



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“EFECTO DE LA ADICIÓN DE METALES EN LA OLIGOMERIZACIÓN DE LA
CHAPERONA DE COBRE LVATX DEL CAMARÓN BLANCO *Litopenaeus vannamei*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Arisbeth Guadalupe Almeida Juárez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Rudiño Piñera
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Ayala Aceves
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Isabel Gómez Gómez
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos, septiembre 2018



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 fue realizado en el laboratorio de Bioquímica Estructural del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Enrique Rudiño Piñera. Durante la realización de este proyecto se contó con la beca de maestría no. 405057 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como la modalidad de beca mixta para la realización de una estancia corta, también se contó con el apoyo del PAEP para la realización una estancia de investigación y la presentación de este proyecto en un congreso nacional.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A la UNAM y al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Al Dr. Enrique Rudiño, por aceptarme en su grupo de trabajo, por todas sus enseñanzas y por su apoyo incondicional en el desarrollo de este y varios proyectos realizados en mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Isabel Gómez y la Dra. Marcela Ayala por sus enseñanzas, observaciones y asesoría en la realización de este proyecto.

A los miembros del jurado Dr. Lorenzo Segovia, Dra. Nina Pastor, Dra. Lidia Riaño, Dr. Gerardo Corzo y Dr. Adrián Ochoa por sus observaciones y comentarios de este trabajo.

A mi mamá Carmen y mis hermanos Alberto y Felipe, por su cariño, paciencia y apoyo durante estos años.

Al Dr. Rogerio Sotelo y el grupo de Biología Molecular de Organismos Acuáticos del CIAD-Hermosillo, por su apoyo en la construcción del gen LVATX.

Al Dr. Luis Brieba y el grupo de Bioquímica Estructural del LANGEBIO, IPN. Así como a la auxiliar de investigación Dra. Corina Díaz y al M.C. Pedro Jiménez por todo el apoyo y asesoría en experimentos clave en este proyecto.

Al Dr. Carlos Amero y a los miembros del laboratorio de Bioquímica y Resonancia Magnética Nuclear del CIQ, UAEM.

A la Biól. Sonia Rojas Trejo, por su apoyo técnico en las pruebas de cristalización, por todos sus consejos y cariño.

Al Biól. Filiberto Sánchez López por su apoyo técnico para la sobreexpresión de la PSP.

A la M.C. Arline Fernández por su asesoría en el uso del equipo Zetasizer y herramientas de medición de DLS.

A la Dra. Adelaida Díaz por su apoyo en las pruebas de cristalización con el robot Mosquito LCP y difracción de cristales.

A la Dra. Rayana Ruiz por su asesoría para las mediciones de DLS.

Al Dr. Juan Fontecilla Camps por haber aceptado mi estancia en su laboratorio, así como a las técnicas auxiliares Claudine Darnault y Oriane Renoux por sus enseñanzas en el desarrollo de técnicas de cristalización en el grupo de Metalloproteínas del IBS.

A la Dra. Gloria Saab por su apoyo y asesoría en las mediciones de DC.

A la Dra. Guadalupe Zavala de la Unidad de Microscopía por su apoyo en el procesamiento de muestras para MET.

A la M.C. Vanesa Hernández, M.C. Martha Contreras, T.L Fernando González y M.C. María Elena Rodríguez por su apoyo técnico y préstamo de equipo indispensable para las mediciones de DLS.

A la Biól. Erika Meneses y la M.C. Lorena Hernández de la unidad de proteómica del IBt, por su apoyo técnico para el análisis de datos y obtención de los espectros de masas de LVATX.

Al L. José Antonio Bolaños y Gloria Villa de la Unidad de docencia.

A todos mis amigos y compañeros del grupo de Bioquímica Estructural del IBt por su ayuda y consejos.

A mis compañeros de mesa en “la esquina de la adversidad”: Liz, Sandy, Arline, Rodolfo y Gilberto por todos sus consejos y momentos agradables día con día.

A mis amigos de la maestría, Paola, Inés, Maira, Betti, Cris, Marianela, Julio, Alberto, Jesús, Pepe, Alexandra, Lucía y Dante, gracias por su aprecio y apoyo en cada momento.

A mis roomies (Gaby, Javi, Alma, Betti y Alberto), gracias por su apoyo incondicional y vivencias compartidas.

A todos los miembros del Grupo teatral IBt.

A todos mis amigos del IBt, en especial a los Titanes y de volibol.

Al Dr. Enrique Galindo y la Dra. Georgina Ponce por su apoyo, consejos y asesoría en el emprendimiento de varios proyectos, así como al resto del equipo de redes sociales.

ABREVIATURAS

Å - Angstrom

Atox1- chaperona de cobre tipo *Atx1-like* de *H. sapiens*

Atx1 - chaperona de cobre de levadura

CcO - citocromo C oxidasa

CCS - chaperona de cobre para la superóxido dismutasa (I)

CopZ - proteína transportadora de cobre

CV – volumen (es) de columna

DLS - Dispersión dinámica de Luz

DTT- Ditioneitol

E. coli - *Escherichia coli*.

IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido

kDa - kilodaltones

LB- Luria Bertani

LC- MS - cromatografía líquida y espectrometría de masas

LVATX - chaperona de cobre de *Litopenaeus vanammei* (*sin etiqueta de histidinas*)

LVATX *his*⁺ - chaperona de cobre con etiqueta de histidinas

O/N- durante la noche (*overnight*)

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

SDS-PAGE- sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.

SOD-superóxido dismutasa

μM – Micromolar

5. Material y métodos	36
5.1. Síntesis del gen para LVATX.....	36
5.2 Análisis de secuencia de LVATX.....	36
5.3 Identificación de homólogos estructurales.....	37
5.4 Identificación de proteínas involucradas en las vías de tráfico de cobre en el transcriptoma de <i>L. vannamei</i>	37
5.5 Clonación y expresión de LVATX.....	37
5.5.1 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 PKJE7.....	38
5.5.2 Pre- inóculo.....	39
5.5.3 Inóculo y expresión.....	39
5.5.4 Cosecha y lisis de células.....	39
5.6 Purificación de LVATX.....	40
5.6.1 Purificación por Afinidad a Níquel.....	40
5.7 Electroforesis SDS-PAGE.....	40
5.8 Cuantificación de proteína.....	41
5.9 Determinación de Punto Isoeléctrico.....	41
5.10 Inmunodetección de LVATX por Western Blo.....	41
5.11 Observación de LVATX por microscopía electrónica de transmisión (MET).....	41
5.12 Corte de etiqueta de histidinas.....	42
5.12.1 Expresión de PSP (<i>PreScission Protease</i>).....	42
5.12.2 Purificación de PSP.....	43
5.13 Corte de Etiqueta de histidinas de LVATX.....	44
5.14 Purificación de LVATX por cromatografía de exclusión molecular.....	44
5.15 Identificación proteómica LC-MS.....	44
5.16 Análisis de estado de agregación de LVATX.....	45
5.17 Análisis de estructura secundaria de LVATX por Dicroísmo Circular (DC).....	45

5.18 Análisis de estructura secundaria <i>in silico</i>	46
5.19 Cristalización de LVATX.....	46
6. Resultados y discusión	48
6.1 Análisis de la secuencia de aminoácidos de LVATX y determinación de parámetros fisicoquímicos	49
6.2 Identificación de secuencias homólogas a LVATX.....	49
6.3 Alineamiento de secuencias homólogas a LVATX.....	51
6.4 Análisis de estructuras tridimensionales homólogas a LVATX.....	54
6.5 Identificación de proteínas involucradas en el tráfico de cobre en <i>L. vannamei</i>	57
6.6 Expresión e identificación de LVATX.....	58
6.7 Purificación de LVATX <i>his</i> ⁺	59
6.8 Análisis del estado de agregación de LVATX <i>his</i> ⁺	60
6.9 Purificación de <i>PSP (PreScission Protease)</i> y corte de etiqueta de histidinas.....	63
6.10 Purificación de LVATX (Ensayo de filtración en gel)	64
6.11 Análisis de especies oligoméricas de LVATX.....	67
6.11.1 Especies oligoméricas de LVATX (<i>Apo forma</i>)	69
6.11.2 Ensayo de oligomerización con la adición de cobre.....	72
6.11.3 Ensayo de oligomerización con la adición de plata.....	73
6.12 Análisis de estructura secundaria de LVATX.....	75
6.13 Cristalización de LVATX.....	79
7. Conclusiones	82
8. Perspectivas	83
9. Anexos	84
10. Referencias	92

1. INTRODUCCIÓN

La vida en la Tierra ha evolucionado dentro de una mezcla compleja de componentes orgánicos e inorgánicos. Mientras que las moléculas orgánicas que conforman las proteínas y el material genético son sintetizados y degradados enzimáticamente, los elementos inorgánicos como Cu, Fe y Zn no pueden ser degradados, por tal motivo, requieren de un estricto control en su regulación homeostática (Festa & Thiele, 2011).

Se ha estimado que alrededor de un tercio de todas las proteínas requieren cofactores metálicos para su función (Rosenzweig, 2002; Waldron & Robinson, 2009). Metales como el Zn, Fe, Cu, Mn, Co y Ni no sólo son requeridos como cofactores catalíticos sino también como elementos estructurales para las enzimas (Beackley & MacGillivray, 2011, Porcheron *et al.*, 2013).

Los metales son componentes esenciales de una gran variedad de sistemas biológicos y su utilización depende tanto del organismo como de su entorno (Beackley & MacGillivray, 2011). La absorción de metales, su equilibrio y su área de función son tan elementales a la vida como el carbono y el nitrógeno para muchos recursos biológicos básicos y complejos (Yannone *et al.*, 2012). Como muchos otros metales de transición, el Cu tiene un papel importante en las funciones celulares, su capacidad redox hace del Cu un cofactor ideal en las enzimas que catalizan la transferencia de electrones, siendo imprescindible para la producción de energía en la célula (Harrison *et al.*, 1999; Rensing & McDevitt, 2012; Vest *et al.*, 2013)

1.1. Cobre en sistemas biológicos

El uso de Cu en los sistemas biológicos coincide con la formación de una atmósfera oxigénica hace 1,700 millones de años (Boal & Rosenzweig, 2009). La presencia de oxígeno permitió la oxidación de Cu^{+1} a Cu^{+2} siendo este último el estado más soluble y biodisponible, permitiendo la incorporación de este metal de transición en el metabolismo de diversos organismos (Boal & Rosenzweig, 2009).

En condiciones fisiológicas, el cobre intracelular se presenta en ambos estados de oxidación, $\text{Cu}^{+1}/\text{Cu}^{2+}$, esta interconversión conduce su participación en diversos roles estructurales y de catálisis (Harrison *et al.*, 2000, Piug & Thiele, 2002; Festa & Thiele, 2011). El Cu es un elemento estructural en proteínas reguladoras, participa en reacciones de transferencia de electrones y actúa como cofactor catalítico de algunos procesos biológicos como: la respiración, el transporte de hierro, la protección contra el estrés oxidativo, la producción de hormonas peptídicas, la coagulación de la sangre, pigmentación y proliferación celular, entre otros, (Piug & Thiele, 2002; Brouwer *et al.*, 2002, Beackley & MacGillivray, 2011); en consecuencia a que el cobre está involucrado en una gran variedad de funciones biológicas se considera fundamental para el desarrollo de diversos organismos (Li *et al.*, 2007; Shoshan *et al.*, 2016).

1.1.2. Cobre en el metabolismo celular

El cobre es un elemento esencial para procariontes y eucariontes (Balamurugan & Schaffner, 2006). Se estima que la concentración intracelular es de 10 a 1000 μM y el cobre libre (no ligado a proteínas) es varios órdenes de magnitud menor debido su

asociación instantánea con chaperonas y otras proteínas (Lee *et al.*, 2002; Petris, 2004; Balamurugan & Schaffner, 2006).

En el humano, la cantidad de cobre total en el cuerpo es ~100 mg y la ingesta en la dieta diaria es ~1-2 mg (Kaplan & Maryon, 2016). Aunque la concentración de iones de cobre libres reportada en las células eucariontes es $<10^{-18}$ M (Rae *et al.*, 1999), la deficiencia crónica o sobrecarga de este metal (desequilibrio homeostático del cobre) ocasiona varios trastornos en el metabolismo humano. Un ejemplo clásico es la enfermedad de Menkes & Wilson, causada además por la predisposición genética del individuo y defectos en los mecanismos de transporte de cobre, también está relacionado con desórdenes neurodegenerativos como el Alzheimer (Georgopoulos *et al.*, 2001; Perry *et al.*, 2002; Shim & Harris, 2003; Harris, 2003; Bandmann *et al.*, 2015).

Los iones de cobre reaccionan de manera promiscua con una amplia variedad de proteínas que contienen S, N y O, y debido a sus propiedades redox producen especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la denominada reacción de Fenton (figura 1) ocasionando daño oxidativo en las células (Valko *et al.*, 2005; Balamurugan & Schaffner, 2006; Boal & Rosenzweig, 2009; Kaplan & Maryon, 2016; Shoshan *et al.*, 2016).

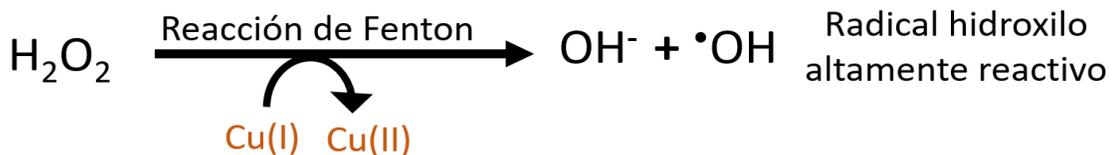


Figura 1. El cobre cataliza la producción de radicales hidroxilos (OH) mediante la reacción de Fenton. (Imagen modificada de Robinson & Winge, 2010)

A causa de su esencialidad y toxicidad, el cobre intracelular, tiene que ser estrictamente controlado (Harrison *et al.*, 2000; Piug & Thiele, 2002). Cada organismo posee mecanismos de homeostasis de cobre, que regulan la captura, distribución y exportación de este (Rutherford & Bird, 2004; Balamurugan & Schaffner, 2006), el ensamblaje de estos centros metálicos involucra la participación de muchas proteínas accesorias (Hausinger *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 2008).

1.2. Metalochaperonas

Los organismos han requerido la evolución de un sinnúmero de sistemas para la captura, transporte intracelular, carga de proteínas y almacenamiento de iones metálicos con el fin de asurar los requerimientos celulares y minimizar los efectos tóxicos de los mismos (Beackley & MacGillivray, 2011; Gaetke *et al.*, 2014).

Una forma de asegurar que el metal correcto ha sido adquirido por una metaloenzima es mediante metalochaperonas (Waldron *et al.*, 2009), que unen iones metálicos y los entregan directamente a proteínas que lo requieren en su estructura, por medio de interacciones proteína-proteína, ya sea para un papel estructural o catalítico (Rosenzweig, 2002; Beackley & MacGillivray, 2011; Bravo-Gómez *et al.*, 2015).

Las metalochaperonas protegen, guían y entregan los cofactores metálicos correctos al sitio correspondiente (Rosenzweig, 2000) y participan en la respiración, fotosíntesis, transmisión neuronal, defensa contra los agentes tóxicos, entre otros procesos biológicos (Rosenzweig, 2002). Estas proteínas mantienen un motivo de secuencia¹

¹ Motivo de secuencia: Secuencia de aminoácidos reconocibles que se encuentran en diferentes proteínas, generalmente indican una función bioquímica (<https://www.sinauer.com/media/wysiwyg/samples/nsp-protein-1-16.pdf>)

altamente conservado *MXCXXC*, que es capaz de coordinar a diferentes metales. Aunque los factores determinantes de la selectividad de estas proteínas por un ion metálico específico aún no han sido definidos, ha habido un progreso significativo en estudios estructurales, de coordinación química y algunos mecanismos moleculares de las metalochaperonas (Rosenzweig, 2002; Urvoas *et al.*, 2004).

1.2.1. Metalochaperonas y la homeostasis de cobre celular

El concepto de metalochaperona de cobre es relativamente nuevo. A inicios de 1997 fueron identificadas por primera vez proteínas con esta función y a partir de su descubrimiento, las metalochaperonas de cobre, han sido las más estudiadas a causa de la gran diversidad de enzimas registradas que utilizan este metal como cofactor (Bravo-Gómez *et al.*, 2015).

La homeostasis de cobre está controlada por transportadores de captura y eflujo de iones, asimismo por los grupos de moléculas intracelulares involucradas en el manejo del cobre y entrega a sus sitios específicos (Kaplan & Maryon, 2016). Esta familia especializada de proteínas, que unen iones de cobre y sirven para distribuirlos en las metaloenzimas que lo requieren son denominadas chaperonas de cobre (Bravo-Gómez *et al.*, 2015).

1.2.2. Chaperonas de cobre

Las chaperonas de cobre son una familia conservada de metalochaperonas presentes en procariontes y eucariontes, que incorporan al Cu^{+1} libre del citoplasma a proteínas que lo coordinan (figura 2) (Rubino & Franz, 2012), de esta manera el cobre está coordinado por una proteína dentro de la célula y consecuentemente es incapaz de

participar en reacciones químicas potencialmente perjudiciales con otros componentes celulares, evitando la producción de ROS (Harrison *et al.*, 2000; Kihlken *et al.*, 2002). Estas chaperonas pueden quelar cobre incluso en condiciones donde las concentraciones de metal son tan bajas que las metaloenzimas no pueden adquirirlo (Bravo-Gómez *et al.*, 2015).

Modelo del mecanismo de transferencia de Cu^{+1}

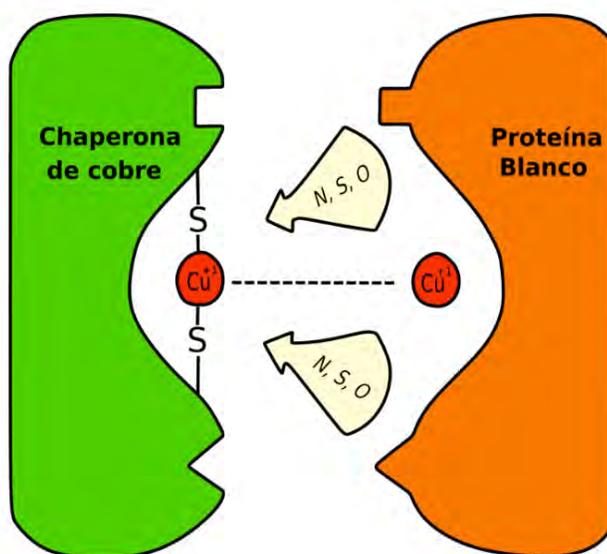


Figura 2. Modelo del mecanismo de transferencia de Cu^{+1} . La *chaperona de cobre* (verde) coordina el ion Cu^{+1} con dos ligandos cisteinil-sulfuro, predominantemente en un complejo diagonal (con un pequeño porcentaje de especies trigonales). El ligando intercambiable puede ser azufre (S), nitrógeno (N) u oxígeno (O) de los aminoácidos que conforman el sitio de unión a metales de la proteína blanco (naranja). (Imagen modificada de Harrison *et al.*, 2000).

Las chaperonas de cobre disponen de una variedad de mecanismos de transferencia de cobre, además, son multifuncionales y estructuralmente heterogéneas, pueden tener uno o múltiples dominios, formar varios estados oligoméricos, así como ser solubles y/o estar ancladas a la membrana (Palumaa, 2013).

La localización de las chaperonas de cobre está relacionada con los requerimientos intracelulares de cobre en los organismos. En eucariontes, las chaperonas de cobre se localizan en el citoplasma y espacio intermembranal de la mitocondria, mientras que en algunas bacterias Gram negativas, las chaperonas de cobre se localizan en periplasma (Rubino & Franz, 2012), y en el caso de bacterias Gram-positivas, en la membrana plasmática. Es decir, en eucariontes es necesario la presencia de cobre en el citoplasma, mientras que, en el caso de bacterias, el requerimiento de cobre aparentemente es extracitoplasmático (Tottey *et al.*, 2005; Osman & Cavet, 2008; Banci *et al.*, 2010). Por lo anterior, la maquinaria homeostática de cobre en bacterias tendría el único propósito de eliminar los iones de cobre que se encuentren en un lugar distinto a lo habitual (periplasma) (Solioz *et al.*, 2010). A excepción de la cianobacteria *Synechocystis* sp., que, hasta la fecha, es el único género de bacteria del cual se tienen registros sobre su requerimiento de cobre en citoplasma (Cavet *et al.*, 2003).

1.3. Vías de tráfico de cobre en eucariontes

1.3.1. Vía de influjo de cobre

El metabolismo de cobre en eucariontes difiere del de procariontes por la utilización de cobre en el citoplasma y varios organelos celulares como la mitocondria y el retículo endoplásmico (Robinson & Winge, 2010; Palumaa, 2013). En las células eucariontes el cobre es importado como Cu^{+1} mediante un sistema de influjo de alta afinidad a cobre, por los miembros de la familia de transportadores Ctr (figura 3) (Boal & Rosenzweig, 2009; Palumaa, 2013). Estos transportadores de membrana fueron identificados por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente se han encontrado

homólogos en plantas, humanos y otros mamíferos (Dancis *et al.*, 1994, Boal & Rosenzweig, 2009). Sin embargo, hasta la fecha, no han sido identificados análogos de estos transportadores en procariontes. Los transportadores Ctr contienen motivos ricos en metioninas en el extremo N-terminal y conservan residuos de cisteína e histidina en el extremo C-terminal para la unión de iones de cobre de manera específica y transportarlos a través de la membrana al interior celular (Boal & Rosenzweig, 2009).

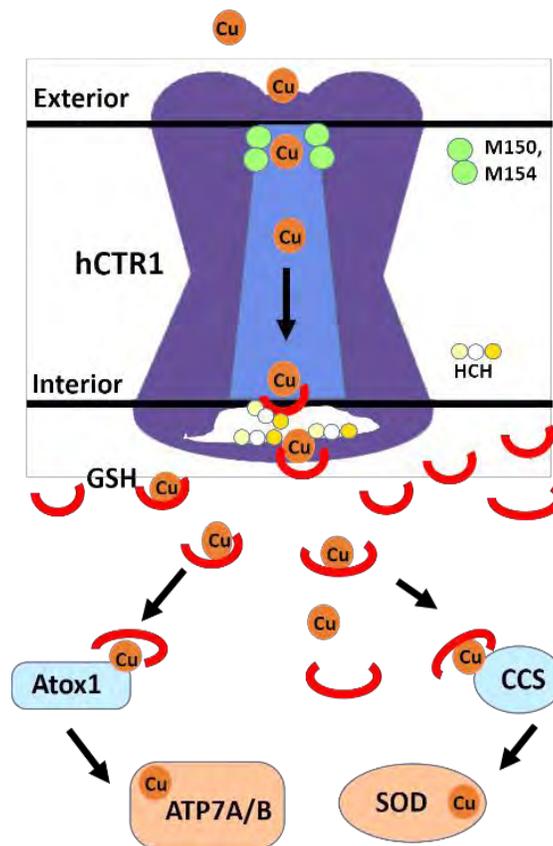


Figura 3. Esquema de un transportador Ctr, por su alta afinidad a cobre, transporta el cobre al interior celular. (Cu) iones de cobre, (M150-M154) metioninas 150 y 154 que forman un anillo de metioninas en el transportador Ctr, (GSH) glutatión, (Atox1) chaperona de cobre Atx1-like, (ATP7A/B) ATPasa A y B, (CCS) chaperona de cobre para la superóxido dismutasa, (SOD) superóxido dismutasa (Imagen modificada de Harrison *et al.*, 2000).

1.3.2. Vías de eflujo de cobre

Una vez dentro de la célula, existen tres destinos principales para el cobre (figura 4) cada una de estas vías posee una chaperona de cobre específica como transportador, que unen Cu^{+1} con múltiples cisteínas como ligando (Rosenzweig, 2000, Sturtz Field *et al.*, 2002; Boal & Rosenzweig; 2009 Robinson & Winge, 2010). Las tres vías de eflujo de cobre que han sido descritas en eucariontes son:

- 1) Vía de tráfico de cobre hacia la superóxido dismutasa (SOD)
- 2) Ruta de entrega de cobre a la mitocondria para la activación de la citocromo C oxidasa
- 3) Ruta de entrega de cobre a la vía secretoria para la activación de enzimas destinadas a la superficie celular o el medio extracelular.

Estas chaperonas son responsables de la transferencia del ion a su destino final o algún punto intermedio de la vía, evitando de esta manera la liberación de iones de cobre en compartimentos celulares donde su presencia causa efectos dañinos (Banci *et al.*, 2010).

