



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas

Centro de Investigación en Dinámica Celular

Estudios químico-estructurales de la perlina
recombinante de *Pictada fucata*

T e s i s

para obtener el título de

Maestro en Ciencias

Presenta

Elena Lizbeth García Villegas

Director de Tesis

Enrique Rudiño Piñera

(IBt, UNAM)

Cuernavaca, Morelos,

16 de enero de 2019

Contenido

Lista de figuras	4
Lista de tablas	14
Abreviaturas	15
Resumen	16
I. Introducción	18
Biom mineralización	18
El carbonato de calcio y la biom mineralización en moluscos	21
Nácar	25
La matriz orgánica de la capa de nácar	26
Características estructurales de las proteínas de biom mineralización	30
II. Antecedentes	34
<i>Pinctada fucata</i> y las proteínas que conforman su capa nacarada	34
Perlina	37
Hipótesis	40
Objetivos	40
III. Metodología	41
Expresión heteróloga de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$	41
Solubilización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$	41
Purificación de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$	42

Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$	42
Análisis de Fluorescencia de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$	43
Cristalización y Optimización de la cristalización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$	43
Difracción de Rayos X de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$	44
IV. Resultados y Discusión	45
Expresión heteróloga de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$	45
Solubilización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$	49
Purificación de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$	51
Análisis del proceso de oligomerización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ en solución	63
La interacción de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His ⁺ /His ⁻ con los iones Ca ²⁺ Mg ²⁺ y CO ₃	67
Cristalización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$	70
Difracción de Rayos X	77
V. Conclusiones	80
VI. Perspectivas	81
VII. Bibliografía citada	82
IX. Anexos	93

Lista de figuras

Figura 1. Diferentes formas y texturas de tejidos mineralizados. **A)** Imagen de HR-SEM de la valva de *Chalciporus ratiantus* (silica). **B)** Imagen de SEM del cocolito *Emiliana buxley* (carbonato de calcio). **C)** Estiloide de oxalato de calcio de *Eicbbornia sp.* **D)** Drusa esférica de *Pepermia sp* (Adaptado de Demichelis *et al.*, 2018).....**18**

Figura 2. Procesos de biomineralización. En el esquema se pueden observar los dos procesos a partir de los cuales se pueden producir biominerales. En la parte superior de la imagen se describe a la mineralización inducida biológicamente, la cual es considerada como patológica un ejemplo de esta son los cálculos renales. En la parte inferior se muestra la mineralización mediada por una matriz orgánica, la cual da como resultado la formación de huesos, dientes y cascarones de huevo (Lowenstam & Weiner 1989).....**20**

Figura 3. Las conchas de los moluscos. Ejemplos de conchas de diferentes moluscos
A) Concha del bivalvo marino *Neotrigonia sp.* **B)** Concha del gasterópodo marino *Turbo marmuratos*, conocido también como caracol verde. **C)** Concha del gasterópodo *Helix pomatia*, o mejor conocido como caracol de Borgoña (Adaptado de Marin, Le Roy, & Marie, 2012).....**21**

Figura 4. Esquema de la morfología y estructura de las capas de la concha de los moluscos. **A)** Capa prismática. **a)** Se muestra la vista macroscópica de la capa prismática de la valva del molusco *P. fucata*. **b)** Representación esquemática de los cristales de calcita que conforman la capa prismática. **c)** Estructura cristalina de la calcita. **B)** Capa nacarada. **a)** Vista macroscópica de la capa nacarada del molusco *P. fucata*. **b)** Representación esquemática de las tabletas de aragonita de la capa

nacarada. **c)** Estructuras cristalinas de la aragonita (Adaptado de Evans, 2008; Soldati *et al.*, 2016; Lemanis & Zlotnikov, 2017).....**23**

Figura 5. Esquema de la anatomía de la concha de un bivalvo. A) La concha se encuentra compuesta por el *pericostratum*, la capa prismática y la capa nacarada. En el esquema también se puede observar el espacio extrapallial ubicado entre el tejido mineralizado y el manto del bivalvo. **B)** En el esquema se muestra una ampliificación de la capa nacarada de la concha del organismo, así como el proceso a través del que se exportan los componentes orgánicos e inorgánicos producidos por el manto en vesículas intracelulares a la zona donde comenzara la nucleación de las tabletas de aragonita. El crecimiento comenzara en el sustrato preformado de β -quitina con ayuda de las macromoléculas que conforman la matriz orgánica, conduciendo así a la maduración del nácar. (Adaptado de Bahn *et al.*, 2017).....**24**

Figura 6. Estructura nacarada de la concha de los moluscos. (A) Capa nacarada o madreperla contenida dentro de la concha del género *Pinctada*. **(B)** Imagen obtenida por SEM, donde, se muestra la estructura característica del nácar en forma de pared de ladrillo observada en algunos bivalvos. **(C)** Imagen obtenida por SEM donde se observa la estructura característica del crecimiento de nácar en forma de monedas apiladas presente en gasterópodos. (Adaptado de Marin *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016).....**26**

Figura 7. Componentes de la matriz orgánica de la capa nacarada de los bivalvos. En la figura se muestran de forma general las macromoléculas que conforman la matriz orgánica (MO*) de la capa nacarada. Como se puede observar las proteínas se pueden clasificar en una fracción orgánica soluble (FOS*) y en una fracción orgánica insoluble (FOI*), de acuerdo con su solubilidad en EDTA, dicha clasificación fue propuesta en 1963 por Hare, pero hasta el momento se desconocen el

fundamento bioquímico de dicha clasificación (Adaptado de Hare, 1963; Rao & Cölfen, 2015).....28

Figura 8. Proteínas asociadas a la biomineralización identificadas en conchas de moluscos. En el grafico se observan las proteínas identificadas en la matriz orgánica pertenecientes a diversas conchas de diversos moluscos por año a partir del año 1991 hasta el año 2011 (Adaptado Marin *et al.*, 2013).....31

Figura 9. Características de las proteínas implicadas en los procesos de biomineralización en moluscos. En el esquema se resumen las características de las proteínas de la matriz de los moluscos (Adaptado de Kalmar *et al.*, 2012).....33

Figura 10 *Pinctada fucata*. *P. fucata*, conocida también como Ostra perlera japonesa o Madre perla (Adaptado de Montagnani *et al.*, 2011).....35

Figura 11 Proteínas encontradas en la capa nacarada de bivalvos modelo en biomineralización. En total se han encontrado aproximadamente 48 proteínas en las matrices orgánicas en las familias de bivalvos *Unionoidae*, *Pteriidae* y *Mytilidae*. Las proteínas que cuentan con un exponente p, también se han encontrado en la capa prismática(Adaptado Marie *et al.*, 2017).....37

Figura 12. Secuencia de aminoácidos de la región N-terminal 30 aminoácidos de n16, llamada n16N. Dentro de las llaves de la imagen se observan los subdominios sugeridos del péptido n16N. El papel tentativo del subdominio **SD1** seria en la unión a β quitina, mediado por Tyr. El subdominio **SD2** funcionaria en las interacciones intra-péptido por medio de interacciones Tyr-Tyr. El subdominio **SD3** podría participar en la captura de iones; Los residuos catiónicos se muestran en azul y los residuos aniónicos en rojo. (Adaptado de Rutter *et al.*, 2015).....38

Figura 13. Mapa del vector Pj414. Vector de expresión Pj414. El vector cuenta con un gen marcador de ampicilina (rosa), el promotor del fago T7 (fucsia) en su extremo

N-Terminal presenta una etiqueta de 10 histidinas (morado), el sitio de corte para la PPS (azul cielo) y el gen de la *rperlina_{pf}*.....45

Figura 14. Proceso de expresión de la *rperlina_{pf}*. (A) Cinética de crecimiento. En la gráfica se observa la cinética de crecimiento de *E. coli* ER2566 post-inducción OD =0.5 a 600 nM durante 5 h de expresión. **(B)** Electroforesis de SDS-PAGE al 15%, donde se muestran la inducción de la *rperlina_{pf}* en los extractos crudos obtenidos de la fracción soluble e insoluble del cultivo tomados cada hora, a partir de la inducción con IPTG (Tiempo 0). (M) Marcador en kDa. En los carriles 1 al 6 se encuentra la fracción soluble desde el tiempo 0 hasta las 5 horas de inducción, donde no se observa la expresión de la *rperlina_{pf}*. En los carriles 7 al 12 se observa la fracción insoluble desde el tiempo 0 al tiempo 5, donde claramente se observa la expresión de la *rperlina_{pf}* a partir de la hora de inducción y se incrementa considerablemente en la segunda hora sin observarse incrementos notables de expresión en las horas posteriores.....46

Figura 15. Análisis de espectrometría de masas de la *rperlina_{pf}*. (A) Búsqueda de la identidad de la *rperlina_{pf}* utilizando las bases de datos de O97048 y I2FK00. **(B)** Secuencias de aminoácidos resultantes de digestiones de tripsina **(C)**. Alineamiento de la *rperlina_{pf}* con las secuencias obtenidas después de la digestión triptica, que se indican debajo de la secuencia de la perlina; la secuencia que se encuentra dentro del recuadro verde representa la etiqueta de histidinas y el sitio de corte para la proteasa PPS que permitirá retirar dicha etiqueta, en el recuadro azul corresponde al péptido señal.....48

Figura 16. Solubilización de la *rperlina_{pf}*. Electroforesis de SDS-PAGE al 15% del protocolo de solubilización de la *rperlina_{pf}*. En los carriles 1 y 2 se observan la fracciones soluble e insoluble obtenidas después de la lisis celular realizada en presencia del amortiguador de lisis Tris-HCl 20 mM, pH 8, Cloruro de Sodio 50 mM,

PMSF 1 mM (señalados con la llave color azul). En los carriles 3 y 4 del gel se observan a las fracción soluble e insoluble obtenidas después de tratar a la fracción insoluble obtenida después de la lisis celular con el amortiguador de solubilización Tris-HCl 20 mM, pH 8, cloruro de sodio 150 mM, PMSF 1 mM y sarcosil 5% (señalado con la llave verde). Dentro del recuadro se observa a la $r_{perlina_{pf}}$51

Figura 17. Cromatografía de afinidad a níquel de la $r_{perlina_{pf}}$. (A) Perfil cromatográfico de la cromatografía de afinidad níquel en una columna His Trap™ de la $r_{perlina_{pf}}$. La columna se equilibró previamente con el amortiguador Tris- HCl 20 mM, pH 8, posteriormente se aplicó la muestra. La proteína fue eluida se empleó un gradiente lineal de 0 -100% del amortiguador Tris- HCl 20 mM, pH 8, imidazol 500 mM. Se empleo una velocidad de flujo de 3 ml/min (B) Electroforesis de SDS-PAGE al 15%. En los carriles de observa la fracción soluble (S), la fracción insoluble (I), fracción no fijada a la columna (V), el número de las fracciones colectadas de la $r_{perlina_{pf}}$ y el marcador de peso molecular (M). con la flecha se indica la migración de la $r_{perlina_{pf}}$ en el gel.....52

Figura 18. Análisis de la $r_{perlina_{pf}}$ His + por DLS. Se realizaron análisis de DLS de la $r_{perlina_{pf}}$ His +, obtenida después de la cromatografía de afinidad níquel. Durante el experimento se observaron oligómeros de hasta 22.24 nm de D_H lo que correspondería aproximadamente a una proteína de 959.7 kDa. La proteína se encontraba en el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8, imidazol 500 mM. El ensayo se realizó el equipo Zetasizer Nano Z (ángulo de dispersión de 173°) a una temperatura de 18°C. Cada una de mediciones se tomó por triplicado. En la parte superior derecha se muestra el coeficiente de correlación de cada una de las mediciones.....54

Figura 19. Análisis de la $r_{perlina_{pf}}$ His+ en presencia de distintos amortiguadores por DLS. (A) En la gráfica se representan algunas de las condiciones evaluadas en el análisis de DLS. Durante el ensayo se evaluó el comportamiento de la $r_{perlina_{pf}}$ en

presencia de distintos amortiguadores. Se puede observar una relación entre los valores de cada uno de los D_H (nm) obtenidos en cada una de las mediciones y el pH del amortiguador en el que se encontraba la proteína. En color negro se observa a la proteína en el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8, imidazol 500 mM. En líneas punteadas de color rojo se muestra el comportamiento de la $r_{perlina_{pf}}$ en el amortiguador HEPES 20 mM, pH 7.5. En líneas punteadas de color verde se muestra el comportamiento de la $r_{perlina_{pf}}$ en el amortiguador fosfatos 20 mM, pH 6.2. En líneas punteadas de color azul se muestra el comportamiento de la $r_{perlina_{pf}}$ en agua Milli Q. En líneas punteadas de color cian se muestra el comportamiento de la $r_{perlina_{pf}}$ en el amortiguador Tris-HCl 20 Mm, pH 8, 1% sarcosil. Los ensayos se realizaron el equipo Zetasizer Nano Z (ángulo de dispersión de 173°) a una temperatura de 18°C. Cada una de mediciones se tomó por triplicado. En la parte superior derecha se muestra el coeficiente de correlación de cada una de las mediciones.....56

Figura 20. Proceso de corte de la etiqueta de His de la $r_{perlina_{pf}}$ His+ con la proteasa PPS. Electroforesis de SDS-PAGE al 15% del proceso de corte de la etiqueta de His de la $r_{perlina_{pf}}$ His+. En el carril 1 se observan la proteína control, previa a la digestión con la PPS. En el carril 2 se muestra a la $r_{perlina_{pf}}$ después del corte con la proteasa PPS. Con la letra M se encuentra señalado el marcador de peso molecular (kDa). Con la flecha verde se señala a la $r_{perlina_{pf}}$ His +, mientras dentro del recuadro naranja se observa a la $r_{perlina_{pf}}$ His -. La proteólisis se llevó acabo en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, DTT 1 mM. A 4 °C.....58

Figura 21. Cromatografía de exclusión molecular de la $r_{perlina_{pf}}$. (A) Perfil cromatográfico de la exclusión molecular en una columna Superdex 75 HR 10/30 de la $r_{perlina_{pf}}$. La columna se equilibró previamente con el amortiguador Tris- HCl 20 mM, pH 8, sarcosil 1%. Se empleo una velocidad de flujo de 1 ml/min. (B)

Electroforesis de SDS-PAGE al 15%. En los carriles se observa a la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}(\text{His}+/\text{His}-)$ antes de ser inyectada a la columna (A) el número de las fracciones colectadas 24 a 34 de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ y el marcador de peso molecular en kDa (M). Con las flechas se señala en el gel a la PPS (azul), $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}+$ (verde), $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}-$ (naranja).....**60**

Figura 22. Análisis del proceso de purificación de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ por DLS. Durante cada una de las etapas del proceso de purificación se evaluó por DLS el comportamiento de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$. En color negro se observa el comportamiento de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}+$ después de la cromatografía de afinidad a níquel. La proteína mostro un D_H de ~ 22.24 nm. En color negro se observa el comportamiento de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}+$ después del proceso de corte con la proteasa PPS, donde la proteína mostro un $D_H \sim 24.20$ nm. Como se puede observas, en ambas mediciones la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ presenta un tamaño aproximado de una proteína de 2041.4 kDa. A diferencia de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ evaluada después de la cromatografía de exclusión molecular donde se observa con un D_H de 4 nm o ~ 18.5 kDa. La cual se muestra en color cian. Las mediciones se realizaron en el equipo Zetasizer Nano Z (ángulo de dispersión de 173°) a una temperatura de 18°C . Cada una de mediciones se tomó por triplicado. En la parte superior derecha se muestra el coeficiente de correlación de cada una de las mediciones.....**62**

Figura 23. Análisis de la oligomerización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ en solución. Se analizó por DLS el efecto de oligomerización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}+/\text{His}-$ en presencia de diferentes iones. En azul se muestra el comportamiento de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}+/\text{His}-$ en presencia de 0.3 equivalentes de CaCl_2 . En verde se muestra el comportamiento de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}+/\text{His}-$ en presencia de 0.3 equivalentes de MgCl_2 . En negro se muestra el comportamiento de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}+/\text{His}-$ en presencia de 3 equivalentes de NaCO_3 . En rojo se muestra el comportamiento de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}} \text{His}+/\text{His}-$ en presencia de 3 equivalentes de NaCl . El ensayo se realizó el equipo Zetasizer Nano Z (ángulo de dispersión de 173°) a una temperatura de 18°C . Cada una de mediciones se tomó

por triplicado. En la parte superior derecha se muestra el coeficiente de correlación de cada una de las mediciones.....66

Figura 24. Análisis de la interacción de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- con los iones Ca^{2+} Mg^{2+} Na^+ y CO_3^{2-} . Se tomaron espectros de fluorescencia de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- en presencia de distintas sales. La $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- que se utilizó como control se muestra en color negro. La $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- adicionada con NaCO_3 se muestra color verde. La $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- adicionada con NaCl se muestra en color azul, La $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- adicionada con MgCl_2 se muestra en color morado. La $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- adicionada con CaCl_2 se muestra en color vino tinto. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro F-4500 FL (HITACHI), con una celda de 1 cm de longitud de camino, una longitud de onda de excitación de 280 nm, y una longitud de onda de emisión entre 295 y 500 nm.....68

Figura 25. Modelo de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$. En la parte superior de la figura se representa la secuencia a completa de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$. Dentro del recuadro coloreado en cian se muestra la secuencia de residuos de aminoácidos a partir de la que se generó el modelo tridimensional de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ mostrado en la parte inferior de la figura. En color azul se encuentran resaltados los residuos Trp contenidos en la secuencia de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$. El modelo se generó con el servidor SWISS MODEL basado en la secuencia de la proteína ubiquitin-ligasa RNF38 y la imagen se obtuvo con el programa PyMOL.....70

Figura 26. Pruebas de Cristalización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ (His +/ His -). En las imágenes se pueden observar algunas de las condiciones de cristalización. Todas las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% y se incubaron a 4 y 18 °C.....71

Figura 28.-Cristales obtenidos a partir de las matrices de optimización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ (His +/ His-). (A) Cristales obtenidos en la condición Tris HCl 20 mM, pH 8,

cloruro de sodio 10 mM, 1% de sarcosil (0.04 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6.5 y PEG 4000 30%. **(B)** Cristales obtenidos en la condición, 0.04 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6.5 y 25% de PEG 4000. **(C)** Cristales obtenidos en la condición 0.2 M de acetato de magnesio y 40% de PEG 3350. **(D)** Cristales obtenidos en la condición 0.08 M de acetato de magnesio, 0.05 de cacodilato de sodio pH 6.5 y 20% de PEG 4000. **(E)** Cristales obtenidos en la condición 0.08 M de acetato de magnesio, 0.05 de cacodilato de sodio pH 6.5 y 35% de PEG 4000. Todas las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% a una concentración de 2.5 mg/mL y se incubaron a 18 °C.....73

Figura 28. Cristales obtenidos en las pruebas de cristalización de *rperlina_{pf}* His +/- His - en presencia de carbonato de sodio. (A) Cristales de *rperlina_{pf}* His +/- His - en presencia de Na₂CO₃ obtenidos en la condición 1 del “kit” “Natrix” en rojo se muestra el cristal que fue sometido a la difracción de rayos X **(B)** Cristales encontrados en la condición 12 del “kit” “Natrix” en presencia de Na₂CO₃. **(C)** Cristales obtenidos en la condición 46 del kit “Membfac” en presencia de Na₂CO₃. Todas las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% a una concentración de 2.5 mg/mL y se incubaron a 18 °C.....74

Figura 29. Cristales encontrados en las pruebas de cristalización generadas a partir de optimizar la condición 1 del “kit” “Natrix”, así como en presencia de Aditivos y “Detergents Screen” (A) Cristal encontrado en presencia del aditivo NDBS 221 (2 M). **(B)** Cristal encontrado en presencia del aditivo hexamina cloruro de cobalto (0.1 M). **(C)** Cristal encontrado en presencia del aditivo trimelamina N-oxido (30%). **(D)** Cristal encontrado en presencia del aditivo PEG 400 (50%). **(E)** Cristal encontrado en la optimización de la condición 1 a una concentración de 2 mg/mL (0.01 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de Mes pH 5.6 y de sulfato de litio). **(G)** Cristal encontrado en

presencia de detergente dodecil-N-Ndimetilglicina. Todas las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% y se incubaron a 18 °C.....75

Figura 30. Cristales obtenidos a partir de una condición de optimización. Se encontraron cristales en la condición 0.1 tris-HCl pH 8.5, 0.2 M de sulfato de litio. Las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% a una concentración de 2.5 mg/mL y se incubaron a 18 °C.....76

Figura 31. Ilustración esquemática del proceso propuesto de la formación de cristales en presencia de $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +/- His. El esquema representa a los cristales obtenidos durante las pruebas de cristalización fueron teñidos con el colorante "Izit". Durante este proceso la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +/- His, participaría en la formación de presuntos cristales de Ca^{2+} o Mg^{2+} . Donde la proteína se ubica en la periferia del centro de nucleación del cristal, para posteriormente estabilizar y promover el crecimiento del cristal de sal.77

Figura 32. Difracción de Rayos X. (A) Cristales difractados en el Ánodo rotatorio en el LANEM. **(B)** Patrón de difracción de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ a aproximadamente 3.2 Å de resolución.....78

Lista de tablas

Tabla 1. Análisis de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ His+ en presencia de distintos amortiguadores por DLS.....	55
Tabla 2. Análisis de la oligomerización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en solución.....	63
Tabla 3. Condiciones de cristalización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ His +/- His - a partir de las cuales se realizaron matrices de optimización.....	72

Abreviaturas

CCA	Carbonato de calcio amorfo
DLS	Dispersión Dinámica de Luz
DC	Dicroísmo Circular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
MPD	<u>2-Methyl-2,4-pentanediol</u>
PEG	Polietilenglicol
pI	Punto isoeléctrico
PIDs	Proteínas intrínsecamente desordenadas
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPS	Prescission protease
RMN	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>
rperlina_{pf}	Perlina recombinante de <i>P. fucata</i>
rperlina_{pf} His+	Perlina recombinante de <i>P. fucata</i> con etiqueta de histidinas
rperlina_{pf} His+/His-	Perlina recombinante de <i>P. fucata</i> con etiqueta de histidinas y sin etiqueta de histidinas
rpm	<i>Revoluciones por minuto</i>
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

Resumen

Las conchas de los moluscos se encuentran formadas por dos capas de polimorfos de carbonato de calcio, la capa prismática formada por cristales de calcita y la capa nacarada formada por tabletas de aragonita. Además de la fase inorgánica se ha descrito la presencia de una pequeña fracción orgánica, la cual juega un papel importante en la nucleación y crecimiento de los cristales de carbonato de calcio.

La investigación de la biomineralización en moluscos se ha centrado principalmente en la formación de la capa nacarada, debido a su alto valor comercial, por lo que hasta el momento las proteínas de esta capa han sido las mejor caracterizadas. Una de estas proteínas es la conocida como perlina o n16 la cual se ha reconocido como una proteína estructural muy conservada entre los miembros del género *Pinctada*.

La perlina de *Pinctada fucata* ($r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$) se expresó en células de *E. coli* ER2566 sin embargo, al encontrarse a la proteína en la fracción insoluble se utilizó un amortiguador que contenía 5% de el detergente sarcosil para solubilizarla. La proteína fue purificada en dos etapas. La primera consistió en una cromatografía de afinidad a níquel, gracias a la etiqueta de histidinas (His) a la que está unida la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$. Después, la muestra fue dializada para realizar el corte de la etiqueta de His con la proteasa PPS durante 16 h. Para la segunda etapa de purificación, la proteína se inyectó a una cromatografía de exclusión molecular con la columna Superdex 75 para retirar la PPS y otras proteínas que aún se encontraban en la muestra y así obtener a la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ con un alto grado de pureza.

Simultáneamente al proceso de purificación, se realizaron análisis de DLS para evaluar el comportamiento oligomérico de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en solución. Durante los ensayos se describió la oligomerización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en presencia de las sales como CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl y Na_2CO_3 . Donde se observó que el mecanismo de oligomerización

de la proteína, se veía afectado por cada una de las sales empleadas durante el experimento. Por lo tanto, se propone que el mecanismo de oligomerización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ podría ocurrir al menos de dos maneras y estas serían dependientes del ambiente iónico en el que la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ se encuentre. Con la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ también se pusieron cerca de 3000 pruebas de cristalización, a partir de las cuales, se obtuvo un cristal de proteína de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en presencia de Na_2CO_3 , a partir del cual se obtuvieron datos de difracción. Durante las pruebas de cristalización se encontró que la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ favorecía la formación de cristales de sal, al igual que en las capas de nácar lo que correspondería con su función biológica.

Introducción

Biomíneralización

De acuerdo con el registro fósil del periodo comprendido entre el Precámbrico tardío y el Cámbrico temprano (hace aproximadamente 515-545 millones de años) existió una radiación en la diversificación de distintos phyla, esto se debió a distintos factores bióticos y abióticos, que incluye el incremento de la cantidad de calcio en el agua de mar que condujo a un aumento en estructuras biomíneralizadas (Figura 1). Desde entonces las propiedades de los biomínerales han sido optimizadas por los organismos, empleándolas en diversas funciones fisiológicas, tales como el soporte de tejidos blandos, la protección frente a los depredadores o desecación, así como sensores magnéticos y de gravedad (Kocot *et al.*, 2016).

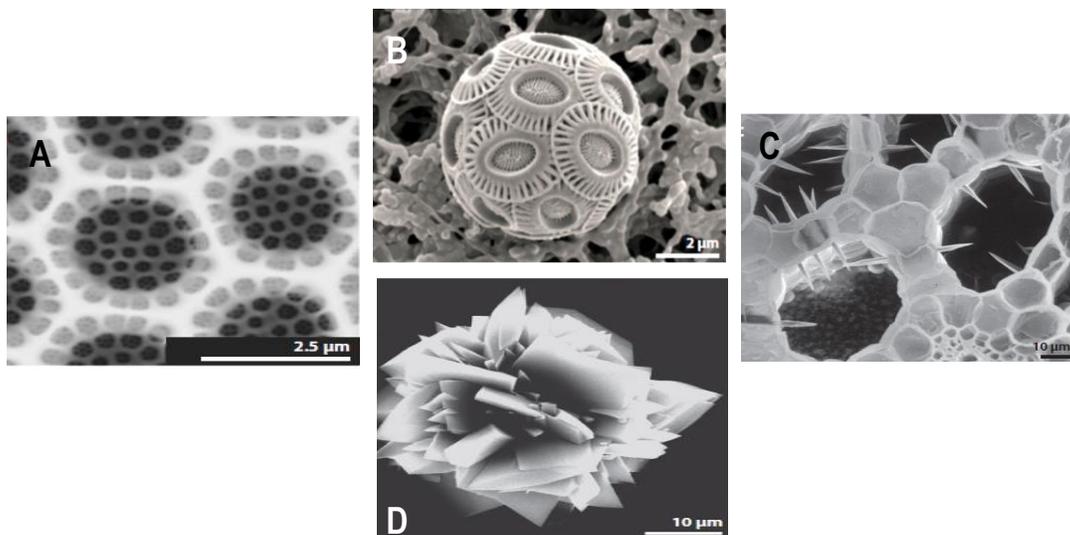


Figura 1. Diferentes formas y texturas de tejidos mineralizados. A) Imagen de HR-SEM de la valva de *Chalciporus ratiantus* (silica). **B)** Imagen de SEM del cocolito *Emiliana buxley* (carbonato de calcio). **C)** Estiloide de oxalato de calcio de *Eichbornia sp.* **D)** Drusa esférica de *Pepermia sp* (Adaptado de Demichelis *et al.*, 2018).

