



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA
SECUENCIA QUE CODIFICA UNA PROTEÍNA DE
NÁCAR (N66) DE *Pinctada mazatlanica*, CON
FUNCIÓN EN EL PROCESO DE
BIOMINERALIZACIÓN *IN VITRO*

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación: Biotecnología)

P r e s e n t a

CATALINA MAGALLANES DOMÍNGUEZ

La Paz, Baja California Sur, febrero 2018.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 15:00 horas del día 16 del mes de febrero del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA SECUENCIA QUE CODIFICA UNA PROTEÍNA DE NÁCAR (N66) DE *Pinctada mazatlanica*, CON FUNCIÓN EN EL PROCESO DE BIOMINERALIZACIÓN *IN VITRO*"

Presentada por el alumno:

Catalina Magallanes Domínguez

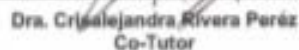
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



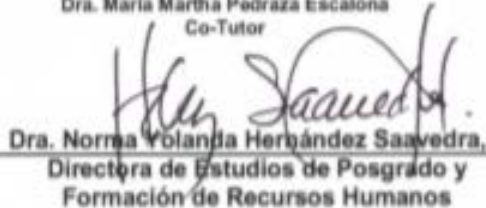
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Directora de Tesis



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Tutor



Dra. María Martha Pedraza Escalona
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité tutorial

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Director de Tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor

Dra. María Martha Pedraza Escalona
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México
Co-Tutor

Comité Revisor de Tesis

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. María Martha Pedraza Escalona

Jurado de Examen

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dra. María Martha Pedraza Escalona

Suplente

Dr. José Arturo Sánchez Paz

Resumen

Dentro del proceso de biomineralización de la concha de moluscos, existen proteínas de la matriz de la concha (SMPs, por sus siglas en inglés: Shell Matrix Proteins), como la N66, con la capacidad de regular la formación de dos polimorfos de carbonato de calcio (aragonita y calcita) en una sola estructura, dicha característica ha sido de alto interés para el diseño de nuevos biomateriales útiles en el área de construcción y medicina. Sin embargo, el conocimiento sobre las implicaciones de las funciones sobre la estructura de este tipo de SMPs es escaso, por lo que se considera importante conocer la secuencia de aminoácidos de las SMPs con la capacidad de nuclear ambos polimorfos. Además, se requiere determinar si las modificaciones postraduccionales en SMPs tienen efecto sobre el proceso de nucleación de los polimorfos de aragonita y calcita. En este trabajo, se describe la caracterización de la secuencia de N66 de *P. mazatlanica*, abordando las implicaciones de las funciones y posible evolución de esta proteína desde dos criterios: su localización celular y su estructura proteica. La función conocida de N66 es como nucleador e inhibidor de aragonita y calcita en el proceso de mineralización de la concha. Este trabajo propone que la N66, podría estar involucrada en el proceso de reparación de la concha, ya que la N66 recombinante nucleó vaterita. Por otro lado, al obtener la N66 recombinante a partir de la expresión heteróloga en bacterias, este proyecto relaciona que la ausencia de las modificaciones postraduccionales de la N66 podrían estar directamente involucradas con la función de inhibición del crecimiento del cristal.

Vo.Bo. Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra



Summary

The mollusk biomineralization process involves of several matrix proteins (SMPs), such as N66, this type of proteins are important for its ability to regulate calcium carbonate in two polymorphs (aragonite and calcite) and create a complex shell structure. This feature has been very important for designing of biomaterials in construction and medicine area. However, we need us more research about of structure of SMPs and its implication in the function of biomineralization process. On the other hand, it's necessary to understand the effects of posttranslational modifications about calcium carbonate nucleation, when we use us recombinant SMPs expressed in *Escherichia coli* as nucleating agents of calcium carbonate. In this research, we describe us N66 recombinat's characterization of *P. mazatlanica* for to analyze the protein expressed in a procariota cell and to determine the effects posttranslational modifications' absence in its function. The function N66's well-known is as nucleator and inhibitor of aragonite and calcite, this work proposes to N66 as nucleator a third polymorph:vaterite, and we suggest us that N66 could be involved in the process of repair of the shell mollusk *P. mazatlanica*. In addition, we results suggest us that the N66's posttranslational modifications could be directly involved with the function of crystal growth inhibition and the post-translational modifications could be related to the structure of the low complexity repeated domain (RLCD) of Asn and Gly.


Vo.Bo. Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra

*Para el shaddai, mi amada familia, el club canino y mis entrañables amigas,
por ser elementos indispensables en la felicidad de mi vida,
como las SMPs en el proceso de mineralización de moluscos.*

-Ina

Agradecimientos

Académicos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C, por proporcionar los recursos e infraestructura adecuada para desarrollar este proyecto de investigación.

A CONACyT por la asignación de la beca de manutención (No. de registro 587084).

A la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, por aceptar ser directora y guía en esta tesis, darme la oportunidad para desarrollar el proyecto, haber proporcionado las facilidades y recursos para realizar este trabajo, gracias por todas sus recomendaciones para mejorar en cada una de mis presentaciones y en este escrito. Muchísimas gracias, por todos sus consejos cuando se presentaron contratiempos. Mil gracias por apoyar mis ideas. Gracias, por toda la paciencia y comprensión proporcionada, fue un gusto poder colaborar con usted.

A la Dra. Crisalejandra Rivera Pérez, por sus comentarios enriquecedores y observaciones para mejorar este escrito. Gracias, por su orientación en el laboratorio para solucionar algunos problemas técnicos presentados, por ayudarme a mejorar las presentaciones derivadas del proyecto e impulsarme para mejorar mi comunicación oral. Muchísimas gracias por ayudarme a crecer profesionalmente en esta estancia estudiantil.

A la Dra. Martha Pedraza Escalona por aceptar ser parte del comité tutorial de este proyecto, por todas sus observaciones y recomendaciones para la mejora del mismo. Gracias por su buena disposición, paciencia y apoyo a pesar de la lejanía en cada una de las evaluaciones.

A la M.C Delia Irene Rojas Posadas, por toda su colaboración en la parte técnica. Muchísimas gracias, por tu constante apoyo desde el principio hasta el final de este proyecto, por corregirme y ayudarme en algunos de mis experimentos.

Agradezco por compartir tu experiencia por medio de todos esos tips, protocolos y enseñanzas dadas, las cuales sin duda facilitaron la obtención de los resultados. Fue un gusto aprender y trabajar contigo ¡Muchas gracias Delia!

A todo el personal de posgrado y departamento de becas de esta institución, en especial, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Tania Verónica Nuñez Valdez, Lic. Leticia González Rubio y Lic. Claudia Olachea, muchísimas gracias, por brindarme siempre una buena atención y por el otorgamiento de la beca parcial de dos meses para gastos de manutención para finalizar con mis estudios de la maestría.

A todo el personal de la biblioteca, en especial a la Lic. Ana María Talamantes y Lic. Susana Luna, por el apoyo otorgado para la búsqueda de bibliografía.

Al Lic. Horacio Sandoval, encargado del área de cómputo, por brindarme siempre una buena atención.

Al Téc. Arturo Pedro Sierra Beltrán, por proporcionar los materiales necesarios para poder determinar el punto isoeléctrico, por donar CA bovina y BSA.

Al Téc. Ariel Cruz Villacorta, por su apoyo en el procesamiento de las muestras para SEM, muchísimas gracias, por todos esos tips para mejorar mi trabajo.

A los colegas: M.C Jehú Ojeda, por proporcionar antecedentes del gen N66 de madre perla, M.C Jesús Antonio López Carvallo por su ayuda al proporcionar la metodología para la limpieza del ARN. cDra. Beatriz Meza Márquez por su asesoría en el inmunodetección de la proteína recombinante y al cDr. Samuel Calderón Liévanos por sus consejos en los análisis para la caracterización de proteínas.

A la Dra. Martha Patricia Hernández Cortes por ayudarme a mejorar mis conocimientos en el área de bioquímica, en especial la parte de estructura de proteínas. Muchísimas gracias Paty, por toda tu ayuda y hospitalidad brindada en los inicios de este periodo estudiantil.

Personales:

A Dios, mi creador, por permitirme existir, por ser mi principal fuente de entusiasmo, felicidad, amor y energía espiritual, por ser el impulso para esforzarme en mis deberes e intentar ser una mejor versión de mi todos los días, por permitirme apreciar a las personas que estuvieron y están a mi lado, pues me has enseñado que todas tienen una lección por mostrarme y que quiero estar atenta para poder aprender siempre algo nuevo. Sin duda, para mí eres lo máximo, mi mayor fuente de felicidad y deseo de superación personal, reconozco que sin ti, mi vida no sería la misma ¡Te amo Shaddai!

A mi querida familia; mis padres, hermanos y la manada canina, por ser mi inspiración, por todo el amor, cariño y comprensión que me dan. Por estar a mi lado en los momentos más difíciles y animarme a seguir adelante. A ti, mi querido padre, por enseñarme a adaptarme ante cualquier circunstancia, por recordarme que lo bello de la vida está en la simplicidad de la misma, te quiero muchísimo papá. A mi amada madre, quien con su ejemplo me enseñó a perseverar en mis metas, a dar siempre el extra ante cualquier situación y a mis hermanos por contagiarme su buen humor, por hacerme participe de sus vidas a pesar de la distancia al compartirme sus experiencias, en especial a mi hermano Gelo, por animarme con sus palabras y acciones cuando más lo necesitaba ¡Los amo mucho, familia!

A mis entrañables amigas de la vida: Fer y Belén por los años de amistad, por no olvidarme a pesar de la distancia, por permitir que siguiera formando parte de sus vidas, las quiero muchísimo bebis. Mil gracias, por demostrarme la vehemencia de la amistad. Les agradezco a cada una por aportarme un poquito de su felicidad y por su tiempo para que nuestra amistad siguiera creciendo y tomando un rumbo con son y ton. Muchísimas gracias por compartir conmigo su Fe por Dios ¡las quiero muchísimo!

A Michelle, gracias por compartir tu tiempo conmigo desde que llegue a estos inciertos lugares, por todos esos momentos alborozados que pasábamos en el

lab y en cada una de las comidas que compartíamos, por todo aquello que nos hacía reír.

A Delia, por escucharme y orientarme, por la calidad y el excelente trato que me brindaste. Por tu valiosa amistad. Muchas gracias, por la confianza y por todas esas pláticas enriquecedoras. Gracias por ayudarme a crecer y a entender otros puntos de vista. Te aprecio muchísimo.

A Angela, por confiar en mí, muchísimas gracias, por el apoyo emocional, por escucharme y abrirme las puertas de su hogar, mil gracias por hacer de esta estancia un poco más llevadera.

A Rosita, muchas gracias por compartir conmigo tu entusiasmo por este bello campo de estudio de la biomineralización.

A Maye, Car, Migue y Mar, muchísimas gracias por la convivencia proporcionada en este periodo. Gracias, por compartir su tiempo conmigo y por las lecciones aprendidas.

A todos aquellos que indirectamente enriquecieron este trabajo con sus investigaciones en el bello campo de la biomineralización, ya que me ayudaron a comprender un poquito más de este increíble proceso de la naturaleza. También agradezco a todas aquellas personas que comparten sus conocimientos en la web, ya que gracias a ello pude adquirir nuevos conocimientos en el área de bioinformática, cristalización y ciencia de materiales.

A todas las personas que lean este escrito, muchas gracias, por tomarse el tiempo en revisarlo, espero que este trabajo les pueda proporcionar ayuda útil en lo que sea que estén buscando

Contenido

Resumen	I
Summary	II
Dedicatoria	III
Agradecimientos	IV
Contenido	VIII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 BIOMINERALIZACIÓN.....	1
1.2 LA BIOMINERALIZACIÓN EN ORGANISMOS MARINOS.	2
1.3 EL PROCESO DE BIOMINERALIZACIÓN EN MOLUSCOS.	4
1.4 FISIOLÓGÍA Y FORMACIÓN DE LA CONCHA EN BIVALVOS.	4
1.5 ESTRUCTURA DE LA CAPA DE NÁCAR.	6
2. ANTECEDENTES	12
2.1 FUNCIÓN, PROPIEDADES Y ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA N66	12
2.2 PROTEÍNAS HOMÓLOGAS A N66	15
2.3 ANHIDRASAS CARBÓNICAS: MECANISMO DE CATÁLISIS	17
2.4 ESTUDIOS RELACIONADOS CON LA EXPRESIÓN DE SMPs EN SISTEMAS PROCARIOTES.	19
2.5 SISTEMAS DE EXPRESIÓN PARA PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 OBJETIVO GENERAL	23
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
6. MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE N66 DE <i>P.</i> MAZATLANICA	25
6.1.1 <i>Obtención de los organismos.</i>	25
6.1.2 <i>Extracción y purificación de ARN.</i>	25
6.1.3 <i>Síntesis de ADNc por RT-PCR</i>	27
6.1.4 <i>Amplificación de fragmentos del gen de N66.</i>	28
6.1.4.1 <i>Fragmento 680-1642</i>	28
6.1.4.2 <i>Fragmento 1-425</i>	29

6.1.4.3 Fragmento 1229-1766	29
6.1.5 Clonación de los productos de PCR.....	30
6.1.6 Análisis de la secuencia	31
6.2. CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR DE EXPRESIÓN DE LA SECUENCIA DE N66 EN EL SISTEMA DE <i>E. COLI</i> TOP10.....	32
6.2.1 Diseño de cebadores con sitios de restricción para la amplificación de N66.....	32
6.2.2 Amplificación de la secuencia de N66 con sitios de restricción	34
6.2.3 Obtención del vector pTrcHis A	35
6.2.4. Ligación y transformación de <i>E.coli</i> Top 10.....	36
6.2.5 Inducción de la expresión de la N66 recombinante	37
6.2.6 Inmunodetección	39
6.3. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA N66 RECOMBINANTE.....	40
6.3.1 Cromatografía de afinidad	40
6.3.1.1 Preparación de la muestra.....	40
6.3.1.2 Purificación de la proteína recombinante.....	40
6.3.2 Evaluación de la oligomerización de la N66 recombinante.....	41
6.3.3 Punto isoeléctrico	42
6.3.4 Determinación de actividad de anhidrasa carbónica	42
6.4. DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> EN LA GENERACIÓN DE POLIMORFOS POR N66 RECOMBINANTE.....	43
7. RESULTADOS	45
7.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	45
7.2 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DEL GEN DE N66.....	46
7.2.1 Amplificación y clonación de un fragmento interno del gen N66.	46
7.2.2 Amplificación de los extremos 5' y 3' de N66 de <i>P. mazatlanica</i>	48
7.3 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE N66 DE <i>P. MAZATLANICA</i>	48
7.4 EXPRESIÓN DE N66 EN EL SISTEMA DE <i>E. COLI</i> TOP10	57
7.4.1 Amplificación de la secuencia de N66 con sitios de restricción	57
7.4.3 Obtención del vector de expresión pTrcHis A-N66.....	58
7.4.4 Transformación de N66-HindIII en células de <i>E. coli</i> TOP10.....	59
7.4.5 Evaluación de la orientación del gen N66 en el vector de expresión pTrc His A.....	60
7.4.6 Inducción para la producción de N66 recombinante, e inmunodetección	60
7.5 PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE N66 RECOMBINANTE	62
7.5.1 Cromatografía de afinidad	62
7.5.2 Determinación de las subunidades de N66	63
7.5.3 Determinación del punto isoeléctrico (pI).....	64
7.5.4 Ensayos de actividad anhidrasa carbónica.....	65
7.6 ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN <i>IN VITRO</i>	66

8. DISCUSIÓN	71
8.1 CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA CODIFICANTE DE N66 DE <i>P. MAZATLANICA</i>	71
8.1.1 <i>Implicaciones de la localización celular</i>	71
8.1.2 <i>Implicaciones de las modificaciones postraduccionales.</i>	72
8.1.3 <i>Implicacion de los dominios de la N66.</i>	74
8.1.3.1 <i>Dominio anhidrasa carbónica</i>	76
8.1.3.2 <i>Dominio NG</i>	79
8.2 N66 RECOMBINANTE Y SU CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	80
8.3 EFECTO DE LA N66 RECOMBINANTE EN EL PROCESO DE CRISTALIZACIÓN <i>IN</i> <i>VITRO.</i>	81
9. CONCLUSIONES	83
10.PERSPECTIVAS	83
11. LITERATURA CITADA.....	85

Lista de figuras

	Página
Figura 1. Esquema de la sección transversal de la concha en moluscos.....	5
Figura 2. Representación esquemática de algunas estructuras presentes en la concha de los moluscos.....	7
Figura 3. Modelo teórico de la N66 de <i>P. maxima</i>	13
Figura 4. Análisis de alineamiento entre las secuencias de N66 de <i>P. maxima</i> (GenBank ID: BAA90540.1) y la secuencia parcial de <i>P. mazatlanica</i> obtenida en el Laboratorio de Genética Molecular.....	14
Figura 5. Comparación entre las secuencias de los alelos localizados en el dominio NG en N66 de <i>P. máxima</i> y en la nacreína de <i>P. fucata</i> y <i>P. margaritifera</i>	15
Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la nacreína de <i>P. fucata</i> comparada con la N66 de <i>P. maxima</i>	17
Figura 7. Elementos de un vector de expresión para sistemas procariotas.....	21
Figura 8. Esquema que representa la estrategia metodológica para abordar los 5 objetivos particulares planteados en la presente tesis.....	24
Figura 9. Representación esquemática de la valva derecha de <i>P. mazatlanica</i> en la que se señalan las diferentes zonas del manto.....	25
Figura 10. Representación gráfica del vector pTrcHis A, creado con SnapGene.....	33
Figura 11. Representación esquemática del constructo N66-pTrcHis. Imagen creada con el programa SnapGene.....	34
Figura 12. Perfil electroforético de ARN total de madre perla obtenido utilizando distintos métodos de extracción.....	45
Figura 13. Perfil electroforético de fragmentos de PCR de N66 obtenidos usando como templado ADNc de manto de <i>P. mazatlanica</i> y los los oligonucleótidos 680F-1642R.....	46
Figura 14. Perfil electroforético de ADN plasmídico recombinante, con inserto de ~1000 pb de N66 de <i>P. mazatlanica</i>	47
Figura 15. Perfil electroforético de productos de PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos del vector pCR2.1, M13F y M13R.....	47
Figura 16. Perfil electroforético de productos de PCR de los extremos codificantes del gen N66 usando los oligonucleótidos 1F-452R y 1229F-1766R.....	48
Figura 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de N66 de <i>P. mazatlanica</i>	50
Figura 18. Estructura primaria y secundaria de N66.....	51
Figura 19. Estructura terciaria de N66.....	52
Figura 20. Comparación de N66 de <i>P. mazatlanica</i> con proteínas homólogas.....	53

Figura 21. Dominios tipo alfa anhidrasa carbónica de N66 de <i>P. mazatlanica</i> y anhidrasas carbónicas tipo II y VII.....	56
Figura 22. Perfil electroforético de productos de PCR de N66 de <i>P. mazatlanica</i> con sitios de restricción <i>HindIII</i>	58
Figura 23. Perfil electroforético derivado de la digestión de plásmido pTrcHis A.....	58
Figura 24. Perfil electroforético de PCR de colonia de N66- <i>HindIII</i> -pTrcHis A (cultivadas en placas de medio LB) utilizando los oligonucleótidos N66 680F y 1642R.....	59
Figura 25. Perfil electroforético de minipreps de bacterias transformadas con el constructo N66- <i>HindIII</i> -pTrcHis A.....	59
Figura 26. Perfil electroforético de la digestión de los plásmidos N66- <i>HindIII</i> -pTrcHis A.....	60
Figura 27. Perfil electroforético, en gel SDS-PAGE al 10%, de proteínas obtenidas de cultivos de <i>E. coli</i> TOP10-N66 pTrcHis A, inducidas con 1 mM de IPTG.....	61
Figura 28. Inmunodetección de N66 recombinante de <i>P. mazatlanica</i>	62
Figura 29. Purificación de N66 recombinante de <i>P. mazatlanica</i> mediante cromatografía de afinidad en Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare).....	63
Figura 30. Perfil electroforético de la proteína N66 en condiciones no reductoras y reductoras.....	64
Figura 31. IEF en gel de poliacrilamida de N66 recombinante de <i>P. mazatlanica</i> usando un gradiente de pH de 3 a 10.....	65
Figura 32. Ensayo de actividad de anhidrasa carbónica de N66 recombinante en placa.....	66
Figura 33. Ensayo de actividad de anhidrasa carbónica de N66 en tubo.....	66
Figura 34. Ensayos de cristalización <i>in vitro</i> utilizando como sustrato una mezcla de sales: bicarbonato de sodio-cloruro de calcio.....	68
Figura 35. Ensayos de cristalización <i>in vitro</i> utilizando como sustrato una mezcla de sales: bicarbonato de sodio-cloruro de magnesio.....	69
Figura 36. Ensayos de cristalización utilizando carbonato de calcio (CaCO ₃).....	70

Lista de tablas

	Página
Tabla I. Tipos de estructuras en las conchas de los moluscos.....	7
Tabla II. Proteínas de matriz (SMPs) de la capa de aragonita.....	9
Tabla III. Proteínas de matriz (SMPs) de la capa de calcita.....	10
Tabla IV. Cebadores usados en el presente trabajo.....	27
Tabla V. Programa utilizado para la amplificación del gen 28s ribosomal y los fragmentos de N66: 1-425 y 680-1642.....	28
Tabla VI. Programa utilizado para la amplificación de N66 con sitios de restricción <i>Hind</i> III y el fragmento 4-1642.....	35
Tabla VII. Rendimiento y pureza del ARN total obtenido de manto empleando diferentes estrategias de extracción de ARN.....	46
Tabla VIII. Análisis de homología de la secuencia de nucleótidos codificante N66 de <i>P. mazatlanica</i>	52
Tabla IX. Comparación de los residuos de la anhidrasa carbónica (CA) tipo II con sus enzimas homólogas.....	57

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biomineralización.

El proceso de biomineralización involucra el depósito y formación de minerales (como calcita, vaterita, aragonita, hidroxiapatita, barita, celestita, entre otros), dentro o fuera de la célula. En la actualidad, se conoce que en la naturaleza existen múltiples organismos, como algas, peces, plantas, mamíferos, bacterias y moluscos con la capacidad de sintetizar una alta cantidad de biominerales (Müller, 2011).

El desarrollo evolutivo de este mecanismo ha permitido generar estructuras propias que proporcionan soporte y protección para estos organismos (Bertini et al., 2007; Lowenstam y Weiner, 1989; Mann, 2001; Müller, 2011; Simkiss y Wilbur, 2012). Sin embargo, existen algunas modificaciones específicas para cada taxón (Baeuerlein, 2004). Estas diferencias pueden ser explicadas por la interacción de las proteínas con otras moléculas que se encuentran en la célula o en la matriz extracelular en donde actúan, principalmente nucleadores y reguladores del crecimiento y orientación de los cristales generados durante este proceso (Boskey, 2003; Dove, 2003). El producto final de la biomineralización conduce a la formación de minerales con diferentes formas (polimorfos), siendo el carbonato y el fosfato de calcio, los más comunes en la naturaleza (Addadi y Weiner, 1997; Collino, 2008; Dove, 2003).

En la actualidad, los elementos naturales más estudiados para la formación de compuestos minerales son los huesos, dientes y conchas marinas. Respecto a las conchas, los minerales formados son polimorfos derivados del carbonato de calcio como calcita (sistema cristalino romboédrico), aragonita (sistema cristalino ortorrómbico) y vaterita (sistema cristalino hexagonal); estos se organizan a escala nanométrica para poder formar estructuras resistentes y complejas organizadas en la concha y perla de algunos moluscos (Donachy *et al.*, 1992; Fu, 2005; Jolly *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2008; Marin y Luquet, 2004; Marxen y Becher, 1997; Matranga *et al.*, 2011)

Investigaciones como las de Kono *et al.* (2000), Kröger (2009), Miyashita *et al.* (2005) y Suzuki *et al.* (2009) señalan que la formación de la aragonita y la calcita están bajo el control de diversas proteínas de la matriz de la concha (SMPs, por sus siglas en inglés: Shell Matrix Proteins). Por lo tanto, las nuevas investigaciones se han enfocado en encontrar a dichas proteínas en diferentes organismos a través de estudios de microarreglos, transcriptómica y proteómica; una vez encontradas se procede a su aislamiento, identificación y secuenciación, así como determinar como es la regulación de su expresión génica. Finalmente se determina la capacidad de mineralización por estudios *in vitro* de aquellas proteínas relacionadas con este proceso (Fang *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2015; Joubert *et al.*, 2010; Kinoshita *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Masaoka *et al.*, 2013; Miyamoto *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015). Finalmente, existen implicaciones importantes en la ciencia de los materiales, porque a pesar de que hay una gran diversidad de procesos de biomineralización, todos los mecanismos se realizan de manera similar, por lo que en la actualidad se buscan materiales sustitutos con capacidad de inducir o sustituir la regeneración de otro tejido de un sistema mineralizado (Almeida *et al.*, 2015). Por ello, las investigaciones se han vinculado a la comprensión de cómo funcionan las proteínas involucradas en el proceso de biomineralización, como las SMPs que actúan como nucleadores o reguladores en la formación de la concha, la cual está constituida por microestructuras compuestas principalmente de aragonita y calcita; dichos polimorfos podrían ser usados como material para la reconstrucción de huesos (Ni y Ratner, 2008).

1.2 La biomineralización en organismos marinos.

En la actualidad, sabemos que hay organismos marinos con la capacidad de sintetizar una alta diversidad de biominerales (Müller, 2011) con la finalidad de generar estructuras propias las cuales les proporcionen soporte y protección (Fu, 2005); dentro de los taxa estudiados se encuentran los equinodermos, crustáceos y moluscos.

Los equinodermos, como el erizo de mar, cuentan con una estructura interna conocida como endoesqueleto, la cual está compuesta de calcita de magnesio en forma de placas que a su vez forman microestructuras, como el estereoma que es una red tridimensional de calcita. En general, cada elemento esquelético de un equinodermo es un cristal de carbonato de calcio finamente ramificado y estructurado, lo que hace del endoesqueleto una estructura sumamente compleja (Matranga *et al.*, 2011). Los equinodermos emplean un proceso genéticamente regulado para formar el endoesqueleto, este último constituido principalmente de calcita de magnesio, una forma de carbonato de calcio que contiene pequeñas cantidades de carbonato de magnesio.

En los últimos años, las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés: Scanning Electron Microscopy) y microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés: Transmission Electron Microscope) han ayudado a generar información detallada acerca de este tipo de estructuras (Matranga *et al.*, 2011).

Otro grupo de organismos estudiados son **los crustáceos**, estos organismos poseen una cutícula (capa exterior del tegumento) compuesta principalmente por quitina, proteínas y carbonato de calcio. El carbonato de calcio proporciona rigidez a la cutícula, por lo que las investigaciones se han orientado a conocer cómo se regulan sus niveles en la célula durante la transferencia entre la cutícula y otras partes del cuerpo del crustáceo; además, se han estudiado los factores que mantienen el estado amorfo de carbonato de calcio después de la deposición en la cutícula y órganos de almacenamiento temporales (Nagasawa, 2011).

Finalmente, del grupo de **los moluscos** se han estudiado ampliamente aquellas especies que presentan una estructura conocida como concha o nácar, principalmente las especies que producen perlas por el interés comercial que representan (por ejemplo, las especies de la familia Pteriidae). El nácar está constituido por cristales de aragonita y/o calcita, que le confieren una estructura altamente resistente a las fracturas (Mackenzie *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2011).

1.3 El proceso de biomineralización en moluscos.

Dentro de las especies de moluscos que han sido estudiados por producir biominerales agrupados en estructuras de la concha, se encuentran abulones (*Haliotis rufescens*, *Haliotis tuberculata*), ostiones (*Cassostrea virginica*), mejillones (*Mitylus edulis*), caracoles de agua dulce (*Biomphalaria glabrata*) y ostras perleras (*Pinctada maxima*, *Pinctada fucata* y *Pinctada martensii* (Donachy *et al.*, 1992; Fu, 2005; Jolly *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2008; Marin y Luquet, 2004; Marxen y Becher, 1997; Southgate y Lucas, 2008).

De todas las especies mencionadas, *P. fucata*, *P. maxima* y *P. martensii* constituyen el grupo de ostras perleras cuyo proceso de mineralización ha sido ampliamente estudiado debido al alto valor comercial que representan en el continente asiático (Southgate y Lucas, 2008). Estas especies pertenecen a la familia Pteriidae, que también incluye a madre perla (*Pinctada mazatlanica*) de la que hasta el momento no se han realizado investigaciones sobre el proceso de biomineralización. Dado lo anterior, es importante realizar estudios en esta especie, ya que se obtendría información acerca de si el mecanismo y/o elementos involucrados en este proceso presentan algunas diferencias entre las especies más estudiadas de esta familia. Además, *P. mazatlanica* representa un recurso valioso en la industria perlera en el continente americano, ya que se encuentra distribuido en las costas del Pacífico, desde el norte de México hasta el sur de Panamá.

1.4 Fisiología y formación de la concha en bivalvos.

El Phylum Mollusca se divide en 7 clases taxonómicas, de las cuales 5 tienen una estructura conocida como concha o nácar, de éstas solo los gasterópodos (*Biomphalaria glabrata*), cefalópodos (*Nautilus macromphalus*) y bivalvos (*P. máxima*, *H. rufescens*) tienen la capacidad de formar una bicapa compuesta por dos polimorfos de carbonato de calcio (prismática y nacarada, Fig. 1 A y B); ésta característica convierte a los moluscos en un modelo ideal para el estudio de

estos minerales en el proceso de biomineralización (Keene, 2010; Marie *et al.*, 2009).

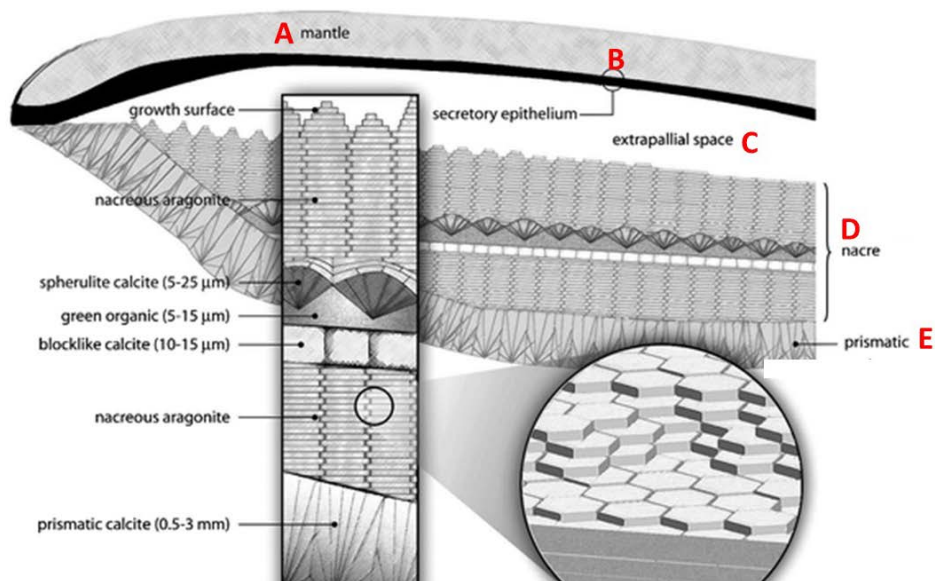


Figura 4. Esquema de la sección transversal de la concha en moluscos. La imagen muestra la localización de los polimorfos calcita y aragonita. A) Manto, B) Epitelio, C) Espacio extrapaleal, D) Capa de nácar, y E) Capa prismática (Tomado de Sun y Brushan, 2012).