Vías de eflujo de cobre en eucariontes

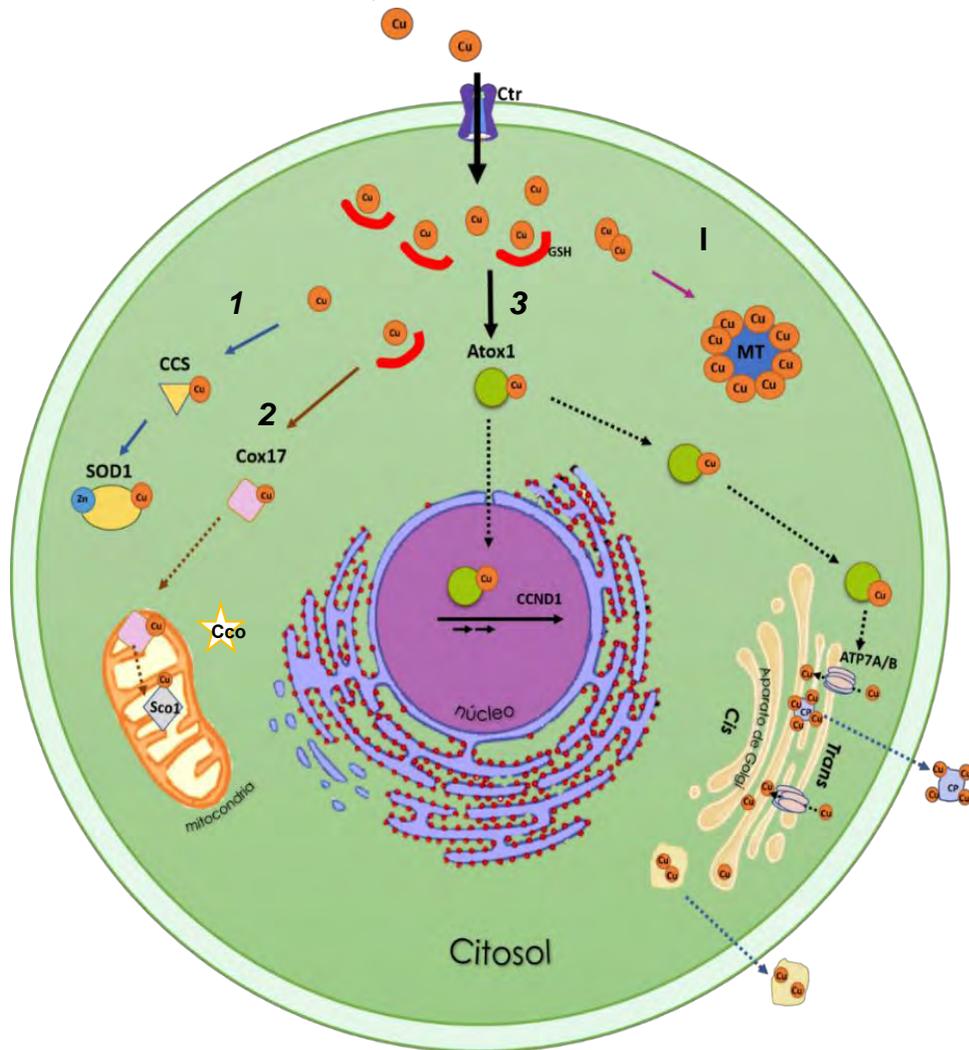


Figura 4. Esquema general de las vías de eflujo de cobre en eucariontes. Una vez que se ha incorporado el cobre al interior celular es coordinado por diversas chaperonas de cobre. **1)** La chaperona de cobre CCS dirige el ion Cu^{+1} hacia la SOD1. **2)** Cox17 guía el Cu^{+1} hacia el espacio intermembranal de la mitocondria. En el interior de la mitocondria el Cu^{+1} participa en la cadena de transporte de electrones cuya proteína terminal es la Cco. **3)** Atox1 viaja hacia el interior del núcleo, esta proteína participa como factor de transcripción del gen CCND1, Atox1 también dirige el cobre hacia el transportador ATP7A/B de la cara *trans* del Aparato de Golgi donde el metal será incorporado por otras cuproproteínas (CP) o expulsado mediante vacuolas. **I)** Los iones “libres” en el citosol se unen a metalotioneínas (MT) o al péptido glutatión (GSH). (Imagen basada en los trabajos de Sturtz Field *et al.*, 2002; Robinson & Winge, 2010; Hatori & Lutsenko, 2013; Grubman & White, 2014; Kaplan & Maryon, 2016).

1.3.2.1. Vía de tráfico de cobre hacia la superóxido dismutasa (SOD1)

La SOD1 (superóxido dismutasa 1) es una enzima citosólica que emplea Cu como cofactor para catalizar la dismutación de dos aniones superóxidos (O_2^-) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). Se localiza también en el espacio intermembranal de la mitocondria, y para su activación en ambos sitios celulares, requiere el cobre transferido por CCS (chaperona de cobre para SOD1) (McCord *et al.*, 1969; Culotta, 1997; Rae *et al.*, 1999; Robinson & Winge 2010). CCS tiene tres dominios estructurales con diferentes funciones: la unión de cobre, la transferencia de cobre y la interacción con SOD1 (Sturtz Field *et al.*, 2002). El dominio I se requiere para la activación de SOD1 solo cuando las concentraciones de cobre son limitadas, mientras que los dominios II y III son esenciales para la función de CCS en cualquier condición (Schmidt *et al.*, 1999).

1.3.2.2. Ruta de entrega de cobre a la mitocondria para la activación de la citocromo C oxidasa (CcO)

La CcO es la proteína terminal de la cadena de transporte de electrones en la respiración en eucariontes, se localiza en la membrana interna mitocondrial y emplea electrones que provienen del citocromo C para reducir el oxígeno molecular en agua (Beackley & MacGillivray, 2011; Bravo-Gómez *et al.*, 2015). La transferencia de Cu a través del citoplasma desde el transportador de membrana (Ctrl1) a la mitocondria requiere de una metalochaperona, función que se atribuye a Cox17 en humanos (Glerum *et al.*, 1996, Nobrega *et al.*, 2002). Sin embargo, al menos seis proteínas, de las cuales tres son solubles (Cox17, Cox19, Cox23) y el resto se localizan en la

membrana interna mitocondrial (Sco1, Sco2 y Cox11), pueden funcionar como chaperonas de cobre para la CcO (Robinson & Winge, 2010).

Cox17 es una proteína pequeña de 63 residuos de aminoácidos, y contiene un motivo de secuencia conservado CX₉C que tiene una configuración de horquilla helicoidal, se encuentra presente tanto en el citoplasma como en el espacio intermembranal y actúa como chaperona de cobre, entregando el cobre de los sitios de importación de cobre a través del citoplasma hasta los receptores mitocondriales (Horng *et al.*, 2004; Robinson & Winge, 2010; Bravo-Gómez *et al.*, 2015). La donación de iones de cobre mediada por esta proteína involucra la participación de dos factores accesorios Cox11 y Sco1 (Robinson & Winge, 2010).

1.3.2.3. Ruta de entrega de cobre a la vía secretoria para la activación de enzimas destinadas a la superficie celular o el medio extracelular

Otra vía descrita, es la incorporación de cobre en el lumen del Golgi, donde el cobre es utilizado para la maduración biosintética de la ferroxidasa FET3 (en humano) u otras cuproproteínas, donde Ccc2p funciona como transportador de cobre para la ATPasa tipo P, las chaperonas de cobre que transportan a esta vía son nombradas chaperonas de cobre tipo *Atx1-like* (Fu *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1997). Estas proteínas son esenciales para la entrega de Cu⁺¹ a las vías secretoras de cobre en eucariontes y para la desintoxicación en procariontes (Banci & Rosato, 2003; Osman, 2008; Boal & Rosenzweig, 2009; Kim *et al.*, 2009).

En eucariontes, las chaperonas de cobre denominadas *Atx1-like* (*anti-oxidant chaperones*), se caracterizan por ser pequeños polipéptidos citoplasmáticos de ~70

residuos de aminoácidos mantienen el motivo de unión a metales *MXCXXC* cerca del N-terminal y conservan un plegamiento tipo ferredoxina ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$). Estas chaperonas participan en el metabolismo de eflujo de cobre, entregando el ion metálico a las ATPasas y otras proteínas blanco (Arnesano *et al.*, 2001; Anastassopoulou *et al.*, 2004, Rubino & Franz, 2012). Se ha observado funciones adicionales de estas chaperonas, como factores de transcripción o como reguladores redox para mantener apropiadamente los estados reductivos de los sulfhidrilos en proteínas involucradas en la homeostasis del cobre (Itoh *et al.*, 2008; Hatori & Lutsenko, 2013).

Si bien, varios de los paradigmas del tráfico intracelular del cobre en eucariontes han sido estudiados en *Saccharomyces cerevisiae*, existen pocos estudios relacionados al eflujo de cobre en eucariontes pluricelulares (Puig & Thiele, 2002; Rees *et al.*, 2004). Un modelo interesante de estudio son los crustáceos, que además de utilizar cobre en sus procesos fisiológicos normales, existen varios estudios sobre los efectos del cobre en su desarrollo. Una de las especies de crustáceos de mayor interés comercial es *Litopenaeus vannamei* (Santos *et al.*, 2000; Valavanidis & Vlachogianni, 2010).

1.4. *Litopenaeus vannamei*

Litopenaeus vannamei (Boone, 1931), también conocido como camarón blanco del Pacífico (figura 5), es la especie comercial de camarón más importante de América Latina. Se distribuye desde la costa oriental del Océano Pacífico en Sonora, México, hasta el sur del continente en Tumbes, Perú (FAO, 2015).



Figura 5. Camarón blanco del Pacífico (*L. vannamei*) (Boone, 1931). (Imagen tomada de: <http://www.vietcuisinetrading.com/shrimp-prawns>).

Los cultivos extensivos de camarón blanco se establecen en las zonas intermareales y a causa del incremento de la contaminación por descargas industriales y de las actividades mineras, los cultivos están expuestos a metales pesados (Hg, Pb, Cr, Cu, Zn, Co, Fe y Mn) que se acumulan en los sedimentos de sistemas acuáticos, siendo el Cu uno de los metales pesados más comunes en las descargas industriales (Lacerda, 2006; Pamukoglu & Kargi, 2007; Xiao-Yi & Yu-Feng, 2011). Por otro lado, el desarrollo acuícola aplicado en la zona costera ha ocasionado un grave deterioro en los ecosistemas acuáticos debido a descargas de nutrientes, materia orgánica y sólidos en suspensión, lo cual constituye una contaminación directa en los cuerpos de agua costeros (Allsopp *et al.*, 2008; Martínez-Córdova *et al.*, 2009).

Para reducir los efectos que este tipo de cultivo produce, se ha implementado el uso de granjas camaroneras. En estas granjas se utilizan componentes bioactivos como desinfectantes, aditivos alimentarios y fertilizantes, que contienen sulfato de cobre (Cu_2SO_4) utilizado para el control de crecimiento de macroalgas, bivalvos y como

fungicida, lo que mantiene la exposición constante de *L. vannamei* a metales pesados teniendo un efecto ambiental importante (Dias-Bainy, 2000, Lyle-Fritch *et al.*; 2006).

Adicionalmente a lo anterior, y debido a que las zonas de distribución y establecimiento de cultivos de *L. vannamei* corresponden con las zonas mineras de cobre y otros metales de México y Perú, existe una alta exposición a metales pesados que, así como el cobre, en pequeñas concentraciones también son requeridos por los organismos como As, Fe, Co, Zn, Mn, Cd, Pb, Cr (Valko, 2005; INEGI, 2010). Incluso a bajas concentraciones de algunos de estos metales son componentes peligrosos, ocasionando un gran impacto en distintas poblaciones (Patrick, 2006; Bagal-Kestwal *et al.*, 2008).

Para *L. vannamei*, se ha reportado que las poblaciones alcanzan una concentración letal media (CL₅₀²) contra cobre de 37.3 mg/L (Yang *et al.*, 2008; Frías-Espericueta *et al.*, 2011). En crustáceos, esta es la CL₅₀ contra cobre más alta reportada a la fecha, en comparación con *Palaemon serratus*, *Cancer magister* y *Panaeus japonicus*, que tienen una CL₅₀ contra cobre de 3.3, 0.5 y 1.45 mg/L respectivamente (Frías-Espericueta *et al.*, 2011), lo anterior hace suponer que *L. vannamei* tiene un mecanismo de captura y eflujo de cobre eficiente, que permite el crecimiento de la mitad de su población a la etapa adulta incluso a altas concentraciones de cobre en su entorno. Otra particularidad de *L. vannamei* es que no tiene un sistema inmune basado en anticuerpos, células T o memoria específica

² CL₅₀ (concentración letal media): se define como la concentración que resulta letal para el 50% de los individuos expuestos a sustancias tóxicas a corto plazo (Calabrese *et al.*, 1977)

de antígenos (Hoffmann *et al.*, 1999; Hauton & Smith, 2007), lo que ha conducido a diversos estudios sobre su transcriptoma para identificar la variabilidad en los genes del sistema inmune innato y sus regiones reguladoras para el mejor entendimiento del sistema (Ghaffari *et al.*, 2014). Estos estudios han permitido conocer otras proteínas que están involucradas en diferentes procesos biológicos de *L. vannamei*, entre ellas algunas involucradas en el mecanismo de eflujo de cobre (Liu *et al.*, 2012; Ghaffari *et al.*, 2014). En este trabajo nos interesamos en el estudio de una chaperona de cobre de la familia Atx1-like identificada en el transcriptoma de *L. vannamei* la cual fue denominada en este trabajo como LVATX (del inglés: *Litopenaeus vannamei, antioxidant copper chaperone*).

2. ANTECEDENTES

2.1. Estructura y plegamiento de chaperonas *Atx1-like*

A finales de los años 90's del siglo pasado se identificaron proteínas homólogas de chaperonas de cobre *Atx1-like* en bacterias, plantas y animales. Mediante estudios por resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X, se han determinado más de 20 estructuras tridimensionales de estas chaperonas de diversos organismos, lo que ha permitido la descripción del sitio de unión a cobre y otras características particulares de las chaperonas de esta familia (tabla 1) (Rosenzweig *et al.*, 1999; Wimmer *et al.*, 1999; Wernimont *et al.*, 2000; Arnesano *et al.*, 2001; Banci *et al.*, 2001).

Tabla 1. Estructuras tridimensionales de chaperonas de cobre Atx1-like

Organismo	Proteína	Tipo	Resolución	PDB	Año
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hg ⁺² - Atx1 (<i>m</i>)	CRX	1.02 Å	1CC8	1999
	Apo-Atx1 (ox.) (<i>m</i>)	CRX	1.2 Å	1CC7	1999
	Cu ⁺¹ -γAtx1 (<i>d</i>)	CRX	1.65 Å	5VDE	2017
	Cu ⁺¹ -γAtx1 (<i>d</i>)	CRX	1.93 Å	5VDF	2017
	Cu ⁺¹ - Atx1 (<i>m</i>)	RMN		1FD8	2000
	Apo-Atx1 (red.) (<i>m</i>)	RMN		1FES	2000
<i>Homo sapiens</i>	Hg ⁺² -Atox1 (<i>d</i>)	CRX	1.75 Å	1FE4	2000
	Cd ⁺² -Atox1 (<i>d</i>)	CRX	1.75 Å	1FE0	2000
	Cu ⁺ - Atox1 (<i>d</i>)	CRX	1.80 Å	1FEE	2000
	H ₆ Cl ₂ N ₂ Pt -Atox1 (<i>m</i>)	CRX	1.6 Å	3IWL	2009
	H ₆ Cl ₂ N ₂ Pt -Atox1 (<i>d</i>)	CRX	2.14 Å	3IWX	2009
	Pt ⁺² -Atox1 (<i>d</i>)	CRX	2.2 Å	4QOT	2014
	H ₆ Cl ₂ N ₂ Pt -Atox1 (<i>m</i>)	CRX	1.602 Å	4YDX	2015
	Ag ⁺ -Atox1 (<i>m</i>)	CRX	2.7 Å	5F0W	2015
	H ₆ Cl ₂ N ₂ Pt -Atox1 (<i>d</i>)	CRX	2.14 Å	4YEA	2015
	Cu ⁺¹ -Atox1 (<i>m</i>)	RMN		1TL4	2004
	Apo-Atox1 (red.) (<i>m</i>)	RMN		1TL5	2004
	<i>Enterococcus hirae</i>	Apo-CopZ (<i>m</i>)	RMN		1CPZ
Cu ⁺¹ -CopZ (<i>m</i>)		RMN		1K0V	2001
<i>Bacillus subtilis</i>	Apo-CopZ (<i>m</i>)	RMN		1P8G	2007
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Cu ⁺¹ - ScAtx1 (<i>d</i>)	CRX	1.5 Å	2XMT	2010
	Cu ⁺² - ScAtx1 (<i>d</i>)	CRX	1.35 Å	2XMK	2010

	Cu ⁺² - ScAtx1 (<i>d</i>)	CRX	1.75 Å	2XMU	2010
	Apo-ScAtx1 (<i>m</i>)	RMN		1SB6	2004
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	CopZ (<i>m</i>)	CRX	1.78 Å	2HU9	2006

Estructuras tridimensionales de chaperonas cobre *Atx1-like* depositadas en el PDB, (CRX) cristalografía de rayos X, (RMN) resonancia magnética nuclear. (m) estructura monomérica, (d) estructura dimérica. (Tabla modificada de Boal & Rosenzweig, 2009).

Atx1 de *S. cerevisiae* fue la primera estructura tridimensional de una chaperona de cobre de la familia *Atx1-like* reportada y se obtuvo a una resolución de 1.02 Å (Rosenzweig *et al.*, 1999). Para determinar su estructura se utilizó Hg⁺² como metal de unión, mostrando la promiscuidad de esta chaperona para unir diversos metales. A partir de este análisis estructural, se observó que las chaperonas *Atx1-like* tienen el motivo de unión a metales *MXCXXC* en el extremo N-terminal y adoptan un plegamiento $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$, al igual que la ferredoxina. En el mismo año, este grupo de investigación determinó la estructura de Atx1-Apo, a una resolución de 1.2 Å, observando que tanto la forma Apo³ como Holo⁴ (en este caso con Hg⁺² como cofactor) conservan el mismo plegamiento, incluso en condiciones oxidantes.

La estructura de la chaperona de cobre Hah1 o Atox1 (homóloga a Atx1) de *H. sapiens* fue determinada en el siguiente año por Wernimont y colaboradores (2000). Esta estructura fue determinada en complejo con Cu⁺², Hg⁺² y Cd⁺² a resoluciones de 1.8, 1.75 y 1.75Å respectivamente. Es importante resaltar que Atox1 fue la primera

³ Apo (Apoenzima): Enzima sin cofactor, el cofactor puede ser un ion metálico, una molécula orgánica o una combinación de ambas. (PAC ,1994)

⁴ Holo (Holoenzima): Enzima unida a su cofactor (PAC ,1994)

estructura de una chaperona *Atx1-like* unida a cobre, donde fue posible observar algunos detalles estructurales de esta proteína con el metal que transporta por excelencia. En este estudio también postularon un posible mecanismo de transferencia de cobre donde el intercambio directo de metales ocurre por la coordinación de los residuos de cisteína localizados en la superficie de la proteína y que esta coordinación permite la formación de dimerizaciones en las chaperonas (figura 6).

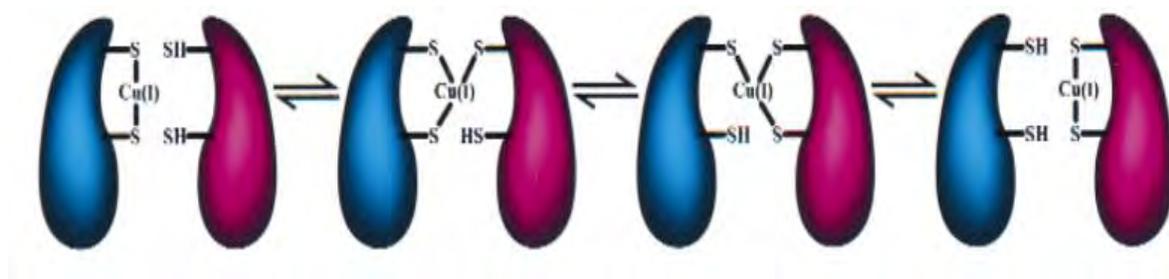


Figura 6. Esquema del mecanismo de transferencia de cobre por Atox1 (azul) y un dominio de las proteínas ATP7A/B (proteínas de la enfermedad de Menkes & Wilson) (magenta). Atox1 coordina el Cu^{+1} mediante los grupos cisteinil-sulfuro de las cisteínas que conforman el motivo de unión a metales. (Imagen tomada de Wernimont *et al.*, 2000).

Hasta el 2001, se determinó la estructura de Atox1 de *S. cerevisiae* en unión a Cu^{+1} por Arnesano y colaboradores, utilizando RMN. Observaron que el plegamiento tipo ferredoxina se mantiene independientemente del metal unido y de su estado de oxidación. Sin embargo, la ausencia de Cu^{+1} en Atox1 da lugar a una apertura de la estructura en la vecindad del sitio de unión a cobre, mediante sutiles movimientos de traslación de los elementos de la estructura secundaria (figura 7) (Arnesano, 2001).

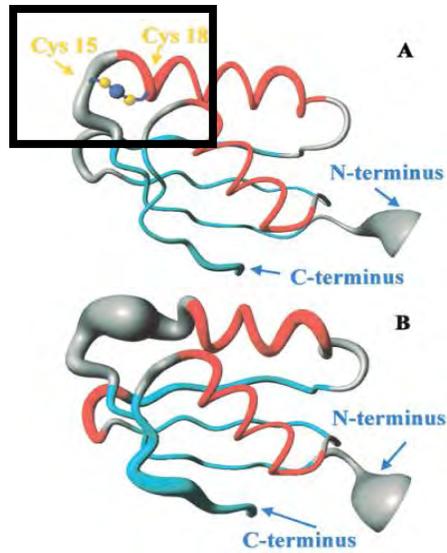


Figura 7. Esquemas de las estructuras en solución de Atx1 de *S. cerevisiae* en su forma Apo (A) y Holo (B). El recuadro negro enmarca el sitio de unión a metales. (Imagen tomada y modificada de Arnesano, 2001)

Las estructuras Apo y Holo-Cu⁺¹ de Atox1 por RMN son muy similares a las estructuras cristalográficas (figura 8), además es posible encontrar las formas monoméricas y diméricas en solución. La mayoría de los cambios conformacionales sobre la unión del metal ocurren en el bucle de unión a metal, a diferencia de Atx1, sólo cambia una de las cisteínas (Anastassopoulou *et al.*, 2004).

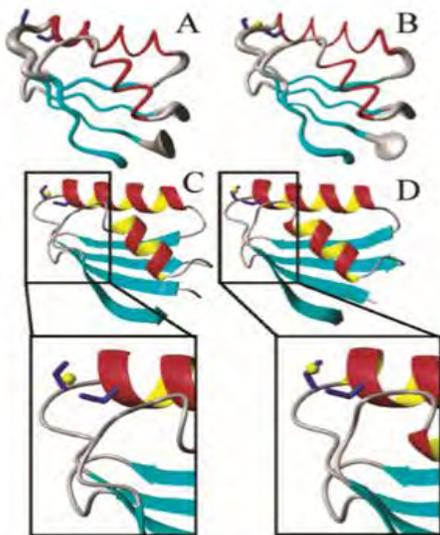


Figura 8. Estructuras de Atox1 de *H. sapiens*. **A)** Atox1-Apo. **B)** Atox1-Cu⁺¹. Las regiones en rojo corresponden a α -hélices y en azul a hebras β . El ion de cobre está representado como una esfera amarilla y las cadenas laterales en color azul. **C)** Estructura de Atox1-Cu⁺¹ en solución. **D)** Estructura cristalográfica de Atox1-Cu⁺¹ Imagen tomada de Anastassopoulou *et al.*, 2004.

Banci y colaboradores en el 2003 determinaron la estructura Apo-CopZ de *B. subtilis* y describieron el mismo plegamiento convencional de las chaperonas *Atx1-like*. Sin embargo, en el 2004, para la chaperona de cobre ScAtx1 de *Synechocystis* sp. PCC6803, encontraron un plegamiento distinto donde la β_4 está ausente del plegamiento tipo ferredoxina descrito previamente (figura 9).



