

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

La biomineralización en seres vivos y sus aplicaciones al estudio del cascarón de huevo.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JUAN PABLO REYES GRAJEDA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ABEL MORENO CARCAMO



El presente trabajo fue realizado:

- Bajo la dirección de Dr. Abel Moreno en el departamento de bioquímica del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) contando con el apoyo de:

CONACyT

Proyecto 36155-E

DGAPA-UNAM

Proyecto IN204702

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Pablito, a Maru, a mis padres y a mi hermano Carlos sin cuyo apoyo y comprensión no hubiese llegado a término. LOS AMO.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (registro 163170).

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP-UNAM) por los apoyos otorgados.

En especial quiero agradecerle al Dr. Abel Moreno todo su apoyo y el haber compartido conmigo toda su experiencia de manera tan entusiasta y sin escatimar recursos.

Mi mas sincero agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial: Dr. Abel Moreno, Dra. Adela Rodríguez y Dra. Valeria Souza, que gracias a sus comentarios y sugerencias pudo realizarse este trabajo.

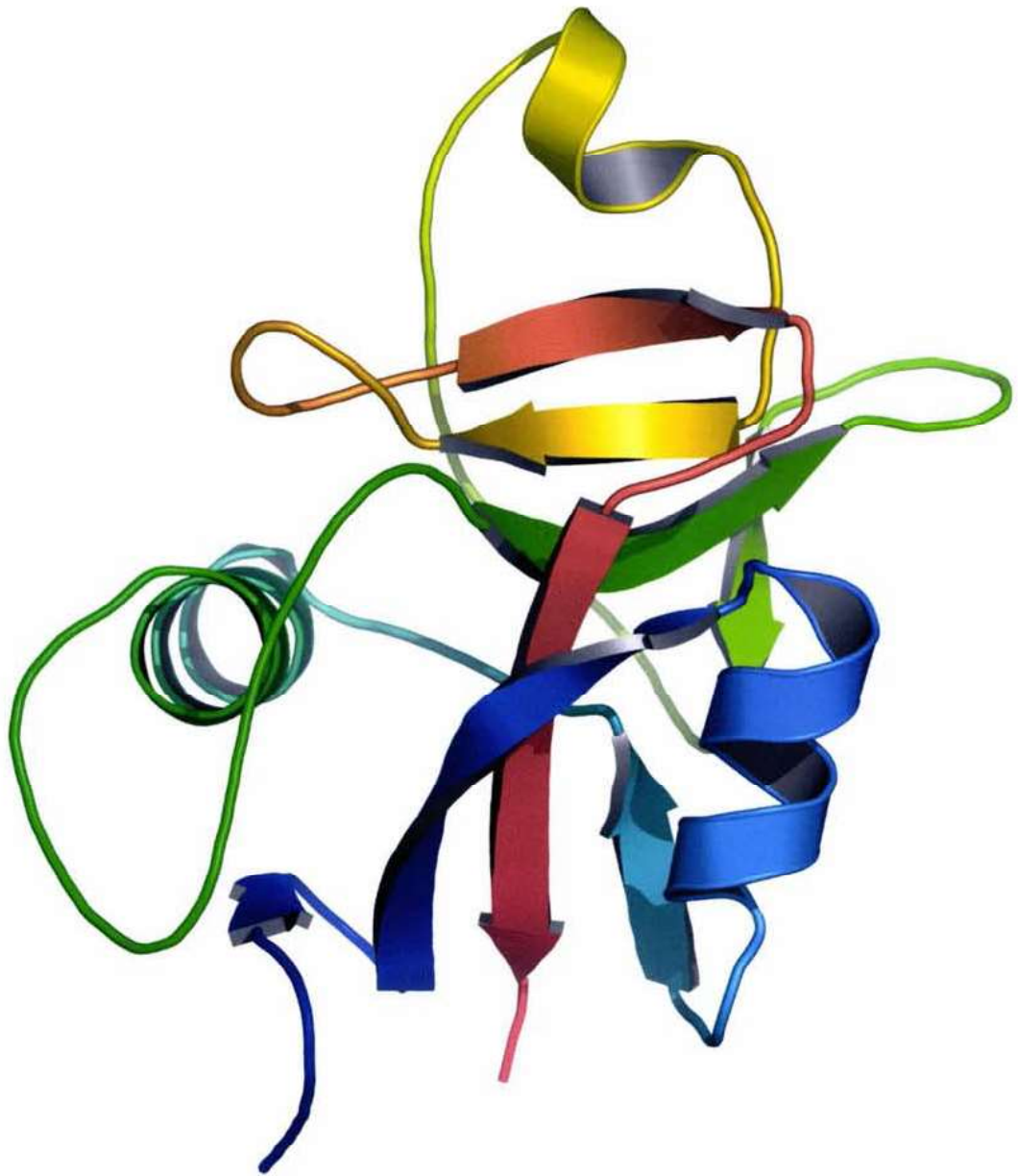
Agradezco enormemente al Dr. Antonio Romero del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC en Madrid, España, por haberme recibido en su laboratorio y guiarme en la resolución estructural de la OC-17.

Al Dr. Cristóbal Viedma de la Facultad de Ciencias Geológicas de la Universidad Complutense de Madrid por sus comentarios y sugerencias.

A los doctores, Mario Calcagno, Adela Rodríguez Romero, Eduardo Horjales, Lorenzo Segovia, Arturo Rojo, Luís Eguiarte y Enrique García por sus revisiones y comentarios, que enriquecieron este trabajo.

También quisiera agradecerle a todos aquellos que de alguna u otra manera hicieron posible que se llevase acabo esta tesis y a toda la gente del departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la U.N.A.M.

Un agradecimiento muy especial a David, César y Ángel, gracias por su amistad.



INDICE.

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. ANTECEDENTES	3
IV. OBJETIVOS	4
V. JUSTIFICACION	5
1. INTRODUCCIÓN.	
1.1 Biomineralización	6
1.2 Biomineralización en cascarones de huevo	8
1.3 Biomimética y aplicación al diseño de biomateriales	12
1.4 Caracterización bioquímica de los componentes proteicos	13
1.5 Cristalogénesis y cristalografía	15
1.6 Interacción proteína – cristal	20
2. SECCION EXPERIMENTAL	
2.1 Caracterización bioquímica	
2.1.1 Protocolo de aislamiento y purificación de la proteína ovocleidina-17	23
2.1.2 Pruebas de hemoaglutinación	24
2.1.3 Determinación de los estados de agregación de la OC-17 en función de la temperatura	24
2.2 Cristalogénesis y cristalografía	
2.2.1 Cristalización de la proteína ovocleidina-17	25
2.2.2 Captación de datos de difracción de rayos X (ánodo rotatorio)	25
2.2.3 Captación de datos de difracción de rayos X a alta resolución	26
2.2.4 Resolución estructural	26
2.3 Influencia de la OC-17 sobre la cristalización del carbonato de calcio	33