Las raíces del estudio de la biomineralización se remontan al siglo XVII, con la invención del microscopio compuesto, pero no fue hasta mediados de los años 90 ´ del siglo pasado, que se comenzaron a analizar los biominerales en detalle (Gower, 2013). Actualmente se conoce como biomineralización al proceso a través del cual los organismos producen estructuras mineralizadas, por lo que se le ha descrito como un proceso fisicoquímico dinámico y muy regulado en los organismos, que implica la participación de miles de genes y docenas de proteínas. Así, que por definición se ha considerado como un campo multidisciplinario, que se basa en investigaciones de las áreas de biología, química, geología y ciencias de los materiales, entre otras. Esto ha permitido identificar más de 60 tipos de biominerales entre los que se encuentran los que conforman a conchas, dientes, huesos, cascarones de huevo, cocolitos, otolitos y corales (Gower, 2013).

A la fecha se conocen dos procesos a través de los que se desarrolla la biomineralización propuestos por Lowenstam y Weiner en 1989. El primero, es conocido como mineralización inducida biológicamente. Ocurre como resultado de la interacción entre metabolitos biológicos e iones presentes en el medio y trae consigo un daño al organismo, por lo que se considera patológico (Figura 2). El segundo, es la mineralización mediada por una matriz orgánica. Consiste en la formación de la fase mineral sobre un esqueleto estructural conocido como matriz orgánica. Este proceso se ha considerado como un ejemplo de exaptación evolutiva que da como resultado la formación de conchas o huesos (Figura 2) (Lowenstam & Weiner 1989; Mann *et al.*, 2002).

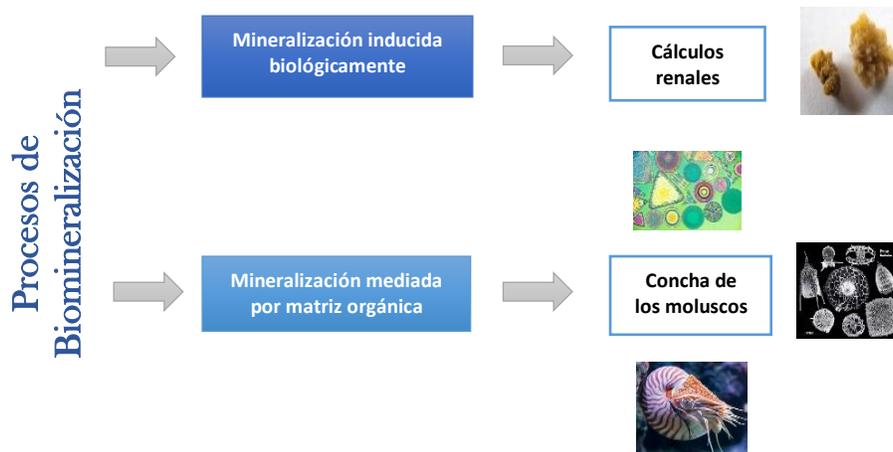


Figura 2. Procesos de biomineralización. En el esquema se pueden observar los dos procesos a partir de los cuales se pueden producir biominerales. En la parte superior de la imagen se describe a la mineralización inducida biológicamente, la cual es considerada como patológica un ejemplo de esta son los cálculos renales. En la parte inferior se muestra la mineralización mediada por una matriz orgánica, la cual da como resultado la formación de huesos, dientes y cascarones de huevo (Lowenstam & Weiner 1989).

En la naturaleza se han encontrado biominerales formados tanto de sílice, como de sulfato de estroncio, óxidos de hierro e hidróxido de cobre. Sin embargo, los biominerales formados a partir de carbonato de calcio son los más abundantes en la tierra, por lo que hasta ahora son los más estudiados (Skinner, 2005; Gower, 2013; Poznar *et al.*, 2017; Demichelis *et al.*, 2018). Así mismo, sus características físicas como dureza, fortaleza, resistencia y durabilidad los han convertido en atractivas fuentes de desarrollo tecnológico, inspirando nuevos materiales biomiméticos, por ejemplo polímeros de impacto para el sector de la construcción o el diseño de prótesis (Gower, 2013).

El carbonato de calcio y la biomineralización en moluscos

En la biosfera, el phylum molusca se conoce como uno de los grupos de metazoarios más extensos del reino Animalia. Este éxito se debe, en gran medida, a la capacidad de manipular el carbonato de calcio para formar estructuras sólidas. En estos organismos se han descrito más de 21 tipos distintos de biominerales con 17 funciones diferentes, de las cuales la más conocida es la formación de la concha (Figura 3) (Brusca & Brusca, 2005; Nudelman, 2015; Kocot *et al.*, 2016).

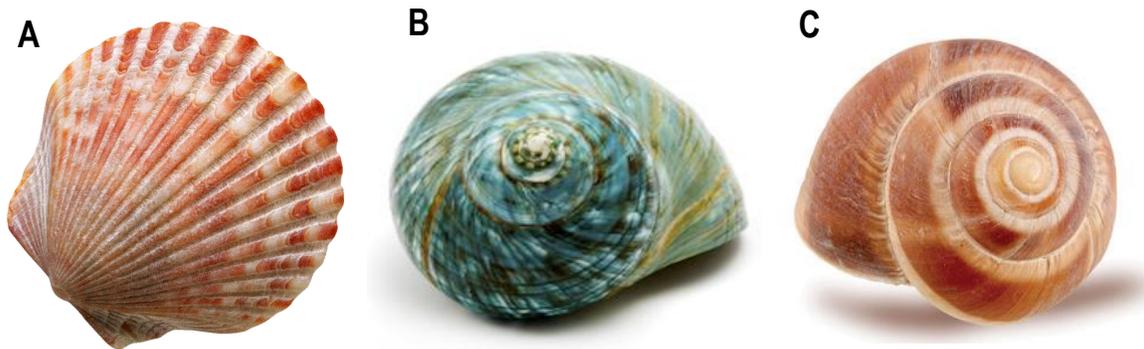


Figura 3. Las conchas de los moluscos. Ejemplos de conchas de diferentes moluscos **A)** Concha del bivalvo marino *Neotrigonia sp.* **B)** Concha del gasterópodo marino *Turbo marmoratus*, conocido también como caracol verde. **C)** Concha del gasterópodo *Helix pomatia*, o mejor conocido como caracol de Borgoña (Adaptado de Marin, Le Roy, & Marie, 2012).

La concha de los moluscos es un compuesto órgano mineral, formado a partir de la superposición de capas mineralizadas compuestas de 95-99.9% de carbonato de calcio (CaCO_3) y entre 5-1 % por componentes orgánicos (matriz orgánica). La concha puede llegar a conformarse por un máximo de 10 microestructuras, de las cuales la capa nacarada y la capa prismática son las más comunes. Tanto la capa prismática

como la nacarada se encuentran formadas por distintos polimorfos de CaCO_3 . La calcita y la aragonita son dos de los polimorfos más comunes del CaCO_3 , las cuales presentan la misma composición química pero, la disposición de los átomos en el espacio es diferente (Figura 4) (Marin & Luquet, 2004; Nudelman, 2015).

La capa prismática se encuentra formada por cristales alargados de calcita, la cual es el segundo polimorfo con mayor distribución entre los moluscos. La calcita cristaliza en el sistema romboédrico y es el más estable termodinámicamente a temperatura y presión ambiente. Esta capa se encarga de proporcionar resistencia a la penetración de la concha, debido a sus propiedades de fragilidad y dureza (Marin, *et al.*, 2012; Gower, 2013; Bahn, *et al.*, 2017). Debajo de la capa prismática se encuentra la capa nacarada, esta se conforma de diminutas tabletas de aragonita, el polimorfo con mayor distribución dentro de las conchas de los moluscos. La aragonita, cristaliza en el sistema ortorrómbico, y es mucho menos estable que la calcita. Sin embargo, es la capa más resistente de la concha al evitar la propagación de grietas, además de contar con una propiedad óptica iridiscente (Figura 4) (Evans, 2008; Marin *et al.*, 2012; Bahn *et al.*, 2017).

Los moluscos también son capaces de manipular la vaterita, otro de los seis polimorfos del CaCO_3 , bajo circunstancias excepcionales como durante la deformación de la concha (Wilt, 2005). Hasta la fecha no se ha descrito que ninguno de los tres polimorfos restantes del CaCO_3 (protodolomito, monohidrocalcita o ikaita) sea utilizado por estos organismos para fabricar su concha (Marin *et al.*, 2007).

Por otro lado, durante los años 60 'del siglo pasado, se descubrió y demostró la existencia de una masa fundida carente de orden con alta concentración y poco solvente llamada carbonato de calcio amorfo (CCA) (Addadi, Raz, & Weiner, 2003). Dicha masa es isotrópica bajo la luz polarizada, no difracta los Rayos X y contiene cantidades considerables de Mg^{2+} . Recientemente se ha propuesto que el CCA podría

funcionar como una fase precursora transitoria previa a la formación de los cristales de calcita, aragonita o vaterita. Así mismo, se ha propuesto que podría tener un papel mucho más amplio en los procesos de biomineralización de lo que se conoce hasta la fecha (Addadi *et al.*, 2003; Weiner & Addadi, 2011).

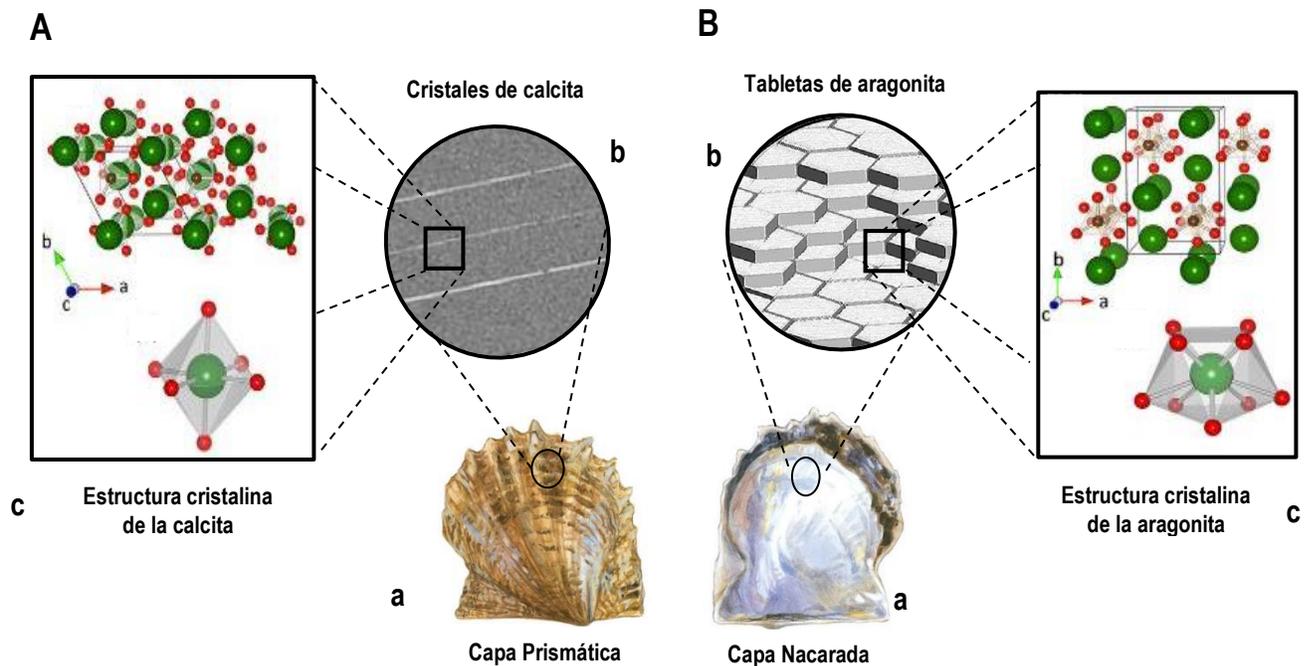


Figura 4. Esquema de la morfología y estructura de las capas de la concha de los moluscos. A) Capa prismática. **a)** Se muestra la vista macroscópica de la capa prismática de la valva del molusco *P. fucata*. **b)** Representación esquemática de los cristales de calcita que conforman la capa prismática. **c)** Estructura cristalina de la calcita. **B)** Capa nacarada. **a)** Vista macroscópica de la capa nacarada del molusco *P. fucata*. **b)** Representación esquemática de las tabletas de aragonita de la capa nacarada. **c)** Estructuras cristalinas de la aragonita (Adaptado de Evans, 2008; Soldati *et al.*, 2016; Lemanis & Zlotnikov, 2017).

La formación de la concha en los moluscos es regulada y controlada por un epitelio altamente especializado llamado manto, que se localiza dentro de la concha del organismo. El borde del manto es la zona más activa durante la deposición de la concha, ya que sus células son las encargadas de la secreción de los componentes necesarios para la formación de la concha al espacio extrapallial (Figura 5). El manto,

también se encarga de la formación del *pericostratum*. Este tejido tiene como función aislar al molusco del ambiente, al crear un compartimiento aislado donde se depositaran los minerales que conformarán la concha (Figura 5) (Estroff *et al.*, 2008; Bahn *et al.*, 2017). Se ha descrito que los iones necesarios para el proceso de biomineralización pueden ser extraídos directamente del agua de mar o de los alimentos que consumen. (Addadi & Weiner, 2014).

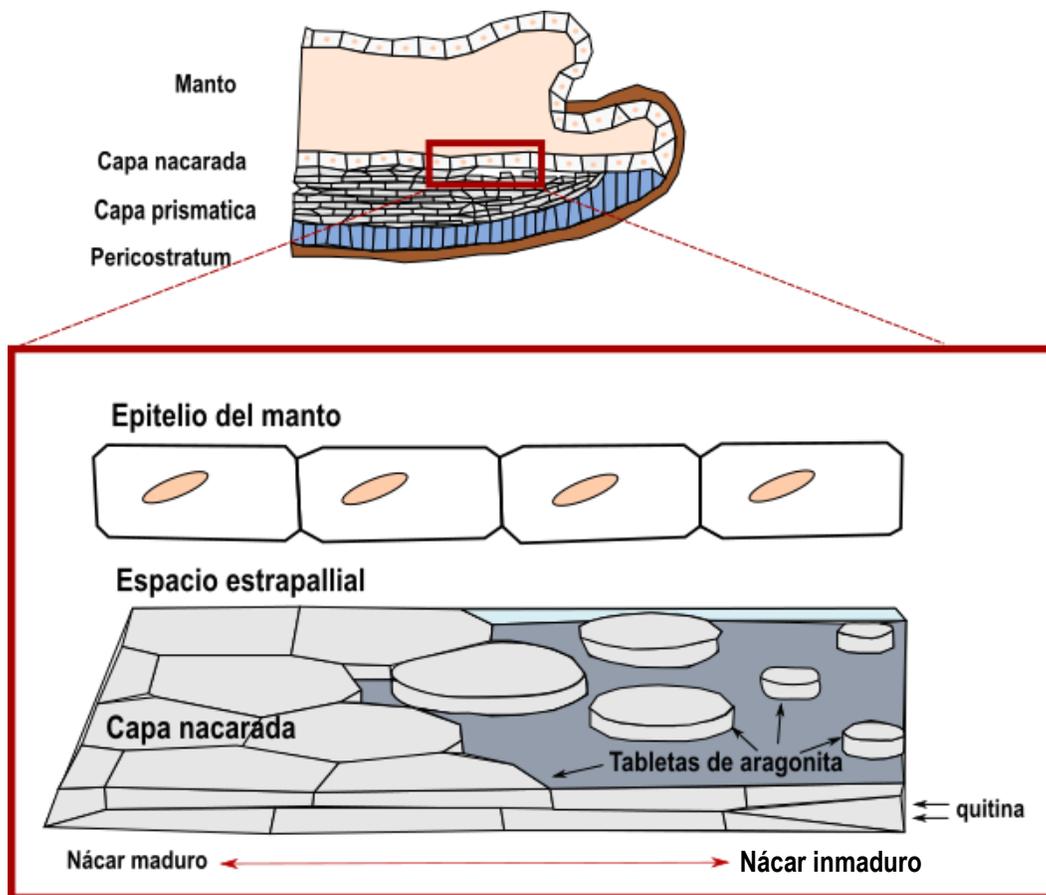


Figura 5. Esquema de la anatomía de la concha de un bivalvo. A) La concha se encuentra compuesta por el *pericostratum*, la capa prismática y la capa nacarada. En el esquema también se puede observar el espacio extrapallial ubicado entre el tejido mineralizado y el manto del bivalvo. **B)** En el esquema se muestra una ampliación de la capa nacarada de la concha del organismo, así como el proceso a través del que se exportan los componentes orgánicos e inorgánicos producidos por el manto en vesículas intracelulares a la zona donde comenzara la nucleación de las tabletas de aragonita. El crecimiento comenzara en el sustrato preformado de

β -quitina con ayuda de las macromoléculas que conforman la matriz orgánica, conduciendo así a la maduración del nácar. (Adaptado de Bahn *et al.*, 2017).

Se ha sugerido que las células del manto inicialmente producen CCA en vesículas intracelulares que concentran los minerales, para luego transportarlos al sitio de deposición del mineral, donde ocurrirá la cristalización de la aragonita formando la capa más interna de la concha, la capa nacarada (Suzuki *et al.*, 2009; Bahn *et al.*, 2017).

Hasta el momento, los mecanismos moleculares y bioquímicos de la mineralización incluida la estabilización y desestabilización de la fase mineral desordenada y el desarrollo del mineral para el producto final altamente organizado, no se conocen bien (Bahn *et al.*, 2017). Debido a sus propiedades mecánicas y su valor comercial, el nácar es la microestructura de la concha de los moluscos más estudiada a nivel fisiológico, estructural y molecular (Montagnani *et al.*, 2011; Marin *et al.*, 2012; Bahn *et al.*, 2017).

Nácar

El nácar es una microestructura laminar, que consiste en tabletas poligonales de aragonita de 5-15 μm de diámetro dispuestas en láminas paralelas continuas de 0.5 μm de espesor (Figura 6). Las tabletas pueden ser rectangulares, hexagonales o redondeadas, variando entre las tres clases de moluscos en donde se encuentren (Figura 6). Una de las diferencias más notables es que en los bivalvos, las tabletas de nácar toman forma de una estructura escalonada, a modo de pared de ladrillos; mientras que en gasterópodos y en algunos cefalópodos se pueden apilar miles de

tabletas formando estructuras similares a monedas apiladas verticalmente (Figura 6). (Marin *et al.*, 2007; Checa, Cartwright, & Willinger, 2011; Marin, 2012; Nudelman, 2015). Recientemente se ha observado que cada una de las tabletas de nácar se encuentra constituida por nanotabletas o nanobloques, es decir, cada tableta representa un arreglo mineral con una estructura jerárquica (Marin *et al.*, 2012).

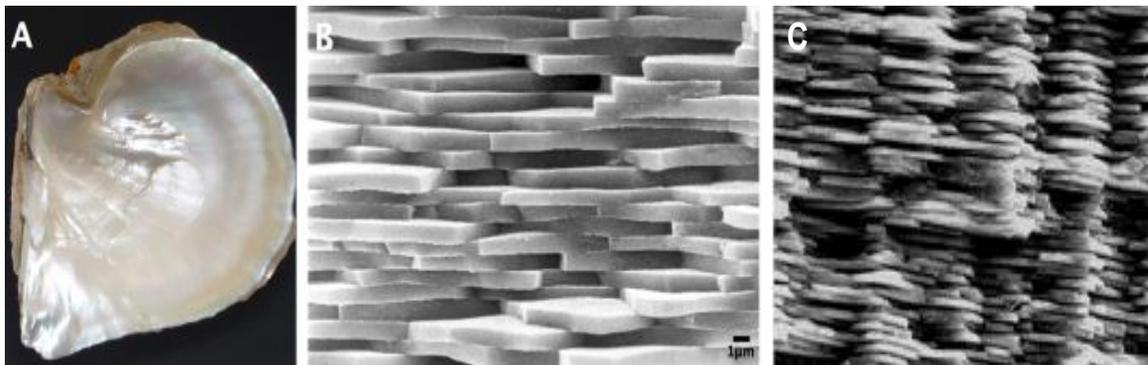


Figura 6. Estructura nacarada de la concha de los moluscos. (A) Capa nacarada o madreperla contenida dentro de la concha del género *Pinctada*. **(B)** Imagen obtenida por SEM, donde, se muestra la estructura característica del nácar en forma de pared de ladrillo observada en algunos bivalvos. **(C)** Imagen obtenida por SEM donde se observa la estructura característica del crecimiento de nácar en forma de monedas apiladas presente en gasterópodos. (Adaptado de Marin *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2016).

Hasta la fecha el mecanismo de formación del nácar es poco conocido, así que se han propuesto dos modelos diferentes para explicar la nucleación y el crecimiento de las tabletas de madreperla (Kono, *et al.*, 2000). El primero, es conocido como mecanismo heteroxipital, donde la nucleación es inducida a partir de un centro de nucleación orgánico. El otro propone que la formación de las tabletas de nácar se da a partir de poros o puentes (Checa *et al.*, 2011; Nudelman, 2015). Actualmente, el mecanismo de crecimiento por puentes es el mayormente aceptado, ya que se han observado poros de aproximadamente 5-50 nm, que podrían permitir el paso del mineral hacia la capa en crecimiento. Ambos mecanismos podrían participar durante

la formación del nácar, los puentes minerales podrían ser responsables de la formación de las tabletas de nácar y los sitios de nucleación en el comienzo del crecimiento de la tableta (Marin *et al.*, 2007; Checa *et al.*, 2011; Marin *et al.*, 2012; Nudelman, 2015).

En el año 2006 Addadi y colaboradores propusieron un mecanismo que, aunque es meramente especulativo describe la formación de las tabletas de nácar ocurre en el orden:

1. Ensamblaje de la matriz: La quitina se organiza en capas planas sucesivas y el espacio entre cada capa se llena con el gel rico en proteínas, a partir del que crecerá la tableta de nácar.
2. Formación de los minerales primarios: Formación del CCA, se piensa que estos minerales son transportados hasta el sitio de nucleación a través de vesículas.
3. Nucleación de las tabletas de nácar: Los nanoelementos organizan desde el centro formando las tabletas.
4. Crecimiento: Cada tableta crece verticalmente hasta llegar a la siguiente capa de quitina para posteriormente expandirse lateralmente dentro de una matriz insoluble.

Se ha descrito en la literatura que el proceso de formación de la concha de los moluscos debe ocurrir bajo ciertas condiciones. Una de estas es que, el proceso se da en un sistema aislado del ambiente. Así mismo, los minerales obtenidos exhiben formas diferentes de sus contrapartes inorgánicas. Además, se requiere de una maquinaria celular especializada para su formación, ya que la concha no es un subproducto del metabolismo del organismo. Finalmente, las etapas del mecanismo antes propuesto se encuentran mediadas por una maquinaria macromolecular especial conocida como matriz orgánica (Marin *et al.*, 2007; Marin *et al.*, 2013).

La matriz orgánica de la capa de nácar

La capa nacarada de la concha de los moluscos está formada por una pequeña fracción orgánica (de un 1-5%), que tiene varias funciones relacionadas con el proceso de biomineralización (Marie *et al.*, 2015; Marie *et al.*, 2017). Dicha capa se compone de macromoléculas orgánicas como lípidos, carbohidratos y proteínas (Figura 7) (Marin *et al.*, 2012).

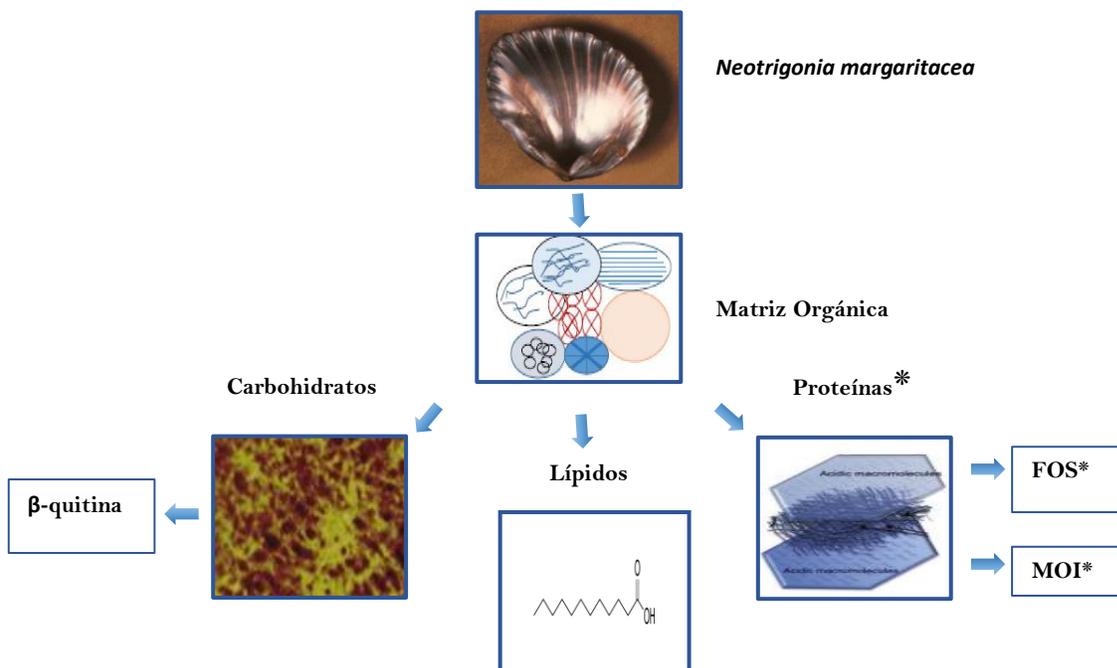


Figura 7. Componentes de la matriz orgánica de la capa nacarada de los bivalvos. En la figura se muestran de forma general las macromoléculas que conforman la matriz orgánica (MO*) de la capa nacarada. Como se puede observar las proteínas se pueden clasificar en una fracción orgánica soluble (FOS*) y en una fracción orgánica insoluble (FOI*), de acuerdo con su solubilidad en EDTA, dicha clasificación fue propuesta en 1963 por Hare, pero hasta el momento se desconocen el fundamento bioquímico de dicha clasificación (Adaptado de Hare, 1963; Rao & Cölfen, 2015).

Las proteínas representan el grupo mayoritario dentro de la matriz orgánica y se han clasificado en dos grupos según su solubilidad en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético (Hare, 1963). La matriz orgánica proteica de la capa nacarada soluble se conforma por una mezcla de proteínas, que presentan uniones covalentes a polisacáridos mediante residuos de serina, en su mayoría enriquecidas de residuos de aminoácidos ácidos o no polares. Se ha considerado que estas proteínas participan en la nucleación, crecimiento e inhibición de los cristales de aragonita. Lo anterior, debido a su localización dentro de los cristales de aragonita, por lo que, se les conoce también como proteínas intracristalinas (Miyashita *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011). Por otro lado, la fracción de la capa nacarada insoluble en EDTA, está formada de proteínas fibrosas ricas en aminoácidos no polares. A estas proteínas, se les atribuye la función de andamio y de proporcionar estructura a los cristales de carbonato de calcio conforme se depositan en la capa nacarada (Weiner, 1979; Zhang & Zhang, 2006). Su tendencia a ubicarse en la periferia de los cristales de aragonita apoya el que se hayan reconocido como proteínas estructurales (Marin & Luquet, 2008; Marie *et al.*, 2011; Seto *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las proteínas juegan un papel importante durante la orientación, crecimiento y nucleación de los cristales de aragonita, por lo que hasta el momento han llamado la atención de numerosos grupos de investigación. Sin embargo, aún nos encontramos en las etapas iniciales de la comprensión de su comportamiento durante el proceso de biomineralización (Zhang *et al.*, 2006; Montagnani *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2013; Marie *et al.*, 2015; Nudelman, 2015).