Figura 9. Estructura de ScAtx1-Apo de *S. sp.* PCC6803, se muestran los elementos de estructura secundaria. Hebras β (amarillo), hélices α (fucsia). (Imagen tomada de Banci *et al.*, 2004)

Además, realizaron una comparación entre ScAtx1-Apo y ScAtx1-Cu⁺¹ donde todos los elementos de la estructura secundaria son superponibles, a excepción de la hélice α_1 la cual es más corta en su forma Apo (figura 10).

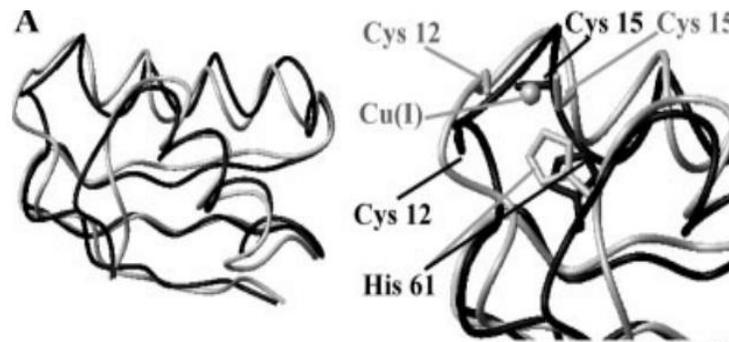


Figura 10. Estructura de ScAtx1-Cu⁺¹ (gris) y ScAtx1-Apo (negro) de *S. sp.* PCC6803, se muestran los elementos de estructura secundaria. (Imagen modificada de Banci *et al.* 2004).

En 2007, Sazinsky y colaboradores determinaron la estructura de CopZ-NT del hipertermófilo *Archaeoglobus fulgidus* (figura 11), esta chaperona es muy particular debido a que está compuesta de dos subdominios: un dominio N-terminal que contiene un centro mononuclear, homólogo a las chaperonas *Atx1-like* con un plegamiento $\beta\alpha\beta\beta\beta\alpha$ y un dominio C-terminal compuesto de hélices α . Su estructura revela sitios adicionales de unión a metales que se localizan en el dominio C-terminal.

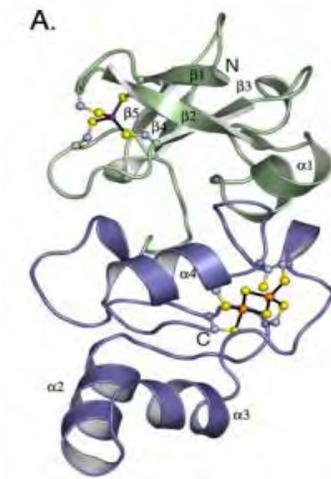


Figura 11. A) Estructura tridimensional del dominio N-terminal de CopZ-NT (verde) y el dominio C-terminal (azul). (Imagen tomada de Sazinsky *et al.*, 2007).

2.2. Oligomerización de las chaperonas de cobre *Atx1-like*

Aunque se conoce mucho sobre las estructuras tridimensionales de las chaperonas de cobre, poco se sabe sobre las formas de estas proteínas en solución (Kihlken *et al.*, 2002). A partir de las observaciones de Wimmer y colaboradores (1999), se postuló la posible formación de un dímero para CopZ de *E. hirae*. Los datos experimentales de DLS mostraban una variabilidad de tamaños del 7%, y los autores

atribuyen esta variación a la agregación de CopZ, dando como resultado una amplia distribución de tamaños y/o formas.

Atx1 de *S. cerevisiae* es la única chaperona de cobre de este tipo para la cual se ha demostrado claramente que permanece en forma monomérica en solución, tanto en su forma Apo como en Holo (Arnesano, 2001). Se han observado formas diméricas en Atox1 de *H. sapiens*, ScAtx1 de *Synechocystis* sp.PCC6803.

En 2002, Khilken y colaboradores, evaluaron los estados oligoméricos de CopZ de *B. subtilis* y mostraron que CopZ-Apo es monomérica al añadir DTT como agente reductor. Así mismo, observaron que la adición de 1 equivalente (eq) de Cu^{+1} ocasiona la dimerización de la chaperona. En sus mediciones concluyeron que al añadir más de 1.5 eq de Cu^{+1} promueve interacciones inespecíficas entre las proteínas. En el caso de ScAtx1, también la dimerización es mediada por cobre (Sazinsky *et al.*, 2007).

En el 2004, Narindrasorasak y colaboradores, realizaron un análisis comparativo entre Atx1 de *S. cerevisiae* y Atox1 de *H. sapiens* con relación a su capacidad de unir metales, observaron que ambas proteínas pueden coordinar los iones: Cu^{+1} , Ag^{+1} , Hg^{+2} , Cd^{+2} y la unión de estos metales altera la conformación de la subunidad estructural y el estado de oligomerización de las proteínas.

En 2010, Badarau y colaboradores, observaron que, en la ScAtx1 de *Synechocystis*, se forma un clúster de dos o cuatro dímeros en coordinación con el cobre (figura 12), dependiendo de la cantidad de iones aplicados a la muestra en solución, observando también la formación de trímeros y aunque la transferencia de cobre de la forma

trimérica es favorable, este proceso es fuertemente dependiente de la forma dimérica, proponiendo que este proceso oligomérico es la manera en que el cobre libre es retirado del citoplasma.

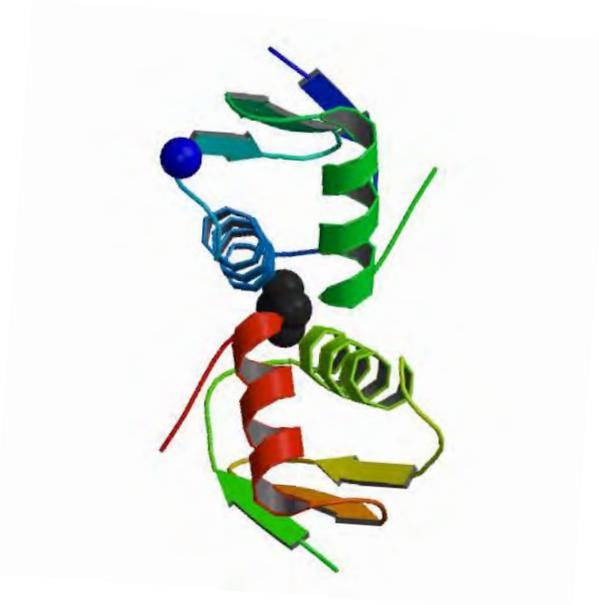


Figura 12. Estructura tridimensional de ScAtx1 de *Synechocystis* sp. PCC6803, se observa la formación de un dímero en coordinación con cuatro iones de cobre. (Imagen tomada de Badarau *et al.*, 2010).

2.3. Particularidades de la unión a metales de las chaperonas de cobre Atx1-like

Khilken y colaboradores (2002) sugieren que el potencial redox de las formas de CopZ de *B. subtilis*, es capaz de reducir el Cu^{+2} a Cu^{+1} . Realizando un experimento con concentraciones de 1 eq de Cu^{+2} se determinó la unión de ~ 0.5 átomos de cobres por cada proteína. El espectro UV-visible sugiere que el cobre detectado es Cu^{+1} , aunque el mecanismo de transferencia de electrones para la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} aún no está claro en este caso, e implicaría la función de la chaperona como cuproso oxidasa

(Khilken *et al.*, 2002). Esta función también puede atribuirse a Atox1 y Atx1, aunque se sabe que la apoproteína reducida es capaz de convertir Cu^{+2} a Cu^{+1} , la proteína oxidada también ejecuta esta función, pero de manera limitada (Narindrasorasak, *et al.*, 2004), demostrando por primera vez que Atox1 es capaz de unir Cu^{+2} y convertirlo a Cu^{+1} en condiciones oxidantes.

Por lo anterior, con el fin conocer cómo las chaperonas de cobre *Atx1-like* llevan a cabo su función en condiciones oxidantes, en este trabajo nos enfocamos en el estudio de las propiedades estructurales de LVATX, en relación a la presencia y ausencia de metales.

3. HIPÓTESIS

La oligomerización de la chaperona de cobre de *Litopenaeus vannamei* (LVATX) en condiciones oxidantes es dependiente de la adición de metales (Cu^{+2} y Ag^{+1}), promoviendo la formación de dímeros y cambios conformacionales en su estructura secundaria.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la ausencia y presencia de metales, Cu^{+2} y Ag^{+1} , sobre la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la LVATX del camarón blanco *Litopenaeus vannamei*.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar un protocolo para la obtención de LVATX con la pureza suficiente para realizar experimentos de DLS, DC y cristalografía.
- Evaluar e identificar los posibles cambios en la estructura secundaria y cuaternaria de la LVATX en presencia y ausencia de Cu^{+2} y Ag^{+1} .
- Obtener cristales de LVATX.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Síntesis del gen para LVATX**

En el laboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos (CIAD-Hermosillo) identificaron la secuencia de una chaperona de cobre *Atx1-like* putativa en el transcriptoma de *L. vannamei* (Ghaffari *et al.*, 2014) la cual fue denominada LVATX (*chaperona de cobre Atx1-like de L. vannamei*). Utilizaron para el diseño de un gen sintético el vector de sobreexpresión pJExpress404 (DNA 2.0, USA), con la secuencia nucleotídica de LVATX más una etiqueta de histidinas (10 histidinas) y el sitio de corte para PSP (*PreScission Protease*) en el extremo N-terminal. El diseño del gen sintético incluyó la optimización de codones para *E. coli*.

***Proceso realizado por colaboradores de CIAD-Hermosillo*

5.2. Análisis de secuencia de LVATX

Se realizó un análisis con el programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) de la secuencia de aminoácidos de LVATX para conocer los valores teóricos de punto isoeléctrico, masa molecular, coeficiente de extinción molar, entre otros. Así mismo se realizó un alineamiento de secuencias de aminoácidos con el programa FASTA EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fast/>) contra la base de datos del PDB (Protein Data Bank), con el fin de identificar las chaperonas *Atx1-like* homólogas a LVATX y con estructura tridimensional determinada. Para complementar este análisis se realizó un alineamiento entre las secuencias de chaperonas de cobre homólogas con el programa BLAST ® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), este análisis se realizó con el fin de calcular su porcentaje de identidad. Sin embargo, para las secuencias de estructuras

cuyo porcentaje de identidad no fue determinado en BLAST (por tener una identidad menor al 30%), el porcentaje de identidad fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ de identidad} = \frac{\text{número de aminoácidos idénticos}}{\text{número de residuos totales}}$$

Finalmente, para localizar los motivos de secuencia conservados y otras características de la secuencia de LVATX en relación con las *Atx1-like* reportadas, se realizó un alineamiento de todas las secuencias con el software Chimera (www.cgl.ucsf.edu/chimera) utilizando ClustalW.

5.3. Identificación de homólogos estructurales

Con el programa Coot versión 0.8.1 (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) se realizó un alineamiento entre las estructuras seleccionadas como homólogos estructurales de LVATX, utilizando los valores de RMSD (Root-mean-square deviation) de la posición de los átomos, considerando los carbonos alfa (C α) de cada una de las estructuras. Se generó un modelo estructural con el programa I-TASSER (<http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER>) para la observación del sitio de unión a metales de las chaperonas *Atx1-like* homólogas a LVATX.7

5.4. Identificación de proteínas involucradas en las vías de tráfico de cobre en el transcriptoma de *L. vannamei*

Se realizó una búsqueda preliminar de las proteínas partícipes en el tráfico de cobre, se utilizaron las bases de datos de Li *et al.*, 2012 y Ghaffari *et al.*, 2014, utilizando como referencia los motivos de secuencia de unión a cobre de cada una de las chaperonas

de cobre y proteínas reportadas. Se utilizó el visualizador de secuencia CLC viewer 8.0.0.

5.5. Clonación y Expresión de LVATX

El gen LVATX fue clonado en el vector pJExpress404 (con promotor T5 y optimizado para *E. coli*) por el proveedor DNA 2.0. Este sistema de expresión es citoplásmico y tiene el gen de resistencia a ampicilina. La cepa utilizada en este estudio fue *E. coli* BL21 PKJE7 que tiene un gen de resistencia a cloranfenicol.

5.5.1. Transformación de *E. coli* BL21 PKJE7

Se transformaron células competentes (50 μ l) de *E. coli* BL21 PKJE7 con 1 μ l de plásmido, colocando la mezcla en tubos *ependorf* estériles de 1.5 ml de volumen. Posteriormente se incubaron en hielo durante 15 min e inmediatamente después a 42°C durante 45 s, al término de esta incubación, la mezcla se colocó nuevamente en hielo durante 5 min.

Se añadieron 200 μ l de medio LB (sin antibiótico) a cada tubo y se introdujeron en un matraz pequeño (125 ml de volumen) para incubarlos a 37°C con agitación de 200 rpm durante 45 minutos.

Al término de la incubación, en condiciones estériles, esta mezcla celular se colocó en cajas petri con agar-ampicilina (200 μ g·ml⁻¹) - cloranfenicol (34 μ g·ml⁻¹) y se extendió en el medio sólido con una espátula Digalski. La caja fue incubada O/N a 37°C y se seleccionaron las colonias que crecieron en este medio, ya que contienen el plásmido

contiene con el gen de resistencia a ampicilina y PKJE7 contiene resistencia a cloranfenicol, posteriormente las cajas se almacenaron a 4°C.

5.5.2. Pre-inóculo

De las colonias transformadas, se seleccionó una y fue colocada en un matraz con 50ml de LB, se adicionó ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y cloranfenicol ($34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se incubó O/N a 37°C a 200 rpm.

5.5.3. Inóculo y expresión

A 1 litro de medio LB se le adicionó ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y cloranfenicol ($34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Se añadieron 15ml de preinóculo y se incubó a 37°C con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (O.D. ₆₀₀) de 0.8, posteriormente se indujo con 1mM de IPTG y se incubó a 16°C por 16 hrs manteniendo la agitación.

5.5.4. Cosecha y lisis de células

Al final de la incubación, el cultivo se colocó en frascos para centrifuga, se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min, después se desechó el sobrenadante y la pastilla de células se colocó en un tubo *Falcon* de 50 ml.

NOTA: Si las células no se utilizan ese mismo día para purificar LVATX, se almacenan a -20°C en tubos debidamente etiquetados y sellados.

Las células se resuspendieron en 30 ml de solución lítica: 10mM Tris HCl pH8, 150 mM NaCl, 5%, Sarcosil y se sonicó en un ciclo 40%de amplitud, 40 s ON y 20 s OFF.

El cultivo lisado se centrifugó a 11,000 rpm durante 20 min, hasta que se formara una pastilla de restos celulares. Se recuperó el sobrenadante y se desechó la pastilla.

5.6. Purificación de LVATX

5.6.1 Purificación por Afinidad a Níquel

Se utilizó el método de *Batch* para la purificación de LVATX. Para este método, se montó 1ml de resina Ni-sepharose (GE Healthcare) a una columna de propileno (Quiagen) (capacidad de 5ml). Se equilibró la resina con 10 volúmenes de columna (CV) de *Buffer A* (50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl) y posteriormente con 10 CV de *Buffer A* + 10mM de imidazol. La resina equilibrada fue colocada junto con el extracto crudo (sobrenadante de la lisis) en un tubo *Falcon* de 50 ml de volumen y se colocó en un agitador-rotador de tubos durante 30 min a 4°C.

Después de la agitación, el extracto junto con la resina fue empacada en la columna de propileno, de este modo la resina se asentó en la base de la columna y el eluado se colectó en un tubo. Para la elución de LVATX *his*⁺ se utilizó un gradiente escalonado de *Buffer A* adicionado con diferentes concentraciones de imidazol: 10 mM, 30 mM, 70 mM, 250 mM y 500 mM. LVATX fue eluida en un volumen total de 5 ml de *Buffer A* con 250 mM de imidazol.

5.7. Electroforesis SDS-PAGE

Mediante SDS-PAGE se identificaron las fracciones que contenían LVATX, así mismo, se utilizó esta técnica para corroborar la expresión y pureza de esta. Los geles

utilizados en este trabajo contenían tricina 10% y acrilamida 15%. Las imágenes fueron capturadas con Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (BioRad).

5.8. Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de LVATX en el extracto se utilizó la técnica colorimétrica de Bradford (1976), las mediciones se realizaron por triplicado utilizando el espectrofotómetro Genesys™ 10S UV-Vis. Como estándar se utilizó una curva con diferentes concentraciones de BSA (*bovine serum albumin*).

5.9. Determinación de Punto Isoeléctrico

Mediante un gel de gradiente de pH “phastgel” (previamente hidratado) en el sistema *PhastSystem separation and control unit* se corrió una muestra de LVATX *his*⁺ a una concentración de 1 mg·ml⁻¹ en *buffer C* (25 mM HEPES pH 8.5, 250 mM NaCl), el gel de isoelectroenfoque utilizado fue para un intervalo de 3-9 de pI y se utilizó una corriente eléctrica entre 75-500 A.

5.10. Inmunodetección de LVATX por Western Blot

Para identificar LVATX se realizó un *Western blot* utilizando un anticuerpo *Penta-His Antibody* (Quiagen) diluido 1/3000, en una muestra de LVATX *his*⁺ expresada, y cargada en un gel de Tris-tricina 10%. Una vez resuelta por electroforesis, se transfirieron las bandas a una membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia semiseca (Bio-Rad), utilizando el *buffer* de transferencia: 37 mM Tris HCl, 39 mM de Glicina, 0.037% SDS, 20% Metanol. La membrana fue teñida con Luminol

(*Santa Cruz Biotechnology*) (diluido 1:1) durante 30 segundos y revelada en Gel Doc XR System (*Bio-Rad*).

5.11. Observación de LVATX por microscopía electrónica de transmisión (MET)

En un trozo de *parafilm* (5x5 cm) se colocó una gota (25 µl) de muestra de LVATX *his*⁺, al interior de la gota se inserta una rejilla de cobre con membrana *formvar*⁵ y carbón evaporado y se mantuvo flotando en la gota durante 1 minuto. Posteriormente, se extrajo la rejilla y se retiró el exceso de muestra con papel filtro tocando una región pequeña del borde de la rejilla. Después, se dejó flotar sobre una gota de 5µl de acetato de uranilo 2%, durante 1 minuto. El exceso de acetato de uranilo también se retiró con papel filtro. Las rejillas se observaron con MET, ZEISS modelo libra a 120kV. Las imágenes capturadas fueron a aumentos de 6,300X - 100,000X.

5.12. Corte de etiqueta de histidinas

Para el corte de la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de LVATX, se estandarizó el protocolo de expresión, purificación y reacción de corte de la proteasa *PSP*.

5.12.1. Expresión de PSP (*PreScission Protease*)

Se transformaron células *E. coli* BL21 con 2 µl de plásmido pGEX con el gen *PSP*. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB sólido con ampicilina (100 µg·ml⁻¹) y se incubaron a 37°C O/N.

⁵ Formvar: resina termoplástica adicionada con carbón evaporado utilizada como película de soporte en las rejillas de cobre para MET.

Las placas con bacterias se utilizaron como inóculo agregando 5ml de LB para resuspender a las bacterias. Esta mezcla se añadió a 1L de medio LB con ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). El cultivo se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una O.D.₆₀₀ de 0.5, momento en que se indujo con 0.5 mM de IPTG. El cultivo se incubó a 16°C y 200rpm, O/N. Posteriormente se cosecharon las células y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.12.2. Purificación de PSP

Las células se resuspendieron en *buffer* de lisis: 50mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 20% glicerol, 10 mM EDTA, 1mM DTT. Se añadió $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de lisozima y se incubó el extracto por 30 min a 4°C con agitación.

Se lisaron las células con 10 pulsos de sonicación y se centrifugaron 30 min a 7,000 rpm y 4°C . Se utilizó una columna de propileno empacada con 3 ml de resina Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow (*GE Healthcare*). Se lavó la columna tipo GST con 10 CV de *buffer* de lavado (*buffer* de lisis), se aplicó el lisado (extracto crudo clarificado) a la columna, se dejó eluir por flujo a gravedad y se repitió este paso para asegurar que la proteína se uniera a la resina. Se lavó la columna con 30 CV de *buffer* de lavado (*buffer* de lisis). Se eluyó la *PSP* con 2 CV del *buffer* de elución (50 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 20% glicerol, 10mM EDTA, 1mM DTT, 10mM de glutatión reducido). Se comprobó la pureza de *PSP* mediante SDS-PAGE 15%.

Las fracciones con *PSP* fueron dializadas contra *buffer* de almacenamiento (50mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 20% glicerol, 10mM EDTA y 1mM DTT). Posteriormente se almacenó la *PSP* en alícuotas de 50 μl a -80°C .

5.13. Corte de Etiqueta de histidinas de LVATX

Para el corte de la etiqueta de histidinas de LVATX, se realizó una diálisis contra *buffer* de corte (*buffer* A + 1mM de DTT). A la muestra de 6 mg·ml⁻¹ LVATX *his*⁺ pura se agregaron 50µl de *PSP* a una concentración de 4 mg·ml⁻¹, esta muestra se colocó en una bolsa de diálisis con tamaño de corte de 6-8 kDa, la diálisis se realizó en un volumen de 800 ml de *buffer* de corte (20mM HEPES, 0.5 M NaCl, 10% glicerol, 1mM DTT) con agitación O/N a 4°C. Se comprobó el corte de la etiqueta de histidinas mediante SDS-PAGE Tricina 10%.

5.14. Purificación de LVATX por cromatografía de exclusión molecular

La purificación por exclusión molecular fue utilizada para separar LVATX (sin etiqueta de histidinas) de los residuos de la reacción de corte, así como de la *PSP*. Para realizar este ensayo se utilizó una columna Superdex® 75 10/600 (*GE Healthcare*), que tiene un volumen total de 120 ml·min⁻¹ y está conectada a un sistema GE ÄKTA prime plus. Se equilibró la columna con 2 CV de *buffer* A (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl), posteriormente se inyectó la muestra a un flujo de 1 ml·min⁻¹, con un límite de presión 0.3 MPa. La proteína se inyectó a una concentración de 4 mg·ml⁻¹, con un volumen total de 2 ml. Se registró el tiempo de retención con un detector UV U9-L: 280nm. Se colectaron fracciones de 2 ml de volumen y se corrió un SDS-PAGE para identificar los picos y el tiempo de retención donde eluye LVATX.

5.15. Identificación proteómica LC-MS

Después de identificar las fracciones que contenían LVATX. Las muestras se corrieron en un SDS-PAGE 15%, esta electroforesis se realizó a 4°C, con soluciones nuevas y

filtradas, para evitar contaminantes en la muestra, estas bandas fueron analizadas por LC-MS (ver más detalles en anexo 1). La concentración de la proteína analizada fue de $2.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.16. Análisis del estado de agregación de LVATX

Se analizaron las muestras de LVATX por DLS (*Dynamic light scattering* por sus siglas en inglés). Las mediciones se realizaron en el equipo Zetasizer Nano Z (ángulo de dispersión 173°), a una temperatura de 28°C tanto para la muestra Apo, así como Holo.

Para la adición de estos metales se prepararon soluciones *stock* de sulfato de cobre (Cu_2SO_4) y nitrato de plata (AgNO_3), ambas soluciones se prepararon a una concentración de 1M. Se realizaron diluciones para añadir 1eq de ion en relación con la concentración de LVATX 1:1. La concentración de LVATX utilizada para estas mediciones fue de $0.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ en un volumen de 1ml. Para validar las mediciones de DLS se consideró que el coeficiente de correlación de las mediciones de cada experimento fuera ≥ 0.5 .

5.17. Análisis de estructura secundaria de LVATX por Dicroísmo Circular (DC)

Mediante DC se analizaron las muestras de LVATX, se usó un espectropolarímetro marca Jasco modelo 715 (*Analytical instruments*). La muestra de LVATX se utilizó a una concentración de $0.3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ y previamente dializada contra *buffer* 50mM Tris-HCl pH8, 50mM NaCl (*buffer* filtrado y desgasificado). Se analizó LVATX en su forma Apo y Holo (1 eq de Cu^{+2} y Ag^{+1}) como control negativo se midió el espectro del *buffer*. Las mediciones se realizaron a una velocidad de adquisición de datos $20 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ (2

espectros·s⁻¹) a 25°C y a una longitud de onda λ de 190-250 nm, los datos se analizaron con el servidor BeStSel (<http://bestsel.elte.hu>)

5.18. Análisis de estructura secundaria *in silico*

Se realizó un análisis de estructura secundaria de las chaperonas *Atx1-like* depositadas en el PDB de *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y *B. subtilis*, comparando los esquemas de estructura secundaria de tres de las chaperonas de cobre homólogas a LVATX, tanto en su forma Apo como Holo (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>) con el fin de identificar diferencias estructurales.