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Caracterización bioquímica	
3.1.1 Aislamiento y purificación de la ovocleidina-17	36
3.1.2 Pruebas de hemoaglutinación	38
3.1.3 Determinación de los estados de agregación de la ovocleidina-17 en función de la temperatura	38
3.2 Cristallogénesis y cristalografía	
3.2.1 Cristalización de la ovocleidina-17	40
3.2.2 Captación de datos de difracción de rayos X (ánodo rotatorio)	41
3.2.3 Captación de datos de difracción de rayos X a alta resolución	42
3.2.4 Resolución estructural de la OC-17	43
3.3 Influencia de la OC-17 sobre la cristalización del carbonato de calcio	54
3.4 Modelo preliminar de interacción OC17 – CaCO ₃	56
4. CONCLUSIONES GENERALES	62
5. REFERENCIAS	64
APÉNDICE A. Índice de figuras	70
APÉNDICE B. Composición de las 50 condiciones experimentales del Hampton Research Crystal Screen 1	72
APÉNDICE C. Protein Pept. Lett. 2002. 9, 253-257	73
APÉNDICE D. Manuscrito enviado para ser publicado en el Journal of Biological Chemistry	78

I. RESUMEN

Muchos de los biomateriales están compuestos de cristales inorgánicos y moléculas orgánicas como lípidos, polisacáridos y proteínas, los cuales son generalmente conocidos como matriz orgánica. Se ha postulado que esta matriz orgánica y principalmente las proteínas tienen cierta influencia sobre el control de la depositación mineral. De las proteínas encontradas en la sección intramineral del cascarón de huevo de *Gallus gallus*, la ovocleidina-17 (OC-17) es la más abundante en la fase inicial de calcificación y es sintetizada específicamente en el útero, por lo que podría jugar un papel importante en la cristalización del carbonato de calcio. En este trabajo se describe su purificación, cristalización y resolución estructural, así como la construcción de un modelo preliminar de interacción proteína-mineral. La purificación fue realizada mediante cromatografía de fase reversa (HPLC-RP). Los cristales de proteína se obtuvieron utilizando la técnica de difusión en fase vapor en gota sedente y fueron caracterizados en un equipo de ánodo rotatorio a una resolución de 3 Å a temperatura ambiente. Para la resolución estructural, la captación de datos de difracción de rayos X se llevó a cabo usando radiación de sincrotrón a la temperatura de 100 K y 1.5 Å de resolución. La resolución estructural se realizó mediante la técnica de reemplazo molecular (MR), usando como modelo la estructura tridimensional de la litostatina de cálculos pancreáticos humanos. El plegamiento de la OC-17 corresponde a un dominio globular similar al de lectinas tipo C (CTLD) con 3 hélices y 8 hebras β que forman dos láminas β antiparalelas. De las hélices, dos son del tipo α y una del tipo 3_{10} . Asimismo, en la estructura se encuentran tres puentes disulfuro formados entre la Cys5-Cys16, Cys33-Cys138, Cys113-Cys130. Durante la resolución estructural fue posible localizar uno de los aminoácidos con modificación postraducciona correspondiente a una fosforilación en la Ser61. *In vitro* la OC-17 produce modificaciones en el hábito cristalino y en el patrón de crecimiento mineral de la calcita, formando agregados cristalinos. Un modelo preliminar de interacción proteína-mineral muestra que los residuos Glu69 y Asp72 podrían interactuar con iones calcio cada dos celdas unitarias en el eje A y B de la calcita.

II. ABSTRACT

The protein ovocleidin-17 (OC-17) of the *Gallus gallus* eggshell is the most abundant in the initial phase of calcification and is synthesized specifically in the uterus. In this work its purification, crystallization and structural resolution is described, as well as the construction of a preliminary model of protein-mineral interaction. The purification was made by means of reversed phase chromatography (HPLC-RP). Crystals suitable for X-ray analysis were obtained by the sitting drop vapor diffusion method. In the preliminary X-ray analysis the crystals obtained diffracted up to 3.0 Å using a rotating anode generator at room temperature. The X-ray data collection for the structural resolution was done using synchrotron radiation at 100 K obtaining a maximum resolution limit of 1.5 Å. The 3D structure was solved by molecular replacement (MR) using the 3D structure of the lithostathine of human pancreatic stones as a reference structure. The OC-17 folding belongs to the C-type lectin-like domain (CTLD) with three helices and eight β -strands, the later being clustered in two oppositely oriented antiparallel β -sheets. The two major helices are α type and the third is a short helix type 3_{10} . The structure is stabilized by three disulphide bridges between Cys5-Cys16, Cys33-Cys138 and Cys113-Cys130. One phosphoserine SEP61 assigned during the 3D solving was modeled. *In vitro* the OC-17 produce modifications in the crystalline habit and pattern of crystal growth of calcium carbonate (CaCO_3) inducing the formation of crystal aggregates. A preliminary model of protein-mineral interaction showed that the residues Glu69 and Asp72 may have a specific interaction with calcium ions every two unit cells along the A and B axis. These evidences demonstrate that the OC-17 plays an important role in the biomineralization of the eggshell.

I. ANTECEDENTES

El primer trabajo formal de biomineralización fue el realizado por Lowenstam en 1962 (Weiner & Addadi, 2002), en el que se describe la biomineralización de magnetita en dientes de quitones (moluscos), que se encuentran dispuestos sobre una estructura llamada rádula. Hasta entonces, se pensaba que la magnetita sólo podía formarse a altas temperaturas y presiones. Su descubrimiento enfocó la atención de los investigadores de diferentes áreas a la capacidad de los organismos vivos de formar inesperadas fases minerales, siendo sus estudios un parteaguas en el campo entonces conocido como calcificación. Desde entonces y hasta ahora se han descrito más de 70 diferentes tipos de minerales en seres vivos (Weiner & Addadi, 2002). Sin embargo, ningún componente macromolecular específico y directamente relacionado con uno de estos procesos había podido ser caracterizado a niveles atómicos, ni existe un modelo de interacción. De igual manera, aunque las primeras caracterizaciones morfológicas para el caso de cascarones de huevo de aves fueron realizadas desde hace más de un siglo por von Nathusius (Tyler, 1964), éstas no tomaban en cuenta componentes a nivel molecular.

Con la finalidad de dilucidar qué componentes podrían estar directamente relacionados con el control de la formación de los cascarones de huevo en aves, usando como un primer modelo de aproximación los huevos de *Gallus gallus*, nos propusimos los siguientes objetivos:

III. OBJETIVOS

General

Caracterización de algunos de los componentes macromoleculares involucrados en el proceso de biomineralización en cascarón de huevo de *Gallus gallus*.