Los carbohidratos son la segunda clase de biomoléculas más abundantes en la capa nacarada. Recientemente se les ha clasificado en dos grupos: polímeros solubles y quitina (Estroff *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2008). Los polímeros solubles se encuentran en su mayoría unidos covalentemente a las proteínas, formando glicoproteínas o

peptidoglicanos y se les ha implicado en funciones de comunicación celular (Marin & Luquet, 2008). La quitina es el polímero de carbohidrato mejor caracterizado en la concha de los moluscos. Tiene como función ayudar en la formación de la arquitectura 3D de la concha, volviéndola esencial durante la formación de las tabletas de nácar (Marin & Luquet, 2008; Suzuki *et al.*, 2009; Marin, *et al.*, 2012). Finalmente, a los lípidos han sido las macromoléculas menos estudiadas de la capa nacarada, y su papel en la biomineralización aún se desconoce. Recientemente se les han encontrado unidos a polisacáridos y proteínas, o como pigmentos, formando patrones en la superficie de las conchas (Arivalagan *et al.*, 2017; Marin, *et al.*, 2012).

Características estructurales de las proteínas de biomineralización

Desde la descripción de la secuencia de la primera proteína de biomineralización en 1996 (Miyamoto *et al.*, 1996), hasta la fecha con el desarrollo de la transcriptómica, proteómica y secretómica, numerosas proteínas han sido caracterizadas. Así que hasta el momento, se han identificado familias de proteínas comunes dentro de las capas nacaradas y familias de proteínas únicas presentes entre distintas clases de moluscos (Figura 8) (Marie *et al.*, 2009; Arivalagan *et al.*, 2017). Con ayuda de técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear (RMN) (Brown *et al.*, 2014), dicroísmo circular (DC) (Ponce & Evans, 2011; Poznar *et al.*, 2017) y dispersión dinámica de luz (*DLS* por sus siglas en inglés) y bioquímicas como cromatografía, se

ha revelado que las proteínas de biomineralización cuentan con características estructurales pocas veces vistas en la naturaleza (Figura 9) (Evans, 2012).

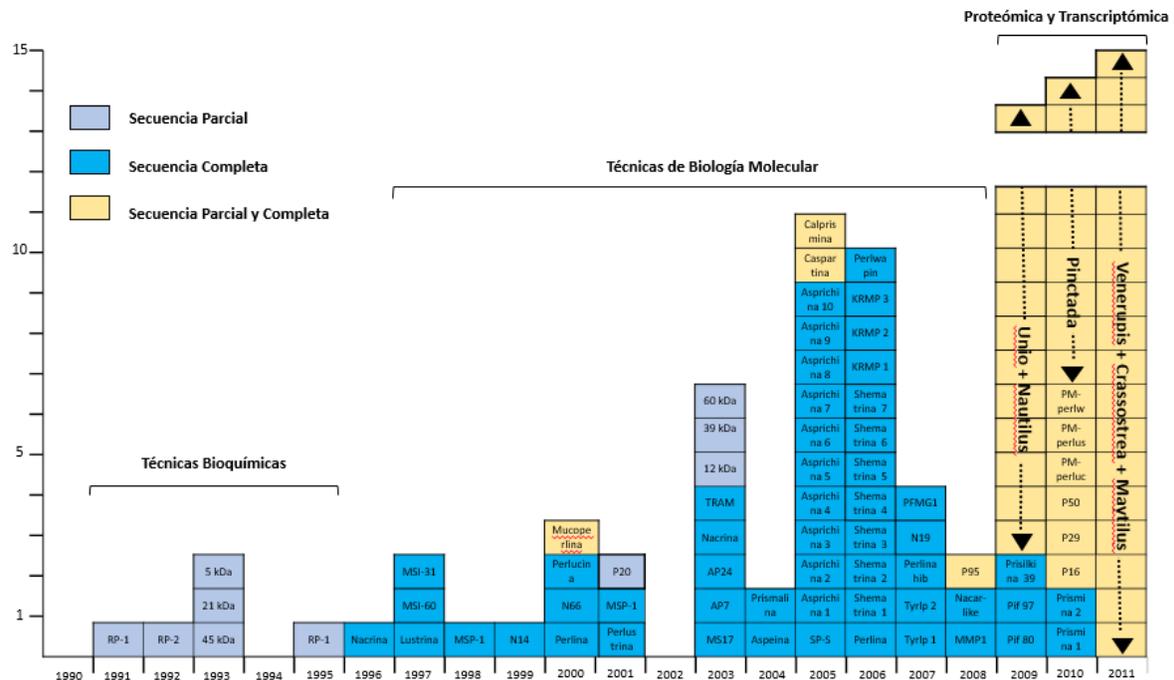


Figura 8. Proteínas asociadas a la biomineralización identificadas en conchas de moluscos en función de su descubrimiento a lo largo del tiempo. En el gráfico se observan las proteínas identificadas en la matriz orgánica pertenecientes a diversas conchas de diversos moluscos por año a partir del año 1991 hasta el año 2011 (Adaptado Marin *et al.*, 2013).

Una de las características más importantes de las proteínas asociadas a la biomineralización es su carga neta negativa, ya que se les ha definido como proteínas ácidas al tener pI (punto isoeléctrico) bajo, de entre 4 o 4.5. Esto, se debe a la elevada cantidad de residuos de ácido aspártico y ácido glutámico en su secuencia de aminoácidos. Además, estas proteínas tienen diversas modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, fosforilación, sulfatación y carboxilación del ácido glutámico, adicionando aún más cargas negativas a la proteína (Marin & Luquet, 2008; Marin *et al.*, 2012;).

En la literatura, también se ha informado sobre la posible falta de estructura secundaria en las proteínas de biomineralización. Por lo que se les ha aceptado como proteínas intrínsecamente desordenadas (PIDs). Ya que carecen de las típicas estructuras secundarias (α -hélice, hoja- β), y en su lugar presentan de forma parcial o total la estructura conocida como espiral aleatoria. Lo anterior se debe a la presencia de aminoácidos cargados o nopolares como la Gln, Ser, Pro, Glu, Lys Asp y Gly. Así mismo, al carecer de residuos hidrofóbicos como Phe, Leu e Ile, que evita la formación de un núcleo hidrofóbico volviéndolas proteínas lábiles y flexibles (Kalmar *et al.*, 2012; Boskey & Villarreal-Ramirez, 2016). Análisis bioinformáticos han mostrado que en la mayoría de estas proteínas, presenta repeticiones en tándem de los residuos Gly y Asn o de la repetición Asp-Ser-Ser, donde se piensa que la Ser podría funcionar como posible sitio de fosforilación que en consecuencia podría provocar un cambio en la estructura secundaria de estas proteínas (Boskey & Villarreal-Ramirez, 2016; Evans, 2008, 2012; Huang *et al.*, 2014; Kalmar *et al.*, 2012; Poznar *et al.*, 2017). Algo que llama la atención, es que los segmentos desordenados con los que cuentan estas proteínas podrían ser sometidos a un proceso de auto ensamblaje. Por lo que se ha considerado que segmentos podrían facilitar las interacciones intermoleculares promoviendo la formación de complejos supramacromoleculares. (Evans, 2012; Kalmar *et al.*, 2012; Boskey & Villarreal-Ramirez, 2016).

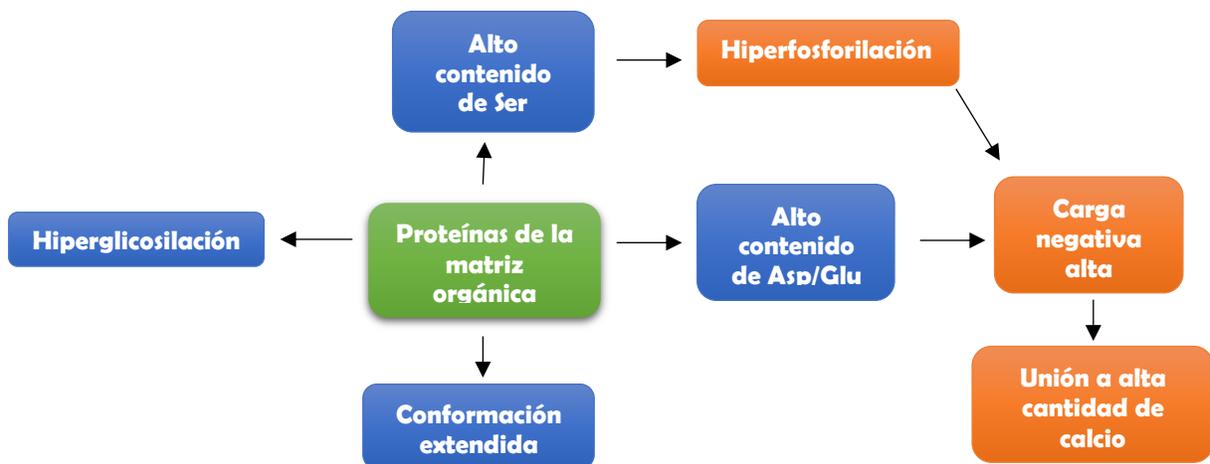


Figura 9. Características de las proteínas implicadas en los procesos de biomineralización en moluscos. En el esquema se resumen las características de las proteínas de la matriz de los moluscos (Adaptado de Kalmar *et al.*, 2012).

Recientemente se ha sugerido que la conformación extendida de esas proteínas podría facilitar su interacción intramolecular permitiéndoles estar en contacto con más de un elemento y/o superficie, además de permitirles cambiar rápidamente su estructura y facilitar el acceso a las modificaciones postraduccionales (Boskey & Villarreal-Ramirez, 2016; Kocot *et al.*, 2016). De hecho, se ha observado la ocurrencia de un mayor número de modificaciones postraduccionales en las regiones desordenadas de las proteínas. Esto, podría estar asociado a un mecanismo de regulación, modulando el proceso de la biomineralización (Evans, 2012; Kalmar *et al.*, 2012; Boskey & Villarreal-Ramirez, 2016).

Antecedentes

Desde la antigüedad las perlas y el nácar se han visto implicados en el comercio por su rareza y belleza. Por esta razón en la actualidad hay gran interés en tratar de sintetizarlas *in vitro* haciendo uso de la bioquímica y la ingeniería genética. Pese a que muchos estudios se han centrado en identificar los factores orgánicos involucrados en su biogénesis, no se ha logrado entender del todo el mecanismo molecular de la formación de las perlas y el nácar. Desde hace aproximadamente dos décadas la bioquímica y la biología molecular han dado acceso a la composición de la compleja matriz orgánica, la cual consta de un gran número de proteínas (Zhang & Zhang, 2006; Liu *et al.*, 2011). Debido a su alto valor comercial el molusco *Pinctada fucata* ha sido una de las especies mejor estudiadas en cuanto a los procesos de biomineralización.

Pinctada fucata y las proteínas que conforman su capa nacarada

Dentro del phylum *Mollusca*, la familia *Pteriidae* es una de las más estudiadas. En ella se encuentran clasificadas especies de bivalvos marinos como ostras o madreperlas, las cuales tienen como atributo principal la formación de nácar y perlas (Monteforte & Cariño, 2013). La especie *P. fucata*, conocida también como “madre perla japonesa”, es un modelo importante en el cultivo de perlas y obtención de nácar (Figura 10). Es un organismo filtrador y hermafrodita, originario de aguas poco profundas de la región del Indo-Pacífico. Debido a su importancia económica, se han aislado y caracterizado hasta la fecha nueve proteínas asociadas al proceso

de biomineralización, todas contenidas en la matriz orgánica de su capa nacarada (Zhang & Zhang, 2006; Liu *et al.*, 2011).



Figura 10. *Pinctada fucata*. *P. fucata*, conocida también como Ostra perlera japonesa o Madre perla (Adaptado de Montagnani *et al.*, 2011).

Una de las proteínas más estudiadas dentro de las obtenidas a partir de la capa nacarada de *P. fucata* es la nacrina. Esta proteína cuenta con actividad anhidrasa carbónica, tiene un peso molecular de 60 kDa y está compuesta de una secuencia rica en residuos de ácido aspártico. Se sabe también que puede estar sulfatada, fosforilada y glicosilada, además de presentar sitios de unión a calcio (Miyamoto *et al.*, 1996). Otra proteína de la capa nacarada es la P10, tiene un peso molecular de 10 kDa y está enriquecida con residuos de Asp, Thr y Gly. Algunos autores han planteado que juega un rol importante en el proceso de la formación del nácar, ya que podría controlar el proceso de la formación de cristales de aragonita (Zhang *et al.*, 2006). Esta proteína también se ha encontrado en mamíferos, donde podría participar en el proceso de diferenciación de células involucradas en la biomineralización, como los osteoclastos (Zhang & Zhang, 2006). Posteriormente se identificó la proteína N19 a partir de la fracción insoluble en EDTA de la capa de

nácar. N19 tiene un peso molecular de 19 kDa y se cree que participa retrasando el proceso de nucleación de los cristales de carbonato de calcio durante la formación del nácar (Yano *et al* 2007; Liu *et al.*, 2011). Se han encontrado involucradas en el proceso de biomineralización del nácar las proteínas MS160 y MS17, con una masa molecular de 60 kDa y 17 kDa, respectivamente. Ninguna de las dos presenta modificaciones postranscripcionales y sus secuencias son ricas en residuos de Ala y Gly. Actualmente, se propone que están involucradas en la formación del andamio que dará estructura a las capas de nácar. Además, MS17 podría participar en la precipitación y el inicio de la nucleación de los cristales de aragonita (Zhang *et al.*, 2003; Yano *et al.*, 2007; Michio *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha descrito la familia de las proteínas Pif, compuesta por dos miembros Pif 80 y Pif 97, nombrados a partir de sus masas moleculares de 80 kDa y 97 kDa, respectivamente. Sus secuencias están enriquecidas con residuos de Asp, Glu, Lys, Arg y Cys. Este último residuo les permite formar puentes disulfuro brindándoles una estructura muy estable. Su posible función radica en inducir la formación de cristales de aragonita, por lo que en recientes años se les ha considerado como componentes esenciales de la matriz orgánica (Michio *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011).

En el año 1999, se reportó a la familia de las proteínas n16, conocida también como una familia de proteínas promotoras de aragonita. Estas proteínas han sido purificadas a partir de la fracción insoluble de la capa de nácar de las conchas de la familia *Pteriidae*. Se cree, que contribuyen a la mineralización del nácar y hasta ahora no muestran homología definitiva con otras proteínas, tienen una masa molecular de aproximadamente 16 kDa (Samata *et al.*, 1999; C. Zhang & Zhang, 2006; Rutter *et al.*, 2015). Dentro de esta familia se ha incluido a la perlina/n16, de la cual se conocen 23 formas polimórficas. Todas ellas se transcriben y expresan activamente en la ostra perlera. Asimismo, se han encontrado homólogos de perlina/n16 en moluscos de esta familia de bivalvos: la proteína N14 en *Pinctada máxima* (Kono *et al.*, 2000), y la

proteína *Pmarg pearl* en *Pinctada margaritifera* (Montagnani *et al.*, 2011). Por tanto, se le ha reconocido como un elemento esencial durante la construcción de la capa de nácar en los moluscos de la familia *Pteriidae* (Figura 11) (Ponce & Evans, 2011; Nogawa *et al.*, 2012).

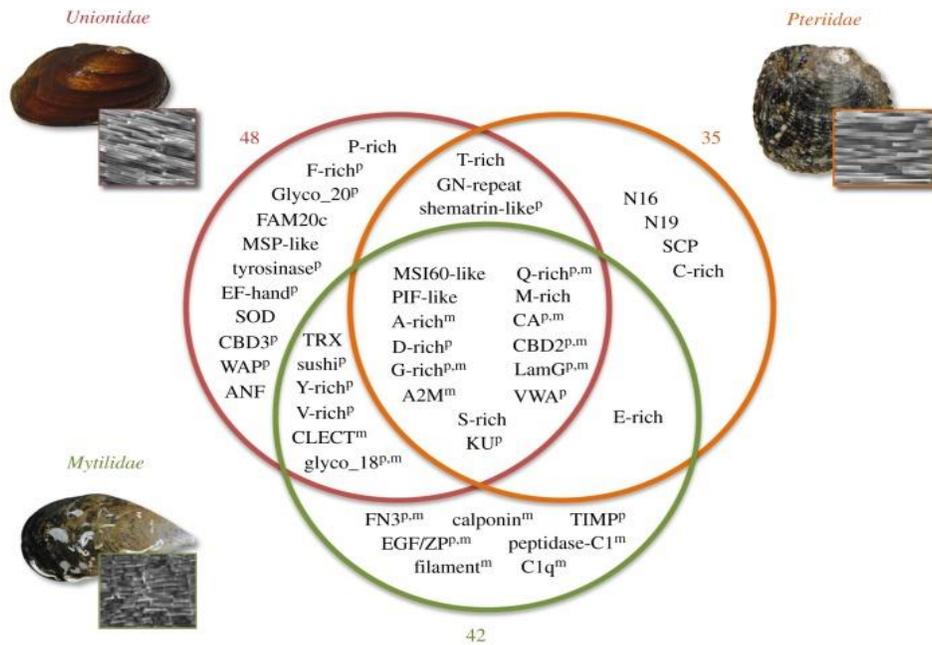


Figura 11. Proteínas encontradas en la capa nacarada de bivalvos modelo en biomineralización. En total se han encontrado aproximadamente 48 proteínas en las matrices orgánicas en las familias de bivalvos *Unionoidae*, *Pteriidae* y *Mytilidae*. Las proteínas indicadas con un exponente p, también se han encontrado en la capa prismática (Adaptado Marie *et al.*, 2017).

Perlina

En el año 2000, Miyashita y colaboradores dieron a conocer a la perlina/n16, una proteína insoluble en EDTA extraída de la matriz orgánica de la capa nacarada de *P. fucata* con 0.3 M de EDTA y 8 M de urea (Miyashita *et al.*, 2000). Es una proteína

También se ha trabajado con una variante de n16N, denominada n16Nn, que se caracteriza por el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu por Asn y Gln, respectivamente. Dicha variante tiene dificultad en la selectividad aragonítica del péptido, confirmando que el carácter ácido del Asp y el Glu debe jugar un papel activo en la asociación orgánico-mineral. (Keene *et al.*, 2010; Rutter *et al.*, 2015).

Por todo lo anterior se han sugerido dos posibles funciones principales de la perlina: (I) brindar estructura en las capas de nácar y favorecer la cristalización de carbonato de calcio en forma de aragonita, y (II) actuar como un ancla entre las proteínas ácidas y las proteínas insolubles de la matriz orgánica (Miyashita *et al.*, 2000). Sin embargo, los mecanismos moleculares mediante los cuales realiza estas funciones, sobre todo durante la formación del nácar, aún están bajo investigación (Miyashita *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011).

En nuestro laboratorio previamente se ha trabajado con la perlina de *Pinctada mazatlanica*. Esta se obtuvo directamente de la concha del bivalvo con un protocolo basado en una mezcla de ácidos ascórbico, cítrico y cafeico. Con esta perlina se realizaron análisis de DLS en presencia y ausencia de Na₂CO₃, donde observó que el Na₂CO₃ era capaz de influir el comportamiento de oligomerización de la proteína en solución. Se debe tener en cuenta que esta proteína se encontraba glicosilada ya que fue obtenida del organismo modelo. Sin embargo, debido al bajo rendimiento en la obtención de la proteína no se pudieron realizar otros estudios (Cortés 2016). Por lo anterior y con el fin de obtener una mayor cantidad de proteína, en el laboratorio se planteó producir de manera recombinante una de las isoformas de la perlina de *P. fucata* reportada en UNIPROT con el código de identificación MA165_PINFU, a la que a partir de este momento llamaremos *rperlina*_{pf}.

Hipótesis

Los iones carbonato (CO_3^{-2}), calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}) influyen en la oligomerización de la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$.

Objetivo General

- Evaluar el efecto de la interacción de la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ en presencia de iones CO_3^{-2} , Ca^{+2} y Mg^{+2} .

Objetivos Específicos

- Expresar y purificar a la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$.
- Estudiar el efecto de los iones CO_3^{-2} , Ca^{+2} y Mg^{+2} en la oligomerización de la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ por dispersión dinámica de luz y fluorescencia.
- Realizar estudios de cristalización, difracción, y en su caso, de determinación estructural de la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$.

Metodología

Expresión heteróloga de la $r_{perlina_{pf}}$

El gen que codifica para la $r_{perlina_{pf}}$ fue sintetizado y clonado en el vector pJexpress 414 (por la compañía DNA 2.0). Una vez transformadas las bacterias fueron sembradas en placas de petri con medio LB (Luria-Bertani), complementado con 100 $\mu\text{g/L}$ de ampicilina, y se incubaron a 37°C durante 12 h. Se seleccionó una de las colonias para inocular un pre-cultivo de 50 mL de medio LB complementado con 100 $\mu\text{g/L}$ de ampicilina a 37°C y 200 rpm por 12 h, que sirvió para inocular un cultivo de un litro de medio LB. Una vez que el medio de cultivo alcanzó una $DO_{600\text{nm}}$ de entre 0.5 y 0.6 las células fueron inducidas con 1 mM de concentración final de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido), se mantuvo la agitación y temperatura iniciales. Después de 5 horas las bacterias se cosecharon por centrifugación a 13,000 rpm durante 20 min a 10°C.

Solubilización de la $r_{perlina_{pf}}$

La pastilla celular obtenida a partir de un litro de cultivo se re-suspendió en 30 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 8, cloruro de sodio 50 mM y PMSF 1 mM). Las células se lisaron por sonicación sobre hielo durante 20 min con ciclos de 40s con descansos de 20 s a 40% de amplitud. La muestra se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. La parte insoluble fue tratada con un amortiguador de solubilización (Tris-HCl 10 mM, pH 8, cloruro de sodio 150 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, imidazol 50 mM y sarcosil 5%) con un segundo paso de sonicación sobre hielo durante 20 min con ciclos de 40s con descansos de 20s a 40% de amplitud. Inmediatamente después del paso de sonicación la muestra se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó la fracción soluble.

Purificación de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$

La $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ se purificó en dos etapas, la primera de ellas consistió en una cromatografía de afinidad a níquel con una columna His Trap™ (GE-Healthcare) de 5 mL. Esta cromatografía se desarrolló en los siguientes pasos: (I) equilibración de la columna con el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, (II) aplicación de la muestra a la columna, (III) lavado con 15 mL equivalentes a tres volúmenes de columna más del amortiguador con el que la columna había sido equilibrada, y (IV) elución de la proteína con un gradiente lineal de 0 a 100% del amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, imidazol 500 mM. Se colectaron fracciones de 3 mL.

Las fracciones que contenían a la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ fueron dializadas contra el amortiguador Tris-HCl 20 mM, DTT 1 mM en presencia de PSP (PreScission protease de GE) durante 16 horas a 4°C para eliminar la etiqueta de histidinas de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$. Posteriormente la proteína fue concentrada por centrifugación con filtros de Amicon Ultracel-10K a 4°C.

Para el segundo paso de purificación se empleó una columna de exclusión molecular (Superdex 75 HR de GE) previamente equilibrada con el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, sarcosil 1%, NaCl 10 mM y se colectaron fracciones de 2 mL. Cada una de las fracciones, así como los pasos anteriores de purificación fueron comprobados a través de un SDS-PAGE al 15%. Todos los geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

Análisis de Dispersión Dinámica de Luz (DLS) de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$

Para realizar los ensayos de DLS se utilizó el equipo Zetasizer Nano Z (ángulo de dispersión de 173°) a una temperatura de 18°C por triplicado. La $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ se encontraba a una concentración de 1mg/mL. Previo al análisis de DLS cada una de las muestras fue filtrada con filtros MILLEX VV de 0.1 μm de Millipore y centrifugada a 15,000 rpm por 10 min. En la tabla 1 se pueden encontrar los distintos

amortiguadores que se probaron para realizar las mediciones de DLS. Finalmente se seleccionó al amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, sarcosil 1%, para realizar las mediciones de DLS que se reportan en esta tesis.

Análisis de Fluorescencia de la rperlina_{pf}

La concentración de la rperlina_{pf} utilizada fue de 1 mg/mL en un mL para cada muestra. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro F-4500 FL (HITACHI), con una celda de 1 cm de longitud de camino, una longitud de onda de excitación de 280 nm, y una longitud de onda de emisión entre 295 y 500 nm.

Cristalización y optimización de la cristalización de la rperlina_{pf}.

Las pruebas de cristalización se realizaron utilizando el método de microbatch. Se emplearon 10 diferentes kits de screening de “Hampton Research” (Crystal Screen 1 y 2, Index 1 y 2, Crystal Screen Lite, Membfac, Natrix, Crystal Screen Cryo, PEG/ Ion y Quick Screen) y 4 de la marca “Jena Bioscience” (Wizard 1, 2, 3 y 4). Para estas pruebas se utilizó tanto la rperlina_{pf} purificada como en presencia de distintas sales (carbonato de sodio 100 mM y cloruro de calcio 10 mM). Todas las placas fueron incubadas a 4 y 18°C.

A partir de las condiciones de cristalización en donde se observaron cristales se realizó una optimización y escalado. Para ello se diseñaron diferentes matrices, donde se variaron las concentraciones del agente precipitante, la concentración de la proteína y el método de cristalización: gota colgante, gota sentada y microbatch. En todos los casos se mantuvieron constantes los amortiguadores, las sales y la temperatura de incubación. También se utilizó el kit de aditivos y detergentes de la marca “Hampton Research” (Apéndice 2). Los cristales obtenidos fueron criopreservados, y almacenados en nitrógeno líquido.

Difracción de Rayos X de la *rperlina*_{pf}

Los cristales obtenidos fueron expuestos Rayos X, para obtener patrones de difracción y determinar su estructura cristalográfica. Los experimentos de difracción se realizaron en el sincrotrón de Stanford, SSRL (Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, por sus siglas en inglés) así como en el laboratorio de estructura de proteínas del LANEM, en el Instituto de Química de la UNAM.

Resultados y Discusión

Expresión heteróloga de la $r_{perlina_{pf}}$

Los ensayos de expresión se llevaron a cabo con las cepas MC1061, ER2566, BL21 (DE3) y con la *BL21-CodonPlus-RIL*. (Anexo 1). Sin embargo, la $r_{perlina_{pf}}$ expresada en células de *E. coli* ER2566 y a partir de una construcción generada en el vector Pjexpress 414 (DNA 2.0), fue la combinación con la cual se logró el mejor resultado. Este vector tiene como particularidad que cuenta con el promotor T7 y confiere resistencia a ampicilina (Figura 13). Mientras que la cepa de *E. coli* ER2566 contiene una copia cromosómica del gen de la ARN polimerasa T7 insertado en el gen LacZ, por lo que está bajo el control del promotor Lac. Se ha reportado que la cepa ER2566 de *E. coli*, se ha utilizado con el fin expresar proteínas que ha reportado problemas de solubilidad (Ding *et al.*, 2007) como la proteína SMAP-29 (Morassutti *et al.*, 2005), o la proteína YscC (Goodin *et al.*, 2005). Así como proteínas que cuentan con codones raros de algunas arqueas (Wu & Oppermann, 2003).