En general, los elementos básicos para la formación y crecimiento de la concha son (Addadi y Weiner, 1997; Cestari, 2008; Marin y Luquet, 2004):

- a) células del manto (Fig. 1A), las cuales son encargadas de secretar carbonato de calcio y otras macromoléculas como polisacáridos y proteínas;
- b) un epitelio (Fig. 1B): donde se lleva a cabo el transporte de iones;
- c) el espacio extrapaleal (Fig. 1C): lugar donde se realiza la calcificación;
- d) una matriz orgánica extracelular: responsable de agrupar los cristales generados en estructuras complejas, como la capa de nácar (Fig. 1D) y la capa prismática (Fig. 1E);
- e) células del sistema inmunitario; y
- f) mecanismo de control hormonal, el cual regulará el crecimiento y forma del nácar.

De acuerdo con Cestari (2008), el proceso de formación de la concha involucra tres etapas: I) Reorganización de los componentes; II) Pre-mineralización de las láminas que formaran la concha; y III) Mineralización mediante su crecimiento y nucleación.

La primera etapa se refiere a la unión de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos y polisacáridos que se encuentran en el nácar. Inicialmente, el polisacárido β -polimorfo N-acetil-2-glucosamina (quitina) se adhiere a la matriz extracelular en forma de cristales, interaccionando con el líquido extrapaleal (líquido acuoso que contiene polisacáridos, proteínas y minerales), estas proteínas catalizan la formación de una matriz intertubular. Peculiarmente, las proteínas involucradas son ricas en ácido aspártico (Cartwright y Checa, 2007; Cestari 2008).

La segunda etapa consiste en la pre-nucleación de los gránulos amorfos de carbonato de calcio, para la formación de cristales los cuales se organizarán en forma de laminillas, necesarias para la formación de la concha (Addadi *et al.*, 2006).

La tercera etapa consiste en la agrupación de las láminas de carbonato de calcio en nanoestructuras localizadas en las membranas interlamelares, dichas nanoestructuras procederán a reagruparse para formar estructuras más grandes y simples como la estructura prismática, foliácea y nacarada, o para la generación de estructuras mixtas como la lamelar cruzada compleja y prismática aragonítica (Addadi *et al.*, 2006 Marin *et al.*, 2008; Rousseau *et al.*, 2005).

1.5 Estructura de la capa de nácar.

El nácar de los moluscos está compuesto por ~95% de carbonato de calcio (Xie *et al.*, 2011) en forma de calcita o aragonita (Matsushiro y Miyashita, 2004), y una matriz orgánica conformada por polisacáridos y proteínas que representa el 1% de la concha (Cestari, 2008). Generalmente, la concha de los moluscos bivalvos está conformada por la combinación de varias estructuras (Fig. 2) como se muestra en la Tabla I (Kobayashi y Samata, 2006).

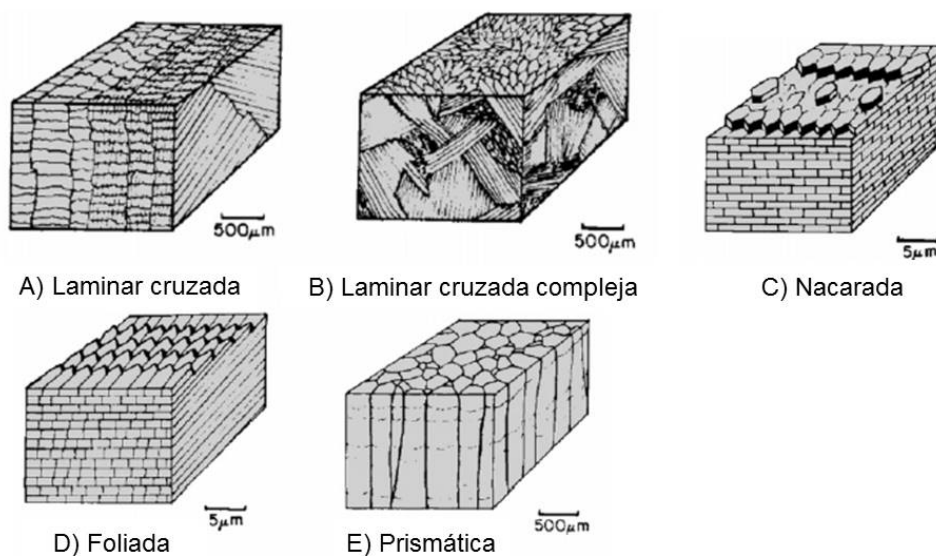


Figura 5. Representación esquemática de algunas estructuras presentes en la concha de los moluscos (Tomado de Vincent, 2002).

Tabla I. Tipos de estructuras en las conchas de los moluscos (Tomado de Kobayashi y Samata, 2006).

Tipos de estructura	Características
Prismática simple	Compuesta por prismas con cristales de calcita, tienen una sección poligonal, con el eje mayor de crecimiento perpendicular a la superficie interna de la concha.
Prismática aragonítica	Estructurada por prismas con cristales de aragonita, cuentan con una sección poligonal, con el eje mayor de crecimiento lateral a la superficie interna de la concha.
Nacarada	Formada por un conjunto de láminas poligonales compuestas de cristales de aragonita, tiene una sección vertical con lamelas parecidas a la superficie interna de la concha.
Foliácea	Laminas alargadas con cristales de calcita, tienen una sección en forma de rombos que agrupan como en la estructura nacarada.
Lamelar cruzada compleja	Esta estructura cuenta con cristales de aragonita que son rectangulares en disposición radial
Homogénea	Agrupaciones de gránulos de aragonita con diferentes tamaños.
Lamelar cruzada	Contiene un conjunto de cristales de aragonita alargados y paralelos entre sí, formando amplias laminas, formando bloques rectangulares
Prismática compuesta	Conjunto de prismas redondeados y alargados, que contienen cristales de aragonita de forma cónica.

1.6 Proteínas involucradas en la estructura de la capa de nácar.

Las SMPs están asociadas al proceso de biomineralización en moluscos y presentan características comunes, como, por ejemplo, actuar como reguladores negativos o positivos en la calcificación que se lleva a cabo durante el proceso de formación de la concha (Miyamoto *et al.*, 2005). De hecho, un alto porcentaje de estas proteínas poseen grupos aniónicos, lo que implica que pueden interactuar con otros componentes altamente cargados del cristal. Esta característica particular de las proteínas del nácar se asocia frecuentemente a modificaciones postraduccionales, y su regulación por enzimas como quinasas, fosfatasa y proteasas (Boskey, 2003).

Otra propiedad generalizada de las proteínas de las SMPs es su estructura secundaria, ya que frecuentemente poseen un alto porcentaje de láminas beta conformadas principalmente por residuos de Gly y Pro; se ha observado que aquellas proteínas que presentan este tipo de estructura son responsables de la elasticidad del nácar (Zhang y Zhang, 2006).

Por otra parte, las SMPs involucradas en formación de la capa de nácar contienen principalmente Asp, Gly, Asn, Ser, Pro y Cys, de los cuales el Asp es el aminoácido más importante en la unión con el Ca^{2+} . Se ha observado que los residuos de Gly y Asn forman parte de secuencias repetidas en las proteínas, formando dominios que se han asociado a funciones de nucleación e inhibición dentro del proceso de la mineralización (Mann *et al.*, 2012; Marie *et al.*, 2011; Montagnani *et al.*, 2011; Zhang y Zhang, 2006).

En la actualidad las SMPs, se han agrupado con base en distintos criterios como, por ejemplo, por el tipo de capa en la que se encuentran en la concha de nácar, clasificándose en: proteínas de la matriz de la capa de aragonita (Tabla II) y proteínas de la matriz de la capa de calcita (Tabla III) (Zhang y Zhang, 2006). Debido a que la aragonita es termodinámicamente menos estable que la calcita,

es de interés investigar cómo los moluscos controlan el carbonato de calcio para formar este tipo de cristales.

Se ha demostrado que algunas proteínas insolubles de la matriz como MSI60, N19, N16 y Pif80 controlan el polimorfismo de los cristales de carbonato de calcio (Kröger, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2013). Otros estudios muestran que algunas proteínas de la capa de nácar de aragonita podrían inducir la diferenciación de osteoblastos (Ma *et al.*, 2016; Mouriès *et al.*, 2002; Shafiu y Zakaria, 2014), esto implica que dichas proteínas cuentan con capacidad osteogénica y podrían utilizarse como material de reparación ósea, lo cual genera interés por conocer la estructura de cada proteína para poder crear materiales compatibles con otros sistemas de soporte (Zhang y Zhang, 2006).

Debido a lo anterior, no resulta extraño que gran parte de las investigaciones realizadas tengan por objetivo estudiar las SMPs de esta capa (Tabla II). Por otra parte, las proteínas procedentes de la capa de calcita se han estudiado para tratar de dilucidar cómo controlan el mecanismo de precipitación de calcita, además de entender cómo se llevan a cabo las interacciones entre las moléculas para la formación de las estructuras mineralizadas; algunas de ellas se muestran en la Tabla III.

Tabla II. Proteínas de matriz (SMPs) de la capa de aragonita (Modificado de Zhang y Zhang, 2006).

Proteína	Especie	Mw (kDa)	No. de aa	pl	Referencia
Lustrina A	<i>Haliotis rufescences</i>	116	1428	8.1	Shen <i>et al.</i> , 1997
MSI60	<i>Pinctada fucata</i>	60	738/717	4.9	Sudo <i>et al.</i> , 1997
N16	<i>Pinctada fucata</i>	16	131/108	4.8	Samata <i>et al.</i> , 1999
Perlina	<i>Pinctada fucata</i>	14	129	6.1	Miyashita <i>et al.</i> , 2000
N14	<i>Pinctada maxima</i>	16	140/115	-	Kono <i>et al.</i> , 2000
Perlucina	<i>Haliotis laevigata</i>	17-21	155	7.2	Weiss <i>et al.</i> , 2000
Perlustrina	<i>Haliotis laevigata</i>	9	84	8	Weiss <i>et al.</i> , 2000
Mucoperlina	<i>Pinna nobilis</i>	67	636/625	4.8	Marin <i>et al.</i> , 2000
Dermatopontina	<i>Biomphalaria glabrata</i>	20	148	6.3	Marxen <i>et al.</i> , 2003
AP7	<i>Haliotis rufescens</i>	7.5	88/86	5.7	Michenfelder <i>et al.</i> , 2003
AP24	<i>Haliotis rufescens</i>	24	171/157	5.3	Michenfelder <i>et al.</i> , 2003

Tabla III. Proteínas de matriz (SMPs) de la capa de calcita (Modificado de Zhang y Zhang, 2006).

Proteína	Especie	Mr (kDa)	No. de aa	pl	Referencia
Lustrina A	<i>Haliotis rufescences</i>	31	332	3.8	Sudo <i>et al.</i> , 1997
MSI60	<i>Pinctada fucata</i>	74.5	840	3.2	Sarashina y Endo, 2004
N16	<i>Pinctada fucata</i>	41	413	1.4	Tsukamoto <i>et al.</i> , 2004
Prismalina 14	<i>Pinctada fucata</i>	12	105	3.9	Suzuki <i>et al.</i> , 2004
Familia Asprich	<i>Atina rigida</i>	20/30	209/244	2.4/ 2,7	Gotliv <i>et al.</i> , 2005
Calprismina	<i>Pinna nobbilis</i>	17	61	4.09	Marin <i>et al.</i> , 2005

Como se muestra en la Tabla II, la mayoría de las proteínas asociadas a la capa de aragonita poseen un punto isoeléctrico (pI) superior a 4, mientras que en las asociadas a la calcita el pI es menor a este valor (Tabla III). Varios estudios sugieren que las proteínas de la matriz de calcita crean microambientes adecuados, ácidos, para la formación de capas de calcita (Gotliv *et al.*, 2005 Marin *et al.*; 2005 Sudo *et al.*, 1997), mientras que las proteínas de la matriz de aragonita son adecuados para el crecimiento de cristales de aragonita (Hare, 1963). Por tanto, es posible que las variaciones entre los pI s de las SMPs influyan en el polimorfismo del cristal de carbonato de calcio (Zhang y Zhang, 2006). Sin embargo, la teoría de asociar el pI a proteínas con la capacidad de nuclear calcita ($pI < 4$) o nuclear aragonita ($pI > 4$) resulta imprecisa, ya que existen SMPs como la nacreína, N66, MS17 y caspartina, que tienen distintos pI (desde 5.98 a 8.98) y exhiben la habilidad de nuclear los dos polimorfos del carbonato de calcio (Kono *et al.*, 2000; Marin *et al.*, 2005; Miyamoto *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Debido a ello, resulta de interés conocer los efectos de estas proteínas (con habilidad para nuclear dos polimorfos de carbonato de calcio) en la formación de los cristales para crear estructuras más complejas, similares a las formadas en la concha de los moluscos.

La mayoría de las SMPs han sido ampliamente estudiadas con respecto a su función como nucleadores de carbonato de calcio. De hecho, la más estudiada ha sido la nacreína, por lo que se requieren de más estudios con otras proteínas

que tengan la capacidad de nuclear dos polimorfos (como la N66), para intentar explicar el mecanismo que regula su actividad nucleadora y así poder aplicar la información generada en el diseño de biomateriales a base de estas enzimas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Función, propiedades y estructura de la proteína N66

La N66 es una proteína extracelular que se expresa en la región dorsal y en el borde del manto de moluscos que producen nácar; esta proteína ha sido caracterizada en la ostra de labio negro *P. maxima* (Kono *et al.*, 2000). La N66 es conocida por su función como nucleadora y reguladora en la etapa de calcificación, y es indispensable para la formación de las estructuras prismáticas de calcita o de aragonita; también, se ha demostrado que funciona como un concentrador de calcio (Kono *et al.*, 2000).

La N66 de *P. maxima* (GenBank ID: BAA90540.1) es una proteína de 66 kDa compuesta por 568 aminoácidos que en su mayoría son residuos de Asn y Gly, que forman una secuencia repetitiva de Asn y Gly entre los residuos 240-420 (NG, según el código de una letra de los aminoácidos), que se ha identificado como un dominio característico de proteínas de las SMPs de bivalvos. Además, la N66 cuenta con un péptido señal 22 aminoácidos, además, presenta dos dominios tipo Anhidrasa Carbónica (CA, por sus siglas en inglés) y contiene 3 His (H, según el código de una letra de los aminoácidos) de unión al zinc en los residuos 154, 156 y 179 (si bien esta proteína contiene dominios característicos de CA, no presenta un número de clasificación enzimática [E.C.]). El análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica sugiere que esta proteína tiene modificaciones postraduccionales como sulfatación y glicosilación (Kono *et al.*, 2000); así mismo, la estructura secundaria de la N66 de *P. maxima* cuenta con 21% de estructura alfa hélice y 11% de hojas beta plegadas (Fig. 3).

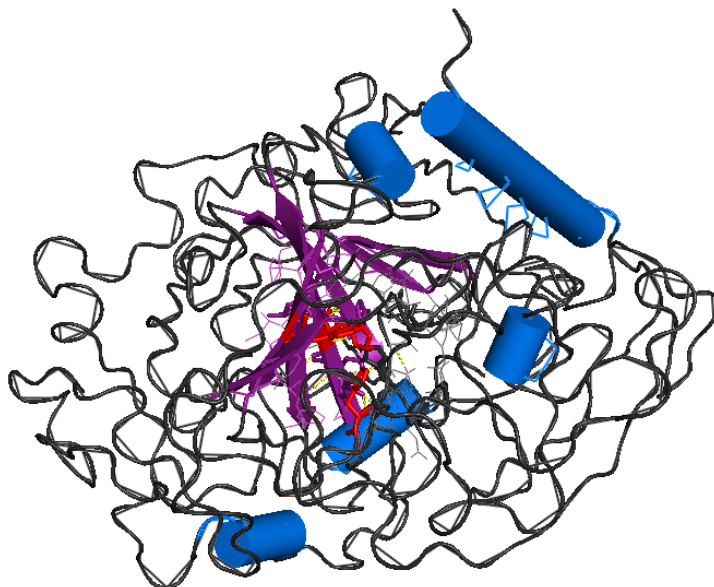


Figura 6. Modelo teórico de la N66 de *P. maxima*. Imagen diseñada con base a la secuencia reportada por Kono *et al.* (2000) usando el programa Phyre 2. PDB: 3ML5, 1FQL, 3MDZ, 1V9J y 5I18.

En un estudio previo, realizado en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. se obtuvo una secuencia parcial de la N66 del manto de madre perla *P. mazatlanica*; esta secuencia de 1523 nucleótidos codifica 508 aminoácidos. Al comparar esta secuencia parcial con la correspondiente a N66 de *P. maxima* (BAA90540.1, Fig. 4) se observan en posición los aminoácidos que conforman los sitios activos y de unión al zinc (en azul). Sin embargo, en la secuencia de *P. mazatlanica* se presenta una diferencia de 40 aminoácidos (120 nucleótidos, denotados por X - amarillo- en la Fig. 4) ubicada al final del primer dominio de CA (gris, aminoácidos 69 al 235) y poco antes del dominio NG (aminoácido 241 al 421, Fig. 4, rosa). Esta observación indica dos posibilidades: 1) que la ausencia de los 120 nucleótidos es una característica intrínseca del gen N66 de *P. mazatlanica*, o 2) que faltan aminoácidos que forman parte del primer dominio CA y del dominio NG. Además, los codones de inicio y término del gen N66 de madre perla tampoco fueron observados (Fig. 4).

como sustituciones de nucleótidos y aminoácidos (Fig. 5). Los autores refieren que este hallazgo es consistente con otros estudios en donde se han observado altos niveles de polimorfismo en el ADN de los genomas de las ostras.

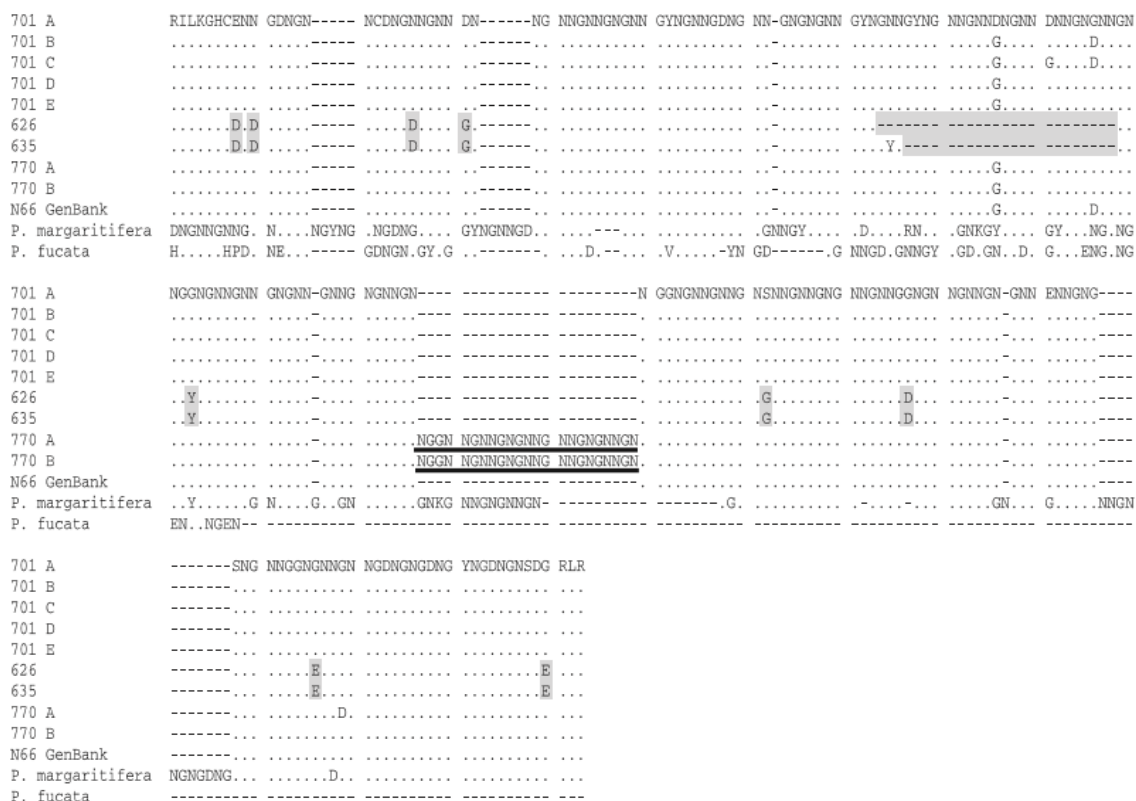


Figura 5. Comparación entre las secuencias del dominio NG de diferentes proteínas localizadas en diferentes alelos de N66 de *P. maxima* y en la nacreína de *P. fucata* y *P. margaritifera*. Alelos del N66 de *P. maxima*: 701 A-E, 626, 635 y 770 A-B. Los residuos e *indels* (inserciones y deleciones) representan los dos *loci* (626 y 635) co-amplificantes de *P. maxima*. Los residuos subrayados muestran las regiones conservadas en cada alelos de *P. maxima*. (Tomado de Smith-Keune y Jerry, 2009).

Por lo anterior, para tener una mayor comprensión de la estructura y función de la N66 en la formación de la concha de madre perla *P. mazatlanica* se requiere caracterizar el gen completo. Además, se requieren de análisis comparativos de la secuencia deducida del gen con respecto al de otras proteínas homólogas.

2.2 Proteínas homólogas a N66

Estudios bioinformáticos revelan que la proteína N66 de *P. maxima* es homóloga con la nacreína procedente de la ostra perlera *P. fucata*, aunque también presenta homología con otras enzimas provenientes de la familia de la Anhidrasa Carbónica (EC 4.2.1.1) como la CAVII (35% de identidad) y CAII (32% de identidad) de *Homo sapiens* (Kono *et al.*, 2000); la comparación entre las secuencias de N66 de *P. maxima* y nacreína de *P. fucata* indican que ambas tienen un dominio similar a la anhidrasa carbónica (Kono *et al.*, 2000).

La **Nacreína** es una proteína soluble compuesta por 447 aminoácidos, con un peso de 60 kDa, con un pI de 6.8 (Miyamoto *et al.*, 1996), se caracteriza por tener un dominio NG (Gly-Xaa-Asn; Xaa = Asp, Asn, o Glu) rico en aminoácidos ácidos, siendo el Asp el más abundante. También cuenta con el dominio de CA que tiene 29% de identidad con CAII de *H. sapiens* (Miyamoto *et al.*, 1996; Samata, 2004). La nacreína forma parte de la matriz orgánica del nácar actuando como regulador negativo en la cristalización de carbonato de calcio (Miyamoto *et al.*, 2005), además, actúa como concentrador para la formación de iones de carbonato de calcio (Norizuki y Samata, 2008). Miyashita *et al.* (2012), en un experimento de transcripción *in vitro*, demostraron que el factor de transcripción c-jun induce la transcripción de nacreína, este factor de transcripción está asociado al factor de transcripción AP1 de *H. sapiens*, por lo que sugiere que participa en el transporte de iones de carbonato de calcio (Miyashita *et al.*, 2012).

Tanto la nacreína como la N66 son consideradas como enzimas tipo anhidrasa carbónica dado que contienen en su estructura un dominio de CA, es decir, catalizan la síntesis de carbonato de calcio; además, ambas proteínas tienen una región rica de aminoácidos repetitivos de N y G (Fig. 6) (Kono *et al.*, 2000; Samata, 2004).

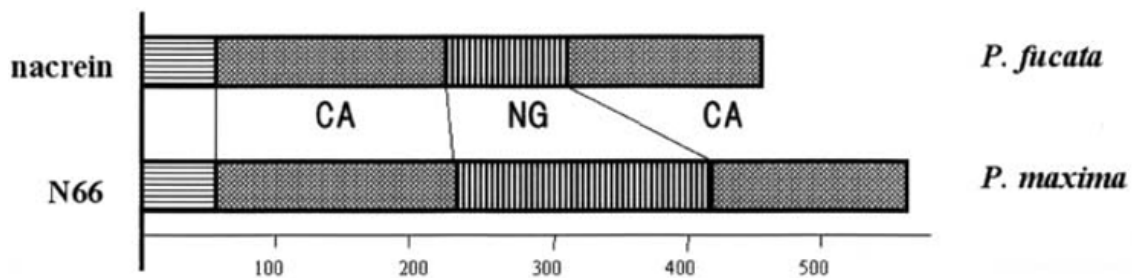


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la proteína nacreína de *P. fucata* comparada con la N66 de *P. maxima*. CA representa el dominio similar a la anhidrasa carbónica y NG la región rica en los aminoácidos Asn y Gly (Tomado de Kono *et al.*, 2000).

2.3 Anhidrasas carbónicas: mecanismo de catálisis

Debido a la importancia del dominio CA presente en la N66 y en la nacreína, es necesario saber cómo es el mecanismo de catálisis de una anhidrasa carbónica. Diversas investigaciones como las realizadas por Mikulski *et al.* (2011 a,b) y Taraphder *et al.* (2017) han empleado como modelo de estudio a la CA II de *H. sapiens*, ya que es la anhidrasa carbónica más estudiada. La reacción de una CA, es catalizar la conversión de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) en bicarbonato (HCO_3^-) y protones (H^+) (Silverman y Lindskog, 1988).

La hidratación del dióxido de carbono se lleva a cabo cuando el carbonilo del CO_2 es atacado nucleofílicamente por el hidroxilo de la CA (formado por los tres sitios de unión al zinc [His 94, 96 y 119]), entonces, se crea un grupo prostético de zinc conformado por la unión de las tres cadenas laterales de histidina y una molécula de agua. Posteriormente, la His 96 asociada al sitio activo (la cual tiene un bolsillo de alta especificidad por el CO_2) acepta un protón produciendo la liberación de HCO_3^- (Silverman y Lindskog, 1988).

El sitio activo de la CA tiene una cavidad que se contiene dos regiones, 1) una hidrofílica (Tyr 7, Asn 62, His 64, Asn 67, Thr 199 y Thr 200), que se encarga de recubrir el sitio activo y de interactuar con otras moléculas (Fisher *et al.*, 2010; Mikulski *et al.*, 2011b) y 2) una región hidrofóbica (Val 121, Val 143, Leu 198, Val207 y Trp209) relacionada con el ataque nucleofílico por el hidróxido unido al zinc. El residuo Asn 62 es relacionado con la formación de dos conformaciones en el sitio activo y en la lanzadera de protones, se conoce que una mutación en

este sitio afecta notablemente la transferencia de protones en el mecanismo de catálisis de las anhidrasas carbónicas (Zheng *et al.*, 2008). El residuo Trp 5, es un elemento importante en la lanzadera de protones, presente en el mecanismo de catálisis de este tipo de enzimas, por lo que es altamente conservado en las alfa anhidrasas carbónicas y se ha observado que una mutación en este residuo causa cambios estructurales significativos (Mikulski *et al.*, 2011a).

El residuo His 107 es importante en el plegamiento de la proteína, además, forma parte de una red de enlaces de hidrógeno localizados en el sitio activo His 119 hasta Trp 209 a través de Glu 117, Tyr 194, Ser 29 y Ser 197 (Taraphder *et al.*, 2017). Además, los residuos Glu 117, His 107, Asn 244 y Arg 246, están involucrados indirectamente en la red de enlaces y orientan las cadenas laterales que recubren la cavidad del sitio activo haciendo su conformación más estable (Eriksson *et al.*, 1988). La Pro 30 tiene gran importancia en el plegamiento de la proteína, además, junto con la Pro 202 tienen una conformación isomérica tipo *cis*, que está asociada con el proceso de re plegamiento lento de la proteína (Eriksson *et al.*, 1988; Fransson *et al.*, 1992). Los aminoácidos Pro 201, Leu 203, Leu 204, Asp 205 están asociados a hidrólisis de enlaces éster. Los residuos Leu 203 y Thr 208, están relacionados a la actividad específica para la hidratación de bióxido de carbono (CO₂), por lo que un cambio en estos residuos podría aumentar o disminuir dicha actividad (Eriksson *et al.*, 1988). Por otra parte, los residuos Asn 67, Gln 92 y Leu 204, Cys 206 están implicados en la unión a inhibidores, se ha demostrado que un cambio en estos sitios repercute en su unión y en la eficiencia catalítica (Ericksson *et al.*, 1988; Turkoglu *et al.*, 2012).

Los residuos, Tyr 191, Trp 192, Pro 195, Gly 196, Ile 210 están asociados al plegamiento de la proteína y a su estabilidad térmica (Krebs y Fierke, 1993), al igual que los residuos Trp 16, His 64, Asn 67, Leu 118, Ala 142, Ile 146 (Hammarstrom *et al.*, 2001). Los residuos Leu 44, Asn 61, Ser 105, His 107, Glu 106, Gly 104 y Pro 186 están relacionados con la estabilidad estructural (Hoque, 2014).

2.4 Estudios relacionados con la expresión de SMPs en sistemas procariontes.

En la actualidad, se han realizado algunos estudios de expresión heteróloga de proteínas recombinantes provenientes del nácar que tienen una función en la biomineralización en ostras perleras. A continuación, se mencionan algunos trabajos en los que se utilizaron diferentes enfoques de estudio al expresar este tipo de proteínas, por ejemplo:

La **N16** de *P. fucata* fue expresada en *Escherichia coli* BL21, purificada mediante cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel y, finalmente, usada en un ensayo de mineralización *in vitro* utilizando células precursoras de osteoblastos provenientes de ratón (*Mus musculus*) para determinar su participación en la resorción y formación ósea. Los resultados indicaron que la N16 tiene efectos tanto anabólicos como moduladores en el hueso (Ma *et al.*, 2016).

En otro estudio Ponce y Spencer (2011) expresaron la isoforma r-n16.3 de N16 de *P. fucata* en *E. coli*, encontrando que la N16, además de nuclear aragonita también es capaz de nuclear varita. Posteriormente, Perovic *et al.* (2014) encontraron que la misma isoforma forma fases de proteínas tipo gel que organizan y agrupan depósitos minerales de dimensiones nanométricas, formando las láminas presentes en los distintos tipos de estructuras de la capa de nácar.

En el 2016, Son *et al.* lograron expresar la proteína **GG1234** (proteína ácida con capacidad de nuclear calcita, proveniente de la concha de moluscos) en *E. coli* BL21, con la finalidad de crear biocompuestos a partir de proteínas con un 95% de grado de pureza.

En otros trabajos Yan *et al.* (2017) expresaron la proteína **PFY2**, que es una proteína soluble, recientemente localizada en la capa prismática y nacarada, en el sistema de *E. coli* (Transsetta, DE3), con la finalidad de determinar su posible

papel en el sistema de mineralización de *P. fucata*. Sus resultados indicaron que la PFY2 podría actuar como un fuerte regulador negativo de la capa nacarada.

La **Perlucina** es una proteína de naturaleza insoluble; esta característica convierte a este tipo de proteínas nativas difíciles de purificar. Debido a ello Weber *et al.* (2012), decidieron expresar la secuencia de la perlucina en el sistema de *E. coli* para determinar si la proteína recombinante influye en los procesos de inhibición de carbonato de calcio. El resultado confirmó esta teoría, y además se demostró que la modificación del dominio Gly-Pro-Tyr (GPY) de la perlucina, le confiere la capacidad de regular calcita en distintas morfologías. Así mismo, este dominio convirtió a la proteína recombinante en menos insoluble en comparación con la nativa.

Otras proteínas que han sido expresadas en el sistema de *E. coli* BL21 son la **Aspeína** y la **Pif 97** de *P. fucata*. La aspeína recombinante fue usada en ensayos de biomineralización *in vitro* para elucidar su participación en el control de la formación de cristales de calcita y aragonita (Takeuchi *et al.*, 2008), mientras que Pif97 fue expresada con el propósito de evidenciar su participación en la calcificación del nácar (Bahn *et al.*, 2015).

2.5 Sistemas de expresión para proteínas recombinantes.

Una de las razones por las que hoy en día se producen proteínas recombinantes es para obtener información acerca de su participación en determinados procesos biológicos. Por ende, la producción de proteínas recombinantes está totalmente relacionada con el origen biológico del organismo parental, por lo que uno de los pasos más importantes para la obtención de proteínas recombinantes es la elección del organismo hospedero. La elección del huésped no sólo afecta a la expresión de la proteína sino también la forma en que la proteína recombinante pueda ser purificada (Rosano y Ceccarelli, 2014).

