestruz, ganso y emú utilizando métodos convencionales de extracción, cromatografía de exclusión molecular y fase reversa. Se determinó que el cascarón de huevo de ganso posee más de una proteína intramineral, de la cual se obtuvo la secuencia y se le dio el nombre de ANCA-2. Se corroboró por medio de dicroísmo circular que las proteínas permanecen plegadas una vez purificadas.

Las proteínas intraminerales de este estudio se comportan de una manera inestable, formando agregados con mucha facilidad, por ello, la cristalización de las mismas representó un reto. A pesar de lo anterior, fue posible cristalizar a una de estas proteínas (SCA-1) y determinar su estructura. Al comparar la estructura de la SCA-1 con la de la OC-17 se observan diferencias en la superficie de carga, que llevan a pensar que estas proteínas interactúan de diferente manera durante la formación del cascarón, y por lo que se sugiere que el mecanismo de formación del huevo en la gallina para formar es diferente que para las aves estudiadas en este trabajo.

Se determinó por medio de voltamperometría cíclica que las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2 tienen una alta selectividad por los iones carbonato, no obstante los experimentos de fluorescencia intrínseca sugieren que tienen una afinidad baja por los mismos y que la proteína tienen más de un sitio de unión para estos iones, lo que es posible debido a que las proteínas están en un medio de hipersaturación en el cual es necesaria la interacción con más de un ión al mismo tiempo.

En los ensayos de estabilidad efectuados por medio de dispersión dinámica de luz se observó que las proteínas, a pesar de mostrar una tendencia natural a agregarse, forman agregados de menor tamaño en medio de carbonato de sodio, es decir en este medio son más estables, y al estar mezcladas las dos proteínas de cada huevo, mejora la estabilidad por lo que se infiere que *in vivo* estas coexisten como componentes mayoritarios trabajando en conjunto para dar paso a la nucleación del  $\text{CaCO}_3$ .

Al realizar experimentos de cristalización *in vitro* de  $\text{CaCO}_3$ , se observaron cambios significativos en la morfología y hábito de los cristales de calcita debido a la presencia de las proteínas SCA-1, SCA-2, DCA-1 y DCA-2. Basándose en estos resultados se infiere que estas proteínas tienen como mecanismo la inducción y formación de agregados policristalinos de calcita selectivos que poseen las características necesarias para posteriormente, tras cambios fisicoquímicos en el sistema, desarrollar estructuras rígidas formadas por capas de calcita altamente ordenada como son los cascarones de huevo.

## 8. Referencias

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D*, 66 (2), 213-221.
- Addadi, L., Weiner, S. (1992). Control and design principles in biological mineralization. *Angew Chem Int Ed*, 31, 153-169.
- Ajikumar, P. K., Lakshminarayanan, R., Ong, B. T., Valiyaveetil, S., Kini, R. M. (2003). Eggshell Matrix Protein Mimics: Designer Peptides to Induce the Nucleation of Calcite Crystal Aggregates in Solution. *Biomacromolecules*, 4(5), 1321-1326.
- Arias, J. L., Cataldo, M., Fernandez, M. S., Kessi, E. (1997). Effect of beta-aminopropionitrile on eggshell formation. *British Poult. Sci.*, 38(4), 349-354.
- Arias, J. L., Fink, D. J., Xiao, S. Q., Heuer, A. H., Caplan, A. I. (1993). Biomineralization and Eggshells: Cell-Mediated Acellular Compartments of Mineralized Extracellular Matrix. W. J. Kwang, J. Jonathan (Eds.), *International Review of Cytology*. Academic Press, 145, 217-250.
- Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., Leslie, A. G. W. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. Sect. D*, 67(4), 271-281.
- Baumgartner, S., Brown, D. J., Salevsky, E., Leach, R. M. (1978). Copper Deficiency in the Laying Hen. *J. Nutrition*. 108(5), 804-811.
- Boeckmann, B., Bairoch, A., Apweiler, R., Blatter, M.C., Estreicher, A., Gasteiger, E., Schneider, M. (2003). The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL. *Nucleic Acids Research*. 31(1), 365-370.
- Boon, J. J. (2005). SEM studies of cross sectional cuts of biomineralized tissues from Gallus and Coturnix eggshells using an Argon ion millin CP-system. *Biomineralization: from paleontology to materials science: Proceedings of the ninth International Symposium on Biomineralization held in Pucón. Santiago, Chile Editorial Universitaria*, 1, 165-173.
- Bricogne, G., Vonrhein, C., Flensburg, C., Schiltz, M., Paciorek, W. (2003). Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Crystallogr. Sect. D*, 59(11), 2023-2030.
- Brionne, A., Nys, Y., Hennequet-Antier, C., Gautron, J. (2014). Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process. *BMC Genomics*, 15(1), 220.
- Canfield, R. E. (1963). The Amino Acid Sequence of Egg White Lysozyme. *J. Biol. Chem.*, 238(8), 2698-2707.
- Cummings RD, M. R. (2009). *C-type Lectins*. (Varki, C. R. A., Esko J. D., Freeze H. H., Stanley, P., Bertozzi C. R., Hart GW, Etzler, M. E. Ed. 2 ed.). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D*, 66(1), 12-21.
- Creel A., Howard F., (1993). *Prospects for the Analysis of High Molar Mass Polymers Using MALDI Mass Spectrometry*. Trends in Polymer Science, Reading (UK), Ed: Pure and Applied Macromolecular Chemistry Group. Macro Group UK. Vol. 1 Cap. 11.



- Chow, G. M., Gonzalves, K. (1996). *Nanotechnology. Molecularly designed materials*. American Chemical Society. USA.
- Chowdhury, S. D. (1990). Shell membrane system in relation to lathyrogen toxicity and copper deficiency. *Worlds Poult. Sci. J.*, 46, 153-169.
- Dauphin, Y., Cuif, J. P., Salomé, M., Susini, J., Williams, C. T. (2006). Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells. *Anal. Bioanalytical Chem.*, 386(6), 1761-1771.
- Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Richardson, D. C. (2007). MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 35 (2), 216.
- Dennis, J. E., Xiao, S.Q., Agarwal, M., Fink, D. J., Heuer, A. H., Caplan, A. I. (1996). Microstructure of matrix and mineral components of eggshells from White Leghorn chickens (*Gallus gallus*). *J. Morphology*, 228(3), 287-306.
- Dietzek, B., Cialla, D., Schmitt, M., Popp, J. (2011). Introduction to the Fundamentals of Raman Spectroscopy. T. Dieing, O. Hollricher, J. Toporski (Eds.), *Confocal Raman Microscopy*. Springer Berlin Heidelberg. 158, 21-42.
- Dominguez-Vera, J. M., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., Nys, Y. (2000). The Effect of Avian Uterine Fluid on the Growth Behavior of Calcite Crystals. *Poult. Sci.* 79(6), 901-907.
- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9(5), 585-590.
- Drickamer, K., Homans, S. (1993). *Carbohydrates and glycoconjugates; Current Opinion in Structural Biology*: London, UK.
- Eftink, M. R., Ghiron, C. A. (1976). Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry*, 15(3), 672-680.
- Eftink, M. R., Ghiron, C. A. (1981). Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal. Biochem.*, 114(2), 199-227.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. Cowtan, K. (2010). Experimental phasing and radiation damage. *Acta crystallogr. Sect. D.* 66, 486-501.
- Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallographica Section D*, 62(1), 72-82.
- Evans, P.R. (2011). An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics, *Acta Crystallogr. Sect. D*, 67, 282-292.
- Fraser, A. C., Bain, M. M., Solomon, S. E. (1998). Organic matrix morphology and distribution in the palisade layer of eggshells sampled at selected periods during lay. *British Poult. Sci.*, 39(2), 225-228.
- Freeman, C. L., John, H. H., David, Q., Rodger, P. M. (2011). Simulations of Ovocleidin-17 Binding to Calcite Surfaces and Its Implications for Eggshell Formation. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, 115(16), 8175-8183.
- Gabius, H.J., André, S., Jiménez-Barbero, J., Romero, A., Solís, D. (2011). From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochem. Sci.* 36(6), 298-313.
- Garcia-Ruiz, J. M., Rodriguez-Navarro, A. (1994). The mineral structure of the avian eggshell: a case of competitive crystal growth. In 7th International Symposium on Biomineralization. (Allemand, D. & Cuif, J-P., eds) pp.85, Bulletin de l'Institut océanographique, Numéro spécial 14, 1. Monaco.
- Gasteiger, E., Jung, E., Bairoch, A. (2001). SWISS-PROT: connecting biomolecular knowledge via a protein database. *Curr. issues mol. biol.*, 3(3), 47-55.

- Gautron, J., Hincke, M., Nys, Y. (1997). Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connect Tissue Res.* 36(3), 195-210.
- Gautron, J.; Hincke, M. T.; Panhéleux, M.; Garcia-Ruiz, J. M.; Boldicke, T.; Nys, Y. (2001b). Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer, *Connective Tissue Research.* 42 (4): 255-267
- Gautron, J., Hincke, M. T., Mann, K., Panhéleux, M., Bain, M., McKee, M. D., Nys, Y. (2001). Ovocalyxin-32, a Novel Chicken Eggshell Matrix Protein: Isolation, Amino Acid Sequencing, Cloning and Immunocytochemical Localization. *J. Biol. Chem.* 276(42), 39243-39252.
- Gautron, J., Murayama, E., Vignal, A., Morisson, M., McKee, M., Rehault, S., Hincke, M. (2007). Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and plunc family proteins. *J. Biol. Chem.* 282(8), 5273 - 5286.
- Gautron, J., Nys, Y. (2007a). Eggshell matrix proteins. *Bioactive egg compounds*, 103 - 108.
- Gautron, J., Nys, Y. (2007b). Function of eggshell matrix proteins. *Bioactive egg compounds*. 109 - 115.
- Gautron, J., Nys, Y. (2007). *Function of eggshell matrix proteins*. R. A. R., López-Fandiño, M.; Rüdiger Schade, R. Ed. Berlin, Heidelberg,.
- Gautron, J. H., Hincke, M. T.; Nys, Y. (1997). Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connect. Tissue Research.* 36, 195-210.
- Hennighausen, L. G., Sippel, A. E. (1982). Mouse whey acidic protein is a novel member of the family of 'four-disulfide core' proteins. *Nucleic Acids Research*, 10(8), 2677-2684.
- Hernández-Hernández, A., Gómez-Morales, J., Rodríguez-Navarro, A. B., Gautron, J., Nys, Y., García-Ruiz, J. M. (2008). Identification of Some Active Proteins in the Process of Hen Eggshell Formation. *Cryst. Growth Des.* 8(12), 4330-4339.
- Hernández-Hernández, A., Rodríguez-Navarro, A. B., Gómez-Morales, J., Jiménez-Lopez, C., Nys, Y., García-Ruiz, J. M. (2008a). Influence of Model Globular Proteins with Different Isoelectric Points on the Precipitation of Calcium Carbonate. *Crystal Growth Des.* 8(5), 1495-1502.
- Hincke, M., Gautron, J., Tsang, C., McKee, M., Nys, Y. (1999). Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116. *J. Biol. Chem.*, 274(46), 32915 - 32923.
- Hincke, M., Nys, Y., Gautron, J. (2010). The role of matrix proteins in eggshell formation. *J. Poul. Sci.*, 47(3), 208 - 219.
- Hincke, M., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A., McKee, M. (2012). The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci.*, 17, 1266-1280.
- Hincke, M. T., Gautron, J., Tsang, C. P. W., McKee, M. D., Nys, Y. (1999). Molecular Cloning and Ultrastructural Localization of the Core Protein of an Eggshell Matrix Proteoglycan, Ovocleidin-116. *J. Biol. Chem.*, 274(46), 32915-32923.
- Hincke, M. T., Tsang, C. P. W., Courtney, M., Hill, V., Narbaitz, R. (1995). Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17). *Calcified Tissue International*, 56(6), 578-583.
- Hincke, M. T. N., Y.; Gautron, J.; Mann, K.; Rodriguez-Navarro, A. B.; Mckee, M. D. (2012). The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci*, 17, 1266-1280.

- Iovanna, J. L., J. C. Dagorn. (2005). *The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to short N-terminal peptide*, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1723 (1-3): 8-18.
- Julian F.V.Vincent.(2014) Biomimetic materials. Elvin karana ed. *Fundamentals of materials and design*. 17, 235-246.
- Jimenez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, A., Dominguez-Vera, J. M., & Garcia-Ruiz, J. M. (2003). Influence of lysozyme on the precipitation of calcium carbonate: a kinetic and morphologic study. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 67(9), 1667-1676.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallographica Section D*, 66(2), 125-132.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157(1), 105-132.
- Kantardjieff, K.A., Rupp, B. (2004). Protein isoelectric point as a predictor for increased crystallization screening efficiency. *Bioinformatics*. 20, 2162–2168.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lammie, D., Bain, M. M., Wess, T. J. (2005). Microfocus X-ray scattering Investigations of eggshell nanotexture. *J. Synchrotron Rad.* 12, 721-726.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York.
- Lakshminarayanan, R., Joseph, J. S., Kini, R. M., Valiyaveetil, S. (2005). Structure–Function Relationship of Avian Eggshell Matrix Proteins: A Comparative Study of Two Major Eggshell Matrix Proteins, Ansocalcin and OC-17. *Biomacromolecules*, 6(2), 741-751.
- Lakshminarayanan, R., Kini, R. M., Valiyaveetil, S. (2002). Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix. *PNAS*. 99(8), 5155-5159.
- Lakshminarayanan, R., Loh, X. J., Gayathri, S., Sindhu, S., Banerjee, Y., Kini, R. M., Valiyaveetil, S. (2006). Formation of Transient Amorphous Calcium Carbonate Precursor in Quail Eggshell Mineralization: An In Vitro Study. *Biomacromolecules*, 7(11), 3202-3209.
- Lakshminarayanan, R., Valiyaveetil, S., Rao, V. S., & Kini, R. M. (2003). Purification, Characterization, and in Vitro Mineralization Studies of a Novel Goose Eggshell Matrix Protein, Ansocalcin. *J. Biol. Chem.* 278(5), 2928-2936.
- Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S., Perrakis, A. (2008). Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat Protoc*, 3( 1171-1179.).
- Leach, R. M. (1982). Biochemistry of the Organic Matrix of the Eggshell. *Poult. Sci.*, 61(10), 2040-2047.
- Lippman, F. (1973). Sedimentary Carbonate Minerals. En: *Mineral, Rocks and Inorganic Materials*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 228.
- Lowenstam, H. A. (1981). Minerals formed by organisms. *Science* 211.
- Mann, K. (2004). Identification of the major proteins of the organic matrix of emu (*Dromaius novaehollandiae*) and rhea (*Rhea americana*) eggshell calcified layer. *British Poult. Sci.*, 45(4), 483-490.
- Mann, K., Hincke, M., & Nys, Y. (2002). Isolation of ovocleidin-116 from chicken eggshells, correction of its amino acid sequence and identification of disulfide bonds and glycosylated Asn. *Matrix Biol*, 21(5), 383 - 387.
- Mann, K., Macek, B., Olsen, J. (2006). Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. *Proteomics*, 6(13), 3801 - 3810.

- Mann, K., Siedler, F. (2004). Ostrich (*Struthio camelus*) eggshell matrix contains two different C-type lectin-like proteins. Isolation, amino acid sequence, and posttranslational modifications. *BBA - Proteins and Proteomics*, 1696(1), 41-50.
- Mann, K., Siedler, F. (2006). Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 143(2), 160-170.
- Mann, K., Siedler, F. (1999). The amino acid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer. *Biochem. Mol. Biol. International.*, 47(6), 997-1007.
- Mann, S. (1983). Mineralization in biological systems *Inorganic Elements in Biochemistry*. Springer Berlin Heidelberg. 54, 125-174).
- Mann, S. (1988). Molecular recognition in biomineralization. *Nature*, 332(6160), 119-124.
- Mann, S. (2001). *Biomineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford University Press.
- Marín-García, L., Frontana-Urbe, B. A., Reyes-Grajeda, J. P., Stojanoff, V., Serrano-Posada, H. J., Moreno, A. (2008). Chemical Recognition of Carbonate Anions by Proteins Involved in Biomineralization Processes and Their Influence on Calcite Crystal Growth. *Crystal Growth Des.*, 8(4), 1340-1345.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Wiley-Blackwell*. 40, 658-674.
- McReynolds, L., O'Malley, B. W., Nisbet, A. D., Fothergill, J. E., Givol, D., Fields, S., Brownlee, G. G. (1978). Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature*, 273(5665), 723-728.
- Miksik, I., Eckhardt, A., Sedlakova, P., Mikulikova, K. (2007). Proteins of insoluble matrix of Avian (*Gallus Gallus*) eggshell. *Connect. Tissue Res.* 48(1), 1 - 8.
- Mikšík, I., Holáň, V., Deyl, Z. (1996). Avian eggshell pigments and their variability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem. Mol. Biol.*, 113(3), 607-612.
- Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D.* 67(4), 355-367.
- Ness, S. R., de Graaff, R. A. G., Abrahams, J. P. and Pannu, N. S. (2004). Crank, Crunch2 and Bp3: A platform for rapid automated structure determination. *Structure*, 12, 1753-1761, 12, 1753-1761.
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J., Hincke, M. (2004). Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *C. R. Palevol*, 3(6-7), 549 - 562.
- Nys, Y., Gautron, J., McKee, M. D., Garcia-Ruiz, J. M., Hincke, M. T. (2001). Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens. *World's Poult. Sci. J.* 57(04), 401-413.
- Nys, Y., Guyot, N. (2011). Egg formation and chemistry. *Improving the Safety and Quality of Eggs and egg Products*, 83 - 132.
- Nys, Y., Hincke, M., Arias, J., Garcia-Ruiz, J., Solomon, S. (1999). Avian eggshell mineralization. *Avian Poult. Biol. Rev.* 10(3), 143-166.
- Nys, Y., Zawadzki, J., Gautron, J., Mills, A. D. (1991). Whitening of Brown-Shelled Eggs: Mineral Composition of Uterine Fluid and Rate of Protoporphyrin Deposition. *Poult. Sci.* 70(5), 1236-1245.
- Pines, M., Knopov, V., Bar, A. (1995). Involvement of osteopontin in egg shell formation in the laying chicken. *Matrix Biol.* 14(9), 765 - 771.

- Peter D. S., S. Radaev, M. Kattah. 2002 Generating isomorphous heavy-atom derivatives by a quick-soak method. *Acta Crystal. Sec. D Biological Crystallography*. 58, 1092-1098.
- Reyes-Grajeda, J., Jauregui-Zuniga, D., Rodriguez-Romero, A., Hernandez-Santoyo, A., Bolanos-Garcia, V. M., Moreno, A (2002). Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Ovocleidin-17 A Major Protein of the Gallus Gallus Eggshell Calcified Layer. *Prot. and Pep. Letts*. 9(3), 253-257.
- Reyes-Grajeda, J. P., A. Moreno, A. Romero (2004). Crystal Structure of Ovocleidin-17, a Major Protein of the Calcified Gallus gallus Eggshell: Implications in the Calcite Mineral Growth Pattern. *J. Biol. Chem*. 279(39): 40876-40881.
- Reyes-Grajeda, J. P., Marin-Garcia, L., Stojanoff, V., Moreno, A. (2007). Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of struthiocalcin-1 from ostrich (*Struthio camelus*) eggshell. *Acta Crystallogr. Sect. F*, 63(11), 987-989.
- Roberston, W. G. (1982). *The Solubility Concept*. G. H. Nancollas Ed.
- Robinson, D. S., King, N. R. (1963). Carbonic Anhydrase and Formation of the Hen's Egg Shell. *Nature*, 199(4892), 497-498.
- Rodriguez-Navarro, A., Kalin, O., Nys, Y., Garcia-Ruiz, J. M. (2002). Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *British Poult. Sci.*, 43(3), 395-403.
- Rodriguez-Navarro, A., Messier, C., Jimenez-Lopez, C., Garcia-Ruiz, J. M. (2000). *Importance of electrostatic interactions between proteins and calcite surfaces*. P. Calvert, R. Levy, T. Kokubo, C. Scheid. Eds.
- Rost, B., Valencia, A. (1996). Pitfalls of protein sequence analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, (7):457-461.
- Rose, M. H., Hincke, M. (2009). Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix proteins. *Cell. and Mol. Life Sci*. 66(16), 2707-2719.
- Ruiz-Arellano, R. R., Serrano-Posada, H. J., Marín-García, M. L., Frontana-Uribeand, B. A., Moreno, A. (2011). *Chem. Biosensors Based on Proteins Involved in Biomineralization Processes*. P. A. Serra Ed. Vol. 1. Rijeka, Croatia.
- Sánchez-Puig, N., Guerra-Flores, E., López-Sánchez, F., Juárez-Espinoza, P. A., Ruiz-Arellano, R., González-Muñoz, R., Moreno, A. (2012). Controlling the morphology of silica-carbonate biomorphs using proteins involved in biomineralization. *J. Materials Science*, 47(6), 2943-2950.
- Sharp, R. M., Silyn-Roberts, H. Development of preferred orientation in the eggshell of the domestic fowl. *Biophysical J.*, 46(2), 175-179.
- Sheldrick, G. (2010). Experimental phasing with SHELXC/D/E: combining chain tracing with density modification. *Acta Crystallographica Section D*, 66(4), 479-485.
- Simons, P. C. M. (1971). Ultrastructure of the hen eggshell and its physiological interpretation. *Centre for Agricultural Pub. and Documentation (Wageningen)*.
- Sjöberg, B., Foley, S., Cardey, B., Enescu, M. (2014). An experimental and theoretical study of the amino acid side chain Raman bands in proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectroscopy*. 128(0), 300-311.
- Sreerama, N., Venyaminov, S. Y. U., Woody, R. W. (1999). Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Science*. 8(2), 370-380.
- Stemberger, B. H., Mueller, W. J., Leach, R. M. (1977). Microscopic Study of the Initial Stages of Egg Shell Calcification. *Poult. Sci*. 56(2), 537-543.
- Taylor, G. (2010). Introduction to phasing. *Acta Crystallogr. Sect. D*. 66(4), 325-338.

- Tullet, S. (1987). Egg shell formation and quality. *Egg quality current problems and recent advances*, 123 - 146.
- Vagin, A., Teplyakov, A. (2010). Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. Sect. D*, 66(1), 22-25.
- Weis, A., Perry, A. (1967). The Phosphoprotein of the Dentin Matrix. *Biochemistry*, 6(8), 2409-2416.
- Verjouski-Almeida, S., Silva, J. C. (1980). Different Degrees of Cooperativity of the Ca<sup>2+</sup> Induced Changes in Fluorescence Intensity of Solubilized Sarcoplasmic Reticulum ATPase. *J. Biochem. Chem.* 256 (6), 2940-2944.
- Weiner, S. (2008). Biomineralization: a structural perspective. *J. Struct. Biol.* 163(3), 229 - 234.
- Weiner, S., Addadi, L. (2011). Crystallization pathways in biomineralization. *Ann. Rev. Mat. Research.* 41, 21 - 40.
- Weiner, S., Dove, P. M. (2003). An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 1-29.
- Weiner, S., Traub, W., Parker, S. B. (1984). Macromolecules in Mollusc Shells and Their Functions in Biomineralization [and Discussion. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 304(1121), 425-434.
- Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S. (2002). Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *J. Experimental Zoology*, 293(5), 478-491.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. Sect. D*, 67(4), 235-242.
- Woody, R. W. (1995). Circular dichroism. S. Kenneth (Ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press. 246, 34-71.
- Zhao, R., Xu, G.-Y., Liu, Z.-Z., Li, J.-Y., Yang, N. (2006). A study on eggshell pigmentation: biliverdin in blue-shelled chickens. *Poul. Sci.* 85(3), 546-549.

## **9. Anexos**

### **9.1. Sobreexpresión de SCA-1 y SCA-2**

#### **9.1.2. Pasos a seguir en la sobreexpresión de las proteínas de interés:**

##### **9.1.2.1. Clonaje del gen de interés en los vectores de expresión seleccionados**

- Amplificación/Aislamiento del gen de interés y subclonaje dentro de la cepa bacteriana (*E.coli* en células de DH10B y DH5 $\alpha$ ).
- Verificación de la autenticidad del gen subclonado por medio de geles de agarosa.
- Corte e introducción en los vectores de expresión elegidos.

##### **9.1.2.2. Generación e identificación de los clones de expresión positivos**

- Transformación de las construcciones recombinantes dentro de una línea de expresión bacteriana de alta eficiencia.
- Inducción a pequeña escala para la sobreexpresión de SCA-1 y SCA-2 con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.5mM.
- Monitoreo de la cinética de reacción tomando alícuotas a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6,8 y 12, 18, 20, y 24 horas).
- Recuperación de las biomásas por centrifugación.
- Disolución de las biomásas en buffer de muestra [50 mM Tris-HCl, pH 8, 300 mM de NaCl y 1mM de PMSF (inhibidor de proteasas)].
- Rompimiento de las células por medio de un sonicador.
- Evaluación de la expresión de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE.

##### **9.1.2.3. Expresión de la proteína a gran escala y purificación**

- Crecimiento a gran escala de las líneas celulares que sobre-expresan correctamente la proteína de interés.
- Purificación de la proteína mediante columna de afinidad.
- Análisis de la proteína purificada mediante SDS-PAGE, cromatografía de permeación en gel y dispersión dinámica de luz.

- Replegamiento de las proteínas recombinantes que se fueron a cuerpos de inclusión.

### 9.1.3. Resultados:

#### Producción de proteínas recombinantes SCA-1 y SCA-2

Debido a la dificultad para la obtención de las proteínas SCA-1 y SCA-2 de la fuente natural, se abordó la producción de proteínas recombinantes SCA-1 y SCA-2 para obtener una cantidad mayor que en la extracción de su fuente natural. Para ello, se siguieron los pasos descritos en la sección 9.1.1. y 9.1.2. Se probaron los vectores de la tabla 11.