5.19. Cristalización de LVATX

Se realizaron pruebas de cristalización con la proteína purificada en la forma Apo y Holo, se realizaron pruebas con la técnica de *Batch*, de gota sedente y gota colgante, estas dos últimas con el robot de cristalización Mosquito LCP y con el robot GRYPHON. Se utilizaron los siguientes *kits* de cristalización:

- Wizard I, II, III, IV
- Crystal Screen 1, 2
- Crystal Screen Cryo
- Crystal Screen Lite
- PEG-ION
- Index, I, II
- Quick Screen
- MembFac

- Morpheus

Para la identificación de cristales de proteína, los cristales observados fueron teñidos con IZIT (Hampton Research).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos de LVATX y determinación de parámetros fisicoquímicos (teóricos).

LVATX es una chaperona de cobre de la familia *Atx1-like*, tiene 74 residuos de aminoácidos y presenta en su secuencia los motivos de unión a metales reportados para los miembros de esta familia (Shoshan *et al.*, 2016). La construcción utilizada en este estudio fue denominada LVATX *his*⁺, ya que posee una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, así mismo el sitio de corte para la PSP (*PreScission Protease*) LeuGluValLeuPheGln/GlyPro (figura 13).

Secuencia de aminoácidos de LVATX *his*⁺

```
MGSHHHHHHHHHSSGHLEVLFG/GPSHMSLMVHEFTVEMTCEGCSG  
AAKRVLGKLGDKVSNVDINLETKKVIVTSTLSSDELLETLLKKTGKEVTYLG  
GKAA
```

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de LVATX (chaperona de cobre *Atx1-like* de *L. vannamei*). Se observa la etiqueta de 10 histidinas (azul), la secuencia del sitio de corte de la PSP (morado) y el motivo de unión a metales MXCXXC (rojo).

Los parámetros estimados *in silico* a partir de la secuencia de LVATX, tanto con etiqueta de histidinas LVATX *his*⁺ como para LVATX (sin la etiqueta) se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. *Parámetros fisicoquímicos de LVATX*

Parámetro	LVATX <i>his</i>⁺	LVATX
Número de aminoácidos	101	74
Masa molecular (Da)	11028.55	8283.59
Coefficiente de extinción molar* ($M^{-1} cm^{-1}$)	1490	1490
Punto isoeléctrico	6.89	6.92

Valores teóricos de los parámetros fisicoquímicos obtenidos del análisis de secuencia de LVATX *his*⁺ y LVATX (sin etiqueta de histidinas) con el programa Protparam. (*) Valor del coeficiente de extinción molar asumiendo que todas las cisteínas están reducidas.

6.2. Identificación de secuencias homólogas a LVATX

Hasta la fecha, únicamente se han determinado las estructuras tridimensionales de chaperonas *Atx1-like* de seis organismos (tabla 1), el porcentaje de identidad de estas secuencias con respecto a LVATX fue determinado con el software FASTA EBI, obteniendo así, para cuatro de las secuencias, valores mayores al 30% de identidad, Atox1 (Hah1) de *H. sapiens* (58%), Atx1 de *S. cerevisiae* (56%), CopZ de *B. subtilis* (31%) y ScAtx1 de *Synechocystis* sp. PCC6803 (31%). Sin embargo, para las chaperonas CopZ-NT de *A. fulgidus* y CopZ de *E. hirae* que fueron identificadas por tener estructura tridimensional depositada en el PDB, el porcentaje de identidad de la

secuencia no pudo ser determinado en este programa. Probablemente a causa de que el dominio *Atx1-like* en CopZ-NT está precedido por un dominio N-terminal de 130 residuos que contiene nueve cisteínas y es homólogo a una clase de proteínas aún sin caracterizar en arqueas (Boal & Rosenzweig, 2009), minimizando el porcentaje de identidad entre estas secuencias. Para resolver esto, se realizó un alineamiento de LVATX con la secuencia del dominio *Atx1-like* de CopZ-C, conformado por 69 aminoácidos, obteniendo un porcentaje de identidad de 38%. En el caso de CopZ de *E. hirae*, la identidad de secuencia es baja (<30%), y fue calculada con la fórmula descrita previamente en la metodología, obteniendo porcentaje de identidad de 17.6% (tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de identidad de secuencia de chaperonas *Atx1-like* con LVATX

<i>Especie</i>	<i>Proteína</i>	<i>% Identidad</i>	<i>% Positivos</i>	<i>E- valor</i>	<i># de acceso PDB</i>
<i>Homo sapiens</i>	Atox1 (Hah)	58	75.4	3.5E-11	1FEE
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Atx1	56	68	2E-21	1FD8
<i>Bacillus subtilis</i>	CopZ	31	48	8E-07	1K0V
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	ScAtx1	31	50	3E-08	1SB6
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	CopZ-C	38	50	0.003	2HU9
<i>Enterococcus hirae</i>	CopZ	17.6	55	-	1CPZ

Porcentaje de identidad de secuencias de chaperonas de cobre de diferentes organismos con estructura tridimensional depositada en el PDB. (% de identidad) número de residuos de aminoácidos idénticos. (% positivos) porcentaje de residuos de aminoácidos con características químicas similares que se

mantienen en las secuencias. (E-value) definido como el valor de expectancia, nos permite definir la tasa de falsos positivos a encontrar dada la longitud de la secuencia problema.

6.3. Alineamiento de secuencias homólogas a LVATX

A nivel de estructura primaria, se puede observar una treonina en la segunda posición del motivo de unión a metales en LVATX (figura 14). Estudios recientes, demuestran la importancia del aminoácido en la segunda posición del motivo **MXCXXC**, siendo común en eucariontes la presencia de una histidina o treonina **MH/TCX₁X₂C** (Shoshan *et al.*, 2016). En Atox1 de *H. sapiens*, la treonina facilita la transferencia direccional del cobre a las proteínas blanco (Niemiec *et al.*, 2014), potencialmente este residuo podría tener la misma función en LVATX. Esta proteína también posee una secuencia que en Atox1 de *H. sapiens* se ha determinado como NLS (por sus siglas en inglés *Nuclear Localization Sequence*), **KKTGK**, en el extremo C-terminal que, desde su descubrimiento en 1999, su función aún no ha sido discutida detalladamente (Hamza *et al.*, 1999). En aspectos generales, se ha descrito para levadura, que los motivos **MXCXXC** y **KTGK** forman un clúster en la superficie de la proteína que es crucial para la función antioxidante en levadura (figura 15) (Lin *et al.*, 1997; Hung *et al.*, 1998), en el mismo organismo, se ha reportado que la lisina 60 (K60) del motivo NLS, tiene un papel importante en la actividad e interacción con Cu-ATPasa y modula la afinidad del sitio **CXXC** por el cobre, en el caso de humano es la lisina 63 (K63) (Hussain *et al.*, 2008).

En el alineamiento de secuencias se aprecia claramente la presencia de ambos motivos en LVATX, lo que confirma que la secuencia de esta chaperona de *L. vannamei* pertenece a la familia *Atx1-like*.



Figura 15. Esquema de los residuos participantes en la coordinación de cobre en las chaperonas de cobre de eucariontes. En verde el ion Cu^{+1} está coordinado por las dos cisteínas (C18-C21) del motivo de unión a metales, así mismo se observa la participación de una treonina (T17). Se observa la lisina (K68) del motivo rico en lisinas cercano al C-terminal (Modelo generado por I-TASSER, basado en la estructura de *H. sapiens*, PDB: 1FEE).

En el caso de procariontes se ha reportado que en la segunda posición del motivo de unión a metales presenta una serina. El alineamiento de las secuencias de las *Atx1-like* de procariontes en comparación con LVATX muestra que las secuencias de CopZ de *B. subtilis* y *E. hirae*, así como ScAtx1 de *S. sp.* PCC6803 mantienen conservados las dos cisteínas del motivo **MXCXXC** y el segundo residuo es variable (figura 16). El motivo NLS está ausente en las secuencias de procariontes analizadas. Esta secuencia es exclusiva de eucariontes debido a la disposición del material genético en el núcleo en caso de eucariontes y la ausencia de este organelo en procariontes.

Alineamiento de secuencias de *Atx1-like* de procariontes

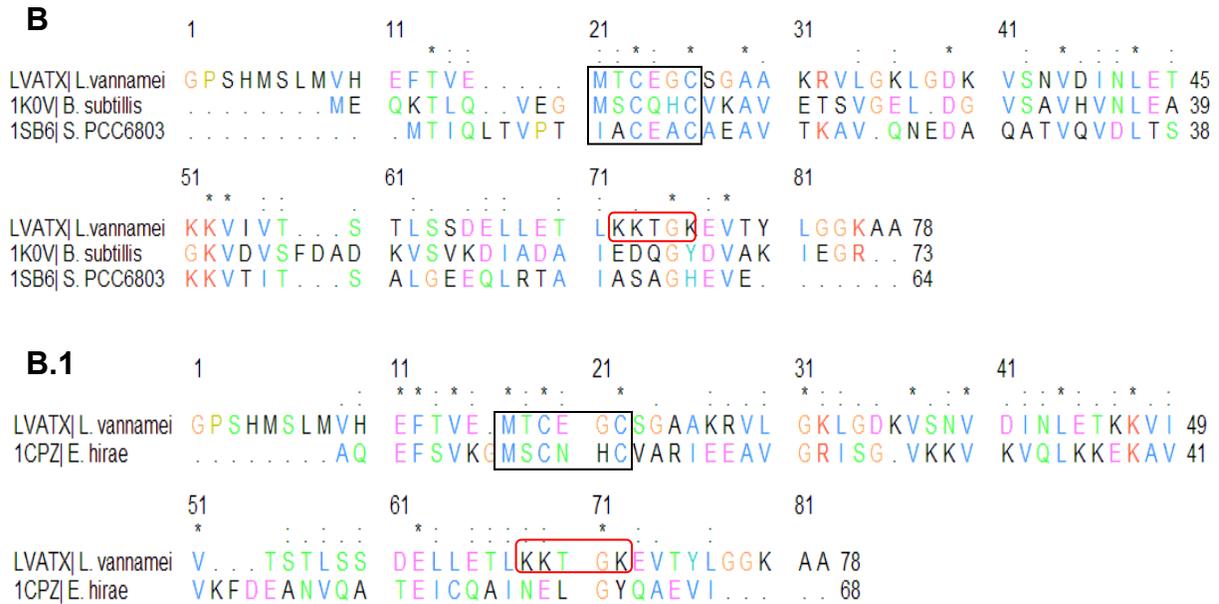


Figura 16. Alineamiento de las secuencias de chaperonas de cobre de procariontes con LVATX. Las regiones con (*) muestran los sitios conservados, (:) señalan sitios con residuos similares, los recuadros negros enmarcan los motivos de unión a metales, los sitios NLS están enmarcados en los recuadros rojos. **B)** Alineamiento de las secuencias de CopZ de *B. subtilis* y de ScAtx1 de *S. sp. PCC6803* con LVATX. **B.1)** Alineamiento de la secuencia de CopZ de *E. hirae* con LVATX.

6.4 Análisis de estructuras tridimensionales homólogas a LVATX

En adición al análisis de secuencia, se analizó la homología estructural tridimensional en las estructuras determinadas de las chaperonas *Atx1-like* identificadas en la tabla 3 y se observó que la mayoría mantiene un plegamiento tipo ferredoxina (figura 17), a excepción de dos chaperonas: ScAtx1 que sólo tiene tres hebras β y dos hélices α en su estructura y CopZ-NT tiene una hebra β más en su dominio *Atx1-like* (Banci *et al.*, 2004; Sazinsky *et al.*, 2007).

Estructuras tridimensionales homólogas a LVATX

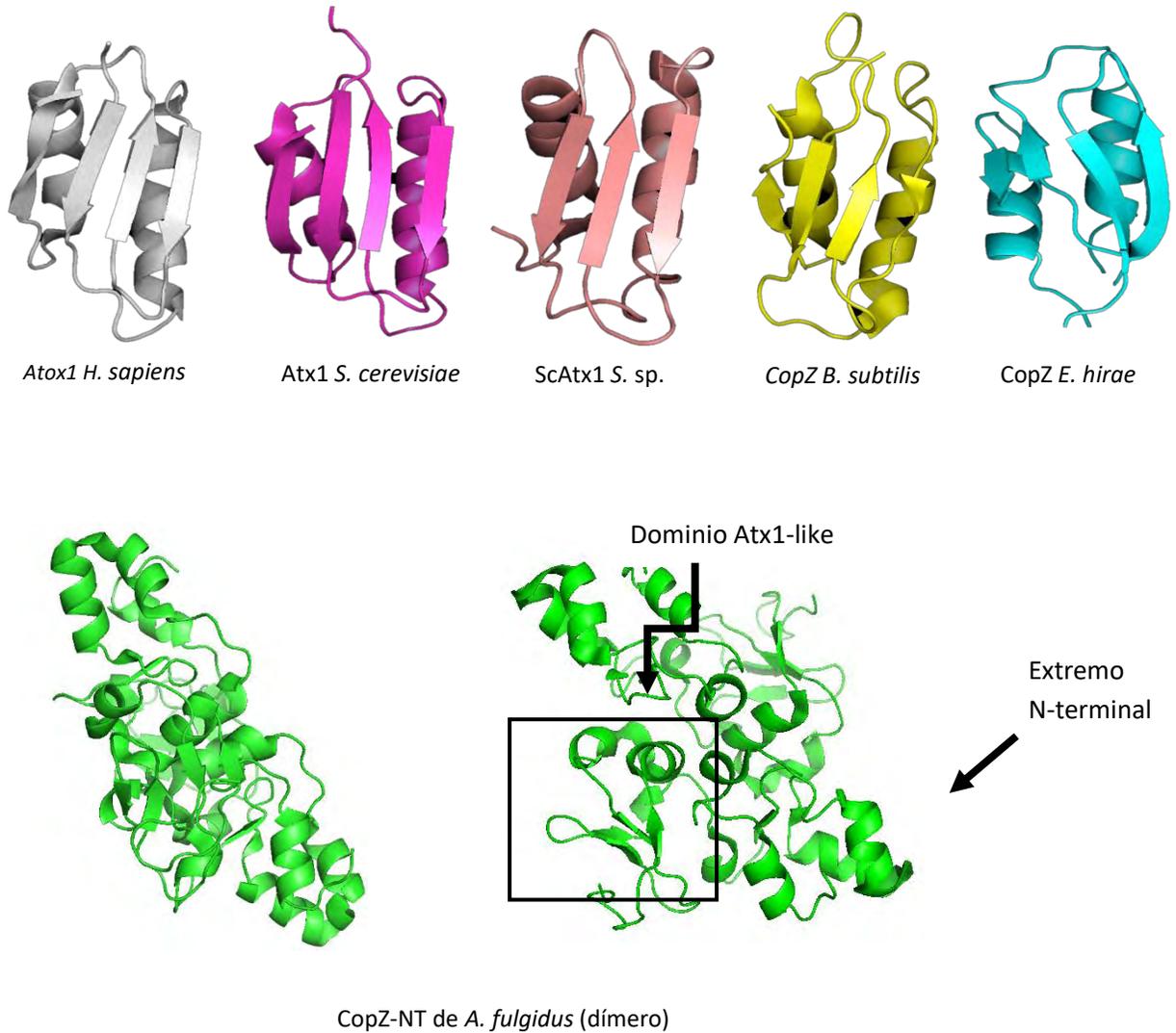


Figura 17. Estructuras tridimensionales de las chaperonas de cobre *Atx1-like* homólogas a LVATX. Estructura de *Atox1* de *H. sapiens* (plateado), estructura de *Atx1* de *S. cerevisiae* (magenta), estructura de *ScAtx1* de *S. sp. PCC6803* (rosa), estructura de *CopZ* de *B. subtilis* (amarillo), estructura de *CopZ* de *E. hirae* (cian), estructura de *CopZ-NT* de *A. fulgidus* (verde), en el recuadro negro se enmarca el dominio *Atx1-like* de esta proteína.

La sobreposición de las estructuras tridimensionales de las chaperonas de cobre *Atx1-like* demuestra las similitudes estructurales entre ellas (figura 18).



Figura 18. Empalme de las estructuras de chaperonas de cobre *Atx1-like* homólogas a LVATX.

De la comparación entre las estructuras de estas chaperonas, en la tabla 4 se muestran los valores RMSD obtenidos (usando $C\alpha$). Estos datos revelan que estructuralmente, las chaperonas son similares, y en el caso de CopZ de *E. hirae* a pesar de tener un bajo porcentaje de identidad en secuencia (17.6%), es también un homólogo estructural del grupo de las *Atx1-like*. Lo anterior resalta la importancia de realizar análisis similares para develar relaciones estructurales, difíciles de evidenciar con un análisis a nivel de secuencia.

Tabla 4. Valores de RMSD entre estructuras Atx1-like de diferentes especies

RMSD	<i>H. sapiens</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. PCC6803</i>	<i>E. hirae</i>	<i>A. fulgidus</i>
<i>H. sapiens</i>	0	1.6 Å 65 Cα	1.89 Å 58 Cα	1.7 Å 50 Cα	1.82 Å 65 Cα	3.47 Å 30 Cα
<i>S. cerevisiae</i>		0	2.11 Å 66 Cα	2.12 Å 61 Cα	2.46 Å 62 Cα	2.51 Å 19 Cα
<i>B. subtilis</i>			0	2.31 Å 24 Cα	2.4 Å 61 Cα	2.51 Å 24 Cα
<i>S. sp</i>				0	2.68 Å 49 Cα	2.6 Å 23Cα
<i>E. hirae</i>					0	3.06 Å 17Cα
<i>A. fulgidus</i>						0

Valores de RMSD calculados con base en los Cα, comparación entre estructuras tridimensionales de chaperonas de cobre homólogas a LVATX.

6.5. Identificación de proteínas involucradas en el tráfico de cobre en *L. vannamei*

Del análisis preliminar en el transcriptoma de LVATX (Liu *et al.*, 2012; Ghaffari *et al.*, 2014) se identificaron las secuencias de cuatro proteínas involucradas en el tráfico de cobre.

- CutC* - proteína partícipe en la homeostasis de cobre, se localiza en el núcleo (Li *et al.*, 2010)
- LVATX* – chaperona de cobre tipo Atx1-like, se localiza en el citoplasma (Lui *et al.*, 2012)
- Ctr*- Proteína de alta afinidad a cobre, se localiza en la membrana plasmática
- ATPasa* asociada a la enfermedad de Menkes (ATP7A), se localiza en la cara *trans* de Aparato de Golgi.

6.6. Expresión e identificación de LVATX

Con el protocolo de expresión mencionado previamente en la metodología, se obtuvo un rendimiento de 6 mg de LVATX por litro de cultivo. Se observa la sobreexpresión de LVATX *his*⁺ (figura 19A), con una masa molecular cercana a ~12 kDa. En el *Western blot* (figura 19B), fueron detectadas dos bandas por el anticuerpo *Penta•his antibody* (Quiagen), la banda más gruesa corresponde con la masa molecular estimada para LVATX *his*⁺. Así mismo, este valor es muy cercano al estimado por el software Protparam (~11kDa) (tabla 2).

Expresión e Identificación de LVATX

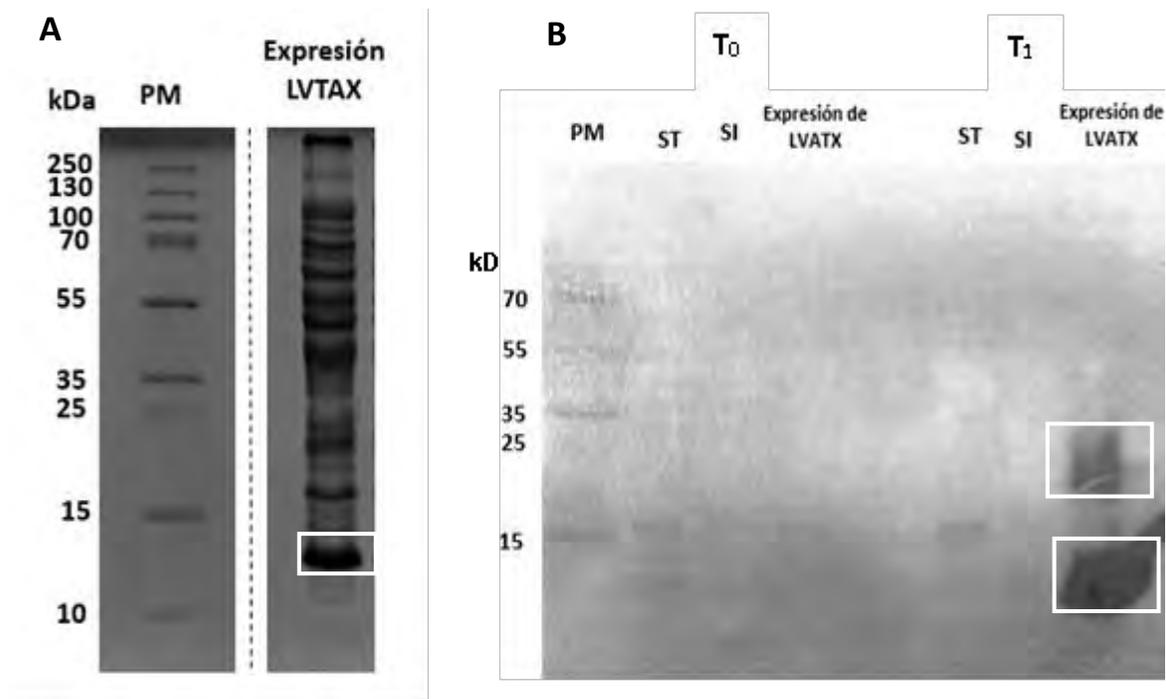


Figura 19. **A)** Análisis por SDS-PAGE 15% de la expresión de LVATX. (PM) marcador de masa molecular, (expresión de LVATX) sobrenadante de las células sonicadas. La banda señalada en el recuadro blanco corresponde a LVATX *his*⁺ (ver gel completo en anexo 2). **B)** *Western blot*, las bandas

señaladas con los recuadros blancos corresponden a las proteínas detectadas con el anticuerpo *Penta-his antibody* (Quiagen). (ST). Cepa sin transformar, (SI) cultivo sin inducir,

6.7. Purificación de LVATX *his*⁺

Mediante cromatografía de afinidad a níquel (*Batch*), se obtuvo LVATX *his*⁺ con alta pureza (figura 20), y se observó a concentraciones mayores de 3 mg·ml⁻¹ la formación de un precipitado de LVATX (datos no mostrados) Este comportamiento no es nuevo, CopZ-Cu⁺¹ de *E. hirae* es otra chaperona de cobre que no puede mantenerse en solución a concentraciones mayores de 0.7 mM (~5.0 mg·ml⁻¹) (Wimmer *et al.*, 1999) y en el caso de Atx1-Cu⁺¹ de *S. cerevisiae* si la concentración es mayor a 2 mM (~15 mg·ml⁻¹) la proteína es inestable, además se tiene registros de que también es sensible a cambios de temperatura, promoviendo la formación de precipitados (Arnesano *et al.*, 2001), sin embargo, si la concentración se mantiene a ≤1.8 mM (~13 mg·ml⁻¹) y 25°C, Atx1-Cu⁺¹ se mantiene estable. Asumiendo que LVATX tiene un comportamiento similar, la purificación de LVATX se realizó a temperatura ambiente (~25°C) y durante el procedimiento no se observó la formación de precipitados.

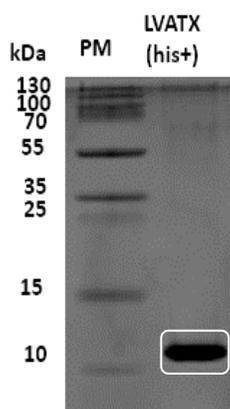


Figura 20. Análisis por SDS-PAGE 15%. (PM) marcador de masa molecular, la banda señalada con el recuadro blanco corresponde a LVATX *his*⁺ pura.