En este trabajo, el origen biológico de la proteína de interés (N66) es eucariota, sin embargo, todos los antecedentes de las SMPs recombinantes se han realizado en *E. coli*, y en todos los casos las proteínas han conservado su actividad (Bahn *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Perovic *et al.*, 2014; Ponce y Spencer, 2011; Takeuchi *et al.*, 2008).

La expresión de cualquier gen exógeno involucra tres etapas: 1) la inserción del gen en un vector de expresión, 2) la introducción del vector de expresión en la célula hospedero, y 3) la examinación de transformantes potenciales para la expresión del gen externo. Uno de los elementos que constituyen un vector de expresión es el promotor (Fig. 7), que se encarga de promover la transcripción; en *E. coli* el más estudiado es el promotor *Lac*.

Otro elemento indispensable en el vector es el marcador de selección que se utiliza para impedir el crecimiento de células libres del plásmido insertado; dentro de los marcadores más comúnmente utilizados se encuentran los antibióticos como la ampicilina y kanamicina. Finalmente, las etiquetas de afinidad (por ejemplo, Histidinas), ayudarán en la purificación y detección de la proteína recombinante (Rosano y Ceccarelli, 2014).

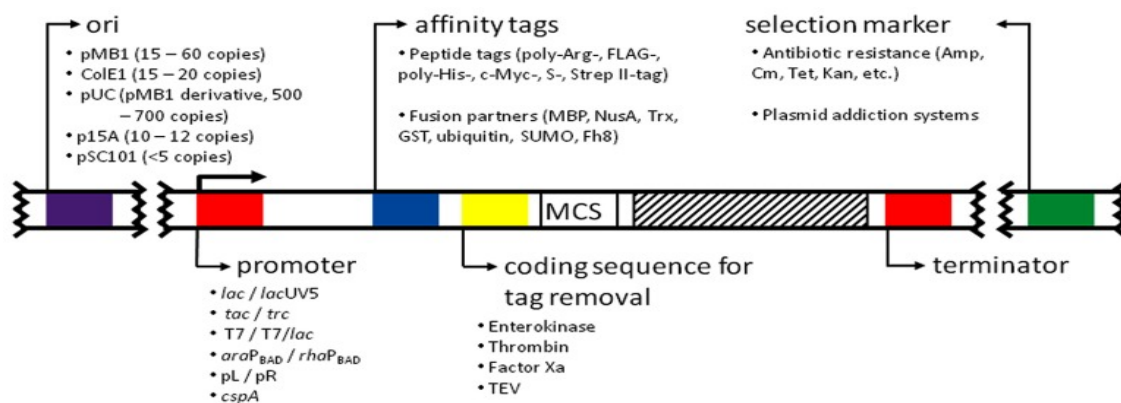


Figura 7. Elementos de un vector de expresión para sistemas procariotas (Tomado de Rosano y Ceccarelli, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La función de las SMPs en la biomineralización de la concha se basa en el estudio de cuatro aspectos: 1) el estudio de la secuencia de genes que codifican las proteínas de la matriz; 2) las secuencias de aminoácidos deducidas; 3) la expresión génica en el manto; y 4) su distribución en las hojas interlaminares de la capa de nácar (Xie *et al.*, 2011). Así, la mayoría de los estudios acerca de la función de las SMPs se ha generado al obtener sus estructuras primarias, que posteriormente se ha relacionado con proteínas homólogas de otros sistemas de biomineralización (Zhang y Zhang, 2006).

Las SMPs han sido ampliamente estudiadas debido a su capacidad para generar diferentes formas del carbonato de calcio (como calcita o aragonita) bajo condiciones físicas similares, durante el proceso de biomineralización. A partir de los resultados de estas investigaciones se conoce que solo algunas proteínas son capaces de inducir la generación de los dos polimorfos: una de estas proteínas es la N66. Debido al escaso conocimiento que existe acerca de la de la N66 de madre perla (*P. mazatlanica*) y su potencial función como nucleador e inhibidor de carbonato de calcio en el proceso de biomineralización, es importante conocer las características intrínsecas de la proteína para poder entender su funcionamiento durante este proceso biológico, además de evaluar su capacidad para formar polimorfos de carbonato de calcio.

Este estudio sentará las bases para la síntesis *in vitro* de proteínas recombinantes de la concha de moluscos para estudiar la modulación de producción de polimorfos específicos que servirán para el diseño de materiales biomiméticos útiles en áreas como la ciencia de los materiales, nanotecnología y medicina (Luz y Mano, 2009; Xie *et al.*, 2011), ya que uno de los fundamentos para el diseño de biomateriales radica en conocer la estructura de la moléculas involucradas.

4. HIPÓTESIS

Si las características bioquímicas de la proteína N66 nativa de *P. mazatlanica* le permiten actuar como nucleador y regulador de dos polimorfos de carbonato de calcio durante el proceso de biomineralización *in vitro*, entonces la proteína N66 recombinante expresada en un sistema heterólogo realizará la misma función.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Expresar y caracterizar la proteína de nácar N66 recombinante proveniente de *Pinctada mazatlanica*, y determinar su función en un sistema de biomineralización *in vitro*.

5.2 Objetivos particulares

- a) Determinar si existe el gap de 120 pb de N66 de *P. mazatlanica* reportada en trabajos previos.
- b) Obtener y caracterizar la secuencia codificante de N66.
- c) Expresar la secuencia de N66 en el sistema de *E.coli*.
- d) Purificar y caracterizar la proteína recombinante de *P. mazatlanica*.
- e) Determinar *in vitro* el efecto en la concentración de sales en la formación de polimorfos del carbonato de calcio por N66 en *P. mazatlanica*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

La estrategia metodológica para abordar las tres principales líneas de investigación de la presente tesis, se muestran en la Figura 8: 1) obtención y caracterización de la secuencia codificante de N66 de *P. mazatlanica* (objetivo particulares a y b); 2) construcción del vector de expresión de la secuencia N66 y expresión heteróloga (objetivo particular c); y 3) purificación y caracterización de la N66 recombinante (objetivos particulares d y e).

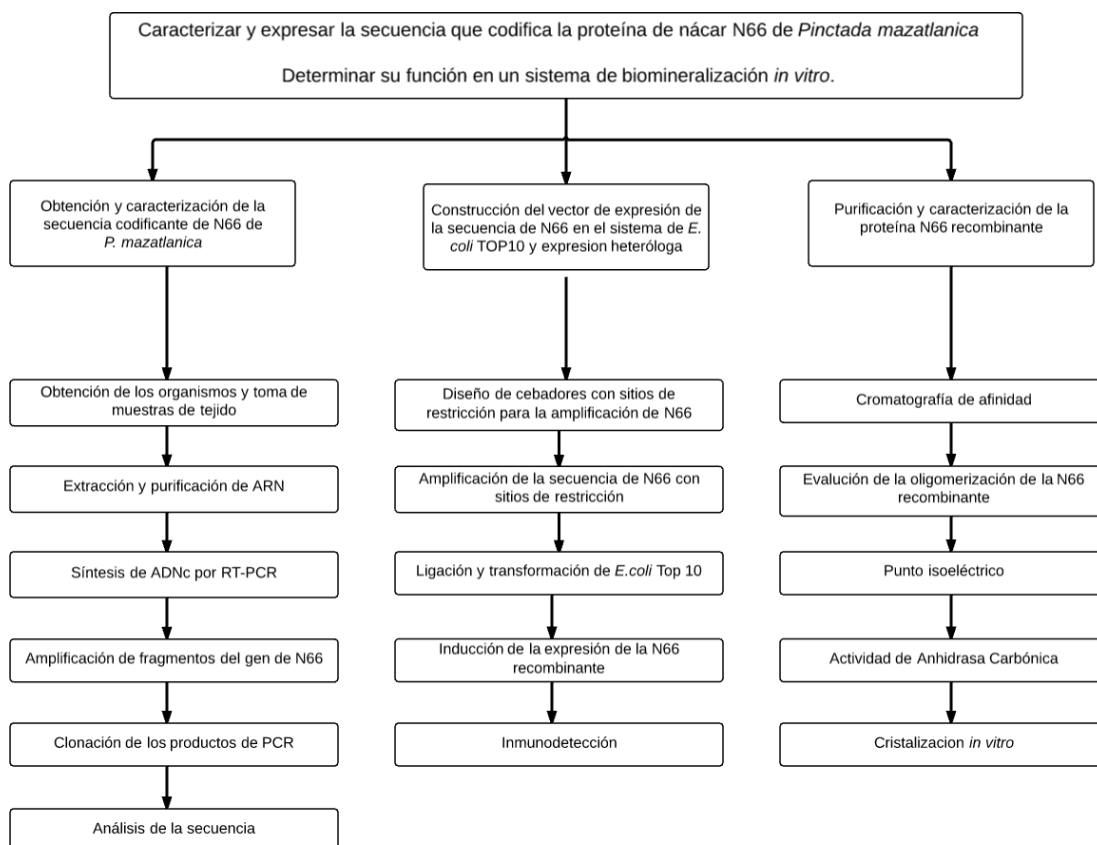


Figura 8. Esquema que representa la estrategia metodológica para abordar los 5 objetivos particulares planteados en la presente tesis.

6.1. Obtención y caracterización de la secuencia codificante de N66 de *P. mazatlanica*

6.1.1 Obtención de los organismos.

Dos organismos adultos de la especie *P. mazatlanica*, donados por el Dr. Pedro Saucedo Lastra del Laboratorio de Larvicultura de Organismos Acuáticos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., fueron transportados en condiciones húmedas a las instalaciones del Laboratorio de Genética Molecular. En el laboratorio, los organismos fueron disectados mediante el uso de un bisturí, obteniendo varias secciones de la parte central del manto (Fig. 9, Mc), que fueron preservadas en RNA later (citrate de sodio 0.024 M, EDTA 0.04 M pH 8, sulfato de amonio 5.29 M) y congeladas a -80 °C hasta su uso posterior.

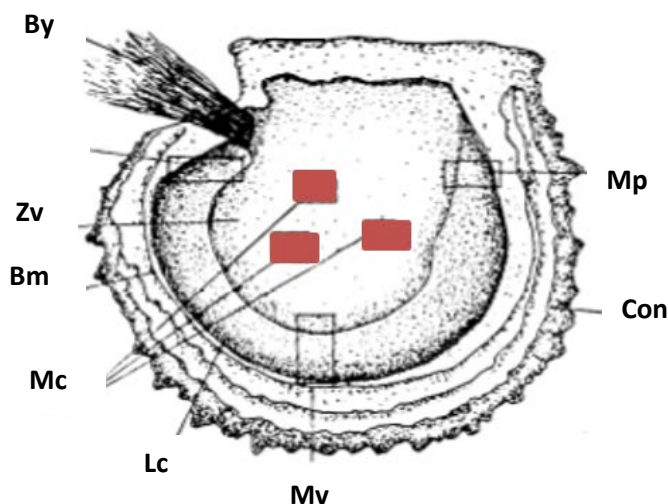


Figura 9. Representación esquemática de la valva derecha de *P. mazatlanica* en la que se señalan las diferentes zonas del manto. **By**, biso; **Mc**, manto central; **Zv**, zona visceral del manto; **Bm**, borde del manto; **Lc**, límite de la capa nacarada; **Mv**, manto ventral; **Con**, concha; **Mp**, manto posterior (Tomado de García-Gasca, 1992).

6.1.2 Extracción y purificación de ARN.

Para la extracción del ARN total del manto, se utilizó el reactivo TRIzol® (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, cada muestra procesada consistió en 100 mg de tejido (manto) que se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se adicionaron 500 µL del reactivo TRIzol® y se homogenizó manualmente con un pistilo durante dos minutos a 25 °C. Después

se adicionaron 500 μL más de TRIzol[®] y se realizó una segunda homogenización bajo las mismas condiciones. Los homogenizados se incubaron a temperatura ambiente por 5 min y, enseguida, se agregaron 200 μL de cloroformo. Cada muestra fue mezclada por inversión durante 15 seg; los tubos se incubaron durante 3 min más a temperatura ambiente.

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12,000 $\times g$ por 15 min a 4 °C. La fase acuosa fue colectada (~400 μL) y transferida a un tubo nuevo estéril. Para precipitar el ARN se agregaron 500 μL de isopropanol; las muestras se mezclaron por inversión 7 veces y, posteriormente, fueron incubadas 10 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarse bajo las condiciones anteriormente descritas. El sobrenadante fue descartado y el pellet (ARN total) se lavó con 1 mL de etanol al 75% (en agua DEPC). Los tubos con el ARN-etanol se centrifugaron a 7000 $\times g$ durante 5 min a 4 °C; el sobrenadante fue descartado y el pellet resultante se secó a temperatura ambiente para eliminar residuos de etanol. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 μL de agua Milli-Q estéril.

Para eliminar inhibidores el ARN obtenido, se precipitó con LiCl 4 M, brevemente: a cada muestra de ARN se adicionaron 5 μL de LiCl 4 M y 300 μL de etanol absoluto frío, enseguida se mezcló por inversión 7 veces y se dejó precipitando toda la noche a -20 °C. Para recuperar el ARN, las muestras se centrifugaron 13,201 $\times g$ durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 500 μL de etanol al 75% (en agua DEPC). Las muestras fueron centrifugadas a 13,201 $\times g$ durante 20 min a 4 °C, nuevamente el sobrenadante fue descartado. Posteriormente, se eliminó el exceso de alcohol de cada muestra, secando al aire a temperatura ambiente. El pellet resultante se resuspendió en 30 μL de agua Milli-Q estéril.

El ARN obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría (260 nm) y la calidad del ARN de las muestras se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa-Synergel[®]-TBE-DEPC al 1%. Para descartar la presencia de ADN genómico en las preparaciones, se realizó un PCR comprobatorio usando como templado 50

ng de ARN total de manto de *P. mazatlanica*, como control positivo 50 ng de ADNc de *C. gigas*, y como control negativo la mezcla de reacción sin templado. La mezcla de cada reacción contenía: cebadores universales para el gen ribosomal 28s (10 μ M) (Tabla IV), buffer PCR 10X, MgSO₄ 50 mM, DMSO 10%, dNTP's 10 mM, 1U de Taq polimerasa y agua Milli-Q estéril en un volumen final de 12.5 μ L. El programa usado para la amplificación se muestra en la Tabla V.

Tabla IV. Cebadores usados en el presente trabajo.

Nombre	Secuencia 5' \longrightarrow 3'	Tamaño del producto (pb)	Tm (°C)	Ta (°C)
N66 1F	ATGTGGAGAATGACGACGCTT	425	56.7	50
N66 425R	TGTGAATATGGAGATTGCGG		52.6	
N66 1229F	GGTGGAACGGGAACAATGGTAA	537	57.6	50
N66 1766R	CTCATATAAAGTTTTTGTACACAGG		50.2	
N66 680R	CCTTTAATATGCGCTTACATTC	1000	50	50
N66 1642F	GTATGGAACCAGACGTCCC		55	
N66 4F	GTGGAGAATGACGACGCTTC	1638	56	60
N66 1642R	GGGACGTCTGGTTCCATAC		55	
28F	GCAGGAAAAGAACTAAC	400	45.8	50
28R	CCTCTAAGTGGTTTCAC		46.6	
N66 HinF (ptrc)	GTGAAGCTTTGCCTCCATGCACAGGCATG	400	67	60
N66 HinR(ptrc)	CACAAGCTTGGGACGTCTTGTTCATAC		61.2	
M13 F	GTA AACGACGGCCAGT	200	52.6	55
M13R	GCGGATAACAATTCACACAGG		54.5	

6.1.3 Síntesis de ADNc por RT-PCR

La síntesis del ADNc se realizó usando como templado 1 μ g de ARN total de manto de madre perla *P. mazatlanica* y el sistema de transcripción reversa ImProm-II™ Reverse Transcriptase Synthesis Reaction® (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con pequeñas modificaciones (se adicionó 1 μ L del oligo dt 18 y se ajustó el volumen de la reacción a 5 μ L con agua libre de nucleasas). El templado se incubó a 70 °C por 5 min y 4 °C por 5 min. Después, se adicionaron 15 μ L de una reacción que contenía: 25 mM de MgCl₂, 10 mM dNTP, 20 U de RNasin, 1 μ L de Improm-II RT, 4 μ L de Improm-II 5x reaction buffer y agua libre de nucleasas. Las reacciones se incubaron a 25 °C

por 5 min, 50 °C por 60 min y 70 °C por 15 min en un termociclador T-100 (BioRad). Finalmente, el ADNc fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm.

Tabla V. Programa utilizado para la amplificación del gen 28s ribosomal y los fragmentos de N66: 1-425 y 680-1642.

Etapa	Temperatura/Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C/5'	1
Desnaturalización	94°C/1'	5
Alineamiento	40°C /1'	
Extensión	72°C/1'	
Desnaturalización	94°C/1'	35
Alineamiento	50°C /1'	
Extensión	72°C/1'	
Extensión final	72°C/10'	1

6.1.4 Amplificación de fragmentos del gen de N66.

En este trabajo se diseñaron diferentes estrategias de amplificación de distintos fragmentos de la N66, con los siguientes propósitos:

1. Para determinar si el gap de 120 pb de la secuencia parcial de N66 obtenida en trabajos anteriores es una característica particular de este gen, se amplificó y clonó el fragmento 680-1642.
2. Para obtener la secuencia completa codificante del gen obtuvieron los extremos 5' y 3', correspondientes a con los fragmentos 1-425 y 1229-1766.

6.1.4.1 Fragmento 680-1642

Se amplificó el fragmento 680-1642 del gen N66 mediante PCR en punto final. La mezcla de reacción contenía 75 ng de ADNc, cebadores para el gen N66 (10 µM) (680Fy 1642R, Tabla IV), buffer PCR 10X, 50 mM MgSO₄, DMSO 10%, 10 mM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa y agua Mili-Q estéril en un volumen final de 50 µL. Como control positivo se usaron 50 ng de ADNc de *C. gigas*, usando los cebadores universales para el gen 28S ribosomal (Tabla IV), mientras que el control negativo contenía la mezcla de reacción sin templado. El programa usado para la amplificación se muestra en la Tabla V. Los productos

obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa-Synergel[®]-TBE al 1%. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados, para su posterior clonación, utilizando el kit MiniElute PCR Purification[®] (QIAGEN) siguiendo las indicaciones del fabricante; posteriormente los productos purificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa-Synergel[®]-TBE al 1% y visualizados en el equipo ChemiDoc XRS (BioRad).

6.1.4.2 Fragmento 1-425

Se amplificó el fragmento 1-425 del gen N66 mediante PCR en punto final. La mezcla de reacción contenía 50 ng de ADNc de manto de madre perla, cebadores (10 μ M) para el gen N66 (1Fy 425R, Tabla IV), buffer PCR 10X, 50 mM MgSO₄, DMSO 10%, 10 mM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa y agua Mili-Q estéril en un volumen final de 50 μ L. El programa usado para la amplificación se presenta en la Tabla V. El producto obtenido fue analizado por electroforesis en geles de agarosa-Synergel[®]-TBE al 1% y visualizado en el equipo ChemiDoc XRS (BioRad). Posteriormente los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a GenWize.

6.1.4.3 Fragmento 1229-1766

Para la amplificación de este fragmento se usó la técnica de PCR anidado. La primera amplificación, contenía: 50 ng del ADNc total de manto de madre perla *P. mazatlanica*, el cebador 680R de N66 (10 μ M) y el cebador 1766F (10 μ M) (Tabla IV), GoTaq@Green[®] Master Mix en un volumen final de 50 μ l. El programa usado se presenta en la Tabla V. El producto obtenido fue diluido 1:10, de esta dilución se usó 1 μ L como templado para la segunda reacción de PCR en punto final que contenía: los cebadores 1229F y 1766R (Tabla IV), buffer PCR 10X, 50 mM MgSO₄, DMSO 10%, 10 mM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa y agua Mili-Q estéril. El programa usado se muestra en la Tabla V. Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa-Synergel[®]-TBE al 1% y visualizados en el equipo ChemiDoc XRS (BioRad). Posteriormente fueron enviados a secuenciar a la compañía GeneWize.

6.1.5 Clonación de los productos de PCR.

El fragmento de N66 680-1642 se ligó en el vector pCR 2.1 (TA Cloning® Kit con el vector pCR™2.1, Thermo Fisher), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se transformaron en células competentes de *E. coli* TOP 10, para ello se adicionaron 2 µL de beta-mercaptoetanol y 2 µL de la reacción de ligación a 50 µL de células competentes mantenidas en baño de hielo, incubándose durante 30 min. Las células fueron sometidas a choque térmico a 42 °C por 30 seg y posteriormente incubadas en hielo durante 2 min. A cada muestra se le añadieron 250 µL de medio SOC líquido y se incubaron por una hora a 37 °C con agitación orbital constante a 150 rpm. Finalmente, las células se plaquearon (200 µL de cada transformación) en placas con medio LB-agar conteniendo X-gal-IPTG (40µg/µl); las cajas fueron incubadas a 37 °C por 18 h.

Las colonias transformadas, positivas (colonias blancas), fueron resembradas en cajas Petri con medio LB-agar. Para corroborar que el inserto estaba ligado al vector se realizó una PCR de colonia usando como templado una colonia blanca en una mezcla que consistió en: buffer PCR 10X, 50 mM MgSO₄, DMSO 10%, 10 mM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa y agua Mili-Q estéril en un volumen final de 50 µL; los cebadores utilizados en la reacción fueron M13Fy M13R (10 µM) (Tabla IV).

Las colonias que contenían el inserto (fragmento 680-1642) se usaron para inocular 3 mL de medio LB-ampicilina (100 µg/mL), los cultivos fueron incubados toda la noche a 37 °C en agitación orbital a 150 rpm. Posterior a la incubación, se tomaron 1.5 mL de cada cultivo y se colocaron en tubos Eppendorf del mismo volumen; el resto del cultivo se guardó en cuarto frío (4 °C). El ADN plasmídico de los cultivos fue extraído por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1989), para ello las células fueron centrifugadas a 9,168 x g por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el botón de células se lavó con 1 mL de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM) y se centrifugó

nuevamente. El sobrenadante se decantó, posteriormente se adicionaron 50 μL de solución I y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A cada tubo se añadieron 150 μL de solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%), preparado al momento, y se mezcló por inversión. Después, las muestras se incubaron en hielo por 5 min. Se añadieron 200 μL de solución III fría (acetato de sodio 3M, pH 5.2) y se agitó en vortex. Para la purificación del plásmido, las muestras se centrifugaron 10 min a $17,968 \times g$ a 4°C ; se colectaron 300 μL de la superficie del sobrenadante y se transfirieron a un tubo nuevo conteniendo 700 μL de etanol absoluto frío. Las muestras se mezclaron por inversión y fueron incubadas a -20°C toda la noche. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a $17,968 \times g$, 10 min a 4°C . El sobrenadante se decantó y el pellet se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se dio un pulso en la centrífuga y el pellet resultante se secó a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 50 μL de buffer TE pH 7.5 (100 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA) y, para eliminar la presencia de ARN, se adicionó 1 μL de ARNasa (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incubó durante 1 hr a 37°C . El ADN plasmídico se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa-Synergel[®]-TBE al 1% y visualizado en el equipo ChemiDoc XRS (BioRad) . El ADN plásmidico purificado se diluyó en agua Milli-Q estéril hasta alcanzar una concentración de 100 ng/ μL para enviarse al servicio de secuenciación (Macrogen); los cebadores utilizados para la secuenciación fueron los M13 (F-R) y N66 (680F-1642R) (Tabla IV).

6.1.6 Análisis de la secuencia

Las secuencias obtenidas de N66 fueron ensambladas utilizando el programa DNA baser (DNA Sequence Assembler v4, 2016, <http://www.dnabaser.com/>, Heracle BioSoft). Los contigs resultantes se compararon con la base de datos del NCBI (Wheeler *et al.*, 2007.) utilizando la herramienta de BLASTn para determinar la identidad de las secuencias. Todos los alineamientos generados en este trabajo se hicieron con el programa de Clustal Omega EMBL-EBI (McWilliam *et al.*, 2013).

Para determinar (por métodos informáticos) si la secuencia de aminoácidos cuenta con péptido señal, sitios de glicosilación y/o sulfatación, así como el punto

isoelectric and molecular weight was used the ExPASy server (Gasteiger *et al.*, 2003). To determine disulfide bridges present in the coding protein were used the programs DISULFIND (Ceroni *et al.*, 2006), DiANNA (Ferrè y Clote., 2006), and CYS-PRED (Fariselli *et al.*, 1999). For cellular localization was used PSORT II (Horton *et al.*, 2007). For the prediction of the secondary and tertiary structure of the protein was used the program Phyre 2 (Kelley *et al.*, 2015), while for the search of domains were used the servers of AIDA (Xu *et al.*, 2013) and DIAL (Pugalenthi *et al.*, 2005).

6.2. Construcción del vector de expresión de la secuencia de N66 en el sistema de *E. coli* TOP10.

6.2.1 Diseño de cebadores con sitios de restricción para la amplificación de N66.

Se realizó un análisis a la secuencia de N66 de *P. mazatlanica* para diseñar un juego de cebadores con sitios de restricción específicos, eliminando de la secuencia codificante los nucleótidos correspondientes al péptido señal (aminoácidos del 1 al 21). La enzima se seleccionó con base al análisis de restricción de la secuencia de N66 utilizando aquellas enzimas dentro del sitio múltiple de clonación del vector pTrcHis A y que no cortan la secuencia de N66 (Fig. 10).

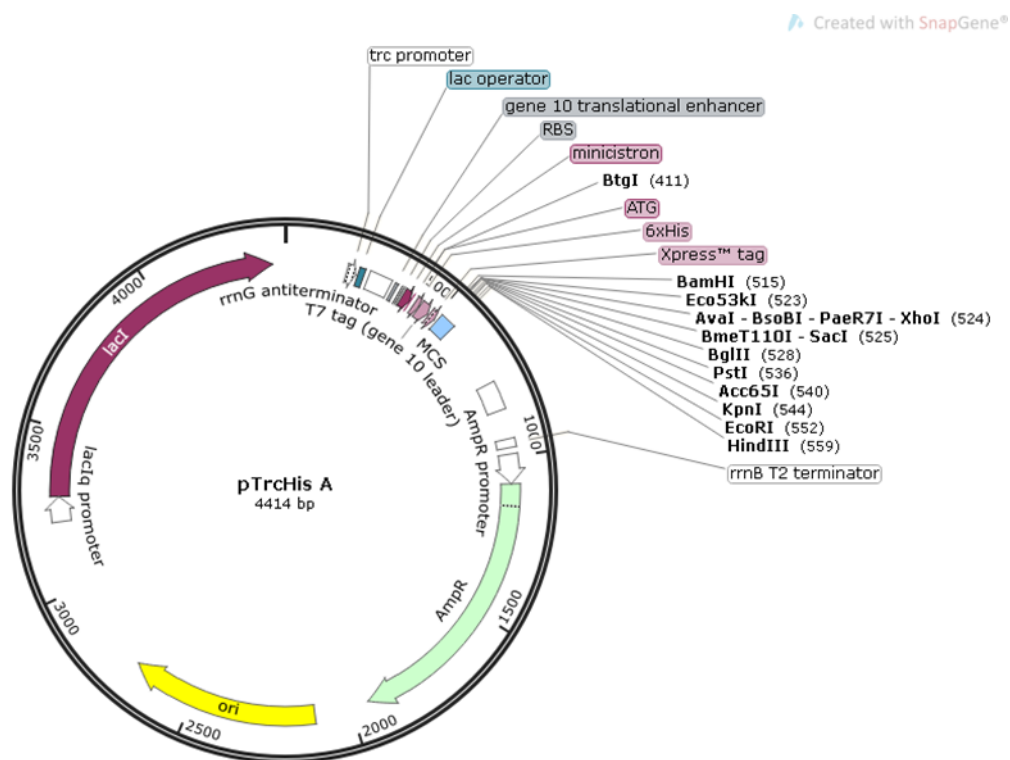


Figura 10. Representación gráfica del vector pTrcHis A, creado con SnapGene. MCS: Sitios múltiples de clonación, indican los sitios de inserción de genes a sobre-expresar.

Se usó el programa SnapGene (<http://www.snapgene.com/>) para realizar un análisis bioinformático para establecer el sitio de clonación más adecuado para insertar el gen en el vector de expresión pTrcHis A (sitio de restricción que no afectara el marco de lectura de la proteína codificante y que no cortara el gen de N66), seleccionándose *Hind* III.

Los cebadores sintetizados originalmente para amplificar el gen de N66 del nucleótido 23 al 1642, fueron sintetizados incorporando el sitio de restricción de *Hind* III (AAGCTT), así mismo se añadieron 3 nucleótidos extra en cada extremo del cebador (GTG [forward]) y CAC [reverse]) para aumentar la eficiencia de la digestión. Los cebadores fueron diseñados y validados utilizando el programa OligoAnalyzer (Owczarzy *et al.*, 2008). En la Tabla IV los nucleótidos resaltados en negritas corresponden a los sitios de restricción. Cabe destacar que este constructo (Fig. 11) contiene un tag de seis histidinas en el extremo carboxilo, las cuales serán de utilidad en el proceso de purificación de la proteína.

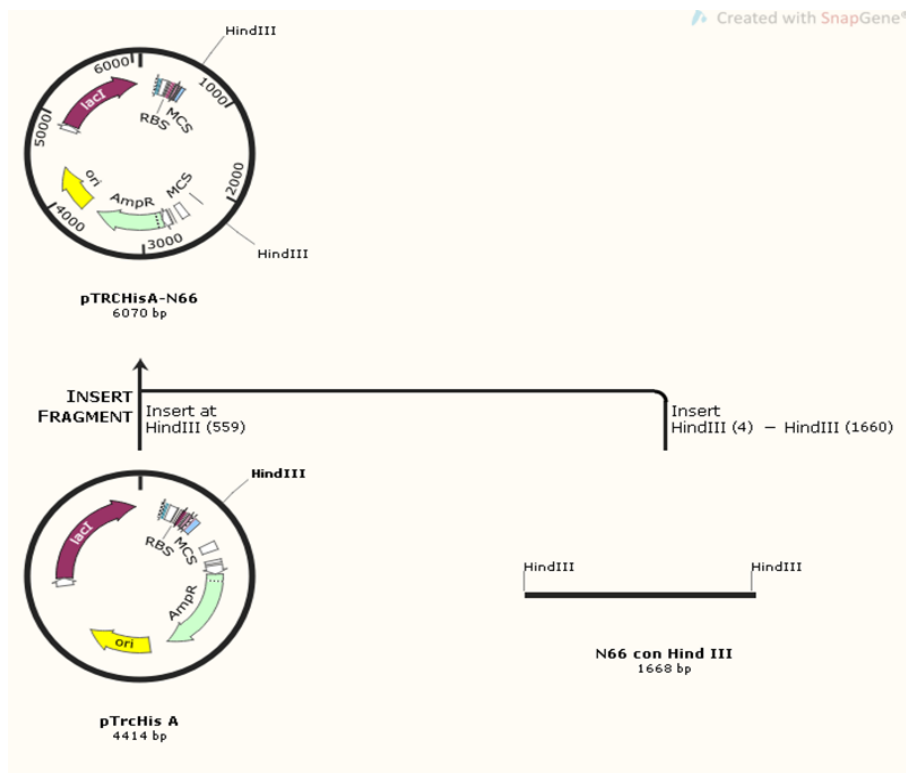


Figura 11. Representación esquemática del constructo N66-pTrcHis. Imagen creada con el programa SnapGene.