**Tabla 11.** Vectores utilizados para la expresión de las proteínas SCA-1 y SCA-2.

Vector	Proteína de fusión	Detección de secuencia y purificación	Tipo de plásmido
<b>pET 32 a</b>	Tioredoxina	Tioredoxina (N-term); His (interno y C-term)	Bacteriano
<b>pET29 lip</b>	Dominio dihidrolipoil acetil-transferasa	His (C-term), S-tag (N-term)	Bacteriano
<b>pMAL</b>	Maltose-binding protein	Maltose-binding protein, MBP (N-term)	Bacteriano
<b>pPICZ<math>\alpha</math>*</b>	Peptido señal del Factor $\alpha$	Myc (C-term), His (C-term)	<i>Pichia pastoris</i>
<b>pET28 MBP</b>	Maltose-binding protein	MBP (C-term), His (N-term)	Bacteriano
<b>pET33 GST</b>	Glutathione S-Transferase	GST (N-term)	Bacteriano

\*secreción al medio de cultivo.



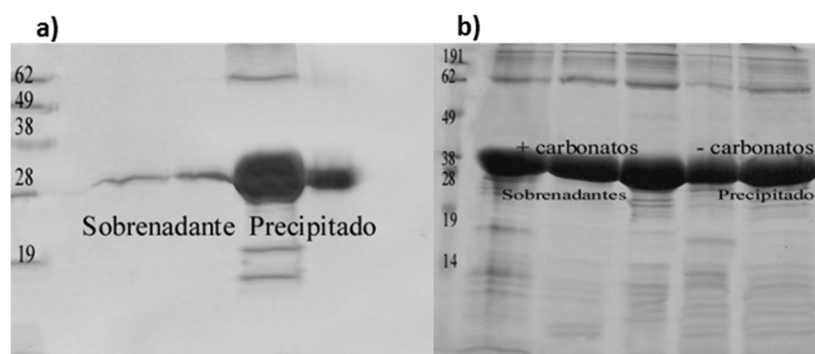
**Tabla 12.** Resumen de resultados obtenidos tras sobreexpresar las proteínas SCA-1 y SCA-2.

Construcciones	Expresión	Purificación
SCA-1 Tioredoxina	Cuerpos de inclusión	°Replegamiento
SCA-2 Tioredoxina	Cuerpos de inclusión	°Replegamiento
SCA-1 Dominio dihidrolipoil acetil transferasa	Soluble en poca cantidad	Cromatografía de afinidad (Níquel), no retuvo en la columna.
SCA-2 Dominio dihidrolipoil acetil- transferasa	Cuerpos de inclusión	Replegamiento
SCA-1 MBP-His	Soluble, alta cantidad	Cromatografía de afinidad (His tag Níquel), corto satisfactoriamente, no se pudo separar por fuerte interacción proteína-proteína.
SCA-2 MBP-His	Soluble, alta cantidad	Cromatografía de afinidad (His tag Níquel), corto satisfactoriamente, no se pudo separar por fuerte interacción proteína-proteína.
SCA-1 MBP	Soluble, Baja cantidad	Cromatografía de afinidad (columna de amilosa), no se separó satisfactoriamente.
SCA-2 MBP	Cuerpos de inclusión	-
SCA-1 GST	Cuerpos de inclusión	-
SCA-2 GST	Soluble	Cromatografía de afinidad (His tag Níquel), No se retuvo en la columna.

° Se procedió a replegar la construcción tioredoxina-SCA-2, para lo cual se diseñaron 4 métodos de replegamiento, los cuales tienen un tronco en común, comenzando con la solubilización de la proteína con agentes caotrópicos (1% de tritón, Urea 8 M) y luego la desnaturalización con agente reductor de puentes disulfuro ( $\beta$ -mercaptoetanol-50mM). En la última etapa radica la diferencia de los 4 métodos utilizados que se describen a continuación:

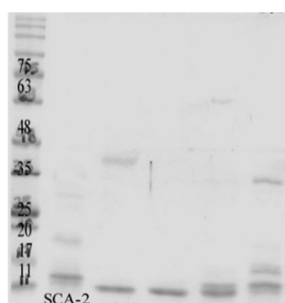
1. Disolución de la proteína agregada gota a gota a 45 mL de buffer + par redox (cisteína/cistina) + 70 mM de carbonato de sodio.
2. Dilución de la proteína agregando gota a gota el buffer + par redox + carbonato de sodio, hasta llegar a un volumen de 50 mL.
3. Diálisis escalonada de la proteína contra buffer + par redox, aumentando la concentración del par redox progresivamente.
4. Diálisis escalonada de la proteína contra buffer + par redox y 70 mM de carbonato de sodio.

Los dos primeros métodos de replegamiento fueron infructuosos, puesto que la proteína se precipitó inmediatamente después de la adición de la solución amortiguadora de replegamiento (Figura 49a). Sin embargo, con los dos últimos métodos se obtuvo a la proteína en forma soluble, pero al eliminar los carbonatos presentes en la solución amortiguadora de replegamiento mediante una diálisis esta precipitó (Figura 49b).

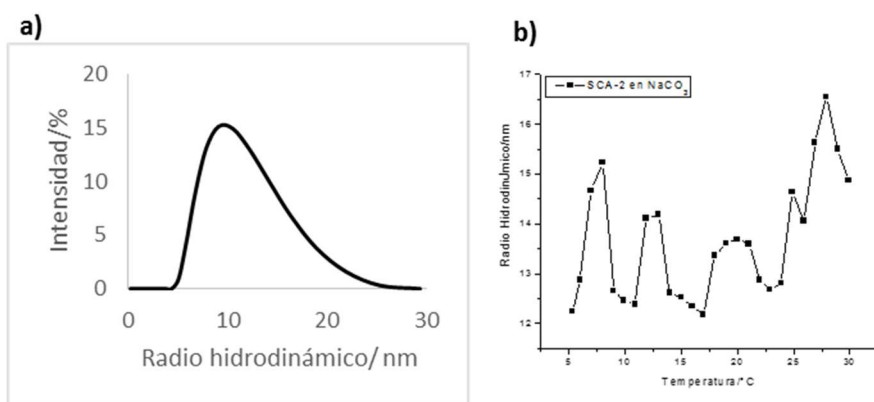


**Figura 48.** Geles de SDS-PAGE a) replegamiento por medio de diálisis escalonada de SCA-2 + tioredoxina sobrenadante y precipitado. b) Gel comparativo de los sobrenadantes con carbonatos y los sobrenadantes sin carbonatos en el replegamiento de la SCA-1-tioredoxina.

Posteriormente, la proteína plegada en solución de carbonato de sodio se cortó con enteroquinasa (se probaron diferentes concentraciones de la enzima de corte 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 mM) y en el último carril del gel en la Figura 50, se observa que corta con a una concentración baja de dicha enzima. Como criterio de prueba para analizar el comportamiento de la proteína, ya separada de la proteína de fusión, en presencia de iones carbonato se hicieron ensayos con DLS y se observó (Figura 51a) que la proteína presenta un Rh alrededor de los 10 nm, valor similar al que se observó en pruebas anteriores (Ruiz-Arellano et al., 2011) de la proteína extraída de su fuente natural en presencia de carbonato de sodio a diferentes temperaturas (ver Figura 51b).

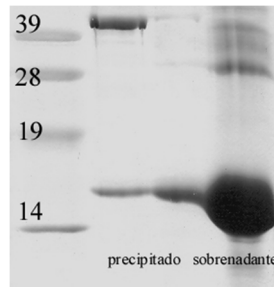


**Figura 49.** Geles de corte de la SCA-2 replegada con enteroquinasa a diferentes concentraciones.



**Figura 50.** Grafico del Rh vs la intensidad de la proteína replegada con diálisis escalonada en presencia de carbonatos. a) Grafico de la variación del Rh con la temperatura de SCA-2 purificada de la fuente natural en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 70mM.

El gel de la Figura 52 muestra a la proteína separada de la proteína de fusión y soluble en presencia de carbonato, pero a medida que pasan pocas horas de la proteína se va precipitando. Debido a que no fue exitosa la sobreexpresión de estas proteínas se decidió purificar a la SCA-1 y SCA-2 de su fuente natural basando en el protocolo seguido por Mann & Siedler (2004).



**Figura 51.** Gel SCA-2 replegada en presencia de carbonato, precipitado y sobrenadante.

## **9.2. Predicción de la cristalización de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2**

Se utilizaron diferente software que permiten hacer una predicción de la dificultad de obtención de un cristal de las proteínas (Sánchez-Puig *et al.*, 2012), con el objetivo de tener una idea de la dificultad de la cristalización y rango de pH en el que es más probable obtener cristales. Estos softwares utilizan algoritmos que se basan en las características de las proteínas tales como la secuencia, punto isoeléctrico, promedio de la hidrofobicidad, estabilidad, existencia de azas flexibles.

	SCA-1	SCCA-2	ANCA-1	DCA-1	DCA-2
<i>XTalPred</i>	<b>4-difícil</b>	<b>4-difícil</b>	<b>4-difícil</b>	<b>4-difícil</b>	<b>5-muy difícil</b>
<i>1-4</i>					
<i>CRYSTALP2</i>	<b>Cristalizable 50.8%</b>	<b>Cristalizable 53.0%</b>	<b>Non-Cristalizable</b>	<b>Cristalizable 40 %</b>	<b>Cristalizable 50%</b>
<i>0-100%</i>			<b>39%</b>		
<i>OB-Score</i>	<b>8.65</b>	<b>4.88</b>	<b>4.27</b>	<b>5.83</b>	<b>6.13</b>
<i>(-5)-(10)</i>					
<i>PXS</i> <i>SERVER</i> Probabilidad de obtener una estructura cristalográfica (escala de 0-1)	<b>0.27</b>	<b>0.29</b>	<b>0.25</b>	<b>0.25</b>	<b>0.3</b>
<i>Cryspred pI</i>	<b>4.5-6.5</b>	<b>4.5-6.5</b>	<b>6.5-8.5</b>	<b>5.5-7.5</b>	<b>5.5-7.5</b>
<i>Crystallitation</i> <i>pH</i> <i>predictor</i>					

**9.3.** Tabla 13. Resumen de parámetros de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1, y DCA-2.

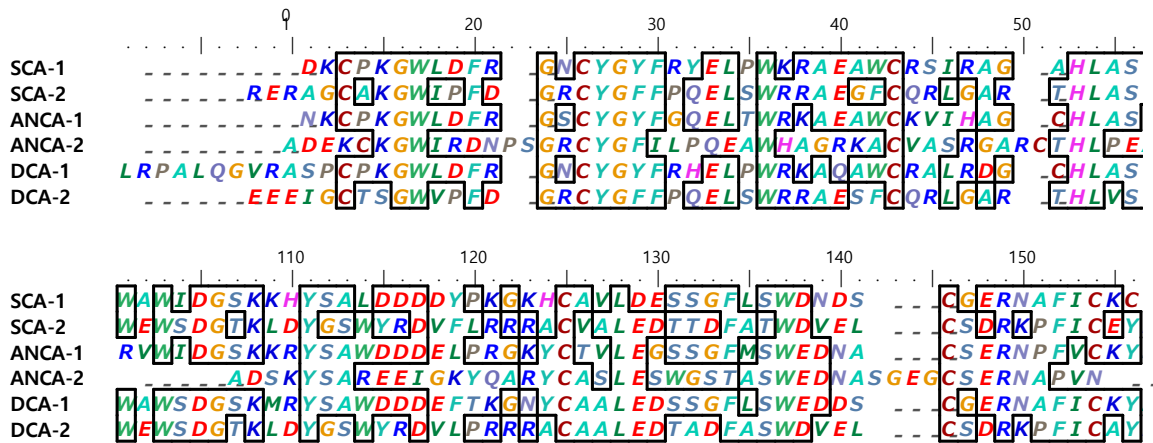
	SCA-1	SCA-2	ANCA-1	ANCA-2	DCA-1	DCA-2
MW Da	15343.2	16834.1	15347.2	14378.7	16365.6	16645.6
Número de aminoácidos	132	142	132	130	142	142
Puentes Disulfuro	3 3-14 31-128 103-120	3 6-17 34-138 113-130			3 13-24 41-138 113-130	3 6-17 34-13 113-130
Serinas Fosforiladas	-	3 62 66 68				2 62 68
Residuos cargados positivamente	17	19	18	18	19	16
Residuos Cargados Negativamente	21	24	18	21	20	24
pI	5.96	5.41	7.14	5.65	6.47	4.87
ε <sub>280</sub>	3.473	2.790	3.377	2.353	3.147	2.809

#### **9.4. Alineamiento de las secuencias de las proteínas SCA-1, SCA-2, ANCA-1, ANCA-2, DCA-1 y DCA-2**

A continuación se realizó un alineamiento de secuencias, con el fin de representar y comparar las estructuras primarias de las proteínas analizadas y de esta manera poder resaltar las zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas.

En la Figura 52 están señalados los aminoácidos conservados y se pueden ver las diferencias de las proteínas en algunas sesiones, nuevamente la ANCA-2 es la proteína que más diferencias presenta. Considerando que hasta ahora no se sabía de su existencia, esta proteína puede ser una proteína que se encuentre en los huevos que se estudiaron y no en todos los huevos de ganso, ya que la alimentación y los agentes externos de crianza de estas aves son diferentes.

Como estas proteínas comparten un ancestro común, las no coincidencias pueden interpretarse como mutaciones puntuales y los huecos como *indels* (mutaciones de inserción) introducidas en uno o ambos linajes en el tiempo que transcurrió desde que divergieron. En el alineamiento el grado de similitud entre los aminoácidos que ocupan una posición concreta en la secuencia puede interpretarse como una medida aproximada de conservación o secuencia motivo, entre linajes.



**Figura 52.** Alineamiento de las proteínas estudiadas señalando los sitios conservados, las diferencias y los huecos.

## 9.5. Agentes Precipitantes utilizados en la pruebas de cristalización de las proteínas estudiadas

Formulation Sheet

### JBScreen Classic 1

PEG 400 to 3000 based

▶▶ JENA BIOSCIENCE

Cat.-No.: CS-101L

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	15 % w/v PEG 400	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	100 mM Calcium Chloride
A 2	15 % w/v PEG 400	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
A 3	15 % w/v PEG 400	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Magnesium Chloride
A 4	15 % w/v PEG 400	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Sodium Citrate
A 5	25 % w/v PEG 400	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	100 mM Magnesium Chloride
A 6	25 % w/v PEG 400	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Lithium Sulfate
B 1	28 % w/v PEG 400	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Calcium Chloride
B 2	30 % w/v PEG 400	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	100 mM Calcium Chloride
B 3	30 % w/v PEG 400	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	100 mM Sodium Acetate
B 4	30 % w/v PEG 400	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	100 mM Magnesium Chloride
B 5	30 % w/v PEG 400	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Magnesium Chloride
B 6	30 % w/v PEG 400	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Sodium Citrate
C 1	30 % w/v PEG 550 MME	None	100 mM Bicine	9.0	100 mM Sodium Chloride
C 2	25 % w/v PEG 550 MME	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	10 mM Zinc Sulfate
C 3	25 % w/v PEG 1000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
C 4	30 % w/v PEG 1000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
C 5	15 % w/v PEG 1500	None	None		None
C 6	20 % w/v PEG 1500	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
D 1	30 % w/v PEG 1500	None	None		None
D 2	20 % w/v PEG 2000 MME	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Nickel(II) Chloride
D 3	25 % w/v PEG 2000 MME	None	None		None
D 4	30 % w/v PEG 2000 MME	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	100 mM Sodium Acetate
D 5	20 % w/v PEG 3000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Acetate
D 6	30 % w/v PEG 3000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Lithium Sulfate

Jena Bioscience GmbH LÖbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.: +49-3641-6285 000 Fax: +49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>



**JBScreen Classic 2**

PEG 4000 based

Cat.-No.: CS-102L

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	4 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
A 2	8 % w/v PEG 4000	None	None		None
A 3	8 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
A 4	10 % w/v PEG 4000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Magnesium Chloride
A 5	12 % w/v PEG 4000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Acetate
A 6	12 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
B 1	16 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Lithium Sulfate
B 2	16 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Sodium Acetate
B 3	16 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Magnesium Chloride
B 4	18 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
B 5	20 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Lithium Sulfate
B 6	20 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Calcium Chloride
C 1	22 % w/v PEG 4000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Acetate
C 2	25 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
C 3	25 % w/v PEG 4000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Magnesium Chloride
C 4	25 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Calcium Chloride
C 5	30 % w/v PEG 4000	None	None		None
C 6	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	100 mM Magnesium Chloride
D 1	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
D 2	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Calcium Chloride
D 3	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Lithium Sulfate
D 4	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Sodium Acetate
D 5	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Magnesium Chloride
D 6	35 % w/v PEG 4000	None	None		None

Jena Bioscience GmbH LÖbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.:+49-3641-6285 000 Fax:+49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>

**JBScreen Classic 3**

PEG 4000 plus based

Cat.-No.: CS-103L

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive 1	Additive 2
A 1	8 % w/v PEG 4000	800 mM Lithium Chloride	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
A 2	10 % w/v PEG 4000	20 % w/v 2-Propanol	None		None	None
A 3	10 % w/v PEG 4000	10 % w/v 2-Propanol	100 mM Sodium Citrate	5.6	None	None
A 4	10 % w/v PEG 4000	5 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
A 5	10 % w/v PEG 4000	20 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
A 6	12 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
B 1	15 % w/v PEG 4000	None	None		200 mM Ammonium Sulfate	None
B 2	15 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
B 3	16 % w/v PEG 4000	10 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Ammonium Sulfate	None
B 4	20 % w/v PEG 4000	None	None		200 mM Ammonium Sulfate	None
B 5	20 % w/v PEG 4000	10 % w/v Glycerol	None		200 mM Magnesium Sulfate	None
B 6	20 % w/v PEG 4000	5 % w/v 2-Propanol	None		100 mM Sodium Citrate	None
C 1	20 % w/v PEG 4000	20 % w/v 2-Propanol	None		100 mM Sodium Citrate	None
C 2	20 % w/v PEG 4000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	600 mM Sodium Chloride	None
C 3	20 % w/v PEG 4000	10 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
C 4	22 % w/v PEG 4000	None	None		200 mM Ammonium Sulfate	100 mM Sodium Acetate
C 5	25 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
C 6	25 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
D 1	25 % w/v PEG 4000	200 mM Lithium Sulfate	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Acetate	None
D 2	25 % w/v PEG 4000	8 % w/v 2-Propanol	None		100 mM Sodium Acetate	None
D 3	30 % w/v PEG 4000	None	None		200 mM Ammonium Sulfate	None
D 4	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Ammonium Sulfate	None
D 5	30 % w/v PEG 4000	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	100 mM Ammonium Sulfate	None
D 6	32 % w/v PEG 4000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	800 mM Lithium Chloride	None

Jena Bioscience GmbH LÖbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.:+49-3641-6285 000 Fax:+49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive 1	Additive 2
A 1	25 % w/v PEG 5000 MME	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Lithium Sulfate	None
A 2	30 % w/v PEG 5000 MME	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Ammonium Sulfate	None
A 3	3 % w/v PEG 6000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	100 mM Potassium Chloride	None
A 4	10 % w/v PEG 6000	None	None		10 mM Magnesium Chloride	None
A 5	12 % w/v PEG 6000	2.0 M Sodium Chloride	None		None	None
A 6	15 % w/v PEG 6000	5 % w/v Glycerol	None		None	None
B 1	15 % w/v PEG 6000	50 mM Potassium Chloride	None		10 mM Magnesium Chloride	None
B 2	16 % w/v PEG 6000	None	None		10 mM Sodium Citrate	None
B 3	20 % w/v PEG 6000	None	50 mM Imidazole-HCl	8.0	None	None
B 4	25 % w/v PEG 6000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Lithium Chloride	None
B 5	28 % w/v PEG 6000	500 mM Lithium Chloride	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
B 6	30 % w/v PEG 6000	1.0 M Lithium Chloride	None		100 mM Sodium Acetate	None
C 1	33 % w/v PEG 6000	None	None		10 mM Sodium Citrate	None
C 2	2 % w/v PEG 8000	500 mM Lithium Sulfate	None		None	None
C 3	2 % w/v PEG 8000	1.0 M Lithium Sulfate	None		None	None
C 4	4 % w/v PEG 8000	None	None		None	None
C 5	8 % w/v PEG 8000	200 mM Lithium Chloride	None		50 mM Magnesium Sulfate	None
C 6	8 % w/v PEG 8000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
D 1	10 % w/v PEG 8000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Zinc Acetate	None
D 2	10 % w/v PEG 8000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Calcium Acetate	None
D 3	10 % w/v PEG 8000	None	None		50 mM Magnesium Acetate	100 mM Sodium Acetate
D 4	10 % w/v PEG 8000	None	None		200 mM Magnesium Acetate	None
D 5	10 % w/v PEG 8000	10 % w/v Ethylene Glycol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
D 6	10 % w/v PEG 8000	10 % w/v PEG 1000	None		None	None

Jena Bioscience GmbH Löbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.:+49-3641-6285 000 Fax:+49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive 1	Additive 2
A 1	12 % w/v PEG 8000	5 % w/v Glycerol	None		100 mM Potassium Chloride	None
A 2	12 % w/v PEG 8000	10 % w/v Glycerol	None		500 mM Potassium Chloride	None
A 3	15 % w/v PEG 8000	None	None		200 mM Ammonium Sulfate	None
A 4	15 % w/v PEG 8000	500 mM Lithium Sulfate	None		None	None
A 5	15 % w/v PEG 8000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Sodium Acetate	None
A 6	15 % w/v PEG 8000	None	None		50 mM Ammonium Sulfate	100 mM Sodium Citrate
B 1	18 % w/v PEG 8000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Calcium Acetate	None
B 2	18 % w/v PEG 8000	2 % w/v 2-Propanol	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Acetate	None
B 3	18 % w/v PEG 8000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Lithium Sulfate	None
B 4	20 % w/v PEG 8000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
B 5	20 % w/v PEG 8000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Magnesium Acetate	None
B 6	20 % w/v PEG 8000	None	100 mM CHES	9.5	None	None
C 1	22 % w/v PEG 8000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Ammonium Sulfate	None
C 2	25 % w/v PEG 8000	None	None		200 mM Lithium Chloride	None
C 3	30 % w/v PEG 8000	None	None		200 mM Ammonium Sulfate	None
C 4	8 % w/v PEG 10000	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None	None
C 5	14 % w/v PEG 10000	None	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None	None
C 6	16 % w/v PEG 10000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
D 1	18 % w/v PEG 10000	20 % w/v Glycerol	100 mM Tris-HCl	8.5	100 mM Sodium Chloride	None
D 2	20 % w/v PEG 10000	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
D 3	30 % w/v PEG 10000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
D 4	10 % w/v PEG 20000	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None	None
D 5	17 % w/v PEG 20000	None	100 mM Tris-HCl	8.5	100 mM Magnesium Chloride	None
D 6	20 % w/v PEG 20000	None	None		None	None

Jena Bioscience GmbH Löbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.:+49-3641-6285 000 Fax:+49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive 1	Additive 2
A 1	500mM Ammonium Sulfate	1.0 M Lithium Sulfate	None		None	100 mM Sodium Citrate
A 2	1.0 M Ammonium Sulfate	None	None		None	None
A 3	1.0 M Ammonium Sulfate	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None	None
A 4	1.0 M Ammonium Sulfate	2 % w/v PEG 400	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
A 5	1.0 M Ammonium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
A 6	1.2 M Ammonium Sulfate	3 % w/v 2-Propanol	None		None	50 mM Sodium Citrate
B 1	1.5 M Ammonium Sulfate	15 % w/v Glycerol	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
B 2	1.6 M Ammonium Sulfate	500 mM Lithium Chloride	None		None	None
B 3	1.6 M Ammonium Sulfate	1.0 M Lithium Sulfate	None		None	None
B 4	1.6 M Ammonium Sulfate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Chloride	None
B 5	1.6 M Ammonium Sulfate	2 % w/v PEG 1000	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
B 6	1.8 M Ammonium Sulfate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None	None
C 1	2.0 M Ammonium Sulfate	2.0 M Sodium Chloride	None		None	None
C 2	2.0 M Ammonium Sulfate	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None	None
C 3	2.0 M Ammonium Sulfate	5 % w/v PEG 400	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None	None
C 4	2.0 M Ammonium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
C 5	2.2 M Ammonium Sulfate	None	None		None	None
C 6	2.2 M Ammonium Sulfate	20 % w/v Glycerol	None		None	None
D 1	2.4 M Ammonium Sulfate	None	None		100 mM Sodium Citrate	None
D 2	3.0 M Ammonium Sulfate	1 % w/v MPD	None		None	None
D 3	3.0 M Ammonium Sulfate	10 % w/v Glycerol	None		None	None
D 4	3.5 M Ammonium Sulfate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
D 5	3.5 M Ammonium Sulfate	1 % w/v MPD	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None	None
D 6	3.5 M Ammonium Sulfate	None	None		None	None

Jena Bioscience GmbH Löbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.:+49-3641-6285 000 Fax:+49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	10 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Citrate
A 2	12 % w/v MPD	None	100 mM Tris-HCl	8.5	50 mM Magnesium Chloride
A 3	15 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	20 mM Calcium Chloride
A 4	15 % w/v MPD	5 % w/v PEG 4000	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None
A 5	15 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	200 mM Ammonium Acetate
A 6	15 % w/v MPD	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Magnesium Acetate
B 1	15 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
B 2	20 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Sodium Citrate
B 3	20 % w/v MPD	None	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None
B 4	20 % w/v MPD	4 % w/v Glycerol	None		200 mM Sodium Chloride
B 5	30 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	20 mM Calcium Chloride
B 6	30 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	200 mM Ammonium Acetate
C 1	30 % w/v MPD	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Magnesium Acetate
C 2	30 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	500 mM Ammonium Sulfate
C 3	30 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
C 4	30 % w/v MPD	5 % w/v PEG 4000	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
C 5	30 % w/v MPD	10 % w/v PEG 4000	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None
C 6	30 % w/v MPD	20 % w/v Ethanol	None		None
D 1	35 % w/v MPD	None	None		None
D 2	35 % w/v MPD	None	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None
D 3	40 % w/v MPD	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
D 4	47 % w/v MPD	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
D 5	47 % w/v MPD	2 % w/v tert-Butanol	None		None
D 6	50 % w/v MPD	None	None		None

Jena Bioscience GmbH Löbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.:+49-3641-6285 000 Fax:+49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive 1	Additive 2
A 1	50 % w/v MPD	15 % w/v Ethanol	None		10 mM Sodium Acetate	None
A 2	50 % w/v MPD	20 % w/v 2-Propanol	None		50 mM Sodium Chloride	50 mM Sodium Acetate
A 3	50 % w/v MPD	None	100 mM Tris-HCl	8.5	100 mM Ammonium dihydrogen Phosphate	None
A 4	55 % w/v MPD	None	None		None	None
A 5	60 % w/v MPD	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	10 mM Calcium Chloride	None
A 6	60 % w/v MPD	None	None		20 mM Sodium Acetate	None
B 1	70 % w/v MPD	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None	None
B 2	70 % w/v MPD	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
B 3	20 % w/v Methanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Calcium Chloride	None
B 4	2 % w/v Ethanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
B 5	5 % w/v Ethanol	5 % w/v MPD	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None	None
B 6	5 % w/v Ethanol	5 % w/v MPD	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Sodium Chloride	None
C 1	10 % w/v Ethanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
C 2	12 % w/v Ethanol	4 % w/v PEG 400	100 mM Sodium Acetate	4.6	None	None
C 3	14 % w/v Ethanol	5 % w/v Glycerol	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
C 4	18 % w/v Ethanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None	None
C 5	20 % w/v Ethanol	None	None		None	None
C 6	20 % w/v Ethanol	10 % w/v Glycerol	None		None	None
D 1	30 % w/v Ethanol	10 % w/v PEG 6000	None		100 mM Sodium Acetate	None
D 2	45 % w/v Ethanol	None	None		None	None
D 3	50 % w/v Ethanol	None	None		10 mM Sodium Acetate	None
D 4	60 % w/v Ethanol	1.5 % w/v PEG 6000	None		50 mM Sodium Acetate	None
D 5	60 % w/v Ethanol	None	None		100 mM Sodium Chloride	None
D 6	2 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Magnesium Sulfate	None

Jena Bioscience GmbH Löbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.:+49-3641-6285 000 Fax:+49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>

Each JBScreen Classic kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	5 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
A 2	10 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Calcium Chloride
A 3	10 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
A 4	10 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Magnesium Chloride
A 5	12 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	50 mM Sodium Chloride
A 6	15 % w/v 2-Propanol	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Sodium Citrate
B 1	15 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
B 2	15 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Magnesium Chloride
B 3	15 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Ammonium Acetate
B 4	20 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	200 mM Calcium Chloride
B 5	20 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Sodium Citrate
B 6	25 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	100 mM Magnesium Chloride
C 1	30 % w/v 2-Propanol	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Sodium Citrate
C 2	30 % w/v 2-Propanol	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	200 mM Magnesium Chloride
C 3	30 % w/v 2-Propanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	200 mM Ammonium Acetate
C 4	25 % w/v tert-Butanol	None	100 mM Tris-HCl	8.5	100 mM Calcium Chloride
C 5	35 % w/v tert-Butanol	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	None
C 6	200 mM Ammonium dihydrogen Phosphate	None	None		None
D 1	200 mM Potassium / Sodium Tartrate	None	None		None
D 2	200 mM Magnesium Acetate	None	None		None
D 3	400 mM Ammonium dihydrogen Phosphate	None	None		None
D 4	400 mM Potassium / Sodium Tartrate	None	None		None
D 5	400 mM Potassium / Sodium Tartrate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
D 6	500 mM Ammonium dihydrogen Phosphate	None	None		200 mM Sodium Citrate

Jena Bioscience GmbH Löbstedter Str. 80 07749 Jena, Germany Tel.:+49-3641-6285 000 Fax:+49-3641-6285 100  
<http://www.jenabioscience.com>

Each **JBScreen Classic** kit contains 24 unique, sterile filtered reagents, supplied in 10 ml volumes.