Particulares

- Aislamiento y purificación de la proteína ovocleidina-17 de la sección intramineral del cascarón de huevo de *Gallus gallus*.
- Caracterización bioquímica de la proteína ovocleidina-17.
- Cristalización, estudios de difracción de rayos X y resolución estructural de la proteína ovocleidina-17.
- Construcción de un modelo de interacción proteína-mineral.

V. JUSTIFICACIÓN

La síntesis de nuevos materiales para el desarrollo de nuevas tecnologías, y más específicamente aquellos con una aplicación potencial en el área biomédica, ha tomado un gran auge de unos años a la fecha. Sin embargo, el desarrollo de materiales híbridos orgánico – inorgánico emulando a los de origen biogénico, es un área emergente en la que los componentes macromoleculares involucrados en su síntesis han sido poco estudiados en detalle.

Uno de los modelos de biomineralización más impresionantes es el cascarón de huevo de aves, llegándose a formar en el caso de la gallina común (*Gallus gallus*) hasta 5 gramos de carbonato de calcio en menos de 24 horas. La caracterización de los componentes biomacromoleculares involucrados en este proceso es de vital importancia, pudiéndose extrapolar a futuro a procesos de biomineralización patológicos como es la formación de cálculos pancreáticos y renales.

La ovocleidina-17 que es la proteína intrinseca más abundante en la fase inicial de calcificación (Gautron et al., 1997). Es sintetizada específicamente en el útero y está presente en la zona mamilar (Hincke et al., 1995), resulta ser un blanco idóneo de caracterización para dilucidar su papel en el proceso de biomineralización del cascarón de huevo. Asimismo, no existe hasta hoy en día un modelo tridimensional de ninguno de los componentes macromoleculares directamente involucrado en un proceso de biomineralización. Debido a lo anterior, las investigaciones relacionadas con los procesos de biomineralización y las interacciones de sus diferentes componentes tienen grandes aplicaciones a futuro, con la finalidad de poder desarrollar “materiales a la medida”, basándose en los de origen biogénico.

1. Introducción

1.1 Biomineralización

La formación controlada de materiales inorgánicos en los organismos resulta en la biomineralización de fases amorfas y/o cristalinas con una ultraestructura, forma y simetría muy peculiar. Debido a que estos sólidos inorgánicos se encuentran ampliamente conservados a través de la evolución han sido sujetos a extensas investigaciones en el campo de la sistemática biológica y la paleontología, como es el caso de los cocolitofóridos (Young et al., 1999). En contraste, los procesos químicos y bioquímicos de la biomineralización han comenzado a estudiarse hasta hace sólo algunos años. Estos estudios nos llevan a una nueva visión en la química bioinorgánica y proveen nuevos conceptos en la ingeniería de cristales y la ciencia de materiales.

Hoy en día se conocen un amplio número de biominerales. Éstos se encuentran en organismos unicelulares y multicelulares. La mayoría están formados por cationes divalentes de metales alcalinotérreos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) unidos a aniones como los carbonatos, oxalatos, sulfatos, fosfatos e hidróxidos / óxidos. Menos comunes son los metales como el Mn, Au, Ag, Pt, Cu, Zn, Cd y Pb que se depositan en las bacterias generalmente como sulfitos metálicos.

En la biomineralización, las formas cristalinas generalmente están relacionadas con una función biológica específica, como el soporte estructural (huesos y conchas), fuerza mecánica (dientes), almacenaje de hierro (ferritina) y sensores magnéticos y de gravedad, mientras que otros minerales generados de forma y tamaño heterogéneo pueden tener un gran valor al incrementar la densidad celular y en la defensa en contra de depredadores (Mann, 1989 ; Chasteen & Harrison, 1999; Wilt, 1999).

Hasta hoy dos procesos de biomineralización han sido descritos: uno en el cual la formación es inducida por el organismo, como resultado de la interacción entre metabolitos biológicos y los cationes presentes en el medio ambiente externo (llamada mineralización "**inducida biológicamente**"), y el otro es un proceso en que los minerales crecen en un esqueleto estructural orgánico preformado (llamada mineralización mediada

por “**matriz orgánica**”), en donde la matriz orgánica está formada principalmente de lípidos, polisacáridos y proteínas (Sarashina & Endo, 1998).

En el proceso de mineralización “inducida biológicamente”, la precipitación mineral adopta hábitos cristalinos similares a los formados por procesos inorgánicos, y la orientación de los cristales, en el caso de los agregados, es esencialmente al azar. En contraste, en el proceso de mineralización mediado por “matriz orgánica” los minerales adoptan un hábito cristalino único, mientras que su tamaño y distribución tienen una orientación bien definida (Lowenstam, 1981).

Asimismo, en casi todos los organismos los cristales están siempre asociados con una membrana o con una matriz orgánica (Watabe, 1974). Esta matriz tiene influencia sobre la formación, morfología y cristalografía de la fase inorgánica, sirviendo como sitio de nucleación para la formación de los cristales o siendo una limitante, ya que puede determinar la orientación y el tamaño de los cristales (Sarikaya, 1994), como es en el caso de las conchas de moluscos, los huesos de los vertebrados, etc.

Esta influencia puede estudiarse basándose en los diferentes tipos de complementariedades moleculares descritas por Mann (1989), entre las que destacan la distribución espacial de cargas y el sinergismo entre los diferentes componentes.

Biomíneralización mediada por matriz orgánica

La matriz orgánica es específicamente sintetizada bajo control genético antes, y algunas veces durante, el proceso de biomíneralización. En muchos casos la matriz es un armazón polimérico que consiste de un complejo agrupamiento de macromoléculas como proteínas y polisacáridos.

Existen varias funciones asociadas con la matriz orgánica, entre las que destacan:

1. La modificación de las propiedades físicas, como fuerza y dureza de los biomateriales.
2. La estabilización de las superficies minerales, protegiéndolas de la disolución o transformación de fase.
3. El control en la localización y organización de los sitios de nucleación, así como de la orientación cristalográfica y la estructura de la fase mineral (Mann, 2001).

Macromoléculas y matriz orgánica

Las matrices orgánicas son producidas como armazones insolubles constituidos por macromoléculas predominantemente hidrofóbicas, sobre las cuales se encuentran sujetas macromoléculas hidrofílicas. Estas últimas pueden presentar una superficie de nucleación activa hacia la solución externa. En general, se ha postulado que las proteínas que forman la fracción soluble son glicoproteínas ácidas. El hecho de que se les haya denominado macromoléculas "ácidas" es debido a que generalmente sólo se han realizado estudios de contenido de aminoácidos, en donde resultaban ser predominantes los ácidos glutámico y aspártico, así como aminoácidos modificados covalentemente como las serinas y treoninas fosforiladas. En general, este modelo de dos componentes (fracción soluble e insoluble) ha sido postulado basándose en datos empíricos obtenidos de la extracción de proteínas de tejidos mineralizados como huesos y conchas. Así, las macromoléculas de este armazón (colágenas, quitina, celulosa) se encuentran asociadas con la fracción insoluble formada de proteínas hidrofóbicas y polisacáridos, las cuales representan el componente biomecánico y estructural de la matriz orgánica, mientras que las macromoléculas solubles en el proceso experimental de desmineralización podrían ser el componente funcional encargado de controlar la nucleación (Mann, 2001).