6.2.2 Amplificación de la secuencia de N66 con sitios de restricción

N66 se amplificó usando cebadores con sitios de restricción *Hind* III (N66 HinF y N66 HinR, Tabla IV) para su posterior clonación en el vector pTrcHis A. La amplificación se llevó a cabo en dos etapas. La primera consistió en la amplificación de la región 4-1642 usando los cebadores mostrados en la Tabla IV (N66 4F-N66 1642R), 50 ng de ADNc *P. mazatlanica*, buffer PCR 10X, 50 mM MgSO₄, DMSO 10%, 10 mM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa y agua Mili-Q estéril en un volumen final de 50 µL. El programa usado se presenta en la Tabla VI. En la segunda etapa, se usó como templado 1 µL del producto 4-1642, los cebadores N66 HinF y N66HinR (Tabla IV), buffer PCR 10X, 50 mM MgSO₄, DMSO 10%, 10 mM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa y agua Mili-Q estéril en un volumen final de 50 µL. El programa usado se describe en la Tabla VI. El

producto obtenido se visualizó en un gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1% en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (BioRad)

Tabla VI. Programa utilizado para la amplificación de N66 con sitios de restricción *Hind* III y el fragmento 4-1642.

Etapas	Temperatura/Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94 °C/5'	1
Desnaturalización	94 °C/1'	5
Alineamiento	40 °C /1'	
Extensión	72 °C/1'	
Desnaturalización	94 °C/1'	35
Alineamiento	60°C /1'30''	
Extensión	72 °C/1'	
Extensión final	72 °C/10'	1

6.2.3 Obtención del vector pTrcHis A

Para la obtención del vector pTrcHis A, se usaron clonas de *E. coli* TOP 10 que contenían el vector pTrcHis A. Las células fueron propagadas en 50 mL de medio LB incubando durante una noche a 37 °C con agitación orbital constante a 150 rpm; posteriormente se extrajo el ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1989) descrito en el apartado 6.1.5. El plásmido obtenido fue digerido con *Eco* RI (GAATTC) a 37 °C durante una noche. La reacción de digestión fue visualizada en un gel de agarosa-Synergel®-TAE al 1% en un fotodocumentador ChemiDoc XRS (BioRad). El vector linearizado fue recuperado para su posterior uso en la construcción del vector pTrcHis A-N66.

El vector pTrcHis A se linearizó con *Hind* III (AAGCTT) a 37 °C durante toda la noche. Los plásmidos linearizados se corrieron en geles de agarosa-Synergel®-TAE al 1% y visualizado en un ChemiDoc XRS (BioRad); la banda correspondiente al vector linearizado con *Hind* III se cortó del gel y se purificó usando la columna de purificación Ultrafree-DA 42600 (Merck); el ADNp purificado fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm.

Se realizó la digestión del producto (N66 con sitios de restricción) y vector (pTrcHis A) con la enzima de restricción *Hind* III (7 U), 2.5µL de NEBuffer™ *Eco* RI, y agua estéril para un volumen final de 25 µL. Cada reacción fue incubada a 37 °C durante toda la noche. Los productos obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1% y visualizados en un ChemiDoc XRS (BioRad). Después, se cortaron y se purificaron las bandas correspondientes al vector y al gen N66 digeridos.

6.2.4. Ligación y transformación de *E.coli* Top 10

Para la ligación del vector pTrcHis A linearizado y los amplicones de N66 con extremos cohesivos para *Hind* III, se utilizó 1U de T4 Ligasa® (Promega). La reacción de ligación se realizó a partir de una proporción molar vector-inserto 1:1, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{ng del vector})(\text{Kb del inserto})}{\text{Kb del vector}} \times \text{relación molar} = \text{ng de inserto} \quad (1)$$

Al sustituir los datos en la fórmula:

$$\frac{(79.2 \text{ ng})(1.6 \text{ Kb})}{(4.4 \text{ Kb})} \times 1 = 18.8 \text{ ng de inserto}$$

La ligación pTrcHis A-N66 se incubó a 4 °C durante toda una noche. Esta ligación se usó para transformar células competentes de *E. coli* TOP 10. Brevemente, se adicionaron 2 µL de beta-mercaptoetanol y 3 µL de la reacción de ligación a 50 µL de células competentes de *E. coli* TOP10 mantenidas en baño de hielo. Esta suspensión se incubó en hielo durante 30 min. Las células fueron sometidas a choque térmico a 42 °C por 45 seg y posteriormente incubadas en hielo 2 min. Posteriormente, se añadieron 250 µL de medio SOC líquido y se incubó por dos horas a 37 °C con agitación orbital constante a 150 rpm. Finalmente, se plaquearon 150 µL de la transformación en placas con medio LB-agar conteniendo X-gal-IPTG (40 µg/µL); las cajas fueron incubadas a 37 °C por 18 h.

Utilizando el sistema de detección de transformación del plásmido (X-gal-IPTG = colonias blancas con plásmido y con inserto; colonias azules con plásmido sin inserto), las colonias transformadas se sembraron en caja petri con medio LB-agar. Para corroborar que el inserto estaba ligado al vector se realizó PCR de colonia usando como templado una colonia blanca en una mezcla consistente en: buffer PCR 10X, 50 mM MgSO₄, DMSO 10%, 10 mM de dNTP's, 1U de Taq polimerasa y agua Mili-Q estéril en un volumen final de 50 µL. Los cebadores que se usaron fueron 680F y 1642R (10 µM) (Tabla IV) usando el programa descrito en la Tabla V.

Las colonias que contenían el inserto esperado (1000 pb), se usaron para inocular 3 mL de medio LB-ampicilina (100 µg/mL); los cultivos fueron incubados una noche a 37 °C en agitación orbital constante a 150 rpm. Al siguiente día se tomó 1.5 mL de cada cultivo y se colocó en un tubo Eppendorf del mismo volumen; el resto del cultivo se guardó en cuarto frío (4 °C) y en glicerol 20% a -80 °C. El ADN plasmídico de los cultivos fue extraído por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1989) descrito en el apartado 6.1.5. Por último, se realizaron ensayos de digestión con la enzima de restricción *Hind* III para corroborar la inserción del gen N66.

6.2.5 Inducción de la expresión de la N66 recombinante

Se inocularon 6 mL de medio LB conteniendo 6 µL de ampicilina (100 µg/mL) con 20 µL de la clona 7 (7p), el constructo pTrcHisA-N66-7p fue incubado a 37°C durante toda la noche en agitación orbital constante a 150 rpm; a éste se le denominó cultivo uno. Posteriormente, se realizó un segundo cultivo con 245 mL de medio LB, 5 mL del primer cultivo (usado como inóculo) y 250 µL de ampicilina (100 µg/mL) que se incubó a 37 °C durante tres horas en agitación orbital constante a 150 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.7. Posteriormente, se realizó el ensayo de inducción adicionando al cultivo 1 mM de IPTG, manteniéndolo a 37 °C en agitación orbital constante a 150 rpm. El periodo total de inducción fue de 4 horas, durante el experimento de inducción

se colectaron muestras de 1 mL cada una por 30 min (por duplicado) a partir del momento de inducción. Todas las muestras obtenidas durante el ensayo fueron centrifugadas 5 min a 4,000 x g a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el pellet (células) libre de medio LB se colectó. El cultivo restante (al finalizar las 4 horas de inducción) se usó para obtener las células por centrifugación a 3000 x g, 25 min a temperatura ambiente; la biomasa resultante se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

Los pellets obtenidos de las muestras tomadas cada 30 min, fueron tratados para visualizar tanto fracciones de proteínas solubles como proteínas totales en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Para obtener las proteínas solubles, se agregaron 200 µL de amortiguador (PBS 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM) para disolver el pellet. Posteriormente, las células se rompieron con perlas de vidrio (0.45 mm de diámetro) mediante 5 ciclos de 1 min de agitación en vórtex con intervalos de enfriamiento en hielo de 1 min; cada muestra se centrifugó a 7,500 x g por 8 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se mezcló con amortiguador de carga SDS 1X (Tris 0.125 M, SDS 2%, beta-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.04%); posteriormente las muestras fueron hervidas durante 10 min. Para obtener las proteínas totales, se agregaron 200 µL de amortiguador (PBS 20 mM, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM) y 50 µL de buffer de carga SDS 1X con beta-mercaptoetanol (1M Tris, glicerol 50%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.5%, β-mercaptoetanol 0.5%). Posteriormente, las células se lisaron con perlas de vidrio (0.45 mm de diámetro) mediante 5 ciclos de 1 min de agitación en vórtex con intervalos de enfriamiento en hielo de 1 min. Las muestras fueron centrifugadas a 7500 x g por 8 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron hervidas por 10 min.

Las proteínas solubles y totales tratadas fueron separadas empleando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%). En cada línea del gel se cargaron 10 µL de muestra, después de la separación, el gel fue teñido con azul de Coomassie (R-250) y desteñido con una solución desteñidora conteniendo metanol 30% y ácido acético 10%. Finalmente, los geles fueron fotodocumentados en un ChemiDoc XRS (BioRad).

6.2.6 Inmunodetección

Para detectar la presencia de la proteína N66 recombinante, la cual contiene una cola de histidinas (His_{6x}), se emplearon dos técnicas de inmunodetección: el Dot Blot y Western Blot.

Brevemente, el Dot Blot consistió en colocar 2 µL de cada extracto de proteínas obtenido (solubles y totales) sobre una membrana de nitrocelulosa pre-humedecida en agua; como control negativo se utilizó agua. Posteriormente, la membrana se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en solución de bloqueo (Tris Base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%, leche descremada 5%). Pasado el periodo de incubación, la membrana fue lavada 3 veces con TNT (Tris Base 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.05%) por periodos de 5 min. Después, se agregó el anticuerpo primario diluído 1:2000 (Anti His-tag (4E3D10H2/E3) Thermo Fisher); la membrana se incubó a 4°C en agitación suave durante toda la noche. Al siguiente día, se realizaron 3 lavados de 5 min en TNT, y se agregó el anticuerpo secundario diluído 1:2000 (Anti-Rat IgG, HRP Thermo Fisher) incubando a 37 °C por 2 h en agitación suave. Finalmente, la detección se realizó con el sustrato cromogénico diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich). Las muestras que mostraron coloración rojiza fueron consideradas positivas.

Para el Western Blot, las proteínas de los extractos obtenidos (solubles y totales), fueron separadas en un gel SDS-PAGE 10% (Laemmli, 1970) y transferidas a una membrana de nitrocelulosa utilizando un sistema húmedo Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad), con el cual se usó un buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol) a 100V durante 1 h. Posteriormente, la membrana fue incubada en solución de bloqueo, lavada con TNT e incubada con el anticuerpo primario (Anti His-tag, (4E3D10H2/E3) Thermo Fisher) y secundario (Anti-Rat IgG, HRP Thermo Fisher). La detección se realizó con el sustrato cromogénico DAB (Sigma-Aldrich). Las bandas que mostraron coloración rojiza fueron consideradas positivas.

6.3. Purificación y caracterización de la proteína N66 recombinante

6.3.1 Cromatografía de afinidad

6.3.1.1 *Preparación de la muestra*

Se tomaron 100 mg del pellet obtenido en la inducción, la proteína soluble fue extraída a partir de las células. Para romper las células, se emplearon perlas de vidrio y 200 μ L del amortiguador 50 mM Tris-HCl pH 7.4, se hicieron 5 ciclos de 1 min de agitación en vórtex con intervalos de enfriamiento en hielo de 1 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 7500 x g a 4°C durante 15 min. Finalmente, el sobrenadante fue transferido a un tubo de 1.5 mL y almacenado a -20°C hasta su uso posterior.

6.3.1.2 Purificación de la proteína recombinante

La purificación de la N66 expresada en *E. coli* TOP10 se realizó mediante cromatografía de afinidad en lote, ya que la N66 recombinante tiene un secuencia de 6 histidinas en el extremo carboxilo, la cual tiene afinidad por los iones de níquel divalente (Ni^{2+}) dispuestos en una resina compuesta de agarosa y sulfato de níquel. Para ello se preparó una resina acoplada con níquel, brevemente: 2.5 mL de Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) fueron lavados con un amortiguador de lavado (Imidazol 300 mM, NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 7.4). Después, se añadieron 2 mL de solución de NiSO_4 (0.3M en amortiguador de sodio acetato pH 6.0) a la sefarosa, posteriormente, el gel resultante (4.5 mL) fue lavado con agua destilada. La matriz resultante (2 mL), Sefarosa-Ni, fue empacada en una columna de (1.45 x 5.0 cm). La matriz fue equilibrada con el amortiguador de equilibrio (Imidazol 1 mM, NaCl 300 mM, Tris 50 mM pH 7.4). Después, se cargaron 50 μ g de la muestra en la columna; para eficientar la interacción de la resina de sefarosa-Ni con los residuos de histidina de la proteína recombinante, la muestra se incubó con la matriz durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las proteínas no ligadas se eliminaron de la resina con 5 volúmenes de columna (12.5 mL) con el amortiguador de

equilibrio. La elución de la proteína recombinante ligada a la matriz se realizó empleando 5 volúmenes de columna (12.5 mL) de amortiguador de elución (Imidazol 300 mM, NaCl 300 mM, 50 Tris mM pH 7.4). Se colectaron en total 10 fracciones de 500 μ L. El contenido de proteínas total de las fracciones se cuantificó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) empleando BSA como estándar.

Las fracciones eluidas se analizaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% (Laemmli, 1970). Brevemente, 12 μ L de cada fracción eluida fue mezclada con 1.5 μ L de amortiguador de carga SDS conteniendo beta-mercaptoetanol, las muestras fueron hervidas 10 min. Las proteínas fueron separadas en geles de SDS-PAGE 10%, posteriormente fueron teñidas con Comassie (R-250) y desteñidas con una solución desteñidora conteniendo metanol 30%, ácido acético 10%. Los geles fueron fotodocumentados con un ChemiDoc XRS (BioRad).

Las fracciones que contenían la N66 recombinante purificada fueron concentradas utilizando un filtro Amicon Ultra 4 (Merck-Millipore) y desaladas usando una columna PD10 Desalting Column (GE Healthcare) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las fracciones concentradas y desaladas fueron analizadas en geles SDS-PAGE 10% y nativos (Laemmli, 1970). Para los geles nativos la muestra se preparó con amortiguador de carga sin SDS ni beta-mercaptoetanol. Los geles se corrieron a 90 V, se tiñieron con Comassie (R-250) y desteñidos con una solución desteñidora conteniendo metanol 30%, ácido acético 10%. Los geles se fotodocumentaron con un equipo ChemiDoc XRS (BioRad).

6.3.2 Evaluación de la oligomerización de la N66 recombinante

Para evaluar el nivel de oligomerización de la N66 recombinante, se evaluó el efecto del SDS y del DTT sobre la estructura de la proteína en geles SDS-PAGE al 10%. El SDS funciona como detergente aniónico. Para ello, 1 μ g de proteína fue incubado con diferentes concentraciones de SDS: 0%, 0.1%, 0.5%, 1% y 2% de SDS, las muestras no fueron hervidas. Las muestras fueron

analizadas mediante electroforesis en geles SDS-PAGE 10% y teñidas con nitrato de plata (Merril y Washart, 1998) y visualizadas en el equipo ChemiDoc XRS (BioRad).

Para evaluar el efecto del DTT, el cual funciona como agente reductor, la proteína recombinante (1 μ g) fue incubada con diferentes concentraciones de DTT: 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 1 y 10 mM de DTT por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se mezclaron con buffer de carga con SDS y se hirieron 15 min. Se separaron en geles SDS-PAGE 10%, que posteriormente fueron teñidos con nitrato de plata (Merril y Washart, 1998) y documentados con un ChemiDoc XRS (BioRad).

6.3.3 Punto isoelectrico

Para determinar el pI de la proteína recombinante, se usó el sistema Mini-IEF Cell (BioRad). Se prepararon geles de poliacrilamida horizontales al 2%, de acuerdo a las indicaciones del proveedor (BioRad, model 111 Mini-IEF Cell). Brevemente, los geles fueron preparados con glicerol al 25%, agua destilada (filtrada), acrilamida 25% (filtrada), persulfato de amonio 10% (BioRad), riboflavina y TEMED (BioRad). Las muestras se prepararon con el buffer de carga IEF (BioRad). La electroforesis se desarrolló bajo los siguientes parámetros: 10 min a 100 V y 40 min a 200 V en un gradiente de pH de 3 a 10 (Byo-Lyte 3/10 Ampholyte, BioRad). Al finalizar la separación de las proteínas, los geles fueron teñidos con nitrato de plata (Merril y Washart, 1998) y fotodocumentados en el equipo ChemiDoc XRS (BioRad).

6.3.4 Determinación de actividad de anhidrasa carbónica

Para evaluar la actividad de anhidrasa carbónica, se siguieron dos estrategias: método cualitativo y método cuantitativo. Ambas técnicas se basan en la conversión rápida de dióxido de carbono y agua a bicarbonato y protones mediada por la presencia de un catalizador (anhidrasa carbónica).

1) Método cualitativo: se disolvió mediante calentamiento 1 g de agarosa en 50 mL buffer de boratos (ácido bórico 0.05 M, NaCl 0.025 M) y 50 mL de agua

destilada. Posteriormente, la mezcla se vació en una placa Petri, dejando solidificar a temperatura ambiente. Las muestras de la N66 (5 μg de proteína), y la muestra de anhidrasa carbonica (2 μg) fueron colocadas sobre la placa, en gotas, permitiendo que se absorbieran por completo. Posteriormente, se agregaron 5 mL de rojo de fenol al 0.1% (disuelto en amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 8.5) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, el colorante fue removido y la actividad tipo anhidrasa carbónica se reveló al añadir agua mineral fría (agua carbonatada). Las áreas de la placa con actividad tomaron una coloración amarilla, mientras que las áreas sin actividad no presentaron cambio de color (control negativo, agua destilada) (Manchenko, 2002).

2) Método cuantitativo: éste método, consistió en medir la densidad óptica (OD_{557}) de la muestra hasta alcanzar un valor de 0.060. Para ello se añadió a la muestra (2 μg de proteína) un amortiguador de reacción (25 mM HEPES, 100 mM N_2SO_4 pH 7.4 con 100 μM de rojo fenol); la reacción fue iniciada al añadir agua mineral fría (Gai *et al.*, 2014). El cambio de absorbancia se midió con un espectrofotómetro, los datos generados se utilizaron para calcular las unidades de actividad utilizando la siguiente formula:

$$UE = \frac{\text{Tiempo de catálisis-Tiempo de la reacción catalizada}}{\text{Tiempo de la reacción catalizada}} \times \frac{1}{\text{Proteína (mg)}} \quad (2)$$

6.4. Determinación *in vitro* en la generación de polimorfos por N66 recombinante.

Para evaluar la capacidad de cristalización de la N66 recombinante en la formación de poliformos de carbonato de calcio se se usaron tres soluciones saturadas:

- 1) Solución A (40 mM CaCl_2 pH 8.2, 100 mM NaHCO_3),
- 2) Solución B (40 mM MgCl_2 pH 8.2, 100 mM NaHCO_3), y
- 3) Solución C (100 mM CaCO_3).

Las reacciones de cristalización se realizaron en placas de poliestireno de 6 pozos. En cada uno de los pozos se colocó una mezcla de 2 μg de proteína recombinante purificada y 50 μL de solución saturada. La cristalización se promovió al incubar las placas a 4 °C durante 30 días. Posteriormente, los cristales generados fueron analizados usando Microscopía Electrónica de Barrido o SEM (Scanning Electron Microscope), en el Laboratorio de Microscopía Electrónica del CIBNOR.

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN de manto de *P. mazatlanica* fue realizada por el método de sales (Chomczynski y Sacchi, 1987), se obtuvo ARN con alta pureza y rendimiento ($A_{260/280}$: 2.00 y 676.31 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido, respectivamente). Sin embargo, una vez sintetizado el ADNc y usarlo como templado para la amplificación de fragmentos de los genes 28S y/o N66 no se obtuvieron resultados reproducibles. Dado lo anterior, se probó la extracción del ARN con TRIzol[®], con el que se obtuvo material de buena calidad (Fig. 12, Tabla VII), con un bajo rendimiento (173.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido), y con el mismo resultado que con el ADNc sintetizado a partir de ARN extraído mediante el método de sales. Para eliminar la presencia de potenciales inhibidores se agregó un paso de precipitación del ARN con LiCl, el cual se sabe que es eficiente para precipitar moléculas de ARN de al menos 100 nucleótidos (Walker y Lorsch, 2013). El ARN derivado de esta precipitación se empleó para la síntesis de ADNc que permitió, de manera reproducible, amplificar el gen control (28s) y el fragmento interno de la N66 como se describe en los siguientes apartados.

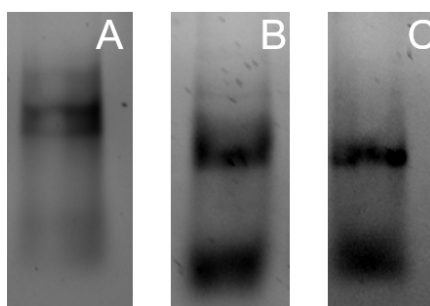


Figura 12. Perfil electroforético de ARN total del manto de madre perla obtenido utilizando distintos métodos de extracción. Líneas (5 μg de ARN total): A) Método de sales; B) TRIzol[®] antes de la precipitación con LiCl; C) TRIzol[®] después de la precipitación con LiCl. (Gel de agarosa-Synergel[®]-DEPC al 1%, teñido con UView).

Tabla VII. Rendimiento y pureza del ARN total obtenido de manto empleando diferentes estrategias de extracción de ARN.

Método de extracción	Rendimiento* (µg/mg tejido)	Abs 260/280nm
Sales	676.31	2.24
TRizol®	173.34	1.91
TRizol® + LiCl	75.68	1.99

*Rendimiento: [volumen total (µL) x concentración (µg/µL)]/ mg de tejido

7.2 Amplificación de fragmentos del gen de N66

7.2.1 Amplificación y clonación de un fragmento interno del gen N66.

La amplificación de un fragmento de N66 con los oligonucleótidos 680F y 1642R permitió obtener un fragmento de 1000 pb (Fig. 13) utilizando dos concentraciones de ADNc (75 y 125 ng); este fragmento es importante debido a que flanquea la región faltante (gap) observado en la N66 en trabajos previos.

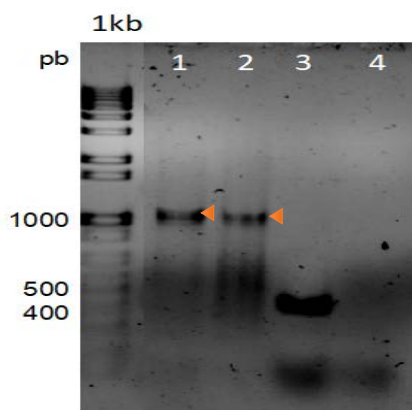


Figura 13. Perfil electroforético de fragmentos de PCR de N66 obtenidos usando como templado ADNc de manto de *P. mazatlanica* y los cebadores 680F-1642R. Líneas: 1kb) Marcador de peso molecular (1 Kb Plus Ladder, Invitrogen); 1) N66 (75 ng); 2) N66 (125 ng); 3) Control (+) 28S de ADNc de manto de *C. gigas*; y 4) Control (-). (Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UView).

La clonación del fragmento de N66 de 1000 pb, obtenido con los cebadores 680F-1647R, permitió obtener una construcción de aproximadamente 5000 pb, ya que

el vector PCR 2.1 tiene un tamaño de 3.9 kb y el tamaño del inserto es de 1 kb. En la Figura 14, se muestra el ADN plasmídico con el fragmento interno de la N66; en la imagen se muestran las tres conformaciones del plásmido: abierto, lineal y superenrollado.

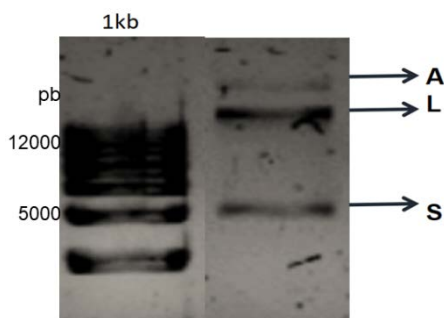


Figura 14. Perfil electroforético de ADN plasmídico recombinante, con inserto de ~1000 pb de N66 de *P. mazatlanica*. Líneas: 1kb) Marcador de peso molecular (1 Kb Plus Ladder Invitrogen). Las letras indican la conformación del plásmido: A, abierto; L, lineal y S, superenrollado. (Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UView).

Como producto de la transformación de *E. coli* TOP10 se obtuvieron 7 colonias positivas. Para corroborar que tuvieran el inserto (1000 pb), se realizó un PCR de colonia (Fig. 15), en el cual se observó que sólo una colonia contenía dicho fragmento.

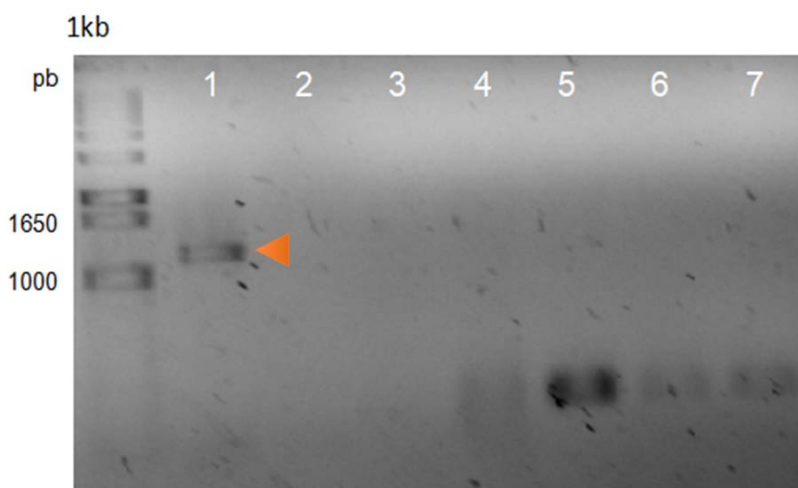


Figura 15. Perfil electroforético de productos de PCR de colonia utilizando los cebadores del vector pCR2.1, M13F y M13R. Líneas: kb) Marcador de peso molecular (1 Kb Plus Ladder Invitrogen). Carriles: 1 Inserto de N66, 2-7) Vector sin inserto. (Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UView).

7.2.2 Amplificación de los extremos 5' y 3' de N66 de *P. mazatlanica*.

Se amplificó el extremo 5' codificante del gen N66, con los cebadores 1F-452R, obteniendo un fragmento de 500 pb. Por otra parte, se amplificó el extremo 3' codificante de N66 con los oligonucleótidos 1229F-1766R, obteniendo productos de amplificación de 510 pb (Fig. 16).

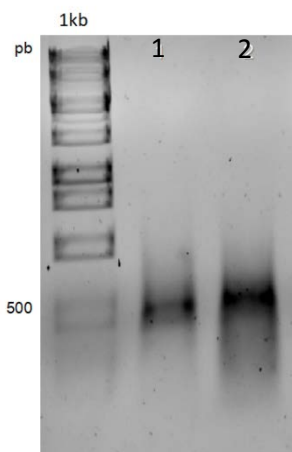


Figura 16. Perfil electroforético de productos de PCR de los extremos codificantes del gen N66 usando los cebadores 1F-452R y 1229F-1766R. Líneas: kb) Marcador de peso molecular (1Kb Plus Ladder Invitrogen); 1) Extremo 5'; 2) Extremo 3'. (Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UVView).

7.3 Análisis de la secuencia de N66 de *P. mazatlanica*

Las secuencias obtenidas se editaron y ensamblaron usando el programa DNA Sequence Assembler, dando como resultado un contig de 1766 pb (Fig. 17), el cual tiene un marco de lectura abierto que inicia en el nucleótido 2 y termina en el nucleótido 1732, codificando a una proteína de 576 aminoácidos. El peso molecular teórico de la proteína es de 63.68 kDa, mientras que el pI calculado es de 7.38. La proteína N66 cuenta con un péptido señal (residuos 1-22), dos dominios alfa anhidrasa carbónica (residuos 70-238 y 439-553) y un dominio NG (residuos 245-438). Dentro de las modificaciones postraduccionales evaluadas, se encontró un sitio potencial de N-glicosilación (residuo 399), 15 sitios potenciales a O-glicosilaciones (residuos: 116, 122, 162, 167, 170, 176, 204, 287,

304, 401, 439, 456, 462, 474 y 497), y cinco sitios potenciales a sulfataciones (residuos 31, 38, 223, 230 y 557). La proteína N66, potencialmente, presenta tres puentes disulfuro (residuos 45-510, 64-238, 80-447). En términos de composición aminoacídica, la proteína está compuesta en su mayoría por aminoácidos polares (40.1%), principalmente: Asn, His y Ser; seguido de aminoácidos hidrofóbicos (37.3%) como Gly, Leu y Val. Finalmente, el 22.6% son aminoácidos con carga positiva y negativa. Con relación a su localización celular, se determinó que es una proteína extracelular (66.7% probabilidad).

Por otra parte, la secuencia de aminoácidos deducida de N66 permitió predecir las estructuras secundaria y terciaria de la proteína de *P. mazatlanica*, permitiendo su comparación con su homóloga N66 de *P. maxima* (GenBank ID: BAA90540.1) (Figs. 18 y 19).

tatg tggagaatgacgacgcttcttcacttgactgctctgcttgttctgattccattatgt
 M W R M T T L L L L T A L L V L I P L C
 cttgtgctccatgcacagggcatgaccattatggacatggatcaaacctaccgtgat
 H C A S M H R H D H Y M D M D Q T Y R D
 cgatggggaaactgtcattattcagggggaagtagctgtgacgcccgggttagctacaat
 R W G N C H Y S G G S S C D A G F S Y N
 agggaaacaaatgaggaacaatgccacgggcccgtatgactggcacactatactagtgc
 R E Q N E E Q C H G P Y D W H T I S S C
 ttaagggcatgtggaagtaaagagagacaatcaccatcaacatttggtcacatagagcc
 F K A C G S K E R Q S P I N I W S H R A
 cttttccgaaaactgccagactgaaattcaagccacatatgaaatcattggatcacgaaa
 L F R K L P R L K F K P H M K S L D T K
 gtgtcaaatcaccacaaatcatgcccctgaattcgattctgaggacgaaaaaacctcatgtt
 V S N H Q N H A P E F D S E D E K L H V
 aaactgaagaaactgttgatgacattataaattccgcaatctccatattcattggc
 K L K K L V D G H Y K F R N L H I H I G
 aaaagttagcgaagggtctcgaacacagccttgacagacattttacacctatggaggct
 K S R R K G S E H S V D R H F T P M E A
 cttttagtgttccatcatgatgagaaaaggaatcaaacctcctaggattccgttagga
 H L V F H H D E K K E I K P P R I P L G
 agaaatttcagtggtatataatgaaatttggctcggtgggggttttctagaggatgggat
 R N F S G I N E F V V V G V F L E D G
 gaaggatacgggtgatgaaccggacgactatgaatgtaagcgcatattaaagggtcattac
 E G Y G D E P D D Y E C K R I L K G H Y
 gatcattcgcacaacatggagacaacgggtacaactgtgataacgggcaacaatgaaac
 D H C D N G D N G D N G Y N C D N G N N E N
 aacggaaacaatggtaatggtaacaacggctataacggtaacaacgggtataacggtaat
 N G N N G N G N N G Y N G N N G Y N G N
 aacggtgacaatggcaacagtggaacaatggtaatggtaacaacgggtataacgggtgac
 N G D N G N S G N N G N G N N G Y N G D
 aatggcaacagcggaaacaatggtaatggtaacaacggtaataacgggtggc
 N G N S G N N G N G N N G N N G N N G G
 aacggaaacaacagaaacaatggtaatggtaacaacgggtataacggtaataacgggtat
 N G N N R N N G N G N N G Y N G N N G D
 aatggcaacaacggaaacaatggtaatggtaacaacggaaataatggtaatggtaacaac
 N G N N G N N G N N G N N G N N G N N
 ggaataaacgggtggcaatggcaacaacggaaacaatggtaatggtaacaacggaaataat
 G N N G G N G N N G N N G N N G N N
 ggtaatggtaacaacgggaataacgggtggcaatggcaacaatggtaatggtaacaatgga
 G N N N G N N G N N G N N G N N G N N
 agtaatggtaacggtgactacggtagtaatggtaacaatggtggaacgggaacaatggt
 S N G N G D Y G S N G N N G G N G N N G
 aataacgggtgataacggtaatggcgaacaatggttataacgggtgataatggtaacagtgac
 N N G N G D N G Y N G D N G S D
 gggcgactcagacggtgggacttgaaaatgtccgcccattcattccgagcgatcac
 G R L R R W D L E N V R R I H T E R Y H
 atcaacgggaagatgtattgtcaaaaaagcaaacgcctcaccaggattctcgaatgcgca
 I S R C I V K K A K R L S R I L E C A
 tatagacacaaaaagtcagagaattcaaaaggaatgggagaacacaaaaagcttgatgtt
 Y R H K K V R E F K R N G E H K S L D V
 gaaattacaccggaaatggttctacggccaataaaatacagacaatactatacctatgaa
 E I T P E M V L P P I K Y R Q Y Y T Y E
 ggatctttgacaacccctccttgcaagagagcgtccggtgggttggtagaaaaatgccac
 G S L T T P P C T E S V R W V V E K C H
 gtgcaagtatccagaagggtgcttgatgcattgcggaagggtcgaaggatgatgatggt
 V Q V S R R V L D A L R K V E G Y D D G
 accacggttgagcaagtatggaacaaagacgtcccacaagagaaaca taaacctgtac
 T T F E Q V W K Q D V P H R E T - N L Y
 ctgtgtacaaaaactttatagaga
 L C T K T L Y E

Figura 17. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de N66 de *P. mazatlanica*. En color rojo se denotan los codones de inicio y término. Las letras subrayadas representan el péptido señal. En color rosa se denotan los dominios de alfa anhidrasa carbónica. Los cuadros verdes denotan los sitios posibles de O-glicosilaciones, los azules los sitios putativos de N-glicosilación, y los morados los sitios potenciales de sulfatación. Los rombos en color naranja identifican los sitios involucrados en la catálisis de la función de alfa anhidrasa carbónica y los sitios de unión al zinc (H).