Storage: 4 °C

Number	Precipitant 1	Precipitant 2	Buffer	pH	Additive
A 1	500 mM Sodium Acetate	None	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None
A 2	700 mM Sodium Citrate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
A 3	700 mM Lithium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
A 4	800 mM Potassium / Sodium Tartrate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
A 5	1.0 M Ammonium dihydrogen Phosphate	None	100 mM Sodium Citrate	5.6	None
A 6	1.0 M Ammonium dihydrogen Phosphate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
B 1	1.0 M Lithium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	10 mM Nickel (II) Chloride
B 2	1.0 M Sodium Acetate	None	100 mM Imidazole-HCl	8.0	None
B 3	1.0 M Sodium Formate	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
B 4	1.4 M Sodium Acetate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
B 5	1.4 M Sodium Citrate	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
B 6	1.5 M Lithium Sulfate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
C 1	1.5 M Sodium Citrate	None	None	6.5	None
C 2	1.6 M Magnesium Sulfate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
C 3	1.6 M Potassium / Sodium Tartrate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
C 4	2.0 M Ammonium Formate	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	None
C 5	2.0 M Ammonium dihydrogen Phosphate	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
C 6	2.0 M Sodium Formate	None	None		None
D 1	2.0 M Magnesium Chloride	None	100 mM Tris-HCl	8.5	None
D 2	2.0 M Sodium Chloride	None	100 mM MES Sodium Salt	6.5	200 mM Sodium Acetate
D 3	2.0 M Sodium Formate	None	100 mM Sodium Acetate	4.6	None
D 4	1.0 M Ammonium dihydrogen Phosphate	30 % w/v Glycerol	100 mM Tris-HCl	8.5	None
D 5	4.0 M Sodium Chloride	None	100 mM HEPES Sodium Salt	7.5	None
D 6	3.0 M Sodium Formate	None	None		None

**Wizard I random sparse matrix crystallization screen - technical sheet**

**Formulations: (Patent No. 6,267,935)**

	<u>crystallant</u>	<u>buffer (0.1 M)</u>	<u>salt (0.2 M)</u>	
1	20% (w/v) PEG-8000	CHES pH 9.5	none	1
2	10% (v/v) 2-propanol	HEPES pH 7.5	NaCl	2
3	15% (v/v) ethanol	CHES pH 9.5	none	3
4	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	imidazole pH 8.0	MgCl <sub>2</sub>	4
5	30% (v/v) PEG-400	CAPS pH 10.5	none	5
6	20% (w/v) PEG-3000	citrate pH 5.5	none	6
7	10% (w/v) PEG-8000	MES pH 6.0	Zn(OAc) <sub>2</sub>	7
8	2.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	citrate pH 5.5	none	8
9	1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	acetate pH 4.5	none	9
10	20% (w/v) PEG-2000 MME	Tris pH 7.0	none	10
11	20% (v/v) 1,4-butanediol	MES pH 6.0	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11
12	20% (w/v) PEG-1000	imidazole pH 8.0	Ca(OAc) <sub>2</sub>	12
13	1.26 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	cacodylate pH 6.5	none	13
14	1.0 M sodium citrate	cacodylate pH 6.5	none	14
15	10% (w/v) PEG-3000	imidazole pH 8.0	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15
16	2.5 M NaCl	Na/K phosphate pH 6.2	none	16
17	30% (w/v) PEG-8000	acetate pH 4.5	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	17
18	1.0 M K/Na tartrate	imidazole pH 8.0	NaCl	18
19	20% (w/v) PEG-1000	Tris pH 7.0	none	19
20	0.4 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /1.6 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	imidazole pH 8.0	NaCl	20
21	20% (w/v) PEG-8000	HEPES pH 7.5	none	21
22	10% (v/v) 2-propanol	Tris pH 8.5	none	22
23	15% (v/v) ethanol	imidazole pH 8.0	MgCl <sub>2</sub>	23
24	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	Tris pH 7.0	NaCl	24
25	30% (v/v) PEG-400	Tris pH 8.5	MgCl <sub>2</sub>	25
26	10% (w/v) PEG-3000	CHES pH 9.5	none	26
27	1.2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /0.8 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	CAPS pH 10.5	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	27
28	20% (w/v) PEG-3000	HEPES pH 7.5	NaCl	28
29	10% (w/v) PEG-8000	CHES pH 9.5	NaCl	29
30	1.26 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	acetate pH 4.5	NaCl	30
31	20% (w/v) PEG-8000	phosphate-citrate pH 4.2	NaCl	31
32	10% (w/v) PEG-3000	Na/K phosphate pH 6.2	none	32
33	2.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CAPS pH 10.5	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	33
34	1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	imidazole pH 8.0	none	34
35	20% (v/v) 1,4-butanediol	acetate pH 4.5	none	35
36	1.0 M sodium citrate	imidazole pH 8.0	none	36
37	2.5 M NaCl	imidazole pH 8.0	none	37
38	1.0 M K/Na tartrate	CHES pH 9.5	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	38
39	20% (w/v) PEG-1000	phosphate-citrate pH 4.2	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	39
40	10% (v/v) 2-propanol	MES pH 6.0	Ca(OAc) <sub>2</sub>	40
41	30% (w/v) PEG-3000	CHES pH 9.5	none	41
42	15% (v/v) ethanol	Tris pH 7.0	none	42
43	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	Na/K phosphate pH 6.2	none	43
44	30% (v/v) PEG-400	acetate pH 4.5	Ca(OAc) <sub>2</sub>	44
45	20% (w/v) PEG-3000	acetate pH 4.5	none	45
46	10% (w/v) PEG-8000	imidazole pH 8.0	Ca(OAc) <sub>2</sub>	46
47	1.26 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tris pH 8.5	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	47
48	20% (w/v) PEG-1000	acetate pH 4.5	Zn(OAc) <sub>2</sub>	48

All formulations are made with ultrapure ASTM Type I water and sterile-filtered stock solutions. Store at 4-25 °C.

© 2004 Emerald BioSystems, Inc., (888) 780-8535, FAX (206) 780-8549, www.emeraldbiosystems.com

**Wizard II random sparse matrix crystallization screen - technical sheet**

**Formulations: (Patent No. 6,267,935)**

	<u>crystallant</u>	<u>buffer (0.1 M)</u>	<u>salt (0.2 M)</u>	
1	10% (w/v) PEG-3000	acetate pH 4.5	Zn(OAc) <sub>2</sub>	1
2	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	MES pH 6.0	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
3	20% (w/v) PEG-8000	Tris pH 8.5	MgCl <sub>2</sub>	3
4	2.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	cacodylate pH 6.5	NaCl	4
5	20% (v/v) 1,4-butanediol	HEPES pH 7.5	NaCl	5
6	10% (v/v) 2-propanol	phosphate-citrate pH 4.2	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6
7	30% (w/v) PEG-3000	Tris pH 7.0	NaCl	7
8	10% (w/v) PEG-8000	Na/K phosphate pH 6.2	NaCl	8
9	2.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	phosphate-citrate pH 4.2	none	9
10	1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Tris pH 8.5	none	10
11	10% (v/v) 2-propanol	cacodylate pH 6.5	Zn(OAc) <sub>2</sub>	11
12	30% (v/v) PEG-400	cacodylate pH 6.5	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	12
13	15% (v/v) ethanol	citrate pH 5.5	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	13
14	20% (w/v) PEG-1000	Na/K phosphate pH 6.2	NaCl	14
15	1.26 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HEPES pH 7.5	none	15
16	1.0 M sodium citrate	CHES pH 9.5	none	16
17	2.5 M NaCl	Tris pH 7.0	MgCl <sub>2</sub>	17
18	20% (w/v) PEG-3000	Tris pH 7.0	Ca(OAc) <sub>2</sub>	18
19	1.6 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /0.4 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	phosphate-citrate pH 4.2	none	19
20	15% (v/v) ethanol	MES pH 6.0	Zn(OAc) <sub>2</sub>	20
21	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	acetate pH 4.5	none	21
22	10% (v/v) 2-propanol	imidazole pH 8.0	none	22
23	15% (v/v) ethanol	HEPES pH 7.5	MgCl <sub>2</sub>	23
24	30% (w/v) PEG-8000	imidazole pH 8.0	NaCl	24
25	35% (v/v) 2-methyl-2,4-pentanediol	HEPES pH 7.5	NaCl	25
26	30% (v/v) PEG-400	CHES pH 9.5	none	26
27	10% (w/v) PEG-3000	cacodylate pH 6.5	MgCl <sub>2</sub>	27
28	20% (w/v) PEG-8000	MES pH 6.0	Ca(OAc) <sub>2</sub>	28
29	1.26 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CHES pH 9.5	NaCl	29
30	20% (v/v) 1,4-butanediol	imidazole pH 8.0	Zn(OAc) <sub>2</sub>	30
31	1.0 M sodium citrate	Tris pH 7.0	NaCl	31
32	20% (w/v) PEG-1000	Tris pH 8.5	none	32
33	1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	citrate pH 5.5	NaCl	33
34	10% (w/v) PEG-8000	imidazole pH 8.0	none	34
35	0.8 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /1.2 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	acetate pH 4.5	none	35
36	10% (w/v) PEG-3000	phosphate-citrate pH 4.2	NaCl	36
37	1.0 M K/Na tartrate	Tris pH 7.0	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	37
38	2.5 M NaCl	acetate pH 4.5	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	38
39	20% (w/v) PEG-8000	CAPS pH 10.5	NaCl	39
40	20% (w/v) PEG-3000	imidazole pH 8.0	Zn(OAc) <sub>2</sub>	40
41	2.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tris pH 7.0	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	41
42	30% (v/v) PEG-400	HEPES pH 7.5	NaCl	42
43	10% (w/v) PEG-8000	Tris pH 7.0	MgCl <sub>2</sub>	43
44	20% (w/v) PEG-1000	cacodylate pH 6.5	MgCl <sub>2</sub>	44
45	1.26 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MES pH 6.0	none	45
46	1.0 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	imidazole pH 8.0	NaCl	46
47	2.5 M NaCl	imidazole pH 8.0	Zn(OAc) <sub>2</sub>	47
48	1.0 M K/Na tartrate	MES pH 6.0	none	48

All formulations are made with ultrapure ASTM Type I water and sterile-filtered stock solutions. Store at 4-25 °C.

© 2004 Emerald BioSystems, Inc., (888) 780-8535, FAX (206) 780-8549, www.emeraldbiosystems.com

**Wizard™ III random sparse matrix crystallization screen - technical sheet**

**Formulations:**

	<b>crystallant</b>	<b>buffer</b>	<b>pH</b>	<b>salt/additive #1</b>	<b>additive #2</b>
1	20%(w/v) PEG 3350			.2M ammonium citrate (dibasic)	
2	30%(v/v) MPD	.1M sodium acetate	4.6	.02M calcium chloride	
3	20%(w/v) PEG 3350			.2M magnesium formate	
4	20%(w/v) PEG 3350			.2M ammonium formate	
5	20%(w/v) PEG 3350			.2M ammonium chloride	
6	20%(w/v) PEG 3350			.2M potassium formate	
7	50%(w/v) MPD	.1M Tris	8.5	.2M ammonium phosphate (monobasic)	
8	20%(w/v) PEG 3350			.2M potassium nitrate	
9	0.8M ammonium sulfate	.1M citric acid	4.0		
10	20%(w/v) PEG 3350			.2M sodium thiocyanate	
11	20%(w/v) PEG 6000	.1M bicine	9.0		
12	10%(w/v) PEG 8000	.1M HEPES	7.5	8%(v/v) ethylene glycol	
13	8%(w/v) PEG 4000	.1M sodium acetate	4.6		
14	20%(w/v) PEG 6000	.1M citric acid	5.0		
15	1.6M Sodium citrate				
16	20%(w/v) PEG 3350			.2M potassium citrate tribasic	
17	20%(w/v) PEG 4000	.1M citrate	5.5	10%(v/v) 2-propanol	
18	20%(w/v) PEG 6000	.1M citric acid	4.0	1M lithium chloride	
19	20%(w/v) PEG 3350			.2M ammonium nitrate	
20	10%(w/v) PEG 6000	.1M HEPES	7.0		
21	1.6M Na/K phosphate	.1M HEPES	7.5		
22	20%(v/v) ethanol	.1M Tris	8.5		
23	10%(w/v) PEG 20,000	.1M bicine	9.0	2%(v/v) dioxane	
24	2M ammonium sulfate	.1M sodium acetate	4.6		
25	10%(w/v) PEG 1000			10%(w/v) PEG 8000	
26	24%(w/v) PEG 1500			20%(v/v) glycerol	
27	30%(v/v) PEG 400	.1M HEPES	7.5	.2M magnesium chloride	
28	70%(v/v) MPD	.1M HEPES	7.5		
29	40%(v/v) MPD	.1M Tris	8.0		
30	5.5%(w/v) PEG 4000			.17M ammonium sulfate	15%(v/v) glycerol
31	14%(v/v) 2-propanol	.07M sodium acetate	4.6	.14M calcium chloride	30%(v/v) glycerol
32	16%(w/v) PEG 8000			.04M potassium phosphate (monobasic)	20%(v/v) glycerol
33	1.6M magnesium sulfate	.1M MES	6.5		
34	10%(w/v) PEG 6000	.1M bicine	9.0		
35	4.4%(w/v) PEG 8000	.08M cacodylate	6.5	.16M calcium acetate	20%(v/v) glycerol
36	30%(v/v) Jeffamine M-600	.1M MES	6.5	.05M cesium chloride	
37	3.2M ammonium sulfate	.1M citric acid	5.0		
38	15%(w/v) PEG 10,000	.1M citrate	5.5	2%(v/v) dioxane	
39	20%(v/v) Jeffamine M-600	.1M HEPES	7.5		
40	10%(v/v) MPD	.1M bicine	9.0		
41	28%(v/v) PEG 400	.1M HEPES	7.5	.2M calcium chloride	
42	30%(w/v) PEG 4000	.1M Tris	8.5	.2M lithium sulfate	
43	30%(w/v) PEG 8000			.2M ammonium sulfate	
44	30%(w/v) PEG 5000 MME	.1M Tris	8.0	.2M lithium sulfate	
45	1.5M ammonium sulfate	.1M Tris	8.5		12%(v/v) glycerol
46	50%(v/v) MPD	.1M Tris	8.5	.2M ammonium phosphate (monobasic)	
47	30%(w/v) PEG 5000 MME	.1M MES	6.5	.2M ammonium sulfate	
48	20%(w/v) PEG 10,000	.1M HEPES	7.5		

All formulations are made with ultrapure ASTM Type I water and sterile-filtered stock solutions. Store at 4-25 °C.

© 2004 Emerald BioSystems, Inc., (888) 780-8535, FAX (206) 780-8549, www.emeraldbiosystems.com



## **9.6. Estudio del N-terminal de la ANCA-2 para comprobar su existencia.**

## SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Antonio Romero_ANCA	Std Amount:	8.000 pmols
ID Code:		Sample Amount:	0.000 pmols
		Detector Scale:	0.005 AUFS
Comments:	MKXP		

## SEQUENCER INFORMATION

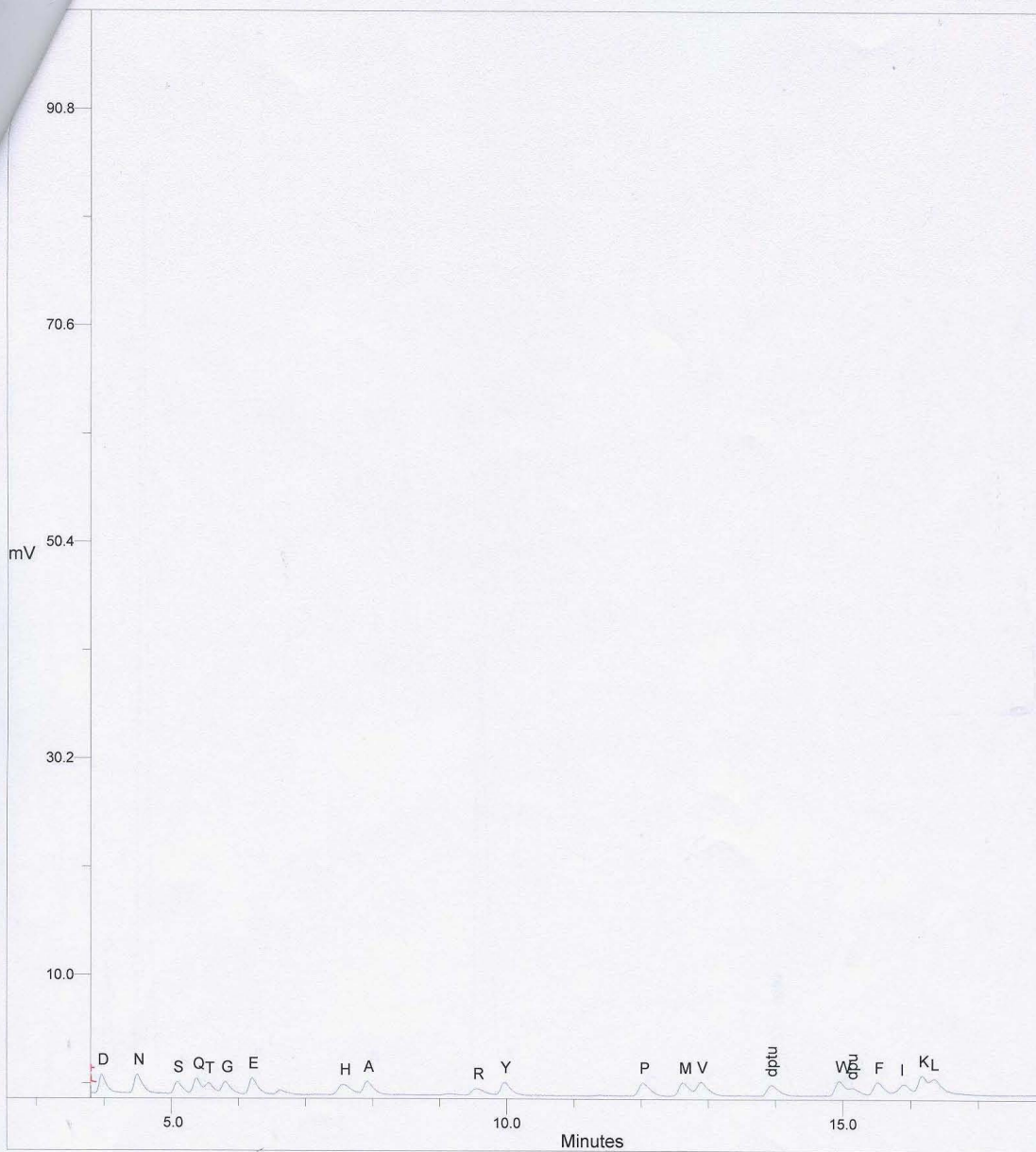
Name:	PROCISE	Model Number:	494
Method:	PL PVDF mod	Cartridge:	A
Operator:			



PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.01	4.01	1.712	8.000	P	12.12	12.12	1.028	8.000
N	4.53	4.53	1.450	8.000	M	12.69	12.69	1.019	8.000
S	5.13	5.13	1.127	8.000	V	12.96	12.96	1.093	8.000
Q	5.44	5.44	1.285	8.000	dptu	14.00	14.00	0.793	8.000
T	5.60	5.60	1.370	8.000	W	15.00	15.00	1.266	8.000
G	5.85	5.85	1.140	8.000	dpu	15.20	15.20	0.786	8.000
E	6.28	6.28	1.498	8.000	F	15.58	15.58	1.057	8.000
H	7.80	7.80	0.917	8.000	I	15.96	15.96	0.995	8.000
A	7.97	7.97	1.446	8.000	K	16.23	16.23	1.541	8.000
R	9.79	9.79	0.650	8.000	L	16.40	16.40	1.387	8.000
Y	10.02	10.02	1.191	8.000					

Friday, October 26, 2012 10:55:11

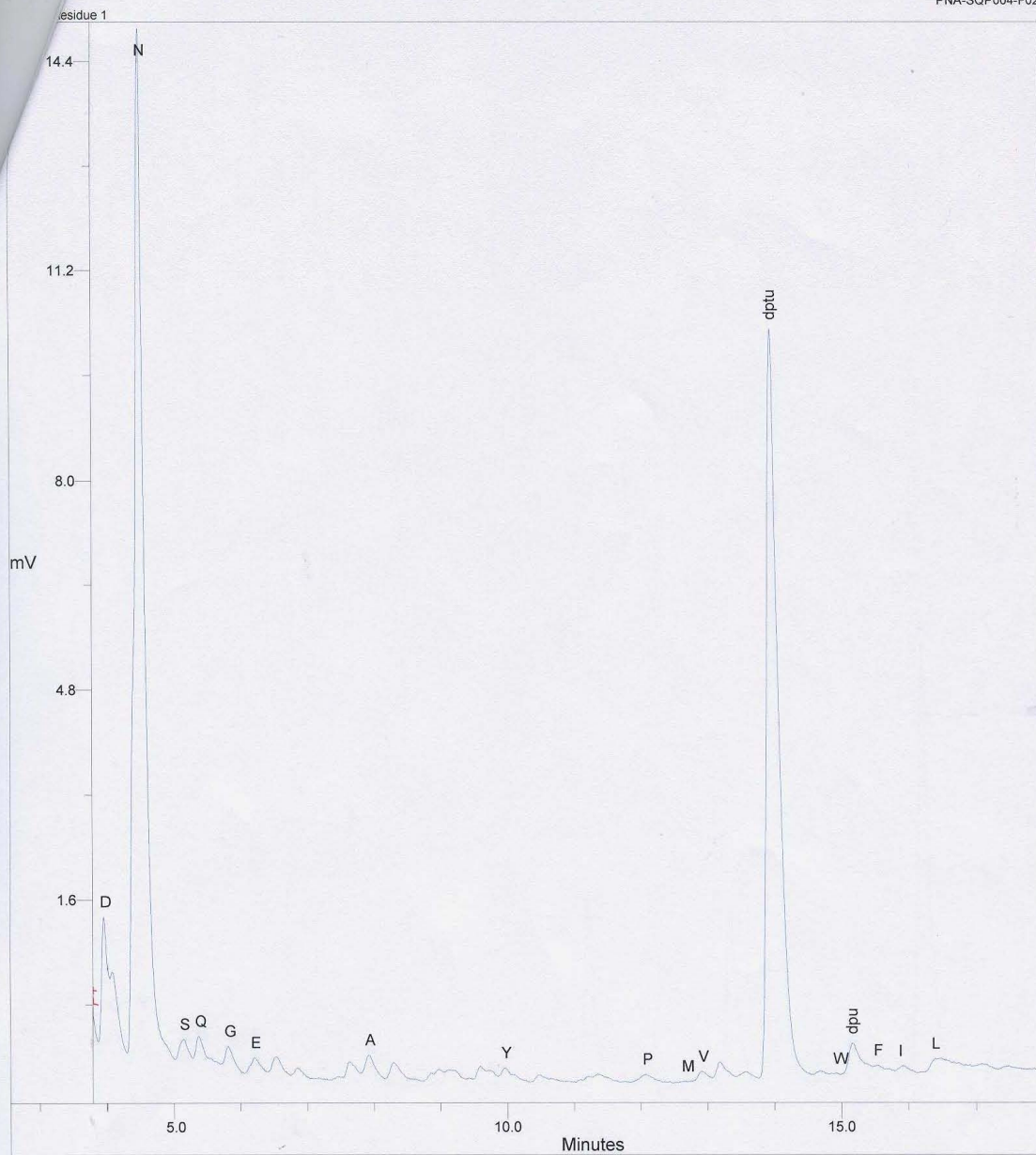
Antonio Romero\_ANCA - 22Oct2012 10:56:52 - Page 4 of 15



PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	3.95	3.95	1.756	8.000	P	12.03	12.03	1.220	8.000
N	4.49	4.49	1.793	8.000	M	12.62	12.62	1.231	8.000
S	5.08	5.08	1.116	8.000	V	12.89	12.89	1.271	8.000
Q	5.38	5.38	1.446	8.000	dptu	13.94	13.94	0.999	8.000
T	5.55	5.55	1.034	8.000	W	14.95	14.95	1.342	8.000
G	5.80	5.80	1.143	8.000	dpu	15.13	15.13	0.691	8.000
E	6.20	6.20	1.493	8.000	F	15.52	15.52	1.190	8.000
H	7.56	7.56	0.959	8.000	I	15.89	15.89	0.980	8.000
A	7.92	7.92	1.228	8.000	K	16.16	16.16	1.747	8.000
R	9.55	9.55	0.625	8.000	L	16.34	16.34	1.429	8.000
Y	9.96	9.96	1.219	8.000					

Friday, September 21, 2012 10:54:38

Antonio Romero\_ANCA - 20Sep2012 09:49:18 - Page 4 of 17

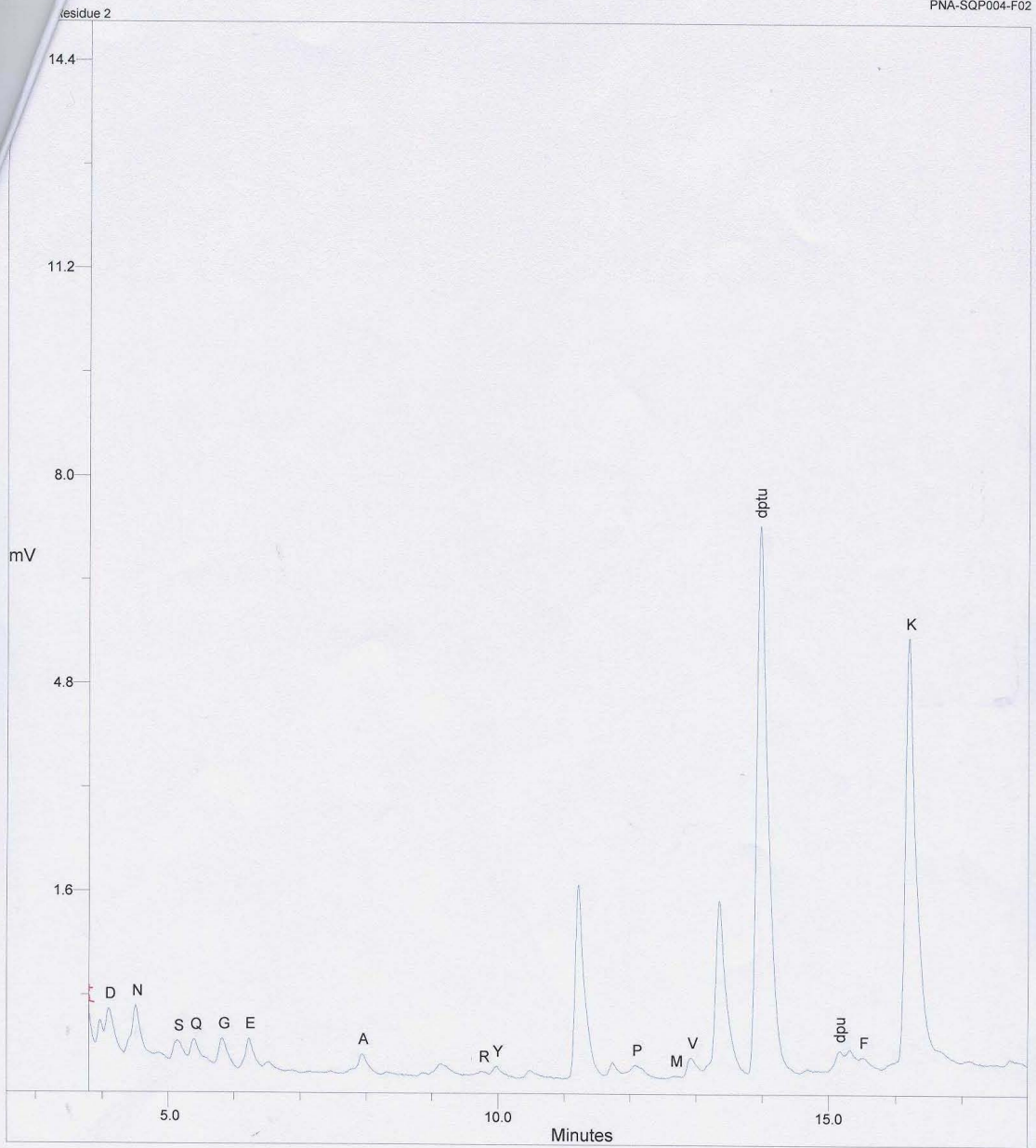


PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	3.96	4.01	1.949	9.111	dptu	13.95	14.00	11.429	115.293
N	4.49	4.53	15.676	86.461	W	14.93	15.00	0.028	0.175
S	5.14	5.13	0.358	2.539	dpu	15.16	15.20	0.462	4.709
Q	5.37	5.44	0.443	2.759	F	15.53	15.58	0.081	0.612
G	5.81	5.85	0.372	2.613	I	15.90	15.96	0.094	0.757
E	6.20	6.28	0.252	1.346	L	16.38	16.40	0.155	0.896
A	7.92	7.97	0.368	2.149					
Y	9.96	10.02	0.122	0.821					
P	12.08	12.12	0.125	0.969					
M	12.67	12.69	0.023	0.181					
V	12.91	12.96	0.158	1.158					

Friday, October 26, 2012 10:55:12

Antonio Romero\_ANCA - 22Oct2012 10-56-52 - Page 5 of 15

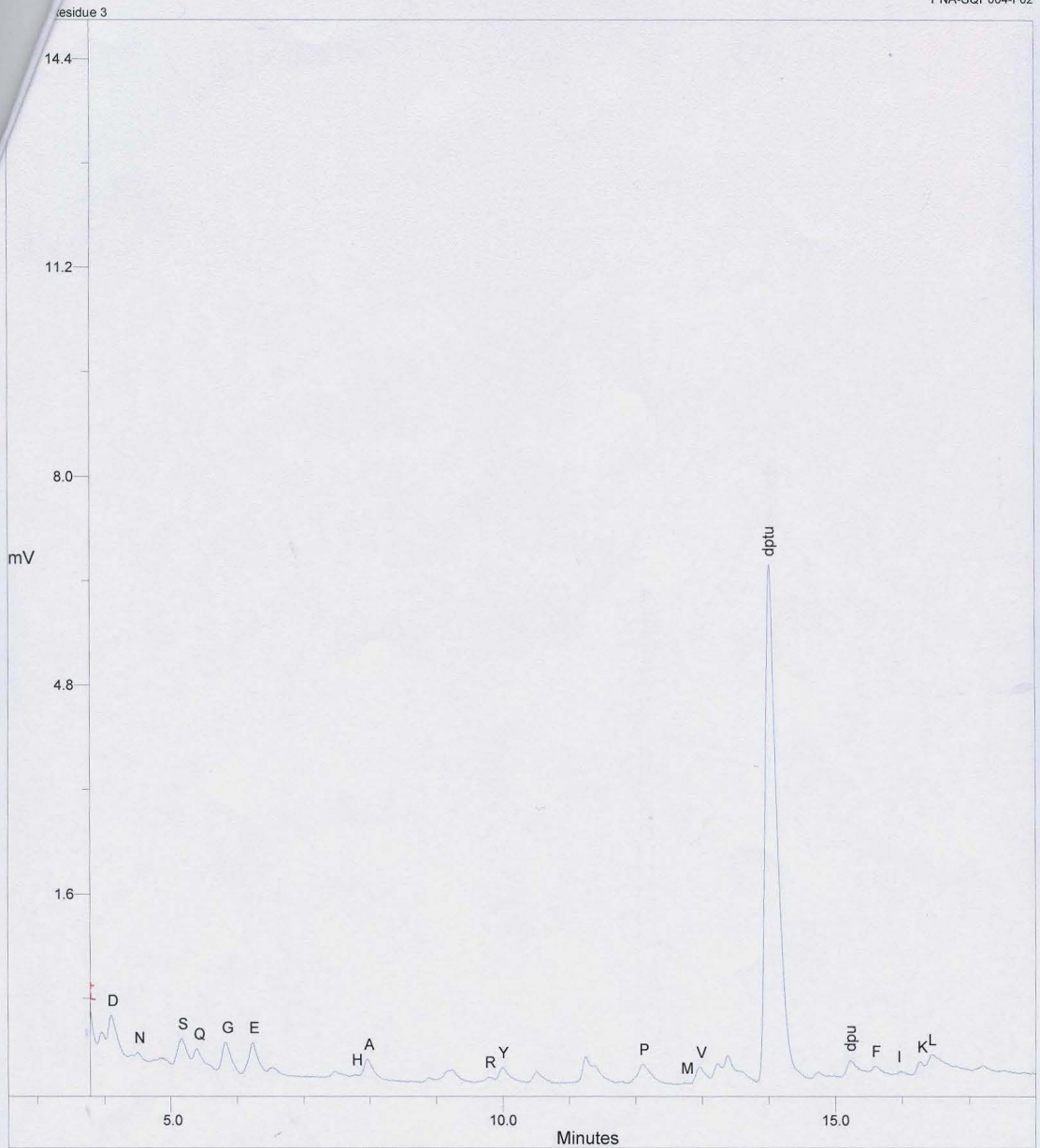
of 15



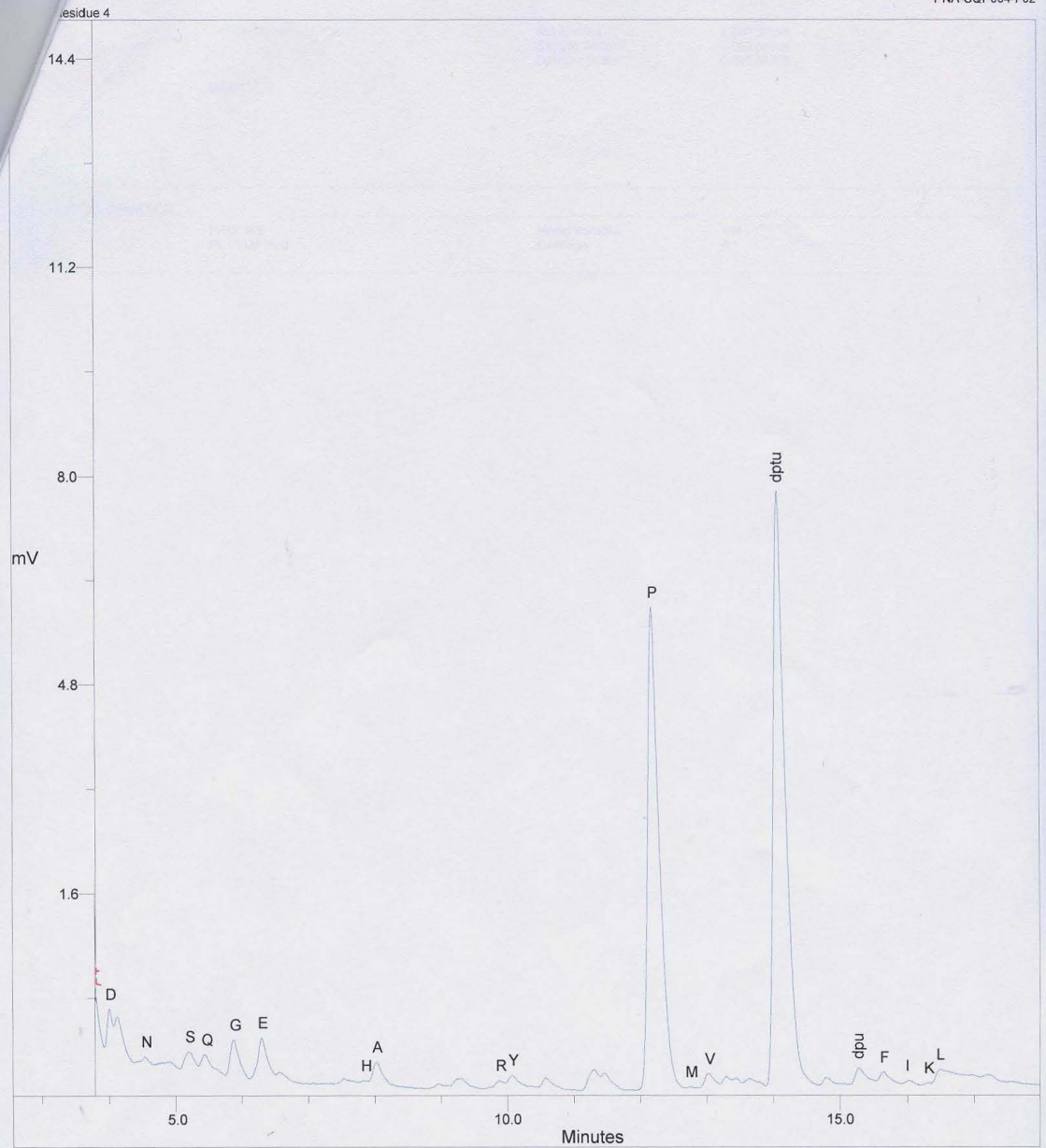
PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.09	4.01	0.604	2.822	V	12.92	12.96	0.295	2.159
N	4.50	4.53	0.755	4.165	dptu	13.95	14.00	8.430	85.041
S	5.14	5.13	0.302	2.146	dpu	15.17	15.20	0.310	3.154
Q	5.39	5.44	0.361	2.247	F	15.52	15.58	0.195	1.473
G	5.81	5.85	0.430	3.014	K	16.19	16.23	6.621	34.364
E	6.22	6.28	0.473	2.527					
A	7.93	7.97	0.312	1.727					
R	9.76	9.79	0.095	1.170					
Y	9.97	10.02	0.180	1.212					
P	12.08	12.12	0.208	1.615					
M	12.66	12.69	0.034	0.268					

Friday, October 26, 2012 10:55:12

Antonio Romero\_ANCA - 22Oct2012 10:56:52 - Page 6 of 15



PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.10	4.01	0.503	2.349	M	12.73	12.69	0.022	0.171
N	4.50	4.53	0.079	0.420	V	12.96	12.96	0.255	1.870
S	5.16	5.13	0.407	2.892	dptu	14.00	14.00	7.907	79.764
Q	5.40	5.44	0.285	1.772	dpu	15.22	15.20	0.253	2.581
G	5.82	5.85	0.445	3.125	F	15.60	15.58	0.151	1.142
E	6.23	6.28	0.486	2.597	I	15.98	15.96	0.060	0.481
H	7.78	7.80	0.065	0.570	K	16.27	16.23	0.190	0.988
A	7.96	7.97	0.308	1.705	L	16.43	16.40	0.284	1.637
R	9.78	9.79	0.086	1.063					
Y	9.99	10.02	0.233	1.563					
P	12.10	12.12	0.296	2.301					



PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT	PEAK ID	R.TIME (mins)	C.TIME (mins)	HEIGHT (mV)	PMOL HT
D	4.00	4.01	0.623	2.914	M	12.73	12.69	0.030	0.234
N	4.53	4.53	0.107	0.589	V	13.02	12.96	0.227	1.664
S	5.20	5.13	0.287	2.035	dptu	14.06	14.00	9.136	92.163
Q	5.44	5.44	0.275	1.712	dpu	15.27	15.20	0.262	2.668
G	5.87	5.85	0.561	3.934	F	15.65	15.58	0.205	1.549
E	6.29	6.28	0.642	3.430	I	16.02	15.96	0.078	0.624
H	7.84	7.80	0.045	0.390	K	16.30	16.23	0.024	0.126
A	8.02	7.97	0.348	1.926	L	16.48	16.40	0.104	0.601
R	9.88	9.79	0.117	1.435					
Y	10.07	10.02	0.187	1.259					
P	12.18	12.12	7.401	57.573					



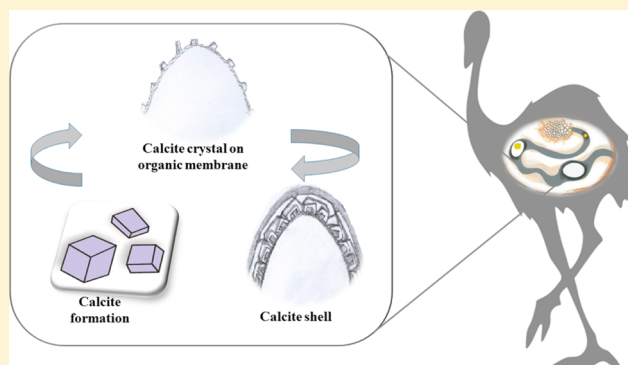
## **9.7. Artículos publicados**

# Obtainment of Spherical-Shaped Calcite Crystals Induced by Intramineral Proteins Isolated from Eggshells of Ostrich and Emu

Rayana R. Ruiz-Arellano<sup>†</sup> and Abel Moreno<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Distrito Federal 04510, México

**ABSTRACT:** In this work, we have performed a set of experiments to study how intramineral proteins affected the growth of calcite crystals and induced spherical growth. Intramineral proteins were first isolated from ostrich and emu eggshells and then purified by liquid chromatography. Samples of these proteins were analyzed by means of cyclic voltammetry to check their selectivity for carbonate ions. Then they underwent assays in solution through dynamic light scattering (DLS) to help us establish their homogeneity and stability (whether individually or in pairs) in the presence of carbonate ions. This was followed by *in vitro* crystallization experiments to determine how they affected the morphology of calcite crystals interacting with the intramineral proteins. Finally, scanning electron microscopy (SEM) showed that the morphology of the calcite crystals was strongly modified in the presence of these intramineral proteins.



calcite crystals was strongly modified in the presence of these

## 1. INTRODUCTION

Intramineral proteins present in the organic matrix of bird eggshells participate in biomineralization processes creating a nucleation site in the formation, growth, and control of calcite crystals. The eggshell formed inside the bird is a highly organized and mineralized structure whose thickness ranges approximately from 0.3 to 0.4 mm in small birds like chickens to 2.5 mm in large birds like ostriches.<sup>1</sup> The eggshell consists of approximately 95% calcium carbonate in the form of calcite,<sup>2,3</sup> 3.3% organic matrix made of macromolecules, and 1.6% water.<sup>4–7</sup> This eggshell is a physical protecting barrier that defines the environment where the embryo is going to be developed. This barrier also regulates the gas exchange of the embryo with the external environment avoiding microbial penetration while providing the growing embryo with calcium reserves.<sup>8</sup> In order to achieve a controlled mineralization within a living organism, it must have a biologically separated space with the adequate physicochemical conditions.<sup>9,10</sup> Mineralization space in the avian oviduct is confined by the eggshell gland (uterus) epithelial cells and the egg with its growing shell.<sup>11</sup> The space is then complemented with uterine fluid containing all the minerals and organic compounds necessary for eggshell formation. Among these organic compounds, there is the organic matrix, which is composed of 70% proteins, 11% proteoglycans, and polysaccharides.<sup>12</sup> These components play an important functional role in the nucleation, growth, and determination of the structural characteristics of the eggshell. This explains why the organic matrix is directly related to the mineralization control of the eggshell.

Genomics studies have revealed that there are 57 proteins in the chicken secreted into the uterine fluid, which exert five fundamental functions: mineralization, formation of proteogly-

cans, chaperon proteins, proteases/antiproteases, and anti-bacterial proteins.<sup>13</sup> Ovocleidin-17 (OC-17) is a protein found specifically in chicken eggshell<sup>14</sup> containing 142 amino acids.<sup>15</sup> This was the first intramineral protein of eggshell structurally resolved.<sup>16</sup> However, struthiocalcin-1 and -2 (SCA-1 and SCA-2) of the ostrich contain 132 and 142 amino acids, respectively, and are not yet structurally resolved<sup>1</sup> (though SCA-1 underwent a preliminary X-ray analysis).<sup>17</sup> Several other proteins were also found in different bird eggshells, such as ansocalcin (ANCA), found in the goose eggshell containing 132 amino acids,<sup>18,19</sup> dromaiocalcins-1 and -2 (DCA-1 and DCA-2) found in emu eggshell, and rheacalcin-1 and -2 (RCA-1 and RCA-2)<sup>20,21</sup> found in American rhea (ñandú in South America). They all have an identity sequence that range from 40% to 80%.<sup>21</sup> The sequence analysis of amino acids of OC-17<sup>15</sup> helped to identify this protein as a member of the superfamily of C-type lectin proteins.<sup>22</sup> All members of this superfamily share a common pattern of 110 to 140 amino acids.<sup>23</sup> The first members of this superfamily were all calcium-dependent lectins.<sup>20</sup> However, the presence of this C-type lectin motif in proteins like OC-17, which do not bind to calcium, brought about a change in the name of this superfamily from C-type lectin proteins to C-type lectin-like proteins.<sup>23</sup>

Ostrich, emu, and American rhea are birds of the *Paleognathae* superorder of the ratites lineage, which, in contrast to birds of the superorder *Neognathae*, possess two C-type lectin-like proteins in the mineral part as major

**Received:** June 9, 2014

**Revised:** September 3, 2014

**Published:** September 8, 2014

component.<sup>20,24</sup> Studies on the mechanisms of eggshell formation in these birds are scarce, and the few existing studies have been focused only on hen eggshell and other birds of the superorder *Neognathae*.<sup>25,26</sup> However, because these intramineral proteins play an important role in the calcification of eggshell, we need to study how they interact with  $\text{CaCO}_3$  in order to understand the principles that rule the process of eggshell formation.

This contribution basically deals with the morphological changes of calcite crystals grown *in vitro* in the presence of the four intramineral proteins isolated from the eggshells of ratite birds. As we have already mentioned, most studies, so far, have been focused only on eggshells of birds of the superorder *Neognathae*, which have as a major component one intramineral protein. In this work, however, we focused on the interactions of intramineral proteins of ostrich and emu, because these birds belong to the order *Paleognathae* pertaining to the ratites lineage and their eggshells mostly contain two intramineral C-type lectin-like proteins. Each of these two proteins was separated, isolated, and purified by means of liquid chromatography (HPLC) in order to study the protein–ligand interaction in solution. We used cyclic voltammetry to study the selectivity for carbonate, phosphate, and sulfate ions of the following intramineral proteins: struthiocalcin-1 (SCA-1) and struthiocalcin-2 (SCA-2) of ostrich and dromaiocalcin-1 (DCA-1) and dromaiocalcin-2 (DCA-2) of emu. Samples of these proteins underwent assays in solution using dynamic light scattering (DLS) in order to establish their homogeneity and their deaggregation state (stability) with respect to temperature when facing carbonate ions (either individually or in pairs). Finally, we performed *in vitro* crystallization experiments to determine the morphological effect on  $\text{CaCO}_3$  crystals when interacting with these proteins. Scanning electron microscopy (SEM) showed that the morphology of the calcite crystals was strongly modified in the presence of these proteins.

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

**2.1. Isolation and Purification of Proteins SCA-1, SCA-2, DCA-1, and DCA-2 through Liquid Chromatography.** Isolation and purification were based on the methodology developed by Mann and Siedler,<sup>1</sup> though slightly modified. Here is a brief explanation of the process: eggshells were first washed with distilled water. They were then immersed in a 5% EDTA solution for 45 min to ease the elimination of both the membrane and the outer layer of polysaccharides. Next a clean eggshell was ground in a porcelain mortar to a fine powder. This powder was suspended in a 10% acetic acid solution. The extract was concentrated in an Amicon filter (Millipore, Billerica, MA, USA), using a membrane with a molecular weight cutoff of 3 kDa. The sample was dialyzed against  $5 \times 10$  volumes of 5% (v/v) acetic acid. To precipitate the protein phase, the solution was oversaturated with ammonium sulfate (99.0% purity, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). After 24 h, the solution was centrifuged at 64 500 rpm for 30 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and the protein-rich pellet was resuspended in 5% (v/v) acetic acid; the latter was used to remove the ammonium sulfate by dialysis.

The purification of SCA-1 and SCA-2 was done by molecular exclusion chromatography with a Shodex SUS 316 column; the injection volume was 500  $\mu\text{L}$  of the sample with citrate buffer at pH 3.8 as mobile phase.

The purification of DCA-1 and DCA-2 was done by reverse phase chromatography using a C18 column; the injection volume was 500  $\mu\text{L}$  with acetonitrile anhydrous (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in gradients (0–100% v/v) with water as mobile phase. We obtained a final concentration of approximately 3 mg/mL for each protein.

**2.2. Mass Spectrometry.** Mass spectrometry experiments were performed for molecular weight determination in a Bruker Esquire mass spectrometer, using the MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) technique. This technique was used as purity criteria based on the molecular weight of these proteins. The matrix used was a mixture of sinapinic acid and 2,5-dihydroxybenzoic acid.

**2.3. Analytical Studies through Cyclic Voltammetry.** Electroanalytical determinations of responses to carbonate ions were performed by means of cyclic voltammetry at a scanning speed of  $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$  in an AUTOLAB PGSTAT 30 potentiostat/galvanostat (UK). A three-electrode system was used: a reference electrode, saturated calomel (EG&G PAR),  $E = 0.241 \text{ V}$  versus normal hydrogen electrode (NHE); an auxiliary electrode, platinum wire; and a working electrode made of vitreous carbon paste with a  $0.03 \text{ cm}^2$  surface. This electrode is composed of 0.8 g of graphite powder, with a 1–2  $\mu\text{m}$  particle size with a 99.99% purity and 0.2 mL of silicone oil. The solution of each of the studied proteins (SCA-1, SCA-2, DCA-1, or DCA-2; 4  $\mu\text{L}$  at 1 mg/mL) was added to the surface of the carbon paste electrode until water was completely evaporated (ca. 30 min).  $\text{LiClO}_4$  (0.1 M) was used as support electrolyte (having been previously deoxygenated for 15 min by  $\text{N}_2$  bubbling (99.9% purity)). Finally, due to the insolubility of  $\text{CaCO}_3$ , aliquots of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  were added as a source of carbonate ions. We carried out other similar experiments by adding either sodium phosphate or sodium sulfate as a source of phosphate or sulfate ions, respectively.