1.2 Biomineralización en cascarones de huevo

Los cascarones son un compartimiento para el desarrollo de embriones de un gran número de especies, y en este sentido constituyen una amplia estrategia evolutiva a través de la filogenia. Éstos no sólo proveen de protección al embrión, sino que también regulan el agua, gas e intercambio iónico y en algunos huevos calcáreos, como en las aves y algunos reptiles, proveen una fuente de calcio para la formación del esqueleto del embrión (Arias et al., 1993). Sin embargo, no todos los huevos se encuentran calcificados. En general se han descrito tres tipos diferentes de cascarones con base en la extensión mineralizada que presentan:

I. Cascarones parecidos a membranas, suaves o en parches: Estos cascarones tienen pequeñas cantidades de calcita granular y son característicos de serpientes, monotremas y muchas lagartijas.

II. Cascarones con un estrato calcáreo flexible: estos cascarones los presentan las tortugas actuales, las tuataras y algunos quelonios fósiles. En estos cascarones existe una clara demarcación entre las membranas orgánicas y la fase cristalina formada en la parte externa.

III. Cascarones con un estrato calcáreo rígido: este tipo de cascarón lo presentan todos los cocodrilos, todas las aves, algunas tortugas y geckos y todos los cascarones identificados de dinosaurios.

Organización estructural y composición de los cascarones de huevo de aves

Las primeras caracterizaciones estructurales de los cascarones de aves fueron hechas a mediados del siglo XIX. Los primeros estudios fueron realizados por Wilhelm von Nathusius quien mostró que los cascarones tienen una estructura compleja, altamente ordenada, compuesta de múltiples membranas y matrices calcificadas (Arias et al., 1993).

La fracción inorgánica

El carbonato de calcio existe de tres formas diferentes en la naturaleza: calcita, aragonita y vaterita. Bajo condiciones normales la calcita es la fase termodinámicamente más estable y es la que se encuentra en cascarones de aves y muchos reptiles. Sin embargo, son muchos los factores que determinan la fase y forma del cristal, entre ellos están la presión, temperatura y velocidad de mineralización.

En general, la porción mineralizada de los cascarones de huevo está dividida en cutícula, palizada externa y botones mamilares internos (figura 1).

Estas zonas han sido identificadas en diferentes especies de aves mostrando básicamente la misma arquitectura (Panheleux et al., 1999b).

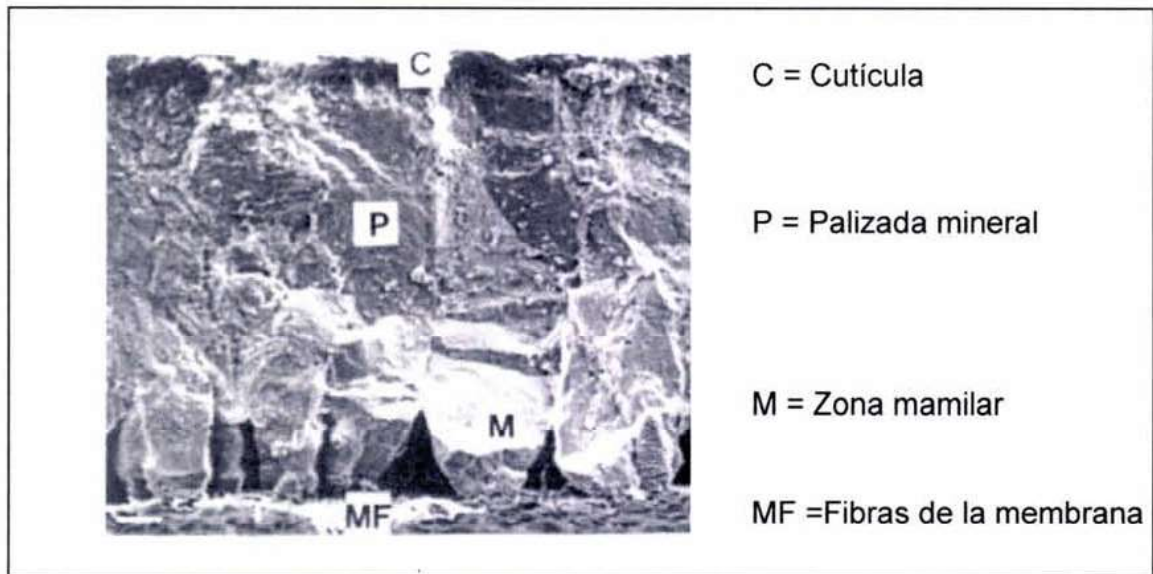


Figura 1. Micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) en vista transversal de cascarón de huevo de *Gallus gallus* (Panheleux, 1999b).

En *Gallus gallus*, la cutícula está constituida de 85-87% de proteínas, 3.5-4.4% de carbohidratos y 2.5-3.5% de lípidos y se ha postulado que sus componentes se encuentran directamente involucrados en el cese del crecimiento de la palizada mineral.

La palizada mineral por su parte tiene un espesor de aproximadamente 200 micras a partir de la base de los botones mamilares y hasta la superficie del cascarón, que en su mayor parte está formado de carbonato de calcio, aunque se han encontrado pequeñas cantidades de fósforo y magnesio (Solomon, 1999).

En la zona mamilar se encuentra una serie de proteínas específicas del cascarón de huevo, las cuales podrían ser las responsables del control de la nucleación del carbonato de calcio sobre la matriz fibrosa de las membranas del cascarón, en las cuales se encuentran colágenas de tipo I, V y X (Fernández et al., 1997).

La fracción orgánica

Recientemente ha resurgido el interés en los componentes orgánicos de los cascarones de huevo, así como su interacción con cristales de calcita.

Estudios bioquímicos han demostrado que la fracción orgánica del cascarón, es decir aquella encontrada en la zona mamilar y de la palizada, representa aproximadamente el 2% del peso total de éste, la cual está formada predominantemente por proteínas (70%) y polisacáridos (11%).

Se han propuesto diferentes papeles para las proteínas que constituyen la matriz orgánica en los biominerales. El material orgánico puede modificar la cristalización de la fase mineral, ya sea al presentar sitios de nucleación (epitaxia o nucleación heterogénea) o al inhibir el crecimiento de ciertos planos cristalográficos (Panheleux et al., 1999a).