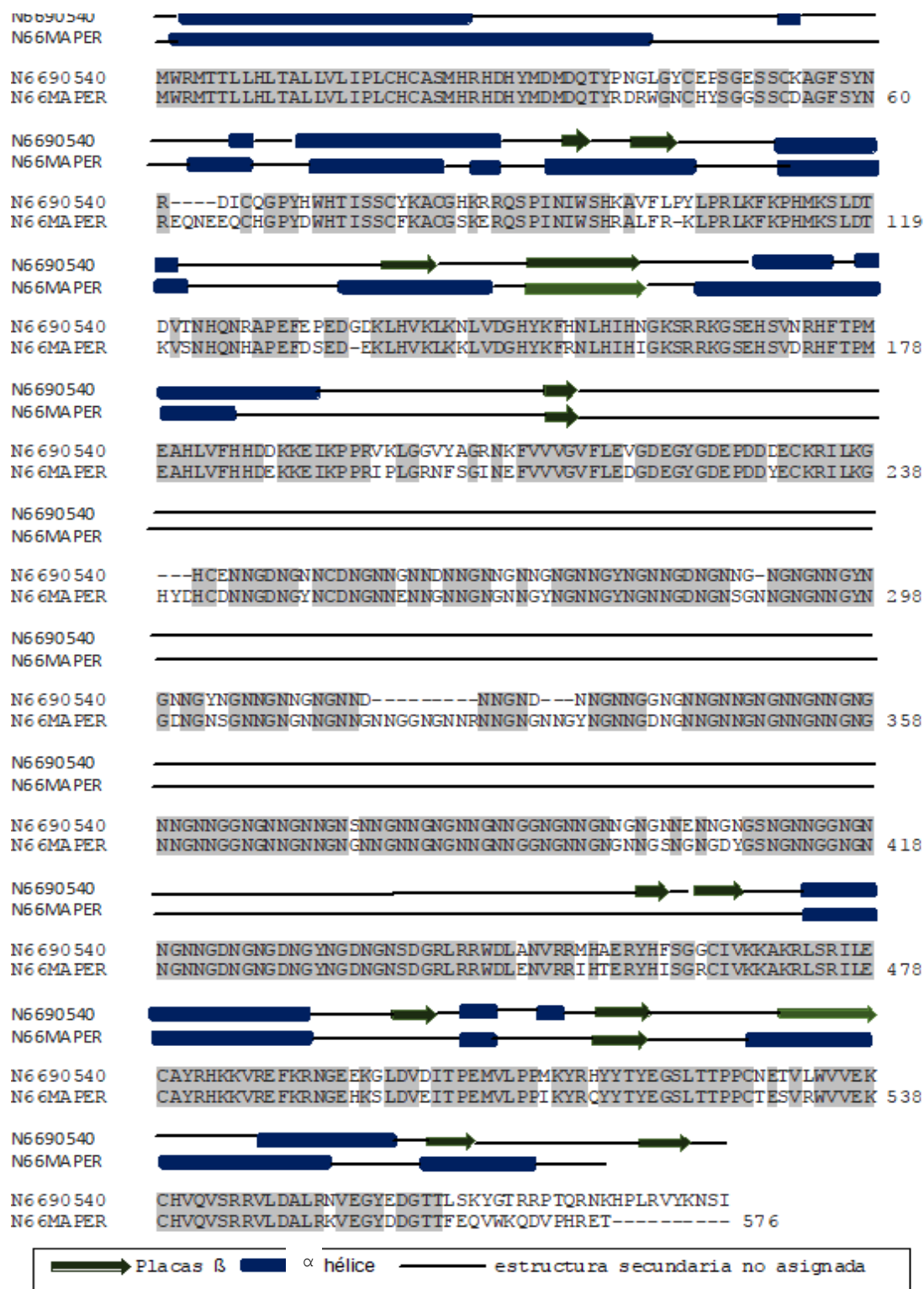


Figura 18. Estructura primaria y secundaria de N66. N66 de *P. máxima* (N6690540); N66MAPER, N66 de *P. mazatlanica*. Las flechas verdes representan las placas beta, los cilindros azules las hélice alfa. Las regiones sombreadas en gris denotan los aminoácidos conservados.

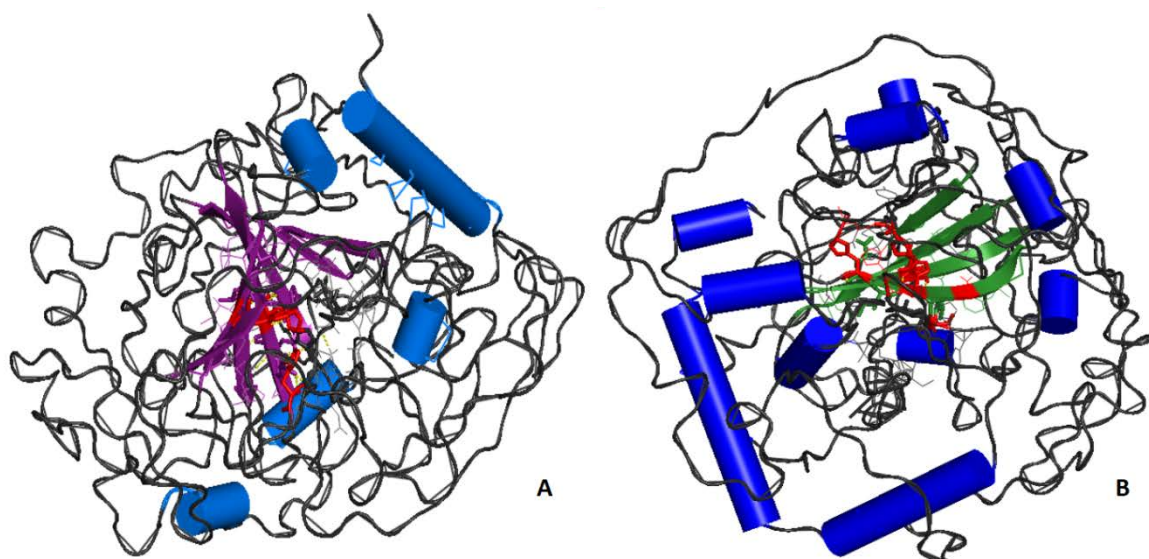


Figura 19. Estructura terciaria de N66. A) *P. máxima* y B) *P. mazatlanica*. Los modelos fueron creados con PDB: 3ML5, 1FQL, 3MDZ, 1V9J y 5II8 con 47 y 46% de homología respectivamente. Los modelos fueron creados usando los programas Phyre 2 y editados con PyMOL; en ambas imágenes el color rojo indica el sitio activo.

Por otro lado, la secuencia de nucleótidos de N66 se comparó mediante Blastn con las secuencias de la base de datos NCBI. Se encontró homología con 8 secuencias (Tabla VIII), que corresponden a 5 secuencias de nacreína (98% a 86% de identidad), N36 (88% de identidad), N45 (86% de identidad) y con la N66 de *P. maxima* (85% de identidad). Se observó que la región de cobertura para el fragmento de N66 de *P. mazatlanica* comparada con su homóloga en *P. maxima* (AB032613) va del nucleótido 2 al 1210.

Tabla VIII. Análisis de homología de la secuencia de nucleótidos codificante N66 de *P. mazatlanica*.

Gen	Especie	No. acceso	Identidad (%)	Rango de cobertura (nt)	Cobertura (%)
Nacreína	<i>P. margaritifera</i>	HQ654772	89	1-1329	99
Nacreína	<i>P. margaritifera</i>	HQ654771	91	1-1352	74
Nacreína	<i>P. margaritifera</i>	HQ896199	93	1-1716	99
Nacreína	<i>P. margaritifera</i>	HQ654770	86	1-1263	99
Nacreína	<i>P. margaritifera</i>	HQ654773	98	727-1368	92
N36	<i>P. maxima</i>	FJ913471	88	203-989	67
N45	<i>P. maxima</i>	FJ913472	86	1-752	72
N66	<i>P. maxima</i>	AB032613	85	2-1210	99

Con base en estos resultados se compararon las secuencias de aminoácidos de N66 y homólogas (Fig. 20), descartando aquellas secuencias parciales, por lo que eligieron de GenBank: nacreína B4 de *P. margaritifera* (AEC03972); nacreína B3 de *P. margaritifera* (AEC03971); nacreína B2 de *P. margaritifera* (ADY69618); nacreína A1 de *P. margaritifera* (AEC03970); y nacreína C5 de *P. margaritifera* (AEC03973), N45 de *P. maxima* (ACT55367) y N66 de *P. maxima* (BAA90540). En este análisis de alineamiento, la numeración se realizó tomando como referencia la secuencia de N66 de *P. mazatlanica*. El alineamiento muestra el péptido señal, la variabilidad de longitud de aminoácidos entre los dominios de anhidrasas carbónicas y el dominio NG característico de N66 y de las nacreínas.

	Péptido señal
N4555367	MWRMTTLLHLTALLVLIPLCHCASMHRHDHYMDMDQTYPNGLGVCPEPSGESSCKAGFSYN
NAC03970	MWRMTTLLHLTSLLLVLIPLCHCASMHRHDHYMDMDQTYPDRWGNCEERSKESKCDVGFSYN
NAC69618	MWRMTTLLHLTSLLLVLIPLCHCASMHRHDHYMDMDKTYRNRWGNCHYSGGSSCDAGFSYN
NAC03971	MWRMTTLLHLTSLLLVLIPLCHCASMHRHDHYMDMDKTYRNRWGNCH-SGGNSCDAGFSYN
NAC03972	MWRMTTLLHLTSLLLVLIPLCHCASMHRHDHYMDMDKTYRNRWGNCHYSGGSSCDAGFSYN
NAC03973	MWRMTTLLHLTSLLLVLIPLCHCASMHRHDHYMDMDQTYPNQWGYCDPKNSSCKAGFSYQ
N6690540	MWRMTTLLHLTALLVLIPLCHCASMHRHDHYMDMDQTYPNGLGVCPEPSGESSCKAGFSYN
N66MAPER	MWRMTTLLHLTALLVLIPLCHCASMHRHDHYMDMDQTYRDRWGNCHYSGGSSCDAGFSYN 60

	Dominio alfa anhidrasa carbónica
N4555367	RL----ICQGPYHWHTISSCFKACGSKKRQSPINIWSHKAFLPYLPRLKFKPHMKSLDT
NAC03970	RK----ICQGPYYWHTISSCFKACGSKKRQSPINIWSHRAVFLPYLPRLKFKPHMKSLDT
NAC69618	REQSEEQCHGPDWHTISSCFKACGSKKERQSPINIWSHRALFR-ILPRLKFKPHMKSLDT
NAC03971	REQSEEQCHGPDWHTISSCFKACGSKKRQSPINIWSHRALFR-RLPRLKFKPHMKSLDT
NAC03972	REQSEEQCHGPDWHTISSCFKACGSKKERQSPINIWSHRALFRHKLRLKFKPHMKSLDT
NAC03973	R----DICQGPYYWHTISSCFKACAKKRQSPINIWSHRAVFPVLDLRLKFKPHMKSLDT
N6690540	RL----ICQGPYHWHTISSCFKACGSKKRQSPINIWSHKAFLPYLPRLKFKPHMKSLDT
N66MAPER	REQNEEQCHGPDWHTISSCFKACGSKKERQSPINIWSHRALFR-KLPRLKFKPHMKSLDT 119

	Dominio alfa anhidrasa carbónica
N4555367	LVINHQNHAFEFEPEDGDKLHVKLKKNLVDGHYKFRNLHIHNGKSRRKGSEHSVNRHFPTM
NAC03970	EVINHQNHAFEFEPEDGSKLHVKLQNLVDGHYKFRNLHIHNGKSRRKGSEHSVDRHFPTM
NAC69618	KVSNHQNHAFEFDSSEDEKLVHVKLKNLVDGHYKFRNLHIHIGKSRRKGSEHSVDRHFPTM
NAC03971	KVSNHQNHAFEFDSSEDEKLVHVKLKNLVDGHYKFRNLHIHIGKSRRKGSEHSVDRHFPTM
NAC03972	KVSNHQNHAFEFDSSEDEKLVHVKLKNLVDGHYKFRNLHIHIGKSRRKGSEHSVDRHFPTM
NAC03973	EVSNHQNHAFEFDSSEDEKPRVKLKNLVDGHYKFRNLHIHIGKSRRKGSEHSVDRHFPTM
N6690540	LVINHQNHAFEFEPEDGDKLHVKLKKNLVDGHYKFRNLHIHNGKSRRKGSEHSVNRHFPTM
N66MAPER	KVSNHQNHAFEFDSSEDEKLVHVKLKNLVDGHYKFRNLHIHIGKSRRKGSEHSVDRHFPTM 178

	Dominio alfa anhidrasa carbónica
N4555367	EAHLVFFHDDKKEIKPPRVKLGQVYAGNKFVVVGVFLEVGDGYGDEPDDECKRILKG
NAC03970	EAHLVFFHDDKKEIKPPRVKFGVVRGNQFVVVGVFLEVGDGYGDEPDDECKRILKG
NAC69618	EAHLMFRPDEKKEIKPSRIWLGNKNGSNEFVVVGVFLEVGDGYGDEPDDECKRILKG
NAC03971	EAHLVFRHDEKKEIRPFRILLGRNFSGINEFVVVGVFLEVGDGYGDEPDDECKRILKG
NAC03972	EAHLVFRHDEKKEIKPSRIWLGRNFSGINEFVVVGVFLEVGDGYGDEPDDECKRILKG
NAC03973	EAHLVFRHDEKKEIEPFRILGRNFSGNEFVVVGVFLEVGDGYGDEPDDECKRILKG
N6690540	EAHLVFFHDDKKEIKPPRVKLGQVYAGNKFVVVGVFLEVGDGYGDEPDDECKRILKG
N66MAPER	EAHLVFFHDDKKEIKPFRIPLRNFSGINEFVVVGVFLEDGDGYGDEPDDECKRILKG 238

Dominio NG

N4555367 ---HCEINNGDNGNCCDNG-----
 NAC03970 HYDHCDDNNGDNGYINCDNGNNGNNGNNGNNDYNGNNGDNGNNGYNGNNGYNGNNGN
 NAC69618 HYDHCDDNNGDNGYINCDNGNNGNNGNNGNNDYNGNNG-----
 NAC03971 HYDHCDDNNGDNGYINCDNGNNGNNGNNGN-----GNNGYNGNNGYNGNNGDN
 NAC03972 HYDHCDDNNGDNGYINCDNGNNEINNGNNGNNGNNGYNGNNGDNGNNGYNGNNGYNGNNGDN
 NAC03973 HYDYCDNNGDNGN-----
 N6690540 ---HCEINNGDNGNCCDNGNNGNNDNN-----GNNGNNGNNGYNGNNGDNGNNG--
 N66MAPER HYDHCDDNNGDNGYINCDNGNNEINNGNNGN-----GNNGYNGNNGYNGNNGDN 284

Dominio NG

N4555367 -----
 NAC03970 GNG-----YNGDNG--NGNNGNNGGNGNNGNNG--NGNNGNNGNNGNNG--NNGGN
 NAC69618 -----GDNGNSGNNNGNNGNNGNNGNNGN
 NAC03971 GNSGNNGN-----GNNGYNGNNGYNGNNGDNGNSGNNNGNNGYNGNNGGN
 NAC03972 GNSGNNGNNGYNGNNGDNGNNGYNGNNGYNGNNGDNGNSRNNNGNNGYNGNNGDN
 NAC03973 -----
 N6690540 -----NGNNGNNGYNGNNGYNGNNGNNGNNG-----NND-----
 N66MAPER GNSGNNGNNGYNGDNGN-----SGNNNGNNGNNGNNGNNGN 321

Dominio NG

N4555367 -----
 NAC03970 SNN-----GNSGYGNGNNGNNGNNGGNDNNGNNGNSNNGNNGNNGNNGGNGNNGNS
 NAC69618 GNNRNNNGNNGYNGNNGDNGNNG--NNGNNGNNGNNG-----NGNNGNNGDNGNNGN
 NAC03971 GNNRNNNGNNGYNGNNGDNGNNG--NNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGGNDNNGN
 NAC03972 GNNRNNNGNNGYNGNNGDDGNGNNG--NNGNNGNNGNNGYGNNGN-----GNN
 NAC03973 -----
 N6690540 -----NNGNDNNGNNGGNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGGNGNNGN
 N66MAPER GNNRNNNGNNGYNGNNGDNGN-----GNNNGNNGNNGNNGNNGNNGGNGNNGN 372

Dominio NG

N4555367 -----
 NAC03970 GY-----GNGNNGNNGNNGGNGNNGNNGNNGNNGNNGDNGSNGNNGGNGNNGND
 NAC69618 GNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGGNGNNGNNGNNGDYGSDNNGGNGNNGNNGD
 NAC03971 GNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGGNGNNGNNGNNGDYGSDNNGGNGNNGNNGD
 NAC03972 GNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGNNGGNGNNGNNGNNGDYGSDNNGGNGNNGNNGD
 NAC03973 -----GNGNNGNNGGNGNNGNNGNNGSNGNGDHSNGNNGGNGNNGNNGD
 N6690540 GNSNNGNNG-----NGNNGNNGGNGNNGNNGNNGNNGNNGSNGNNGGNGNNGNNGD
 N66MAPER -----GNGNNGNNGNNGNNGGNGNNGNNGNNGSNGNGDYGSDNNGGNGNNGNNGD 424

	Dominio NG	Dominio CA	
N4555367	--NGDNGYNGDNGNSDGRLLRRLANVRRMHAERYHFSGCTVKKAKRLSRILECAYRHK		
NAC03970	NGNGDNGYNGDNGNSDGRLLRRLANVRRMHAERYHFSGRMVKKAKRLSRILECAYRHK		
NAC69618	NGNGDNGYNGDNGNSDGRLLRRLANVRRMHTERYHFSGRCTVKKAKRLSRILECAYRHK		
NAC03971	NGNGDNGYNGDNGNSDWRLLRRLANVRRMHTERYHFSRRCTVKKAKRLSRILECAYRHK		
NAC03972	NGNGDNGYNGDNGNSDGRPRRDLNVRMHTERYHFSGRCTVKKAKRLSRILECAYRHK		
NAC03973	NGNGDNGYNGDNGNSDGRLLRRLANVRRMHTERYHFSGRCTVKKARRLSRILECAYRHK		
N6690540	NGNGDNGYNGDNGNSDGRLLRRLANVRRMHAERYHFSGCTVKKAKRLSRILECAYRHK		
N66MAPER	NGNGDNGYNGDNGNSDGRLLRRLANVRRMHTERYHFSGRCTVKKAKRLSRILECAYRHK		484

Dominio alfa anhidrasa carbónica

N4555367 KVREFRRNGEEKGLDVEITPEMVLPPMKYRQYYTYEGSLTTPPCNETVWVVENATCKYP
 NAC03970 KVREFKRNAGEHKSLDVEITPEMVLPPIKYRQYYTYEGSLTTPPCNETVWVVEKCHVQVS
 NAC69618 KVREFKRNAGEHKSLDVEITPEMVLPPINRYRQYYTYEGSLTTPPCNETVWVVEKCHVQVS
 NAC03971 KVREFKRNAGEHKSLDVEITPEMVLPPIKYRQYYTYEGSLTTPPCDETIVWVVEKCHVQVS
 NAC03972 KVREFKRNAGEHKSLDVEITPEMVLPPIKYRQYYTYEGSLTTPPCNETVWVVEKCHVQVS
 NAC03973 KVREFKRNAGEHKSLDVEITPEMVLPPIKYRQYYTYEGSLTTPPCTESVWVVEKCHVQVS
 N6690540 KVREFKRNAGEHKSLDVEITPEMVLPPMKYRQYYTYEGSLTTPPCNETVWVVEKCHVQVS
 N66MAPER KVREFKRNAGEHKSLDVEITPEMVLPPIKYRQYYTYEGSLTTPPCTESVWVVEKCHVQVS 544

	Dominio	alfa	anhidrasa carbónica
N455367	EGCLMRCGTSKDM	---	KMVPR-----
NAC03970	RRVLDALRN	VEGY	EDGATLSKYGTRRPTQRNKHPLPVYKNFI
NAC69618	RRVLDALRK	VEGYDDGTTLSK	FGTRRPTQRNIEPVPVYKNFI
NAC03971	RRVLDALRK	VEGYDDGTTLSK	FGTRRPTQRNIKPVTVYKNFI
NAC03972	RRVLDALRK	VEGYDDGTTLSK	FGTRRPTQRNIKPVVPYKNFI
NAC03973	RRVLDALRK	VEGYDDGTTLSK	FGTRRPTQRNIKPVTVYKNFI
N6690540	RRVLDALRN	VEGY	EDGTTLSKYGTRRPTQRNKHPLRVYKNSI
N66MAPER	RRVLDALRK	VEGYDDGTT	FEQVWKQDVPHRET----- 576

Figura 20. Comparación de N66 de *P. mazatlanica* con proteínas homólogas. NAEC03972, nacreína B4 de *P. margaritifera*; NAEC03971 nacreína B3 de *P. margaritifera*; NADY69618 nacreína B2 de *P. margaritifera*; NAEC03970 nacreína A1 de *P. margaritifera*; NAEC03973 nacreína C5 de *P. margaritifera*; NACT55367 N45 de *P. maxima*; y N5BAA90540 N66 *P. maxima*. En color gris se muestran los aminoácidos conservados. En color azul se observan los sitios conservados en todas las secuencias respecto a la N66 de *P. mazatlanica* (N66MAPER). En color verde se resaltan los sitios conservados al comparar las secuencias con N66 de *P. maxima* (N6690540). En color rosa se muestran los aminoácidos que varían en el dominio NG de las secuencias.

Por otro lado, Kono *et al.* (2000), reportaron que la N66 es homóloga con dos anhidrasas carbónicas humanas (Tipo II y VII), por lo que se compararon las estructuras de N66 con estas secuencias. Además, en la comparación se incluyó una anhidrasa carbónica Tipo II de *M. galloprovincialis* (ID: ALF62133, Pavicic *et al.*, 2016). Cabe aclarar que este alineamiento (Fig. 21) se enumeró con base a la CA II de *H. sapiens*, ya que su secuencia ha sido la más estudiada. Por ejemplo, los residuos Thr 199, Glu 106, His 64 conforman el sitio activo y la lanzadera de electrones necesaria en el mecanismo de catálisis de las alfa anhidrasas carbónicas (Tu *et al.*, 1989). Los residuos His 94, His 96, His 119 son los sitios de unión al zinc. Los residuos Phe 93, Phe 95 y Trp 97 rodean dos de las tres histidinas asociadas a los sitios de unión al zinc, se ha demostrado que alguna modificación en los residuos 93, 95 y 97 afecta la actividad catalítica de la enzima (Hunt y Fierke, 1997). Para hacer más evidente la comparación entre todos los sitios mencionados se elaboró una Tabla (Tabla VII) que muestra las modificaciones en estas regiones. En cuanto al porcentaje de identidad entre los dominios tipo CA y las anhidrasas carbónicas, el resultado indica que la N66 de *P. maxima* tiene 28.35% al compararla con la anhidrasa carbónica Tipo II de *H. sapiens*, 24.70% con la anhidrasa carbónica Tipo II de *M. galloprovincialis* y 26.73% con la anhidrasa carbónica Tipo VII de *H. sapiens*. Por otro lado, la N66

de *P. mazatlanica* tiene 29.80% con la anhidrasa Tipo II de *H. sapiens*, 25.21% con la anhidrasa carbónica Tipo II de *M. galloprovincialis* y 30.57% con la anhidrasa Tipo VII *H. sapiens*. Cabe destacar que la anhidrasa carbónica Tipo II de *M. galloprovincialis* tiene 47.6 y 47.74% de identidad con las anhidrasas carbónicas Tipo II y VII de *H. sapiens*. Por otro lado, entre las anhidrasas carbónicas Tipo II y VII de *H. sapiens* hay 56.80% de identidad.

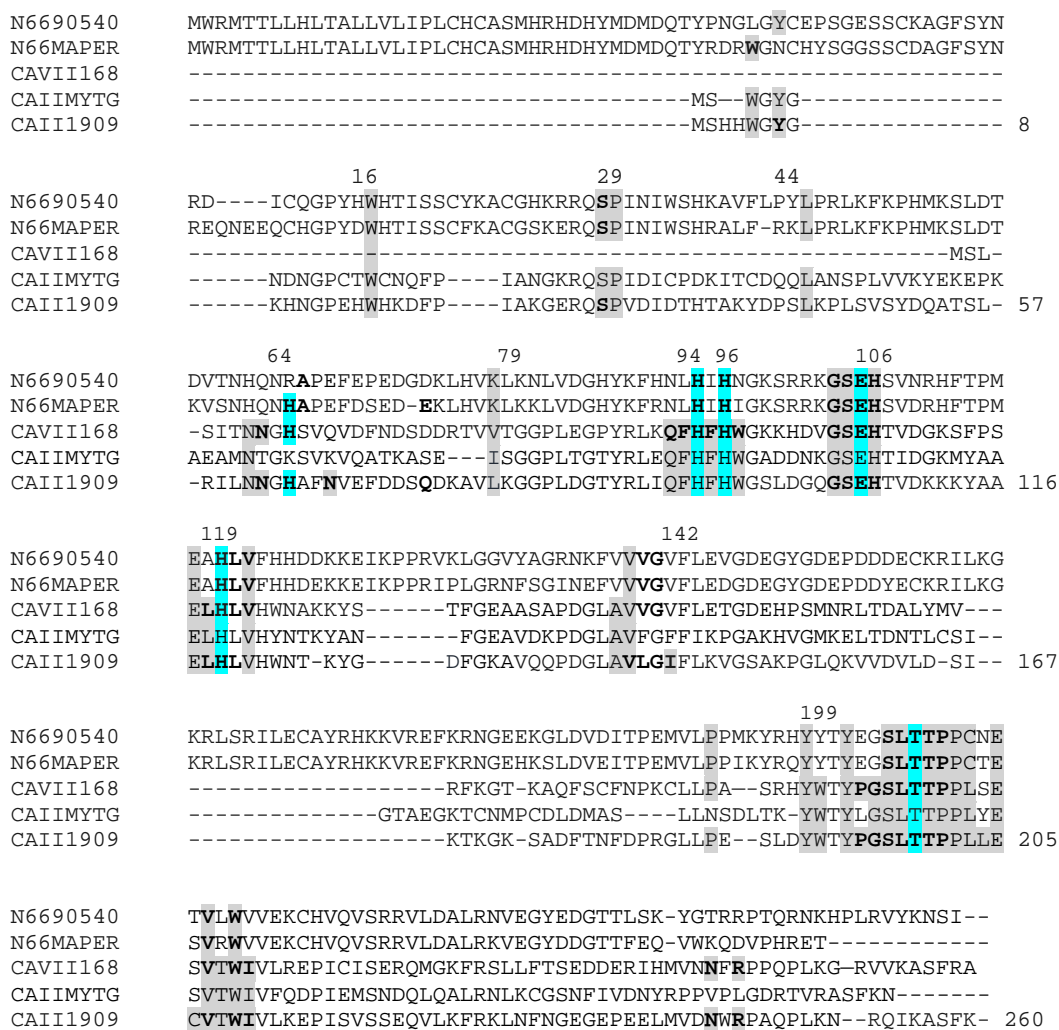


Figura 21. Dominios tipo alfa anhidrasa carbónica de N66 de *P. mazatlanica* y anhidrasas carbónicas Tipo II y VII. El color gris muestra los sitios conservados. CAII1909, anhidrasa carbónica II de *H. sapiens*; CAIIIMYTG, anhidrasa carbónica II de *M. galloprovincialis*, CAVII168, anhidrasa carbónica VII de *H. sapiens*; N6690540, dominios AC de N66 de *P. maxima*; N66MAPER dominios AC de *P. mazatlanica*. El color azul muestra los sitios más importantes relacionados al mecanismo de catálisis de las AC.

Tabla IX. Comparación de los residuos de la anhidrasa carbónica (CA) Tipo II con sus enzimas homólogas.

Residuo	5	7	16	29	30	44	61	62	64	67	79	92	93	94	95	96	97	104
CA II	W	Y	W	S	P	L	N	N	H	N	L	Q	F	H	F	H	W	G
CAIIMG	W	Y	W	S	P	L	N	T	K	K	I	Q	F	H	F	H	W	G
CAVII	-	-	-	-	-	-	N	N	H	Q	V	Q	F	H	F	H	W	G
N66 (A)	L	Y	W	S	P	L	H	Q	R	E	K	N	L	H	I	H	N	G
N66MP (B)	W	N	W	S	P	L	H	Q	H	E	K	N	L	H	I	H	I	G

Residuo	105	106	107	117	118	119	121	142	143	146	186	191	192	194	195	196
CA II	S	E	H	E	L	H	V	A	V	I	P	Y	W	Y	P	G
CAIIMG	S	E	H	E	L	H	V	A	V	F	N	Y	W	Y	L	G
CAVII	S	E	H	E	L	H	V	A	V	V	P	Y	W	Y	P	G
N66 (A)	S	E	H	E	A	H	V	V	V	V	P	Y	Y	Y	E	G
N66MP (B)	S	E	H	E	A	H	V	V	V	V	P	Y	Y	Y	E	G

Residuo	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	244	246
CA II	S	L	T	T	P	P	L	L	E	C	V	T	W	I	N	R
CAIIMG	S	L	T	T	P	P	L	Y	E	S	V	T	W	I	V	L
CAVII	S	L	T	T	P	P	L	S	E	S	V	T	W	I	N	R
N66 (A)	S	L	T	T	P	P	C	N	E	T	V	L	W	V	T	R
N66MP (B)	S	L	T	T	P	P	C	T	E	S	V	R	W	V	K	D

Nota: N66 (A) representa el dominio AC de la N66 descrita por Kono y colaboradores (2000). N66MP dominio AC de la N66 de *P. mazatlanica*;

7.4 Expresión de N66 en el sistema de *E. coli* TOP10

7.4.1 Amplificación de la secuencia de N66 con sitios de restricción

Se amplificó la secuencia de N66, obteniéndose un amplicon de 1662 pb (Fig. 22A), sin embargo, en el resultado de esta amplificación se observaron bandas inespecíficas, por lo que se procedió a cortar y purificar la banda de interés (Fig. 22B) para su posterior clonación en vector pTrcHis A.