**2.4. Studies of Dynamic Light Scattering (DLS).** DLS experiments were performed to study the aggregation/deaggregation states of proteins SCA-1, SCA-2, DCA-1, and DCA-2 as a function of the temperature. We employed different concentrations of sodium carbonate solutions, using the Malvern NanoS (Malvern, Ltd.) equipment with laser NIBS (noninvasive back scattering) technology, with a Peltier temperature controller. The solution was filtered through inorganic Anotop membranes of 10 mm diameter with a 0.02  $\mu\text{m}$  pore size (Whatman). The solution was then immediately introduced into the DLS equipment provided with a laser diode of 633 nm wavelength. Different temperatures ranging from 5 to 30 °C were tested. The protein concentration was 1 mg/mL. The concentration of sodium carbonate for each solution was 10, 70, and 100 mM. The analysis of hydrodynamic radii and aggregation/deaggregation degrees versus temperature was performed with the Zeta Sizer software version 6.20 DTS.

**2.5. Crystal Growth Assays.** In order to determine the effect of the intramineral proteins SCA-1, SCA-2, DCA-1, and DCA-2 on the morphology of the calcium carbonate crystals, we performed *in vitro* synthesis of  $\text{CaCO}_3$  evaluating the effect of the proteins at different concentrations.

Calcite crystals were grown by means of the vapor phase diffusion technique, using an *ad hoc* crystallization device (Glass Crystallization Mushroom, CM-A-60, Triana Sci & Tech).<sup>27</sup> This crystallization mushroom was used to create a homogeneous vapor pressure, product of ammonium carbonate decomposition (Sigma; 0.1 M). Proteins were added (50, 75, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to the 0.1 M calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) solution drops, which were placed on a silicone coverslip inside the crystallization mushroom. Control tests (without proteins) were mounted on the same system. The system was perfectly sealed to avoid leaks. The total volume of drops was 4  $\mu\text{L}$ , and all experiments were performed at 18 °C.

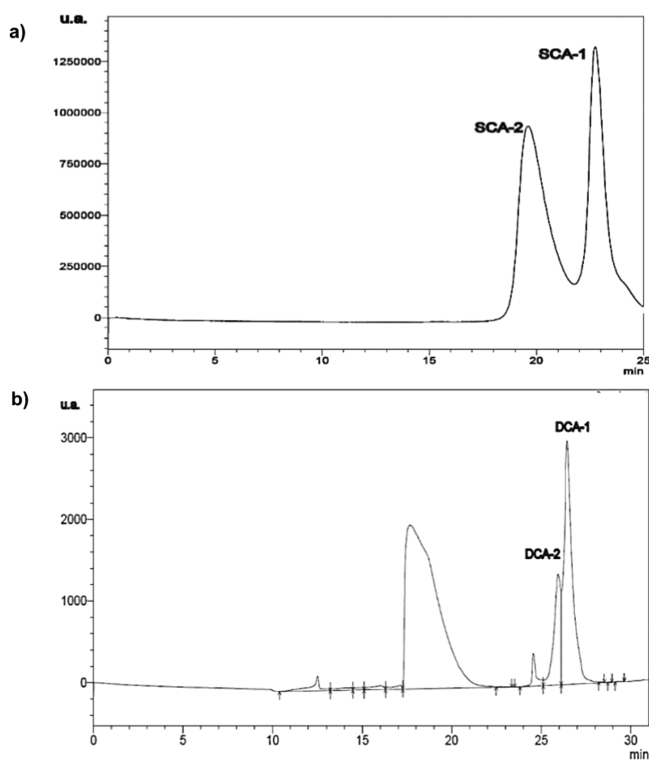
**2.6. Study of  $\text{CaCO}_3$  Crystals through Scanning Electron Microscopy (SEM).** *In vitro* crystallization assays were analyzed in a scanning electron microscope, using a SEM-TESCAN VEGA3 SB microscope. Crystals were first grown on an 18 mm diameter glass plate that was afterward covered with a gold layer to improve conductivity; a 12–18 keV voltage was used for obtaining scanning electron micrographs.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

**3.1. Isolation and Purification of Proteins SCA-1, SCA-2, DCA-1, and DCA-2.** We have found two intramineral

proteins as the main components in ratite eggshell. These two proteins are difficult to separate because they both share some characteristics and are rather close in molecular weight values. The protein purification procedure was optimized, testing different chromatographic columns and different buffer solutions that ranged from pH 3 to 10. Gel permeation chromatography (with a citrate buffer at pH 3.8) was used to separate proteins SCA-1 and SCA-2. This procedure reduced the purification time in comparison to a reverse phase chromatography procedure as previously published elsewhere. On the other hand, the purification of DCA-1 and DCA-2 was performed using reverse phase chromatography as suggested by Mann and Siedler.<sup>1</sup>

The proteins SCA-1 and SCA-2 were separated through molecular exclusion chromatography (Figure 1a), taking



**Figure 1.** Chromatograms obtained during purification of the intramineral proteins found in (a) the ostrich eggshell, SCA-1 and SCA-2, and (b) the emu eggshell, DCA-1 and DCA-2.

advantage of the almost 1.5 kDa difference in their molecular weight. The two pure proteins were collected, and their purity was confirmed through mass spectrometry based on their molecular weight (Figure 2a,b).

DCA-1 and DCA-2 have very similar molecular weights as reported by Mann and Siedler, 16 370 and 16 645 Da, respectively,<sup>21</sup> hence the use of reverse phase chromatography (Figure 1b) to accomplish their purification. The purification chromatogram revealed two peaks that were collected separately; observation of the mass spectrum (Figure 2c,d) confirmed that each peak corresponds to each one of the proteins according to their molecular weight. In the present investigation, we have shown that the application of MALDI-TOF mass spectrometry for the analysis of different classes of proteins is easily performed, apart from providing highly resolved mass spectra. Figure 2 shows that an additional peak appears (in all cases). The larger peak is the molecular ion

( $M^{1+}$ ); the smaller peak is the doubly charged species. The x-axis is  $m/z$  (mass divided by charge); therefore the doubly charged proteins appear at approximately half the mass of the singly charged proteins. Small deviations from theoretical values in such measurements are not unusual for such relatively large molecules.<sup>28,29</sup>

### 3.2. Analysis of the Interaction of Proteins with Carbonate Ions through Cyclic Voltammetry.

The interactions of SCAs with carbonate ions have already been studied by Marín-García et al.<sup>30</sup> Using cyclic voltammetry experiments as well as different anions and cations to study the preference (selectivity) of several proteins for calcium or carbonate ions, we concluded that the intramineral proteins of the ostrich eggshell (SCA-1 and SCA-2) show a higher preference for carbonate ions. Based on these experiments and on the experimental set up, we were able to determine the convenience of cyclic voltammetry as a method to analyze the interaction of all these proteins with carbonate ions, due to its high sensitivity and low detection limit.

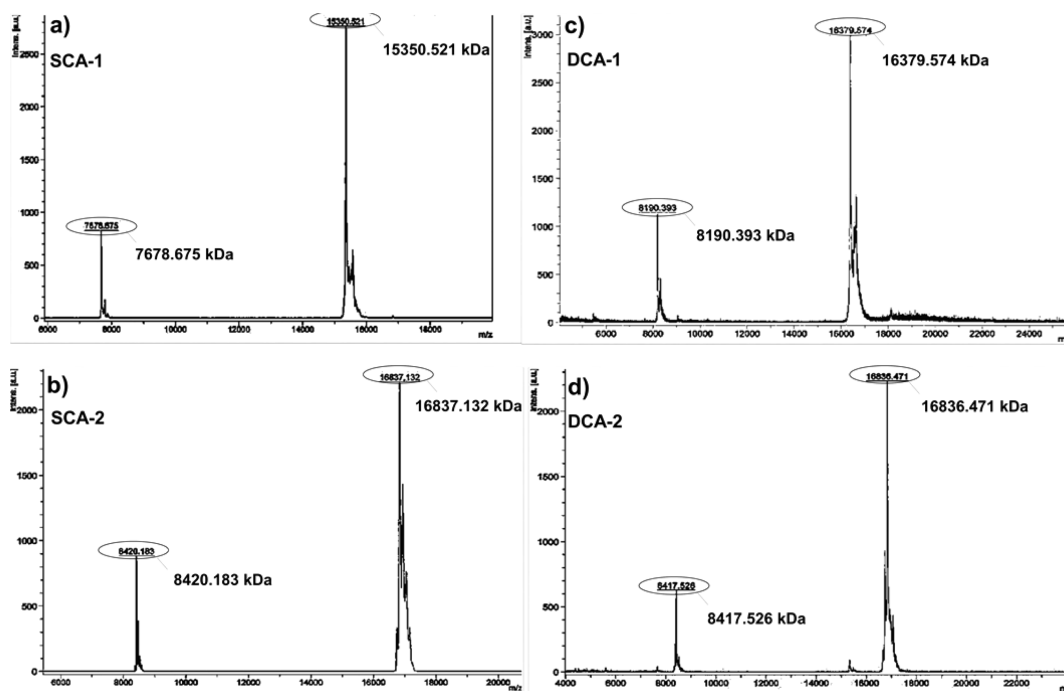
When the carbonate ions interacted with proteins adsorbed on the vitreous carbon paste electrode in the electrochemical cell, an increase in anodic current was observed. The fact that the anodic barrier current increases suggests that there is a chemical interaction, since cyclic voltammetry is able to detect the general oxidizing state of the redox reaction. To analyze these results, the electrochemical responses were plotted in terms of anodic current with respect to the  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  concentration for each of the studied proteins. We additionally tested the preference for carbonate ions compared with phosphate and sulfate anions, which are usually present in the uterine fluid (Figure 3).

On these curves, the slopes represent a measure of the degree of preference (selectivity) of each protein for these anions. The curve for carbonate ions in particular showed a characteristic behavior when this preference was compared in the presence of these four intramineral proteins (Figure 4). The current ( $I$ ) was normalized with respect to the initial current ( $I_0$ ) versus carbonate concentration. From the electrochemical point of view, the general trend was as follows: the higher the slope the higher the preference for carbonate ions. This preference cannot be taken as a test of affinity for carbonate ions due to the lack of kinetic data related to the binding constants for these proteins (these proteins do not work as enzymes). The comparison of the slope reveals that SCA-1 is more selective for carbonate ions than SCA-2 and that DCA-2 is also more selective than DCA-1. Of the four proteins, SCA-1 is 2-fold more selective for carbonates than the remaining ones, followed in order by DCA-2.

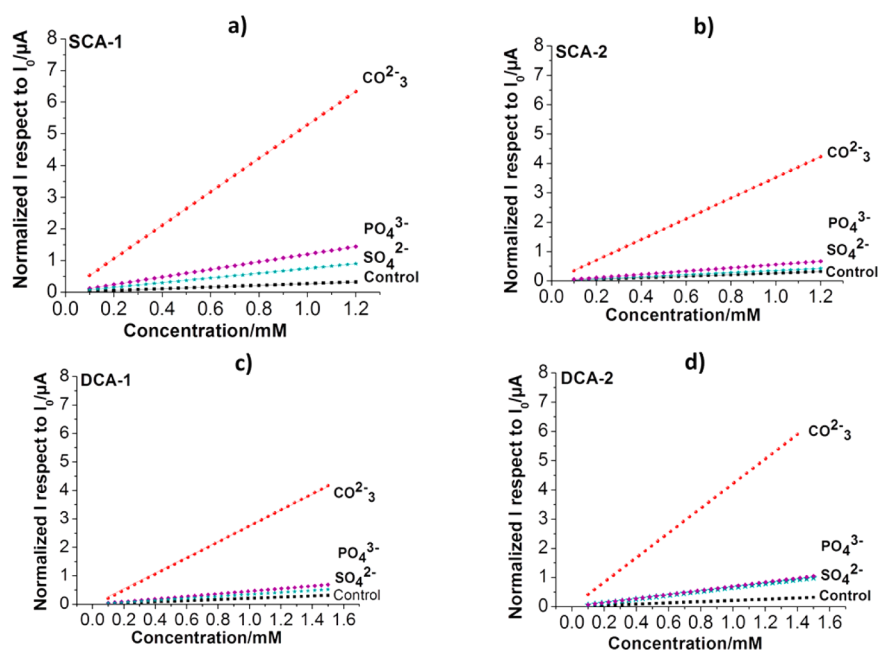
Proteins were studied at very low concentrations as compared with the concentration of the ligand (carbonate), resembling the *in vivo* process, where the protein is found in a  $\text{CaCO}_3$ -rich environment. This is probably due to the necessary accomplishment of biomineralization in hypersaturation conditions;<sup>31,32</sup> the plausible explanation is that proteins must interact with large amounts of carbonates.

### 3.3. Analysis of Conformational Stability through Dynamic Light Scattering.

After studying the protein-carbonate interaction in solution and based on previous studies on the size and distribution of SCA-1 and SCA-2 using DLS performed by Ruiz-Arellano et al.,<sup>33</sup> we analyzed the thermal stability of these four intramineral proteins as a function of their hydrodynamic radius ( $R_h$ ) in a carbonate-rich medium. Figure 5 shows the straight lines of  $R_h$  variation as a function of



**Figure 2.** Mass spectra for (a) SCA-1, (b) SCA-2, (c) DCA-1, and (d) DCA-2. The numbers included in the inset are the peaks separately magnified for all cases.



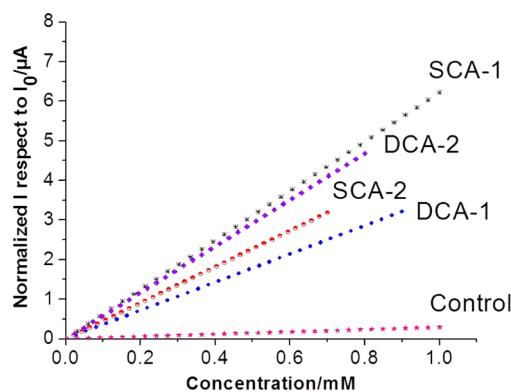
**Figure 3.** Graphical representation of the current's intensity at the working electrode (made of vitreous carbon paste) versus carbonates, phosphates, or sulfates at different concentrations added to the studied proteins into the electrochemical cell.

temperature. These straight lines expose a global behavior (trend) of  $R_h$  values at temperature ranging from 5 to 35 °C.

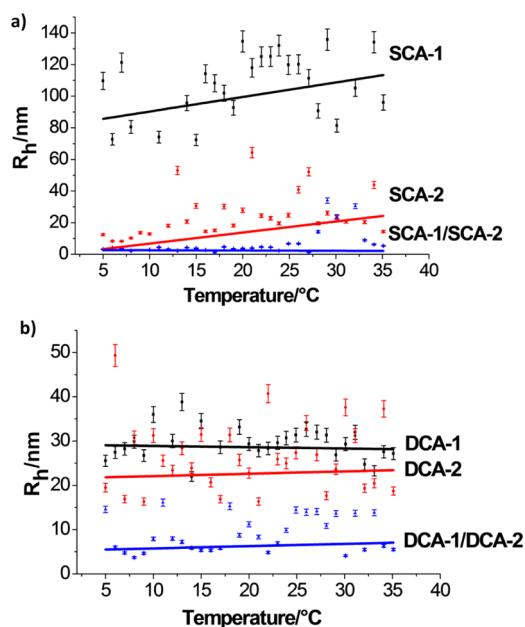
Assays of proteins both individually and in pairs were performed simulating the *in vivo* conditions (at high concentrations of carbonates) (see Figure 5). The average  $R_h$  of SCA-1 and SCA-2 is  $\sim 90$  and  $\sim 10$  nm, respectively. As temperature increases, the size of aggregates also increases. This significant increment in the size of the  $R_h$  implies the formation of large aggregates. The mixture of proteins SCA-1 and SCA-2 in the presence of carbonate ions shows an average  $R_h$  size  $\sim 2$  nm, which is smaller than the individually isolated proteins,

showing the mixture of proteins to be stable at the highest temperature and the lack of drastic changes along the temperature interval.

For DCA-1 and DCA-2, the average  $R_h$  is  $\sim 30$  and  $\sim 22.5$  nm, respectively, with a diminution in  $R_h$  as temperature increases, forming smaller sized aggregates. When studying the mixture of these proteins, we observed a marked diminution, suggesting that these proteins are not so independent of each other. However, there is deaggregation since the  $R_h$  is  $\geq 20$  nm for the proteins separately tested. In the mixture (DCA-1 and DCA-2), the average size is  $\sim 5$  nm and is almost constant along



**Figure 4.** Graphical representation of the current's intensity at the working electrode (made of vitreous carbon paste) versus the carbonate ions at different concentrations added for the studied proteins into the electrochemical cell.



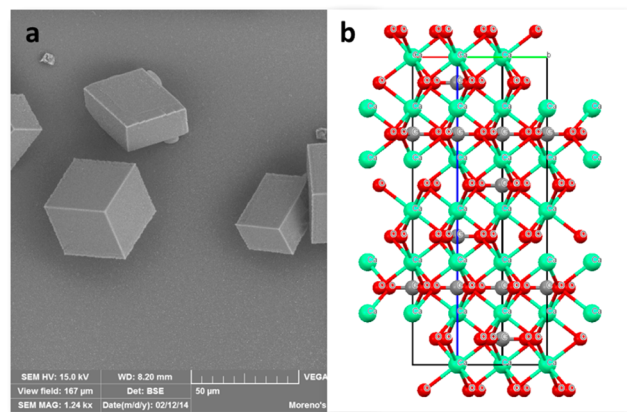
**Figure 5.** DLS graphs representing the hydrodynamic radius versus temperature. These graphs show that mixed proteins are more stable. All color lines (black, red, and blue) show the trend of the data.

the temperature range, suggesting better stability (deaggregation) for the mixed proteins. These results suggest the stability of mixed proteins (DCA-1 and DCA-2) to be higher in the presence of carbonate ions, whereas individual proteins show a greater tendency to form aggregates, suggesting that both proteins may be mixed in the uterine fluid working together. Although ovocleidin 17 appears to be the major intramineral protein in the hen eggshell, it can also be inferred that one protein acts toward the other as a necessary cofactor to perform its function. The fact that these ratite birds have two major intramineral proteins as components can be due to both the large size, and the strength of the eggshell structure. However, there is no experimental data available to prove this assumption.

**3.4. Influence of Proteins SCA-1, SCA-2, DCA-1, and DCA-2 on Calcite Crystallization.** The effect of proteins such as protein matrix fractions,<sup>34</sup> proteins from uterine fluid of the chicken,<sup>27,35</sup> and proteins like lysozyme,<sup>36</sup> OC-17,<sup>16</sup> and ANCA,<sup>19</sup> on the growth of calcite had been previously studied elsewhere. However, there are not any studies involving the

effect of proteins of ratite bird eggshells. Therefore, we had to analyze the effect of these proteins on the morphology and formation of  $\text{CaCO}_3$  crystals by means of *in vitro* crystal growth assays.

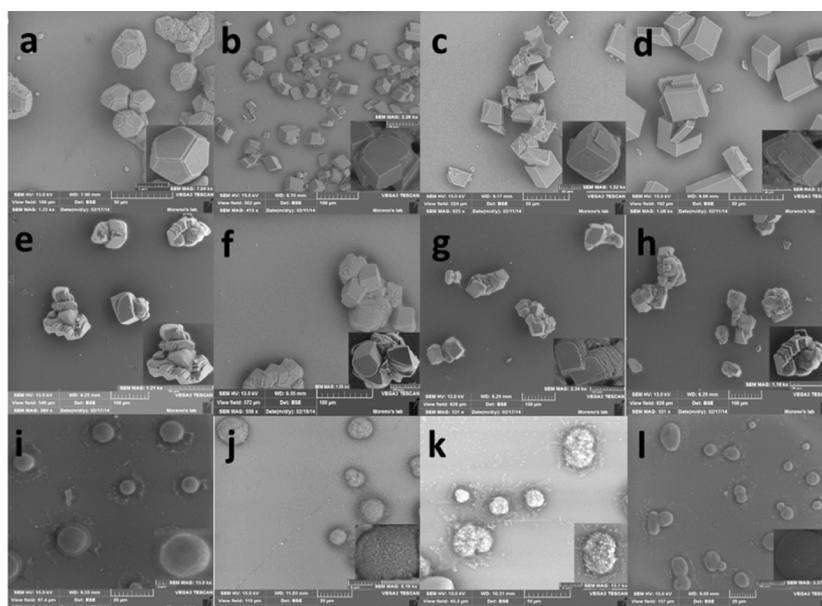
Crystals were visualized through scanning electron microscopy (SEM). Figure 6a shows well-shaped rhombohedral



**Figure 6.** (a) Calcite single crystals (control) and (b) 3D structure of calcite using Mercury Software (see the text for details).

calcite crystals  $\{104\}$ ,<sup>37</sup> grown as a control without protein. Figure 6b shows packing of  $\text{CaCO}_3$  molecules in 3D space (using the Mercury software to visualize the molecule using the CIF file of calcite). In the process of growing calcite crystals, we subsequently added to the medium  $50 \mu\text{g/mL}$  of each of these proteins at a time (Figure 7a–d). We observed that SCA-1 (Figure 7a) significantly affected the morphology of calcite crystals, whereas the other proteins only affected it sparingly. Figure 7a shows the morphology of a truncated octahedron with rounded and, apparently smooth, vertices. When the protein concentration is increased to  $75 \mu\text{g/mL}$  (Figure 7e–h), we observed anisotropic growth (the growth of certain surfaces is inhibited when the proteins interact with  $\text{CaCO}_3$ ). In all cases, proteins promote crystal twinning with stepwise forms in the faces grown in layers. Again, SCA-1 exerts more influence on crystal deformation (Figure 7e). We observed that when protein concentration is increased to  $100 \mu\text{g/mL}$  (Figure 7i–l), crystals with SCA-1 grew as spherical polycrystalline aggregates with a surface in which the components could not be distinguished (Figure 7i). In the presence of SCA-2 and DCA-1 (Figure 7j,k), semirounded polycrystalline aggregates were formed. The surface of the spherical particles exhibits an irregular cluster shape resulting from random orientations of the particles that compose the rounded polycrystalline material. Finally, with DCA-2 (Figure 7l), ellipsoidal polycrystalline aggregates appeared, showing much smaller particles than those found in crystals influenced by SCA-2 and DCA-1. SCA-1 exerts a marked effect on the morphology of  $\text{CaCO}_3$  crystals starting at low concentrations, followed by DCA-2, a fact that agrees with the cyclic voltammetry experiments where SCA-1 is the protein with the greatest preference (selectivity) for carbonate ions followed by DCA-2. Table 1 shows the concentration of proteins in solution in millimolar units. This table was obtained taking into account the molecular weight of each protein as determined by mass spectrometry.

Modifications in crystals habit result from adsorption of proteins. The formation of rounded aggregates indicates that this adsorption is not specific because they bind to the crystal's



**Figure 7.** CaCO<sub>3</sub> with 50 µg/mL (a) SCA-1, (b) SCA-2, (c) DCA-1, and (d) DCA-2; CaCO<sub>3</sub> + 75 µg/mL (e) SCA-1, (f) SCA-2, (g) DCA-1, and (h) DCA-2; and CaCO<sub>3</sub> + 100 µg/mL (i) SCA-1, (j) SCA-2, (k) DCA-1, and (l) DCA-2.

**Table 1. Concentrations (mM) for Each of the Proteins Shown in Figure 7**

proteins	50 µg/mL	75 µg/mL	100 µg/mL
SCA-1	0.87	1.22	1.62
SCA-2	0.74	1.11	1.48
DCA-1	0.76	1.14	1.52
DCA-2	0.74	1.11	1.48

surface blocking its growth in all faces. These experiments suggest that aggregates are formed first, and initiation sites or nuclei are formed second. These formations are followed by the transformation of calcium carbonate to a more stable form (Lakshminarayanan et al.).<sup>38</sup> This means that proteins induce precipitation and that the thermodynamic stability conditions are fostered in the uterus so that the crystalline aggregates give rise to a stable calcite. The final step shows that the eggshell is formed by a competitive crystal growth mechanism.

#### 4. CONCLUSION

We determined, by means of cyclic voltammetry, that proteins SCA-1, SCA-2, DCA-1, and DCA-2 have a preference for carbonate ions. The studies about the stability of aggregates performed with DLS might suggest that, in ratites, the two intramineral proteins coexist as major components working together to give rise to CaCO<sub>3</sub> nucleation.

When performing *in vitro* CaCO<sub>3</sub> crystallization experiments in the presence of protein, we observed significant changes in the morphology of calcite crystals due to the effect of proteins SCA-1 and DCA-2, though the effects of SCA-2 and DCA-1 are less remarkable. This suggests that they might play an important role in the promotion of nucleation and precipitation due to the affinity between the crystal's surface and the carbonate ions. Based on these results, we inferred that these proteins exert a mechanism of induction and formation of selective rounded polycrystalline calcite aggregates that possess the necessary characteristics to develop (after physicochemical changes in the system) rigid structures formed by layers of

highly ordered calcite crystals. Finally the eggshells are formed by a competitive crystal growth mechanism.

#### ■ AUTHOR INFORMATION

##### Corresponding Author

\*A.M. Tel. +52-55-56224467. E-mail address: carcamo@unam.mx.

##### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ■ ACKNOWLEDGMENTS

Rayana R. Ruiz-Arellano thanks CONACYT (registration No. 289778) for the scholarship for the Ph.D. studies in the Ph.D. Program in Biomedical Sciences of Universidad Nacional Autonoma de Mexico. One of the authors (A.M.) acknowledges the support from CONACYT Project No. 175924 and PAPIIT Project No. IN201811 from the DGAPA-UNAM.