Las técnicas electroforéticas han sido utilizadas para determinar las proteínas presentes en el líquido uterino y en los extractos de cascarón de *Gallus gallus*, así como de otras especies (Panheleux et al, 1999b). Un grupo de proteínas corresponde a las proteínas del huevo, lisozima (Hincke et al., 2000) (14.4 kDa), ovotransferrina (78 kDa) y ovoalbumina (Hincke, 1995) (43 kDa). Otro más corresponde a aquellas asociadas al hueso como la osteopontina y la sialoproteína (Solomon, 1999). Finalmente un tercer grupo es específico del útero y del cascarón de huevo como las ovocleidinas y las ovocalixinas.

Los proteoglicanos también están considerados como una parte esencial en la biomineralización de cascarones por su capacidad de unión a calcio. En general los encontrados en cascarones de huevo son el queratán sulfato y el dermatán sulfato (Solomon, 1999; Fernández et al., 1997).

Ovocleidinas 17 y 23

La ovocleidina es una proteína que se encuentra en la fracción orgánica soluble del cascarón de huevo y se encuentra en dos formas diferentes. La forma predominante es una fosfoproteína con dos serinas fosforiladas (OC-17), mientras que la que se encuentra en una menor proporción es una glicoproteína con secuencia idéntica, pero que sólo tiene una serina fosforilada (OC-23). El sitio de glicosilación es la Asn59. Ésta es la única asparagina en la secuencia de aminoácidos y se encuentra en la secuencia consenso de N-glicosilación N-A-S. La Ser61, que es parte de este sitio, está fosforilada en la OC-17, pero no en la OC-23, indicando que las dos modificaciones son mutuamente excluyentes, siendo el primer ejemplo de una glicosilación/fosforilación que ocurre en un sitio de N-glicosilación (Mann & Siedler, 1999; Mann, 1999).

La ovocleidina 17 es producida por las células mucosas del útero y se ha demostrado por métodos inmunquímicos que está localizada en la zona calcificada, tanto en la zona mamilar como en la palizada mineral (Hincke et al., 1995). De igual manera, se ha demostrado su presencia en el líquido uterino producido durante la fase inicial de la mineralización (Gautron et al., 1997). Esta proteína consiste en 142 aminoácidos, incluyendo las dos serinas fosforiladas. La secuencia de aminoácidos parece formar un dominio de lectina tipo-C (Mann & Siedler, 1999). Este dominio fue caracterizado en primera instancia en algunas lectinas de origen animal, donde funciona como un dominio de reconocimiento a carbohidratos dependiente de calcio. Se han encontrado secuencias relacionadas en proteínas multidominios incluyendo las lectinas asociadas a membranas, las selectinas y las colectinas, que se encuentran en fluidos extracelulares y algunos proteoglicanos. Entre otras proteínas que incluyen solamente el dominio de lectina tipo C se encuentra la proteína de cálculos pancreáticos (litostatina), proteínas asociadas a pancreatitis, algunas lectinas de invertebrados, proteínas anticoagulantes de veneno de serpiente (Mizuno et al., 1999) y proteínas anticongelantes de peces teleósteos (Mann & Siedler, 1999).

1.3 Biomimética y aplicación al diseño de biomateriales

La biomimética es un campo interdisciplinario nuevo en el que participa la ingeniería, la biología y la ciencia de materiales, en donde esta última aporta las bases para el desarrollo de nuevas tecnologías. Esta ciencia involucra investigaciones tanto de la estructura como de la función de compuestos biológicos para diseñar y sintetizar nuevos y mejores materiales.

En los sistemas biológicos los organismos producen materiales suaves y duros que tienen extraordinarias propiedades, las cuales podrían ser aplicadas al diseño de nuevos materiales. Estos compuestos son complejos en términos de composición y microestructura, pero son altamente ordenados, conteniendo componentes tanto orgánicos como inorgánicos en una estrecha asociación. Por estas razones se ha comenzado a estudiar para desarrollar materiales híbridos orgánico-inorgánicos (Mark & Lee, 1995) y sus diferentes aplicaciones en nanotecnología (Hull, 1981; Chow &

Gonsalves, 1996), debido a que presentan interesantes propiedades ópticas, magnéticas, electrónicas, piezoeléctricas y mecánicas. Es importante enfatizar que muchos biomateriales son sintetizados a temperatura y presión ambiental con refuerzos estructurales completamente controlados por los organismos (Sarikaya, 1994). Así, aunque la microestructura única y las propiedades de los materiales biológicos no son bien conocidos aún, éstos pueden ser una fuente de inspiración en el desarrollo de futuros materiales, emulando a los de origen biológico, dando pauta a una siguiente generación de materiales creados *ad hoc* para el desarrollo de nuevas tecnologías.

El estudio de los procesos de biomineralización ofrece un valioso panorama en el área de química de materiales, así como en el de las interfases orgánico-inorgánicas. El caso del cascarón de huevo es uno de los que se pueden explotar con menos dificultades debido a que no existe un componente celular intrínseco al sistema, contrastando con otros como los huesos de los vertebrados, donde diferentes tipos celulares se encuentran en una asociación directa con el biomaterial (Arias et al, 1993).

1.4 Caracterización bioquímica de los componentes proteicos

La determinación de la estructura tridimensional de una proteína mediante difracción de rayos X requiere de una cantidad relativamente grande de proteína y un alto grado de pureza. Esto es debido principalmente al hecho de que se utiliza mucha proteína en los primeros ensayos de cristalización. Además de la cantidad, la calidad de la muestra es de vital importancia. Para obtener un resultado positivo, además de que la muestra tiene que estar libre de contaminantes, las moléculas de proteína tienen que ser química y estructuralmente homogéneas, manteniendo la misma distribución de cargas superficiales, el cual es uno de los factores que intervienen en el proceso de empaquetamiento molecular dentro del cristal.

Aunque muchas proteínas han sido cristalizadas a partir de muestras relativamente impuras, en general la calidad de los cristales resultantes (en términos del límite de resolución) incrementa con la pureza de la muestra. Debido a la importancia de la pureza de la muestra en los experimentos de cristalización, el proceso de purificación es crucial, debiéndose tener el mayor cuidado posible en los diferentes pasos para obtener la mayor

homogeneidad posible y mantener a la proteína en su estado activo. En general, los procedimientos usados en la purificación de proteínas están basados en la separación de los diferentes componentes en función de sus propiedades fisicoquímicas, como son el peso molecular, la carga, la hidrofobicidad, la presencia de cofactores y los sitios de unión con alta especificidad por algún sustrato. Para el caso de las proteínas en que no se conoce nada acerca de estas propiedades, el proceso de purificación es más empírico. Uno de los principales problemas encontrados es la presencia de isoformas, lo cual produce heterogeneidad en la muestra. Su presencia puede ser además la responsable del crecimiento de monocristales que difractan poco los rayos X, debido a que no existe un empaquetamiento sistemático en la estructura del cristal. Hoy en día el uso de técnicas de ADN recombinante puede servir para eliminar el problema de purificación de isoformas, facilitando la obtención de proteínas en la cantidad y pureza necesarias para los experimentos de cristalización (Souza et al., 2000).