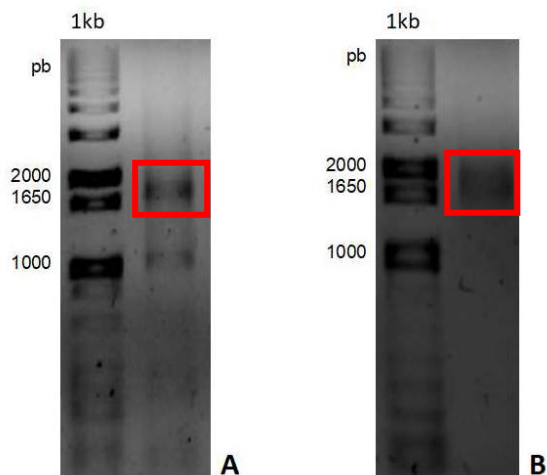


Figura 22. Perfil electroforético de productos de PCR de N66 de *P. mazatlanica* con sitios de restricción *Hind*III. A) productos de PCR del gen N66 de *P. mazatlanica*. B) Producto de PCR purificado. 1kb) Marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder, Invitrogen). (Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UView).

7.4.3 Obtención del vector de expresión pTrcHis A-N66

El vector de expresión pTrcHis A se linearizó con *Hind*III para clonar el amplicón N66-*Hind*III de *P. mazatlanica*; el tamaño del plásmido lineal fue de 4.4 kb (Fig. 23).

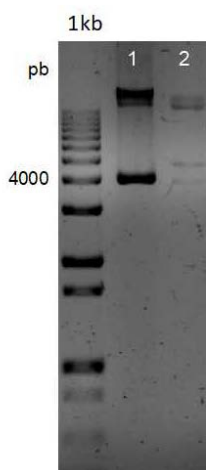


Figura 23. Perfil electroforético derivado de la digestión de plásmido pTrcHis A. 1kb) Marcador de peso molecular (1 Kb plus Ladder, Invitrogen) 1) Plásmido sin digerir; 2) Plásmido digerido con 7U de *Hind*III. (Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UView)

7.4.4 Transformación de N66-*Hind*III en células de *E. coli* TOP10

El producto N66-*Hind*III fue ligado en el vector de expresión pTrcHis A. Para ello se digirió tanto el inserto como el vector con 7U de la enzima *Hind*III. En total, se obtuvieron 25 colonias transformadas, de las cuales se evaluaron 19 para corroborar que la presencia del inserto mediante la amplificación de cada una de las colonias con los cebadores N66 680F-1642R. El resultado (Fig. 24) indicó que todas las colonias evaluadas contenían el inserto esperado. Posteriormente, todas las clonas fueron cultivadas en medio LB líquido, para proceder al aislamiento y purificación del plásmido. Sólo se obtuvo ADNp de 12 clonas, ya que 4 perdieron el inserto y 3 colonias parecían tenerlo aunque su amplificación era menos intensa que el resto (Fig. 25).

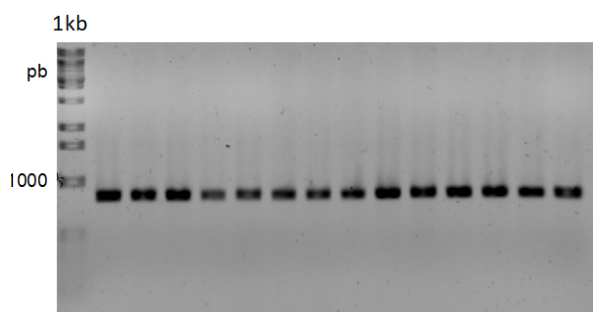


Figura 24. Perfil electroforético de PCR de colonia de N66-*Hind*III-pTrcHis A (cultivadas en placas de medio LB) utilizando los cebadores N66 680F y 1642R. 1kb) Marcador de peso molecular (1 kb Plus Ladder Invitrogen) .Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UView.

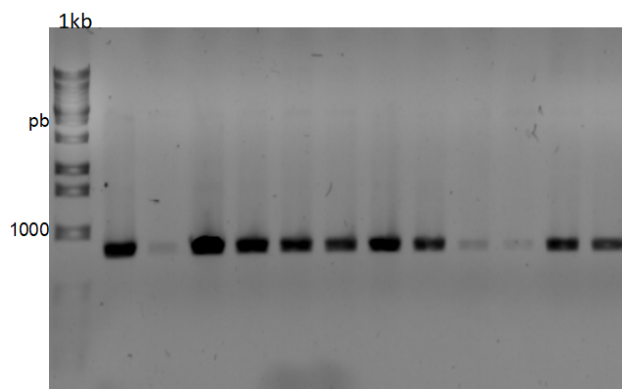


Figura 25. Perfil electroforético de minipreps de bacterias transformadas con el constructo N66-*Hind*III-pTrcHis A. Se usaron los cebadores 680F y 1642R. 1kb) Marcador de peso molecular (1 kb Plus Ladder Invitrogen) .Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UView.

7.4.5 Evaluación de la orientación del gen N66 en el vector de expresión pTrc His A

Se realizó un análisis de restricción a los constructos N66-*Hind*III-pTrcHis A con la enzima *Hind*III (10U), para evaluar la orientación del gen N66 dentro del vector de expresión. El análisis indicó que algunos plásmidos fueron parcialmente digeridos ya que el tamaño esperado del vector con el inserto (linearizado) era de 6.0 kb (Fig. 26), lo que indica que la enzima cortó solo en uno de los extremos, la razón pudiera deberse a una modificación en los extremos del gen amplificado.

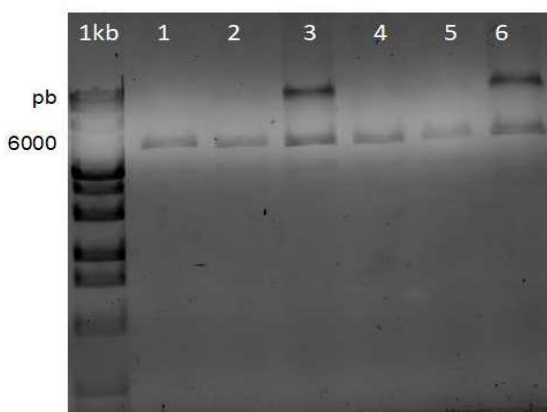


Figura 26. Perfil electroforético de la digestión de los plásmidos N66-*Hind*III-pTrcHis A. Líneas: 1-2 y 4-5) Plásmido digerido con 7U de *Hind*III; 3 y 6) Plásmido sin digerir. Gel de agarosa-Synergel®-TBE al 1%, teñido con UVView.

7.4.6 Inducción para la producción de N66 recombinante, e inmunodetección

Para inducir la N66, se utilizó una de las clonas en la que previamente se demostró la presencia del gen (por PCR). La proteína recombinante se indujo en un cultivo LB para *E. coli* TOP10-N66-*Hind*III-pTrcHis mediante la adición de 1 mM de IPTG, una vez que la densidad del cultivo celular alcanzó 0.6 unidades de absorbancia. Se colectaron muestras cada 30 min hasta completar 4 h de inducción. Las fracciones colectadas fueron tratadas para obtener las proteínas

solubles y totales. Posteriormente, las muestras se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante (Fig. 27). El perfil de proteínas en gel mostró un aumento general en la concentración de proteína de cada fracción colectada conforme aumenta el tiempo de inducción, sin embargo, el aumento fue más notable a partir de las 1.5 y hasta las 3 hr (Fig. 27 -flechas rojas-, líneas 4-7). Como la síntesis de otras proteínas también fue inducida (Fig. 27, flechas azules) se evaluó la presencia de N66 utilizando métodos de inmunodetección.

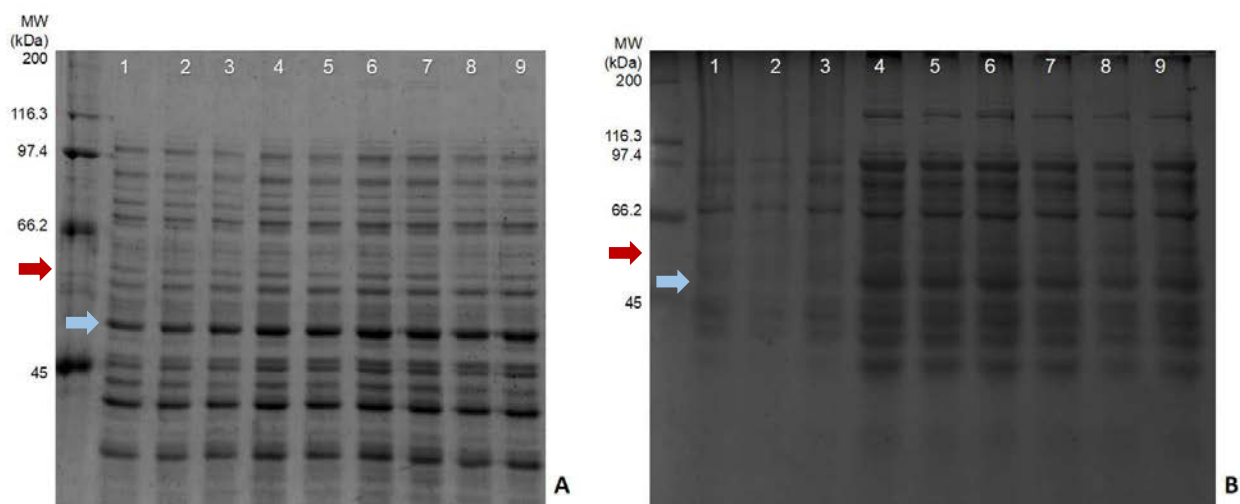


Figura 27. Perfil electroforetico, en gel SDS-PAGE al 10%, de proteínas obtenidas de cultivos de *E. coli* TOP10-N66 pTrcHis A, inducidas con 1 mM de IPTG. Paneles: A) Proteínas solubles; B) Proteínas totales. Líneas: Tiempo de inducción con IPTG, 1) 0 hr; 2) 0.5 hr; 3) 1 hr; 4) 1.5 hr; 5) 2 hr; 6) 2.5 hr; 7) 3 hr; 8) 3.5 hr; y 9) 4 hr. Las flechas rojas indican la movilidad esperada de la N66 de *P. mazatlanica* y las flechas azules un ejemplo de otras proteínas inducidas por el IPTG.

Para la inmunodetección, se realizó el método de Dot-Blot, ya que es un método de inmunodetección rápida, que permite saber la presencia o ausencia del antígeno en presencia de un anticuerpo. En este caso, se utilizó Anti-His Tag, el cual tiene afinidad por las histidinas, ya que el constructo N66-pTrcHis A tiene acoplado un tag de seis histidinas en el extremo 3' de la proteína. El resultado (Fig. 28A) indicó la presencia de la proteína en algunas de las fracciones, haciéndose más evidente en la fracción soluble inducida a las 2.5 h (Fig. 28A-8). Posteriormente, para corroborar el peso de la proteína de la fracción que dio positivo a la inmunodetección, se realizó un Western Blot. El western blot (Fig.

28B) mostró bandas inespecíficas; en la fracción soluble inducida por 2 hr (Fig. 28B, línea X) apreció una banda con un peso similar al esperado para N66 (61.3 kDa), sin embargo, en el gel también se observan otras bandas con distinto peso (Fig. 28B).

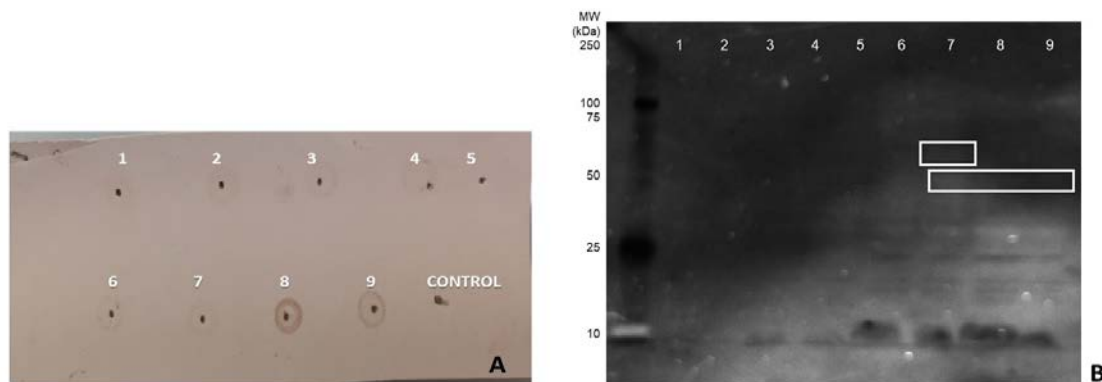


Figura 28. Inmunodetección de N66 recombinante de *P. mazatlanica*. A) Dot blot, B) Western blot. Los números denotan las fracciones colectadas durante la inducción con 1 mM IPTG de 1 a 3 hr. Líneas: 1-5) Fracciones de proteínas totales; 6-9) Fracciones de proteínas solubles. Control: (Negativo) agua destilada. Los recuadros blancos, indican la presencia del complejo de N66 recombinante, de acuerdo a su movilidad esperada.

7.5 Purificación y caracterización de N66 recombinante

7.5.1 Cromatografía de afinidad

Las células del cultivo inducido se lisaron para extraer las proteínas solubles, a partir de las cuales se purificó N66 recombinante mediante cromatografía de afinidad, considerando que el constructo de N66 contiene un tag de seis histidinas. Para ello, se empleó una resina acoplada a níquel, la cual tiene afinidad por los iones de histidina. En la Figura 29A se muestra el cromatograma del proceso de purificación. Las fracciones eluidas (23) fueron evaluadas mediante electroforesis, observando dos bandas con peso de 66 y 60 kDa respectivamente, representativas de la N66 recombinante de madre perla (Fig. 29B).

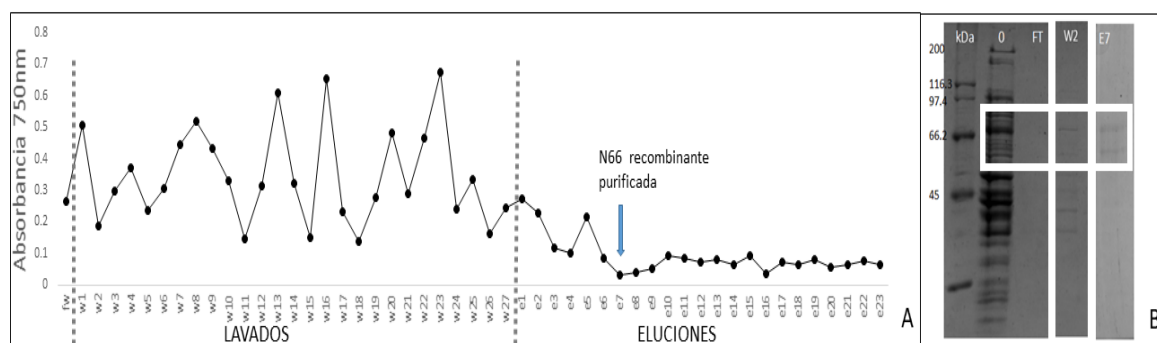


Figura 29. Purificación de N66 recombinante de *P. mazatlanica* mediante cromatografía de afinidad. A) Cromatograma derivado de cromatografía de afinidad empleando Sefarosa-Niquel; B) Perfil electroforético de en gel SDS-PAGE 10%. Líneas: kDa) Marcador molecular (Broad range protein ladder, BioRad); 0) Muestra antes de la puurificación; FT) Flow-through; W2) Lavado 2; E7) Fracción eluída número 7. El recuadro blanco, indica las bandas que representan la N66 recombinante.

7.5.2 Determinación de las subunidades de N66

Para determinar la presencia de estructura cuaternaria en la N66 de *P. mazatlánica*, se realizó un gel de electroforesis en condiciones nativas (Fig. 30A), en el cual se observó que todas las fracciones de N66 recombinante se aglomeraron en la parte superior del gel, este resultado sugiere una potencial aglomeración de la proteína. Con base en este resultado se agregaron a la proteína distintas concentraciones de DTT (0 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM, 0.25 mM, 1 mM y 10 mM), para promover la disociación de la proteína mediante la reducción de los puentes disulfuro; paralelamente se realizó un experimento similar utilizando distintas concentraciones de SDS (0.1%, 0.5%, 1% y 2%), ya que el SDS es un detergente aniónico conocido por disociar y desnaturalizar proteína multiméricas. El resultado, al agregar DTT (Fig. 30C) mostró que la N66 recombinante se disocia con 0.25 mM de DTT en dos monómeros con peso de 66 y 60 kDa, mientras que en presencia de SDS (Fig. 30B) no mostró cambios en la conformación de la proteína. Los resultados indican que la N66 recombinante contiene en su estructura puentes disulfuros que unen las dos subunidades (cuando la proteína es disociada con DTT o beta-mercaptoetanol).

De acuerdo a los trabajos de Dutton *et al.* (2008) y Khodabakhsh *et al.* (2013) se considera que esta modificación se lleva a cabo en el espacio periplásmico de bacterias gram (-) (e.g. *E. coli* TOP10). La formación de enlaces disulfuro es importante para la estructura, estabilidad y función de diversas proteínas, en especial para las proteínas extracelulares. Respecto a la estructura de las proteínas los enlaces disulfuro se pueden oxidar, isomerizar y/o reducir (Hatahet *et al.*, 2014).

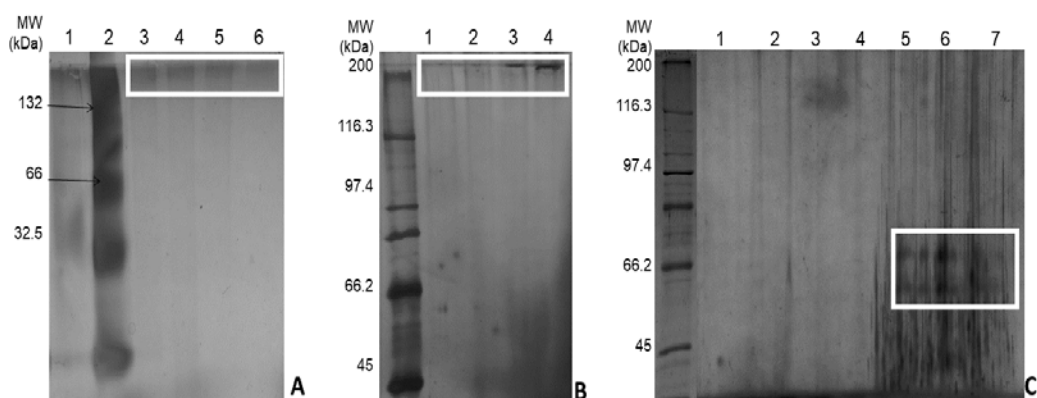


Figura 30. Perfil electroforético de la proteína N66 en condiciones no reductoras y reductoras. Panel A: N66 en condiciones nativas en geles de poliacrilamida al 7.5%. Líneas: 1) Cu/Zn SOD; 2) Albumina Sérica bovina (BSA); 3-6) N66 en condiciones no reducidas. Panel B: N66 en condiciones desnaturalizantes en gel SDS-PAGE al 7.5%. Líneas: SDS al 1) 0.1%; 2) 0.5%; 3) 1%; y 4) 2%. Panel C: N66 en condiciones desnaturalizantes en gel SDS-PAGE al 7.5%. Líneas: DTT al 1) 0; 2) 0.01; 3) 0.05; 4) 0.1; 5) 0.25; 6) 1; y 7) 10 mM, respectivamente). Los recuadros blancos, indican la aglomeración la N66 recombinante en un gel nativo (A) y en presencia de SDS (B). En el panel C, el recuadro evidencia la disociación del complejo N66.

7.5.3 Determinación del punto isoeléctrico (pI)

Para determinar el pI de la proteína se realizó una electroforesis IEF en gel de poliacrilamida usando un gradiente de pH de 3 a 10. Como se muestra en la figura 31, el pI calculado de la N66 recombinante de *P. mazatlanica* es de 6.9, esto es de tres décimas menos al estimado por métodos bioinformáticos (sección 7.2). Esto sugiere que si bien la mayoría de los algoritmos que predicen el pI de las proteínas tienen una buena correlación con secuencias de aminoácidos que no están modificados químicamente, existe un umbral de error

al calcular el pI de aquellas secuencias proteicas con aminoácidos modificados (Audain *et al.*, 2015). Al expresar la N66 en un sistema bacteriano, la única modificación posible efectuada por el organismo procarionta es la oxidación de grupos tiol (SH) entre dos residuos de cisteína que dan como resultado un enlace covalente llamado puentes disulfuro (Hatahet *et al.*, 2014).

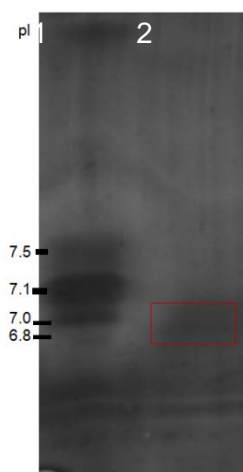


Figura 31. IEF en gel de poliacrilamida de N66 recombinante de *P. mazatlanica* usando un gradiente de pH de 3 a 10. Líneas: 1) Estándar de pI (BioRad); 2) N66 recombinante de *P. mazatlanica*.

7.5.4 Ensayos de actividad anhidrasa carbónica.

Para determinar la actividad de anhidrasa carbónica de la N66 recombinante de *P. mazatlanica*, se realizaron pruebas colorimétricas (cuantitativa y cualitativa). En la figura 32 se muestra el resultado de la prueba cualitativa en placa, en la que se observa un cambio de color en las muestras positivas de rojo a amarillo (el indicador rojo de fenol cambia de color rojo a amarillo al reaccionar con CO₂ en presencia de la enzima), lo que indica que la N66 recombinante tiene actividad de anhidrasa carbónica. Adicionalmente se observó que la N66 recombinante tiene mayor eficiencia catalizadora cuando se desala la proteína (Fig. 32, muestras 2 y 3).

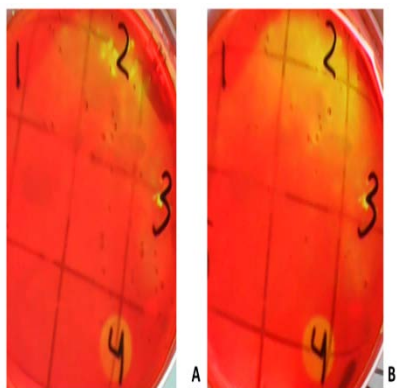


Figura 32. Ensayo de actividad de anhidrasa carbónica de N66 recombinante en placa. Paneles: Incubacion con el sustrato, A) 1 min; B) 3 min. Números: 1) Control negativo (agua); 2) N66 recombinante desalada ($5\mu\text{g}$); 3) N66 recombinante sin desalar ($5\mu\text{g}$); y 4) control positivo ($2\mu\text{g}$) (anhidrasa carbónica bovina, Sigma Aldrich).

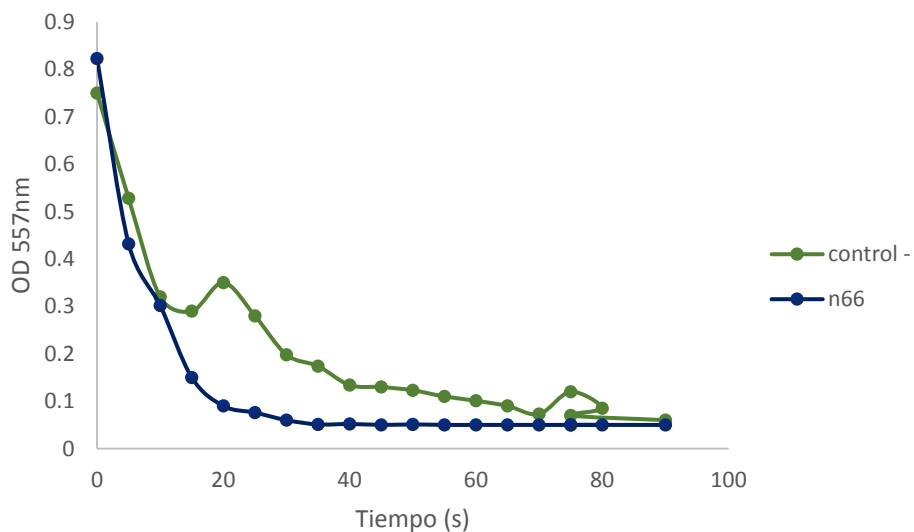


Figura 33. Ensayo de actividad de anhidrasa carbónica de N66 en tubo. La barra verde representa el control negativo de la reacción (agua). La barra azul representa la actividad de la N66 recombinante ($2\mu\text{g}$).

7.6 Ensayos de cristalización *in vitro*

Para determinar la capacidad de nucleación de carbonato de calcio en calcita (sistema cristalino romboédrico) y aragonita (sistema cristalino ortorrómbico) de la N66 recombinante de *P. mazatlanica*, se realizaron ensayos de cristalización en los que se mezcló la enzima recombinante con distintas sales. Además, para validar este ensayo se consideraron como controles negativos las sales sin la enzima recombinante y como control positivo las N66 nativa de madre perla. Primero, la enzima fue evaluada con una mezcla saturada de sales de bicarbonato de sodio-cloruro de calcio, que dan como resultado carbonato de calcio y cloruro de sodio; dicha mezcla es utilizada como sustrato para que una SMP's pueda nuclear un solo polimorfo de carbonato de calcio: aragonita o calcita. Sin embargo, en la actualidad se sabe que existen otras proteínas como la N66, que tienen la capacidad de nuclear dos tipos de polimorfos usando un solo sustrato. De acuerdo con nuestras observaciones, con este sustrato (carbonato de calcio-cloruro de sodio) la proteína N66 recombinante de *P. mazatlanica* tiene la capacidad de nuclear calcita (Fig. 34A) y aragonita (Fig. 34B y C). Además, se observó que los cristales de aragonita y calcita se agrupan por polimorfo (no se observaron agrupaciones con ambos polimorfos). Por último, se observó que carbonato de calcio con cloruro de sodio favorecen más al crecimiento de la calcita (Fig. 34A-C. Con respecto al tamaño, los cristales de calcita formador fueron de 200 μm (Fig. 33A), mientras que los de aragonita son mucho más pequeños, teniendo tallas de 10 μm (Fig. 34C).

El segundo sustrato evaluado fue una mezcla de bicarbonato de sodio-cloruro de magnesio, que dan como resultado bicarbonato de magnesio y cloruro de sodio. En la Figura 35 se observa que, en este caso, la N66 recombinante de *P. mazatlanica* únicamente nucleó calcita (Fig. 35A-F). Cabe destacar que el proceso de cristalización fue menos eficiente que con carbonato de calcio y cloruro de sodio, sin embargo, el tamaño individual de los cristales en promedio fue igual que con el sustrato de carbonato de calcio y cloruro de sodio, es decir, cristales de 200 μm (Fig. 35E).

El último sustrato probado fue carbonato de calcio, este sustrato puede ayudar a la enzima a nuclear calcita, aragonita o vaterita. Como se observa en la Figura 36, la N66 recombinante nuclea calcita (Fig. 36E), aragonita (Fig. 36G) y vaterita (Fig. 36C). En la figura se observa que la aragonita crece independiente de la calcita y vaterita (Fig. 36H), mientras que la calcita y vaterita tienden a crecer en conjunto (Figs. 36A, B, D y F).

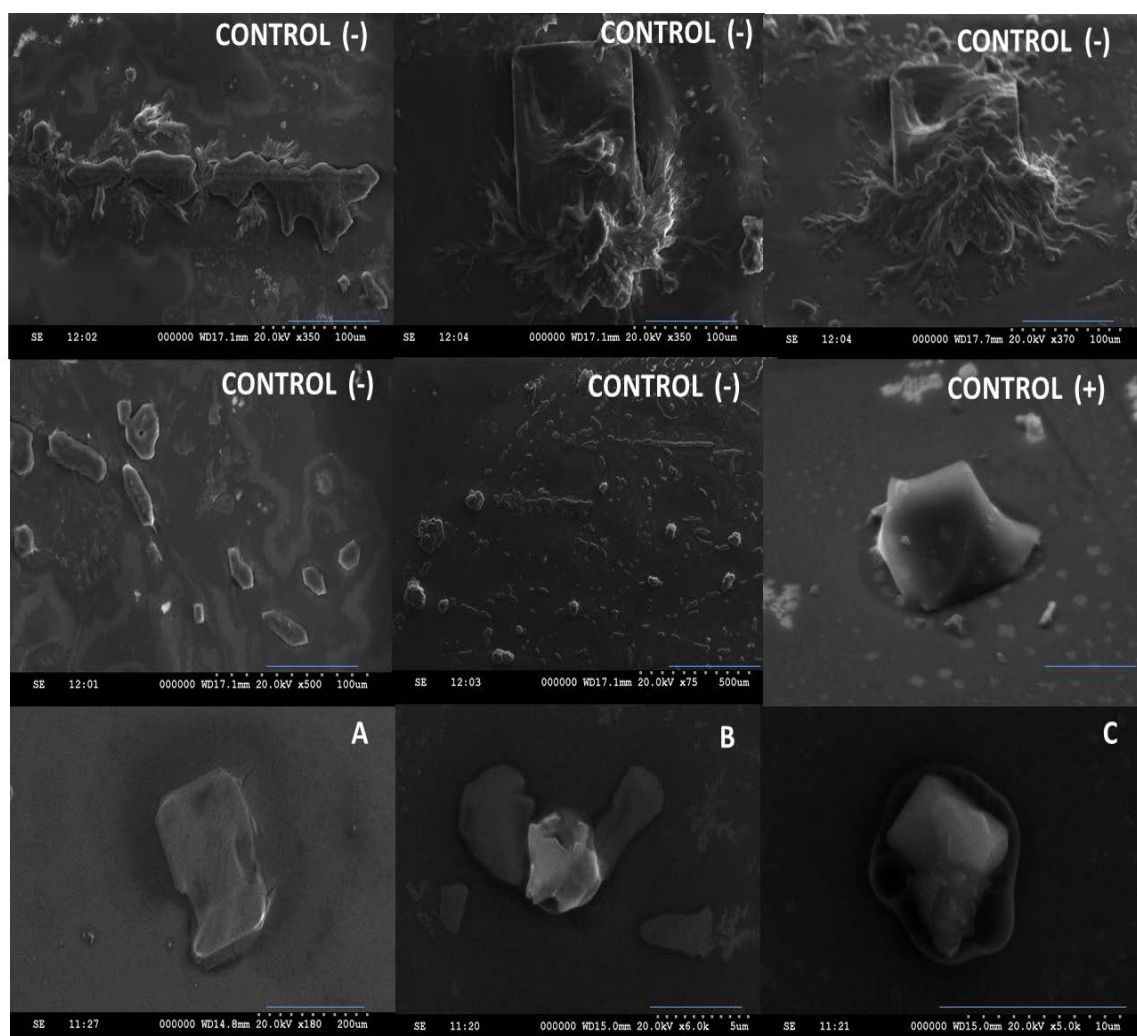


Figura 34. Ensayos de cristalización *in vitro* utilizando como sustrato una mezcla de sales: bicarbonato de sodio-cloruro de calcio. Paneles: Control (-), Cristales generados con las sales sin la enzima; Control (+), Cristales generados con la N66 nativa; A-C, Cristales generados con N66 recombinante de *P. mazatlanica*. La barra azul equivale a 100 micras en los paneles control y A. En los paneles B y C la barra equivale a 5 micras.