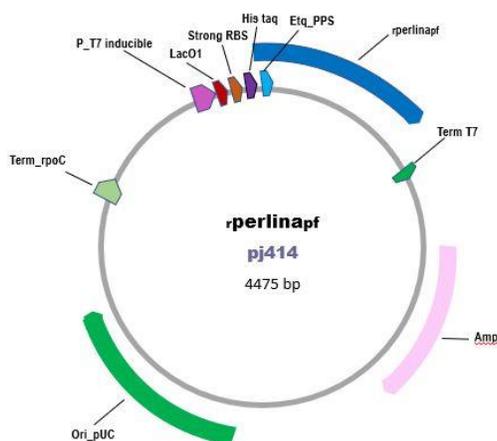


Figura 13. Mapa del vector Pj414. Vector de expresión Pj414. El vector cuenta con un gen marcador de ampicilina (rosa), el promotor del fago T7 (fucsia) en su extremo N-Terminal presenta una etiqueta de 10 histidinas (morado), el sitio de corte para la PSP (azul cielo) y el gen de la $r_{perlina_{pf}}$.

Después de seleccionar la cepa, las células fueron inducidas con IPTG y procesadas por medio de sonicación. El lisado obtenido fue centrifugado dando lugar a dos fracciones, las cuales fueron evaluadas por SDS-PAGE, donde se observó que la $r_{perlina_{pf}}$ se encontraba en la fracción insoluble (Figura 14).

Cinética de Crecimiento post inducción

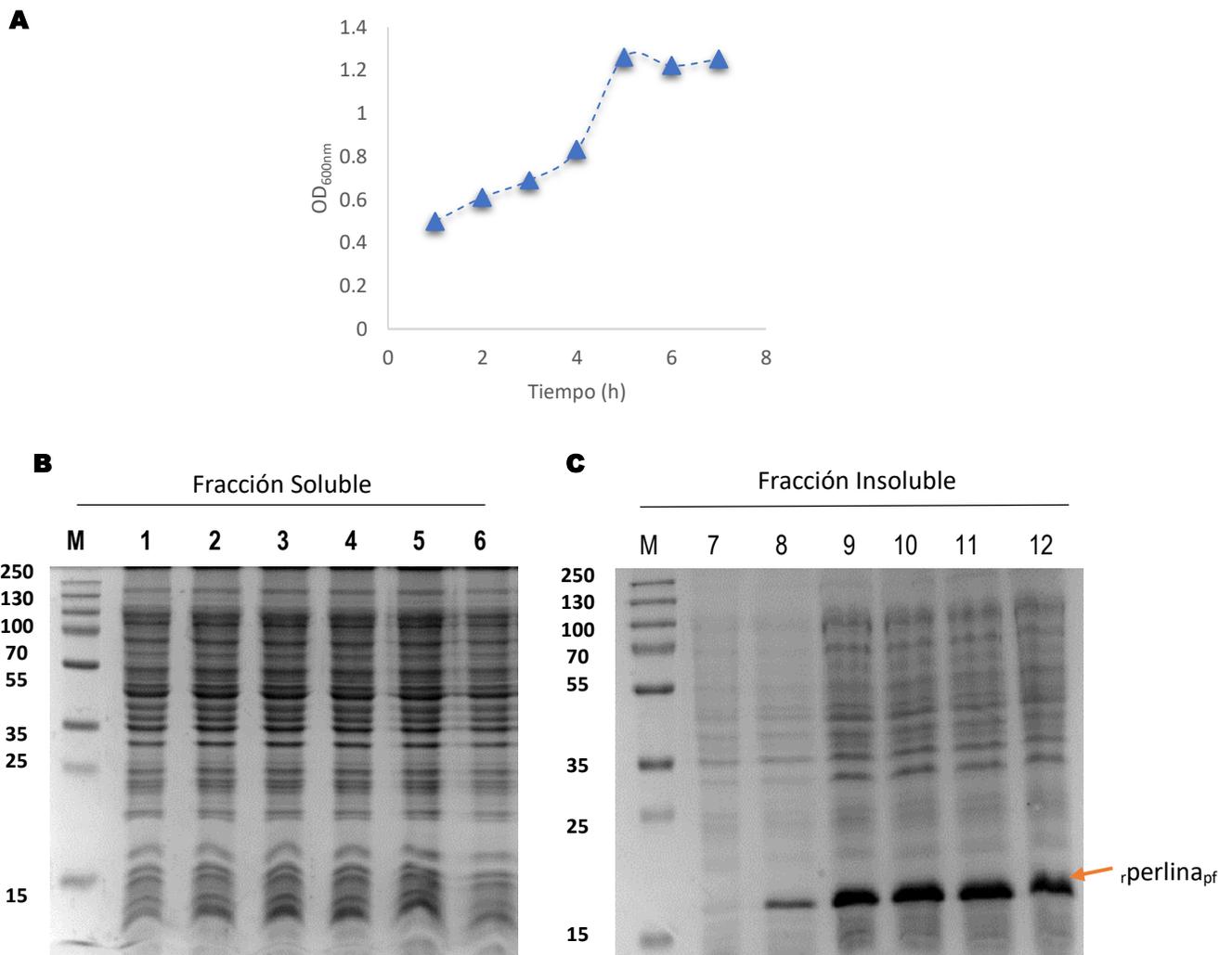


Figura 14. Proceso de expresión de la $r_{perlina_{pf}}$. (A) Cinética de crecimiento. En la gráfica se observa la cinética de crecimiento de *E. coli* ER2566 post-inducción OD =0.5 a 600 nM durante 5 h de expresión. (B) Electroforesis de SDS-PAGE al 15%, donde se muestran la inducción de la $r_{perlina_{pf}}$ en los extractos crudos obtenidos de la fracción soluble e insoluble del cultivo tomados cada hora, a

partir de la inducción con IPTG (Tiempo 0). (M) Marcador en kDa. En los carriles 1 al 6 se encuentra la fracción soluble desde el tiempo 0 hasta las 5 horas de inducción, donde no se observa la expresión de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$. En los carriles 7 al 12 se observa la fracción insoluble desde el tiempo 0 al tiempo 5, donde claramente se observa la expresión de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ a partir de la hora de inducción y se incrementa considerablemente en la segunda hora sin observarse incrementos notables de expresión en las horas posteriores.

Con el fin de comprobar la identidad de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$, se cortó la banda correspondiente a 18.5 kDa (masa molecular de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$) encontrada en el SDS-PAGE; la muestra correspondía a la fracción insoluble obtenida después de la lisis celular. Dicha banda fue enviada al Laboratorio Universitario de Proteómica del IBT (Instituto de Biotecnología) de la UNAM, para ser analizada por espectrometría de masas (Anexo 2). La muestra, es decir la banda cortada del SDS-PAGE mencionado arriba, fue digerida por la enzima tripsina, a partir de la cual se obtuvieron 8 fragmentos de la proteína (Figura 14B) (Anexo 3). Los fragmentos fueron comparados con las bases de datos O97048 (<http://www.uniprot.org/uniprot/O97048>) y la I2FK00 (<http://www.uniprot.org/uniprot/I2FK00>), cubriendo un 63.57% y un 53.7% respectivamente del extremo carboxilo, de la secuencia de la perlina de *P. fucata* reportada en UNIPROT (MA165_PINFU). Además de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en la banda analizada se encontraron otras proteínas de *E. coli* como las proteínas ribosomales 30 y 50S, ferretina y tiol peroxidasa (Anexo 2). El análisis de masas solamente nos permitió comprobar la identidad de secuencia de la proteína (Figura 15).

La $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ tiene una composición predominante de residuos de Gly (13.2%), Tyr (9.6%), Cys (8.1%) y Asn (7.4%) (Figura 14). Esta composición, es característica de las proteínas que conforman a la familia de proteínas promotoras de aragonita o n16 (Montagnani, Marie, & Marin, 2011). Se ha descrito que las proteínas de esta familia podrían formar cuatro enlaces disulfuro intramoleculares. Sin embargo, a pesar de que la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ cuenta con once cisteínas en su secuencia, hasta el momento este resultado no ha sido comprobado experimentalmente (Montagnani *et al.*, 2011).

Solubilización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$

Debido a que la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ se expresó en las células de *E. coli* en forma insoluble, se probaron distintas condiciones de temperatura, pH, y concentración de IPTG, durante el proceso de inducción con la finalidad de recuperar la proteína en forma soluble. También se probaron diversas condiciones de solubilización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$, que incluyeron diferentes pH durante la lisis celular, distintos protocolos de lisis y el uso de agentes caotrópicos como urea, con el fin de optimizar la expresión soluble de la proteína sin obtener resultados positivos (resultados no mostrados).

Actualmente se ha descrito, que al igual que la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ algunas proteínas asociadas a la biomineralización expresadas en *E. coli* han sido encontradas en la fracción insoluble. Como por ejemplo la proteína perlustrina (Weber *et al.*, 2012), pif97 (Bahn *et al.*, 2015), aspeína (Takeuchi *et al.*, 2008) y Pfy2 (Yan *et al.*, 2017), las cuales han tenido que ser solubilizadas con protocolos a base de altas concentraciones de urea. Incluso en trabajos recientes, se ha reportado que otras isoformas de la perlina han sido solubilizadas con tratamientos a base de agentes caotrópicos como la perlina reportada por Huang y colaboradores en el 2017 (Huang *et al.*, 2017) o la proteína n16 expresada y solubilizada por Xu y colaboradores a comienzos del año 2018 (Xu

et al., 2018). Pero a diferencia de los trabajos antes mencionados la *rperlina_{pf}* finalmente fue solubilizada al utilizar el amortiguador de solubilización que contiene Tris-HCl 20 mM, pH 8, cloruro de sodio 150 mM, PMSF 1 mM y sarcosil ([Sodium lauroryl sarcosinate](#)) 5% (Figura 16).

El sarcosil es un detergente aniónico ampliamente utilizado durante la producción y solubilización de proteínas recombinantes (Massiah *et al.*, 2016; Alsenaidy, 2018). Por lo que consideramos que la combinación de este detergente aniónico (5%) y el cloruro de sodio (150 mM) fue fundamental durante el proceso de solubilización. Debido a que durante las pruebas de solubilización se evaluó la cantidad de *rperlina_{pf}* soluble en función de la concentración de cloruro de sodio y sarcosil, llegando a la conclusión de que al aumentar el detergente y la fuerza iónica se obtenía una mayor cantidad de *rperlina_{pf}* soluble (resultados no mostrados). Es importante mencionar que este comportamiento solo se observa durante el proceso de solubilización, ya que después de dicho proceso la *rperlina_{pf}* no puede estar en presencia de concentraciones mayores a 10 mM de cloruro de sodio, comportamiento que hasta el momento no se ha podido explicar.

Protocolo de Solubilización

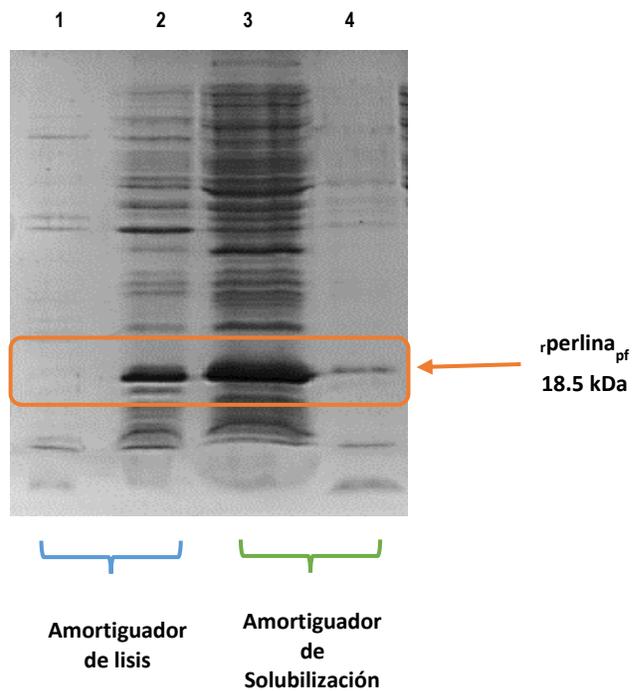


Figura 16. Solubilización de la $r_{perlina_{pf}}$. Electroforesis de SDS-PAGE al 15% del protocolo de solubilización de la $r_{perlina_{pf}}$. En los carriles 1 y 2 se observan la fracciones soluble e insoluble obtenidas después de la lisis celular realizada en presencia del amortiguador de lisis Tris-HCl 20 mM, pH 8, Cloruro de Sodio 50 mM, PMSF 1 mM (señalados con la llave color azul). En los carriles 3 y 4 del gel se observan a las fracción soluble e insoluble obtenidas después de tratar a la fracción insoluble obtenida después de la lisis celular con el amortiguador de solubilización Tris-HCl 20 mM, pH 8, cloruro de sodio 150 mM, PMSF 1 mM y sarcosil 5% (señalado con la llave verde). Dentro del recuadro se observa a la $r_{perlina_{pf}}$.

Purificación de la $r_{perlina_{pf}}$

El primer paso de purificación se realizó por medio de una cromatografía de afinidad a níquel. Después de aplicar la muestra, se observó la elusión de la $r_{perlina_{pf}}$ al 62% del gradiente de imidazol a la cual fue sometida. Cada una de las fracciones

colectadas durante el proceso de purificación, fue evaluada mediante un SDS-PAGE al 15% (Figura 17).

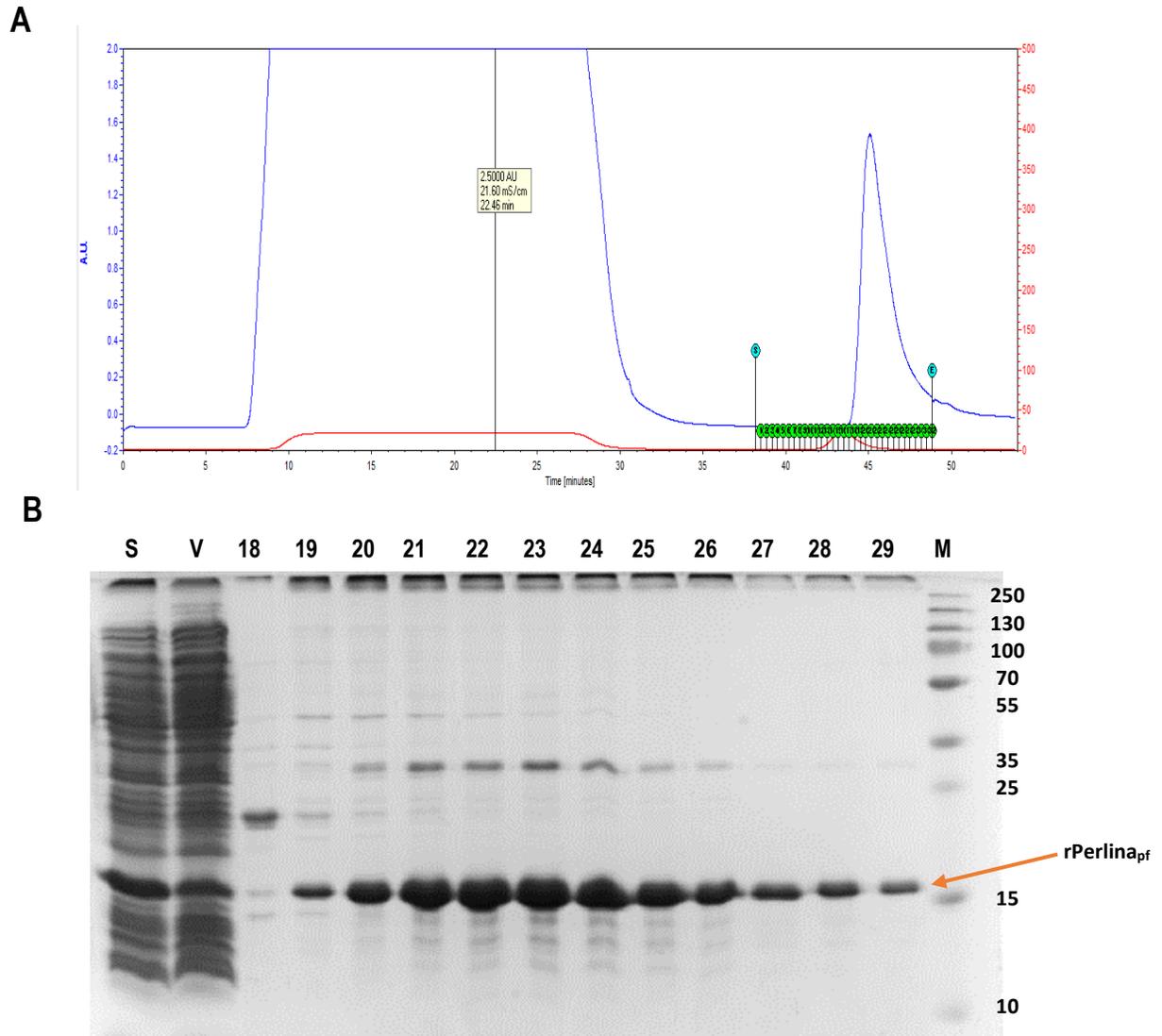


Figura 17. Cromatografía de afinidad a níquel de la $rPerlina_{pf}$. (A) Perfil cromatográfico de la cromatografía de afinidad níquel en una columna His Trap™ de la $rPerlina_{pf}$. La columna se equilibró previamente con el amortiguador Tris- HCl 20 mM, pH 8, posteriormente se aplicó la muestra. La proteína fue eluída se empleó un gradiente lineal de 0 -100% del amortiguador Tris- HCl 20 mM, pH 8, imidazol 500 mM. Se empleó un flujo de 3 ml/min (B) Electroforesis de SDS-PAGE al 15%. En los carriles de observa la fracción soluble (S), la fracción insoluble (I), fracción no fijada a la columna (V),

el número de las fracciones colectadas de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ y el marcador de masa molecular (M). con la flecha se indica la migración de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en el gel.

En el SDS-PAGE de la Figura 17 se puede observar que la proteína eluida presenta una masa molecular de aproximadamente 18.5 kDa, que correspondería a la masa estimada de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ (His +). Además de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ (His +), en el gel se observan bandas asociadas a la ella las cuales hasta ahora se ha inferido, podrían ser oligómeros de la proteína en solución.

Las proteínas asociadas a la biomineralización tienden a formar agregados para estabilizar la formación de los biominerales en solución (Collino & Evans, 2008; Amos & Evans, 2009; Amos *et al.*, 2011; Evans, 2012; Ndao *et al.*, 2012; Perovic *et al.*, 2013; Perovic *et al.*, 2014; Rutter *et al.*, 2015; Alsenaidy, 2018). Por lo que se ha descrito que la agregación en las proteínas de biomineralización es un comportamiento típico (Kalmar *et al.*, 2012; Rutter *et al.*, 2015). Con este antecedente, se monitoreó el comportamiento de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ (His +) durante el proceso de purificación por la técnica de DLS. El primer ensayo de DLS se realizó inmediatamente después de obtener las fracciones de la columna HisTrap™. Durante la medición, se observaron oligómeros de hasta 22.24 nm de diámetro hidrodinámico (D_H) ~959.7 kDa (Figura 18). La muestra se encontraba en el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8, imidazol 500 mM.

Cromatografía de afinidad a níquel

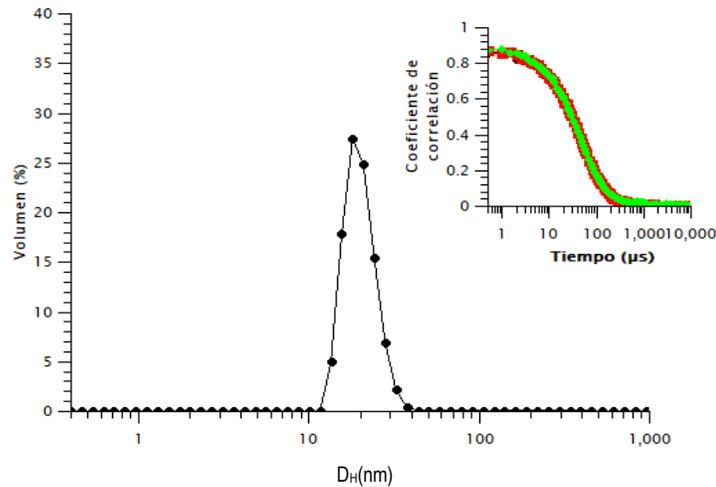


Figura 18. Análisis de la *rperlina*_{pf} His + por DLS. Se realizaron análisis de DLS de la *rperlina*_{pf} His +, obtenida después de la cromatografía de afinidad níquel. Durante el experimento se observaron oligómeros de hasta 22.24 nm de D_H lo que correspondería aproximadamente a una proteína de 959.7 kDa. La proteína se encontraba en el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8, imidazol 500 mM. El ensayo se realizó el equipo Zetasizer Nano Z a una temperatura de 18°C. Cada una de mediciones se tomó por triplicado. En la parte superior derecha se muestra el coeficiente de correlación de cada una de las mediciones.

Se evaluó por DLS el comportamiento de la *rperlina*_{pf} en presencia de diferentes amortiguadores (Figura 19). Lo anterior, con el fin de explorar si existía alguna condición en que la proteína se encontrara en un estado de oligomerización menor. En la Tabla 1 se muestran algunas de las condiciones evaluadas. Esta amplia variedad de soluciones fue necesaria ya que la muestra presentó siempre una gran tendencia a formar agregados de alta masa molecular en tiempos muy cortos, lo cual entorpeció la reproducibilidad de las mediciones de DLS.

Durante este experimento las mediciones, mostraron que la *rperlina*_{pf} (His +) presentaba un comportamiento oligomérico bastante irregular (Tabla 1), pero después de analizar cada una de las mediciones, se observó una relación entre el pH

y el aumento en el diámetro hidrodinámico de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$, en solución ya que a mayor $\text{pH} < D_{\text{H}}$.

Se observó que a $\text{pH} 4$, la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ presentaba una tendencia a formar oligómeros de gran tamaño $\sim 200 \text{ nm}$ de D_{H} ($\sim 321965 \text{ kDa}$). Mientras que a $\text{pH} 8$ la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ presentó un D_{H} de $\sim 23.3 \text{ nm}$ (2041.4 kDa), como se muestra en la Figura 19 y en la Tabla 1. Este comportamiento, podría deberse a que las cadenas laterales de los residuos cargados (Asp, Glu, His, Lys y Arg) de la proteína que se encuentran expuestos al solvente, se ven afectados por los cambios de pH , lo que propiciaría el ensamblaje de la proteína, formando oligómeros de gran tamaño. En la literatura estudios anteriores reportaron que la oligomerización de la n16 de *P. fucata* podría ser dependiente del pH (Ponce & Evans, 2011; Perovic *et al.*, 2013, 2014). Por lo que se ha propuesto, que los cambios de pH podrían tener un papel muy importante durante la formación de la calcita y la aragonita (Amos *et al.*, 2011; Ponce & Evans, 2011; Perovic *et al.*, 2014).

Tabla 4. Análisis de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ His+ en presencia de distintos amortiguadores por DLS

Condición	DH (nm)	Masa (kDa)
Citrato 20 mM, pH 4	200	321965
MOPS 20 mM, pH 6.8	144	149277.8
HEPES 20 mM, pH 7.5	98.29	61084
Fosfatos 20 mM, pH 6.2	66.69	24648
Agua	35.1	2766
Tris-HCl 20 mM, pH 8	23.36	2041.4
Tris-HCl 20 Mm, pH 8, 1% sarcosil	4.1	18.3

Dicho comportamiento también fue reportado por Ndao y colaboradores, ellos observaron que cuando el pH en el que se encuentra la asprichina, va de 4 a 8, la proteína tiende a formar oligómeros de menor tamaño (Ndao *et al.*, 2012), al igual que ocurre en la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$. En cambio, Perovic y colaboradores describen que a pH 8 la proteína RPFM6 muestra una sola población oligomérica por DLS. Sin embargo, cuando la RPFM6 se encuentra en pHs distintos a 8, la proteína muestra un comportamiento oligomérico bastante irregular (Perovic *et al.*, 2013).

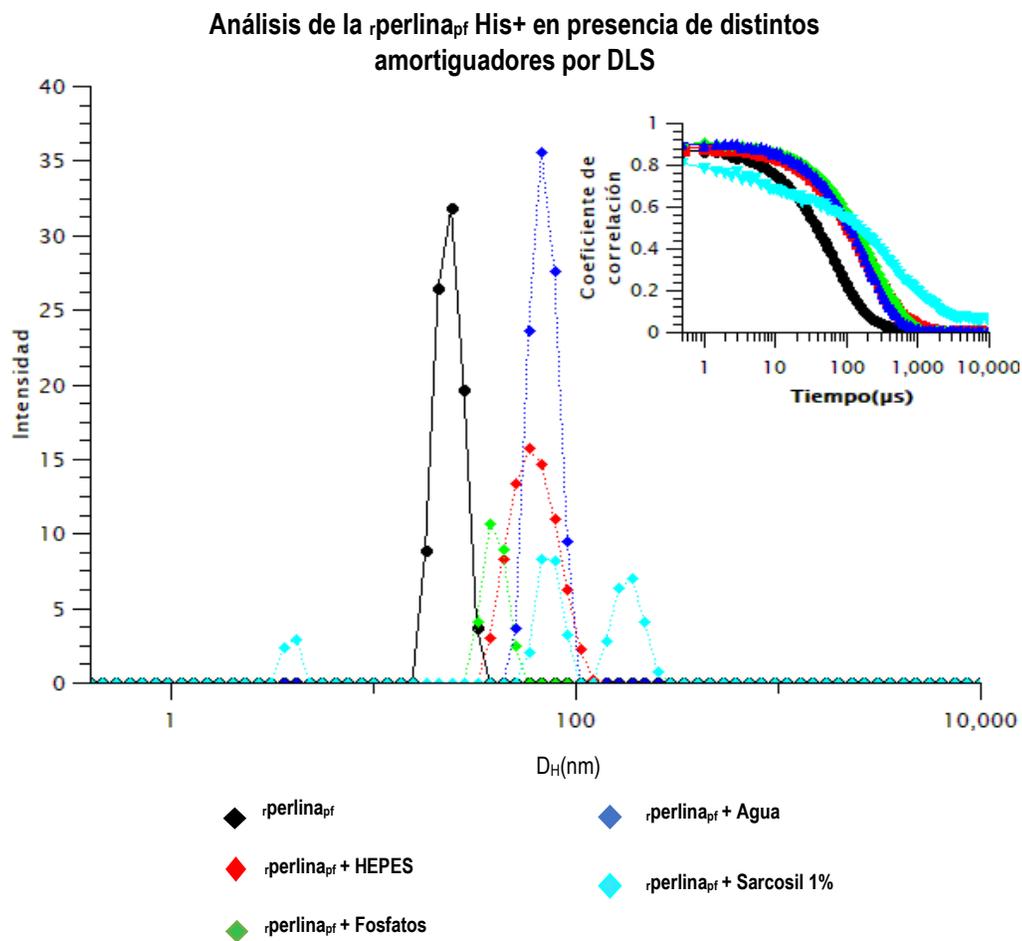


Figura 19. En la gráfica se representan algunas de las condiciones evaluadas en el análisis de DLS. Durante el ensayo se evaluó el comportamiento de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ en presencia de distintos amortiguadores. Se puede observar una relación entre los valores de cada uno de los D_H (nm) obtenidos en cada una de las mediciones y el pH del amortiguador en el que se encontraba la

proteína. En color negro se observa a la proteína en el amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 8, imidazol 500 mM. En líneas punteadas de color rojo se muestra el comportamiento de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en el amortiguador HEPES 20 mM, pH 7.5. En líneas punteadas de color verde se muestra el comportamiento de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en el amortiguador fosfatos 20 mM, pH 6.2. En líneas punteadas de color azul se muestra el comportamiento de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en agua Milli Q. En líneas punteadas de color cian se muestra el comportamiento de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en el amortiguador Tris-HCl 20 Mm, pH 8, 1% sarcosil. Los ensayos se realizaron el equipo Zetasizer Nano Z a una temperatura de 18°C. Cada una de mediciones se tomó por triplicado. En la parte superior derecha se muestra el coeficiente de correlación de cada una de las mediciones.