6.8. Análisis del estado de agregación de LVATX his⁺

Se analizó por DLS la muestra de LVATX his⁺ a una concentración de 1 mg·ml⁻¹ con el fin de determinar la viabilidad de la muestra para ensayos de oligomerización y de cristalización. En estos experimentos, se observó la formación de grandes agregados en solución (figura 21)

De las tres mediciones realizadas a tres tiempos (T₀, T₁ y T₂) se observa que existe más de un estado oligomérico de LVATX his⁺, cada una de las mediciones se realizó con una diferencia de tres minutos entre cada una. Se observan poblaciones que varían de tamaños con radios hidrodinámicos (R_H) que oscilan desde los ~22 nm (4,613 kDa), ~34 nm (12,925 kDa) hasta los ~400 nm (1'118,721 kDa), estos agregados fueron confirmados mediante MET

Radio hidrodinámico de LVATX his⁺ en solución

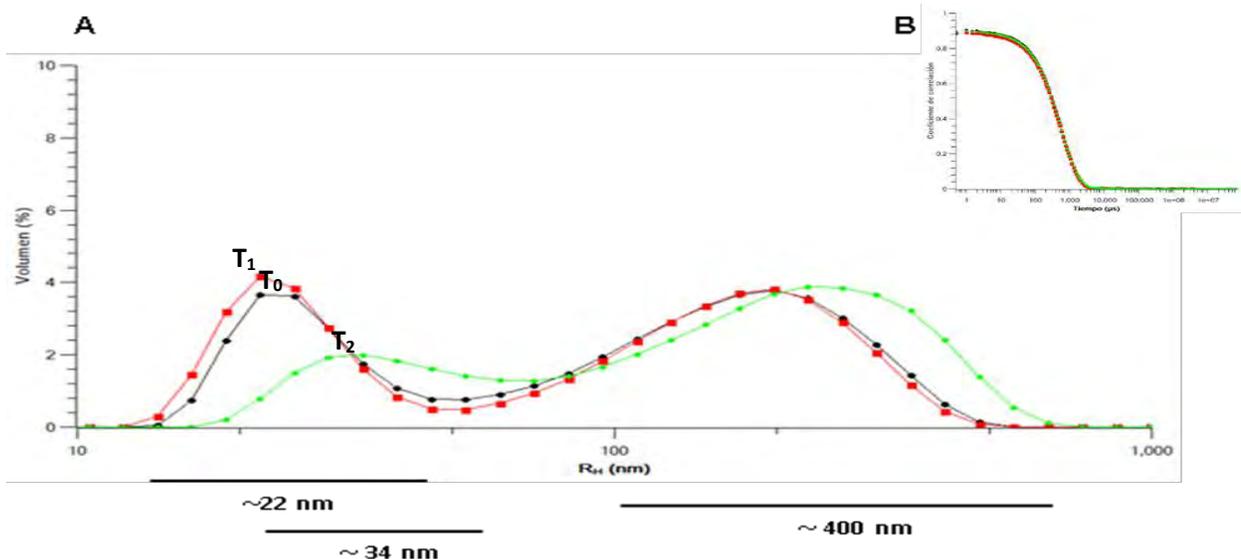


Figura 21. Análisis de DLS de una muestra de LVATX his⁺ pura. **A)** Gráfico de las diferentes poblaciones de LVATX his⁺ en solución. Las barras negras de la parte inferior del gráfico señalan el radio hidrodinámico (R_H) promedio de las poblaciones presentes en los picos de las tres mediciones (nm). (T₀)

medición inicial, (T_1) medición a los 3 minutos y (T_2) medición a los 6 minutos. **B)** Gráfico del coeficiente de correlación del espectro de DLS.

Mediante MET se pueden observar los agregados de LVATX *his*⁺, la mayoría tienen forma redonda, con un diámetro desde los ~30 nm (figura 22).

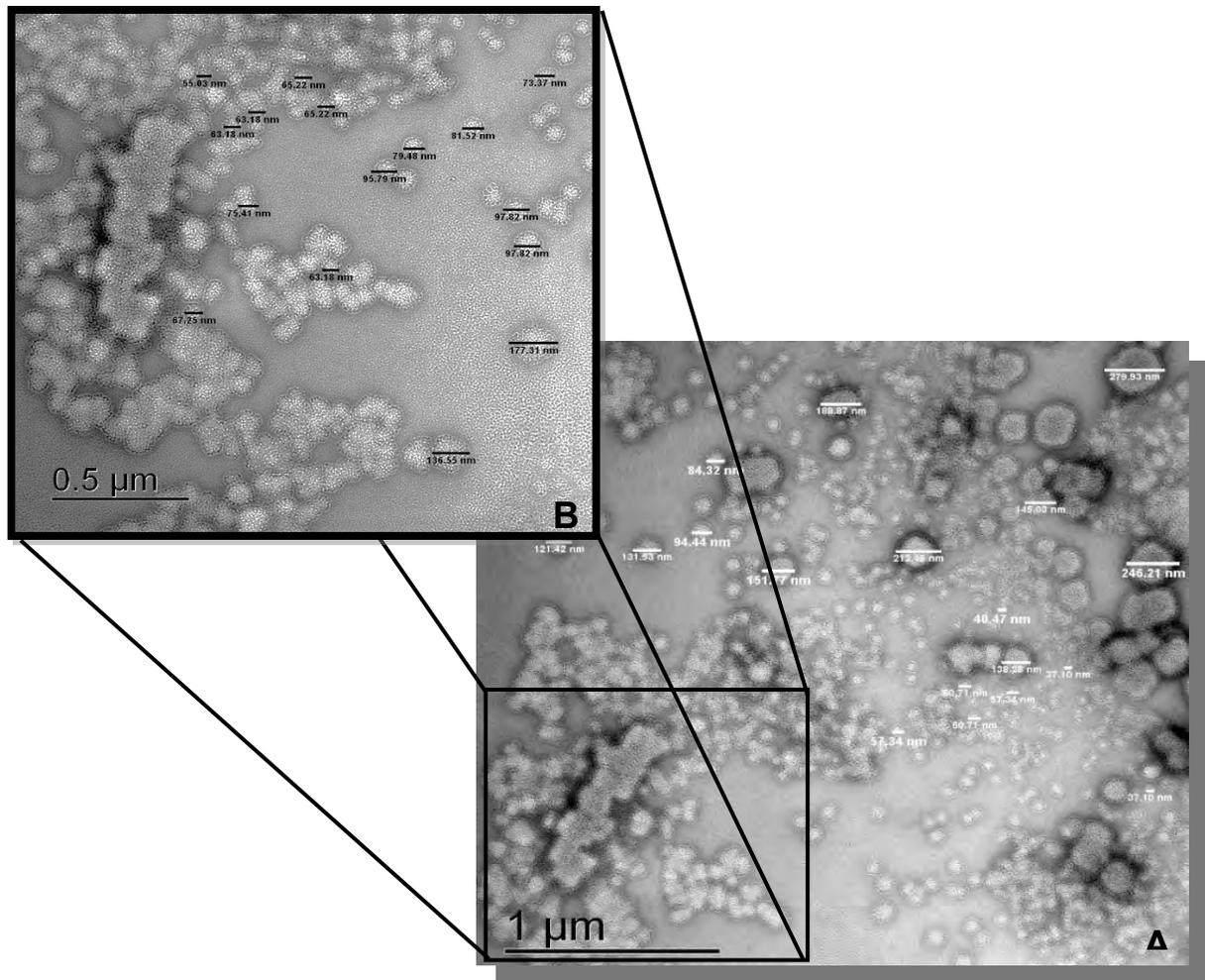


Figura 22. **A)** Agregados de LVATX *his*⁺, contraste convencional para MET (acetato de uranilo). Las barras indican el diámetro de los agregados en nanómetros (nm), 6,300X. **B)** Ampliación a una región con agregados de diversos tamaños (10,000X).

A mayor aumento podemos observar que varios agregados se conforman por unidades de ~120-160 nm de diámetro de LVATX *his*⁺ (figura 23). Esta agregación

puede ser ocasionada por la etiqueta de histidinas, así que se optó por evaluar si este comportamiento de agregación era típico de LVATX o un artefacto de la etiqueta de histidinas añadida.

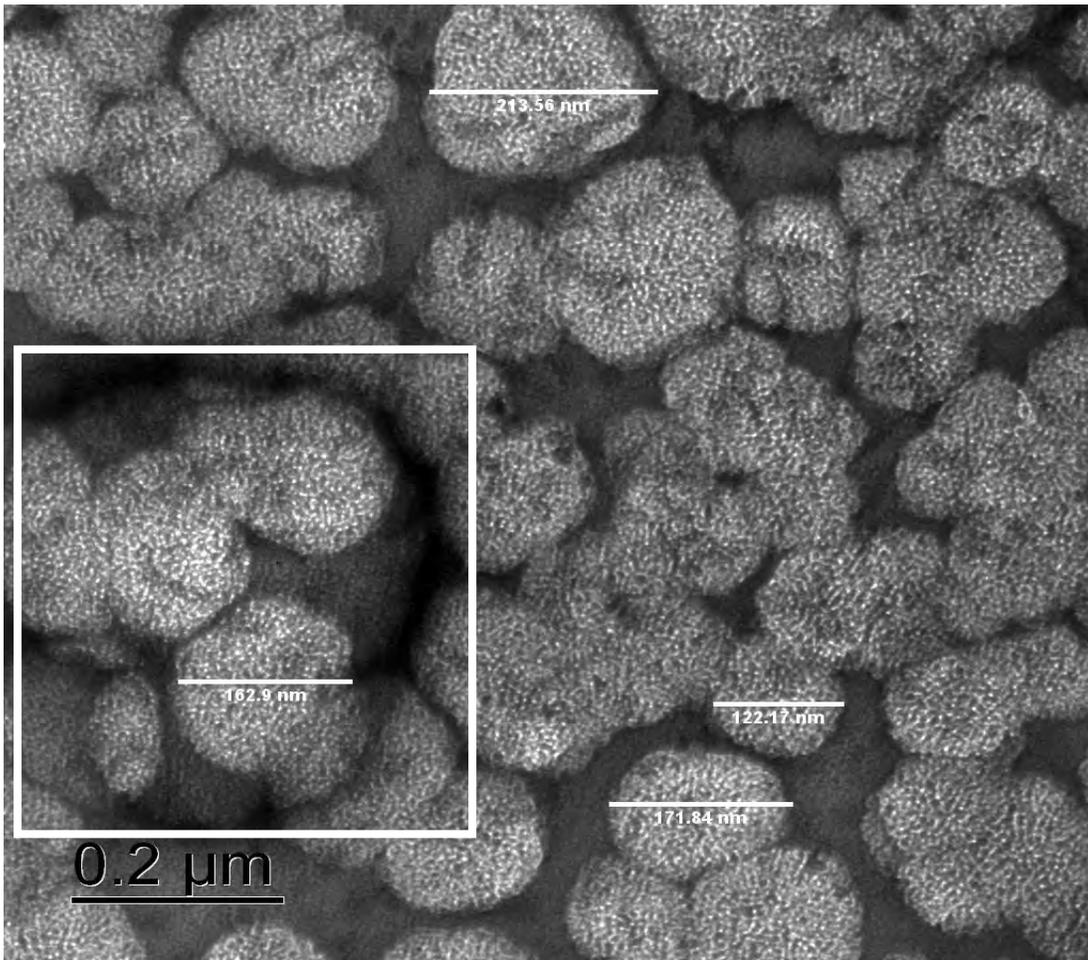


Figura 23. Agregados de LVATX *his*⁺ contraste convencional para MET (acetato de uranilo). Las barras indican el diámetro de los agregados en nanómetros (nm), 20,000X. El recuadro blanco señala la formación de un agregado más grande por subunidades de ~160 nm de diámetro.

6.9. Purificación de PSP (*PreScission Protease*) y corte de etiqueta de histidinas

Se purificó la proteasa PSP y se obtuvo a una concentración de $3.5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se pueden observar del proceso de purificación por afinidad a GST la fracción no unida a la columna y la banda mayoritaria correspondiente a la proteasa y algunas bandas por debajo de los 35 kDa (figura 24).

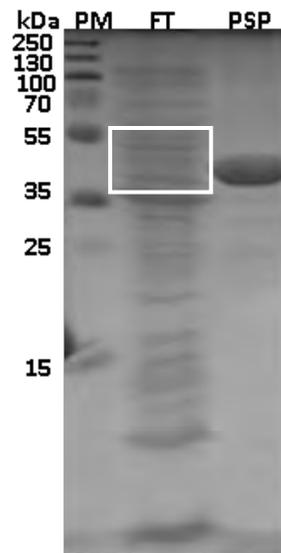


Figura 24. Análisis por SDS-PAGE 15%. (*PSP*) *PreScission Protease* purificada (46 kDa), (FT) Fracción no retenida, (PM) marcador de masa molecular.

La proteína LVATX *his*⁺ fue procesada con la *PSP* como se describe en materiales y métodos. La reacción de corte fue verificada mediante electroforesis de proteína donde se observan LVATX digerida y otras bandas de proteína que corresponden a la *PSP*, LVATX *his*⁺ y residuos de la reacción de corte (figura 25)

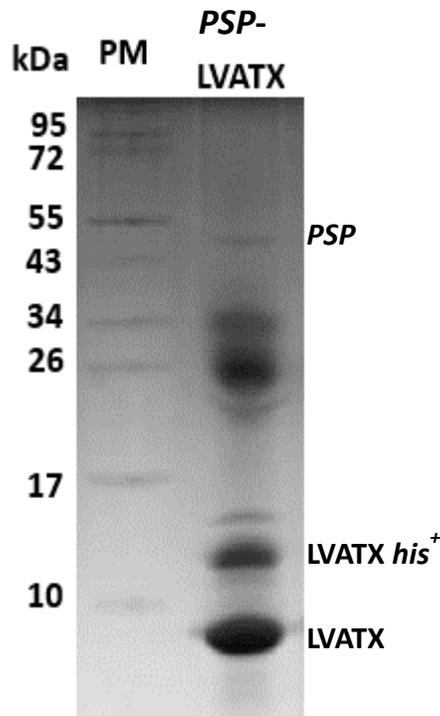


Figura 25. SDS-PAGE Tris-tricina 10%. Corte de la etiqueta de histidinas de LVATX. LVATX (sin etiqueta) ~8 kDa. (*PSP*) *PreScission Protease*, LVATX *his⁺* (proteína sin cortar). (PM) marcador de masa molecular.

6.10. Purificación de LVATX (*Ensayo de filtración en gel*)

En la purificación de LVATX por cromatografía de exclusión molecular (después de la reacción de proteólisis con la *PSP*), se obtuvieron varios picos a diferentes volúmenes de elución. En el pico 1 eluyen *PSP* y LVATX *his⁺*, en los picos 2, 3 y 4 eluye LVATX, en los picos 5 - 8 no se observan bandas en el gel (figura 26).

Perfil de elución de LVATX

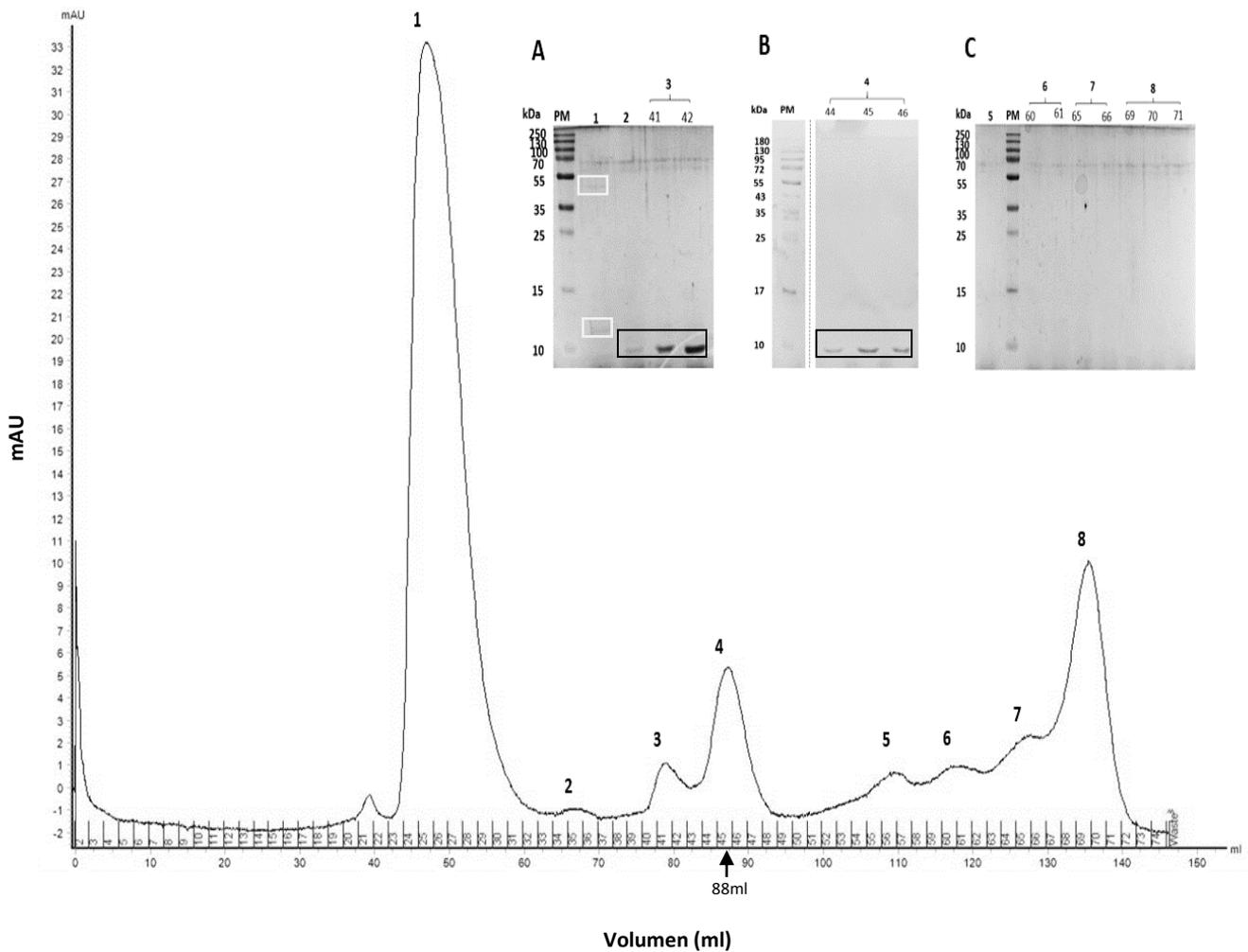


Figura 26. Cromatograma de purificación de LVATX por cromatografía de exclusión molecular. La concentración de proteína total cargada a la matriz fue de $6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Los picos marcados con los valores 2,3 y 4 corresponden a LVATX en diferentes estados oligoméricos. *Buffer*: 50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl. **A)** SDS-PAGE 15% de las fracciones de los picos 1,2 y 3 los recuadros blancos señalan las bandas de *PSP* y LVATX *his*⁺, los recuadros negros enmarcan las bandas de LVATX en diferentes fracciones. **B)** SDS-PAGE 15% de las fracciones del pico 4, los recuadros negros enmarcan las bandas de LVATX en diferentes fracciones. **C)** SDS-PAGE 15% de las fracciones de los picos 5, 6, 7 y 8.

La recuperación de LVATX en tres picos distintos, indica que presenta más de un estado oligomérico. Para confirmar que LVATX fue la única proteína presente en cada uno de los picos, se juntaron las fracciones de los picos 2, 3 y 4, y mediante espectrometría de masas (LC-MS) se confirmó la identidad de LVATX, siendo esta la única proteína presente en la muestra y obteniendo una cobertura del 95% de los residuos totales con una masa molecular de 7.9 kDa (tabla 5).

Tabla 5. *Identificación proteómica de LVATX*

MSLMVHEFTV **E**MTCEGCSGA **A**KRVLGKLG**D** **K**VSNVDINLE
TKKVIVTSTL **S**SDELLET**L**K **K**TGKEV**T**Y**L**G **G**K**AA**

Descripción	Cobertura	# de fragmentos peptídicos	Masa molecular [kDa]
Chaperona de cobre	95.95	64	7.9
LVATX			

Los aminoácidos marcados en rosa fueron reconocidos por el programa Proteome Discoverer 1.4 que corresponden a los aminoácidos de la secuencia de LVATX (medición realizada por la Unidad de Proteómica del IBt). (Cobertura) porcentaje de residuos identificados en la proteína. (# de fragmentos peptídicos) número de fragmentos obtenidos de la proteólisis que fueron identificados. (Masa molecular) masa molecular de LVATX en kDa. (ver espectro de masas en anexo 5)

Este resultado, explica que, LVATX se encuentra en más de una especie oligomérica en las condiciones descritas en este trabajo. Es relevante mencionar que LVATX se precipita al centrifugar la muestra e incrementar la concentración de proteína, por lo tanto, al juntar las fracciones de cada uno de los picos y concentrar la muestra se

favorecieron dicha variedad de oligómeros. Por los resultados mencionados, se realizó un análisis de DLS de las fracciones de manera individual, con el fin de conocer el radio hidrodinámico (R_H) de las diferentes especies oligoméricas de LVATX en cada una de las fracciones obtenidas e identificar a las más estables para los ensayos de oligomerización con metales (figura 27).

6.11. Análisis de especies oligoméricas de LVATX

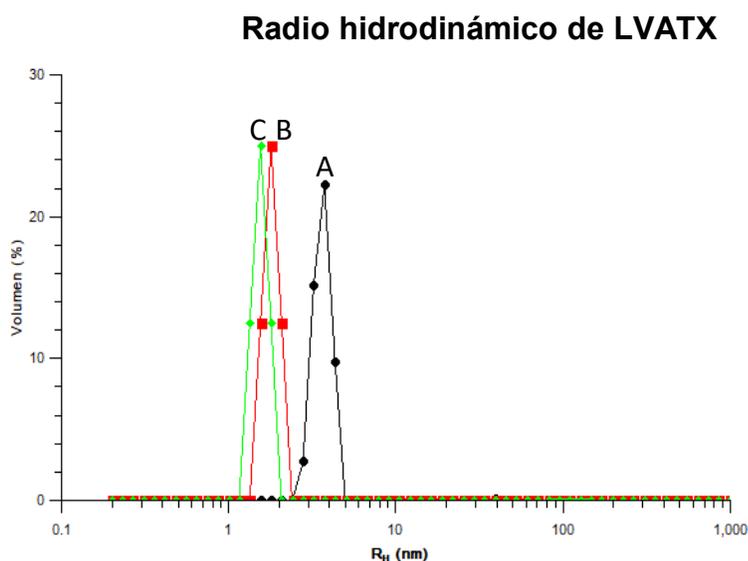


Tabla 6. *Radio hidrodinámico de LVATX en solución*

	R_H (nm)	Masa molecular ⁶ (kDa)	Concentración (mg·ml ⁻¹)
A	3.765	75	0.46
B	1.808	14	0.49
C	1.561	9.5	0.5

Figura 27. Gráfico del R_H de los diferentes picos de elución de LVATX. **A)** Pico 2 (fracción 35). **B)** pico 3 (fracción 41), **C)** pico 4 (fracción 45). R_H : radio hidrodinámico en (nm), MW: masa molecular aparente kDa.

⁶ Masa molecular aparente en kDa estimada con el software Zetasizer versión 7.03 a partir del R_H

Del análisis de los tres picos de elución de LVATX, se observa una relación directa entre volumen de elución y R_H con el tamaño de las especies de LVATX. A menor volumen de elución, se obtienen especies grandes de LVATX. En el pico 2, se obtiene una población con un R_H de 3.765 nm, correspondiente a una masa molecular de ~75 kDa, para el pico 3, la población tiene un R_H de 1.808 nm (~14 kDa) y para el pico 4 la población tiene un R_H de 1.561nm, este último valor, correspondiente a un tamaño de ~9.5 kDa, es el más cercano a la masa molecular de LVATX (7.9 kDa), sugiriendo que la muestra obtenida en un volumen de retención de 88 ml es la forma monomérica de LVATX. Este dato es muy similar al volumen de retención en el que se obtiene Atox1-Apo, por el mismo sistema de purificación (cromatografía de exclusión molecular) y mismo tipo de columna (Superdex 75 16/600) (Dolgova *et al.*, 2017). Aunque, LVATX al igual que Atox1, podría adoptar varios estados conformacionales (Levy *et al.*, 2017). Otro registro de una chaperona *Atx1-like* que tiene varias formas oligoméricas, es CopZ-apo de *B. subtilis* (Kihlken *et al.*, 2002), En sus ensayos de filtración en gel, se observó que la forma Apo de esta chaperona, con y sin DTT, se obtiene en la fracción con la masa molecular más baja, sin embargo, estas fracciones contienen una pequeña cantidad de las especies de mayor tamaño, con un intervalo entre 22-28 kDa.