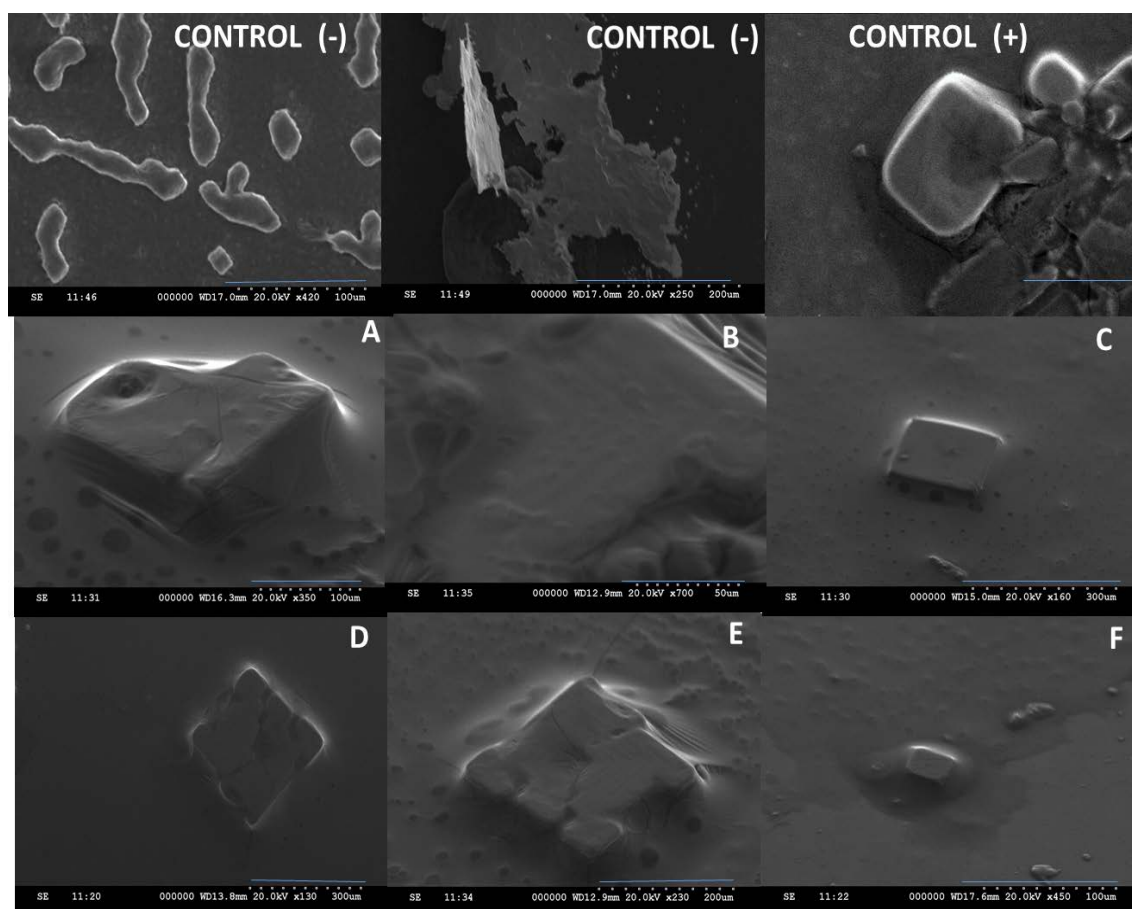


Figura 35. Ensayos de cristalización *in vitro* utilizando como sustrato una mezcla de sales: bicarbonato de sodio-cloruro de magnesio. Paneles: Control (-), Cristales generados con las sales sin la enzima; Control (+), Cristales generados con la N66 nativa; A-F, Cristales generados con N66 recombinante de *P. mazatlanica*. La barra azul equivale a 100 micras.

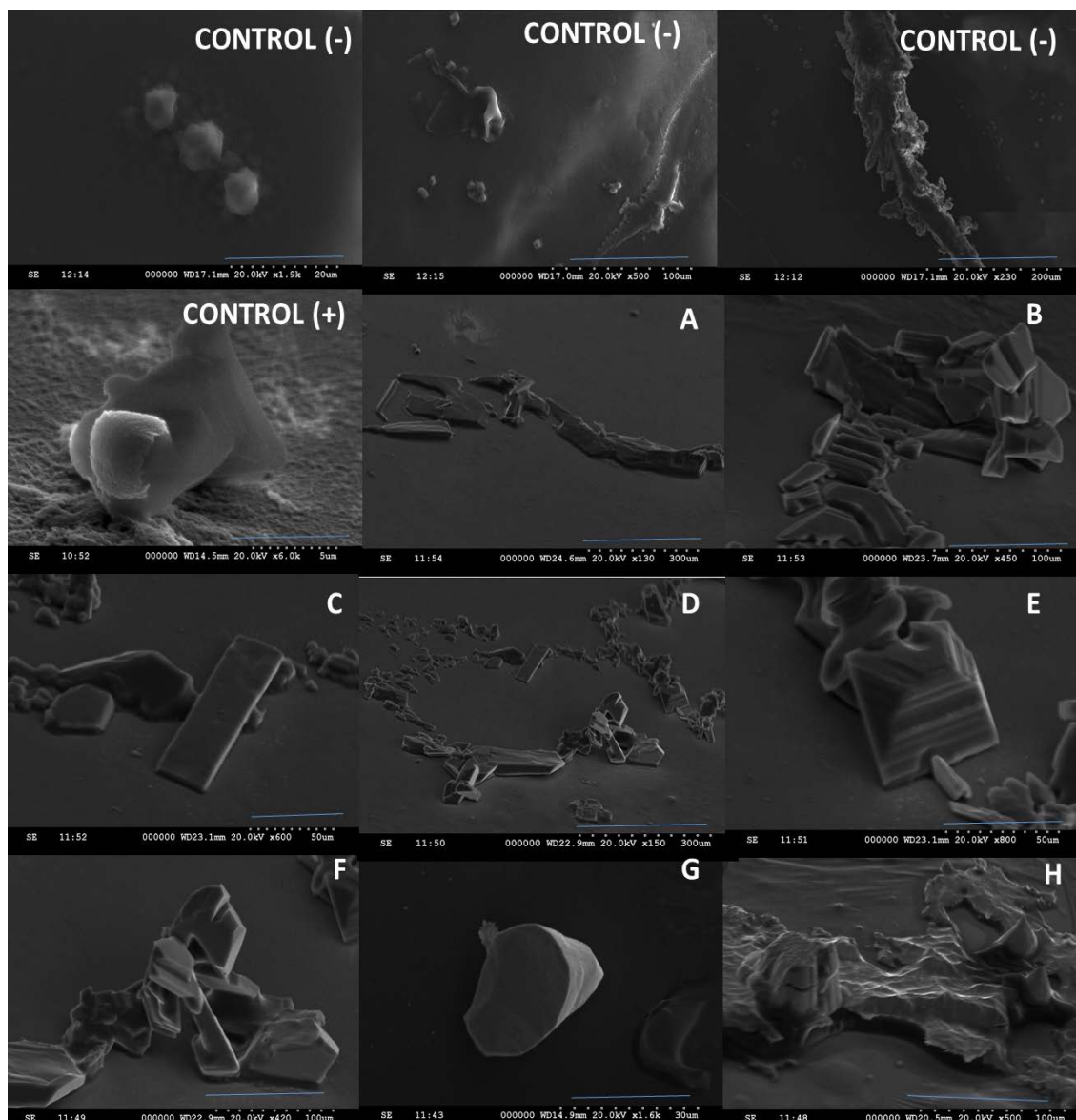


Figura 36. Ensayos de cristalización utilizando carbonato de calcio (CaCO_3). Paneles: CONTROL (-), Cristales generados con la sal sin la enzima; CONTROL (+), Cristales generados con la N66 nativa; A-H, Cristales generados con N66 recombinante de *P. mazatlanica*. La barra azul equivale a 100 micras; en los paneles C, E y G, la barra azul equivale a 50 micras.

8. DISCUSIÓN

En la actualidad, las SMPs (como la N66) han sido estudiadas con base en distintos criterios como pueden ser la caracterización y el análisis de las secuencias de los genes que las codifican y las secuencias de aminoácidos deducidas. Dichos estudios (Kong *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Naganuma *et al.*, 2014; Nakayama *et al.*, 2013) han servido para conocer las funciones, diversidad y evolución de este grupo de proteínas en la formación de la concha de los moluscos. En este trabajo, se caracterizó la secuencia codificante de la N66 de *P. mazatlanica*. Posteriormente, con base en el análisis realizado se expresó una parte de la secuencia de N66 (se eliminó el péptido señal) en el sistema de *E. coli*-pTrcHis para determinar su función como agente nucleador en el proceso de cristalización *in vitro* con carbonato de calcio como principal sustrato.

8.1 Caracterización de la secuencia codificante de N66 de *P. mazatlanica*

8.1.1 Implicaciones de la localización celular

Previo a esta investigación, Kono *et al.* (2000) amplificaron el gen que codifica la N66 de *P. maxima* utilizando ADNc sintetizado a partir de ARN obtenido de tejidos de la región dorsal y del borde del manto. Estos autores obtuvieron una secuencia de 1811 pb que codifican una proteína de 568 aminoácidos. En este trabajo, se utilizó ADNc sintetizado a partir de ARN obtenido de muestras de tejido de la región central del manto (localizada entre la zona visceral y el músculo abductor) de *P. mazatlanica*, obteniéndose una secuencia de 1766 pb que codifican una proteína de 576 aminoácidos. Ambas proteínas conservan los primeros 22 aminoácidos localizados en la región N-terminal que corresponde al péptido señal, que tiene la función de determinar la localización celular de la proteína. Con base en el análisis bioinformático de las regiones correspondientes al péptido señal de ambas proteínas, se deduce que son secretadas hacia el exterior de las células del manto. Cabe destacar, que el manto de los moluscos es responsable de la formación de la concha, de la

secreción de distintas macromoléculas y, además, presenta una función importante en la capacidad respiratoria (Gosling, 2008; Xiang *et al.*, 2014). Dado lo anterior, el manto está dividido en distintas regiones compuestas por células epiteliales especializadas (Fougerouse *et al.*, 2008), cada región está asociada a la formación de la concha (Gardner *et al.*, 2011; Jabbour-Zahab *et al.*, 1992; Jolly *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2017). Así, al obtener la N66 a partir de dos regiones del manto de *P. maxima*, Kono *et al.* (2000) dedujeron que la N66 estaba presente en la capa prismática (compuesta por calcita) y en la capa de nácar (compuesta por aragonita). En la presente tesis se obtuvo la N66 de la región central del manto de *P. mazatlanica* e Ivanina *et al.* en el 2017 demostraron que esta zona contribuye a la regulación del equilibrio ácido-base y la regulación de la composición iónica del manto, incluyendo el sitio de mineralización. Por otra parte, Hüning *et al.* (2016) observaron que en la región central del manto 4 de 10 genes inducidos aumentan notablemente su expresión cuando son expuestos a procesos de reparación de la concha; entre estos genes reportaron la nacreína, la cual es homóloga con la N66. Por lo anterior, estos estudios sugieren que la N66 de *P. mazatlanica* podría actuar como nucleador dentro en el proceso de formación de las estructuras prismáticas y de nácar de la concha e involucrada en el proceso de reparación de la misma. Además, la N66 podría actuar como regulador en el mecanismo de equilibrio ácido-base del manto, sin embargo, son necesarios más estudios para corroborar esta hipótesis.

8.1.2 Implicaciones de las modificaciones postraduccionales.

Las modificaciones postraduccionales de una proteína involucran modificaciones covalentes en sus aminoácidos (Seo y Lee, 2004). Estos cambios determinan su estructura terciaria y cuaternaria, regulan su actividad y función (Karve y Cheema, 2011), están involucradas en la regulación de procesos celulares como la localización celular, formación de complejos moleculares e interacciones proteína-proteína (Parker *et al.*, 2010).

Las SMPs generalmente presentan en su estructura varias modificaciones postraduccionales como: fosforilaciones, glicosilaciones, sulfataciones, entre otras, las cuales pueden tener una función en el proceso de mineralización de la

concha (Marin *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2011). Kono *et al.* (2000), sugieren que la N66 pudiera tener modificaciones postraduccionales como sulfataciones. Por ello, la secuencia de N66 de *P. mazatlanica* fue analizada por métodos bioinformáticos para determinar si presenta sitios potenciales de regulación postraducciona. La N66 de *P. mazatlanica* mostró cinco sitios potenciales a sulfatación, quince sitios potenciales a O-glicosilación, un sitio potencial a N-glicosilación y seis cisteínas potenciales para formar tres puentes disulfuro. Lo anterior, sugiere que la N66 de *P. mazatlanica* podría ser una glicoproteína sulfatada, es decir, una proteína con capacidad de unión a los carbohidratos mediante enlaces N (unión del grupo amida de la asparagina, Imperiali y O'Connor, 1999) o enlaces O (unión del grupo hidroxilo de la serina o treonina, Jentoft, 1990) que, a su vez, tienen la capacidad de unión a un grupo sulfato mediante la modificación de la tirosina (Yang *et al.*, 2015).

En la actualidad se ha establecido que las glicoproteínas sulfatadas (como la perlina, mucoperlina, MSP-1 y nacreína), podrían tener una función importante en el proceso de biomineralización al favorecer la absorción de iones de calcio a través del ácido sulfítico y el ácido siálico (Cölfen *et al.*, 2006; Marin *et al.*, 2000; Norizuki *et al.*, 2008; Samata, 2004; Takaura *et al.*, 2008). Cabe destacar que la alta afinidad de iones de calcio podría inhibir negativamente el proceso de cristalización, como en el caso de la MSP130, por lo que esto se podría considerar como una característica general de las glicoproteínas sulfatadas (Weiss y Marin, 2008). Esta hipótesis coincide con las observaciones de los trabajos de Kono *et al.* (2000) y Miyamoto *et al.* (2005); sin embargo, es una idea general; ya que no se esclarece hasta qué punto repercuten las glicosilaciones y sulfataciones de manera individual en el proceso de mineralización. Recientemente, Chang y *et al.* (2016) demostraron que la proteína AP24 (un tipo de SMPs intracristalina con habilidad de nuclear calcita) sobre-expresada en células de insecto muestra un comportamiento similar que la proteína recombinante AP24 sobre-expresada en células bacterianas en ensayos de mineralización *in vitro*. No obstante, lo anterior, se mostraron diferencias en el grado de agregación proteica y en la dirección de los cristales, mostrando que la AP24 recombinante expresada en bacterias tiene un mayor grado de agregación

que la expresada en células de insecto. Además, la AP24 expresada en células de insecto es un inhibidor más fuerte en el proceso de nucleación, y modificó la dirección del crecimiento de los cristales en comparación con la AP24 expresada en células bacterianas. Finalmente, Chang *et al.* (2016) sugieren que las modificaciones postraduccionales de grupos aniónicos (por sialilación y sulfatación), junto con modificaciones en la topología de la proteína, podrían explicar los cambios en la agregación de las proteínas.

De acuerdo con los trabajos realizados por Ceroni *et al.* (2006), la formación de puentes disulfuro se relaciona con la estructura de la proteína y la estabilización del proceso de plegamiento. En algunas proteínas de la concha de moluscos se ha observado la formación de oligómeros (multímeros generados por la unión de varios monómeros a través de puentes disulfuro) (Bédouet *et al.*, 2001; Lao *et al.*, 2007; Treccani *et al.*, 2006), por lo que la predicción de tres puentes disulfuro en la secuencia de la N66 de *P. mazatlanica* podría conferirle una estructura tridimensional más rígida, al tener el potencial de formar oligómeros.

8.1.3 Implicación de los dominios de la N66

En la actualidad, se sabe que la mayor parte de las SMPs tienen estructuras multidominio, que pueden ser glicosiladas en regiones hidrofílicas y ácidas, por lo que pudiesen tener una función de interacción entre la proteína con el mineral (Cölfen *et al.*, 2006).

La N66 de *P. mazatlanica* al igual que sus homólogas (Fig. 20), son proteínas multidominio, ya que poseen en su estructura dos dominios tipo CA y un dominio NG (Fig. 20). En general, las proteínas multidominio presentan ciertas características, como, por ejemplo: plasticidad estructural y múltiple funcionalidad (Bhaskara y Srinivasan, 2011), por lo que, una forma de estudiar la relación de dichas características sobre la función de la proteína es observando la evolución de la composición de cada dominio que esté presente en la proteína (Buljan y Bateman, 2009). Según Traut (2014) la longitud de un dominio es variable, sin embargo, el tamaño promedio es de 120 aminoácidos (Buljan y Bateman, 2009). Actualmente, diversas investigaciones (Apic *et al.*,

2003; Bhaskara y Srinivasan, 2011; Vogel *et al.*, 2008) señalan que la longitud del dominio puede deberse a distintos mecanismos moleculares a nivel génico como la duplicación, la recombinación, la presencia de inserciones y de deleciones, o por la combinación de estos mecanismos, dando origen a diversos procesos evolutivos en los dominios, por ejemplo: mezcla de dominios, pérdida de dominio, ganancia de dominio, reclutamiento de dominios (*domain shuffling, domain loss, domain gain, domain recruitment*), entre otros.

Kocot *et al.* (2016), explican que la mayoría de las SMPs tienen dominios repetitivos de baja complejidad, los cuales probablemente promovieron la evolución acelerada de las proteínas de la concha al recombinarse con dominios más antiguos como los que se observan en las anhidrasas carbónicas. Entonces, algunos dominios pudieron evolucionar por procesos de duplicación haciéndose susceptibles a la ganancia, pérdida o intercambio de dominios. De acuerdo con esto, probablemente, en algún momento de la historia evolutiva del gen de N66 (que tiene un dominio repetitivo de NG de baja complejidad), se recombinó con un gen de anhidrasa carbónica; tras esta combinación y un proceso de duplicación del dominio CA, se originó la actual estructura del gen de N66: dos dominios tipo CA y un dominio NG. Kocot *et al.* (2016) mencionan que, aunque no se sabe con exactitud el origen y la evolución de las SMPs, su prevalencia en el manto sugiere que las proteínas que contienen estos dominios son componentes importantes en los tejidos responsables de secretar las proteínas involucradas en la formación de la concha. Con base en esta información, se puede suponer que en algún momento, cuando los moluscos no habían desarrollado por estrategia de supervivencia su caparazón, los moluscos ancestrales contaban con este manto que tendría como función principal la de respiración. Posteriormente, la selección natural (protección contra depredadores), pudo ser el mecanismo por el que se adquirió el caparazón originado por la mutación y/o recombinación de uno o varios genes del manto, por lo que algunas proteínas pasaron de tener en su estructura un solo dominio a ser proteínas multidominio involucradas en el proceso de formación y reparación de la concha. Como cada especie de molusco es diferente, la diversidad en el manto de cada organismo, proporcionó una diversidad de

proteínas homólogas; cada proteína tiene una función distinta en el proceso de mineralización, en particular, en la etapa de nucleación al crear cristales con mayor o menor resistencia, que serán posteriormente agrupados para crear la diversidad de conchas con mayor o menor dureza en su estructura. Con base en lo anterior, surge la necesidad de estudiar a detalle la estructura de cada dominio, para entender la función(es) de estas proteínas dentro del organismo.

8.1.3.1 Dominio anhidrasa carbónica

La función principal de una anhidrasa carbónica (CA) es catalizar la conversión de dióxido de carbono y agua en bicarbonato y protones. Dicha reacción forma parte importante de procesos fisiológicos de animales de distinta taxa, como procesos de respiración, equilibrio acido-base, resorción ósea, calcificación, vías biosintéticas, crecimiento celular, carcinogénesis, fotosíntesis, así como una variedad de procesos que involucran la transferencia de iones, gases y fluidos (Chegwidden *et al.*, 2013). La evidente multifuncionalidad de esta clase de enzimas las ha convertido en un importante objeto de estudio. En la actualidad se conoce, que esta enzima tiene tres isomorfias no relacionadas genéticamente, por lo que este grupo de enzimas se ha dividido en seis familias: CA- α , CA- β , CA- γ , CA- δ , CA- ζ y CA- η (Chegwidden *et al.*, 2013; http://pfam.xfam.org/family/Carb_anhydrase). Para fines de esta tesis, solo se abordará la información referente a la familia CA- α , ya que la N66 de *P. maxima* y *P. mazatlanica* (este trabajo), así como otras proteínas homólogas (como la nacreína y N45), presentan dos dominios tipo CA- α .

Las CA- α (al igual que los dominios CA presentes en otras isoformas), son metaloenzimas que se han agrupado en más de 16 isoformas (nombrados: CA I, II, III, y así sucesivamente). De las cuales, solo tres isoformas (por sus siglas en inglés nombradas CA-RP; proteínas relacionadas a CA) carecen de actividad debido a las sustituciones en uno o más de los residuos de histidina necesarios para unirse al zinc, que es un elemento esencial para la actividad de hidratación del dióxido de carbono. Sin embargo, también se han encontrado sustituciones en más de 16 isoformas, en distintos sitios, dando como resultado isoenzimas

con mayor o menor eficiencia de catálisis (Chegwidden *et al.*, 2013). Por lo tanto, en este trabajo se realizó un análisis de alineamiento entre las N66 de *P. mazatlanica* y las CA II y CA VII humanas, y CAII de un molusco, para determinar la existencia de cambios en los sitios relacionados al mecanismo de catálisis y al plegamiento y estructura de esta proteína. De los 50 sitios analizados en este alineamiento (Fig. 21, Tabla IX), solo 26 sitios fueron totalmente conservados, el resto presentó alguna sustitución. A continuación, se discutirán las implicaciones de las sustituciones en los sitios relacionados al mecanismo y eficiencia de catálisis, para posteriormente, abordar las implicaciones relacionadas a la estructura de esta enzima.

A) Sustituciones involucradas en el mecanismo de catálisis de CA.

Los residuos Phe93, Phe95 y Trp97 rodean dos de las tres histidinas asociadas a los sitios de unión al zinc, se ha demostrado están relacionados a la eficiencia de la actividad catalítica de la enzima CA y que alguna modificación en ellos afecta la actividad catalítica (Hunt y Fierke, 1997). El análisis de alineamiento resultado del alineamiento (Fig. 21, Tabla IX) muestra que estos residuos están totalmente conservados en las enzimas CAII y CA VII humanas, y en la CAII del molusco, sin embargo, las N66 de *Pinctada* muestran cambios en estos residuos. En el sitio 93 ambas enzimas tienen Leu, en el sitio 95 ambas tienen Ile y en el sitio 97 la N66 de *P. maxima* tiene Asn mientras que la N66 de *P. mazatlanica* tiene Ile. De acuerdo con Hunt y Fierke (1997), este tipo de sustituciones afecta negativamente la afinidad de la enzima con el zinc, por lo que las N66 podrían tener menor afinidad con el zinc, afectando su nivel de actividad.

Los residuos Tyr7, Asn62, His64, Asn67, forman parte de una cavidad hidrofílica encargada de recubrir el sitio activo y de interactuar con otras moléculas de agua y otros disolventes (Fisher *et al.*, 2010; Mikulski *et al.*, 2011b). Los resultados (Tabla IX) muestran que las enzimas CA II del molusco, la CA VII humana y las N66 de *Pinctada*, muestran sustituciones semiconservativas, por lo que este cambio, probablemente no afectarían la función de interacción con otras moléculas.

El residuo Trp5, es un elemento importante en la lanzadera de protones del mecanismo de catálisis de una CA, por lo que es altamente conservado en las CA- α ; se ha observado que una mutación en este residuo causa cambios estructurales significativos (Mikulski *et al.*, 2011a). El resultado del análisis realizado (Tabla IX) indica que solo la N66 de *P. maxima* tiene una sustitución de Trp por Leu, lo cual refiere a que es una sustitución semiconservativa, por lo que este cambio, quizás, no afectaría drásticamente en su función como elemento clave en su mecanismo de catálisis.

Los residuos Asn244 y Arg246 están involucrados indirectamente en la red de enlaces, y orientan las cadenas laterales que recubren la cavidad del sitio activo haciendo su conformación más estable (Eriksson *et al.*, 1988). Los resultados (Tabla IX) muestran cambios semiconservativos en estos sitios en la CA II del molusco y las N66 de *Pinctada*, por lo que, quizás, tampoco exista afectación en la estabilidad conformacional de la cavidad del sitio activo.

Los residuos Leu203 y Thr208, están relacionados con la interacción de bióxido de carbono (CO₂), por lo que un cambio en estos residuos podría aumentar o disminuir dicha interacción (Eriksson *et al.*, 1988). El resultado del análisis (Tabla IX) indica que las N66 de *Pinctada* presenta sustituciones no conservativas, por lo que estas enzimas podrían presentar una interacción mayor o menor respecto a la actividad del CO₂.

Los residuos Asn67, Gln92, Leu204, Cys206 están implicados en la unión a inhibidores como sulfonamidas (Ericksson *et al.*, 1988; Turkoglu *et al.*, 2012). El resultado del análisis (Tabla IX) indica cambios no conservativos en las N66 de *Pinctada* y en la CA II del molusco. Actualmente, se ha demostrado que un cambio en estos residuos repercute en la unión con estos y en la eficiencia catalítica (Ericksson *et al.*, 1988; Turkoglu *et al.*, 2012).

B) Sustituciones con implicaciones en la estructura y plegamiento de CA.

Los residuos Trp192, Pro195, Ile210, His64, Asn67, Leu118, Ala142, Ile146 están asociados a la estabilidad estructural y plegamiento de la proteína CA (Hammarstrom *et al.*, 2001; Hoque, 2014; Krebs y Fierke, 1993). El análisis realizado (Tabla IX) indicó cambios semiconservativos y no conservativos en las

N66 de *Pinctada* y en las CA II del molusco, por lo que habría diferencias en la estabilidad estructural de estas enzimas con respecto a otras anhidrasas carbónicas.

8.1.3.2 Dominio NG

El dominio NG presente en las N66 y en las nacreínas, es un dominio repetido de baja complejidad (RLCD, por sus siglas en inglés); este tipo de dominios tienen implicaciones importantes en las proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDPs, por sus siglas en inglés) (Feng *et al.*, 2017). Las IDPs, son proteínas hidrofílicas con múltiples repeticiones de aminoácidos, sin una estructura terciaria bien definida, y presentan regiones intrínsecamente desordenadas, lo cual genera proteínas con estructuras altamente variables.

Por ejemplo, algunas de estas proteínas presentan estructuras en forma de espirales. La mayoría de las IDPs, adquieren estructuras más plegadas cuando se modifican postraduccionalmente o cuando sus estructuras intrínsecamente desordenadas se vinculan. En el proceso de biomineralización, se supone que las IDPs están relacionadas a estabilizar iones o grupos de iones, proporcionar sitios epitaxiales útiles para la deposición inicial del mineral inicial y también están asociadas a la estabilización del cristal (Boskey y Villarreal-Ramírez, 2016). Feng *et al.* (2017) mencionan que el RLCD de las nacreínas, podría estar relacionado con la concentración de Ca^{2+} y CO_3^{2-} , la nucleación cristalina y la inhibición del crecimiento cristalino, además de sugerir que el dominio de repetición NG se adquirió de forma independiente en los linajes de bivalvos y gasterópodos.

En este trabajo se comparó el RLCD de la N66 de *P. mazatlanica*, compuesto principalmente por Asn y Gly, con otros RLCD homólogos presentes en la N66 de *P. maxima* y nacreínas (ver Fig. 20) cabe aclarar que esta figura muestra la comparación con la N45, enzima homóloga a la N66, sin embargo, a pesar de que su estructura tiene repeticiones de Asn y Gly, el número es inferior a 50 aminoácidos, por lo que no podría ser considerado como un dominio.

En este alineamiento (Fig. 20) se puede observar que la longitud del dominio es variable en cada una de las secuencias comparadas, además, todos los RLCD presentan variabilidad de inserciones y deleciones, así como algunas sustituciones, principalmente de Asp, Tyr, Cys, Glu, Ser y Arg. Estos resultados (Fig. 20) podrían apoyar un estudio que reporta la presencia de variabilidad intraespecífica en la longitud y la secuencia del dominio NG (Asn y Gly), identificando polimorfismos (se observaron inserciones y deleciones, así como sustituciones en términos de nucleótidos y aminoácidos (Fig. 5). Los autores refieren a que este hallazgo es consistente con otros estudios en donde se muestran altos niveles de polimorfismo del ADN en los genomas de ostras (Smith-Keune y Jerry, 2009).

8.2 N66 recombinante y su caracterización bioquímica

En la actualidad, la mayoría de los estudios relacionados con la expresión de SMPs se han hecho en sistemas bacterianos de *E. coli*, generando SMPs activas y funcionales (Bahn *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2016; Perovic *et al.*, 2014; Ponce y Spencer, 2011; Takeuchi *et al.*, 2008). Por ello, en este trabajo se decidió expresar parte del gen de N66 de *P. mazatlanica* (ver el apartado 6.2 sobre el diseño de la construcción) en la bacteria *E. coli* TOP10, de la cual se obtuvo una proteína recombinante, que por sus características corresponde a la N66 de *P. mazatlanica*. Esta enzima recombinante mostró un pI de 6.9 (Fig. 31) y está formada por dos monómeros de 66 y 60 kDa (Fig. 30). Cabe destacar que si bien la N66 aún no está oficialmente reconocida como parte de la familia de las anhidrasas carbónicas, si tiene una gran similitud en los residuos relacionados al mecanismo catalítico de este tipo de enzimas, las cuales tienen la característica de tener estructuras diméricas (unión de dos estructuras monoméricas) que a su vez pueden formar estructuras tetraméricas y otras más complejas (Aggarwal *et al.*, 2015; Cuesta-Seijo *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; McDevitt *et al.*, 2011; Perfetto *et al.*, 2017); a este proceso de unión entre estructuras monoméricas, para formar estructuras diméricas, triméricas, tetraméricas o estructuras de cadena más larga se le conoce como oligomerización proteica.

La formación aparente de este dímero en la N66 recombinante de *P. mazatlanica*, derivó en la realización de análisis de oligomerización utilizando un agente reductor (DTT) y un detergente aniónico (SDS) (Fig. 30). Los resultados indicaron que los componentes o subunidades de la N66 recombinante comienzan a reducir sus puentes disulfuro a partir de 0.25 mM de DTT, mientras que con concentraciones de hasta 2% de SDS la proteína no logra disociarse.

Finalmente, se determinó la actividad tipo CA de la N66 recombinante, por métodos colorimétricos. Los resultados revelaron actividad CA positiva (Fig. 33), demostrando una actividad específica de 500 EU/mg de proteína, que son valores de actividad mayores a los reportados para otras CAs por Gai *et al.* (2014).

8.3 Efecto de la N66 recombinante en el proceso de cristalización *in vitro*.

Kono *et al.* (2000) reportaron que la N66 podría ser capaz de nuclear dos polimorfos de carbonato de calcio, ya que su estudio reportó que esta proteína está presente en la capa de nácar (estructura asociada a la aragonita) y en la capa prismática (estructura relacionada con la calcita). Para evaluar la función como nucleador de la N66 recombinante de *P. mazatlanica* (mediante su efecto de nucleación polimórfica de carbonato de calcio), se ensayaron tres sustratos: carbonato de calcio, carbonato de calcio-cloruro de calcio y carbonato de calcio-cloruro de magnesio. Con los tres tratamientos (Figs. 34-36) se observa la preferencia de la N66 por nuclear calcita; de hecho, con el tratamiento con cloruro de magnesio (Fig. 35) únicamente cristalizó calcita, mientras que con los dos sustratos restantes también se observaron cristales de aragonita (aunque en menor medida; Figs. 34 y 36).

Por último, se observó que la N66 recombinante de *P. mazatlanica* también puede nuclear vaterita (Fig. 36). Si bien la vaterita no está relacionada a una estructura en particular, si se le vincula con procesos de reparación de la concha. Además, nuestros resultados en cierta forma concuerdan con las observaciones de Hüning *et al.* (2016), quienes determinaron que los genes inducidos en la región central del manto están involucrados en procesos de reparación.

La producción de N66 recombinante de *P. mazatlanica* y la actividad descrita en este trabajo sugiere que las modificaciones postraduccionales potencialmente existentes, no afectan la función de la proteína de nuclear el carbonato de calcio, sin embargo, si afectaron la función de inhibición del cristal, ya que el control positivo (N66 nativa) que se puso en cada tratamiento creció en menor medida que la recombinante, además, de que ambos generaron distintas orientaciones con respecto al crecimiento del cristal. Estos resultados, son parecidos al comportamiento de los cristales generados por las AP24 recombinantes en células de insecto y células de bacteria descritos por Chang *et al.* (2016).