#### ■ REFERENCES

- (1) Mann, K.; Siedler, F. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2004**, *1696*, 41–50.
- (2) Leach, R. M. *Poult. Sci.* **1982**, *61*, 2040–2047.
- (3) Hincke, M. T.; Gautron, J.; Tsang, C. P.; McKee, M. D.; Nys, Y. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32915–32923.
- (4) Nys, Y.; Hincke, M. T.; Arias, J. L.; García-Ruiz, J. M.; Solomon, S. E. *Avian Poult. Biol. Rev.* **1999**, *10*, 143–166.
- (5) Nys, Y.; Gautron, J.; McKee, M. D.; García-Ruiz, J. M.; Hincke, T. *World's Poult. Sci. J.* **2001**, *57*, 401–413.
- (6) Nys, Y.; Gautron, J.; García-Ruiz, J. M.; Hincke, M. T. *C. R. Palevol* **2004**, *3*, 549–562.
- (7) Gautron, J.; Nys, Y. *Function of Eggshell Matrix Proteins; In Bioactive Egg Compounds; Huopalahti, R., López-Fandiño, R., Anton, M., Schade, R., Eds.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2007; Chapter 17, pp 109–115.*
- (8) Rose, M. L. H.; Hincke, M. T. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2707–2719.
- (9) Mann, S. *Nature* **1988**, *332*, 119–124.
- (10) Weiner, S.; Addadi, L. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 252–256.
- (11) Hincke, M. T.; Nys, Y.; Gautron, J.; Mann, K.; Rodríguez-Navarro, A. B.; McKee, M. D. *Front. Biosci.* **2012**, *17*, 1266–1280.

- (12) Tullet, S. G. Egg shell formation and quality; *Egg Quality Current Problems and Recent Advances*; Wells, R. G.; Belyavin, C. G., Eds.; Butterworth: London, U.K., 1987; pp 123–146.
- (13) Brionne, A.; Nys, Y.; Hennequet-Antier, C.; Gautron, J. *BMC Genomics* **2014**, *15*, No. 220.
- (14) Hincke, M. T.; Tsang, C. P.; Courtney, M.; Hill, V.; Narbaitz, R. *Calcif. Tissue Int.* **1995**, *56*, 578–583.
- (15) Mann, K.; Siedler, F. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1999**, *47*, 997–1007.
- (16) Reyes-Grajeda, J. P.; Moreno, A.; Romero, A. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40876–40881.
- (17) Reyes-Grajeda, J. P.; Marín-García, L.; Stojanoff, V.; Moreno, A. *Acta Crystallogr., Sect F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2007**, *63*, 987–989.
- (18) Lakshminarayanan, R.; Kini, R. M.; Valiyaveetil, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 5155–5159.
- (19) Lakshminarayanan, R.; Valiyaveetil, S.; Rao, V. S.; Kini, R. M. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 2928–2936.
- (20) Mann, K. *Br. Poult. Sci.* **2004**, *45*, 483–490.
- (21) Mann, K.; Siedler, F. *Comp. Biochem. Physiol.* **2006**, *143*, 160–170.
- (22) Drickamer, K.; Taylor, M. E. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1993**, *9*, 237–264.
- (23) Drickamer, K. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *5*, 585–590.
- (24) Mann, K.; Macek, B.; Olsen, J. V. *Proteomics* **2006**, *6*, 3801–3810.
- (25) Lakshminarayanan, R.; Joseph, J. S.; Kini, R. M.; Valiyaveetil, S. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 741–751.
- (26) Freeman, C. L.; Harding, J. H.; Quigley, Q.; Rodger, P. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5135–5137.
- (27) Domínguez-Vera, J. M.; Gautron, J.; García-Ruiz, J. M.; Nys, Y. *Poult. Sci.* **2000**, *79*, 901–907.
- (28) Yi-Tzu, C.; Hung, S.; Tiao-Lai, H.; Hung-Chun, C.; Wen-Jeng, W.; Pei-Chang, W.; Deng-Chyand, W.; Jentaie, S. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *415*, 266–275.
- (29) Schiller, J.; Arnhold, J.; Benard, S.; Müller, M.; Reichi, S.; Arnold, K. *Anal. Biochem.* **1999**, *267*, 46–56.
- (30) Marín-García, L.; Frontana-Urbe, B. A.; Reyes-Grajeda, J. P.; Stojanoff, V.; Serrano-Posada, H. J.; Moreno, A. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1340–1345.
- (31) Roberston, W. G. The Solubility Concept; *Biological Mineralization and Demineralization*; Nancollas, G. H., Ed.; Springer-Verlag: London, UK, 1982; Vol 23, pp 5–21.
- (32) Nys, Y.; Zawadzki, J.; Gautron, J.; Mills, A. D. *Poult. Sci.* **1991**, *70*, 1236–1245.
- (33) Ruiz-Arellano, R. R.; Serrano-Posada, H. J.; Marín-García, M. L.; Frontana-Urbeand, B. A.; Moreno, A. Chemical Biosensors Based on Proteins Involved in Biomineralization Processes. In *Biosensors – Emerging Materials and Applications*; Serra, P. A., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2011; Vol. 1, Chapter 26, pp 589–600.
- (34) Hernández-Hernández, A.; Vidal, M. L.; Gómez-Morales, J.; Rodríguez-Navarro, A. B.; Labas, V.; Gautron, J.; Nys, Y.; García Ruiz, J. M. *J. Cryst. Growth* **2008**, *310*, 1754–1759.
- (35) Hernández-Hernández, A.; Rodríguez-Navarro, A. B.; Gómez-Morales, J.; Jimenez-Lopez, C.; Nys, Y.; García-Ruiz, J. M. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1495–1502.
- (36) Jimenez-Lopez, C.; Rodríguez-Navarro, A.; Domínguez-Vera, J. M.; García-Ruiz, J. M. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2003**, *67*, 1667–1676.
- (37) Sharp, R. M.; Silyn-Roberts, H. *Biophys. J.* **1984**, *46*, 175–179.
- (38) Lakshminarayanan, R.; Jun Loh, X.; Gayathri, S.; Sindhu, S.; Banerjee, Y.; Kini, M. R.; Valiyaveetil, S. *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 3202–3209.



# Chemical Biosensors Based on Proteins Involved in Biomineralization Processes

Rayana R. Ruiz-Arellano<sup>1</sup>, Hugo Javier Serrano-Posada<sup>2</sup>, María Liliana Marín-García<sup>3</sup>, Bernardo A. Frontana-Uribe<sup>4,5</sup> and Abel Moreno<sup>1</sup>

*Universidad Nacional Autónoma de México*

<sup>1</sup>*Instituto de Química*

<sup>2</sup>*Instituto de Biotecnología*

<sup>3</sup>*FES-Cuautitlán*

<sup>4</sup>*Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM*

<sup>5</sup>*Permanent position at the Instituto de Química-UNAM Circuito Exterior*

*Mexico*

## 1. Introduction

Biomineralization processes are involved in bone and teeth formation, optical/acoustic/magnetic sensors (Mann, 2001), even as in pathological aspects like cardiovascular calcifications, renal or gallbladder stones and others (Narayana & Subramanian, 2010). A remarkable example is the formation of eggshell in avians. The eggshell is the only rigid part of an avian egg, made up of calcium carbonate and some biological macromolecules. The eggshell is a mineral structure with a highly specialized function (Lammie et al., 2005). The question about the role of individual matrix proteins in avian eggshell calcification is an important subject of investigation (Hincke et al., 1999). This is so because the role of individual matrix proteins in avian eggshell calcification is poorly understood, and has never been investigated as calcium or carbonate's biosensors have. Lakshminarayanan et al., (2005) have done a comparative study of the structure/function relationship of avian eggshell matrix ansocalcin and ovocleidin-17 (OC-17) proteins. These two proteins belong to the C-type lectin family, and share a high degree of similarity, though they interact differently with the growing calcium carbonate crystals, which suggest that their role in eggshell calcification is different as shown by Reyes-Grajeda et al., (2003).

Nowadays, an increasing number of studies in C-type lectin-like proteins contained in the avian eggshell matrix have been reported elsewhere (Drickamer, 1999) but they have not been considered as biological sensors for inorganic ions. In this way, Mann & Siedler have determined the amino acid sequence of OC-17, a major protein of the hen's (*Gallus gallus*) eggshell (Mann & Siedler, 1999); later, struthiocalcin-1 and 2 (SCA-1 and SCA-2) present in ostrich (*Struthio camelus*) eggshell matrix (Mann & Siedler, 2004), and they have recently, elucidated the amino acid sequence of two proteins of emu (*Dromaius novaehollandiae*) dromaiocalcin-1 and 2 and two proteins in rhea (*Rhea americana*) rheacalcin-1 and 2 (Mann & Siedler, 2006). Mann suggested that the structure of the ostrich eggshell was very similar to that of avian eggshells; for example, ansocalcin had the same number of aminoacid

sequences. SCA-1 contained 132 amino acids, the mass determined by ESI mass spectrometry was  $15,343.2 \pm 4$  Da, while SCA-2 contained 142 amino acids, the mass determined by electrospray ionization (ESI) mass spectrometry was  $16,834.1 \pm 2$  Da (Mann & Siedler, 2004).

In this chapter, we report the purification and characterization of SCA-1 and 2, two proteins isolated from the intramineral part of the ostrich's eggshell, Ansocalcin (ANCA) found in goose eggshell matrix. In order to obtain a better insight about its solubility behavior at different temperatures in water, as well as in the presence of carbonate ions, Dynamic Light Scattering (DLS) experiments were carried out. The selectivity and chemical recognition of proteins present in the eggshell for carbonate ions (carbonate biosensors), was sorted out by means of electrochemical and dynamic light scattering methods. It was verified the influence of  $\text{CO}_3^{2-}$  concentration on the electrochemical and on the DLS responses using the intramineral proteins SCA-1, SCA-2, Ansocalcin (ANCA) and hen egg white Lysozyme (LYS), which is not intramineral and was used as protein control. The DLS experiments confirmed the protein-carbonate's interaction observed by means of electro-analytical methods.

## 2. Experimental

### 2.1 Protein purification

This was done following and modifying the procedure of Mann and Siedler (2004). The ostrich as well as goose's eggshells were treated with 5% (v/v) EDTA for one hour to facilitate the removal of the organic membranes. The calcified layer was then extracted with 10% acetic acid (20 ml/g of eggshell) at 4 °C for 48 h stirring constantly. The solution was then filtered and concentrated using an ultra filtration cell (Amicon cellulose filter YM3) of 3KDa molecular weight cut. The concentrated solution was dialyzed against 5 x 10 vol. of 5% acetic acid. The dialyzed solution was saturated with ammonium sulfate in order to precipitate all proteins. After 24 h, the solution was centrifuged at 64,500g for 30 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was resuspended and dialyzed against 5% (v/v) acetic acid in order to remove the ammonium sulfate. The resulting solution was filtered using PVDF filters (Millipore) of 0.45  $\mu\text{m}$ . The resulting solution was injected into a Vydac C18 HPLC reverse phase column and eluted using a gradient of acetonitrile (100 %) with 0.1 % (v/v) TFA for 85 minutes at a rate flow of 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Along the purification step two proteins were observed, SCA-1 ( $R_t=58.765$  min) at a higher concentration and SCA-2 ( $R_t=56.26$  min) at a lower concentration as reported previously (Mann and Siedler, 1999). In the particular case of Ansocalcin, only one protein was obtained ( $R_t=58.0$  min) using the same gradient as that reported for SCA-1 and SCA-2 adjusted to our experimental set up for chromatographic procedures. All proteins were purified in an Ultra Fast Liquid Chromatographer (UFLC, Shimadzu Model Prominence), and obtained in a high degree of purity as shown by the electrophoresis gel (Figure 1), highly pure Lysozyme (recrystallized six times) was purchased from Seikagaku Kogyo Co., Japan (Code 100940).

### 2.2 Dynamic light scattering

The analysis of the hydrodynamic radius and the degree of aggregation versus temperature were obtained from the Zeta Sizer software version 6.20 DTS (Nano) (Malvern, Ltd.). A Malvern Nano S apparatus with a NIBS laser technology was used. For these studies,

solutions of SCA-1, SCA-2, Ansocalcin, and Lysozyme (control) were prepared in distilled water. All these three intramineral proteins (SCA-1, SCA-2, ANCA) as well as Lysozyme were thermally analyzed in their aggregation behavior ranging from 5-30 °C in steps of 1°C. For all proteins analyzed in dynamic light scattering the final concentration was 1.0 mg/mL.

### 2.3 Electrochemical investigations

The electro-analytical determinations of carbonate response for SCA-1 and SCA-2 were carried out by cyclic voltammetry (100 mVs<sup>-1</sup>) in an AUTOLAB PGSTAT 30 potentiostat/galvanostat following the procedure published by Marín-García *et al.* (2008). For these experiments, all maximum currents for each addition of carbonate ions at different concentrations respect to a voltage of 1.3V vs SCE (Saturated Calomel Electrode) using the protein adsorbed carbon paste electrode, were divided by current of the pure carbon paste electrode to obtain a normalized curve  $I/I^0$  vs carbonate concentration. This electrochemical procedure was suitable to detect the interaction between these proteins (10 µg included in the working electrode) and carbonate ions (ranging from 0 to 14 mM) for SCA-1 and SCA2. It is worth mentioning that in electrochemistry an inert electrolyte is always required for these types of experiments, so in all cases LiClO<sub>4</sub> 0.1 M was used as supporting electrolyte, and the electrochemical response (current) of the carbonate oxidation on the pure carbon paste electrode was used as the control experiment. The analyzed proteins did not show any electrochemical response in this medium. This electroanalytical methodology was not suitable to be applied to ANCA due to the limitation of amount of protein purified from the natural source, where the yield is very low compared to SCA-1 and SCA-2 from the ostrich eggshell.

### 3. Results and discussion

The purity of all the proteins used in this research were analyzed and characterized by means of biochemical methods as have been shown in the gel of electrophoresis (Figure 1). In order to verify the feasibility of constructing a carbonate's biosensor using these intramineral proteins contained in the avian eggshells, we based our electroanalytical analyses using the first prototype designed by Marín-García *et al.* (2008).

Nowadays, proteins play an important role in the development of novel electroanalytical devices because of their high selectivity for certain analytes. However, there is the possibility of using them for monitoring biomolecules during diagnostic tests in different clinical areas (Chien *et al.*, 2009; Cosnier, 1999; Navratilova *et al.*, 2006). Recently, the development of a protein biosensor used to detect a specific class of antibiotic or any other biological important species have been reported elsewhere (Amine & Palleschi, 2004; Li *et al.*, 2006; Mechler *et al.*, 2006). Most of the proteins, which have been used for these types of structural and biomedical research, need to be in a higher degree of purity.

In our experiments, for the electroanalytical results a clear final difference of the electrode response was observed after the protein adsorption on the surface of the electrode. An enhancement of the capacitive current and the change of the barrier potential were the most important features proving the presence of the protein. The stability of the adsorption was verified every 10 minutes using a cyclic voltammetry of the biosensor dipped into the electrolyte solution. The response of cyclic voltammetry for proteins SCA-1 and SCA-2 in period of one hour remained unchanged after protein-adsorption. Once the stability of the protein on the biosensor was checked, its electrochemical response towards the carbonate

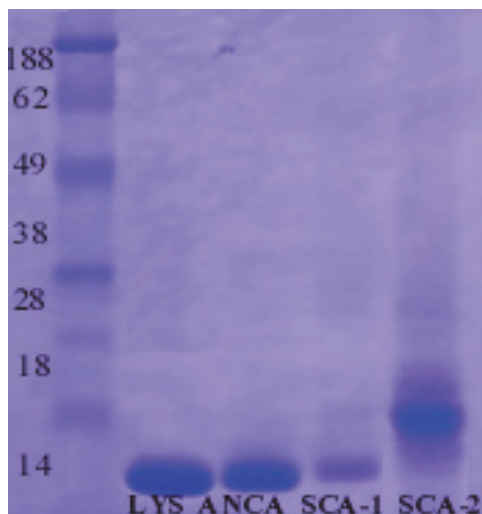


Fig. 1. SDS-PAGE electrophoresis gel for highly purified proteins used for this research: first lane corresponds to MW markers, the second to Lysozyme (lys), third to Ansocalcin (ANCA), the fourth and fifth for struthiocalcins 1 and 2 (SCA-1 and SCA-2) respectively.

ion was investigated. In Figure 2, the electrochemical response in terms of the normalized current measured at 1.3 V vs SCE (Saturated Calomel Electrode, anodic barrier) with respect to  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  concentration is shown. Due to the absence of an electrochemical peak to follow the electrochemical response, the current related to the anodic barrier, which corresponds to the oxidation of carbonate anions, was monitored. The protein SCA-1, for instance, showed a higher slope and a clear linear response ( $R^2=0.98$ ) of the current when carbonate concentration in the solution was ranging from  $10^{-3}$  to  $10^{-2}$  M and a slope less remarkable for SCA-2. This range was selected to show the response of the biosensor with the isolated proteins from the eggshell, but it must be clarified that the biosensor could also give a good response at lower carbonate concentrations or higher sensibility.

The comparison of the slope values for these analyzed proteins demonstrated that the biosensor containing SCA-1 was 2.7 times more sensitive to carbonates, than the pure carbon paste electrode.

Although these experiments were highly sensitive for detecting protein-carbonate ions interactions, when applied to proteins SCA-1 and SCA-2, it was nevertheless a challenge to look for another methodology to detect these interactions (chemical recognition) using a simple experimental set up. By means of using photon correlation spectroscopy methods like dynamic light scattering (DLS) can be performed easily using higher amounts of carbonate ions ranging from 10mM to 100mM as those found in the intrauterine fluid in avian (Domínguez-Vera et al., 2000), and less amount of protein sample.

Many proteins aggregate to some extent when they are in pure water. At low ionic strength, the tendency to form aggregates is usually lower and became more soluble at certain pH values (salting-in effect). However, in a transparent solution, it is difficult either to evaluate the homogeneity or the inhomogeneity of the biological aggregates in solution. So, dynamic light scattering methods were used to characterize the homogeneity, the conformational stability, and thermal properties of these proteins. On the whole, the analyzed range of

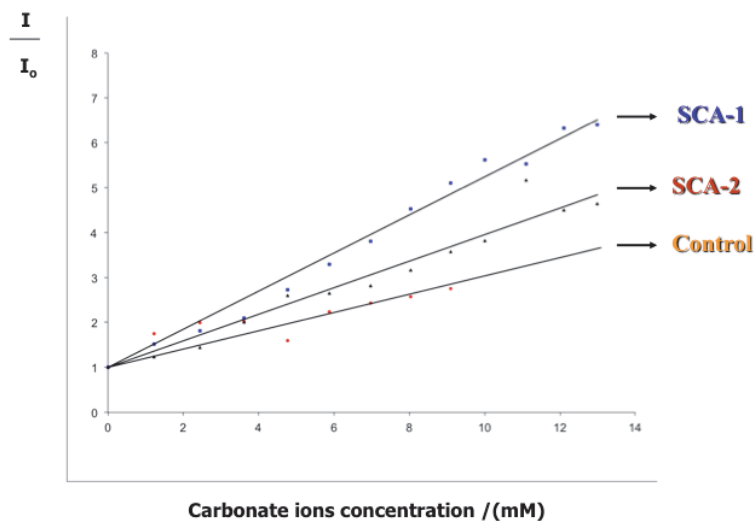


Fig. 2. Fig. 2. Plot of normalized ( $I/I_0$ ) electrochemical response taken at 1.3V for all cyclic voltammograms versus concentration of carbonate ions using an electrode of carbon paste.

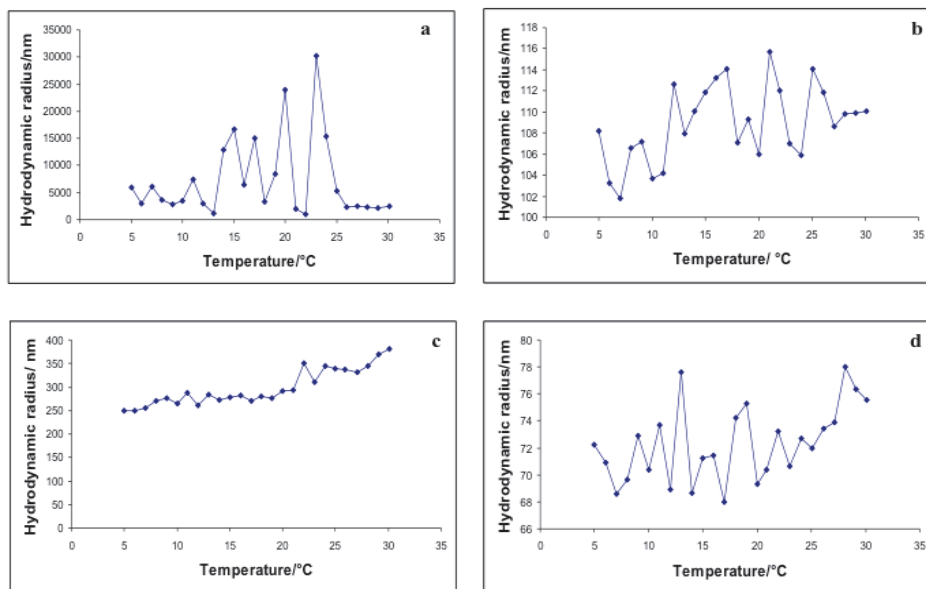


Fig. 3. Dynamic light scattering aggregation behavior for a) SCA-1, b) SCA-2, c) SCA-1 filtered, and d) SCA-2 filtered.

temperatures (5 to 30 °C), dynamic light scattering experiments for SCA-1, SCA-2 showed a fully random aggregation behavior with huge aggregates (Figure 3a and 3b respectively). However, when filtering the protein solution a few small and slightly homogeneous aggregates were observed for SCA-1 in water as shown in Figure 3c (ranging from 250 to 350 nm in their hydrodynamic radii) when for SCA-2 these aggregates were small and inhomogeneous (Figure 3d).

On the other hand, when adding different concentrations of carbonate ions (10mM, 70mM and 100mM as shown in Figure 4 a-c respectively). This protein SCA-1 was stable showing a highly homogeneous particle size distribution (around 40 nm in hydrodynamic radius) when 70 mM sodium carbonate was added to the protein sample along the DLS analysis and thermal behavior (Figure 4 b). It is clearly observed that the particle size distribution is a function of carbonates concentration. The homogeneous hydrodynamic radius observed on these experiments could be explained in terms of a well-defined aggregation process that generates smallest species at 100mM and the biggest at 10mM. On the other hand, SCA-2 for instance, showed almost the same behavior (Figure 4 d-f) obtained for SCA-1, but at higher concentrations of sodium carbonate (ranging from 70 mM to 100mM) as shown in Figure 4 f. In this case the aggregate size distribution did not follow a clear tendency like in SCA-1 with the concentration, although the hydrodynamic radii were also function of carbonates concentration value, which demonstrates that the process to form them occurs but by different mechanism.

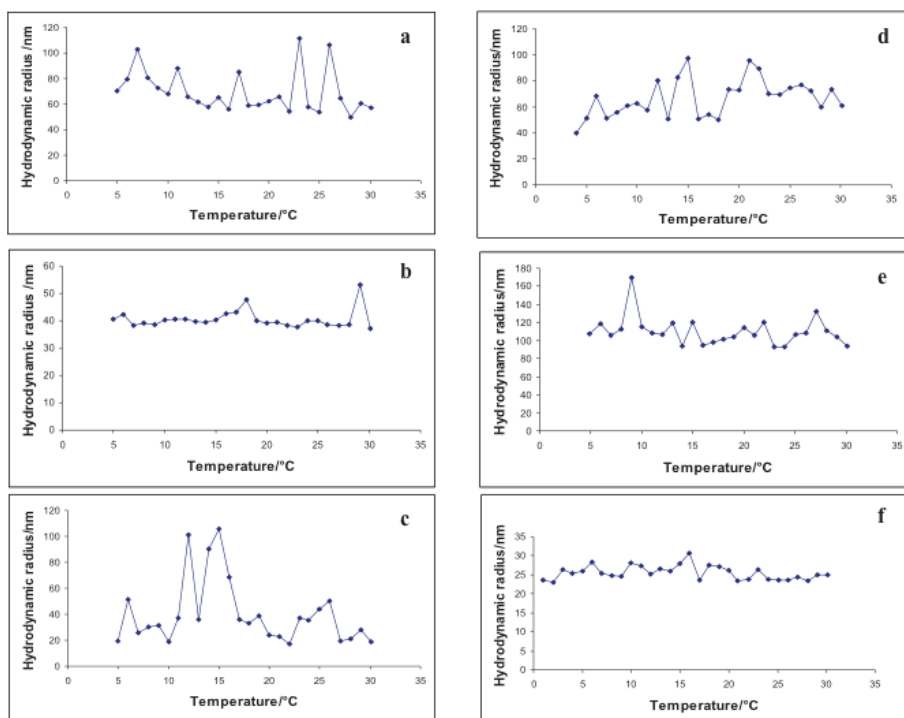


Fig. 4. Dynamic light scattering aggregation behavior for SCA-1 at a) 10mM, b) 70mM and c) 100mM sodium carbonate; the same for SCA-2 from d) 10mM, e) 70m, and f) 100mM.

In the particular case of Ansoalcin (Figure 5 a-d), this homogeneous size distribution behavior was obtained starting at 10°C ranging from 10mM concentration of sodium carbonate as that obtained for SCA-1, from the filtered solution (Figure 5 a) to the addition of 10mM, 70mM, and 100mM sodium carbonate (Figure 5b, 5c, and 5d respectively). This protein did not show the aggregation trend observed for SCA-1 and SCA-2, which demonstrates that ANCA is less sensitive to the carbonate ions recognition. It is worth mentioning that goose eggshell contains only one intramineral protein (called ANCA). This result is particularly interesting in terms of the conformational stability, and chemical recognition function of these intramineral proteins as biological sensors for carbonate ions. While SCA-1 is very sensitive, ANCA is less sensitive in all range of specific concentrations of sodium carbonate (from 10mM to 70mM), and slightly more homogeneous at 70mM concentration, which is equivalent to those concentrations found in the intrauterine fluid in avian. The protein SCA-2 is sensitive at higher concentrations of carbonate ions (100 mM), which is probably less sensitive to carbonate ions interactions than SCA-1 (see Figure 4f). These dynamic light scattering experiments gave us a double check methodology to prove our electrochemical approach shown in Figure 2. However, the procedure via light scattering methods is less time-consuming, needs less amount of sample, and it is non-destructive for analyzing these protein-carbonate interactions.