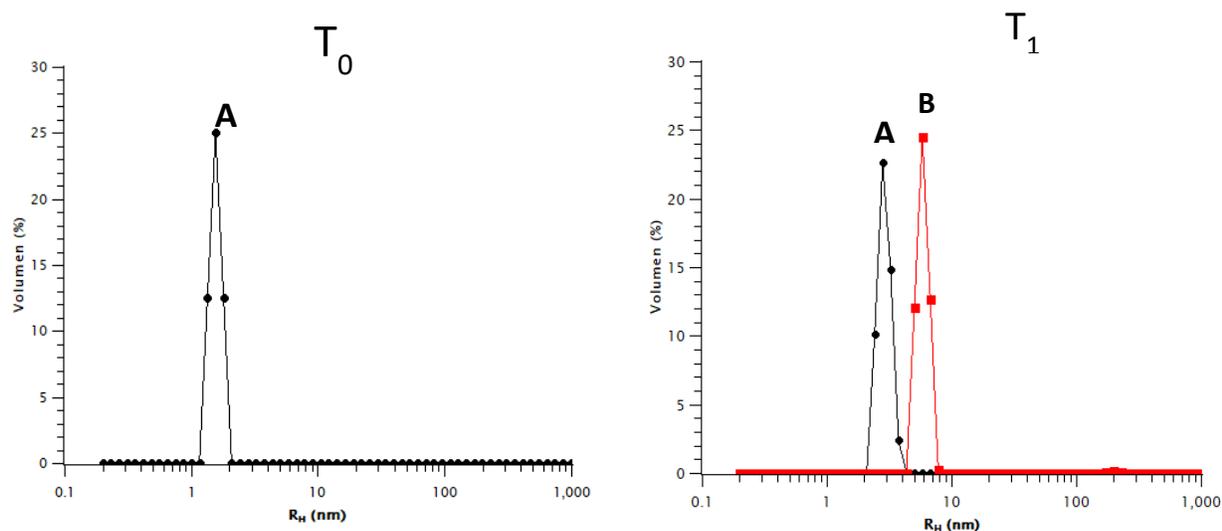
Con base en este análisis, para los ensayos de oligomerización con metales, se decidió utilizar la muestra C (fracción 45 del pico 4), no sólo por ser la de mayor concentración (0.5 mg·ml⁻¹), sino porque aparentemente predomina en su forma monomérica (R_H 1.561 nm). Es importante destacar que, además de que la

especie monomérica es la más abundante, se mantiene en equilibrio con otras especies oligoméricas. Este fenómeno sucede en cada una de las purificaciones realizadas durante este estudio.

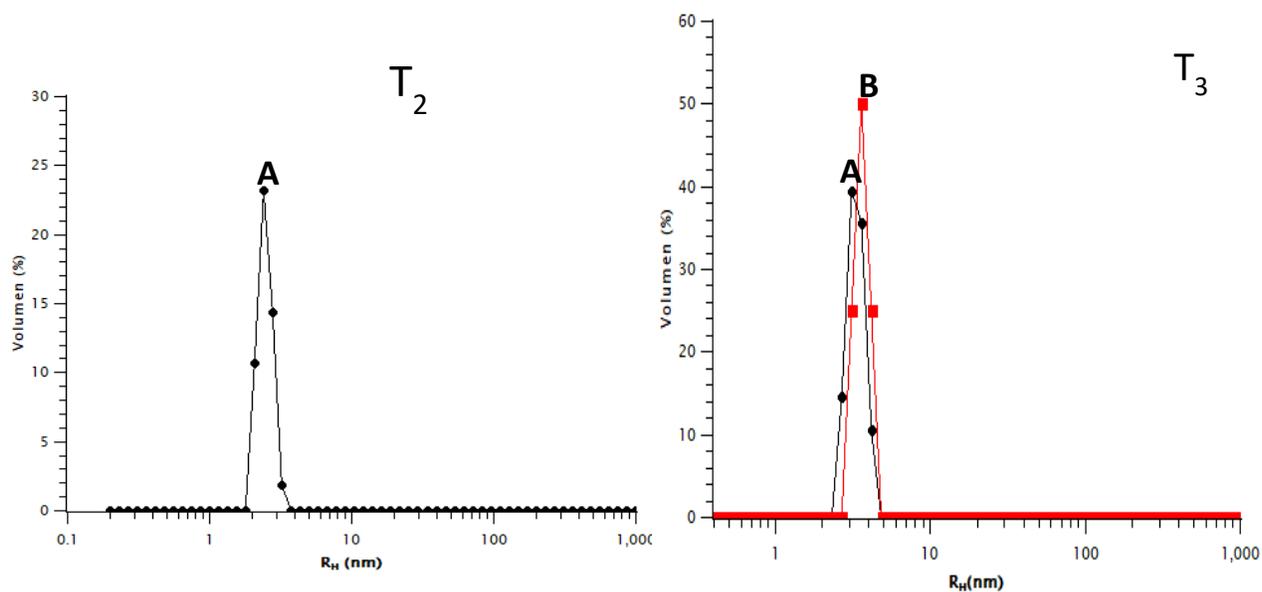
El comportamiento de agregación de LVATX en su forma Apo no tiene un patrón específico, o al menos ninguno que hayamos detectado con nuestras mediciones, aunque se esperaría que se encontraran de nuevo las especies oligoméricas que fueron removidas mediante la cromatografía de exclusión molecular (R_H 1.808 nm y 3.765 nm) también podría inferirse que incrementa el tamaño conforme al tiempo. Debido a que cada una de las mediciones con una diferencia de temporalidad de 3 min, es posible observar que LVATX cambia constantemente de tamaño entre un intervalo de 1.5 nm hasta 5.848 nm sin mostrar una tendencia evidente hacia la agregación, desagregación o alguna especie oligomérica estable (figura 28).

6.11.1 Especies oligoméricas de LVATX (Apo)

Radio hidrodinámico de muestras de LVATX



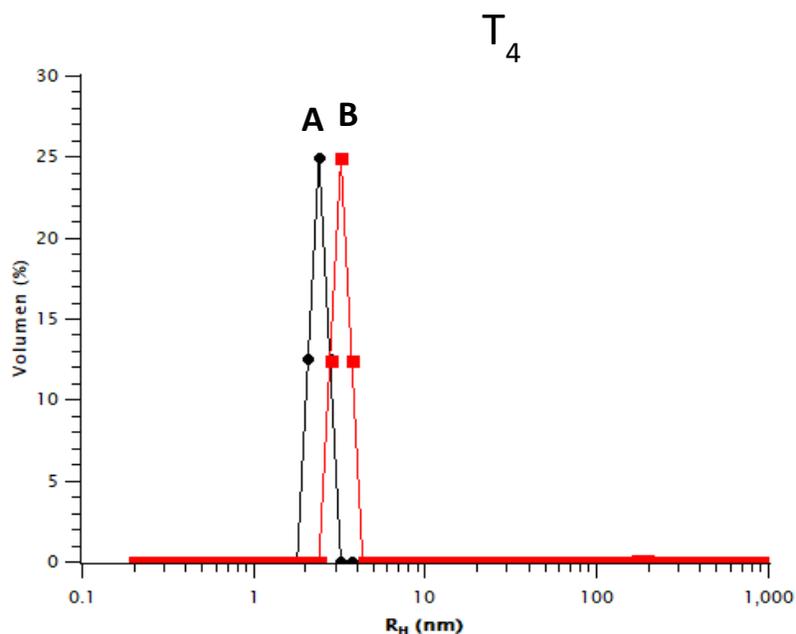
	T ₀		T ₁ (3 min)	
	A		A	B
R_H (nm)	1.561		2.807	5.848
MW (kDa)	9.5		38	209



	T ₂ (6 min)		T ₃ (15 min)	
	A		A	B
R_H (nm)	2.424		1.561	1.808
MW (kDa)	27		9.5	209

Figura 28. Gráfico de R_H de LVATX (Apo), mediciones realizadas durante los 15 min posteriores a su purificación. **A)** (T₀) medición realizada inmediatamente después de su purificación. **B)** (T₁) medición realizada a los 3 min **C)** (T₂) medición realizada a los 6 min **D)** (T₃) medición realizada 15 min. R_H (nm) y (MW) masa molecular en kDa.

Estudios en chaperonas *Atx1-like* en condiciones oxidantes, reportan que, la forma Apo de Atox1 de *H. sapiens* en solución y en ausencia de DTT, dimeriza rápidamente (Anastassopoulou *et al.*, 2004). Este comportamiento puede ser ocasionado en LVATX por la exposición al ambiente oxidante, puesto que después de las 2h, LVATX se mantiene en más de una forma oligomérica en solución. Este equilibrio abarca especies oligoméricas cuyos R_H , corresponden a masas moleculares de los 27 kDa a 53 kDa, pudiendo corresponder a una forma trimérica y hexamérica respectivamente (figura 29).



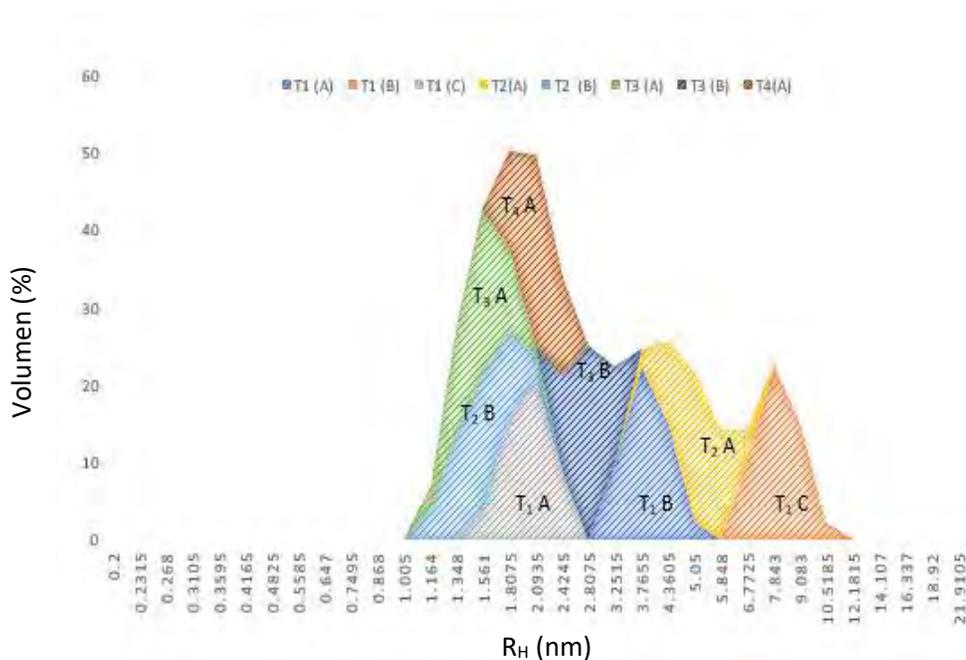
T ₄ (> 2 h)		
	A	B
R_H (nm)	2.424	3.251
MW (kDa)	27	53

Figura 29. Gráfico de R_H de LVATX, medición realizada >2h posteriores a su purificación. R_H (nm). (MW) masa molecular en kDa.

6.11.2. Ensayo de oligomerización con la adición de cobre

A partir de la muestra de LVATX en la fracción 45, a 1 ml de volumen de la muestra se añadió 1 equivalente (eq) de Cu_2SO_4 . Desde los 3 min posteriores a la adición del metal se observan cambios en los tamaños de las poblaciones en la muestra (figura 30).

Distribución de especies oligoméricas de LVATX con 1 eq de Cu^{+1}



	T ₁ (3 min)			T ₂ (6 min)		T ₃ (30 min)		T ₄ (4 h)
	A	B	C	A	B	A	B	A
R _H (nm)	2.093	3.765	7.843	1.807	5.05	1.561	2.807	2.093
MW (kDa)	19	75	417	13.4	148	9.5	38	19

Figura 30. Gráfico de los R_H de LVATX Cu^{+1} a diferentes tiempos. (T₁) medición realizada 3 min después de la adición de 1eq de Cu_2SO_4 . se observan tres especies oligoméricas (T₁ A) R_H 2.093 nm, (T₁ B) R_H 3.765 nm y (T₁ C) R_H: 7.843 nm. (T₂) medición realizada a los 6 min, se observaron dos especies

oligoméricas (T₂ A) R_H 1.807 nm, (T₂ B) R_H 5.05 nm. (T₃) medición realizada 30 min, se observaron dos especies oligoméricas (T₃ A) R_H 1.561 nm, (T₃ B) R_H 2.807 nm. (T₄) medición realizada a las 4 h, se observó una especie oligomérica (T₄ A) R_H 2.093 nm. (MW) masa molecular estimada en kDa.

A partir de los 3 minutos posteriores a la adición del metal, existe cambio en las especies oligoméricas de LVATX, dando lugar primero a agregados más grandes y posteriormente se observa la aparición de la forma monomérica de LVATX-Cu⁺¹. A los 30 minutos se mantienen dos especies (9.5 y 38 kDa), y a las 4 horas se observa únicamente una especie oligomérica de LVATX -Cu⁺¹ correspondiente a 19 kDa, este tamaño podría corresponder a la forma dimérica de LVATX-Cu⁺¹.

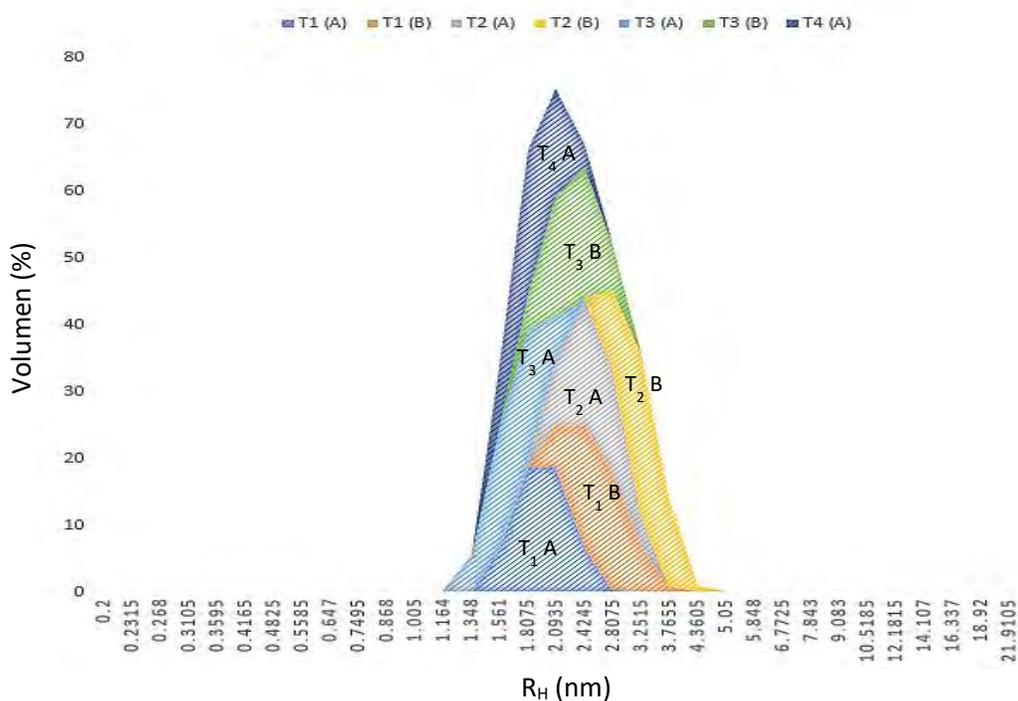
Si comparamos los datos de DLS obtenidos, con estudios en otras chaperonas de cobre, para CopZ-Cu⁺¹, han obtenido especies oligoméricas con un R_H 25.9 ±1.8 Å (equivalente a 31.2 - 36.5 kDa). Estos datos experimentales mostraron una variabilidad de tamaños de ±7. Reflejando la amplia distribución de tamaños o formas en este tipo de proteínas (Wimmer *et al.*, 1999). Así mismo, la obtención de la especie dimérica en LVATX-Cu⁺¹ es similar a lo observado en Atox1, que en condiciones oxidantes es capaz de formar dímeros después de los 30 minutos de incubación con el metal (Narindrasorasak *et al.*, 2004).

6.11.3. Ensayo de oligomerización con la adición de plata

Para el caso de los ensayos con plata, se añadió 1 eq de AgNO₃, a los 3 minutos, se observa que al igual que con Cu₂SO₄ se forma más de una especie oligomérica de LVATX. A los 6 minutos se observa que existen dos picos en las poblaciones, entre 2.424 nm y 3.251 nm, que corresponden a una masa molecular de entre 27-

53 kDa (figura 31). Es difícil considerar que la especie monomérica de LVATX- Ag^{+1} tenga un R_H de 1.808 nm (14 kDa), puesto que también podría corresponder a un dímero “compacto” considerando que la masa molecular de LVATX es de 7.9 kDa. A los 30 minutos se mantienen dos especies y a las 4 horas, se mantiene la especie de R_H de 1.808 nm.

Distribución de especies oligoméricas de LVATX con 1 eq de Ag^{+1}



	T_1 (3 min)		T_2 (6 min)		T_3 (30 min)		T_4 (4 h)
	A	B	A	B	A	B	A
R_H (nm)	1.808	2.807	2.424	3.251	1.808	2.424	1.808
MW (kDa)	14	38	27	53	14	27	14

Figura 31. Gráfico de los R_H de LVATX Ag^{+1} a diferentes tiempos. (T_1) medición realizada 3 min después de la adición de 1eq de AgNO_3 , se observaron dos especies oligoméricas (T_1 A) R_H 1.808 nm y (T_1 B) R_H 2.807 nm. (T_2) medición realizada a los 6 min, se observaron dos especies oligoméricas (T_2 A) R_H 2.424 nm y (T_2 B) R_H 3.251 nm. (T_3) medición realizada 30 min, se observaron dos especies oligoméricas (T_3 A)

R_H 1.808 nm y (T₃ B) R_H 2.424 nm. (T₄) medición realizada a las 4 h se observó una especie oligomérica (T₄ A) R_H 1.808 nm. (MW) masa molecular estimada en kDa.

En este experimento, la adición de Ag^{+1} a LVATX ocasiona que las especies oligoméricas de R_H 1.808 nm se mantengan constantes a través de las mediciones. Es probable que la coordinación de LVATX hacia Ag^{+1} tenga una conformación más “relajada” en comparación con LVATX Cu^{+1} y esta especie constante sea la forma monomérica de LVATX Ag^{+1} . Otra posibilidad es que LVATX no sea capaz de unir Ag^{+1} . En estudios con Atox1 de *H. sapiens*, determinaron mediante espectros de absorbancia a 254 nm, que Ag^{+1} podría unirse solamente a la forma reducida de Atox1 pero no a la forma oxidada, puesto que, no observaron incremento en la absorbancia en la adición de Ag^{+1} (Narindrasorasak *et al.*, 2004), así mismo, este valor de R_H corresponde a una de las tres especies oligoméricas que fueron determinadas por la cromatografía de exclusión molecular (pico B, figura 27), sin embargo, la adición de Ag^{+1} promueve la formación de una especie oligomérica predominante.

6.12. Análisis de estructura secundaria de LVATX

Los análisis de estructura secundaria de LVATX realizados en este estudio, permiten percatarnos de un ligero cambio en el espectro de DC, de LVATX en complejo tanto con Cu^{+1} como con Ag^{+1} (figura 32). El espectro UV-DC lejano refleja que LVATX es una proteína conformada por α hélices y hebras β en su estructura secundaria (figura 32B) lo que concuerda con el tipo de plegamiento en las chaperonas de la familia Atx1-like. El espectro de LVATX en su forma Apo es similar al reportado para Atox1 de *H. sapiens* (Levy *et al.*, 2017) donde se observa un mínimo entre 208 - 222 nm (figura 32 C), formando un espectro ancho debido a las contribuciones superpuestas entre las α hélices y hebras β . En la región 190-195 nm del espectro las bandas son positivas.

Espectro de DC de LVATX Apo y Holo (Cu^{+1} y Ag^{+1})

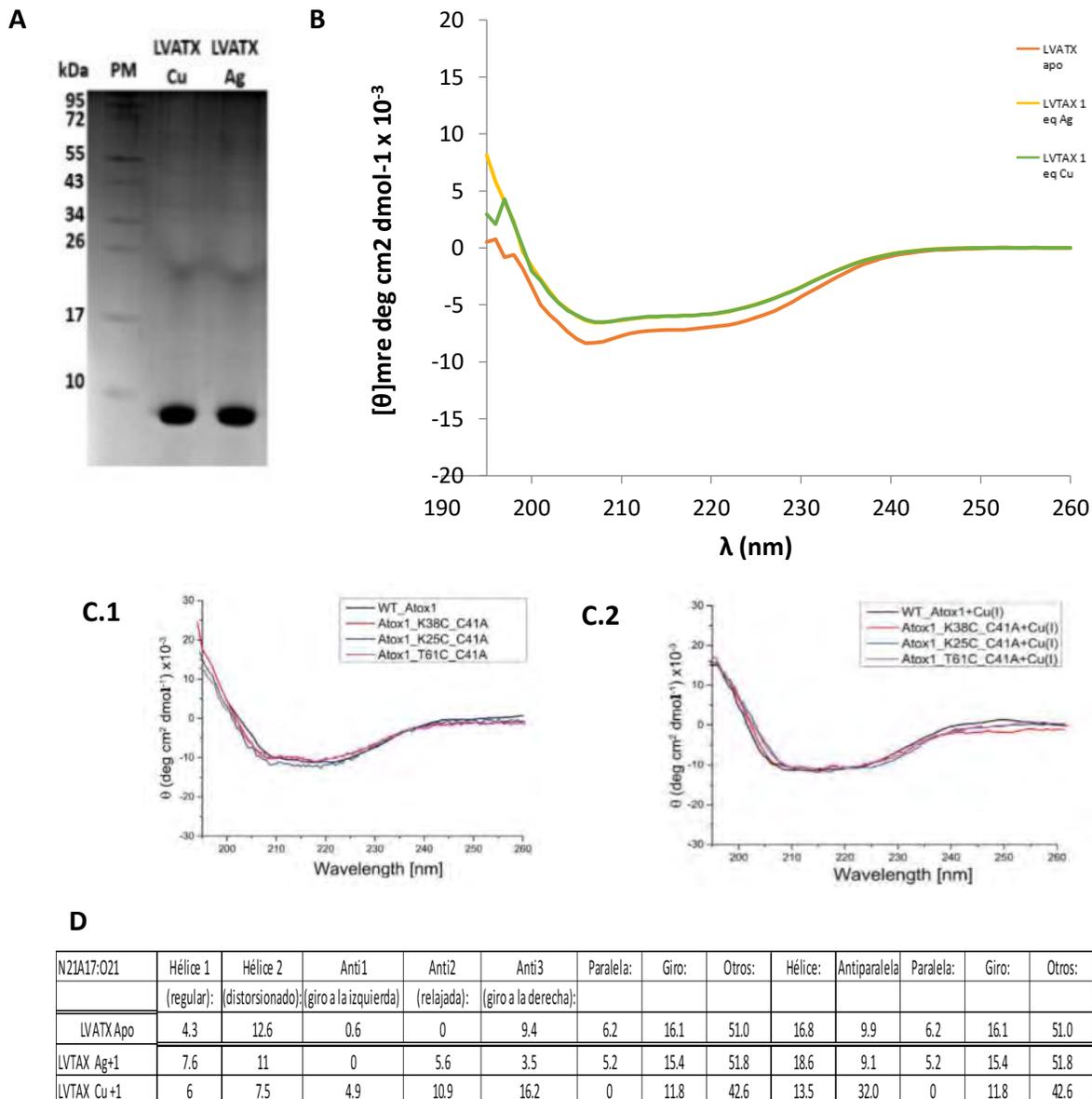


Figura 32. **A)** Análisis por SDS-PAGE 15%, de las muestras utilizadas para el análisis de DC y DLS LVATX- Cu^{+1} y LVATX- Ag^{+1} . (PM) marcador de masa molecular en kDa. **B)** Espectros de DC de la estructura secundaria de LVATX en su forma Apo y Holo (Cu^{+1} y Ag^{+1}) a 25 °C. **C)** Espectros de DC la estructura secundaria de Atox1 y mutantes en su forma Apo (C.1) y Holo (C.2) a 25 °C (Levy *et al.*, 2017) **D)** Valores de composición de estructura secundaria de LVATX- Apo, LVATX- Ag^{+1} , LVATX - Cu^{+1} obtenidos por el software BestSel

En el espectro de DC, se observa que la presencia de metales ocasiona cambios en la organización estructural de LVATX, modificando las proporciones de α hélices y hebras β . Esto puede indicar que LVATX en su forma Apo, está en una conformación más relajada y al unir los metales su conformación, es más compacta y/o sufre un arreglo estructural. Los valores de estructura secundaria (figura 32 D), muestran las modificaciones en las proporciones de hebras paralelas y antiparalelas de LVATX Cu^{+1} con respecto a LVATX - Apo y LVATX Ag^{+1} , tiene 3 veces más hebras antiparalelas con valores de 32, 9.9. y 9.1 respectivamente. A pesar de que el espectro de DC de LVATX- Ag^{+1} es similar al de LVATX- Cu^{+1} , los valores de estructura secundaria son muy cercanos a la forma LVATX - Apo, a excepción de un ligero cambio en el valor de hebra Anti (relajada).