Este experimento, también nos permitió establecer que el amortiguador en el que la proteína se encontraba en un estado de menor oligomerización fue en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8 (Figura 19). Estos resultados concuerdan con los reportados por Amos *et al.*, 2011; Ponce & Evans, 2011; Huang *et al.*, 2017, donde se había usado este amortiguador durante la producción de perlina de *P. fucata*. Se encontró que al añadir 1% del detergente sarcosil al amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, es posible obtener una fracción de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en forma monomérica (Figura 19).

Se decidió retirar la etiqueta de His de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$, para evitar que la etiqueta influya en el comportamiento de la proteína en solución. Se siguió el protocolo de la digestión enzimática propuesto por GE (<https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/chromatography/prepacked-columns/affinity-tagged-protein/precision-protease-for-gst-tag-removal-p-00248?current=27084301>). Sin embargo, no se logró escindir por completo la etiqueta de la muestra (Figura 20). Así que se evaluaron otras condiciones de corte. Durante las pruebas se varió la concentración de PSP durante la digestión y el amortiguador de corte (resultados no mostrados), sin lograr mejorar la condición de proteólisis, por lo que se mantuvo la condición de corte inicial.

Corte con PSP

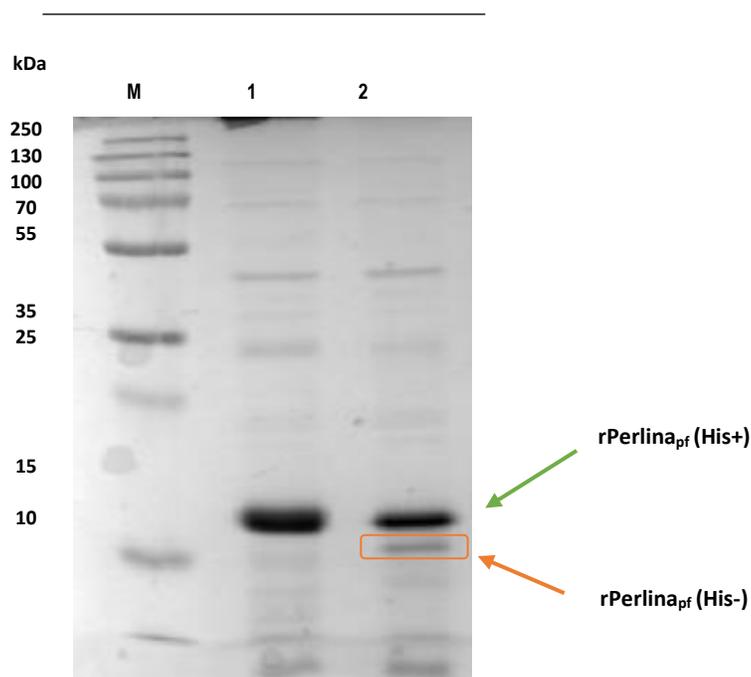


Figura 20. Proceso de corte de la etiqueta de His de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+ con la proteasa PSP.

Electroforesis de SDS-PAGE al 15% del proceso de corte de la etiqueta de His de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+. En el carril 1 se observan la proteína control, previa a la digestión con la PSP. En el carril 2 se muestra a la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ después del corte con la proteasa PSP. Con la letra M se encuentra señalado el marcador de masa molecular (kDa). Con la flecha verde se señala a la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +, mientras dentro del recuadro naranja se observa a la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His -. La proteólisis se llevó acabo en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, DTT 1 mM. A 4 °C.

Hasta el momento, se infiere que la razón por la que no se retiró en su totalidad la etiqueta de His de la muestra, podría deberse al estado de oligomerización en el que se encontraba la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ durante el corte. Si bien, al evaluar a la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ por DLS se describió que en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, 1% (p/v) sarcosil se encontraba una fracción monomérica de la proteína, esta condición no se incorporó al proceso de corte debido a que el detergente no es compatible con la PSP. Debido a que no le permite llevar a cabo su función, a pesar de que en la literatura se tiene

bien reportado que la PSP tiene actividad en 1% de los detergentes SDS y Tritón. Por lo que se decidió continuar trabajando con la muestra que contenía a la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ con etiqueta (His+) y sin etiqueta (His-) (Figura 20). Muestra que a partir de este momento llamaremos $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ His+/His-.

La $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ His+/His- se aplicó a una columna de exclusión molecular. Las fracciones correspondientes a la cromatografía fueron colectadas y evaluadas por SDS-PAGE (Figura 21). En el cromatograma obtenido durante el proceso de exclusión molecular (Figura 21A), se obtuvieron dos picos bastante definidos y simétricos. Mientras el análisis electroforético reveló, que en las fracciones 24-28 que corresponden al primer pico obtenido durante la cromatografía se encontraba la PSP, algunas impurezas con las que aun contaba la muestra previas a este ensayo, así como una parte mayoritaria de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ (His+/His-). Y en las fracciones 30-34 que corresponden al segundo pico, se encontró únicamente a la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ (His+/His-).

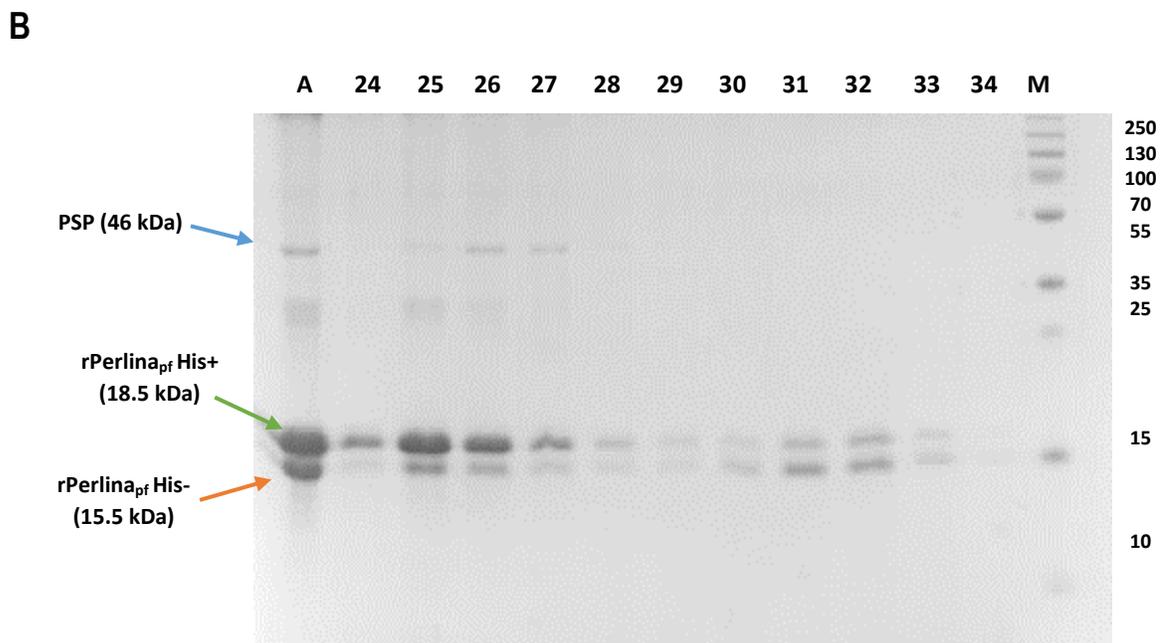
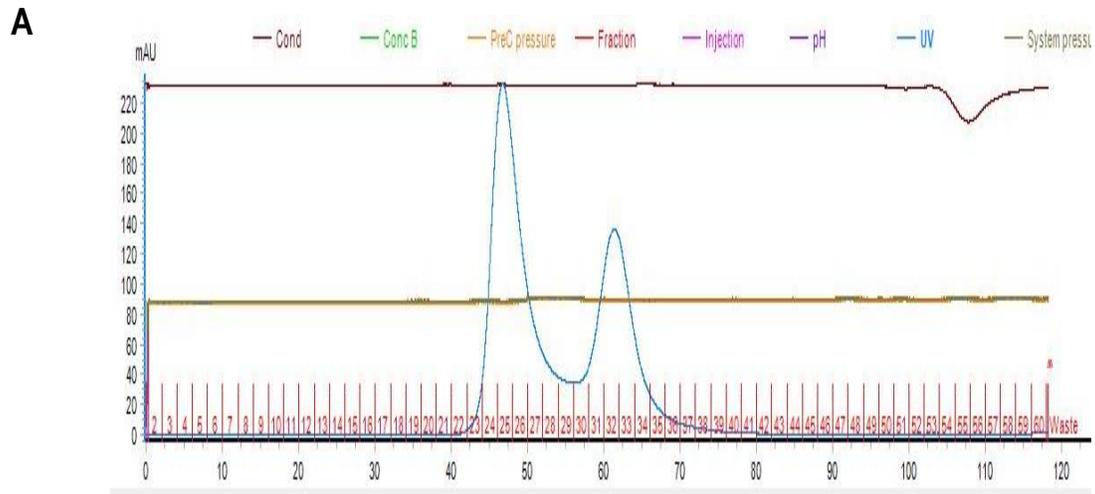


Figura 21. Cromatografía de exclusión molecular de la *rperlina_{pf}*. (A) Perfil cromatográfico de la exclusión molecular en una columna Superdex 75 HR 10/30 de la *rperlina_{pf}*. La columna se equilibró previamente con el amortiguador Tris- HCl 20 mM, pH 8, sarcosil 1%. Se empleó una velocidad de flujo de 1 ml/min. **(B)** Electroforesis de SDS-PAGE al 15%. En los carriles se observa a la *rperlina_{pf}*(His+/His-) antes de ser inyectada a la columna (A) el número de las fracciones colectadas 24 a 34 de la *rperlina_{pf}* y el marcador de masa molecular en kDa (M). Con las flechas se señala en el gel a la PSP (azul), *rperlina_{pf}* His+ (verde), *rperlina_{pf}* His- (naranja).

Como se recordará, al inicio de las mediciones la $r_{perlina_{pf}}$, mostraba un comportamiento mayormente heterogéneo y polidisperso (Figura 18). Pero al analizar las fracciones 30-34, obtenidas de la cromatografía de filtración en gel, se encontró que la $r_{perlina_{pf}}$ His+/His-, mostraba un comportamiento homogéneo y monodisperso, con un $D_H \sim 4.2$ nm o lo que correspondería aproximadamente a 18 kDa. Lo anterior correspondería aproximadamente al monómero de la $r_{perlina_{pf}}$ en solución. En la Figura 22, se puede observar el comportamiento de la $r_{perlina_{pf}}$, durante el proceso de purificación. Durante este ensayo sí se mantuvo el amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8, 1% Sarcosil.

En la literatura se ha reportado que existe una mayor probabilidad de obtener cristales de proteínas apropiados para ser difractados con Rayos X, si la proteína cuenta con un alto grado de pureza, se mantiene estable durante el tiempo y además si al ser analizada por DLS se comporta de manera homogénea y monodispersa (D'Amaré, 1994). Por lo que obtener a la $r_{perlina_{pf}}$, mostrando este comportamiento podría aumentar las posibilidades de encontrar un cristal de proteína de la misma. Ya que como se mencionó antes, uno de los objetivos de esta tesis es obtener cristales de la $r_{perlina_{pf}}$.

Análisis del proceso de purificación de la r perlina_{pf} por DLS.

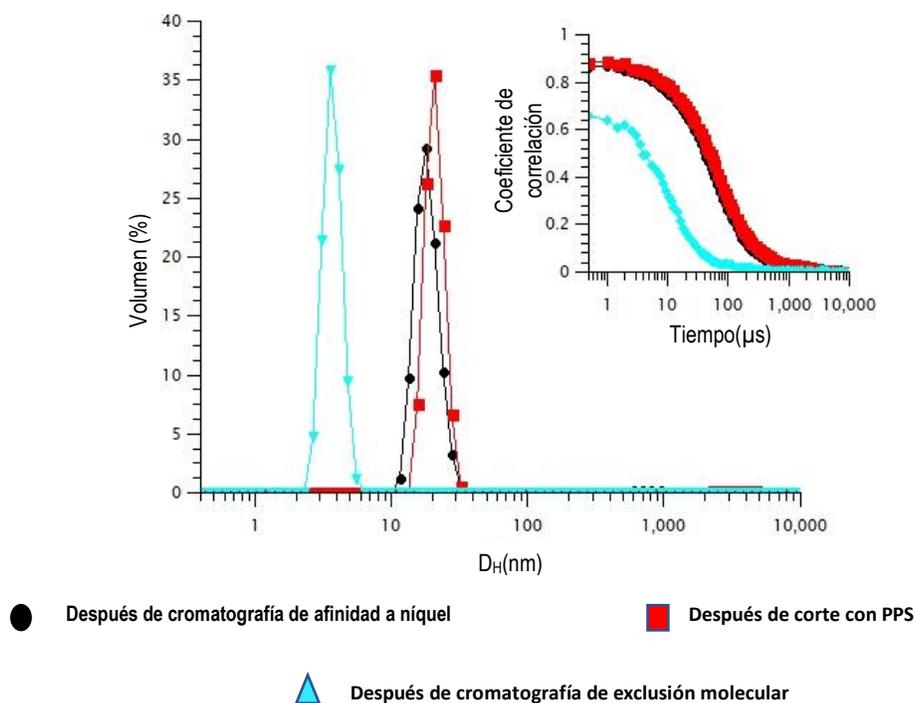


Figura 22. Análisis del proceso de purificación de la r perlina_{pf} por DLS. Durante cada una de las etapas del proceso de purificación se evaluó por DLS el comportamiento de la r perlina_{pf}. En color negro se observa el comportamiento de la r perlina_{pf} His + después de la cromatografía de afinidad a níquel. La proteína mostró un D_H de ~ 22.24 nm. En color negro se observa el comportamiento de la r perlina_{pf} His + después del proceso de corte con la proteasa PSP, donde la proteína mostro un $D_H \sim 24.20$ nm. Como se puede observas, en ambas mediciones la r perlina_{pf} presenta un tamaño aproximado al de una proteína de 2041.4 kDa. A diferencia de la r perlina_{pf} evaluada después de la cromatografía de exclusión molecular donde se observa con un D_H de 4 nm o ~ 18.5 kDa. La cual se muestra en color cian. Las mediciones se realizaron en el equipo Zetasizer Nano Z a una temperatura de 18°C. Cada una de mediciones se tomó por triplicado. En la parte superior derecha se muestra el coeficiente de correlación de cada una de las mediciones.

Finalmente, después de los dos pasos de purificación y el proceso de corte en presencia de la PSP a los que fue sometida la r perlina_{pf}, se obtuvieron 2 mg de proteína total (0.5 ml de proteína a una concentración de 4 mg/mL) (His+/His-). La

cual fue suficiente para realizar los ensayos de DLS, fluorescencia, cristalización y difracción de Rayos X.

Análisis del proceso de oligomerización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en solución

Hasta el momento, mucho se ha hablado acerca de las características bioquímicas y estructurales de las proteínas de biomineralización. No obstante, una de las que más ha llamado la atención es la capacidad de oligomerización que presentan al estar en solución (Gower, 2013; Brown *et al.*, 2014; Rutter *et al.*, 2015; Kocot *et al.*, 2016; Arivalagan *et al.*, 2017; Rutter *et al.*, 2018). Considerando lo anterior, nuestros análisis iniciales de DLS se emplearon para caracterizar la homogeneidad y la estabilidad conformacional de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en solución. La técnica de DLS, también nos permitió evaluar el efecto de oligomerización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ al interactuar con distintos iones en solución (Tabla 2).

Tabla 5. Análisis de la oligomerización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en solución

<i>Muestra</i>	Equivalentes (Sales)	D_H (nm)	Masa molecular (kDa)
$r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$	-	4.1	18.3
$r_{\text{perlina}_{\text{pf}}} + \text{NaCO}_3$	3	4.9	28
$r_{\text{perlina}_{\text{pf}}} + \text{NaCl}$	3	5.1	30
$r_{\text{perlina}_{\text{pf}}} + \text{CaCl}_2$	0.3	36.03	2950.5
$r_{\text{perlina}_{\text{pf}}} + \text{MgCl}_2$	0.3	102.1	102373.7

Durante las mediciones, el equipo de DLS monitoreó los cambios en el D_H que se presentaron después de añadir las sales NaCO_3 , NaCl , CaCl_2 y MgCl_2 a la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His-. La cual al inicio del experimento mostraba un $D_H \sim 4.2$ nm. Nuestros resultados revelaron que se produjo un aumento en el D_H de la proteína en cada una de las condiciones evaluadas (Figura 23).

Se analizó la interacción de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- en presencia de tres equivalentes de NaCO_3 . En este caso el equipo de DLS reportó un aumento poco significativo en el D_H de la proteína al estar en presencia de NaCO_3 . Debido a que el D_H de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- solo alcanzó 4.9 nm al interaccionar con este ion. Al igual que cuando la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- estuvo en presencia de tres equivalentes de NaCl , donde se registró un D_H de 5 nm. Estos D_H corresponderían a una proteína de entre 28 y 30 kDa respectivamente.

A diferencia de los cambios encontrados cuando la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- estuvo en presencia de 0.3 equivalentes de CaCl_2 , donde se reportó un aumento del D_H que alcanzó los 36.03 nm (~ 2950.5 kDa) (Figura 23). Como se puede observar el proceso de oligomerización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ se potencia en presencia de Ca^{2+} lo cual podría deberse a los posibles sitios de unión a calcio ubicados dentro de la secuencia de la proteína donde se uniría este ion como anteriormente lo reportaron Ponce y Evans en el 2011. Este comportamiento también correlaciona con lo previamente reportado para la proteína asprichina, donde al interaccionar con Ca^{2+} se observa un aumento de hasta un 95% en el tamaño de los oligómeros en solución (Ndao *et al.*, 2012). Al igual que la proteína RPFM61, que al entrar en contacto con Ca^{2+} da lugar a un aumento en la polidispersidad de la muestra evaluada por DLS, así como un aumento significativo en el tamaño de los oligómeros respecto a los descritos para la RPFM61 en ausencia de Ca^{2+} (Perovic *et al.*, 2013). O incluso un fragmento de la proteína n16; el péptido de 30 aminoácidos generado a partir de la secuencia N-

terminal de la n16 llamado n16N, donde se observan aumentos en los diámetros hidrodinámicos de este péptido en solución al interactuar con Ca^{2+} (Ponce & Evans, 2011). Sus resultados al igual que los aquí reportados mostraron que el Ca^{2+} tiene la capacidad de promover la oligomerización de la $r\text{perlina}_{\text{pf}} \text{His}^+/\text{His}^-$ en solución.

Se observó que cuando la $r\text{perlina}_{\text{pf}} \text{His}^+/\text{His}^-$ estuvo en presencia de 0.3 equivalentes de MgCl_2 , la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ aceleró tanto la velocidad de oligomerización, como el tamaño de los oligómeros en solución, ya que el equipo reportó partículas de hasta ~ 102 nm de D_H (Figura 23). Hasta el momento, se sabe que el ion Mg^{2+} funciona como un interruptor durante el proceso de selección del polimorfo durante la formación de la concha, debido a que en presencia de Mg^{2+} se formará preferentemente aragonita e inhibirá la formación de calcita y viceversa (Marin *et al.*, 2012; Marin *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2014). Lo que nos hace pensar que el Mg^{2+} podría interactuar con la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ para promover y favorecer la oligomerización durante la formación de aragonita dentro de la capa nacarada, ya que como se observa en el experimento el Mg^{2+} , puede producir un efecto de oligomerización mayor en la $r\text{perlina}_{\text{pf}} \text{His}^+/\text{His}^-$, que el Ca^{2+} mismo. Incluso la oligomerización de la perlina en función del magnesio presente en el ambiente podría estar relacionado con el proceso de selección polimórfica, ya que como se reportó en los trabajos de Michio y colaboradores o Xiang y su grupo de trabajo donde se ha descrito que la perlina junto las proteínas pif 80/97 participarían activamente al seleccionar el polimorfo que se depositara, modificar la morfología del cristal y regular el crecimiento de los mismos al estar en presencia de magnesio (Michio *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2013). Hasta el momento, no se ha descrito la interacción entre el magnesio y las proteínas de la capa nacarada, sin embargo, en 2014, Pan y colaboradores describieron que la proteína asociada a la capa prismática Pfn44, es capaz de interactuar con Mg^{2+} . Pfn44 al igual que la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$, cuenta con una región rica en los aminoácidos NGN, la cual podría funcionar como probable sitio de unión a Mg^{2+} . No obstante, lo anterior es

puramente especulativo ya que, hasta el momento no existe evidencia experimental de esta interacción (Pan *et al.*, 2014).

Análisis de la oligomerización de la r perlina_{pf} en solución

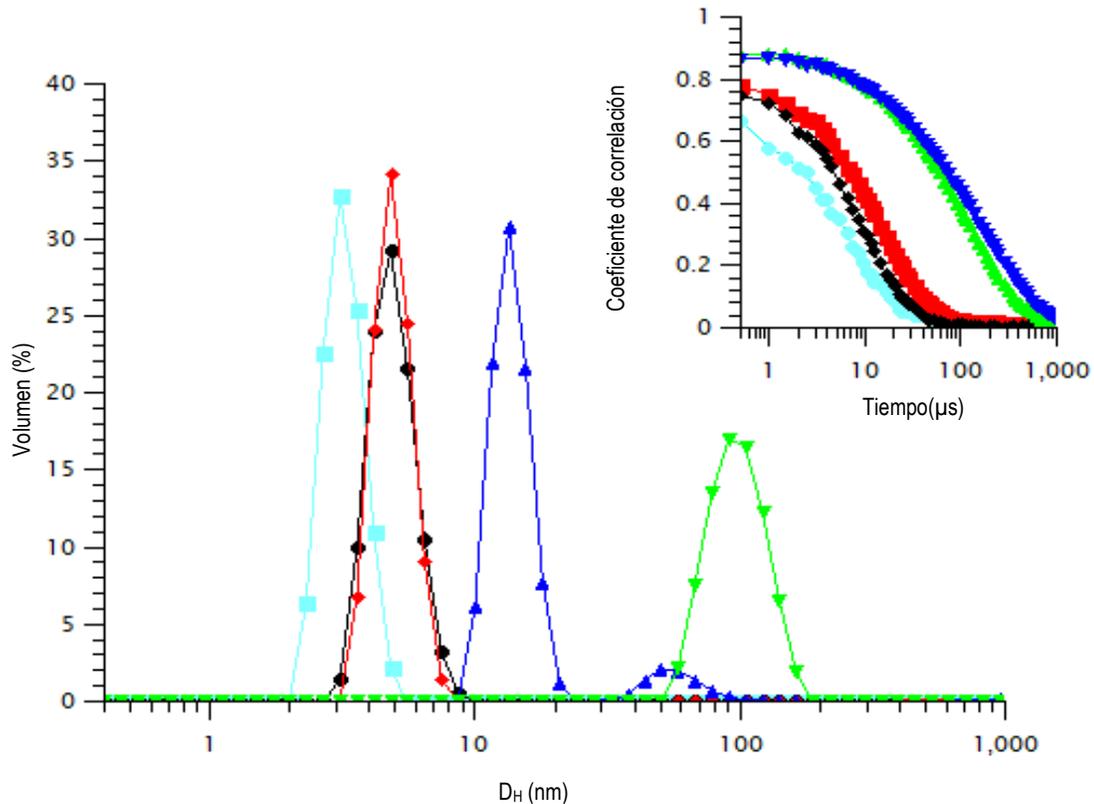


Figura 23. Análisis de la oligomerización de la r perlina_{pf} en solución. Se analizó por DLS el efecto de oligomerización de la r perlina_{pf} His +/His- en presencia de diferentes iones. En azul se muestra el comportamiento de la r perlina_{pf} His +/His- en presencia de 0.3 equivalentes de CaCl₂. En verde se muestra el comportamiento de la r perlina_{pf} His +/His- en presencia de 0.3 equivalentes de MgCl₂. En negro se muestra el comportamiento de la r perlina_{pf} His +/His- en presencia de 3 equivalentes de NaCO₃. En rojo se muestra el comportamiento de la r perlina_{pf} His +/His- en presencia de 3 equivalentes de NaCl. El ensayo se realizó el equipo Zetasizer Nano Z a una temperatura de 18°C. Cada una de mediciones se tomó por triplicado. En la parte superior derecha se muestra el coeficiente de correlación de cada una de las mediciones.

Es importante mencionar que en la literatura, el ensamblaje y la unión a CaCO_3 de las proteínas de biomineralización en moluscos, no solo ha sido atribuido a la capacidad de estas proteínas de unir Ca^{2+} , sino también a las modificaciones postraduccionales con las que estas cuentan (Sarem & Lüdeke, 2015; Boskey & Villarreal-Ramirez, 2016; Kocot *et al.*, 2016). La $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ es una proteína que se obtuvo de manera recombinante en *E. coli*, por lo que carece de las modificaciones postraduccionales descritas en la literatura (sulfatación, glicosilación y miritilización) (Miyashita *et al.*, 2000). A pesar de eso, se observó que la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ mantuvo un comportamiento con tendencia a la oligomerización influenciado por los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y CO_3^{2-} a pesar de carecer de las modificaciones postraduccionales que caracterizan de las proteínas de biomineralización. Por lo anterior, proponemos que en el caso de la perlina las modificaciones postraduccionales podrían no estar asociadas al proceso de ensamblaje, sino principalmente podrían participar en ubicar a la proteína en el núcleo donde comenzará la deposición de los biominerales u otras funciones desconocidas.

La interacción de la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ His⁺/His⁻ con los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} y CO_3^{2-}

Se obtuvieron espectros de fluorescencia de la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ His⁺/His⁻ con el fin de describir los cambios en el ambiente químico de los residuos de Trp en presencia de distintos iones (Ca^{2+} , Mg^{2+} , CO_3^{2-} y Na^+) (Figura 23). Los espectros mostraron que al adicionar CaCl_2 a la $r\text{perlina}_{\text{pf}}$ His⁺/His⁻, se presentó un desplazamiento en el máximo de emisión de fluorescencia de 12 nm con respecto a la emisión de la proteína control (339 nm máximo de emisión). La adición de NaCO_3 por su parte, provocó un desplazamiento en la emisión de fluorescencia de 2 nm con respecto a la proteína control, ya que su máximo de emisión fue de 337 nm. Durante el ensayo también se

utilizaron las sales NaCl y MgCl₂. Sin embargo, no se observó que estas influyeran de manera significativa el comportamiento de la *r*perlina_{pf} His⁺/His⁻.