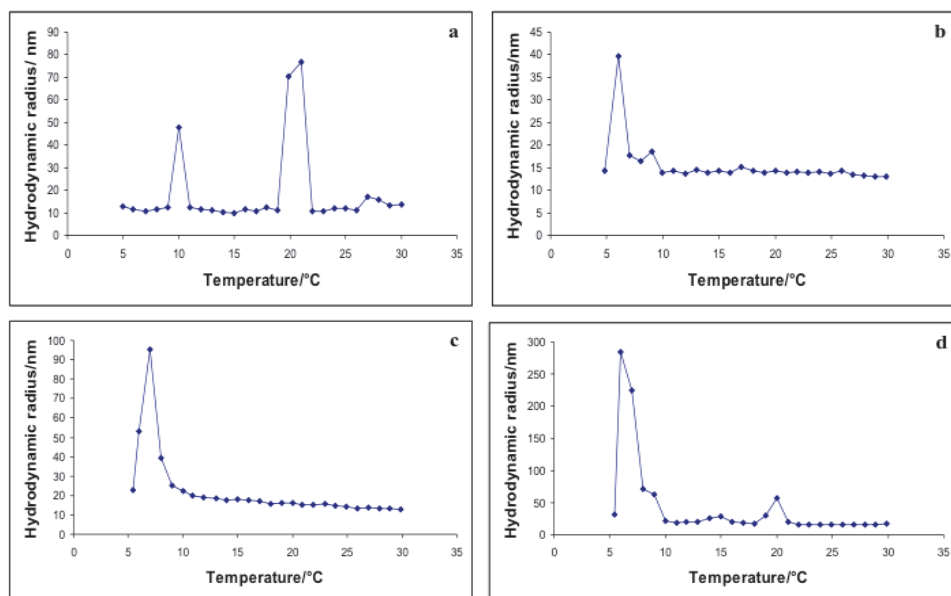


Fig. 5. Dynamic light scattering aggregation behavior for ANCA: a) filtered solution, b) in the presence of 10mM, c) 70mM, and d) 100mM of sodium carbonate respectively.

Based on the present results, it is also possible to propose that the mineralization of calcium carbonate (calcite) process that gives rise to avian eggshell formation is fostered by proteins like SCA-1 in ostrich or ANCA for goose eggshell (or from the biological point of view maybe controlled by some genes), which have an specific biological function during this process. These would give rise to crystalline arrays that favor the formation of highly

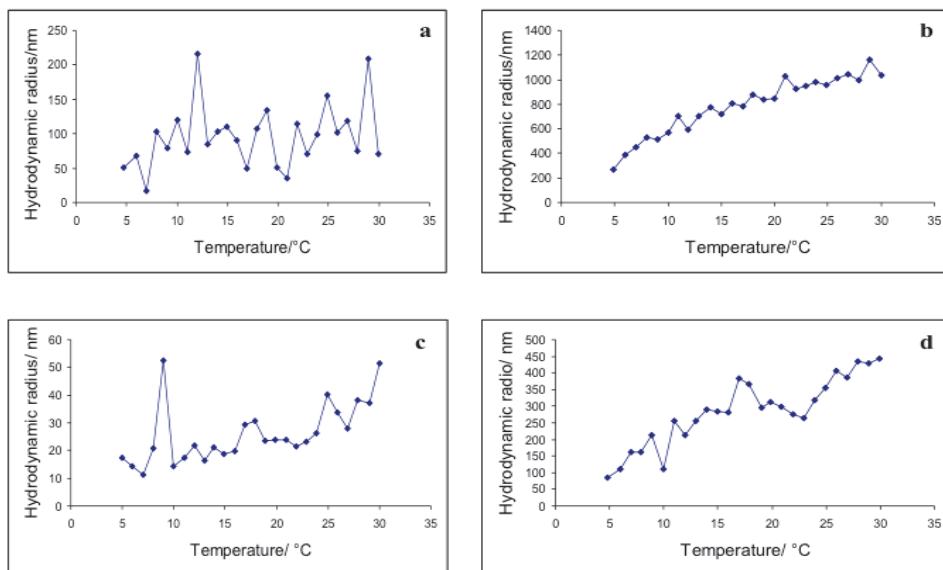


Fig. 6. Dynamic light scattering aggregation behavior for Lysozyme: a) filtered solution, b) in the presence of 10mM, c) 70mM, and d) 100mM of sodium carbonate respectively.

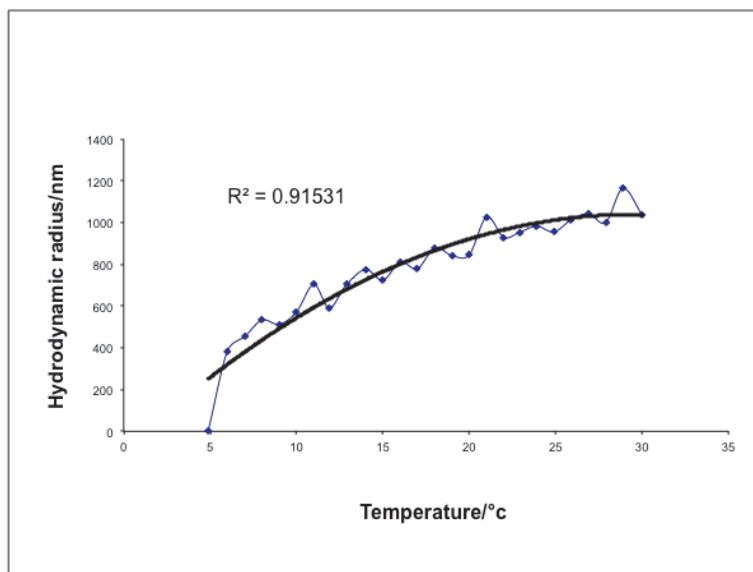
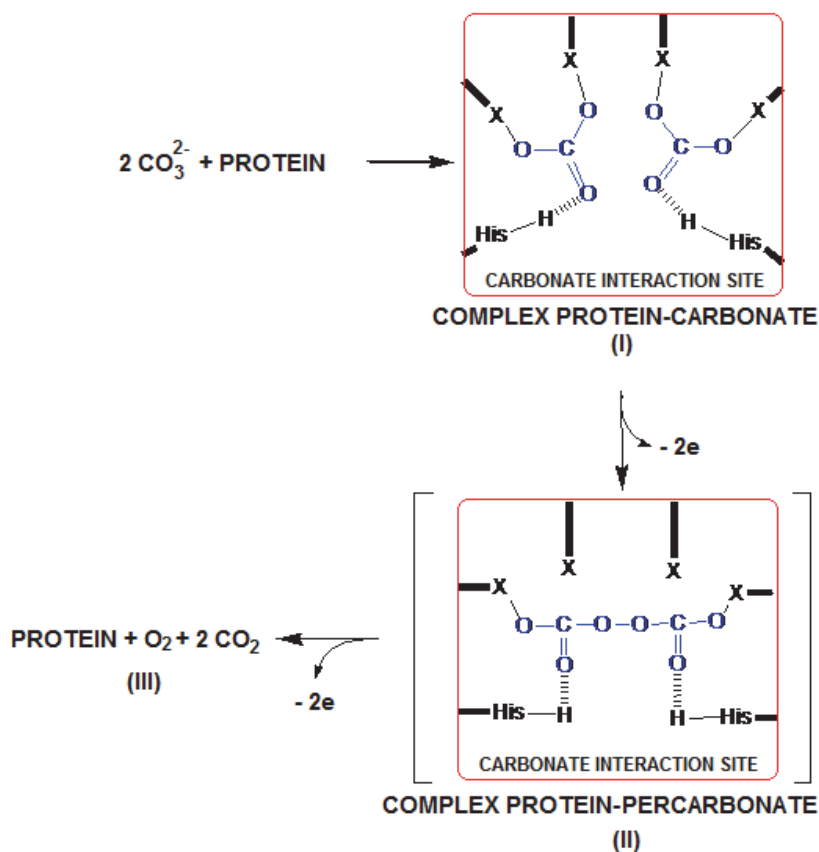


Fig. 7. Curve fitting of lysozyme aggregates growth for a quadratic power of the hydrodynamic radius versus temperature. The fitting equation was  $Y = -1.2945x^2 + 76.566x - 92.554$



selective polycrystalline aggregates, which have the specific features to develop the duties for which these rigid structures have being designed (Li & Stroff, 2007). Finally, hen egg white lysozyme, used as control, did not show a remarkable effect (Figure 6 a-d). This protein is not intramineral, nonetheless it could play an important role also in the calcification of eggshell as has been published recently (Wang et al., 2009). This can be assumed by looking at Figure 6b where 10 mM sodium carbonate was added and a trend was observed; the hydrodynamic radius varies from 200 to 1200 nm in the range of temperatures from 5 to 30°C compared to other values (Figure 6 c, d), where the random aggregates size distribution was ranging from 10 to 400 nm, when adding 70 mM and 100 mM sodium carbonate respectively. From the crystal growth point of view, this linear aggregation behavior for lysozyme is more related to the influence of the ionic strength to the growth of the nucleus of lysozyme than the carbonate ions recognition. The linear behavior of lysozyme aggregates (shown in Figure 6 b) was mathematically adjusted, and did show a quadratic growth fitting; when plotting a quadratic value or root square of the  $r_h$  (hydrodynamic radius) versus temperature (Figure 7).



Scheme 1. Proposed carbonate oxidation process through an interaction protein-carbonate

The selectivity towards carbonate ion observed with these proteins in electrochemical and DLS experiments could be explained by an interaction mechanism where two carbonate anions are fixed into a protein cavity named carbonate interaction site (Scheme 1, step I). In the case of the electrochemical experiments, this mechanism facilitates the first oxidation process producing the percarbonate ion that remains fixed at this site (step II). It can suffer a second oxidation step yielding as final products oxygen and carbon dioxide molecules (step III). The current value is enhanced due to an enriched mass transfer during the oxidation process because both reactants are confined on the protein adsorbed on the electrode surface. Finally, based on Figures 3 to 5 those clearly show the solution of the dilemma about the selectivity of these proteins for carbonate ions. At least three of the intramineral proteins SCA-1, and SCA-2 (concentration dependent) as well as ANCA (less sensitive) interact directly with carbonate ions as proven by using electroanalytical methods (for SCA-1 and 2), and dynamic light scattering techniques for all of them. This fact opens the first possibility of explaining the mechanisms of calcite mineralization in the eggshell as well as the potential applications of SCA-1, SCA-2, and ANCA as plausible carbonate ions biosensors.

#### 4. Conclusion

The idea of designing carbonate biosensors would be based on these types of experiments, which demonstrated interaction between SCA-1, SCA-2 and ANCA with carbonate anions. The electroanalytical characterization, and limits of the biosensor containing intramineral proteins could be estimated in this contribution combining both methods cyclic voltammetry, and photon correlation methods like dynamic light scattering.

#### 5. Acknowledgment

The authors acknowledge financial support from the DGAPA-UNAM through projects No. IN201811 and IN212207-3. Rayana R. Ruiz Arellano acknowledges the scholarship for a PhD from C.L.A.F., and the Institute for Science and Technology of Mexico City (ICyTDF) and CONACYT (complementary scholarship as an assistant researcher for SNI 3). Finally, one of the authors (A.M.) acknowledges the partial support of CONACYT (Mexico) project No. 82888.

#### 6. References

- Amine, A., Palleschi, G. (2004) Phosphate, Nitrate, and Sulfate Biosensors. *Analytical. Letters* 37, pp. 1-19. ISSN 0003-2719.
- Cosnier, S. (1999). Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerization films. *Biosensors and Bioelectronics*. 14, pp. 443-456. ISSN 0956-5663.
- Chien, Y.-C., Hincke, M.T., McKnee, M.D. (2009). Avian Eggshell Structure and Osteopontin. *Cells Tissues Organs*. 189 pp. 38-43. ISSN 1422-6405.
- Dominguez-Vera, J. M., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., Nys, Y. (2000). The effect of avian uterine fluid on the growth behavior of calcite crystals. *Poultry Science* 79, pp. 901-907. ISSN 0032-5791.

- Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, pp. 585-590. ISSN 0959-440X.
- Hincke, M.T., Gautron J., Tsang, Ch. P.W., McKnee, M.D., Nys, Y. (1999). Molecular Cloning and Ultrastructural Localization of the Core Protein of an Eggshell Matrix Proteoglycan, Ovocleidin-116, *Journal of Biological Chemistry* Vol. 274, pp 32915-32923. ISSN 0021-9258.
- Lammie, D., Bain, M. M., Solomon S. E., Wess, T. J. (2005). The Physiology of Avian Eggshell, *Current Topics in Biotechnology*, Vol. 2, pp 65-74, ISSN 0972-821X.
- Lakshminarayanan, R., Joseph, J. S., Kini, R. M., and Valiyaveetil, S. (2005). Structure-Function Relationship of Avian Eggshell Matrix Proteins: A Comparative Study of Two Major Eggshell Matrix Proteins. Anocalcin and OC-17. *Biomacromolecules*, 6, pp. 741-751, ISSN 1525-7797
- Li, H. & Estroff, L. A. (2007). Hydrogels Coupled with Self-Assembled Monolayers: An in Vitro Matrix To Study Calcite Biomineralization. *J. Am. Chem. Soc.* 129, pp. 5480-5483. ISSN 0002-7863.
- Li, I. T., Pham, E., Truong, K. (2006). Protein biosensors based on the principle of fluorescence resonance energy transfer for monitoring cellular dynamics. *Biotechnol Letters*. 28, pp. 1971-1982. ISSN 0141-5492.
- Mann, K. & Siedler, F. (1999). The amino acid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47, pp. 997-1007. ISSN 1039-9712.
- Mann, K. & Siedler, F. (2004). Ostrich (*Struthio camelus*) eggshell matrix contains two different C-type lectin-like proteins. Isolation, amino acid sequence, and posttranslational modifications. *Biochim. et Biophysica Acta.*1696, pp. 41-50. ISSN 09266585.
- Mann, K. & Siedler, F. (2006). Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 143B, pp. 160-170. ISSN 1095-6433.
- Mann, S. (2001). *Biomineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press, ISBN 0-19-850882-4, Oxford, UK.
- Marín-García, L., Frontana-Uribe, B.A., Reyes-Grajeda, J.P., Stojanoff, V., Serrano-Posada, H.J., Moreno, A. (2008). Chemical recognition of carbonate anions by proteins involved in biomineralization processes and their influence on calcite crystal growth. *Crystal Growth and Design*. 8, pp. 1340-1345. ISSN 1528-7483.
- Mechler, A., Nawaratna, G., Aguilar, M., Martin, L. L. (2006). A Study of Protein Electrochemistry on a Supported Membrane Electrode. *Int. J. of Peptide Research and Therapeutics* 12, No. 3 (2006) 217-224. ISSN 1573-3149.
- Navratilova, I., Pancera, M., Wyatt, R. T., Myszkka, D. G. (2006). A biosensor-based approach toward purification and crystallization of G protein-coupled receptors. *Analytical Biochemistry*. 353, pp. 278-283. ISSN 0003-2697.
- Narayana K. & Subramanian N. (2010). Crystallization from Gels In: *Handbook of Crystal Growth*, Dhanaraj, G., Byrappa, K., Prasad, V., Dudley, M. (Ed), pp. 1607-1636 Springer-Verlag, ISBN 978-3-540-74182-4, Berlin, Germany.

- Reyes-Grajeda, J. P., Moreno, A., Romero, A. (2004). Crystal Structure of Ovocleidin-17, a Major Protein of the Calcified *Gallus gallus* Eggshell. Implications in the calcite mineral growth pattern. *J. Biol. Chem.* 279, pp. 40876-40881. ISSN 0021-9258.
- Wang, X., Sun, H., Xia, Y., Chen, C., Xu, H., Shan, H., Lu, J. R. (2009). Lysozyme mediated calcium carbonate mineralization. *Journal of Colloid and Interface Science* 332, pp. 96-103. ISSN 0021-9797.

# Controlling the morphology of silica–carbonate biomorphs using proteins involved in biomineralization

N. Sánchez-Puig · E. Guerra-Flores · F. López-Sánchez ·  
P. A. Juárez-Espinoza · R. Ruiz-Arellano · R. González-Muñoz ·  
R. Arreguín-Espinosa · A. Moreno

Received: 26 September 2011 / Accepted: 11 November 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** Silica–carbonate biomorphs are inorganic self-organized structures that mimic the morphology of living organisms. In this study, we present the effect that proteins involved in the in vivo biomineralization of silica and calcium carbonate have on the formation of silica–carbonate biomorphs. We tested four different sources of protein: (1) struthiocalcin-1, (2) the catalytic domain of silicatein- $\alpha$  of *Tethya aurantia*, (3) a protein extract obtained from the spicules of a vitreous sponge (*Protosuberitis* sp.), and (4) a protein extract obtained from the spines of the sea urchin *Echinometra lucunter*. In addition to the well-established role that pH plays in biomorph formation, all the proteins tested controlled the morphology of these aggregates. Biomorphs obtained in the presence of the catalytic domain of silicatein- $\alpha$  were similar in shape to those observed in the control though considerably smaller in size. Struthiocalcin-1 affected the availability of carbonate ions and completely inhibited the formation of biomorphs resulting only in worm-like aggregates. Finally, novel biomorphs with shapes such as twisting rods, sunflowers, and mitotic cells were obtained in the presence of protein extracts from the marine sponge spicules and sea urchin spines.

N. Sánchez-Puig (✉) · E. Guerra-Flores · F. López-Sánchez ·  
P. A. Juárez-Espinoza · R. Ruiz-Arellano ·  
R. Arreguín-Espinosa · A. Moreno  
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de  
México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria,  
04510 México, DF, México  
e-mail: nuriasp@unam.mx

R. González-Muñoz  
Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación-Sisal,  
Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de  
México. Ex-Sanatorio Rendón Peniche, Calle 43 s/n, Col.  
Industrial, 97050 Mérida, YUC, México

## Introduction

The precipitation of barium and strontium carbonates inside silica gels at alkaline pH leads to the formation of crystalline aggregates named biomorphs. This term was coined after the resemblance of their morphology (formed mainly of non-crystallographic helicoidal filaments, or very thin sheets) to that of living organisms [1–3]. Biomorphs are self-assembled aggregates composed solely of inorganic material with two distinctive phases: a carbonate crystalline phase that grows aided by a second amphiphilic amorphous silica gel phase. The crystalline phase composed by orthorhombic alkaline earth carbonates such as witherite crystals ( $\text{BaCO}_3$ ) is enveloped by silica sheets that control both the nucleation frequency and the growth rate of the carbonate nuclei [4]. It has been proposed that biomorphs can be used to model the biomineralization processes that occur in nature by applying well-known theories of crystal growth [5].

Biomineralization is the formation of inorganic materials by biological means. It is a process widely distributed among living organisms and all six taxonomic kingdoms contain members that are able to form inorganic structures using biological molecules. These molecules, predominantly proteins, associate with the mineral phase and are known as the organic matrix. They change the texture, flexibility, and fracture characteristics of the mineral phase such that it behaves like a hard glass-like material rather than a crystal. Biomineralization involves the formation of structures that provide organisms with structural support and protection to their internal organs, as well as protection against predators. In humans, uncontrolled biomineralization is the hallmark for the development of several pathologies. The biological synthesis of calcium-based minerals plays a key role in the formation of bones, teeth,

and shells. Calcium carbonate biomineralization has been extensively studied using the formation of sea urchin skeletons and bird eggshells as models. Ovocleidin-17 (OC-17) was the first protein to be isolated from hen eggshells, while struthiocalcin-1 and -2 (SCA-1 and SCA-2, respectively) are homologous proteins present in ostrich eggshells. The three-dimensional structure of OC-17 shows that this family of proteins has a C-type lectin binding domain with affinity for carbonate ions rather than for its calcium counterpart. It has been proposed that a solvent exposed ring, rich in conserved basic residues, is responsible for the interaction with the carbonate ions [6–8]. The sea urchin skeleton consists of calcite rich in magnesium ions with less than 0.1% of organic matrix. This structure is built by primary mesenchymal cells that provide the amorphous calcium carbonate and the proteins for the organic matrix [9]. The most abundant proteins present in the sea urchin spicules are the spicule matrix proteins (SM family) and the primary mesenchyme cell-specific membrane-associated glycoproteins (MSP family). Similarly to the proteins in the bird eggshells, it has also been predicted that the sea urchin SM proteins have a C-type lectin-like domain. Though the residues forming the carbohydrate-binding site of a typical lectin are not conserved, suggesting they do not function as lectins. Despite the huge amount of information about the components of the sea urchin spicules, their structure, function and interaction with the mineral matrix are not well known [10–12]. In addition to calcium biomineralization, vitreous sponges and diatoms are able to precipitate silica in a process called biosilicification [13]. Vitreous sponges polymerize silica to create spicules that provide them with structural support. The formation of these structures is mainly mediated by an enzyme called silicatein [14]. Spicules contain a central canal named the axial canal which harbor an organic filament composed predominantly of the different isoforms of the silicatein [15]. Other molecules such as collagen and galectin important for spicule formation are also present in the axial canal [16]. The genes that codify for the silicateins suggest that they are members of the cathepsin-L subfamily of papain-like cysteine proteases [15]. Although no three-dimensional structure is yet available, it is predicted that they have a cathepsin L-like scaffold in which the cysteine of the catalytic triad is replaced by a serine essential for activity [17]. The natural substrate of the enzyme is yet unknown, nonetheless, *in vitro* is capable of condensing organosiloxanes and other compounds such as titanium, gallium, and zirconium oxides [18–20]. Due to these properties, silicateins are of high interest and potential importance for various applications in medicine and biotechnology, e.g., encapsulation and surface modification of biomaterials, as well as synthesis of nanostructures of silica (reviewed in [21–23]).

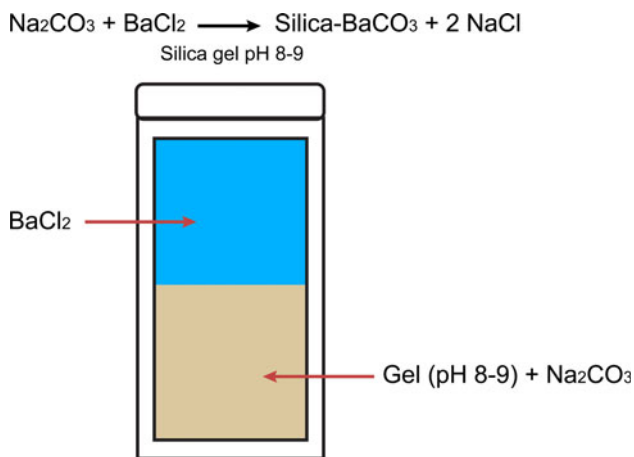
In this report we tested the effect that different biomineralization proteins have on the formation of BaCO<sub>3</sub> precipitates grown inside silica gels. Struthiocalcin-1 and silicatein- $\alpha$  have well-established roles in biomineralization acting on carbonate ions and on siloxanes, respectively. Struthiocalcin-1 completely blocked the formation of biomorphs whereas silicatein- $\alpha$  limited their growth in shape and size. On the other hand, the samples obtained from the spines of the sea urchin and from the spicules of the marine sponge, contain proteins involved in the biomineralization of calcium and silica, respectively. Novel biomorph shapes resembling sunflowers, mitotic cells, and twisted rods were obtained in the presence of these protein extracts.

## Materials and methods

Silica gels were prepared as described in [24], and Granada crystallization boxes<sup>TM</sup> (Triana Sci. and Tech. Spain) were used to set up the experiments. The gels were prepared by neutralization of a sodium silicate solution (Aldrich 33,844-3) with a density of 1.06 g/cm<sup>3</sup> using 1 M HCl. A titration plot was initially obtained to find the appropriate volumes of silicate and HCl to reach pH values ranging from 8 to 9. The final volume of silicate solution plus HCl was 5 ml for each GCB. Before the gelling of the sol, 100  $\mu$ l of sodium carbonate solution (0.1 M) or protein was added as described in Fig. 1. After obtaining the gel phase inside the GCB, 5 ml of 0.1 M BaCl<sub>2</sub> solution was poured onto the surface of the gel to diffuse Ba<sup>2+</sup> ions throughout the gel network containing either only carbonate ions or carbonate ions mixed with isolated proteins or protein extracts. Triplicate experiments were done in parallel adding different amounts of protein to the sol: 20 and 100  $\mu$ g of total protein for extracts obtained from the spicules of the sea urchin and the sponge, 172 and 860  $\mu$ g of purified SCA-1 and 10 and 50  $\mu$ g of the recombinant catalytic domain of silicatein- $\alpha$ . Photographs were taken a week after setting up the experiments in a microscope Leica DME equipped with an ocular Periplan 10 $\times$ /18. Pictures were processed with the program Helicon Focus (Helicon Soft Ltd.).

### Silicatein- $\alpha$ catalytic domain expression and purification

The plasmid pHLTEV-silicat $\alpha$  contains the gene encoding for the residues 113–330 of the silicatein isoform  $\alpha$  of *Tethya aurantia*. The clone was kindly obtained from Dr. Daniel Morse (University of California Santa Barbara, USA), reamplified by PCR and digested with *Bam*HI and *Eco*RI. The amplified fragment was subsequently purified



**Fig. 1** Granada crystallization box (GCB) used for the growth of silica-carbonate biomorphs

and ligated into the plasmid pRSETHisLipoTEV-HIF1 $\alpha$ 403-603 [25] (kindly provided by Professor Alan R. Fersht, LMB-MRC, UK) at the *Bam*HI and *Eco*RI sites. The final construct encodes an N-terminal 6 $\times$  histidine-tag, amino acids 1–85 of the *Bacillus stearothermophilus* dihydrolipoyl acetyltransferase domain and a TEV protease recognition site fused to the catalytic domain of the silicatein isoform- $\alpha$  of *Tethya aurantia*.

The plasmid pHLTEV-silicatz was transformed into *E. coli* C41, plated onto LB/ampicillin plates, and grown overnight at 37 °C. A single colony was used to inoculate 50 ml of LB medium containing 100  $\mu$ g/ml of ampicillin was grown overnight at 37 °C. 10 ml of this culture were used to inoculate 1 l of 2 $\times$ TY medium with antibiotic. At A<sub>600</sub> of 0.6, gene expression was induced with 0.5 mM isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactoside (IPTG), and the cells incubated for a further 4 h at 37 °C. Cells were harvested by centrifugation, the pellet was resuspended in Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) supplemented with 1 mM PMSF. The cell suspension was sonicated, and cell debris removed by centrifugation. The fusion protein was purified by applying the supernatant to a fast-flow Ni<sup>2+</sup> column (Qiagen) and eluted with Elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole). Protein fractions were pooled together and digested with His-TEV protease while dialyzing in Lysis Buffer. The digested protein was reintroduced onto the Ni<sup>2+</sup> column. Finally the protein was dialyzed against storage buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl) and stored at -70 °C. The ability of the sample to polymerize siloxanes was tested using tetraethyl orthosilicate as described in [26] and the presence of the product confirmed by IR spectroscopy [27] (data not shown).