Los resultados obtenidos en LVATX concuerdan con lo reportado para la estructura de Atox1, donde la conformación en solución de Atox1- Cu^{+1} es más compacta que Atox1-Apo, así mismo, presentan conformaciones abiertas y cerradas (Levy *et al.*, 2017), se realizó un análisis complementario evaluando la estructura secundaria de chaperonas Atox1-like, donde se puede apreciar la flexibilidad estructural entre la forma Apo y Holo en condiciones oxidantes como reductoras (ver anexo 4). Estos resultados indican que la flexibilidad de la estructura en esta familia de chaperonas es común, sustentado por lo reportado para Atox1 (Levy *et al.*, 2017). Este mecanismo estructural puede tener un rol importante en la captura y transferencia de metales en esta familia.

A pesar de que el Cu^{+1} y Ag^{+1} podrían tener la misma coordinación en LVATX, la adición de metales afecta la conformación de las subunidades estructurales de la proteína de manera distinta (Narindrasorasak *et al.*, 2004). Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que los complejos formados por estos dos metales (Cu^{+1} y Ag^{+1}), son

diferentes, y, aunque es probable que LVATX en condiciones oxidantes sea capaz de coordinar ambos metales Cu^{+1} y Ag^{+1} . Es importante resaltar que el rol relativo y la importancia de los fenómenos como agregación específica, dimerización de la proteína y coordinación de moléculas pequeñas es fuertemente dependiente del sistema y las condiciones experimentales utilizadas (Anastassopoulou *et al.*, 2004).

En chaperonas *Atx1-like* de eucariontes, se ha encontrado una tendencia a dimerizar en presencia de Cd^{+2} , así como Hg^{+2} , sin embargo, su existencia como monómero o dímero tanto en complejo con Cu^{+1} , Ag^{+1} y en su forma Apo en solución, aún no han sido definidos (Narindrasorasak *et al.*, 2004).

En este trabajo, se determinó que LVATX- Apo tiene tendencia a la agregación, lo que dificulta la solubilidad de la proteína, mientras que, LVATX en complejo con Cu^{+1} y Ag^{+1} presentan varias especies oligoméricas. En condiciones oxidantes, LVATX- Ag^{+1} , adopta una conformación con R_H de 1.808 nm (14kDa) predominante y en el caso de LVATX- Cu^{+1} , se presenta en una mezcla de especies oligoméricas en equilibrio, con diferentes R_H . Estas especies con diferentes R_H podrían ser monómeros coordinando un ion Cu^{+1} , dímeros que comparten un ion Cu^{+1} , así como subunidades libres u otras coordinaciones de LVATX con el ion metálico. Este comportamiento fue descrito previamente para Atox1 (*H. sapiens*) por Narindrasorasak y colaboradores en el 2004, por lo que, LVATX es otra chaperona *Atx1-like* de eucariontes en la que se encuentra este comportamiento. Es importante mencionar que las características de LVATX sugieren que es una proteína flexible, esta propiedad podría ser indispensable para viajar en el citoplasma y transferir el ion a la proteína blanco. En el caso de Atox1 de *H. sapiens* (homólogo más cercano a LVATX) la variación de conformaciones tiene un rol importante en el mecanismo de transferencia, así como la coordinación del metal y su

capacidad de quelar y mantener el ion aislado del solvente previniendo reacciones inespecíficas (Levy *et al.*, 2017).

6.13. *Cristalización de LVATX*

Con el fin de obtener cristales de LVATX en forma Apo y Holo (Cu⁺¹ y Ag⁺¹), y confirmar la coordinación de metales o cambios conformacionales en su estructura tridimensional. Se realizaron pruebas de cristalización, con un total de 3150 pruebas con las técnicas de microbatch, gota sedente (mosquito LCP y GRYPHON) y gota colgante (mosquito LCP). Las condiciones utilizadas para estas pruebas se observan en la tabla 7.

Tabla 7. *Condiciones utilizadas para pruebas de cristalización de LVATX*

		18°C	4°C	19°C
		Concentración de proteína		
LVATX his ⁺	Cu ⁺¹	0.67 mg·ml ⁻¹	7.69 mg·ml ⁻¹	-
	Apo	2.14 mg·ml ⁻¹	-	1.5 mg·ml ⁻¹
LVATX	LVATX	0.5 mg·ml ⁻¹	-	-
	Cu ⁺¹	1.5 mg·ml ⁻¹	-	-
		0.8 mg·ml ⁻¹	-	-
	LVATX			
	Ag ⁺¹	0.8 mg·ml ⁻¹	-	-

De las pruebas de cristalización realizadas, se observó que en la mayoría de las condiciones se formaron fibras de proteína, independientemente de la concentración y temperatura, tanto en la forma Apo, como Holo, de LVATX *his*⁺ y LVATX (sin etiqueta).

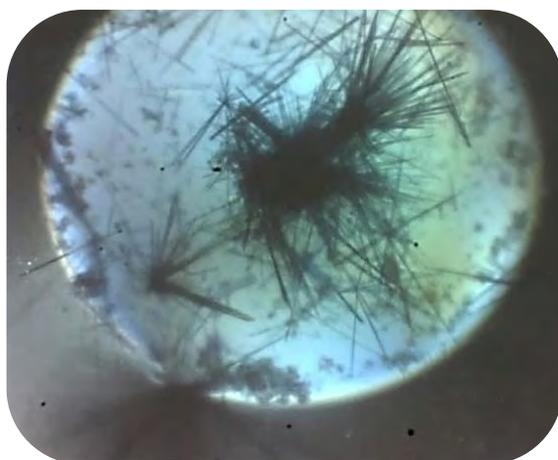
Este es un indicio de que la agregación de LVATX favorece la formación de fibras de proteína. En el caso de LVATX en complejo con cobre, se observa la formación de fibras (figura 33).



Figura 33. Fibra de LVATX Cu⁺

Así mismo, se encontraron dos condiciones en las que se obtuvieron cristales de proteínas, ambos para LVATX- Cu⁺ a una concentración de 0.8 mg·ml⁻¹ (figura 34).

Las condiciones de cristalización fueron las siguientes:



A

- 30% v/v PEG 400
- 100 mM HEPES, pH 7.5
- 200mM NaCl



B

- 20% w/v PEG 3000
- 100 mM TRIS, pH 7
- 200 mM Acetato de Calcio

Figura 34. Cristales de LVATX Cu^{+1} teñidos con IZIT.

Los cristales (A) crecieron en un periodo de cinco meses y fueron difractados el 17 de octubre del 2017, sin embargo, no se obtuvieron datos. De esta condición se realizaron matrices de optimización, para mejorar la calidad de los cristales de LVATX. Para los cristales (B) tomó un periodo de doce meses en que se formaran, sin embargo, debido a su forma acicular no son óptimos para su difracción.

La obtención de cristales de LVATX- Cu^{+1} es una confirmación indirecta de que la adición de metales a LVATX, favorece que predomine sólo una especie oligomérica y por lo consecuente promueve la cristalización de esta proteína. Es necesario mejorar la calidad de los cristales LVATX- Cu^{+1} , sin embargo, para LVATX-Apo y LVATX- Ag^{+1} no se obtuvieron cristales.

7. CONCLUSIONES

- LVATX-Apo es capaz formar oligómeros de diferentes tamaños, con especies mayores de 27 kDa (tamaño estimado por DLS), mostrando una tendencia a la agregación, lo que dificulta la solubilidad de la proteína.
- La etiqueta de histidinas es un factor que promueve la agregación de LVATX.
- La adición de metales a LVATX (Cu^{+1} y Ag^{+1}) favorece cambios en su estructura secundaria, promoviendo una conformación compacta en la forma Holo (LVATX- Cu^{+1} y LVATX- Ag^{+1}) mientras que la forma Apo es más laxa.
- La adición de metales Cu^{+1} y Ag^{+1} a LVATX (en un periodo de 4 h en condiciones oxidantes) permite establecer una especie oligomérica predominante en solución (14 kDa para LVATX- Ag^{+1} y 19 kDa para LVATX- Cu^{+1}) que, en el caso de LVATX- Cu^{+1} favorece la cristalización de la proteína.
- LVATX - Cu^{+1} y LVATX- Ag^{+1} presentan varias especies oligoméricas lo que manifiesta la flexibilidad conformacional de LVATX en presencia de diferentes metales.

8. PERSPECTIVAS

- Generar una nueva construcción de LVATX (sin etiqueta de histidinas) para evitar las interacciones inespecíficas que promueve la agregación de LVATX.
- Optimizar las condiciones de cristalización de LVATX-Cu⁺¹ con el fin de determinar su estructura cristalográfica y conocer la conformación de la especie de LVATX cristalizable en las condiciones determinadas en este estudio.
- Evaluar el efecto de oligomerización en LVATX con otros iones metálicos (Cd⁺² y Hg⁺²).
- Explorar las condiciones de cristalización y oligomerización de LVATX (Apo y Holo) en condiciones reductoras y definir los cambios conformacionales con relación a las condiciones oxidantes.
- Realizar ensayos de oligomerización utilizando diferentes concentraciones de iones metálicos y de proteína, para conocer la capacidad de coordinación de cobre y definir las variaciones oligoméricas de LVATX.

9. ANEXOS

Anexo 1

Metodología para la Identificación de proteínas por LC-MS

Las muestras fueron previamente reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamide (Sigma-Aldrich) y digerida con Trypsin (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA). En el procesamiento de la muestra con tripsina se utilizó una solución de reacción conteniendo 50mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) y la incubación fue de 18 horas a temperatura de 37 C.

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore; Billerica, MA, USA) y aplicados en un sistema LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II (Thermo-Fisher Co.; San Jose, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA) con fuente de ionización tipo nano-electrospray (ESI).

La calibración del espectrómetro fue realizada con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621. Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (Fourier Transform) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender la calibración de masas a menores valores de m/z. Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 minutos utilizando una columna capilar hecha en casa (ID 0.75 μ m y 10cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto.

La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation). Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones sún las

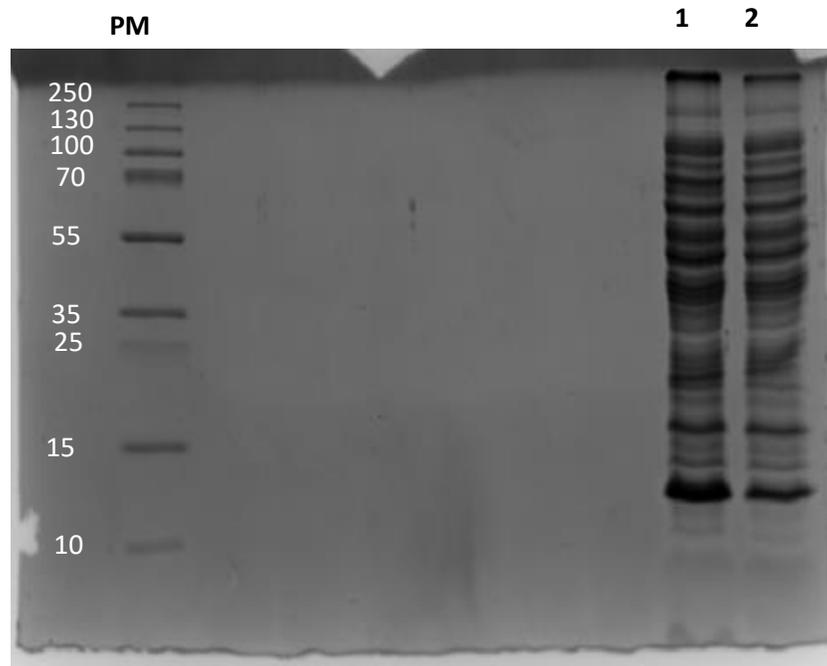
cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 300 segundos.

Los datos en formato .raw fueron sometidos a búsqueda a través el software Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific), los parámetros utilizados fueron los siguientes:

- BASE DE DATOS: *LVATX*
- MODIFICACIÓN CONSTANTE: Carbamidomethyl (C)
- MODIFICACIONES VARIABLES: Oxidation (M) y Deamidated (NQ)
- ENZIMA: Tripsina
- MISSED CLEAVAGES: 2

Anexo 2

Sobreexpresión de LVATX his⁺

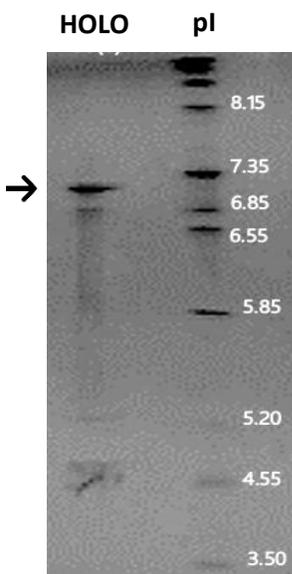


Análisis por SDS-PAGE 15% de la muestra de sobreexpresión de LVATX. (PM) marcador de masa molecular, (1 y 2) sobrenadante de las células sonicadas

Anexo 3

Determinación del punto isoeléctrico (pI) de LVATX

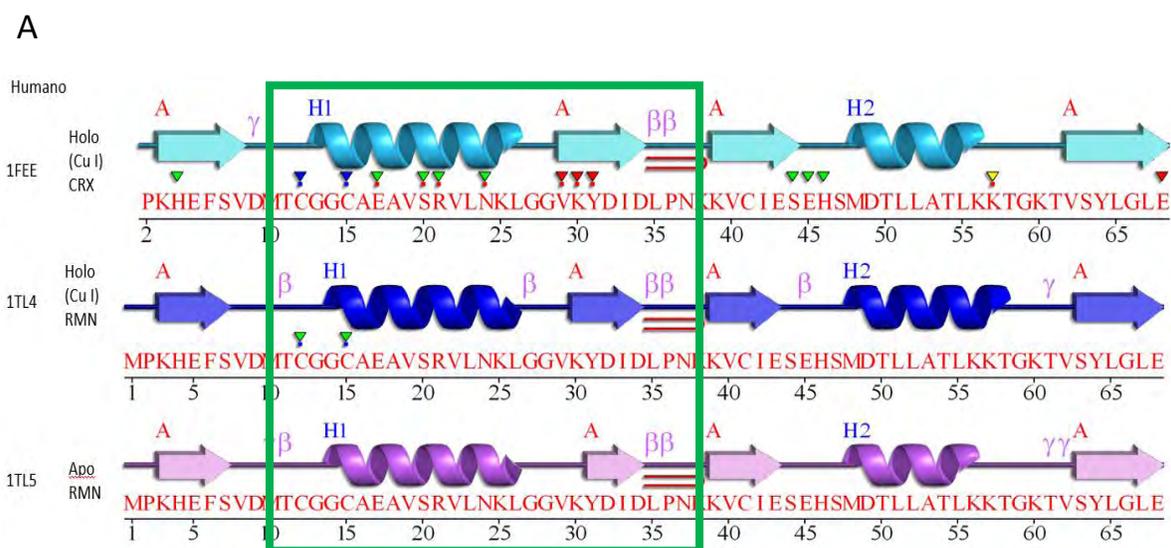
El punto isoeléctrico de LVATX es de ~7.0, este valor es similar al calculado con *Protparam* (tabla 1) y coincide con el pI de Atox1 (~ pI 7) (Anastassopoulou *et al.*, 2004), con quien tiene mayor porcentaje de identidad; el pI de otras chaperonas de cobre como Atx1 de *S. cerevisiae* es de 8.71 siendo un valor básico, a diferencia de CopZ de *B. subtilis*, que tiene un pI 4-5 ácido (Arnesano *et al.*, 2002).



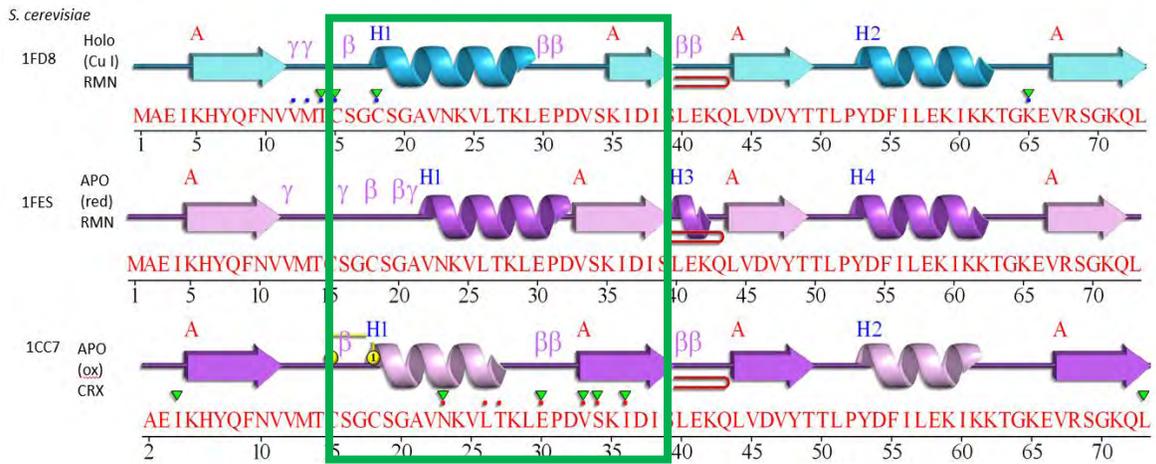
Gel de isoelectroenfoque para la determinación de pI de LVATX *his*⁺. Se observó una banda intensa que corresponde a un pI de ~7. (pI) marcador de punto isoeléctrico. Concentración de LVATX *his*⁺ de 1 mg·ml⁻¹ en *buffer* 10mM Tris-HCl pH 8.

Anexo 4

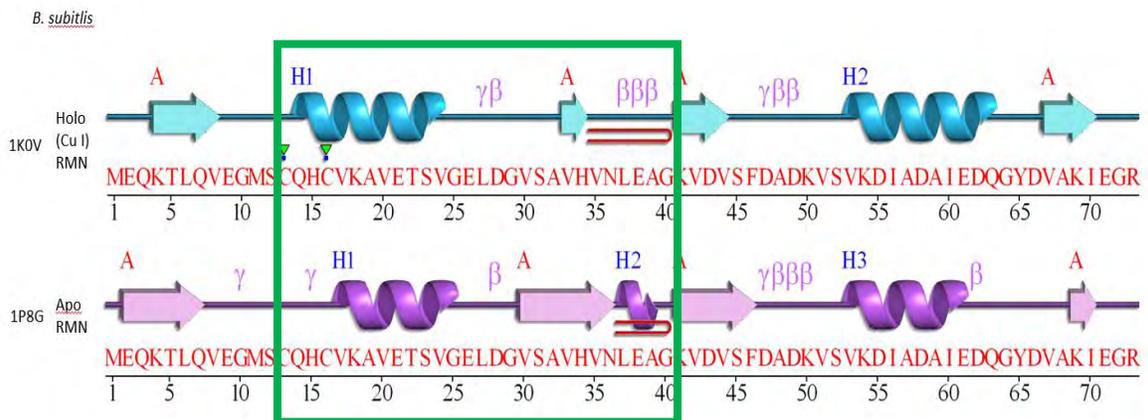
Se realizó un análisis de las modificaciones en estructura secundaria de las chaperonas *Atx1-like* depositadas en el PDB de *H. sapiens* (A), *S. cerevisiae* (B) y *B. subtilis* (C). Comparando los esquemas de estructura secundaria de tres de las chaperonas de cobre homólogas a LVATX, tanto en su forma Apo como Holo, se observó que existen cambios estructurales en *Atox1* de *H. sapiens*, así como en *B. subtilis* y *S. cerevisiae*. Lo anterior se presentó en condiciones reductoras B1, como no reductoras B2, y una de las variaciones detectadas fue la longitud del asa donde se localiza el motivo de unión a metales. Se demostró que existe un re-arreglo de la estructura al interaccionar CopZ con Cu^{+1} indicando que no son cambios estructurales mayores, pero que al menos la adición de cobre tiene un impacto en los residuos 9-22, estos cambios conformacionales ocurren justo en la región de unión a ligandos (Cu^{+1}), (Morby *et al.*, 1995 ; Sahlman & Skarfstad., 1993) lo que puede suponerse ocurre también en LVATX.



B



C



Esquemas de estructura secundaria de *H. sapiens*, *S. cerevisiae* y *B. subtilis*. Los recuadros verdes enmarcan las regiones flexibles de las chaperonas Atx1-like. Las flechas indican estructura hebras β y las espirales, α hélices.

Anexo 5

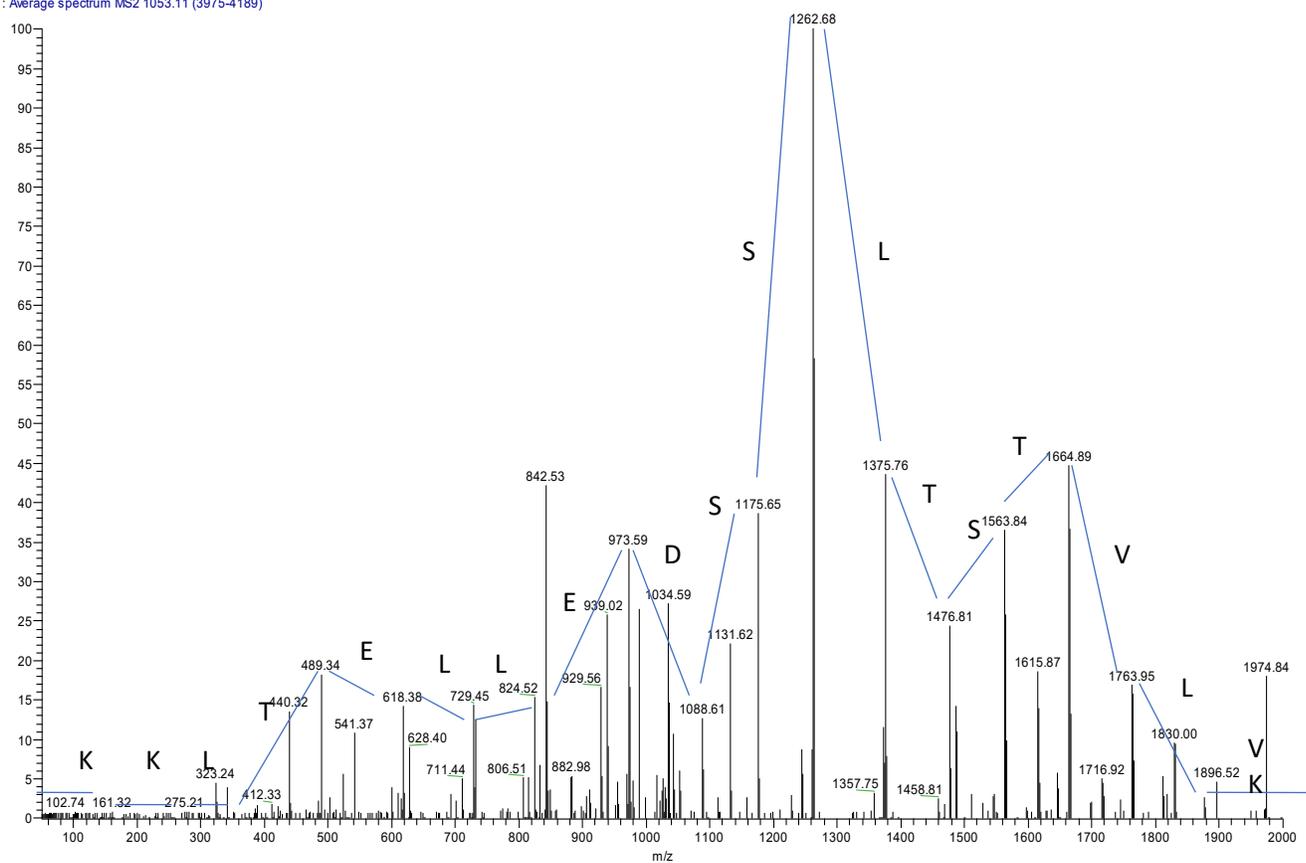
Espectro de Masas LC-MS de un fragmento peptídico de LVATX. Secuenciando el ion 1053.11 (Z+2) de la serie iónica para la determinación de la secuencia del péptido.