Las técnicas más comúnmente utilizadas para la determinación de la pureza de una muestra son las técnicas electroforéticas, existiendo diferentes variantes como la electroforesis nativa, la desnaturizante, el enfoque isoeléctrico, las técnicas bidimensionales, etc. De éstas, la electroforesis desnaturizante o SDS-PAGE aporta información sobre el grado de pureza química y un estimado del peso molecular de las diferentes subunidades.

Uno de los parámetros más importantes involucrados en la cristalización de proteínas es la monodispersidad de la muestra (esto es, que existan en solución partículas de un tamaño uniforme), la cual puede ser medida mediante técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS). En esta técnica, un equipo de DLS analiza las fluctuaciones en la intensidad de la luz dispersada por la proteína en solución en función del tiempo. El equipo calcula el coeficiente de difusión translacional (DT) de las moléculas en solución a partir de la autocorrelación de los datos de intensidad de luz dispersada. El radio hidrodinámico (Rh) de las moléculas es deducido a partir del DT, usando la ecuación de Stokes-Einstein, así el equipo de DLS calcula el peso molecular estimado a partir del Rh, utilizando una curva standard de MW vs Rh para proteínas globulares.

1.5 Cristalogénesis y cristalografía

Cristalización y métodos de crecimiento cristalino

Hoy en día existen numerosas técnicas y aproximaciones fisicoquímicas que nos dan información acerca de la estructura molecular de las diferentes especies minerales, así como de las diferentes moléculas y macromoléculas biológicas. Algunos de estos métodos, como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN), están ayudando cada vez más a conocer las diferentes estructuras moleculares, particularmente las de aquellas con una masa molecular baja. Existe sin embargo sólo una técnica que ayuda a una descripción más detallada y precisa en términos matemáticos sin la limitante del peso molecular para la determinación estructural, la difracción de rayos X, la cual ha sido utilizada para la determinación estructural de especies minerales, proteínas, ácidos nucleicos, etc. (McPherson, 1990).

El paso fundamental para la aplicación de las diferentes metodologías en la resolución estructural es obtener los cristales de la proteína de interés, que tienen que ser de la mejor calidad y tamaño para un análisis de difracción de rayos X de alta resolución (Souza et al., 2000). La estrategia empleada para realizar la cristalización consiste generalmente en guiar muy lentamente al sistema a un estado de solubilidad reducida, modificando las propiedades del disolvente, acompañado del incremento en la concentración del agente precipitante o alterando algunas condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura. (McPherson, 1990).

Crecimiento de cristales a partir de soluciones sobresaturadas

En una solución sobresaturada, existen dos estados en equilibrio, una fase sólida y una que consiste de moléculas libres en solución. En la saturación no existe ningún aumento neto en la proporción de la fase sólida que pueda acumularse para la formación de un núcleo cristalino. Así, los cristales no nuclean a partir de una solución saturada. El sistema tiene que estar fuera del equilibrio, y más específicamente, en un estado de sobresaturación.

Cuando el objetivo es crecer cristales de cualquier compuesto, una solución de esta molécula tiene que ser llevada a un estado de sobresaturación y regresada al equilibrio por medio de fuerzas de exclusión de moléculas de soluto hacia el estado sólido, el cristal. Sobre un diagrama de fases (Ostwald-Miers) en donde la concentración en el equilibrio (solubilidad) se grafica contra la concentración de agente precipitante (figura 2), la línea indicativa de la saturación marca también las necesidades energéticas para dar paso a una segunda fase, la formación del núcleo de un cristal o un agregado. Cuando un núcleo estable ha sido formado en una solución sobresaturada, éste puede seguir creciendo hasta que el sistema llegue al equilibrio, pero mientras se mantenga lejos del equilibrio y exista algún grado de sobresaturación, los cristales seguirán creciendo o continuará la precipitación amorfa (McPherson, 1990).

En la teoría clásica de crecimiento de cristales, la región de sobresaturación que se encuentra exactamente sobre la curva de saturación está dividida en dos zonas, la región metaestable y la región lábil (figura 2) (Ducruix, 1992).

Por definición, los núcleos cristalinos no pueden formarse en la región metaestable, justo arriba de la curva de saturación. Sin embargo, un núcleo puede estar presente en la región metaestable, en la que puede mantenerse para crecer. Por el contrario, es en la región lábil en donde los núcleos pueden formarse espontáneamente, por lo que siendo estables en esta región, las moléculas se acumulan y se agota la fase líquida hasta que el sistema reingresa a la región metaestable, llevándolo al estado de saturación.

Así, en cristales crecidos para análisis de rayos X, se intenta ya sea por deshidratación o por la alteración de condiciones físicas, transportar a la solución a la región lábil y al estado de sobresaturación, acercándose lo más posible al estado metaestable (Ducruix, 1992).