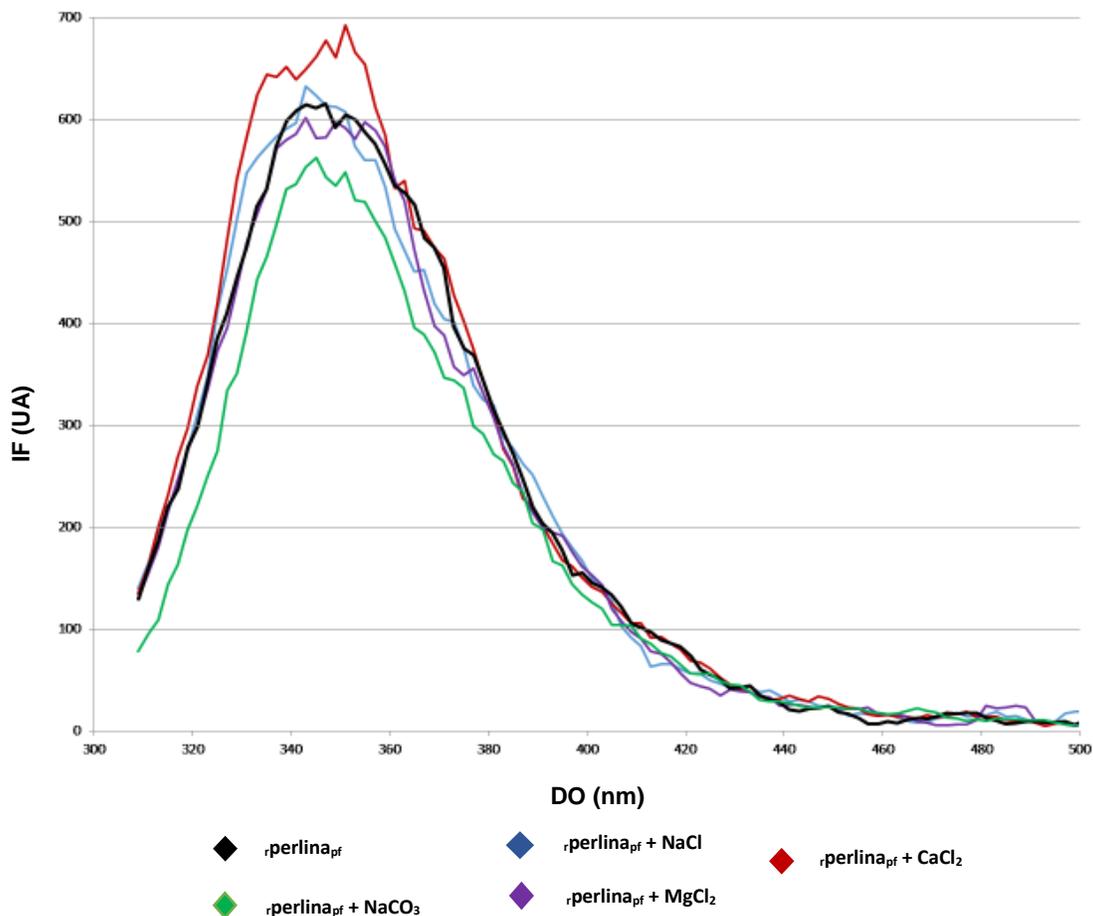


Figura 24. Análisis de la interacción de la *r*perlina_{pf} His⁺/His⁻ con los iones Ca²⁺ Mg²⁺ Na⁺ y CO₃²⁻. Se tomaron espectros de fluorescencia de la *r*perlina_{pf} His⁺/His⁻ en presencia de distintas sales. La *r*perlina_{pf} His⁺/His⁻ que se utilizó como control se muestra en color negro. La *r*perlina_{pf} His⁺/His⁻ adicionada con NaCO₃ se muestra color verde. La *r*perlina_{pf} His⁺/His⁻ adicionada con NaCl se muestra en color azul, La *r*perlina_{pf} His⁺/His⁻ adicionada con MgCl₂ se muestra en color morado. La *r*perlina_{pf} His⁺/His⁻ adicionada con CaCl₂ se muestra en color vino tinto. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro F-4500 FL (HITACHI), con una celda de 1 cm de longitud de camino, una longitud de onda de excitación de 280 nm, y una longitud de onda de emisión entre 295 y 500 nm.

En 2008 Collino y Evans describieron que si bien, la proteína n16N no sufre cambios conformacionales drásticos a nivel global al interactuar con los iones carbonato o calcio, si es posible que se reordenen las cadenas laterales de la proteína (Collino & Evans, 2008). Lo que corresponde con los datos de fluorescencia, determinados en esta tesis, debido a que durante nuestras mediciones no se observaron grandes cambios en el máximo de emisión de los Trp de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ cuando estos se monitorearon al interactuar con diversos iones.

Se generó un modelo tridimensional por homología con la secuencia de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$, con el fin de mostrar la posible ubicación espacial de los residuos de Trp en la secuencia de la proteína. El modelo se construyó con base a la identidad de la proteína ubiquitin-ligasa RNF38. Utilizando el programa SWISS MODEL. Los Trp mostrados en la Figura 24 son algunos de los residuos que podrían verse perturbados durante la interacción de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His+/His- y los iones presentes en el ambiente durante el experimento de fluorescencia. Sin embargo, debido a que la familia de las proteínas n16 no muestran identidad con ninguna proteína reportada hasta el momento, solo se generó un modelo que cubrió el 20% de la secuencia de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ (Figura 24).

GPGGSGSMTCTLRW TITALVLLGICHLARPAFRTKCGRYSYCWIPYDIER DRYDNGDKKCCFCRNA WSP WQCK
EDERYEWLRCGHKFFYMC CYTDDNGNGNGNGNGFNLYKSLYGGYGNGNGEFWEEYIDERYDK

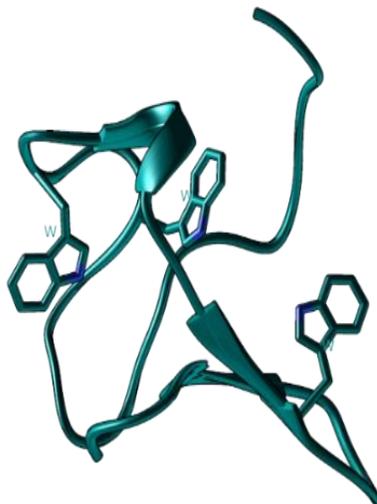


Figura 25. Modelo de la $r_{perlina}_{pf}$. En la parte superior de la figura se representa la secuencia a completa de la $r_{perlina}_{pf}$. Dentro del recuadro coloreado en cian se muestra la secuencia de residuos de aminoácidos a partir de la que se generó el modelo tridimensional de la $r_{perlina}_{pf}$ mostrado en la parte inferior de la figura. En color azul se encuentran resaltados los residuos Trp contenidos en la secuencia de la $r_{perlina}_{pf}$. El modelo se generó con el servidor SWISS MODEL basado en la secuencia de la proteína ubiquitin-ligasa RNF38 y la imagen se obtuvo con el programa PyMOL.

Cristalización de la $r_{perlina}_{pf}$

Se realizó un “screening” inicial de cristalización por el método de “microbatch” utilizando los 14 “kits” de cristalización de la marca “Hamton Research” y “Jena Bioscience”. Durante este ensayo se utilizó la $r_{perlina}_{pf}$ His +/ His- a una concentración de 2 mg/ml. Probando un total de 1400 condiciones diferentes. Todas fueron incubadas a 4 y 18° C. Las pruebas fueron analizadas después de dos semanas

y se observó que menos del 50% de ellas se encontraban precipitadas, formando fibras, erizos y pequeñas esferulitas (Figura 25). También se determinó que los “kits” con mayor éxito fueron el “Natrix” y “Membfac”.

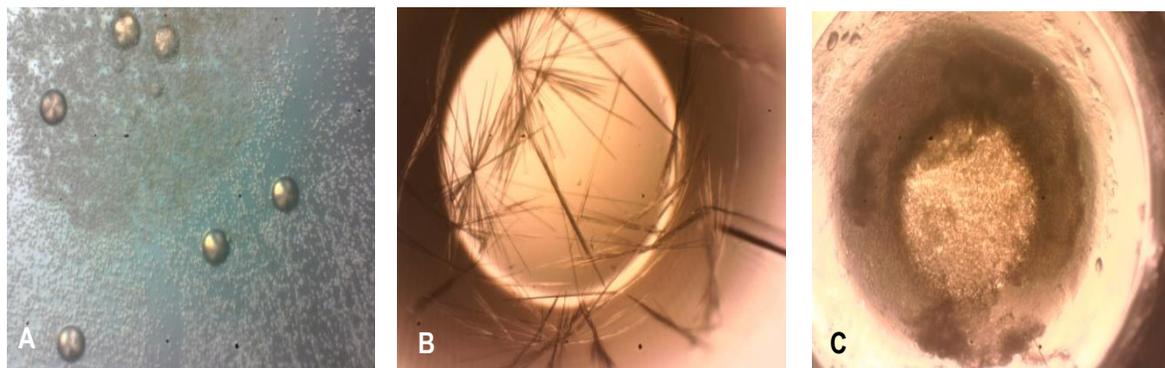


Figura 26. Pruebas de Cristalización de la ρ erlina_{pf} (His +/ His -). En las imágenes se pueden observar algunas de las condiciones de cristalización. Todas las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% y se incubaron a 4 y 18 °C.

Se realizaron 10 matrices de optimización (Anexo 4). Donde se variaron las condiciones de cristalización alrededor de las que mostraron mejores resultados. Lo anterior, con el fin de obtener cristales que pudieran ser expuestos a los rayos X (Tabla 3).

Tabla 6. Condiciones de cristalización de la *rperlina_{pf}* His +/- His - a partir de las cuales se realizaron matrices de optimización

N° de condición	Kit	Condición	Adicionada
1	Natrix	0.01 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de mes pH 5.6 Y 1.8 M de sulfato de litio	
12	Natrix	0.1 M de sulfato de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6 y 1.8 M de sulfato de litio	
11	Natrix	0.1 M cloruro de magnesio, 0.05 M cacodilato pH 6,5 ,1 M sulfato de litio	
15	Natrix	0.04 M cloruro de magnesio, 0.05 M cacodilato pH 6, 5% MPD	
23	Natrix	0.04 M cloruro de magnesio, 0.05 M cacodilato pH 6.5, 20% PEG 4000	
30	Natrix	0.1 M Tris-HCl pH 8, 1.5 M sulfato de litio	
		0.01 M cloruro de magnesio, 0.05 Mes pH 5.6, 2 M sulfato de litio	
7	PEG/Ion	0.2 M de cloruro de calcio 20% PEG 3350	
12	Natrix	0.1 M sulfato de magnesio, 0.05 cacodilato de sodio pH 6, 1 M sulfato de litio	
25	Natrix	0.08 M acetato de magnesio 0.05 M cacodilato pH 6.5, PEG 30% 4000	
25	PEG/Ion	0.2 M acetato de magnesio, 20 % PEG 3350	
30	Natrix	0.1 M Tris-HCl pH 8, 1.5 M sulfato de litio	Na ₂ CO ₃
28	Natrix	0.1 M sulfato de magnesio, 0.05 cacodilato de sodio pH 6, 1.6 M sulfato de litio	Na ₂ CO ₃

De las 10 matrices, las más exitosas fueron las generadas a partir de una variación de la condición 23, 0.04 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6.5 y 20% de PEG 4000 y la condición 25, 0.08 M de acetato de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6.5 y 30 % de PEG 4000 del “kit” “Natrix”. Así como la condición 25, 0.2 M de acetato de magnesio y 20 % de PEG 3350 del “kit” PEG/Ion (Figura 26) donde se obtuvieron cristales después de 3 semanas.

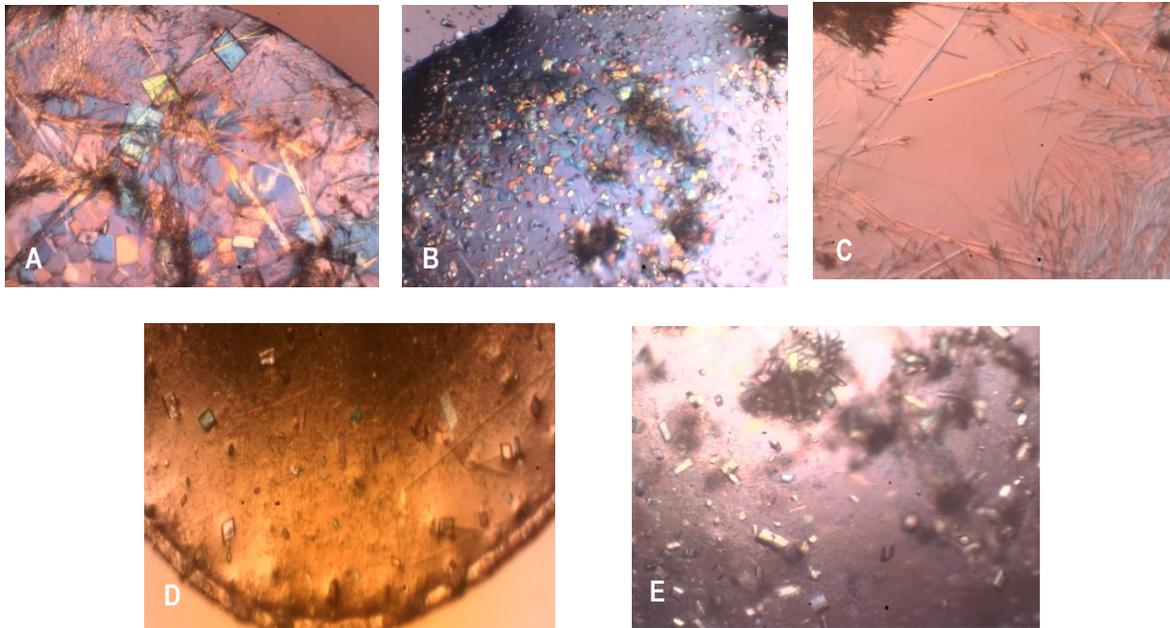


Figura 27.-Cristales obtenidos a partir de las matrices de optimización de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ (His +/ His-).

(A) Cristales obtenidos en la condición Tris HCl 20 mM, pH 8, cloruro de sodio 10 mM, 1% de sarcosil (0.04 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6.5 y PEG 4000 30%). **(B)** Cristales obtenidos en la condición, 0.04 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6.5 y 25% de PEG 4000. **(C)** Cristales obtenidos en la condición 0.2 M de acetato de magnesio y 40% de PEG 3350. **(D)** Cristales obtenidos en la condición 0.08 M de acetato de magnesio, 0.05 de cacodilato de sodio pH 6.5 y 20% de PEG 4000. **(E)** Cristales obtenidos en la condición 0.08 M de acetato de magnesio, 0.05 de cacodilato de sodio pH 6.5 y 35% de PEG 4000. Todas las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% a una concentración de 2.5 mg/mL y se incubaron a 18 °C.

De manera simultánea se pusieron pruebas de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ (His +/ His -) a 2 mg/ml en presencia de 0.1 M de NaCO_3 y con 0.01 M de CaCl_2 . Para cada una de estas se probaron 350 condiciones (con los “kits” “Membfac, Natrix, Crystal Screen 1 y 2, Crystal Screen Lite”) y 240 condiciones respectivamente con los “kits” “Membfac, Natrix, Crystal Screen 1 y 2, Crystal Screen Lite”. Estas pruebas se incubaron solamente a 18° C.

Los primeros cristales de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ (His +/ His -) adicionados con 0.1 M de NaCO_3 , se obtuvieron después de dos semanas en las condiciones 1 (0.01 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de mes pH 5.6 Y 1.8 M de sulfato de litio) y 12 (0.1 M de sulfato de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6 y 1.8 M de sulfato de litio) del “kit” “Natrix” y la condición 46 (0.1 Tris-HCl pH 8.5, 0.2 M de sulfato de litio) del “kit” “Membfac” (Figura 227); El cristal obtenido en la condición 1 del “kit” “Natrix” fue sometido a difracción de rayos X, y permitió obtener datos de difracción de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ (His +/ His -) (Figura 27 A).

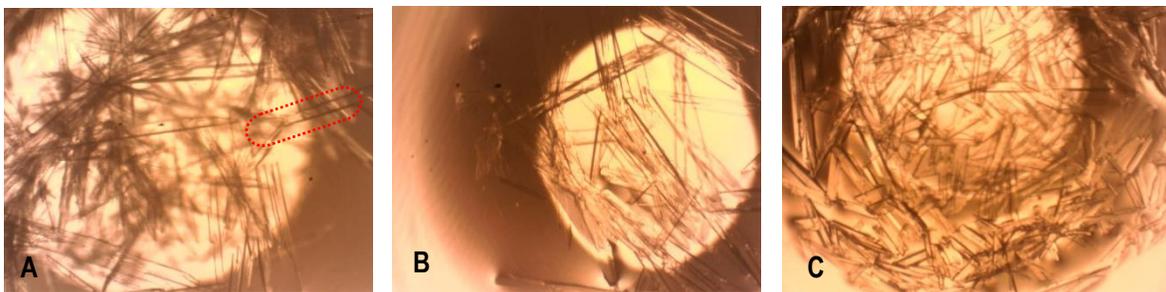


Figura 28. Cristales obtenidos en las pruebas de cristalización de $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +/ His - en presencia de carbonato de sodio. (A) Cristales de $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +/ His - en presencia de Na_2CO_3 obtenidos en la condición 1 del “kit” “Natrix” en rojo se muestra el cristal que fue sometido a la difracción de rayos X **(B)** Cristales encontrados en la condición 12 del “kit” “Natrix” en presencia de Na_2CO_3 . **(C)** Cristales obtenidos en la condición 46 del kit “Membfac” en presencia de Na_2CO_3 . Todas las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% a una concentración de 2.5 mg/mL y se incubaron a 18 °C.

Una vez que se comprobó que el cristal era de proteína, se realizó una matriz de optimización por el método de “gota colgante”. Pero al no encontrarse ningún cristal en esta matriz después de que la placa fuera incubada por más de 3 meses se exploraron también los métodos de “microbatch” y gota sedente. Donde después de 2 semanas, se encontraron cristales (Figura 26). Además, para esta condición se probó el “kit” de “Aditivos” de “Hamton Research” encontrando 29 condiciones nuevas donde aparecieron cristales. Algunos de los cristales obtenidos se muestran

en la Figura 28. Se probaron también los tres “kits” de “Detergents Screen” de “Hampton Research” donde se obtuvo un cristal bastante similar al antes difractado (Figura 27). Tanto los “Aditivos” como los “detergentes” se probaron por el método de “microbatch” y se incubaron a 18°C.

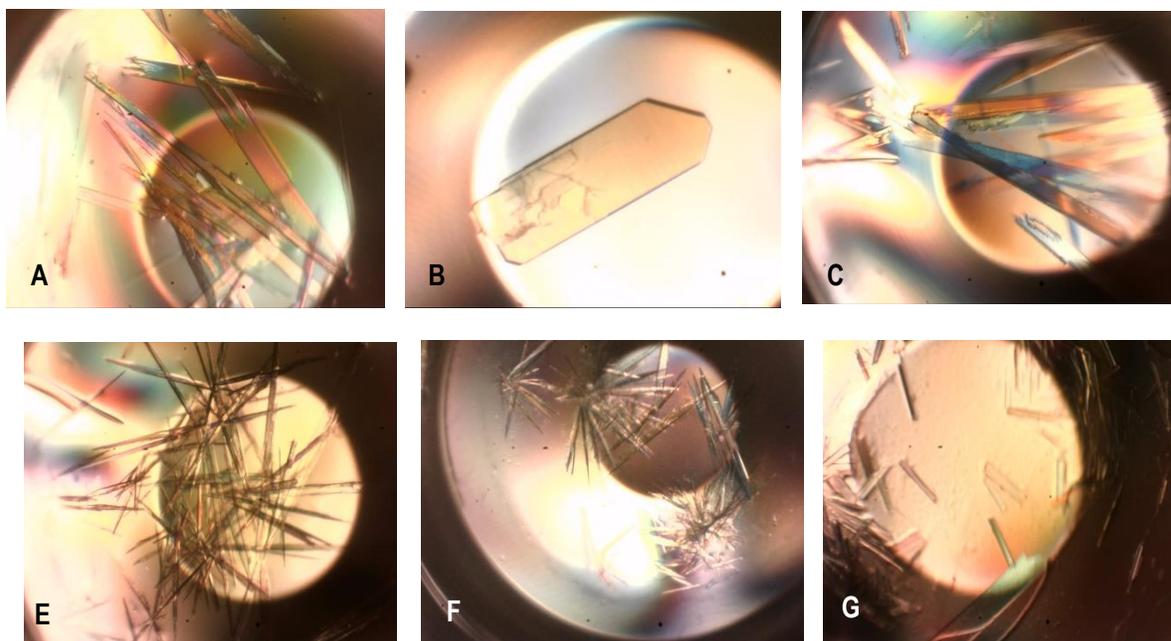


Figura 29. Cristales encontrados en las pruebas de cristalización generadas a partir de optimizar la condición 1 del “kit” “Natrix”, así como en presencia de Aditivos y “Detergents Screen” (A) Cristal encontrado en presencia del aditivo NDBS 221 (2 M). (B) Cristal encontrado en presencia del aditivo hexamina cloruro de cobalto (0.1 M). (C) Cristal encontrado en presencia del aditivo trimelamina N-oxido (30%). (D) Cristal encontrado en presencia del aditivo PEG 400 (50%). (E) Cristal encontrado en la optimización de la condición 1 a una concentración de 2 mg/mL (0.01 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de Mes pH 5.6 y de sulfato de litio). (G) Cristal encontrado en presencia de detergente dodecil-N-Ndimetilglicina. Todas las pruebas se realizaron en presencia del amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% y se incubaron a 18 °C.

Se analizaron las condiciones 12 (0.1 M de sulfato de magnesio, 0.05 M de cacodilato de sodio pH 6 y 1.8 M de sulfato de litio) y 46 (0.1 Tris-HCl pH 8.5, 0.2 M de sulfato

de litio) de las optimizaciones de la $r_{perlina_{pf}}$ en presencia de Na_2CO_3 . Al igual que en la condición 1 no se encontraron cristales utilizando el método de “gota colgante”, aunque al pasarlas a los métodos de “microbatch” y gota sedente solo se observó nucleación en las matrices de la condición 46 (Figura 29).

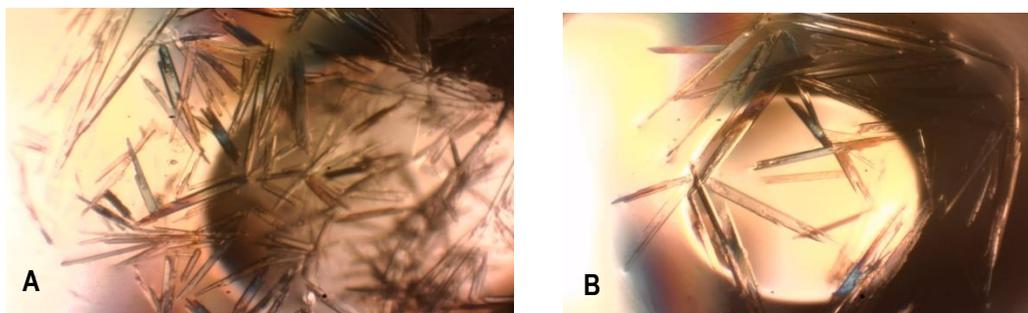


Figura 30. Cristales obtenidos a partir de una condición de optimización. Se encontraron cristales en la condición 0.1 tris-HCl pH 8.5, 0.2 M de sulfato de litio. Las pruebas estaban en el amortiguador Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, sarcosil 1% a una concentración de 2.5 mg/mL y se incubaron a 18 °C.

Llama la atención que como se podrá observar en las figuras 24-29, en su mayoría los cristales encontrados presentan una forma característica de barras o cubos. Además de que cuando los cristales fueron teñidos con el colorante “Izit”, no presentaron el comportamiento característico de tinción frente a este colorante (cuando los cristales son de sal, estos no se tiñen, a diferencia de los cristales de proteína que sí se tiñen). Sino que se observó que solo se tiñó la parte periférica del cristal y la parte central se mantuvo sin teñir. Este comportamiento podría deberse a que como se describió previamente, la $r_{perlina_{pf}}$ His +/- His- es una proteína de andamio que participa en el proceso de nucleación de cristales o tabletas de aragonita , así que lo que observamos en casi todas las pruebas de cristalización fue

que la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +/ His- mantiene su función como proteína promotora de la nucleación de cristales como lo hace en la concha de los moluscos (Miyashita *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2009; Bahn *et al.*, 2017). Debido a lo anterior y como se observó durante las pruebas de cristalización, fue más probable encontrar cristales de sal, que podrían ser de Mg^{2+} o Ca^{2+} ya que se encuentran como factor común en las condiciones de cristalización, que encontrar cristales de proteína de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +/ His- (Figura 30).

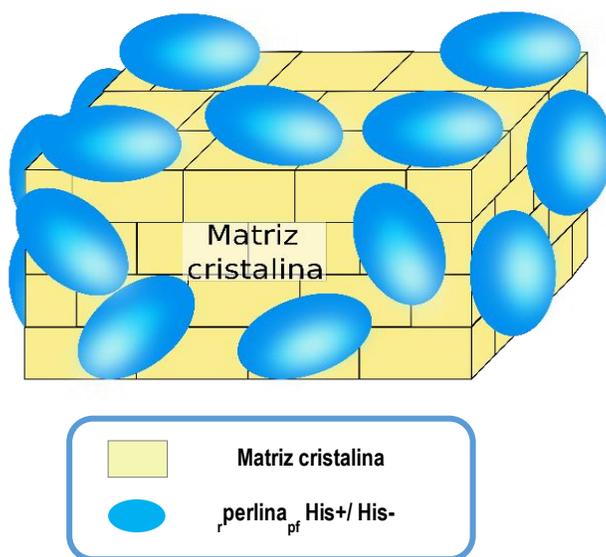


Figura 31. Ilustración esquemática del proceso propuesto de la formación de cristales en presencia de $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +/ His. El esquema representa a los cristales obtenidos durante las pruebas de cristalización fueron teñidos con el colorante “Izit”. Durante este proceso la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ His +/ His, participaría en la formación de presuntos cristales de Ca^{2+} o Mg^{2+} . Donde la proteína se ubica en la periferia del centro de nucleación del cristal, para posteriormente estabilizar y promover el crecimiento del cristal de sal.

Difracción de Rayos X

Los cristales encontrados en la condición 0.01 M de cloruro de magnesio, 0.05 M de mes pH 5.6 y 1.8 M de sulfato de litio, fueron criopreservados (0.01 M de cloruro de

magnesio, 0.05 M de mes pH 5.6, 1.8 M de sulfato de litio y 30% de glicerol) y difractados en el Laboratorio de Estructura de Proteínas del LANEM, en el Instituto de Química de la UNAM; se colectaron 164° utilizando el detector Dectris *Pilatus* 3R. 200K, con el programa HKL se propuso que los grupos espaciales podrían ser C222, P2, P622 y P6, con cada una de las cuales se intentó hacer un remplazo molecular con el programa Phaser, utilizando un modelo parcial generado en el servidor SWISS-MODEL de ExPASy (<https://www.expasy.org/>) por homología, a pesar de eso no se encontraron resultados que nos permitieran resolver las fases por lo que también se intentó utilizar el programa Phaser SAD con cada uno de los grupos espaciales ya hipotetizado, sin encontrar ninguna solución.

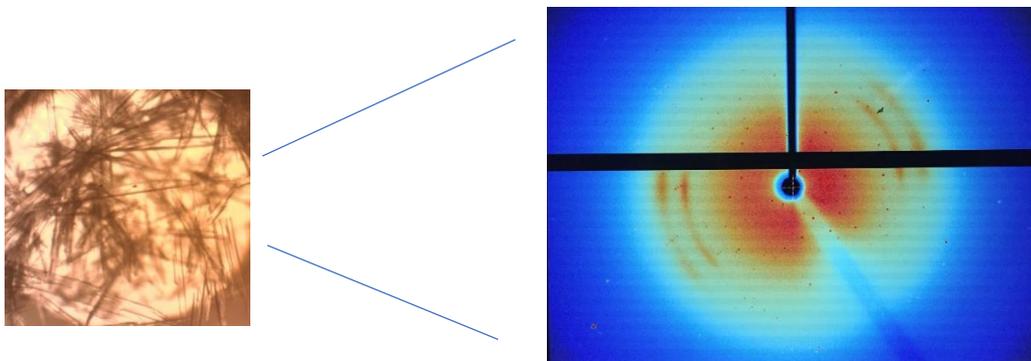


Figura 32. Difracción de Rayos X. (A) Cristales difractados en el Ánodo rotatorio en el LANEM. **(B)** Patrón de difracción de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ a aproximadamente 3.2 Å de resolución.