Sequence	Modifications	Charge	MH+ [Da]
KVIVTSTLSSDELLET LKK		2	2104.20244

E:\Respaldo VelosL_M8-2016-M1cobre

6/7/2016 1:32:31 PM

48-2016-M1cobre #3975-4189 RT: 48.63-50.39 AV: 6 NL: 7.29E4
T: Average spectrum MS2 1053.11 (3975-4189)

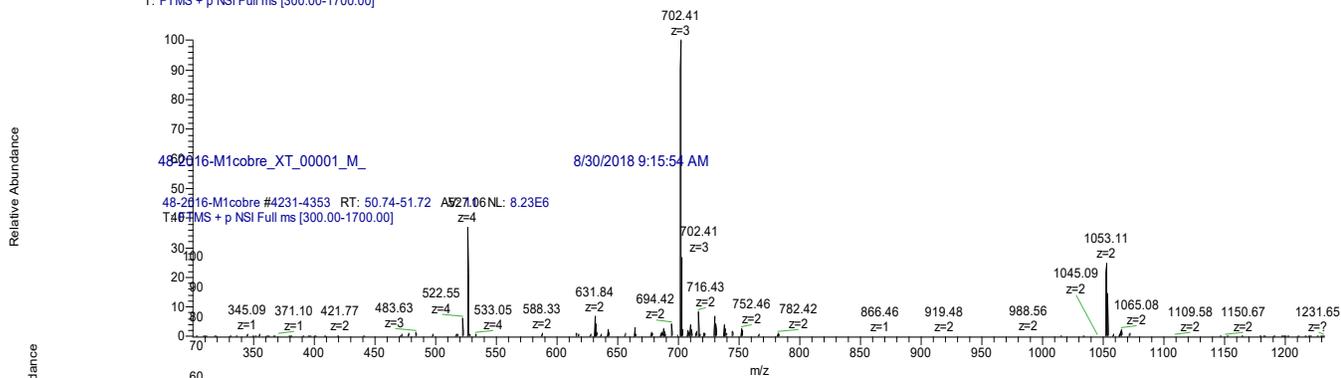


Series iónicas utilizadas en LC-MS

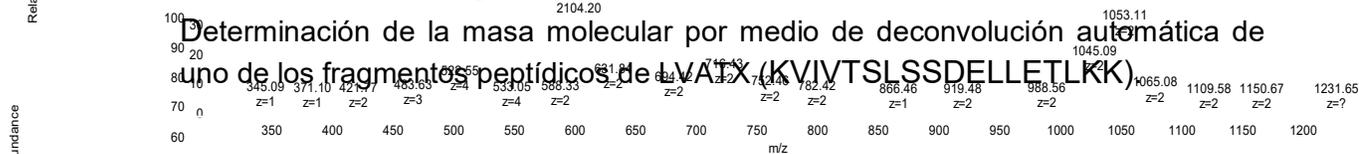
48-2016-M1cobre_XT_00001_M_

8/30/2018 9:15:54 AM

48-2016-M1cobre #4231-4353 RT: 50.74-51.72
T: FTMS + p NSI Full ms [300.00-1700.00]

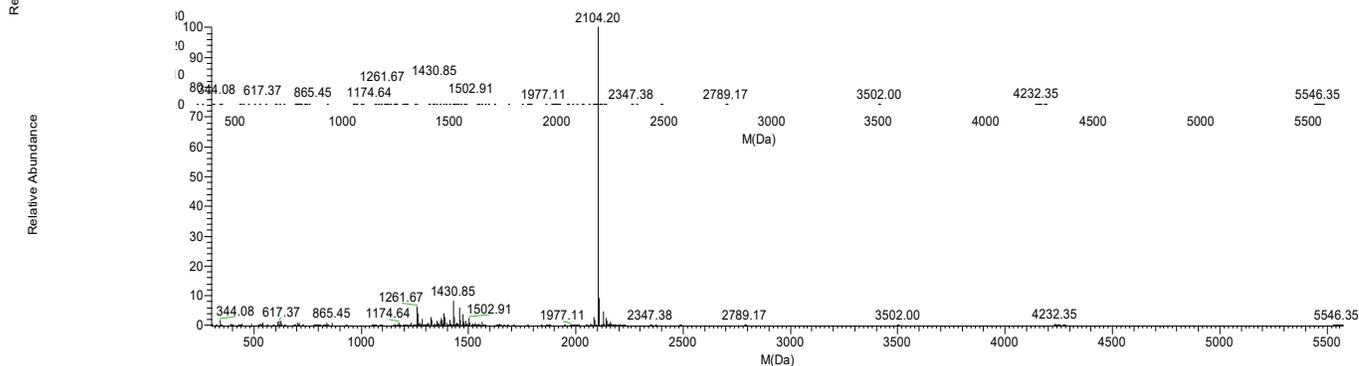


48-2016-M1cobre_XT_00001_M_ #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 4.48E6
T: FTMS + p NSI Full ms [300.00-1700.00]



Determinación de la masa molecular por medio de deconvolución automática de uno de los fragmentos peptídicos de IVDX (KVIVTSLSSDELLETLKK)

48-2016-M1cobre_XT_00001_M_ #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 4.48E6
T: FTMS + p NSI Full ms [300.00-1700.00]



10. REFERENCIAS

1. Allsopp M; Johnston P; Santillo D (2008) Challenging the Aquaculture Industry on Sustainability. 2nd Edition. Green Peace. 22 pp.
2. Álvarez, T.P., F. Soto; Q.S. Aviles; L.C. Díaz y C.L. Treviño. (2012). Panorama de la investigación y su repercusión sobre la producción Acuícola en México. Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca -Instituto Nacional de la Pesca.30 pp.
3. Anastassopoulou I; Banci F; Bertini L; Cantini I; Katsari F; Rosato A. (2004) Solution structure of the apo and copper (I) loaded human metallochaperone HAH1. *Biochemistry*. 43: 13046-13053.
4. Arnesano F; Banci F; Bertini L; Huffman I; O'Halloran TV. (2001) Solution Structure of the Cu (I) and apo forms of the yeast metallochaperone, Atx1. *Biochemistry*. 40: 1528-1539.
5. Badarau A; Firbank SJ; Banfield MJ; Dennisons C. (2010) Visualizing the metal-binding versatility of copper trafficking sites. 49 (36): 7798-7810.
6. Badarau A & Dennison C (2011) Copper Trafficking Mechanism of CXXC-Containing Domains; Insight from the pH- Dependence of Their Cu (I) Affinities. *Journal of the American Chemical Society*, 133: 2983-2988.
7. Bagal-Kestwal D; Karve MS; Kakade B; Pillai VK. (2008) Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*. 24: 657-664.

8. Balamurugan K & Schaffner W. (2006) *Biochimica et Biophysica Acta*. 1763 (7): 737-746.
9. Banci L; Bertini I; Ciofi-Baffoni S; Huffman DL; O'Halloran VO. (2002) Solution Structure of the Yeast Copper Transporter Domain Ccc2a in the Apo and Cu (I)-loaded States. *The Journal of Biological Chemistry*. 276:8415-8426.
10. Banci L & Rosato A. (2003) Structural genomics of proteins involved in copper homeostasis. *Accounts of Chemical Research*- 36 (3): 215-221.
11. Banci L; Bertini I; Del Conte R. (2003) Solution Structure of Apo Copz from *Bacillus subtilis*: Further Analysis of the Changes Associates with the Presence of Copper. *Biochemistry*. 42 (46): 13422- 13428.
12. Banci L; Bertini I; Ciofi-Baffoni S; Xun-Cheng S; Borelly GPM; Robinson NJ. (2004) Solution Structures of a Cyanobacterial Metallochaperone. Insight into an atypical copper-binding motif. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (26): 27502-27510
13. Banci L; Bertini I; Ciofi-Baffoni S; Kozyreva T; Zovo K; Palumaa P. (2010) Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature*.465 (7298): 645-648.
14. Bandmann O; Weiss KH; Kaler SG. (2015) Wilson's disease and other neurological copper disorders. 14 (1): 103-113.
15. Beackley MR & MacGillivray RTA. (2011) Transition metal homeostasis: from yeast to human disease. *BioMetals*. 24 (5): 785-809.
16. Boal AK & Rosenzweig AC. (2009) Structural biology of copper trafficking. *Chemical Reviews*. 109 (10):4760-4779.
17. Bradford MM. (1976) *Analytical Biochemistry*. 72 (1-2): 248- 254

18. Bravo-Gómez MA; Espinoza-Guillén A; Castillo Blum S; Barba Behrens N. (2015) Metalochaperonas: escoltas personales en el tráfico intracelular de iones metálicos. *Educación química*. 26 (1):1-12.
19. Brouwer M; Syring R; Brouwer TH. (2002) Role of a copper specific methallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 88: 228-239.
20. Calabrese A; Thurberg F; Gould E. (1977) Effects of cadmium, mercury and silver on marine animals. *Marine Fisheries Review*. 39 (4): 5-11.
21. Cavet JS; Borrelly GP; Robinson NJ. (2003) Zn, Cu and Co in cyanobacteria: selective control of metal availability. *FEMS Microbiology Reviews*. 27 (2-3): 165-181.
22. Cook JD; Penner-Hahn JE; Stemmler T.L. (2008) Structure and Dynamics of Metalloproteins in Live Cells. *Methods in Cell Biology*. 90: 199-216.
23. Culotta VC; Klomp LW; Strain J, Casareno RL, Krems B, Gitlin JD. (1997) The copper chaperone for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (38); 23469-23472.
24. Dancis A; Yuan DS; Haile D; Askwith C; Eide D; Moehle C; Kaplan J; Klausner RD. (1994) Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. 76 (2): 393-402.
25. Dias-Bainy AC. (2000) Biochemicals Responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture* 191: 163-168.
26. Dolgova NV; Yu C; Cvitovic JP; Hodak M; Nienaber KH; Summers KL; Cotelesage JJH; Bernholc J; Kaminski GA; Pickering IJ; George GN; Dmitriev

- OY. (2017) Binding of Copper and Cisplatin to Atox| Is Mediated by Glutathione through the Formation of Metal-Sulfur Clusters. *Biochemistry*. 56 (24):3129-3141
27. FAO (2015) A world overview of species of interest to fisheries. *Penaeus vannamei*. FIGIS Species Fact Sheets. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Disponible en línea: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es
28. Fast AW; Menavesta P. (2000.) Some recent issues and innovations in marine shrimp pond culture. *Reviews in Fisheries Science*. 8: 151- 233.
29. Festa RA & Thiele DJ. (2011) Copper: an essential metal in biology. *Current Biology*. 21(21): R877- R883.
30. Freydank AC; Brandt W; Dräger B. (2008) Protein structure modeling indicates hexahistidine-tag interference with enzyme activity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 72 (1):173-183
31. Frías-Espericueta MG; Aguilar-Juárez M; Osuna-López I; Abad-Rosales S; Izaguirre-Fierro G; Voltolina D. (2011) Metals and shrimp aquaculture in Mexico. *Hidrobiológica*. 21 (3): 217-228.
32. Fu D; Beeler TJ; Dunn TM. (1995) Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross- complements the Ca²⁺- sensitive phenotype of csg1 mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu²⁺- ATPase subfamily. *11(3): 283-292*
33. Gaetke LM; Chow-Johnson HS; Chow CK. (2014) Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Archives of Toxicology*. 88 (11): 1929-1938.

34. Georgopoulos PG; Roy A; Yonone-Lioy MJ; Opiekun RE; Lioy PJ. (2001) Environmental copper: its dynamics and human exposure issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*.4:341-394.
35. Ghaffari N; Sanchez-Flores A; Doan R; Garcia-Orozco KD; Chen PL; Ochoa-Leyva A; Lopez-Zavala AA; Salvador Carrasco J; Hong C; Brieba LG; Rudiño-Piñera E; Blood PD; Sawyer JE; Johnson CD; Dindot SV; Sotelo-Mundo RR; Criscitiello MF. (2014) Novel transcriptome assembly and improved annotation of the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*), a dominant crustacean in global seafood mariculture. *Scientific Reports*. 4:7081
36. Glerum DM, Shtanko A; Tzagoloff A (1996) Characterization of COX17, a Yeast Gene Involved in Copper Metabolism and Assembly of Cytochrome Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 14504-14509.
37. Grubman A & White AR. (2014) Copper as a key regulator of cell signaling pathways. *Expert reviews in molecular medicine*. 16: e11.
38. Hamza I; Schaefer M; Klomp LWJ; Gitlin JD. (1999) Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (23): 13363-13368.
39. Harris ED. (2003) Basic and Clinical Aspects of Copper. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 40 (5): 547-586.
40. Harrison MD; Jones CE.; Solioz M; Dameron CT. (2000) Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends in Biochemical Sciences*. 25: 29-32.

41. Harrison MD; Jones CE; Dameron CT. (1999) Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 4 (2): 145-153.
42. Hatori Y & Lutsenko S. (2013) An expanding range of functions for the copper chaperone/antioxidant protein Atox1. *Antioxidants & Redox Signaling*. 19 (9): 945-957.
43. Hausinger RP; Colpas GJ; Soriano A (2001) Urease: a paradigm for protein-assisted metallocenter assembly. *ASM News*. 67: 78-84.
44. Hauton C & Smith VJ. (2007) Adaptive immunity in invertebrates: a straw house without a mechanistic foundation. *BioEssays*. 29 (11) : 1138-1146
45. Hoffman JA; Kafatos FC; Janeway CA; Ezekowitz R. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. 284: 1313-1318.
46. Horng YC; Cobine PA; Maxfield AB; Carr HS; Winge DR.(2004) Specific Copper Transfer from the Cox17 Metallochaperone to Both Sco1 and Cox11 in the Assembly of Yeast Cytochrome c Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 35334-35340.
47. Hung IH; Casereno RL; Labesse G; Mathews FS, Gitlin JD. (1998) HAH1 is a copper binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense, *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 1749-1754.
48. Hussain F; Olson JS; Wittung-Stafshede P. (2008) Conserved residues modulate copper release in human copper chaperone Atox1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(32):11158-11163.

49. INEGI (2010) Estadística de la industria minerometalúrgica. Disponible en línea: <http://www.inegi.org.mx/>
50. Itoh S; Kim HW; Nakagawa O; Ozumi K; Lessner Sm; Aoki H; Akram K; McKinney RD, Ushio-Fukai M; Fukai T. (2008) Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *283 (14):9157-9167.*
51. Kaplan JH & Maryon EB. (2016) How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal. *Biophysical journal. 110(1):7-13.*
52. Kihlken MA; Lecch AP; Le Brun NE. (2002) Copper-mediated dimerization of CopZ, a predicted copper chaperone from *Bacillus subtilis*. *The Biochemical Journal. 368 (Pt3): 729-739.*
53. Kim H; Son HY; Bailey SM; Lee J. (2009) Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. 296 (2): G356-364.*
54. Lacerda LD; Santos JA; Madrid RM. (2006) Copper emission factors from the intensive shrimp aquaculture. *Marine Pollution Bulletin 52: 1823-1826.*
55. Lee J; Peña MM; Nose Y; Thiele DJ. (2002) Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *The Journal of Biological Chemistry. 277 (6): 4380-4387.*
56. Levy AR; Turgeman M; Gevorkyan-Aiapetov L; Ruthstein S. (2017) The structural flexibility of the human copper chaperone Atox1, Insights from combined pulsed EPR studies and computations. *The Protein Society. 26:1609-1618.*

57. Li N; Zhao Y; Yang J. (2007) Impact of waterborne copper on the content on the structure of gills and hepatopancreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergi* (Crustacea: Decapoda). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 52: 73-79.
58. Li Y; Du J; Zhang P; Jianping D. (2010) Crystal structure of human copper homeostasis CutC reveals a potential copper-binding site. Journal of Structural Biology. 169: 399-405.
59. Lin SJ; Pufahl RA; Dancis A; O'Halloran TV; Culotta VC. (1997) A role of the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 Gene in Copper trafficking and iron transport. The Journal of Biological Chemistry. 272: 9215-9220.
60. Liu C; Wang X; Xiang J; Li F, (2012) EST-derived SNP discovery and selective pressure analysis in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 30 (5): 713-723.
61. Lyle-Fritch LP; Romero-Beltran E; Páez- Osuna F (2006). A survey on use of the chemical and biological products for shrimp farming in Sinaloa (NW Mexico). Aquacultural Engineering 35: 135-146.
62. Martínez Córdova LR; Martínez M; López Elías JA; Campaña Torres A; Miranda Baeza A; Ballester E; Porchas Cornejo AP (2009) Alimento natural en acuicultura: una revision actualizada. Avances en Nutrición Acuícola X- Memorias del X Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 668-699
63. Martínez-Córdova LR & Peña-Messina E (2005) Biotic communities and feeding habits of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) and *Litopenaeus*

- stylirostris* (Stimpson, 1974) in monoculture and polyculture semi-intensive ponds. *Aquaculture Research*. 36: 1075-1084.
64. McCord JM & Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*. 244 (22): 6049-6055.
65. Morby AP; Hobman JL; Brown NL. (1995) The role of cysteine residues in the transport of mercury ions by the Tn501 MerT and MerP mercury-resistance proteins. *Molecular Microbiology*. 17: 25-35
66. Narindrasorasak S; Zhang X; Roberts EA; Sarkar B. (2004) Comparative analysis of metal binding characteristics of copper chaperone proteins, Atx1 and ATOX1. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2 (1-2):105-123.
67. Niemiec MS; Dingeldein AP; Wittung-Stafshede P. (2014) T versus D in the MTCXXC motif of copper transport proteins plays a role in directional metal transport. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 19: 1037-1047.
68. Nobrega MP; Bandeira SC; Beers J; Tzagoloff A. (2002) Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (43): 40206-40211.
69. Norzagaray Campos, M., Muñoz Sevilla, P., Sánchez Velasco, L., Capurro Filograsso, L., Llánes Cárdenas, O. *Acuicultura: estado actual y retos de la investigación en México* AquaTIC [online] 2012, (Julio-Diciembre)
70. Osman D & Cavet JS. (2008) Copper homeostasis in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. 65:217-247.

71. Paaluma P. (2013) Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Letters*. 587 (13): 1902-1910
72. PAC (1994) Glossary of bioanalytical nomenclature. Part 1. General terminology, body fluids, enzymology, immunology (IUPAC Recommendations) 2593.
73. Páez-Osuna F; Ochoa-Izaguirre MJ; Bojórquez-Leyva H; Michel-Reynoso IL. (2000) Macroalgae as biomonitors of heavy metal availability in coastal lagoons from the subtropical Pacific of Mexico. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 64: 846-8851.
74. Pamukoglu MY & Kargi F. (2007) Mathematical modeling of copper (II) ion inhibition on COD removal in an activated sludge unit. *Journal of Hazardous Materials*. 146: 372-377.
75. Patrick L. (2006) Lead toxicity. Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Alternative Medicine Review*. 11: 114–127.
76. Perry G; Sayre LM; Atwood CS; Castellani RJ; Cash AD; Rottkamp A; Smith MA. (2002) The Role of Iron and Copper in the Aetiology of Neurodegenerative Disorders. *16(5):339-352*.
77. Petris MJ. (2004) The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Pflugers Archiv: European Journal of physiology*. 447 (5): 752-755
78. Piug S; Thiele DJ. (2002) Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Current Opinion in Chemical Biology*. 6: 171-180.
79. Porcheron G; Garénaux A; Proulx J; Sabri M; Dozois CM. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria:

- correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3: 1- 18.
80. Rae TD; Schmidt PJ; Pufahl RA; Culotta VC; O'Halloran TV. (1999) Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*. 284 (5415): 805-808.
81. Rees EM, Lee J; Thiele DJ. (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the *ctr2* vacuolar copper transporter. *The Journal of Biological Chemistry*. 279 (52): 54221-54229.
82. Rensing C & McDevitt SF. (2013) The Copper Metallome in Prokaryotic Cells. *Metallomics and the Cell, Metal Ions in Life Sciences* 12. 417- 443
83. Robinson NJ & Winge DR. (2010) Copper metallochaperones. *Annual Review of Biochemistry*. 79: 537-562.
84. Rosenzweig A C; Huffman DL; Hou MY; Wernimont AK; Pufahl RA; O'Halloran TV. (1999) Crystal structure of the Atx1 metallochaperone protein at 1.02 Å resolution. *Structure*. 7 (6): 605-617.
85. Rosenzweig AC & O'Halloran TV (2000). Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Current Opinion in Chemical Biology*. 4: 140-147.
86. Rosenzweig AC. (2002) Metallochaperones: Bind and Deliver. *Chemistry & Biology*. 9 (6): 673-677.
87. Rubino JT & Franz KJ. (2012) Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of inorganic biochemistry*. 107 (1): 129-143

88. Rutherford JC & Brid AJ. (2004) Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryotic cell*. 3 (1): 1-13.
89. Sahlman L & Skärfstad EG. (1993) Mercuric ion binding abilities of MerP variants containing only one cysteine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 196 (2): 583-588.
90. Santos CA; Andrade SCSM Teixeira AK; Farias F; Kurkjian K; Guerrelhas AC; Rocha JL; Galetti PM Jr; Freitas PD. (2018) *Litopenaeus vannamei* Transcriptome Profile of populations Evaluated for growth Performance and Exposed to White Spot Syndrome Virus (WSSV). *Frontiers in Genetics*. 9:120
91. Sazinsky MH; Agarwal S; Argüello JM; Rosenzweig AC. (2006) Structure of the actuator domain from the *Archaeoglobus fulgidus* Cu (+) ATPase. *Biochemistry*. 45 (33):9949-9955.
92. Schmidt PJ, Ramos-Gomez M, Culotta VC. (1999) A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(52): 36952-36956
93. Shim H & Harris I. (2003) Genetic Defects in Copper Metabolism. *The Journal of Nutrition*. 133 (5): 1527S-1531S.
94. Shoshan MS; Shalev DE; Tshuva EY (2013) Peptide Models of Cu (I) and Zn (II) Metallochaperones: The Effect of pH on Coordination and Mechanistic Implications. *Inorganic Chemistry*, 52: 2993-3000.
95. Shoshan MS; Dekel N; Goch W; Shalev DE; Danieli T; Lebendiker M; Bal W; Tshuva EY. (2016) Unbound position II in MXCXXC metallochaperone model

- peptides impacts metal binding mode and reactivity. Distinct similarities to whole proteins.159: 29-36.
96. Solioz M; Abicht HK; Mermoud M; Mancini S. (2010) Response of gram-positive bacteria to copper stress. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 15 (1): 3-14.
97. Sturtz Field L; Luk E; Culotta VC. (2002). Copper Chaperones: Personal Escorts for Metal Ions. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 34 (5): 373-379.
98. Tottey S; Harvie DR; Robinson NJ. (2005) Understanding how cells allocate metals using metals sensors and metallochaperones. *Accounts of Chemical Research*. 38:775-783.
99. Urvoas A; Moutiez M; Estienne C; Couprie J; Mintz E; Le Clainche L (2004) Metal-binding stoichiometry and selectivity of the copper chaperone CopZ from *Enterococcus hirae*. *European Journal of Biochemistry*. 271 (5): 993 – 1003.
100. Valavinidis A & Viachogianni T. (2010) Metal Pollution in Ecosystems. *Ecotoxicology Studies and Risk Assessment in the Marine Environment*. Science Advances on Environment, Toxicology & Ecotoxicology issues.1-14.
101. Valko M; Morris H; Cronin MTD. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Currents Medicine Chemistry*. 12(10)1161–1208.
102. Vest KE; Leary SC; Winge DR; Cobine PA. (2013) Copper Import into the Mitochondrial Matrix in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mediated by Pic2, a Mitochondrial Carrier Family Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 288 (33): 23884-23892.

103. Waldron KJ & Robinson NJ. (2009) How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?. *Nature Reviews Microbiology*. 6: 25-35.
104. Wernimont AK; Huffman DL; Lamb AL; O'Halloran TV; Rosenzweig AC. (2000) Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins. *Nature Structural Biology*. 7 (9): 766-771.
105. Wimmer R; Herrmann T; Solioz M; Wüthrich K. (1999) NMR structure and metal interactions of the CopZ copper chaperone. *The Journal of the Biological Chemistry*. 274 (32): 22597-22603.
106. Xiao-Yi W; Yu-Feng Y. (2011) Heavy metal (Pb, Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn and Zn) concentrations in harvest –size white shrimp *Litopenaeus vannamei* tissues from aquaculture and wild source. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24: 62-65.
107. Yang C; Zhang J; Li F; Ma H; Zhang Q; Jose Priya TA; Zhang X; Xiang J. (2008) A Toll receptor from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* is responsive to *Vibrio anguillarum* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 24: 564-574.
108. Yannone SM; Hartung S; Menon A.L.; Adams MWW; Tainer JA.(2012) *Current Opinion in Biotechnology: Analytical Biotech*. 23(1): 89-95.