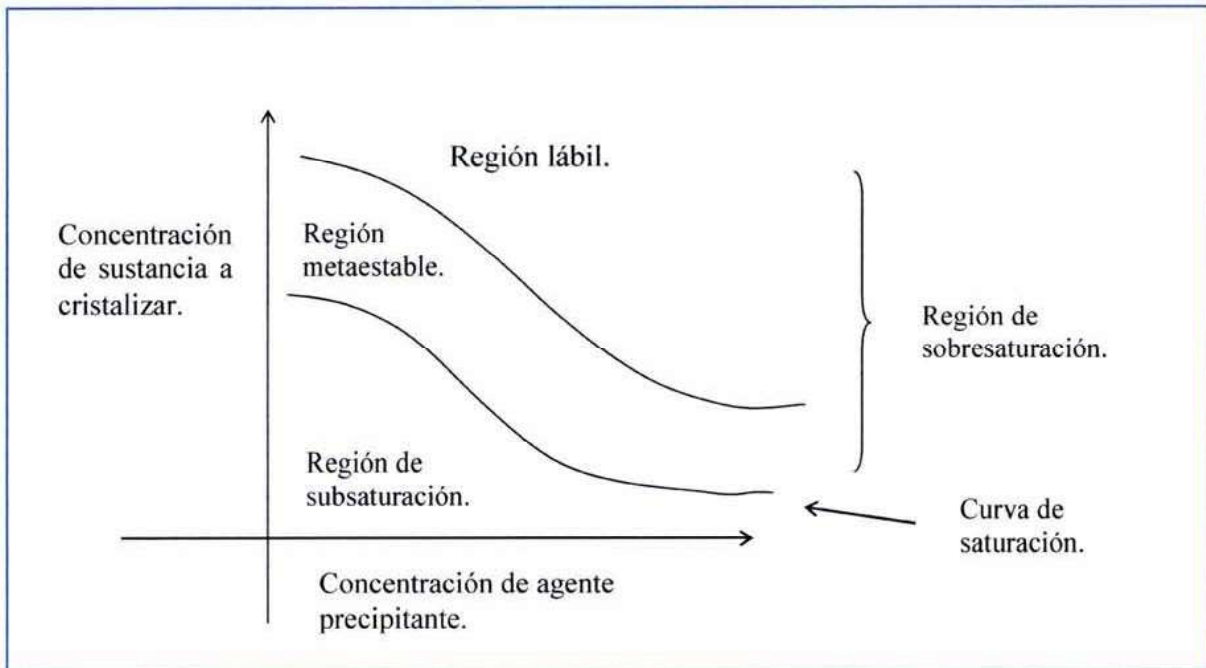


Figura 2. Diagrama de fases (Ostwald-Miers) donde se muestra la solubilidad en función de la concentración de agente precipitante (Ducruix, 1992).

Caracterización del cristal

Cuando se ha obtenido un cristal del tamaño suficiente (aproximadamente 0.2 x 0.2 x 0.2 mm) éste es caracterizado para verificar su calidad de difracción, dimensiones de la celda unitaria, red cristalina, grupo espacial (una descripción de la simetría del cristal) y el número de moléculas de proteína por celda unitaria. Todos estos parámetros pueden ser determinados directa o indirectamente a partir de las imágenes de difracción del cristal. El número de moléculas de proteína por celda unitaria puede ser estimado por el método descrito por Matthews en 1968, al calcular la relación entre el volumen de la celda unitaria y el peso molecular de la proteína, el cual es llamado coeficiente de Matthews.

El conocer el grupo espacial y el número de moléculas en la celda unitaria permite la determinación del número de moléculas en la unidad asimétrica, la cual es la estructura mínima que debe resolverse para determinar la estructura tridimensional de la proteína, y es ésta precisamente la que se deposita en el Protein Data Bank (PDB).

Reducción de datos

Una vez que se tienen los datos de difracción, las reflexiones son indizadas (sus índices de Miller determinados) y sus intensidades normalizadas. El resultado es una lista con las reflexiones (hkl), la intensidad de las reflexiones y su error. Una evaluación de la calidad de los datos procesados puede ser realizada usando diferentes criterios. Uno de estos parámetros es el llamado R_{merge} que mide la concordancia entre reflexiones equivalentes, las cuales han sido medidas más de una vez durante la captación de datos o son reflexiones relacionadas por simetría. En ambos casos las intensidades de las reflexiones pueden ser idénticas y la desviación del valor promedio (valor combinado) puede ser usada para estimar la calidad de los datos, por lo que un buen valor de R_{merge} dependerá de la redundancia de los datos (cuantas veces ha sido medida una misma reflexión). En general, se considera bueno un valor de R_{merge} menor al 10%. Otro parámetro usado en la evaluación de los datos experimentales es el denominado integridad (completeness), que es la relación entre el número de reflexiones observadas y aquellas teóricamente medibles. Por lo que la integridad y la redundancia deben de ser lo más grande posible, mientras que el R_{merge} deberá ser lo más pequeño posible.

Asimismo, el valor de R_{sym} , el cual provee una estimación de la correlación de los datos a una simetría dada, es un parámetro usado para la determinación del grupo espacial, considerándose buenos los valores menores a 0.05.

Las restricciones especiales para cada grupo espacial, las cuales se encuentran en las Tablas Internacionales de Cristalografía (Hahn, 2002), aunado a las ausencias sistemáticas nos ayudan a la determinación del grupo espacial.

Resolución estructural

La determinación de la estructura tridimensional de una proteína por difracción de rayos X implica que se deben encontrar las fases para todas las reflexiones generadas por la incidencia de los rayos X sobre el cristal (éste es llamado el problema de las fases en cristalografía). En cristalografía de proteínas existen tres métodos básicos para resolver el problema de las fases y cada uno es utilizado en función del problema a resolver: Reemplazo Isomórfico Múltiple (MIR), Dispersión Anómala Múltiple (MAD) y Reemplazo Molecular (MR).

Construcción de los mapas de densidad electrónica

Una vez determinadas las fases mediante alguno de los métodos anteriores, puede calcularse un mapa de densidad electrónica de la unidad asimétrica, lo cual se realiza al calcular la transformada de Fourier de los factores de estructura. El modelo se construye sobre los mapas de densidad electrónica, aunque algunas veces existen interrupciones de la densidad, lo cual es común en los extremos amino y carboxilo terminales causado por la flexibilidad de la estructura en estas regiones. En general, dos tipos de mapas son construidos, un mapa de diferencias $F_o - F_c$ y un mapa $2F_o - F_c$.

Afinamiento del modelo

El modelo inicial contiene errores que deben ser minimizados afinando el modelo. Éste es un proceso de ajuste de las coordenadas atómicas del modelo para minimizar las diferencias entre la amplitud de los factores de estructura observados experimentalmente (F_{obs}) y los calculados (F_{calc}); es decir, se debe procurar que el patrón de difracción calculado para un modelo se ajuste lo mejor posible a los datos experimentales.

Durante el afinamiento, la calidad del modelo resultante puede evaluarse al usar un índice de discordancia (R factor) entre los F_{obs} y los F_{calc} .

Un valor aceptable del factor R depende de la resolución de la estructura. Para estructuras determinadas a alta resolución ($<2 \text{ \AA}$), el valor final de R se espera que sea menor a 0.2 ó 20%. Debido a que para las estructuras de proteínas generalmente se tiene un número menor de observaciones que parámetros, el factor R puede ser artificialmente disminuido a expensas de la estereoquímica del modelo. Para evitar este tipo de errores, Brunger en 1992 introdujo una nueva metodología en el proceso de afinamiento (la validación cruzada), donde aproximadamente el 10% de los datos es separado del total y no es usado en el afinamiento. Este 10% es usado para calcular un nuevo parámetro, el factor R libre (R_{free}), este factor es un indicador sensible al sobreafinamiento y generalmente no debe alejarse más del 5% del valor de R.

1.6 Interacción proteína – cristal

El papel de las diferentes proteínas en los procesos de biomineralización y el mecanismo de formación del cascarón de huevo no son bien conocidos. Sin embargo, varios mecanismos han sido propuestos para explicar la interacción entre proteínas y superficies minerales, entre los que se encuentran las interacciones estereoquímicas y electrostáticas. Para poder entender estos mecanismos es necesario estudiarlos separadamente usando sistemas en los cuales sólo un tipo de interacción sea predominante (Rodríguez-Navarro et al., 2000), en donde la predominancia dependerá del tamaño, conformación y propiedades moleculares como carga y grupos funcionales de las diferentes macromoléculas.