Hasta la fecha solo se encuentran determinadas estructuras cristalográficas de la proteína llamada PPL3 de la concha de *Pteria pingüino*, en condiciones de cristalización completamente diferentes a las reportadas para la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ (0.2 M de sulfato de amonio, 0.1 M de Tris-HCl pH 5.5 y 25% de PEG 3350) con el método de gota colgante en la forma apo con un máximo de resolución de 1.2 Å y en complejo con trehalosa a 1.5 Å. La estructura apo se resolvió con un reemplazo

isomorfo por el método de dispersión anómala (SIRAS) (Nakae *et al.*, 2018). Esto en gran medida se debe a que las proteínas de biomineralización carecen de estructura secundaria, lo que impide obtener un cristal apropiado para ser difractado (Evans, 2012; Boskey & Villarreal-Ramirez, 2016; Rutter *et al.*, 2018). Así como a que las secuencias de estas proteínas han sido reconocidas por presentar regiones que no corresponden con secuencias de otras proteínas globulares, por lo cual no pueden ser resueltas por el método de remplazo molecular, dificultando aún más, el proceso de determinación estructural por cristalografía.

Como ya se mencionó en este trabajo reportamos la obtención de un cristal de proteína de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$, el cual fue difractado y con él cual se colectaron datos de difracción. Este resultado junto a los obtenidos con los servidores IUPred y PONDR (este método identifica las regiones de secuencia intrínsecamente desordenadas basadas en la composición de aminoácidos) no describen a la perlina como una proteína intrínsecamente desordenada (Anexo 5). Por lo cual, fue factible que la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ cristalizará. Es importante recordar que el cristal encontrado se encontraba co-cristalizado con NaCO_3 , lo que pudo aumentar la estabilidad de la proteína al interactuar con este ion.

Conclusiones

- Se logró expresar, solubilizar, purificar y cristalizar a la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$. Los cristales se obtuvieron en presencia de NaCO_3 . Sin embargo, no se logró determinar la estructura cristalográfica de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$.
- Se observó que el pH es un factor determinante durante el proceso de oligomerización de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$, ya que a mayor pH se encontrarán oligómeros de menor tamaño de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ y viceversa.
- El estado oligomérico de la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ es alterado por la presencia de distintos iones como CO_3^{2-} , Ca^{+2} y Mg^{+2} y esto se puede correlacionar con su función biológica durante el proceso de biomineralización del nácar, a pesar de que la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ en realidad tiene poblaciones de perlina con y sin etiqueta de histidina.
- Los análisis de DLS nos permitieron observar que la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ es capaz de interactuar con los iones CO_3^{2-} , Ca^{+2} y Mg^{+2} a pesar de carecer de las modificaciones postranscripcionales (sulfatación, glicosilación y miritilización), por lo que proponemos que dichas modificaciones participarían principalmente en ubicar a la perlina en los sitios donde comenzará la nucleación de los cristales de aragonita y no en la interacción entre la proteína y los iones CO_3^{2-} , Ca^{+2} y Mg^{+2} .
- Durante las pruebas de cristalización se encontró que la $r_{\text{perlina}_{\text{pf}}}$ mantiene su función como proteína promotora de cristales, debido a que se observó que la proteína fue capaz de favorecer la nucleación de cristales de sal.

Perspectivas

- Obtener una nueva construcción de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ que nos permita obtener una proteína sin la etiqueta de histidinas y sin el péptido señal.
- Evaluar por DLS el comportamiento oligomérico de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ al interactuar con diferentes metales como zinc, cobre y plata.
- Evaluar el plegamiento de la proteína con técnicas espectroscópicas como Dicroísmo Circular (*DC*) o Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
- Realizar estudios termodinámicos de la interacción entre la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ y los iones CO_3^{2-} , Ca^{+2} y Mg^{+2} .
- Obtener la estructura cristalográfica de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$, así como la estructura del complejo de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ en presencia de NaCO_3^{2-} , Ca^{+2} y Mg^{+2} . La obtención de estas estructuras nos permitiría establecer los detalles de la interacción a nivel atómico de la proteína y estos iones.

Bibliografía citada

- Addadi, L., Raz, S., & Weiner, S. (2003). Taking advantage of disorder: Amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Advanced Materials*, *15*(12), 959–970. <https://doi.org/10.1002/adma.200300381>
- Addadi, L., & Weiner, S. (2014). Biomineralization: mineral formation by organisms. *Physica Scripta*, *89*(9), 98003. <https://doi.org/10.1088/0031-8949/89/9/098003>
- Alsenaidy, M. A. (2018). Aggregation and conformational stability evaluation of myoglobin in the presence of ionic surfactant. *Saudi Pharmaceutical Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.005>
- Amos, F. F., Ponce, C. B., & Evans, J. S. (2011). Formation of framework nacre polypeptide supramolecular assemblies that nucleate polymorphs. *Biomacromolecules*, *12*(5), 1883–1890. <https://doi.org/10.1021/bm200231c>
- Arivalagan, J., Yarra, T., Marie, B., Sleight, V. A., Duvernois-Berthet, E., Clark, M. S., Berland, S. (2017). Insights from the shell proteome: Biomineralization to adaptation. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(1), 66–77. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw219>
- Bahn, S. Y., Jo, B. H., Choi, Y. S., & Cha, H. J. (2017). Control of nacre biomineralization by Pif80 in pearl oyster. *Science Advances*, *3*(8), e1700765. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700765>
- Bahn, S. Y., Jo, B. H., Hwang, B. H., Choi, Y. S., & Cha, H. J. (2015). Role of Pif97 in Nacre Biomineralization: In Vitro Characterization of Recombinant Pif97 as a Framework Protein for the Association of Organic-Inorganic Layers in Nacre. *Crystal Growth and Design*, *15*(8), 3666–3673. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00275>

- Boskey, A. L., & Villarreal-Ramirez, E. (2016). Intrinsically disordered proteins and biomineralization. *Matrix Biology*, 52–54, 43–59.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.01.007>
- Brown, A. H., Rodger, P. M., Evans, J. S., & Walsh, R. (2014). Equilibrium Conformational Ensemble of the Intrinsically Disordered Peptide n16N: Linking Subdomain Structures and Function in Nacre. *Biomacromolecules*, 15(12), 4467–4479. <https://doi.org/10.1021/bm501263s>
- Brusca, R., & Brusca, G. (2005). *Invertebrados. PhD Proposal* (2a ed., Vol. 1).
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Checa, A. G., Cartwright, J. H. E., & Willinger, M. G. (2011). Mineral bridges in nacre. *Journal of Structural Biology*, 176(3), 330–339.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.09.011>
- Collino, S., & Evans, J. S. (2008). Molecular specifications of a mineral modulation sequence derived from the aragonite-promoting Protein n16. *Biomacromolecules*, 9(7), 1909–1918. <https://doi.org/10.1021/bm8001599>
- Cortez-Trujillo, F. (2016). Caracterización de perlina una proteína intra mineral de las valvas de *Pinctada mazatlanica* (Tesis de licenciatura). Universidad tecnológica de Toluca. Toluca, México.
- Demichelis, R., Schuitemaker, A., Garcia, N. A., Koziara, K. B., Pierre, M. D. La, Raiteri, P., & Gale, J. D. (2018). Simulation of Crystallization of Biominerals, (February), 1–26.
- Ding, F. X., Yan, H. L., Mei, Q., Xue, G., Wang, Y. Z., Gao, Y. J., & Sun, S. H. (2007). A novel, cheap and effective fusion expression system for the production of recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(2), 483–488. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1160-0>

- Estroff, L. A., Addadi, L., Weiner, S., Hamilton, A. D., Whiteside, G. M., Science, M., & Investigator, W. Y. (2008). Introduction : Biomineralization. *Chemical Reviews*, *108*(11), 10–12. <https://doi.org/10.1021/cr8004789>
- Evans, J. S. (2008). “Tuning in ” to Mollusk Shell Nacre- and Prismatic-Associated Protein Terminal Sequences . Implications for Biomineralization and the Construction of High Performance Inorganic - Organic Composites. *Chemical Reviews*, *108*(11), 4455–4462. <https://doi.org/10.1021/cr078251e>
- Evans, J. S. (2012). Sequence analysis Aragonite-associated biomineralization proteins are disordered and contain interactive motifs. *Bioinformatics*, *28*(24), 3182–3185. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts604>
- Ferré-D’Amaré, A. R., & Burley, S. K. (1994). Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. *Structure*, *2*(5), 357–359. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00037-X)
- Gong, N., Ma, Z., Li, Q., Li, Q., Yan, Z., Xie, L., & Zhang, R. (2008). Characterization of calcium deposition and shell matrix protein secretion in primary mantle tissue culture from the marine pearl oyster *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, *10*(4), 457–65. <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9081-1>
- Goodin, J. L., Raab, R. W., McKown, R. L., Coffman, G. L., Powell, B. S., Enama, J. T., ... Andrews, G. P. (2005). Yersinia pestis outer membrane type III secretion protein YscC: Expression, purification, characterization, and induction of specific antiserum. *Protein Expression and Purification*, *40*(1), 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.11.001>
- Gower, L. B. (2013). Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization. *Chemical Reviews*, *108*(11), 1–11. <https://doi.org/10.1021/cr800443h>.Biomimetic

- Hare, P. E. (1963). Amino Acids in the Proteins from Aragonite and Calcite in the Shells of *Mytilus californianus*. *Science*, 139(3551), 216 LP-217. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/139/3551/216.abstract>
- Huang, G., Bi, X., Zhang, B., Qu, T., Liu, B., Fan, S., & Yu, D. (2017). Expression, Purification, and Functional Activity of Shell Matrix Protein Pearlin from the Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Shellfish Research*, 36(2), 373–377. <https://doi.org/10.2983/035.036.0210>
- Kalmar, L., Homola, D., Varga, G., & Tompa, P. (2012). Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomineralization. *Bone*, 51(3), 528–534. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.05.009>
- Keene, E. C., Evans, J. S., & Estroff, L. A. (2010a). Matrix Interactions in Biomineralization : Aragonite Nucleation by an Intrinsically Disordered Nacre Polypeptide , n16N , Associated with a β -Chitin Substrate. *Cryst. Growth Des*, 10(3), 1383–1389. <https://doi.org/10.1021/cg901389v>
- Keene, E. C., Evans, J. S., & Estroff, L. A. (2010b). Silk Fibroin Hydrogels Coupled with the n16N - β -Chitin Complex : An in Vitro Organic Matrix for Controlling Calcium Carbonate Mineralization. *Cryst. Growth Des*, 10(12), pp 5169–5175. <https://doi.org/10.1021/cg1009303>
- Kim, I. W., Dimasi, E., & Evans, J. S. (2004). Identification of Mineral Modulation Sequences within the Nacre-Associated Oyster Shell Protein, n16. *Crystal Growth & Design*, 4(6), 1113–1118. <https://doi.org/10.1021/cg049919a>
- Kocot, K. M., Aguilera, F., McDougall, C., Jackson, D. J., & Degnan, B. M. (2016). Sea shell diversity and rapidly evolving secretomes: insights into the evolution of biomineralization. *Frontiers in Zoology*, 13(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0155-z>

- Liu, X., Li, J., Xiang, L., Sun, J., Zheng, G., Zhang, G., ... Zhang, R. (2011). The role of matrix proteins in the control of nacreous layer deposition during pearl formation. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. [https://doi.org/279\(1730\), 1000-1007](https://doi.org/279(1730), 1000-1007).
- Marin, F., & Luquet, G. (2004). Molluscan shell proteins. *Paleovol*, 3, 469–492. <https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.07.009>
- Marin, F., Le Roy, N., & Marie, B. (2012). The formation and mineralization of mollusk shell. *Frontiers in Bioscience*, S4(1), 1099. <https://doi.org/10.2741/S321>
- Marin, F., Luquet, G., Marie, B., & Medakovic, D. (2007). Molluscan Shell Proteins: Primary Structure, Origin, and Evolution. *Current Topics in Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(07\)80006-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(07)80006-8)
- Marin, F., & Luquet, G. (2008). Unusually Acidic Proteins in Biomineralization. In E. Bäuerlein (Ed.), *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation* (1st ed., Vol. 1, pp. 273–290). Planegg, Germany. <https://doi.org/10.1002/9783527619443.ch16>
- Marin, F., Marie, B., Hamada, S. Ben, Silva, P., Roy, N. Le, Wolf, S. E., ... Marie, B. (2013). “Shellome”: proteins involved in mollusc shell biomineralization – diversity, functions. *Recent Advances in Pearl Research*, (33), 149–166. Retrieved from <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00793668/>
- Massiah, M. A., Wright, K. M., & Du, H. (2016). Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl , Triton X-100 , and CHAPS : Application to LB and M9 Minimal Media. *Curr. Protoc. Protein Sci*, 84(6), 1–24. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0613s84>
- Metzler, R. A., Evans, J. S., Killian, C. E., Zhou, D., Churchill, T. H., Appathurai, N. P.,

& Coppersmith, S. N. (2010). Nacre Protein Fragment Templates Lamellar Aragonite Growth. *J. Am. Chem. Soc.*, *132*(8), 6329–6334.

<https://doi.org/10.1021/ja909735y>

Michio, S., Kazuko, S., Toshihiro, K., Yuya, Y., Tatsuya, N., Takashi, K., & Hiromichi, N. (2009). An Acidic Matrix Protein Pif Is a Key Macromolecule for Nacre Formation. *Science*, *325*(5946), 1388–1390. <https://doi.org/10.1126/science.1175111>, 1388-1390

Miyamoto, H., Miyshita, T., Okushima, M., Nakano, A., Morita, T., & Matsushiro, A. (1996). A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls.

Proceedings of the National Academy of Sciences, *93*, 9657–9660.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9657>, 9657-9660

Miyashita, T., Takagi, R., Okushima, M., Nakano, S., Miyamoto, H., Nishikawa, E., & Matsushiro, A. (2000). Complementary DNA Cloning and Characterization of Pearlins, a New Class of Matrix Protein in the Nacreous Layer of Oyster Pearls.

Marine Biotechnology (New York, N.Y.), *2*(5), 409–418.

<https://doi.org/10.1007/s101260000013>

Montagnani, C., Marie, B., & Marin, F. (2011). Pmarg-Pearlin is a Matrix Protein Involved in Nacre Framework Formation in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. Retrieved from

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbic.201100216/full>

Monteforte, M., & Cariño, M. (2013). Condiciones para el desarrollo de granjas perleras y producción de perlas: Estado del arte, potencial y perspectivas.

Revista de Biología Marina y Oceanografía. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000100001>

Morassutti, C., De Amicis, F., Bandiera, A., & Marchetti, S. (2005). Expression of

SMAP-29 cathelicidin-like peptide in bacterial cells by intein-mediated system. *Protein Expression and Purification*, 39(2), 160–168.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.11.006>

Nakae, S., Shionyu, M., Ogawa, T., & Shirai, T. (2018). Structures of jacalin-related lectin PPL3 regulating pearl shell biomineralization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 86(6), 644–653.

<https://doi.org/10.1002/prot.25491>

Ndao, M., Ponce, C. B., & Evans, J. S. (2012). Oligomer formation, metalation, and the existence of aggregation-prone and mobile sequences within the intracrystalline protein family, Asprich. *Faraday Discussions*, 159(64), 449.

<https://doi.org/10.1039/c2fd20064c>

Nudelman, F. (2015). Nacre biomineralisation: A review on the mechanisms of crystal nucleation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 46, 2–10.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.004>

Pan, C., Fang, D., Xu, G., Liang, J., Zhang, G., Wang, H., ... Zhang, R. (2014). A novel acidic matrix protein PfN44 stabilizes magnesium calcite to inhibit the crystallization of aragonite. *Journal of Biological Chemistry*, 289(5), 2776–2787.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.504027>

Perovic, I., Chang, E. P., Lui, M., Rao, A., Cölfen, H., & Evans, J. S. (2014). A nacre protein, n16.3, self-assembles to form protein oligomers that dimensionally limit and organize mineral deposits. *Biochemistry*, 53(16), 2739–2748.

<https://doi.org/10.1021/bi401721z>

Perovic, I., Mandal, T., & Evans, J. S. (2013). A pearl protein self-assembles to form protein complexes that amplify mineralization. *Biochemistry*, 52(33), 5696–5703.

<https://doi.org/10.1021/bi400808j>

- Ponce, C. B., & Evans, J. S. (2011a). Polymorph crystal selection by n16, an intrinsically disordered nacre framework protein. *Crystal Growth and Design*, *11*(10), 4690–4696. <https://doi.org/10.1021/cg201015w>
- Rutter, G. O., Brown, A. H., Quigley, D., Walsh, T. R., & Allen, M. P. (2015). Testing the transferability of a coarse-grained model to intrinsically disordered proteins. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *17*(47), 31741–31749. <https://doi.org/10.1039/C5CP05652G>
- Rutter, G. O., Brown, A. H., Quigley, D., Walsh, T. R., & Allen, M. P. (2018). Emergence of order in self-assembly of the intrinsically disordered biomineralisation peptide n16N. *Molecular Simulation*, *44*(6), 463–469. <https://doi.org/10.1080/08927022.2017.1405158>
- Samata, T., Hayashi, N., Kono, M., Hasegawa, K., Horita, C., & Akera, S. (1999). A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01387-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01387-3)
- Sarem, M., & Lüdeke, S. (2015). Circular dichroism: A powerful tool for studying biomineralization promoter proteins. *MRS Bulletin*, *40*(06), 490–498. <https://doi.org/10.1557/mrs.2015.116>
- Seto, J., Picker, A., Chen, Y., Rao, A., Evans, J. S., & Cölfen, H. (2014). Nacre protein sequence compartmentalizes mineral polymorphs in solution. *Crystal Growth and Design*, *14*(4), 1501–1505. <https://doi.org/10.1021/cg401421h>
- Shi, Y., Yu, C., Gu, Z., Zhan, X., Wang, Y., & Wang, A. (2013). Characterization of the Pearl Oyster (*Pinctada martensii*) Mantle Transcriptome Unravels Biomineralization Genes. *Marine Biotechnology*, *15*, 175–187. <https://doi.org/10.1007/s10126-012-9476-x>
- Skinner, H. C. W. (2005). Biominerals. *Mineralogical Magazine*, *69*(5), 621–641.

<https://doi.org/10.1180/0026461056950275>

Suzuki, M., Saruwatari, K., Kogure, T., Yamamoto, Y., & Nishimura, T. (2009). An Acidic Matrix Protein, Pif, Is a Key Macromolecule for Nacre Formation, *325*(SEPTEMBER), 1388–1391.

Takeuchi, T., Sarashina, I., Iijima, M., & Endo, K. (2008). In vitro regulation of CaCO₃ crystal polymorphism by the highly acidic molluscan shell protein Aspein. *FEBS Letters*, *582*(5), 591–596.

<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.01.026>

Weber, E., Guth, C., & Weiss, I. M. (2012). GFP Facilitates Native Purification of Recombinant Perleucine Derivatives and Delays the Precipitation of Calcium Carbonate. *PLoS ONE*, *7*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046653>

Weiner, S., & Addadi, L. (2011). Crystallization Pathways in Biomineralization. *Annual Review of Materials Research*, *41*(1), 21–40.

<https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-062910-095803>

Wu, X., & Oppermann, U. (2003). High-level expression and rapid purification of rare-codon genes from hyperthermophilic archaea by the GST gene fusion system. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *786*(1–2), 177–185.

[https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00810-3](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00810-3)

Wilt, F. H. (2005). Developmental biology meets materials science: Morphogenesis of biomineralized structures. *Developmental Biology*, *280*(1), 15–25.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.019>

Xiang, L., Su, J., Zheng, G., Liang, J., Zhang, G., Wang, H., ... Zhang, R. (2013). Patterns of Expression in the Matrix Proteins Responsible for Nucleation and Growth of Aragonite Crystals in Flat Pearls of *Pinctada fucata*. *PLoS ONE*, *8*(6).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066564>

Xu, Z. Y., Liu, Y. L., Lin, J. B., Cheng, K. L., Wang, Y. G., Yao, H. L., ... Li. (2018). Preparative expression and purification of a nacreous protein N16 and testing its effect on osteoporosis rat model. *International Journal of Biological Macromolecules*, *111*, 440–445.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.054>

Yan, Y., Yang, D., Yang, X., Liu, C., Xie, J., Zheng, G., ... Zhang, R. (2017). A Novel Matrix Protein, PfY2, Functions as a Crucial Macromolecule during Shell Formation. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06375-w>

Yano, M., Nagai, K., Morimoto, K., & Miyamoto, H. (2007). A novel nacre protein N19 in the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *362*(1), 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.172>

Zhang, C., Li, S., Ma, Z., Xie, L., & Zhang, R. (2006). A novel matrix protein p10 from the nacre of pearl oyster (*Pinctada fucata*) and its effects on both CaCO₃ crystal formation and mineralogenic cells. *Marine Biotechnology*, *8*(6), 624–633. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-6029-6>

Zhang, C., & Zhang, R. (2006). Matrix proteins in the outer shells of molluscs. *Marine Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-6029-6>

Zhang, G., Brion, A., Willemin, A. S., Piet, M. H., Moby, V., Bianchi, A., ... Rousseau, M. (2016). Nacre, a natural, multi-use, and timely biomaterial for bone graft substitution. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 662–671. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35939>

Zhang, Y., Xie, L., Meng, Q., Jiang, T., Pu, R., Chen, L., & Zhang, R. (2003). A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster,

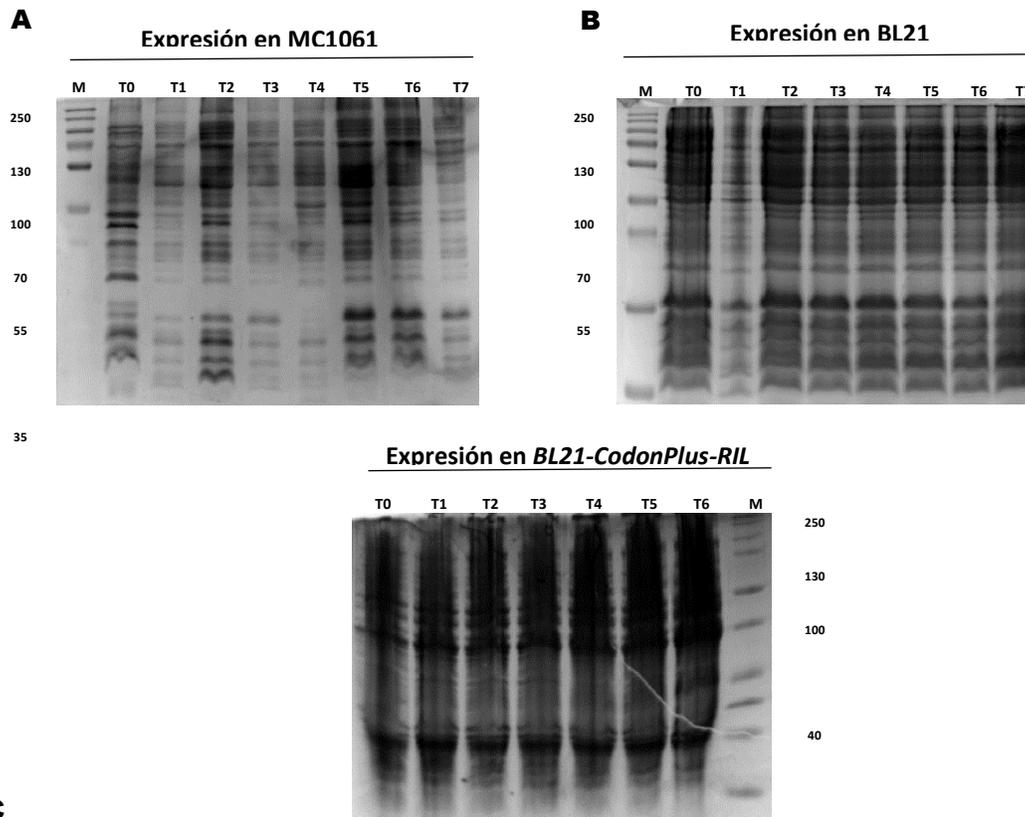
Pinctada fucata. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(03\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00138-6)

Anexos

Anexo 1

Evaluación de la expresión de la en diferentes cepas de *E. coli*.

Se evaluó la expresión de $r_{perlina_{pf}}$ en las cepas MC1061, ER2566, BL21 y *BL21-CodonPlus-RIL* de *E. coli*. Durante el proceso solo se observó expresión de la proteína en la fracción insoluble de la cepa ER2566, por lo que se decidió trabajar con estas condiciones. A continuación, se muestran los gels correspondientes a cada una de las cepas evaluadas.



Proceso de expresión de la $r_{perlina_{pf}}$ en diferentes cepas Electroforesis de SDS-PAGE al 15%, donde se muestran la inducción de la $r_{perlina_{pf}}$ en el extracto crudos obtenido de la fracción insoluble del cultivo tomados cada hora, a partir de la inducción con IPTG (Tiempo 0). (M) Marcador en kDa. **(A)** Ceba MC1061. **(B)** Ceba BL21. **(C)** *BL21-CodonPlus-RIL*. Todas las pruebas de expresión se realizaron a 37 °C.

Laboratorio Universitario de Proteómica
IBT/UNAM

Servicios de identificación, caracterización estructural y cuantificación de proteínas a través de la Espectrometría de Masas de alta resolución.