9. CONCLUSIONES

En este estudio se describe la caracterización de la secuencia de N66 de *P. mazatlanica*, abordando las implicaciones de las funciones y posible evolución de esta proteína desde dos criterios: su localización celular y la estructura proteica. La función conocida de N66 es como nucleador e inhibidor en el proceso de mineralización de la concha. En este trabajo se observó que la N66 recombinante, además de nuclear los polimorfos de calcita y aragonita, también, nuclea vaterita, por lo que se sugiere que N66 podría estar involucrada en el proceso de reparación de la concha.

Por otro lado, al obtener una N66 recombinante funcional (en su actividad tipo CA y como nucleador de carbonato de calcio), los resultados de este trabajo apuntan a que las modificaciones postraduccionales potenciales de la N66 podrían estar directamente involucradas con la función de inhibición del crecimiento del cristal. Además, estas modificaciones podrían estar relacionadas con la estructura del RLCD de Asn y Gly.

10. PERSPECTIVAS

1. Verificar el grado de pureza de los cristales generados por la N66 recombinante y la nativa, así como evaluar las propiedades químicas, ópticas, eléctricas y magnéticas de los cristales generados, para determinar su posible utilidad en el área de la construcción o para la generación de un biomaterial con aplicación en el área médica.
2. Evaluar el posible efecto de las modificaciones postraduccionales en las propiedades mecánicas del cristal como dureza, densidad y fractura; se recomienda someter a ensayos petrográficos a los cristales generados por la N66 recombinante y a la N66 nativa.
3. Evaluar el efecto de las modificaciones postraduccionales y el RLCD de NG en la topología de N66 nativa y recombinante.
4. Determinar las posibles funciones biológicas de la N66 distintas al proceso de cristalización, evaluando los niveles de expresión en otras partes del organismo

como: agallas, hemocitos y el musculo abductor; así como su regulación genética por medio del estudio de splicing alternativo.

11. LITERATURA CITADA

Addadi L., S. Weiner. 1997. Biomineralization: A pavement of pearl. *Nature*. 389(6654):912-915.

Addadi L., D. Joester., F. Nudelman., S. Weiner. 2006. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chemistry-A European Journal*. 12(4):980-987.

Aggarwal M., K. Chua., A. Pinard., M. Szebenyi., R. McKenna. 2015. Carbon dioxide “trapped” in a β -carbonic anhydrase. *Biochemistry*. 54(43): 6631-6638.

Almeida A., A. Silva., A. Nakamura-Filho., M. Carvalho., A. Cardoso. 2015. Nacre Compared to Aragonite as a Bone Substitute: Evaluation of Bioactivity and Biocompatibility. *Materials Research*. 18(2):395-403.

Apic G., W. Huber., A. Teichmann. 2003. Multi-domain protein families and domain pairs: comparison with known structures and a random model of domain recombination. *Journal of structural and functional genomics*. 4(2): 67-78.

Audain E., Y. Ramos., H. Hermjakob., D. Flower., Y. Perez-Riverol. 2015. Accurate estimation of isoelectric point of protein and peptide based on amino acid sequences. *Bioinformatics*. 32(6):821-827.

Bahn S. Y., B.H. Jo., B. Hwang., Y. S. Choi., H. J. Cha. 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 Design*. 15(8):3666-3673.

Baeuerlein E. 2004. *Biomineralization: Progress in biology, molecular biology and application*. John Wiley y Sons. 91-213.

Bédouet L., M. J. Schuller., F. Marin., C. Milet., E. Lopez., M. Giraud. 2001. Soluble proteins of the nacre of the giant oyster *Pinctada maxima* and of the abalone *Haliotis tuberculata*: extraction and partial analysis of nacre proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 128(3):389-400.

Bertini I. 2007. *Biological inorganic chemistry: structure and reactivity*. University Science Books. 79-93

Bhaskara R., N. Srinivasan. 2011. Stability of domain structures in multi-domain proteins. *Scientific reports*. 1:40

Boskey A. 2003. Biomineralization: an overview. *Connective tissue research*. 44(1):5-9.

Boskey A., E. Villarreal-Ramirez. 2016. Intrinsically disordered proteins and biomineralization. *Matrix Biology*. 52:43-59.

Buljan M., A. Bateman. 2009. The evolution of protein domain families. *Biochemsoctrans*. 1:751-755

Cartwright J. H., A.G. Checa. 2007. The dynamics of nacre self-assembly. *Journal of the Royal Society Interface*. 4(14):491-504.

Ceroni A., A. Passerini., A. Vullo., P. Frasconi. 2006. DISULFIND: a disulfide bonding state and cysteine connectivity prediction server. *Nucleic acids research*. 34(2):177-181.

Cestari R. 2008. Los rudistas (Bivalvia, Hippuritoidea) en el apenino, Centro Meridional (Italia). Análisis de las asociaciones de radiolítidos en el contexto de plataforma calcárea en el Super- Greenhouse climate del cretácico superior. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. 22-38.

Chang P., I. Perovic., A. Rao., H. Cölfen., S. Evans. 2016. Insect cell glycosylation and its impact on the functionality of a recombinant intracrystalline nacre protein, AP24. *Biochemistry*. 55(7):1024-1035.

Chegwidden W., D. Carter., Y. Edwards. 2013. The carbonic anhydrases: new horizons. *Birkhäuser*. 79-241.

Chomczynski P., N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 162(1):156-159.

Collino S. 2008. Inorganic Crystal Formation Directed by Biomineral Proteins: Characterization and Biophysical Studies of Mollusk-Nacre and Tooth-Enamel Polypeptide Sequences. Tesis de Doctorado. Universidad de Nueva York. 2-25.

Cölfen H., K. Naka., T. Okamura., A. Onoda., K. Takahashi., N. Ueyama., S. Yumamoyo. 2006. *Biomineralization II: Mineralization Using Synthetic Polymers and Templates*. Springer. 4-13.

Cuesta-Seijo J., S. Borchert., C. Navarro-Poulsen., M. Schnorr., B. Mortensen., L. Lo-Leggio. 2011. Structure of a dimeric fungal α - type carbonic anhydrase. *FEBS letters*. 585(7):1042-1048.

Dove P. M., J. De Yoreo., S. Weiner. 2003. *Biomineralization*. Willey. 1-29

Donachy J. E., B. Drake., C. S. Sikes. 1992. Sequence and atomic-force microscopy analysis of a matrix protein from the shell of the oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*. 114(3):423-428.

Dutton J., D. Boyd., M. Berkmen., J. Beckwith. 2008. Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(33):11933-11938.

Eriksson A. E., T. A. Jones., A. Liljas. 1988. Refined structure of human carbonic anhydrase II at 2.0 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 4(4): 274-282.

Fang D., G. Xu., Y. Hu., C. Pan., L. Xie., R. Zhang. 2011. Identification of genes directly involved in shell formation and their functions in pearl oyster, *Pinctada fucata*. *PLoS One*. 6(7):21860.

Fariselli P., P. Riccobelli., R. Casadio. 1999. Role of evolutionary information in predicting the disulfide - bonding state of cysteine in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 36(3):340-346.

Feng D., Q. Li., H. Yu., L. Kong., S. Du. 2017. Identification of conserved proteins from diverse shell matrix proteome in *Crassostrea gigas*: characterization of genetic bases regulating shell formation. *Scientific Reports*. 7.

Ferrè F., P. Clote. P. 2006. DiANNA 1.1: An extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic acids research*. 34(2): 182-185.

Fisher S. Z., J. F. Kovalevsky., M. Domsic., R. Mustyakimov., D. McKenna., P. Silverman., P. Langan. 2009. Neutron structure of human carbonic anhydrase II: implications for proton transfer. *Biochemistry*. 49(3):415-421.

Fougerouse A., M. Rousseau., S. Lucas. 2008. Soft tissue anatomy, shell structure and biomineralisation. *The Pearl Oyster*.77-102.

Fransson C., P. O. Freskgård., H. Herbertsson., A. Johansson., P. Jonasson., L. Mårtensson., U. Carlsson. 1992. Cis-trans isomerization is rate-determining in the reactivation of denatured human carbonic anhydrase II as evidenced by proline isomerase. *FEBS letters*. 296(1):90-94.

Fu G. 2005. Calcium Carbonate Biomineralization: Characterizing the Molecular Mechanisms of Protein-Mineral Interaction. Tesis de Doctorado. Universidad de California.12-30

Gardner L.D., D. Mills., A. Wiegand., D. Leavesley., A. Elizur. 2011. Spatial analysis of biomineralization associated gene expression from the mantle organ of the pearl oyster *Pinctada maxima*. *BMC genomics*. 12(1):455.

Gasteiger E., A. Gattiker., C. Hoogland., I. Ivanyi., R. D. Appel. A. Bairoch. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*. 31(13):3784-3788.

Gai S., J. Lu., J. Brigham., C. Bernardi., J. Sinskey. 2014. Insights into bacterial CO₂ metabolism revealed by the characterization of four carbonic anhydrases in *Ralstonia eutropha* H16. *AMB Express*. 4(1):2.

Gosling E. 2008. *Bivalve molluscs: biology, ecology and culture*. John Wiley y Sons.19-22.

Gotliv B. A., N. Kessler., J. L. Sumerel., D. E. Morse., N. Tuross., L. Addadi., S. Weiner. 2005. Asprich: A novel aspartic acid - rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida*. *ChemBioChem*. 6(2):304-314.

Hare P.E. 1963. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. *Science*. 139(3551):216-217.

Hatahet F., D. Boyd., J. Beckwith. 2014. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1844(8): 402-1414.

Hammarström P., R. Owenius. L. G. Mårtensson., U. Carlsson., M. Lindgren. 2001. High-resolution probing of local conformational changes in proteins by the use of multiple labeling: unfolding and self-assembly of human carbonic anhydrase II monitored by spin, fluorescent, and chemical reactivity probes. *Biophysical journal*. 80(6):2867-2885.

Hernández-Saavedra N. Y. 1997. Characterization of the superoxide dismutase enzyme type copper-zinc from the marine yeast *Debaryomyces hansenii*, and cloning of the encoding sequence from cDNA. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. 27-30.

Horton P., J. Park., T. Obayashi., N. Fujita., H. Harada., C. Adams-Collier., K. Nakai. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic acids research*. 35(2):585-587.

Hoque R. 2014. Defining Lists of Conserved Amino Acid Residues in Alpha Carbonic Anhydrases. Tesis de Maestría. Universidad de Tampera. 29-48.

Huang S., T. Hainzl., C. Grundström., C. Forsman., G. Samuelsson., A. Sauer-Eriksson. 2011. Structural studies of β -carbonic anhydrase from the green alga *Coccomyxa*: inhibitor complexes with anions and acetazolamide. *PLoS One*. 6(12):28458.

Hunt A., A. Fierke. 1997. Selection of Carbonic Anhydrase Variants Displayed on Phage Aromatic Residues in Zinc Binding Site Enhance Metal Affinity and Equilibration Kinetics. *Journal of Biological Chemistry*. 272(33):20364-20372.

Hüning K., M. Lange., K. Ramesh., E. Jacob., J. Jackson., U. Panknin., F. Melzner. 2016. A shell regeneration assay to identify biomineralization candidate genes in mytilid mussels. *Marine genomics*. 27:57-67.

Imperiali B., E. O'Connor. 1999. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current opinion in chemical biology*. 3(6):643-649.

Ivanina V., I. Falfushynska., E. Beniash., H. Piontkivska., M. Sokolova. 2017. Biomineralization-related specialization of hemocytes and mantle tissues of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Biology*. 220(18): 3209-3221.

Jabbour-Zahab R., D. Chagot., F. Blanc., H. Grizel. 1992. Mantle histology, histochemistry and ultrastructure of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquatic Living Resources*. 5(4):287-298.

Jentoft N. 1990. Why are proteins O-glycosylated?. *Trends in biochemical sciences*. 15(8):291-294.

Jiao Y., Z. Zheng., R. Tian., X. Du., Q. Wang., R. Huang. 2015. MicroRNA, pm-miR-2305, participates in nacre formation by targeting pearl in pearl oyster *Pinctada martensii*. *International journal of molecular sciences*. 16(9): 21442-21453.

Jolly C., S. Berland., C. Milet., S. Borzeix., E. Lopez., D. Doumenc. 2004. Zona localization of shell matrix proteins in mantle of *Haliotis tuberculata* (Mollusca, Gastropoda). *Marine Biotechnology*. 6(6):541-551.

Joubert C., D. Piquemal., B. Marie., L. Manchon., F. Pierrat., I. Zanella-Cléon., C. Montagnani. 2010. Transcriptome and proteome analysis of *Pinctada margaritifera* calcifying mantle and shell: focus on biomineralization. *BMC genomics*. 11(1):1.

Karve T., K. Cheema, K. 2011. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *Journal of amino acids*. 1:2-12

Kelley A., S. Mezulis., C. M. Yates., M. Wass., J. Sternberg. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*. 10(6): 845-858.

Keene E. 2010. Matrix - Mineral Interfaces in Biomineralization: Designing an in vitro Assay for Nacre. Tesis de Doctorado. Universidad de Cornell. 23-47

Khodabakhsh F., Z. Dehghani., M. F. Zia., M. Rabbani., H. Sadeghi. 2013. Cloning and expression of functional retE in *Escherichia coli* Top10. *Avicenna journal of medical biotechnology*. 5(3): 168.

Kinoshita S., N. Wang., H. Inoue., K. Maeyama., K. J. Okamoto., A. Nagai., S. Watabe. 2011. Deep sequencing of ESTs from nacreous and prismatic layer producing tissues and a screen for novel shell formation-related genes in the pearl oyster. *PLoS One*. 6(6):21238.

Kobayashi I., T. Samata. 2006. Bivalve shell structure and organic matrix. *Materials Science and Engineering: C*. 26(4): 692-698.

Kocot K., F. Aguilera., C. McDougall., J. Jackson., M. Degnan. 2016. Sea shell diversity and rapidly evolving secretomes: insights into the evolution of biomineralization. *Frontiers in zoology*. 13(1):23.

Kong Y., G. Jing., Z. Yan., C. Li., N. Gong., F. Zhu., D. Li., C. Zhang., G. Zheng., H. Wang., L. Xie. 2009. Cloning and characterization of Prsilkin-39, a novel matrix protein serving a dual role in the prismatic layer formation from the oyster *Pinctada fucata*. *Journal of Biological Chemistry*. 284(16):10841-10854.

Kono M., N. Hayashi., T. Samata. 2000. Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*. *Biochemical and biophysical research communications*. 269(1):213-218.

Krebs J., C. Fierke. 1993. Determinants of catalytic activity and stability of carbonic anhydrase II as revealed by random mutagenesis. *Journal of biological chemistry*. 268(2):948-954.

Kröger N. 2009. The molecular basis of nacre formation. *Science*. 325(5946): 1351-1352.

Lao Y., X. Zhang., J. Zhou., W. Su., R. Chen., Y. Wang., F. Xu. 2007. Characterization and in vitro mineralization function of a soluble protein complex P60 from the nacre of *Pinctada fucata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 148(2): 201-208.

Li H., B. Zhang., S. Fan., B. Liu., J. Su., D. Yu. 2017. Identification and Differential Expression of Biomineralization Genes in the Mantle of Pearl Oyster *Pinctada fucata*. *Marine Biotechnology*. 1-11.

Lin Y., G. Jia., G. Xu., J. Su, L. Xie., X. Hu., R. Zhang. 2014. Cloning and characterization of the shell matrix protein Shematrixin in scallop *Chlamys farreri*. *Acta Biochim Biophys Sin.* 46(8):709-719.

Liang J., J. Xie., J. Gao., Q. Xu., Y. Yan., G. C. Jia., L. Xiang., L. Xie, Q. Zhang, Q. 2016. Identification and characterization of the lysine-rich matrix protein family in *Pinctada fucata*: indicative of roles in shell formation. *Marine Biotechnology.* 18(6):645-658.

Liu J., D. Yang., S. Liu., S. Li., G. Xu., G. Zheng., R. Zhang. 2015. Microarray: a global analysis of biomineralization-related gene expression profiles during larval development in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *BMC genomics.* 16(1):1.

Lowenstam H. A., S. Weiner. 1989. *On biomineralization.* Oxford University Press on Demand. 10-75

Luz G. M., J. Mano. 2009. Biomimetic design of materials and biomaterials inspired by the structure of nacre. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* 367(1893):1587-1605.

Ma J. Y., K. L. Wong., Z. Y. Xu., K. Y. Au., N. L. Lee, C. Su., P. C. Shaw. 2016. N16, a Nacreous Protein, Inhibits Osteoclast Differentiation and Enhances Osteogenesis. *Journal of natural products.* 1-6

Mackenzie C. L., G. A. Ormondroyd., S. F. Curling., R. J. Ball., N. M. Whiteley., S. K. Malham. 2014. Ocean warming, more than acidification, reduces shell strength in a commercial shellfish species during food limitation. *PLoS One.* 9(1):86764.

McDevitt E., A. Lambert. 2011. Molecular evolution and selection pressure in alpha-class carbonic anhydrase family members. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics.* 1814(12):1854-1861.

Mann S. 2001. *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry.* Oxford University Press on Demand. 17-38.

Mann K., A. J. Poustka., M. Mann. 2008. In-depth, high-accuracy proteomics of sea urchin tooth organic matrix. *A Proteome Sci.* 6:33

Mann K, A. J. Poustka., M. Mann. 2008. The sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) test and spine proteomes *B. Proteome Sci.* 6:22

Mann K., E. Edsinger-Gonzales., M. Mann. 2012. In-depth proteomic analysis of a mollusc shell: acid-soluble and acid-insoluble matrix of the limpet *Lottia gigantea*. *Proteome science*.10(1):1.

Marie B., F. Marin., A. Marie., L. Bédouet., L. Dubost., G. Alcaraz., G. Luquet. 2009. Evolution of nacre: biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus*. *ChemBioChem*. 10(9): 1495-1506.

Marie B., N. Le Roy., I. Zanella-Cléon., M. Becchi., F. Marin. 2011. Molecular evolution of mollusc shell proteins: insights from proteomic analysis of the edible mussel *Mytilus*. *Journal of molecular evolution*. 72(5-6):531-546.

Marie B., C. Joubert., A. Tayalé., I. Zanella-Cléon., C. Belliard., D. Piquemal., C. Montagnani. 2012. Different secretory repertoires control the biomineralization processes of prism and nacre deposition of the pearl oyster shell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(51):20986-20991.

Marin F., P. Corstjens., B. De Gaulejac., E. De Vrind-De Jong. P. Westbroek. 2000. Mucins and molluscan calcification Molecular characterization of mucoperlin, a novel mucin-like protein from the nacreous shell layer of the fan mussel *Pinna nobilis* (Bivalvia, Pteriomorpha). *Journal of Biological Chemistry*. 275(27):20667-20675.

Marin F., G. Luquet. 2004. Molluscan shell proteins. *Comptes Rendus Palevol*. 3(6):469-492.

Marin F., R. Amons., N. Guichard., M. Stigter., A. Hecker., G. Luquet., P. Layrolle., G. Alcaraz., C. Riondet., P. Westbroek. 2005. Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*. *Journal of Biological Chemistry*. 280(40):33895-33908.

Marin F, G. Luquet., B. Marie., D. Medakovic. 2008. Molluscan shell proteins: primary structure, origin, and evolution. *Current topics in developmental biology*. 80:209–276.

Marxen J. C., W. Becker. 1997. The organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 118(1):23-33.

Masaoka T., T. Samata., C. Nogawa., H. Baba., H. Aoki., T. Kotaki., T. Kobayashi. 2013. Shell matrix protein genes derived from donor expressed in pearl sac of Akoya pearl oysters (*Pinctada fucata*) under pearl culture. *Aquaculture*. 384:56-65.

Matranga V., R. Bonaventura., C. Costa., K. Karakostis., A. Pinsino., R. Russo., F. Zito. 2011. Echinoderms as blueprints for biocalcification: regulation of

skeletogenic genes and matrices. In *Molecular Biomineralization*. Springer Berlin Heidelberg. 225-248

Matsushiro A., T. Miyashita. 2004. Evolution of hard-tissue mineralization: comparison of the inner skeletal system and the outer shell system. *Journal of bone and mineral metabolism*. 22(3):163-169.

McWilliam H., W. Li., M. Uludag., S. Squizzato., Y. M. Park., N. Buso., A. Cowley., R. Lopez. 2013. Analysis tool web services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*. 41(1):597-600.

Mikulski R., B. S. Avvaru., C. Tu., N. Case., R. McKenna., D. Silverman. 2011. Kinetic and crystallographic studies of the role of tyrosine 7 in the active site of human carbonic anhydrase II. *Archives of biochemistry and biophysics*. 506(2): 181-187.

Mikulski R., J. F. Domsic., G. Ling., C. Tu., A. H. Robbins., D. Silverman., R. McKenna. 2011. Structure and catalysis by carbonic anhydrase II: role of active-site tryptophan 5. *Archives of biochemistry and biophysics*. 516(2): 97-102.

Miyamoto H., T. Miyashita., M. Okushima., S. Nakano., T. Morita., A. Matsushiro. 1996. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(18):9657-9660.

Miyamoto H., M. Yano., T. Miyashita. 2003. Similarities in the structure of nacrein, the shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod. *Journal of molluscan studies*. 69(1):87-89.

Miyamoto H., F. Miyoshi., J. Kohno. 2005. The carbonic anhydrase domain protein nacrein is expressed in the epithelial cells of the mantle and acts as a negative regulator in calcification in the mollusc *Pinctada fucata*. *Zoological science*. 22(3):311-315.

Miyamoto H., H. Endo., N. Hashimoto., K. Limura., Y. Isowa., S. Kinoshita., C. Nogawa. 2013. The diversity of shell matrix proteins: Genome-wide investigation of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Zoological science*. 30(10):801-816

Miyashita T., A. Takami., R. Takagi. 2012. Molecular cloning and characterization of the 5'-flanking regulatory region of the carbonic anhydrase nacrein gene of the pearl oyster *Pinctada fucata* and its expression. *Biochemical genetics*. 50(9-10):673-683.

Montagnani C., B. Marie., F. Marin., C. Belliard., F. Riquet., A. Tayalé., N. Cochennec-Laureau. 2011. Pmarg-Pearlin is a Matrix Protein Involved in Nacre

Framework Formation in the Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. *Chembiochem*. 12(13):2033-2043

Mouriès L.P., M. J. Almeida., C. Milet., S. Berland., E. Lopez. 2002. Bioactivity of nacre water-soluble organic matrix from the bivalve mollusk *Pinctada maxima* in three mammalian cell types: fibroblasts, bone marrow stromal cells and osteoblasts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 132(1):217-229.

Müller W. E. 2011. Molecular biomineralization: aquatic organisms forming extraordinary materials. Springer Science y Business Media. 45-93.

Nagasawa H. 2011. Structure and function of matrix proteins and peptides in the biomineral formation in Crustaceans. In *Molecular Biomineralization*. Springer Berlin Heidelberg. 315-329.

Naganuma T., W. Hoshino., Y. Shikanai., R. Sato., K. Liu., S. Sato., K. Muramoto., M. Osada., K. Yoshimi., T. Ogawa. 2014. Novel matrix proteins of *Pteria penguin* pearl oyster shell nacre homologous to the jacalin-related β -prism fold lectins. *PloS one*. 9(11):112326.

Nakayama S., M. Suzuki., H. Endo., K. Limura., S. Kinoshita., S. Watabe., T. Kogure. H. Nagasawa. 2013. Identification and characterization of a matrix protein (PPP - 10) in the periostracum of the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *FEBS open bio*. 3(1):421-427.

Ni M., B. Ratner. 2008. Differentiating calcium carbonate polymorphs by surface analysis techniques—an XPS and TOF - SIMS study. *Surface and Interface Analysis*. 40(10):1356-1361.

Norizuki M., T. Samata. 2008. Distribution and function of the nacrein-related proteins inferred from structural analysis. *Marine Biotechnology*. 10(3): 234-241.

Owczarzy R., V. Tataurov., Y. Wu., A. Manthey., A. McQuisten., G. Almabrazi., F. Pedersen., Y. Lin., J. Garretson., N. McEntaggart., C. Sailor. 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*. 36(2):163-169.

Parker C. E., V. Mocanu., M. Mocanu., N. Dicheva., R. Warren. 2010. Mass spectrometry for post-translational modifications. *Neuroproteomics*. PMID-21882444.

Pavicic-Hamer D., A. Baricevic., M. Gerdol., B. Hamer. 2016. *Mytilus galloprovincialis* carbonic anhydrase II: activity and cDNA sequence analysis. *Key Engineering Materials*. 672:137.

Perfetto R., S. Del Prete., D. Vullo., V. Carginale., G. Sansone., C. M. Barone. M. Rossi., A. Alasmay., M. Osman., Z. AlOthman., T. Supuran. 2017. Cloning, expression and purification of the α -carbonic anhydrase from the mantle of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 32(1): 1029-1035.

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

Ponce C. B., J. S. Evans. 2011. Polymorph crystal selection by n16, an intrinsically disordered nacre framework protein. *Crystal Growth and Design*. 11(10):4690-4696.

Pugalenthi G., G. Archunan., R. Sowdhamini. 2005. DIAL: a web-based server for the automatic identification of structural domains in proteins. *Nucleic acids research*. 33(2):130-132.

Rousseau M., E. Lopez., P. Stempflié., M. Brendlé., L. Franke., A. Guette., X. Bourrat. 2005. Multiscale structure of sheet nacre. *Biomaterials*. 26(31): 6254-6262.

Rosano G. L., E. A. Ceccarelli. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 5.

Samata T. 2004. Recent advances in studies on nacreous layer biomineralization molecular and cellular aspects. *Thalassas: An international Journal of Marine Sciences*. 20(1):25-44.

Seo J., K. J. Lee. 2004. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *Journal of biochemistry and molecular biology*. 37(1):35-44.

Shafiu Kamba A. y Zakaria, Z.A.B., 2014. Osteoblasts growth behaviour on bio-based calcium carbonate aragonite nanocrystal. *BioMed research international*.1-11

Silverman D.N., S. Lindskog. 1988. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: implications of a rate-limiting protolysis of water. *Accounts of chemical research*. 21(1):30-36.

Simkiss K., K. M. Wilbur. 2012. *Biomineralization*. Elsevier.38-40

Smith-Keune C., D. R. Jerry. 2009. High levels of intra-specific variation in the NG repeat region of the *Pinctada maxima* N66 organic matrix protein. *Aquaculture Research*. 40(9):1054-1063.

Son C., W. Song., D. S. Hwang., Y. K. Hong., J. Joo., Y. Choi. 2016. Recombinant production and biochemical characterization of a hypothetical acidic shell matrix protein in *Escherichia coli* for the preparation of protein-based CaCO₃ biominerals. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 33(8): 2406-2410.

Song X., X. Wang., L. Li., G. Zhang. 2014. Identification two novel nacrein-like proteins involved in the shell formation of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular biology reports*. 41(7):4273-4278.

Southgate P, J. Lucas. 2008. *The pearl oyster*. Elsevier.73-128.

Sudo S., T. Fujikawa., T. Nagakura., T. Ohkubo., K. Sakaguchi., M. Tanaka., T. Takahashi. 1997. Structures of mollusc shell framework proteins. *Nature*. 387(6633): 563.

Sun J., G. Xu., Z. Wang., Q. Li., Y. Cui., L. Xie., R. Zhang. 2015. The Effect of NF- κ B Signalling Pathway on Expression and Regulation of Nacrein in Pearl Oyster, *Pinctada fucata*. *PloS one*. 10(7):131711.

Suzuki M., K. Saruwatari., T. Kogure., Y. Yamamoto., T. Nishimura., T. Kato., H. Nagasawa. 2009. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science*. 325(5946):1388-1390.

Takakura D., M. Norizuki., F. Ishikawa., T. Samata. 2008. Isolation and characterization of the N-linked oligosaccharides in nacrein from *Pinctada fucata*. *Marine biotechnology*. 10(3):290-296.

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

Taraphder S., P. Halder., T. K. Paul., S. Khatua. 2017. Unfolding intermediates of the mutant His-107-Tyr of human carbonic anhydrase II. *Journal of Chemical Sciences*.129(7):1031-1044.

Traut T. 2014. *Multidomain Proteins*. John Wiley y Sons Ltd, Chichester.1-7.

Treccani L., K. Mann., F. Heinemann., M. Fritz. 2006. Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals. *Biophysical journal*. 91(7): 2601-2608.

Tu C., N. Silverman., C. Forsman., H. Jonsson., S. Lindskog. 1989. Role of histidine 64 in the catalytic mechanism of human carbonic anhydrase II studied with a site-specific mutant. *Biochemistry*. 28(19):7913-7918.

Turkoglu S., A. Maresca., M. Alper., F. Kockar., S. Işık., S. Sinan., C. T. Supuran. 2012. Mutation of active site residues Asn67 to Ile, Gln92 to Val and Leu204 to Ser in human carbonic anhydrase II: Influences on the catalytic activity and affinity for inhibitors. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*. 20(7): 2208-2213.

Vincent, J. F. 2002. Survival of the cheapest. *Materials today*. 5(12):28-41.

Vogel C., M. Bashton., D. Kerrison., C. Chothia., A. Teichmann. 2004. Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Current opinion in structural biology*. 14(2):208-216.

Xiang L., Su, J., Zheng, G., Liang, J., Zhang, G., Wang, H, y 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), e66564.

Xiang L., W. Kong., J. Su., J. Liang., G. Zhang., L. Xie., R. Zhang. 2014. Amorphous calcium carbonate precipitation by cellular biomineralization in mantle cell cultures of *Pinctada fucata*. *PloS one*. 9(11):113150.

Xie L. P., F. J. Zhu., Y. J. Zhou., C. Yang., R. Q. Zhang. 2011. Molecular approaches to understand biomineralization of shell nacreous layer. In *Molecular Biomineralization*. Springer Berlin Heidelberg.351-352.

Xu D., L. Jaroszewski., Z. Li., A. Godzik. 2013. FFAS-3D: improving fold recognition by including optimized structural features and template re-ranking. *Bioinformatics*. 30(5):660-667.

Yan Y., D. Yang., X. Yang., C. Liu., J. Xie., G. Zheng., L. Xie., R. Zhang. 2017. A Novel Matrix Protein, PfY2, Functions as a Crucial Macromolecule during Shell Formation. *Scientific reports*. 7(1): 6021.

Yang S., C. Wang., H. Chen., H. Hou., S. Hung., C. Mao. 2015. Tyrosine sulfation as a protein post-translational modification. *Molecules*. 20(2): 2138-2164.

Weber E., C. Guth., I. M. Weiss. 2012. GFP facilitates native purification of recombinant perlucin derivatives and delays the precipitation of calcium carbonate. *PloS one*. 7(10):46653.

Weiss I., F. Marin. 2008. The role of enzymes in biomineralization processes. *Met Ions Life Sci-Biomineralization: From Nature to Application*. West Sussex, UK: John Wiley y Sons. 71-126.

Wheeler D.L., T. Barrett., D. A. Benson., S. H. Bryant., K. Canese., V. Chetvernin., D. M. Church., M., DiCuccio., R. Edgar. S. Federhen., M. Feolo. 2007. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research*. 36(1):13-21.

Zhang C., R. Zhang. 2006. Matrix proteins in the outer shells of molluscs. *Marine Biotechnology*. 8(6):572-586.

Zheng J., B. S. Avvaru., C. Tu., R. McKenna., D. N. Silverman. 2008. Role of hydrophilic residues in proton transfer during catalysis by human carbonic anhydrase II. *Biochemistry*. 47(46):12028-12036.

Zhong X., J. F. Wright. 2013. Biological insights into therapeutic protein modifications throughout trafficking and their biopharmaceutical applications. *International journal of cell biology*. 1-7