### Struthiocalcin-1 purification

Struthiocalcin-1 was purified from 150 g of ostrich eggshell according to the method described in [28].

### Protein purification from vitreous marine sponge spicules

Spicules from the marine sponge (*Protosuberitis* sp.) were removed manually and treated as described in [15]. The soluble fraction was dialyzed against water and lyophilized. The resulting pellet was dissolved in distilled water and stored at -70 °C.

### Protein purification from sea urchin spines

Spines from adult sea urchin *Echinometra lucunter* were removed manually and 100 g of material was treated as described in [11]. The sample was dialyzed against water and stored at -70 °C for subsequent use.

## Results and discussion

In this report we tested the effect that silicatein- $\alpha$ , struthiocalcin-1, and proteins extracted from the spines of a sea urchin and from the spicules of a marine sponge have on the formation of BaCO<sub>3</sub> precipitates grown inside silica gels. The idea of using these four sources of proteins was based on the following rationale. The catalytic domain of silicatein- $\alpha$  is a protein with a well-established role on the polymerization of sodium metasilicate solutions. Biomorphs formation mainly depends on the availability of polysiloxane oligomers dissolved at these pH values. It is expected that silicatein- $\alpha$  will efficiently catalyze the polymerization of silicates reducing per se the formation of biomorphs and inhibiting the formation of their characteristic shapes. Second, the addition of struthiocalcin-1, a protein involved in the biomineralization of calcium carbonate in avian eggshell, would promote specific interactions with carbonate anions [6]. Thus, the biomorphs obtained in the presence of SCA-1 should be diminished due to the reduction of available carbonates that are part of the chemical structure of the silica biomorphs. Third, the use of a protein extract from marine sponge spicules should have an effect on silicate biomorphs formation by affecting the polymerization of sodium metasilicate. Finally, the protein extract from sea urchin spines should have a strong effect on barium carbonate precipitation since data available in the literature suggest that the proteins present in their spines directly participate in the precipitation of calcium. Protein purification from these marine organisms is not easy as the amount of protein obtained from their

spicules is very low, and obtaining enough quantities of any isolated protein would represent a huge ecological cost. Due to these reasons we used protein extracts rather than isolated proteins.

Figure 2 shows the chemical reactions that occur during silica-carbonate biomorphs synthesis. Sodium metasilicate solution contains a strong base in equilibrium with monosilicic acid. Lowering the pH of the solution to values ranging from 8 to 11 favors the polymerization of the monosilicic acid molecules through a condensation reaction. The formed polysiloxane oligomers act as a template (silicate membrane) for the deposition of  $\text{BaCO}_3$  crystallites that originate the silica-carbonate biomorphs. Condensation of additional  $\equiv\text{Si}-\text{O}$  molecules finally leads to the generation of the gel three-dimensional network. The studied proteins exerted their influence at different stages of the aforementioned pathway resulting in either a complete inhibition or changes in the morphology of the corresponding biomorphs (Fig. 2).

The experiments presented in this study were done at pH ranging from 8 to 9 which is where the most striking biomorphs shapes are observed [24]. At this pH the morphologies observed in the control experiment (without proteins) varied from helices to leaf-shaped laminas (Fig. 3). Helices were very well defined and could reach a length of 0.5 mm. Two different helices were observed: those composed of one sheet that twisted along the growing axis (Fig. 3a) and those formed by two threads intertwined with one another (Fig. 3b). These structures were obtained

when the diffusion pathway reached the middle region of the gel in the Granada crystallization box.

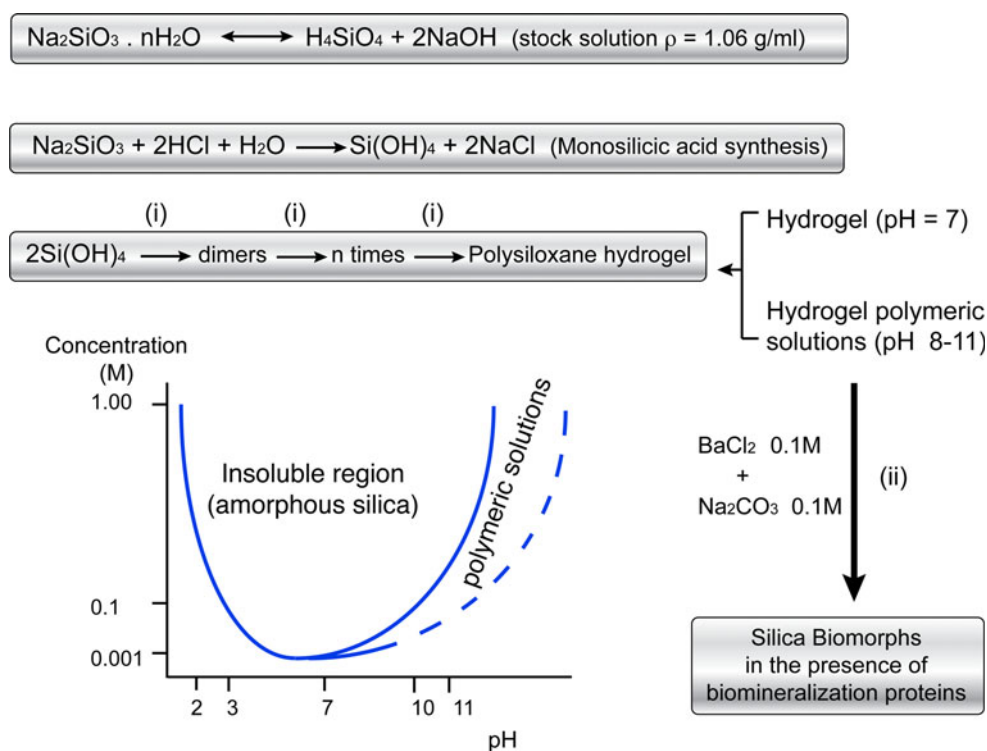
#### Biomorphs formation in the presence of struthiocalcin-1

The aggregates observed in the presence of this particular protein were completely different to those observed in the control. Figure 4 shows a series of worm-like structures of silica-carbonate biomorphs obtained in the presence of SCA-1. These shapes suggest that most of the biomorphs obtained are composed mainly of silicate and lack the typical induced crystalline morphology that we usually called silica-carbonate biomorphs. The higher the contents of SCA-1, the higher the tendency to form these worms-like structures made of precipitated silicate. A previous publication demonstrated that the protein SCA-1 is a naturally tailored-made carbonate biosensor (in avian eggshell biomineralization) that selectively recognizes  $\text{CO}_3^{2-}$  ions and does not interact with  $\text{Ca}^{2+}$  ions [6]. Thus, SCA-1 inhibits the formation of silica carbonate biomorphs by sequestering carbonate ions (chelating process) and producing a concatenated globular-like aggregation of polysiloxanes stabilized by  $\text{Ca}^{2+}$  around it (shadow in Fig. 4a).

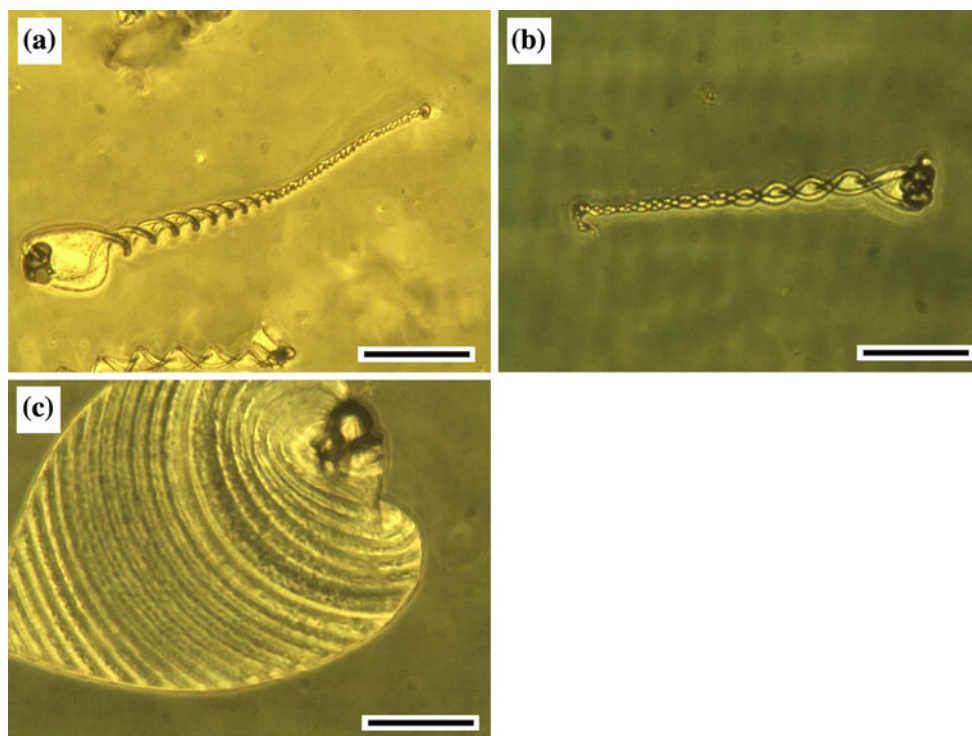
#### Biomorphs formation in the presence of silicatein- $\alpha$

The majority of the aggregates obtained in the presence of the catalytic domain of silicatein- $\alpha$  were similar to those

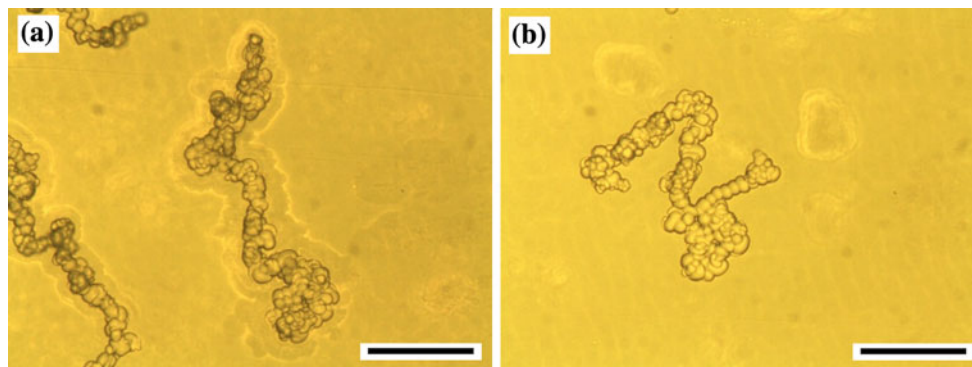
**Fig. 2** Synthesis of silica-carbonate biomorphs in the presence of different biomineralization proteins. (i) Stage at which silicatein- $\alpha$  and the protein extract from sponge spicules act and (ii) stage at which SCA-1 and the protein extract from sea urchin spines act







**Fig. 3** Control silica-carbonate biomorphs. **a, b** helical and **c** leaf-like aggregates. Scale bar 150  $\mu\text{m}$



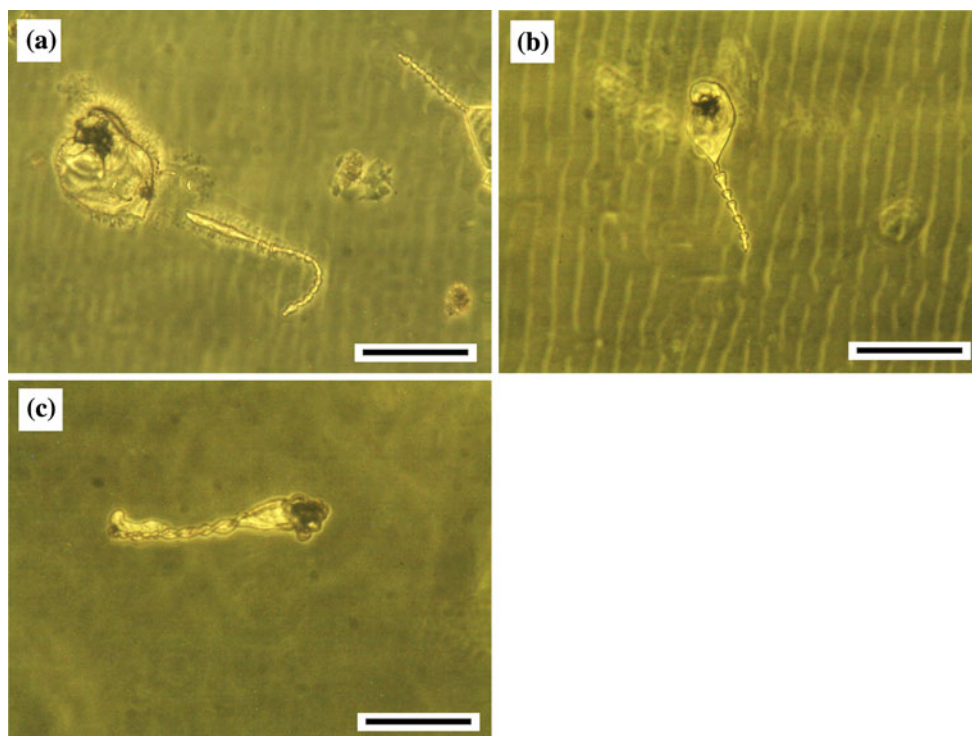
**Fig. 4** Worm-like biomorphs obtained in the presence of SCA-1. Scale bar 150  $\mu\text{m}$

observed for the control though smaller in size. Few helical shapes could be observed and they were half the size of those present in the control. Most of them grew as appendices of laminar plates and had irregular shapes. A comparison of the helical structures obtained in the control with those obtained in the presence of the catalytic domain of silicatein- $\alpha$  shows that they resemble a nodule-like chain growing out the laminar plates (Fig. 5). Normally, silicate ribbon aggregates are formed by epitaxial growth and osmotic pressure when crystallites of barium carbonate deposit on their surface [2]. Once these ribbon structures are totally covered with barium carbonate crystallites they continue to accumulate on the surface forming nodule-shaped aggregates. The reduction in size of the helical and

the laminar shapes, as well as the changes into nodule-shaped structures are the result of the silicatein- $\alpha$  acting specifically on the polymerization of sodium metasilicate at basic pH.

Biomorphs formation in the presence of a protein extract from marine sponge spicules

The effect of this extract clearly inhibited the characteristic helical and laminar shapes observed in the control experiment. The majority of the aggregates obtained were needle crystals of  $\text{BaCO}_3$  (Fig. 6a) mixed with some butterfly-like and sphere-like structures (Fig. 6b). This trend can be explained as an efficient polymerization of the silicates



**Fig. 5** Representative biomorphs obtained in the presence of the catalytic domain of silicatein- $\alpha$ . Scale bar 150  $\mu\text{m}$

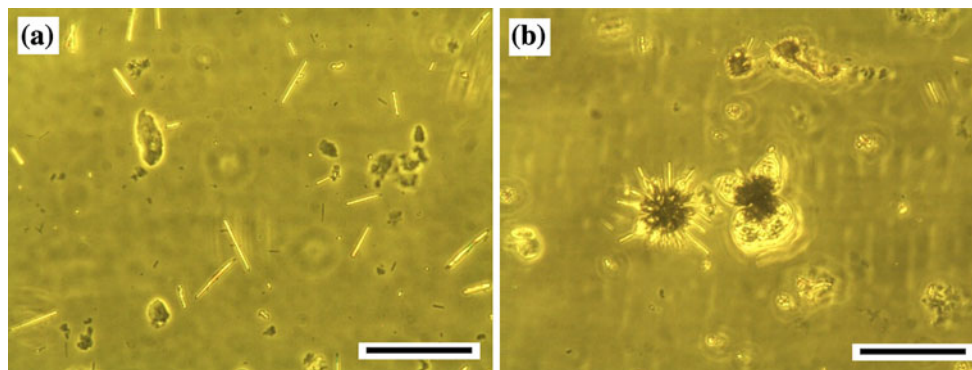
present in the polysiloxane structure due to a synergistic effect of the components of the extract. The sample used in this experiment may polymerize silicates more efficiently than silicatein- $\alpha$  alone, as it probably contains other proteins such as the silicatein- $\beta$  and - $\gamma$ , and galectin that are naturally present in the sponge spicules. A SDS-PAGE of this sample showed the presence of several proteins (data not shown). Thus, they probably elicit a synergistic effect on silicate polymerization and supersaturation of  $\text{BaCO}_3$ . Biomorphs obtained in the presence of silicatein- $\alpha$  and the protein extract of sponge spicules are different despite both being obtained in the presence of the former common protein. Clearly the other proteins or cellular components present in the spicule extract directly participate in the morphogenesis process causing the protein extract to have a greater impact on the biomorph morphology compared to that observed for the isolated protein.

#### Biomorphs formation in the presence of a protein extract from sea urchin spines

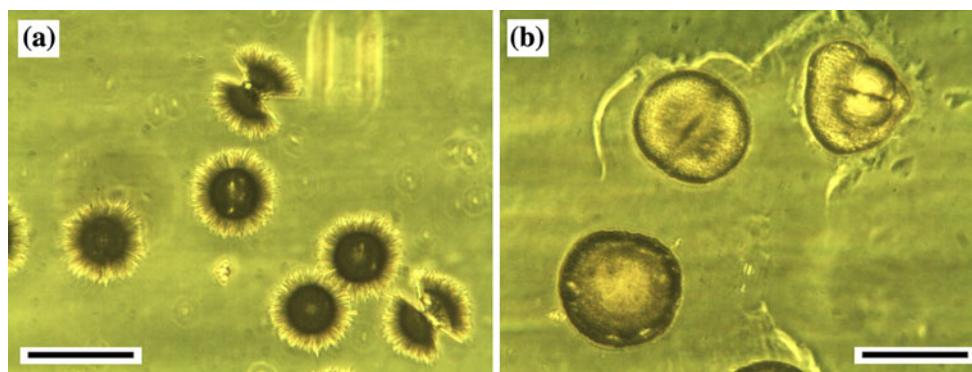
The extract of sea urchin spines produced two structures that were not observed in any of the controls: aggregates resembling a sunflower (Fig. 7a) and a mitotic cell-like precipitation (Fig. 7b). Although these shapes can be explained in terms of osmotic pressure mechanism proposed out by Garcia-Ruiz et al. [5], they were specifically obtained using only the extract from the sea urchin

spicules. Usually, these spines contain proteins that are believed to be involved in the deposition of calcium carbonate in the polymorph aragonite.

Marine sponges and sea urchins originated during the Pre- and Cambrian-periods, respectively. They are impressive organisms adapted to live initially in a reducing environment and recently under oxidizing conditions. These animals together with ancient microorganisms such as radiolarian and stromatolites evolved proteins that participate in the synthesis of their mineral skeletons from silica and calcium carbonate. Interestingly, archaean fossils recovered from the Monte Cristo Formation in South Africa 2600 Myr old have a remarkable shape similarity to that of the biomorphs obtained in the presence of the sea urchin protein extract, both resembling a dividing cell [29]. Furthermore, a transversal cut of the biomorphs obtained in the presence of SCA-1 may look very similar to the petrographic thin sections of presumptive archaean prokaryotic fossils from the Tumbiana Formation of Western Australia [30]. Recently, Wang and collaborators showed that silk fibroin controls the crystallization of  $\text{CaCO}_3$ . The binding affinity of the fibroin to the inorganic material played an important role in the growth process and in the morphology of the  $\text{CaCO}_3$  particles [31]. Most probably, the binding affinity of the proteins tested here may have also played its part on the resulting biomorphs observed. Further studies should focus on testing not only the influence of the catalytic domain of silicatein- $\alpha$  on these



**Fig. 6** Biomorphs obtained in the presence of a protein extract from marine sponge spicules. **a** Needle and **b** butterfly-like aggregates. Scale bar 150  $\mu\text{m}$



**Fig. 7** Biomorphs obtained in the presence of a protein extract from sea urchin spines. **a** Sunflower-like biomorphs and **b** mitotic cell-like biomorphs. Scale bar 150  $\mu\text{m}$

silica–carbonate biomorphs, but also the influence of other types of silicateins (e.g., silicatein- $\beta$  and - $\gamma$ ) in combination with galectin and/or collagen present in the sponge spicules on biomorph morphogenesis. Finally, in the near future, different purified protein from the extracts of marine sponges spicules or sea urchin spines may be better characterized and it would be interesting to test their influence on biomorph formation under reductive conditions that emulates the Pre-Cambrian period in the origin of life.

## Conclusions

Precise understanding on how factors such as pH, temperature, and additives like the proteins tested here, influences the morphogenesis of biomorphs is not fully clear. At present these biomimetic nano-aggregates are best described by the equation of a cardioid with epitaxial growth [4, 5]. Thus, it is difficult to explain the formation mechanism for either the complex silica–carbonate biomorphs observed in the control experiment (helices or laminar-like shapes) or the peculiar morphologies (donut-shaped or mitotic cell structures) obtained for the extracts of marine

sponge spicules and sea urchin spines. However, all the proteins tested in this report either as isolated proteins or as protein extracts controlled the morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica. Silicatein- $\alpha$  diminished the size and amount of helical and laminar biomorphs by increasing the polymerization rate of sodium metasilicate at alkaline pH values, while SCA-1 completely inhibited them due to its chemical interaction with carbonate anions by a chelating mechanism. Novel biomorph shapes were obtained in the presence of protein extracts from the sea urchin spines and sponge spicules. This is the first time that these self-assembled nanocrystalline structures of barium carbonate obtained into a silica matrix can be modified or shifted to silicate nodular shapes or barium carbonate crystals by means of proteins (or extracts). Each of the protein samples added to the matrix gel altered the morphology of silica–carbonate biomorphs by acting at different stages of the biomorph synthesis pathway (Fig. 2).

**Acknowledgements** A.M. acknowledges the financial support from CONACYT project No. 82888 and partial financial support by DGAPA-UNAM Project No. IN201811 N.S-P acknowledges the financial support from UNAM-DGAPA project PAPIIT IN204010-3.

## References

1. Garcia-Ruiz JM (1985) *J Cryst Growth* 73:251
2. Garcia-Ruiz JM (1994) *Origins Life Evol B* 24:451
3. Garcia-Ruiz JM, Amorós JL (1982) *J Cryst Growth* 55:379
4. Bittarello E, Massaro FR, Aquilano D (2010) *J Cryst Growth* 312:402
5. Garcia-Ruiz JM, Melero-Garcia E, Hyde ST (2009) *Science* 323:362
6. Marin-Garcia L, Frontana-Uribe BA, Reyes-Grajeda JP, Stojanoff V, Serrano-Posada HJ, Moreno A (2008) *Cryst Growth Des* 8:1340
7. Reyes-Grajeda JP, Marin-Garcia L, Stojanoff V, Moreno A (2007) *Acta Crystallogr, Sect F: Struct Biol Cryst Commun* 63:987
8. Reyes-Grajeda JP, Moreno A, Romero A (2004) *J Biol Chem* 279:40876
9. Beniash E, Addadi L, Weiner S (1999) *J Struct Biol* 125:50
10. Livingston BT, Killian CE, Wilt F, Cameron A, Landrum MJ, Ermolaeva O, Sapojnikov V, Maglott DR, Buchanan AM, Etensohn CA (2006) *Dev Biol* 300:335
11. Mann K, Poustka AJ, Mann M (2008) *Proteome Sci* 6:33
12. Mann K, Poustka AJ, Mann M (2008) *Proteome Sci* 6:22
13. Mann S (2001) *Biomaterialization: principles and concepts in bioinorganic material chemistry*. Oxford University Press, Oxford
14. Weaver JC, Morse DE (2003) *Microsc Res Tech* 62:356
15. Shimizu K, Cha J, Stucky GD, Morse DE (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6234
16. Schroder HC, Boreiko A, Korzhev M, Tahir MN, Tremel W, Eckert C, Ushijima H, Muller IM, Muller WE (2006) *J Biol Chem* 281:12001
17. Zhou Y, Shimizu K, Cha JN, Stucky GD, Morse DE (1999) *Angew Chem Int Edit* 38:780
18. Kisailus D, Choi JH, Weaver JC, Yang WJ, Morse DE (2005) *Adv Mater* 17:314
19. Natalio F, Mugnaioli E, Wiens M, Wang X, Schroder HC, Tahir MN, Tremel W, Kolb U, Muller WE (2010) *Cell Tissue Res* 339:429
20. Tahir MN, Theato P, Muller WE, Schroder HC, Borejko A, Faiss S, Janshoff A, Huth J, Tremel W (2005) *Chem Commun* 44:5533
21. Muller WE, Wang X, Cui FZ, Jochum KP, Tremel W, Bill J, Schroder HC, Natalio F, Schlossmacher U, Wiens M (2009) *Appl Microbiol Biotechnol* 83:397
22. Schroder HC, Brandt D, Schlossmacher U, Wang X, Tahir MN, Tremel W, Belikov SI, Muller WE (2007) *Naturwissenschaften* 94:339
23. Schroder HC, Wang X, Tremel W, Ushijima H, Muller WE (2008) *Nat Prod Rep* 25:455
24. Reyes-Grajeda JP, Jauregui-Zuniga D, Batina N, Salmon-Salazar M, Moreno A (2002) *J Cryst Growth* 234:227
25. Sanchez-Puig N, Veprintsev DB, Fersht AR (2005) *Mol. Cell* 17:11
26. Cha JN, Shimizu K, Zhou Y, Christiansen SC, Chmelka BF, Stucky GD, Morse DE (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:361
27. Vinogradova E, Estrada M, Moreno A (2006) *J Colloid Interface Sci* 298:209
28. Mann K, Siedler F (2004) *Biochim Biophys Acta* 1696:41
29. Lanier WP (1986) *Palaos* 1:525
30. Schopf JW, Walter MR (1983) *Archean microfossils: new evidence of ancient microbes*. Princeton University Press, Princeton
31. Wang T, Che R, Li W, Mi R, Shao Z (2011) *Cryst Growth Des* 11:2164