Usuario: Elena Lizbeth Garcia Villegas
Teléfono: 3338319294
E. mail: eliz@ibt.unam.mx; rudino@ibt.unam.mx
Jefe de Grupo: Dr. Enrique Rudiño
Institución: IBT-UNAM
Número de Muestras :1
Tipo de servicio: Identificación de proteínas
Fecha de recepción de muestra: 2/6/2016

RESULTADOS
MUESTRA-51-2016

Búsqueda de identidad utilizando base de datos de O97048 y I2FK00

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	MW [kDa]	calc. pI
O97048	N16.5 matrix protein OS=Pinctada fucata PE=1 SV=1 - [MA165_PINFU]	546.97	63.57	8	9	467	15.4	6.49

MTCTLRWTIT ALVLLGICHL ARPAFRTKCG R **YSYCWIPYD IER** DRYDNGD KKCCFCR **NAW**
SPWQCKEDER YEWLRCGHK**F** **YMCCTDDDD** **NGNGNGNGNG** **FNYLKSLYGG YGNGNGEFWE**
EYIDERYDK

Sequence	# PSMs	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
SLYGGYGnGnGEFWE EYIDER	12	N8(Deamidated); N10(Deamidated)	5.61	2	2457.0 1909	1.49	1229.0 1318	43.79	0
SLYGGYGNGNGEFW EEYIDER	5		5.45	2	2455.0 4424	-1.28	1228.0 2576	41.95	0

SLYGGYGnGnGEFWE EYIDER	24	N10(Deamidated)	4.3 0	2	2456.0 2886	-1.04	1228.5 1807	47.51	0
SLYGGYGnGnGEFWE EYIDERYDK	8	N8(Deamidated); N10(Deamidated)	3.9 9	2	2863.2 0244	0.62	1432.1 0486	44.04	1
SLYGGYGnGNGEFWE EYIDERYDK	16	N8(Deamidated)	3.9 0	2	2862.2 0903	-2.66	1431.6 0815	42.74	1
YSYcWIPYDIER	52	C4(Carbamidometh yl)	3.8 7	2	1664.7 3845	-1.76	832.87 286	38.58	0
SLYGGYGnGNGEFW EEYIDERYDK	8		3.7 1	2	2861.2 2515	-2.62	1431.1 1621	42.25	1
NAWSPWQcKEDER	2	C8(Carbamidometh yl)	3.1 6	2	1705.7 3772	-0.64	853.37 250	25.82	1
FYYmccYTDDDNGNG nGnGnGFNYLK	29	M4(Oxidation); C5(Carbamidometh yl); C6(Carbamidometh yl); N16(Deamidated); N18(Deamidated); N20(Deamidated)	2.7 1	2	3092.1 2969	0.15	1546.5 6848	34.62	0
NAWSPWQcK	116	C8(Carbamidometh yl)	2.5 9	1	1176.5 2283	-2.30	1176.5 2283	26.25	0
EDERYEWLR	112		2.0 1	2	1295.6 0015	-1.08	648.30 371	19.74	1

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
I2FK00	Pearlin protein (Fragment) OS=Pinctada fucata GN=pearlin PE=4 SV=1 - [I2FK00_PINFU]	393.2 0	53.70	6	7	12.9	7.96

MTCTLRWTIT ALVLLGICHL ARPAFRTKCG RYSYCWIPYD IERDRYDNGD KKCCFCR NAW SPWQCKEDER
YEWLR CGHK FYYMCCYTDDD NGNGNGNGNG FNYLKSLY

Sequence	# PSMs	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
FYYMccYTDDDNGNG nGnGnGFNYLK	6	C5(Carbamidometh yl); C6(Carbamidometh yl); N16(Deamidated) ; N18(Deamidated) ; N20(Deamidated)	5.3 6	3	3076.1 3303	-0.42	1026.0 4919	38.41	0
YSYcWIPYDIER	52	C4(Carbamidometh yl)	3.8 7	2	1664.7 3845	-1.76	832.87 286	38.58	0

NAWSPWQcKEDER	2	C8(Carbamidomet hyl)	3.1 6	2	1705.7 3772	-0.64	853.37 250	25.82	1
NAWSPWQcK	116	C8(Carbamidomet hyl)	2.5 9	1	1176.5 2283	-2.30	1176.5 2283	26.25	0
EDERYEWLR	112		2.0 1	2	1295.6 0015	-1.08	648.30 371	19.74	1

Búsqueda de identidad utilizando base de datos de *E.coli*

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A7Z SL6	30S ribosomal protein S7 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=rpsG PE=3 SV=1 - [RS7_ECO24]	26 7.9 5	55.1 3 %	8	11	17.6	10. 30

MPRRRVIGQR KILPDPKFGS ELLAK **FVNIL MVDGKKSTAE SIVYSALET L AQRSGKSELE**
AFEVALENVR PTVEVKSRRV **GGSTYQVPVE VRPVR**RNALA MRWIVEAARK RGDKSMALRL
ANELSDAAEN KGTAVKKRED VHRMAEANKA FAHYRW

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
SGKSELEAFEVALENVRPTVEVK		6.95	3	2531.33146	-1.52	844.44867	47.79	1
SELEAFEVALENVRPTVEVK		5.21	2	2259.18266	-1.84	1130.09497	48.35	0
LANELSDAAENK		4.44	2	1274.61992	-1.91	637.81360	4.83	0
RVGGSTYQVPVEVRPVR		4.31	3	1899.05271	-1.73	633.68909	28.20	1
VGGSTYQVPVEVRPVR		3.49	2	1742.95207	-1.60	871.97968	29.25	0
FVNILMVDGKK		3.43	2	1263.71074	-1.81	632.35901	32.98	1
FVNILmVDGKK	M6(Oxidation)	3.17	2	1279.70586	-1.63	640.35657	30.45	1

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A0A027Z CD5	Peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein OS=Escherichia coli O91:H14 str. 2009C-3227 GN=BX07_17860 PE=3 SV=1 - [A0A027ZCD5_ECOLX]	114. 95	29.48	3	3	18.9	7.43

MQLNKVLKGL MIALPVMAIA ACSSNKNASN DGSEGLGAG TGM YANGGNG NMSSEEQARL
OMQQLQQNNI VYFDLDKYDI RSDFAQMLDA HANFLRSNPS YKVTVEGHAD ERGTPEYNIS
 LGERRANAVK MYLQGK**GVSA DQISIVSYGK** EKPAVLGHDE AAYSKNRRRAV LRV

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
LQmQQLQQnNIVYFDLDKY DIR	M3(Oxidation) ; N9(Deamidated)	7.69	3	2802.38010	1.18	934.79822	41.99	1
LQMQLQQNNIVYFDLDKY DIR		5.90	3	2785.39597	-0.68	929.13684	45.21	1
LQmQQLQQNNIVYFDLDKY DIR	M3(Oxidation)	5.34	3	2801.39170	-0.39	934.46875	42.05	1
SDFQAQMLDAHANFLR		5.31	2	1735.81987	-1.31	868.41357	42.18	0
GVSAQDQISIVSYGK		5.23	2	1423.74114	-1.16	712.37421	30.13	0
SDFQAQmLDAHANFLR	M6(Oxidation)	4.68	2	1751.81401	-1.74	876.41064	36.02	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc . pI
A0A090BZW5	30S ribosomal protein S5 OS=Escherichia coli GN=rpsE PE=3 SV=1 - [A0A090BZW5_ECOLX]	82.37	57.49	6	6	17.5	10.23

MAHIEKQAGE LQEKLIAVNR VSKTVKGGRI **FSFTALTVVG DGNGR**VGFGY GKAREVPAAI
 QKAMEKARRN **MINVALNNGT LQHPVKGVHT GSRVFMQPAS EGTGIIAGGA MRVLEVAGV**
HNVLAKAYGS TNPINVVRR IDGLENMNSP AMVAAKRGKS VEEILGK

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
VFmQPASEGTGIIAGGAmR	M3(Oxidation); M18(Oxidation)	5.69	2	1924.92217	-1.82	962.96472	28.30	0
VFmQPASEGTGIIAGGAMR	M3(Oxidation)	4.84	2	1908.92864	-1.11	954.96796	31.88	0
AVLEVAGVHNVLAK		4.80	2	1419.83110	-0.56	710.41919	32.62	0
AYGSTNPINVVRR		3.83	2	1290.68010	-0.02	645.84369	24.49	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A7Z UJ8	50S ribosomal protein L10 OS=Escherichia coli O139:H28 (strain E24377A / ETEC) GN=rpLJ PE=3 SV=1 - [RL10_ECO24]	79.80	37.58	4	4	17.7	8.98

MALNLQDK**QA IVAEVSEVAK** GALSAVVADS RGVTVDKMT E LRKAGREAGV YMRVVRNTLL
 RRAVEGTPFE CLK**DAFVGPT LIAYSMEHPG AAR**LFKEFA KANAKFEVKA **AAFEGELIPA**
SQIDRLATLP TYEEAIARLM ATMKEASAGK LVRTLAAVRD AKEAA

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
DAFVGPTLIAYSMEHPG AAR		5.62	2	2174.06474	-2.42	1087.53601	42.39	0
AAFEGELIPASQIDR		4.84	2	1687.86333	-1.03	844.43530	34.29	0
DAFVGPTLIAYSMEHPG AAR	M13(Oxidation)	4.60	2	2190.06059	-1.98	1095.53394	35.89	0
LATLPTYEEAIAR		3.36	2	1447.77776	-0.98	724.39252	33.16	0
QAIVAEVSEVAK		3.27	2	1243.68730	-1.61	622.34729	29.45	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A0A0171763	50S ribosomal protein L13 OS=Escherichia coli 1-176-05_S3_C2 GN=rpIM PE=3 SV=1 - [A0A0171763_ECOLX]	44.75	27.46	4	4	16.0	9.82

MKTFTAKPET VKR**DWYVVDA TGR**TLGRLAS ELALRLRGKH **KAEYTPHVD T GDYIIVLNAD**
KVAVTGNKRT DKVYYHHTGH IGGIKQATFE EMIARRPERV IEIAVKGMLP KGPLGRAMFR
 KLVYAGNEH NHAAQQPQVL DI

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
AEYTPHVD TGDYIIVLNADKVA VTGNK		7.17	3	2903.47904	0.14	968.49786	41.30	1
AEYTPHVD TGDYIIVLNADK		6.22	2	2234.09160	-2.70	1117.54944	36.82	0
HKAEYTPHVD TGDYIIVLNADK		4.75	3	2499.24588	-2.25	833.75348	35.05	1
DWYVVDATGK		3.78	1	1153.54968	-2.41	1153.54968	27.51	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
E7I5H3	Ferritin OS=Escherichia coli LT-68 GN=ECLT68_0741 PE=3 SV=1 - [E7I5H3_ECOLX]	37.29	39.38	3	3	18.8	4.81

MIKLNQMN LELYSSLLYQ QMSAWCSYHT FEGAAFLRR HAQEEMTHMQ R**LFDYLTDTG**
NLPRINTVES PFAEYSSLDE LFQETYKHEQ LITQKINELA HAAMTNQDYP TFNFLQWYVS
 EQHEEEKLFK SIIDKLSLAG K**SGEGLYFID KELSTLDTQ**N

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
SGEGLYFIDKELSTLDTQN		5.86	2	2130.02080	-1.41	1065.51404	46.74	1
LFDYLTDGTGNLPR		5.04	2	1524.76726	-1.37	762.88727	36.13	0
INTVESPFAEYSSLDLDFQETYKHEQLITQK		4.50	4	3687.80190	-1.27	922.70593	52.51	1

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A0A025CV90	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli O145:NM str. 2010C-3526 GN=BX51_03055 PE=4 SV=1 - [A0A025CV90_ECOLX]	34.90	43.24	4	4	19.8	5.54

MRNLVKYVGI GLLVMGLAAC DDKDTNATAQ GSAESNATG NPVNLLDGK**L SFSLPADMTD QSGK**LGTQAN NMHVSDATG QK**AVIVIMGD DPKEDLAVLA KR**LEDQQRSH DPQLQVVTNK AIELKGHKMQ QLDSIISAK**G QTAYSSVILG NVGNQLLTMQ ITLPADNQK** **AQTTAENIIN TLVIQ**

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
AVIVImGDDPKEDLAVLAK	M6(Oxidation)	5.40	2	2013.09233	-0.72	1007.04980	37.08	1
GQTAYSSVILGNVGNQLLTMQITLPA DnQQK	N28(Deamidated)	5.05	3	3303.68479	-1.30	1101.89978	50.44	0
AQTTAENIINTLVIQ		4.53	2	1628.88323	-1.36	814.94525	43.24	0
LSFSLPADMTDQSGK		3.49	2	1596.75481	-1.67	798.88104	35.55	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
Q0TFJ0	Lipopolysaccharide core heptose(II)-phosphate phosphatase OS=Escherichia coli O6:K15:H31 (strain 536 / UPEC) GN=ais PE=3 SV=1 - [AIS_ECOL5]	31.31	26.00	1	3	22.4	9.29

MLAFCRSSLK SKKYFIILLA LAAIAGLGTH AAWSSNGLPR IDNKTLAR**LA QQHPVVVLF**R HAERCDRSTN QCLSDKTGIT VKGTQDAR**EL GNAFSADIPD FNLYSSNTVR** TIQSATWFSA GKKLTVDKRF LQCGNEIYSA IKDLQRKAPD KNIVIFTHNH CLTYIAKDKR **DATFKPDYLD GLVMHVEK**GK VYLDGEFVNH

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
DATFKPDYLDGLVmHVEK	M14(Oxidation)	5.99	3	2094.01938	-0.92	698.67798	39.70	0
ELGNAFSADIPDFnLYSSNTVR	N14(Deamidated)	5.06	2	2431.13799	-1.37	1216.07263	45.10	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A0A0B1K325	Heptose kinase OS=Escherichia coli GN=ais PE=3 SV=1 - [A0A0B1K325_ECOLX]	31.31	26.00	2	3	22.2	9.17

MLAFCRSSLK SKKYIILLLA LAAIAGLGTH AAWSSNGLPR IDNKTLAR**LA QQHPVVVLF**
 HAERCDRSTN QCLSDKTGIT VKGTQDAR**EL GNAFSADIPD FDLYSSNTVR** TIQSATWFSA
 GKKLTVDKRL LQCGNEIYSA IKDLQSKAPD KNIVIFTHNH CLTYIAKDKR **NATFKPDYLD**
GLVMHVEKGK VYLDGEFVNH

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A0A070DPB5	Probable thiol peroxidase OS=Escherichia coli O145:H25 str. 07-3858 GN=tpx PE=3 SV=1 - [A0A070DPB5_ECOLX]	24.12	28.74	1	3	17.8	4.92

MSQTVHFQGN PVTVANSIPQ AGSKAQFTTL VAK**DLSDVTL GQFAGK**RKVL NIFPSIDTGV
 CAASVRKFNQ LATEIDNTVV LCISADLPFA QSR**FCGAEGL NNVITLSTFR** **NAEFLQAYG**
AIADGPLKGL AARAVVVIDE NDNVIFSQLV DEITTEPDYE AALAVLR

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
NAEFLQAYGVAIADGPLK		6.25	2	1876.97905	-0.74	938.99316	43.36	0
FcGAEGLNNVITLSTFR	C2(Carbamidomethyl)	5.23	2	1898.94133	-0.88	949.97430	43.50	0
DLSDVTLGQFAGK		3.29	2	1350.68743	-1.94	675.84735	33.48	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
M8SPW1	Bacterioferritin OS=Escherichia coli 2871950 GN=bfr PE=3 SV=1 - [M8SPW1_ECOLX]	23.17	21.09	2	2	15.0	4.58

MFKNWGLKRL NDVEYHESID EMKHADRYIE R**ILFLEGLPN LQDLGKLNIG EDVEEMLR**SD
 LALELDGAKN LREAIGYADS VHDYVSRDMM IEILRDEEGH IDWLETELDL IQKMGLQNYL
 QAQIREEG

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
ILFLEGLPNLQDLGK		4.91	2	1669.94951	-1.74	835.47839	50.29	0
LNIGEDVEEMLR		3.75	2	1417.69646	-1.96	709.35187	43.61	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
L9IRW8	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli 3.4880 GN=EC34880_0547 PE=4 SV=1 - [L9IRW8_ECOLX]	11.66	24.34	2	2	16.6	8.40

MGVTVSINGA DQRTDQALAK VTRDNQIVTL TASRDLR **FLLQEIVLEK**QMTA RGYMVGPNGP
VNLQIIVSQL YADVSQGNVR YNIATKADIA IIATAQNGNK MTKNYRASYN VEGAFQASNK
NIADAVNSVL TDTIADMSQD TSIHEFIKQN AR

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
NIADAVNSVL TDTIADMSQD TSIHEFIK		4.81	3	3048.48026	-0.95	1016.83160	57.67	0
FLLQEIVLEK		3.13	2	1118.64177	-3.46	559.82452	37.69	0

Accession	Description	Score	Coverage	# Unique Peptides	# Peptides	MW [kDa]	calc. pI
A0A079CEP7	DNA-binding protein H-NS (Fragment) OS=Escherichia coli 2-316-03_S4_C3 GN=AD30_5632 PE=4 SV=1 - [A0A079CEP7_ECOLX]	4.78	15.67	1	1	15.2	5.76

ALKILNNIRT LRAQARECTL ETLEEMLEKL EVVNERREE ESAAAAEVEE RTRKLQQYR **E**
MLIADGIDPN ELLNSLAVK SGTKAKRAQR PAKYSYVDEN GETKTWTGQG RTPAVIKKAM
DEQGKSLDDF LIKQ

Sequence	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
EmLIADGIDPNELLNSLAVK	M2(Oxidation)	4.78	2	2242.15923	-1.98	1121.58325	50.92	0

METODOLOGÍA

Las muestras fueron previamente reducidas con dithiothreitol (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA), alquiladas con iodoacetamide (Sigma-Aldrich) y digerida "in gel" 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 μm 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 según 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 contra la base de datos obtenidas de UniProt a través del programa Discoverer 1.4 (Thermo-Fisher Co., San Jose, CA, USA).

Motor de búsqueda: Sequest HT

Base de datos: UniProt (I2FK00, O97048 y E.coli)

Modificación constante: Carbamidomethyl (Cisteínas)

Modificaciones variables: Oxidation (M) y Deamidated (NQ)

Enzima proteolítica: Tripsina

Número máximo de "Missed cleavages": 2

Contaminantes como keratina no son reportados

CUENTA

-Identificación de proteínas por LC-MS/MS, 1 muestra

Precio Total:\$1,500.00 M.N.

Junio 8, 2016.

Atentamente,

Dr. Cesar V. F. Batista

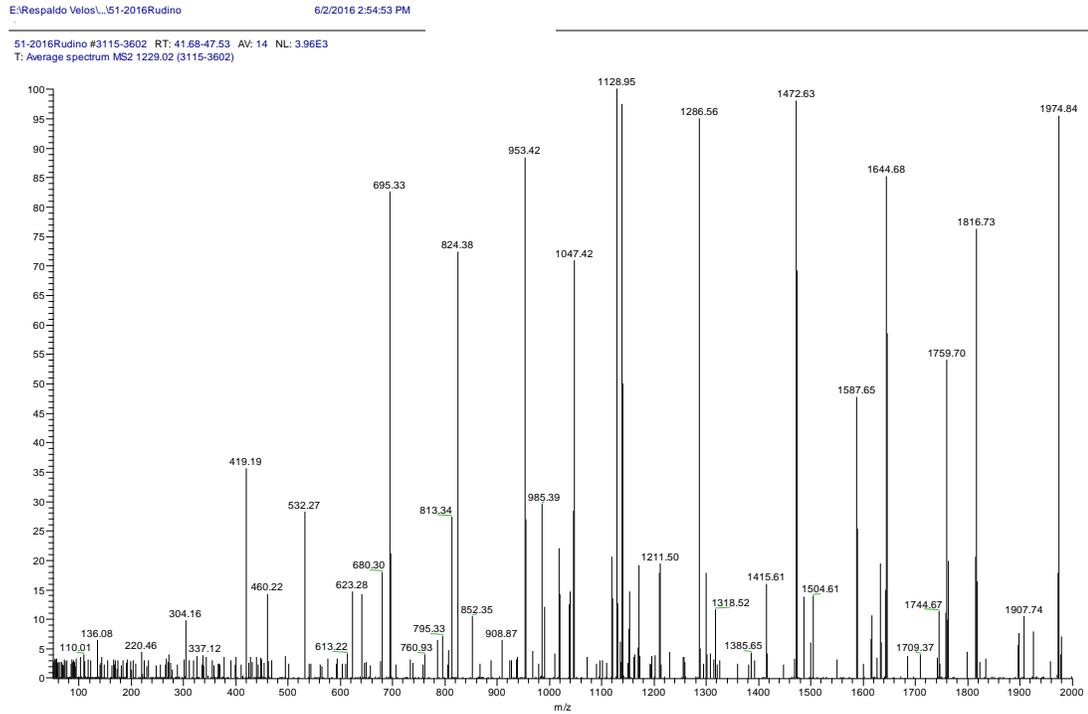
Jefe del L.U.P.

*******Nota: Conservar el número de folio para cualquier aclaración.*******

Anexo 3

Espectrometría de masas de la cristalización de la rperlina_{pf}.

Sequence	# PSMs	Modifications	XCorr	Charge	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	m/z [Da]	RT [min]	# Missed Cleavages
<u>SLYGGYGnGnGEFWEEYIDER</u>	<u>12</u>	<u>N8(Deamidated); N10(Deamidated)</u>	<u>5.61</u>	<u>2</u>	<u>2457.01909</u>	<u>1.49</u>	<u>1229.01318</u>	<u>43.79</u>	<u>0</u>



Espectrometría de masas de la cristalización de la rperlina_{pf}.

Anexo 4

Matrices de optimización diseñadas a partir de las mejores condiciones de cristalización de la $r_{perlina_{pf}}$. Con el cristal verde se señalan los cristales encontrados en las matrices de optimización.

Matriz 1

Condición de cristalización inicial:

Condición 11 del “kit” “Natrix”

0.1 M cloruro de magnesio, 0.05 M cacodilato pH 6,5 ,1 M sulfato de litio

2.5 M	2 M	1.5 M	1 M	0.5 M	0.25 M	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 2

Condición de cristalización inicial:

Condición 15 del “kit” “Natrix”

0.04 M cloruro de magnesio, 0.05 M cacodilato pH 6, 5% MPD

40 %	35 %	30 %	25 %	20 %	15 %	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL
						1.5 mg/mL

Matriz 3

Condición de cristalización inicial:

Condición 23 del "kit" "Natrix"

0.04 M cloruro de magnesio, 0.05 M cacodilato pH 6.5, 20% PEG 4000

40%	35%	30%	25%	20%	15%	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 4

Condición de cristalización inicial

Condición 30 del "kit" "Natrix"

0.1 M Tris-HCl pH 8, 1.5 M sulfato de litio

2 M	1.75 M	1.5 M	1.25M	1 M	0.75 M	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 5

Condición de cristalización inicial

0.01 M cloruro de magnesio, 0.05 M Mes pH 5.6, 2 M sulfato de litio

1.75M	1.5 M	1.25M	1 M	0.75 M	0.5 M	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 6

Condición de cristalización inicial

Condición 7 del "kit" PEG/Ion

0.2 M de cloruro de calcio 20% PEG 3350

40%	35%	30%	25%	20%	15%	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 7

Condición de cristalización inicial

Condición 12 del “kit” “Natrix”

0.3 M sulfato de magnesio, 0.05 cacodilato de sodio pH 6, 1 M sulfato de litio

1.75 M	1.5 M	1.25M	1 M	0.75 M	0.5 M	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 8

Condición de cristalización inicial

Condición 25 del “kit” “Natrix”

0.08 M acetato de magnesio 0.05 M cacodilato pH 6.5, PEG 30% 4000

40 %	35%	30%	25%	20%	15 %	Agente precipitante /Concentración de proteína
						4 mg/mL
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 9

Condición de cristalización inicial

Condición 25 del “kit” PEG/Ion

0.4 acetato de magnesio, 20 % PEG 3350

40%	35%	30%	25%	20%	15%	Agente precipitante /Concentración de proteína
						4mg/mL
						3.5 mg/mL
						3mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 10

Condición de cristalización inicial

Condición 15 del “kit” “Natrix”

0.04 M cloruro de magnesio, 0.05 M cacodilato de sodio pH 6, 5% MPD

34%	28%	21%	14%	8%	5%	Agente precipitante /Concentración de proteína
						4 mg/mL
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 11

Condición de cristalización inicial

Condición 30 del “kit” “Natrix”

0.1 M Tris-HCl pH 8, 1.5 M sulfato de litio (Na₂CO₃)

2 M	1.75M	1.5 M	1.25M	1 M	0.75 M	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL

Matriz 13

Condición de cristalización inicial:

Condición 28 del “kit” “Natrix”

0.1 M sulfato de magnesio, 0.05 cacodilato de sodio pH 6, 1.6 M sulfato de litio (Na₂CO₃)

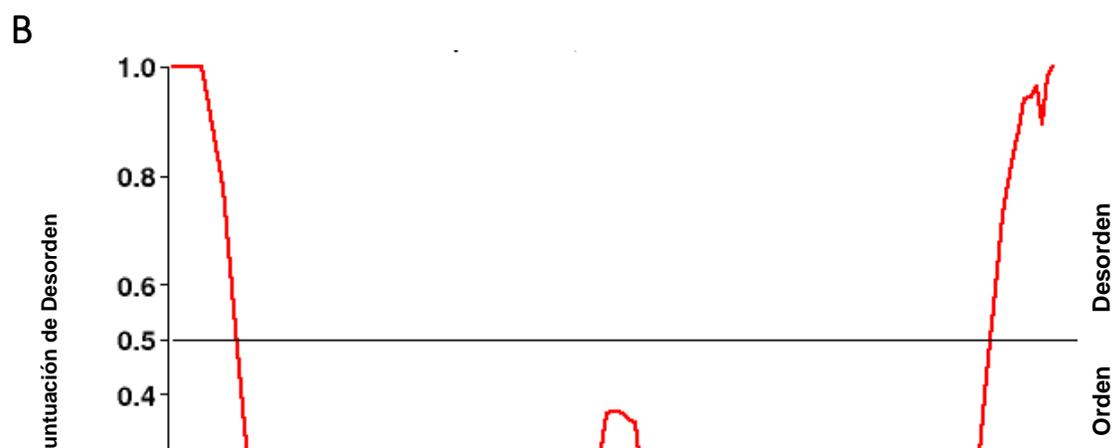
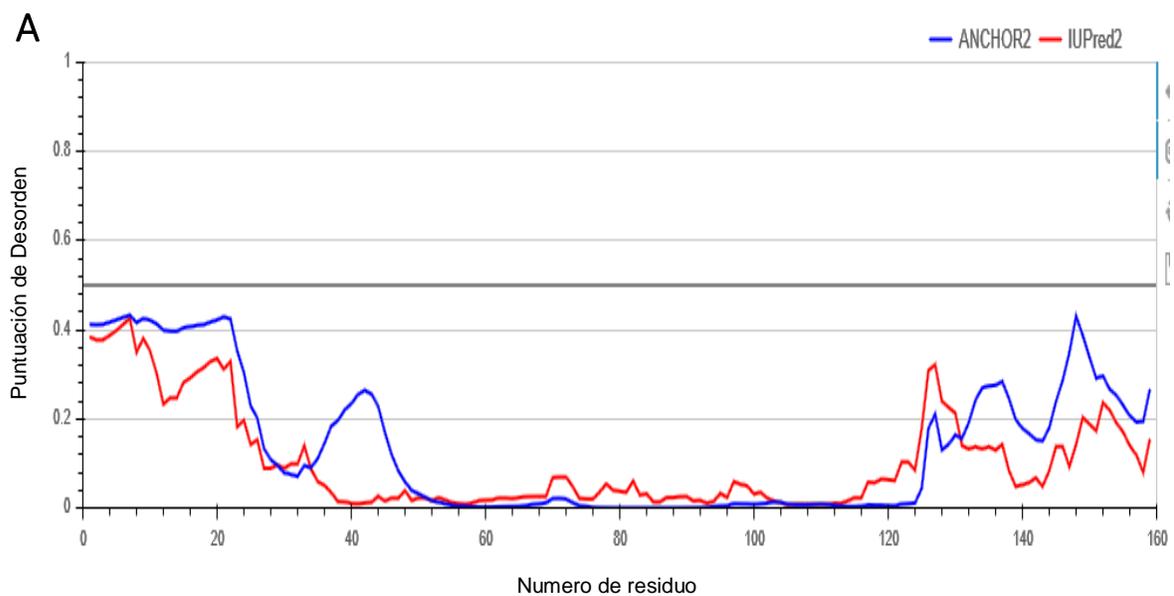
1.75M	1.5 M	1.25M	1 M	0.75 M	0.5 M	Agente precipitante /Concentración de proteína
						3.5 mg/mL
						3 mg/mL
						2.5 mg/mL
						2 mg/mL

Anexo 5

Predicción del desorden estructural de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$

El desorden estructural de la $r_{\text{perlina}}_{\text{pf}}$ fue pronosticado por los predictores IUPred y PONDR © VSL2. Estos predictores atribuyen la probabilidad de trastorno

estructural a nivel de residuos; cuando el residuo obtiene una puntuación mayor a 0.5 en ambos predictores significa que es probable que el residuo caiga en un trastorno local. En el caso de proteínas completas, el contenido del trastorno global se calcula dividiendo el número de residuos con una puntuación superior a 0,5 por la longitud de la proteína. Una proteína se consideraba "en su mayoría desordenada" si más del 50% de sus residuos tenían una puntuación superior a 0,5 y "completamente desordenada" si más del 90% de sus residuos caía en un trastorno local (Kalmar *et al.*, 2012).



Patrón de trastorno de la proteína rperlina_{pf}. Se predijo el desorden estructural de la rperlina_{pf} con los predictores IUPred (A) y PONDR © VSL2 (B). Los residuos por encima del umbral de 0.5 se consideran desordenados.