Existen pocos trabajos que se hayan enfocado a la influencia de extractos macromoleculares (Arias et al., 1993; Gautron et al., 1996) sobre la cristalización del carbonato de calcio. En estos trabajos se ha postulado que las diferentes macromoléculas tienen un efecto sobre la morfología de los cristales. La influencia de proteínas purificadas a homogeneidad sólo ha sido estudiada para el caso de la ansocalcina de ganso (Lakshminarayanan et al., 2002) y para la lisozima de gallina (Jimenez-López et al., 2003), observándose con esta última un efecto sólo a altas concentraciones, mientras que la ansocalcina promueve la agregación de cristales.

Para poder evaluar la influencia de las diferentes macromoléculas es necesario realizar una caracterización a nivel microscópico.

Para la investigación de superficies a alta resolución se utilizan comúnmente dos técnicas, la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM). Cada una de estas técnicas puede darnos detalles a escala de nanómetros, aunque sólo la técnica de microscopía de efecto túnel (a partir de la cual se desarrolló la microscopía de fuerza atómica) puede darnos detalles a nivel atómico, siendo prerrequisito para su uso que la muestra sea conductora.

El mecanismo de formación de imágenes para cada una de estas dos técnicas es diferente, lo cual da como resultado diferente información acerca de las estructuras superficiales.

En general, la técnica de AFM provee información topográfica tridimensional tanto de materiales conductores como no conductores. Esta técnica tiene sus orígenes en el método de SPM (scanning probe microscopy) desarrollado por IBM en 1981.

Para la caracterización de muestras tanto conductoras como no conductoras, la microscopía de fuerza atómica (AFM) fue desarrollada en 1986 y el primer microscopio de fuerza atómica comercial fue producido en 1989. Ésta es una familia de técnicas que involucra la exploración de una superficie con el uso de una "punta" unida a un "muelle", en donde la punta interactúa directamente mediante fuerzas de van der Waals con la superficie. Estas interacciones son monitoreadas a partir de la señal registrada en un fotodiodo de las deflexiones del muelle, al que se encuentra unida la punta, generando así una imagen tridimensional.

Los dos modos de operación más comúnmente utilizados en la microscopía de fuerza atómica son el modo contacto (contact mode) y el modo intermitente (tapping mode), en donde el modo intermitente se utiliza generalmente para la caracterización de muestras suaves.

Aunque la técnica de AFM es la más comúnmente usada, existen muchas otras técnicas de SPM que han sido desarrolladas para obtener información sobre diferencias en fricción, adhesión, elasticidad, dureza, campos eléctricos y magnéticos, distribución de temperaturas, etc.

SECCION EXPERIMENTAL

De forma general el trabajo se divide en tres partes fundamentales que son: la parte bioquímica, la parte de cristalogénesis y cristalografía y la parte de la influencia de la OC-17 sobre la cristalización del carbonato de calcio. La primera parte abarca el aislamiento, purificación y determinación de los estados de agregación de la OC-17. En la parte de cristalogénesis y cristalografía se describe la obtención de cristales, la captación de datos de difracción y la resolución estructural de la OC-17 y la tercera parte detalla la influencia de la concentración sobre la cristalización del carbonato de calcio.

2.1 Caracterización bioquímica

2.1.1 Protocolo de aislamiento y purificación de la proteína ovocleidina-17

Se utilizaron 18 huevos blancos de *Gallus gallus* no fertilizados para comenzar con el aislamiento y purificación de la proteína ovocleidina-17. El contenido de los huevos fue desechado y los cascarones lavados con agua corriente. Las membranas fueron separadas manualmente después de un tratamiento con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Aldrich) al 5 % por un periodo de 30 minutos a 4° C. Mediante este tratamiento es posible también separar la cutícula, lavándose los cascarones abundantemente con agua corriente y finalmente con agua destilada.

Los cascarones lavados se secaron a temperatura ambiente sobre papel absorbente. Posteriormente fueron molidos en un mortero de porcelana hasta que el tamaño de las partículas fuera el más pequeño posible.

Después de este primer tratamiento, se obtuvieron 75 g de polvo de cascarón a partir de los cuales se comenzó la extracción, la primera parte de la extracción se realizó con ácido acético (Sigma) al 20% (10 ml por gramo de cascarón) con agitación constante por un periodo de 24 horas a 4°C.

Este extracto fue centrifugado a 22,100 x g durante 1.5 horas. Se recuperó el sobrenadante y se dializó contra 5x10 vol. de ácido acético al 5%, que contenía 5 mM de EDTA y 0.025% de NaN_3 para cada cambio en la diálisis. Para llevar a cabo la precipitación de la fase proteica, la solución dializada se llevó a saturación con sulfato de amonio (Sigma). Después de 24 horas, esta solución fue centrifugada a 64,500 x g durante 50 minutos a 4°C, el sobrenadante descartado y el botón fue resuspendido y

dializado contra ácido acético al 10% para remover el sulfato de amonio. La solución resultante fue centrifugada a 29,500 x g por un lapso de 5 minutos y el sobrenadante fue filtrado con filtros de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con abertura de malla de 0.2 μm .

La solución que contenía la porción soluble intramineral del cascarón de huevo (extracto intramineral), fue inyectada a una columna Vydac C4 de HPLC fase reversa (50 x 4.6 mm), usando como fase móvil 100% de acetonitrilo más 0.1% de TFA (ácido trifluoroacético) y utilizando diferentes gradientes.

Con la finalidad de observar las proteínas presentes en el extracto intramineral se realizó una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), utilizando un gel de tipo homogéneo 15% en un sistema BioRad.

Después de la cromatografía de fase reversa y para detectar en qué pico o picos se encontraba la ovocleidina-17, las fracciones obtenidas fueron verificadas mediante electroforesis, utilizando la metodología SDS-PAGE descrita para minigeles del sistema PhastSystem del tipo homogéneo 20% (PhastSystem separation technique file No. 111. Amersham Bioscience Co).

En ambos casos los geles fueron teñidos con azul de Coomasie.

2.1.2 Pruebas de hemoaglutinación

Debido al hecho de que previamente se sabía que en la secuencia de la ovocleidina-17 existe un dominio de lectina tipo-C (Mann & Siedler, 1999) se realizaron una serie de pruebas de hemoaglutinación utilizando un kit de los diferentes tipos sanguíneos con eritrocitos humanos y determinar así el tipo de azúcares que reconocían. A la par se realizaron análisis del extracto completo conteniendo todas las proteínas intraminerales y con la ovocleidina-17 purificada.

2.1.3 Determinación de los estados de agregación de la OC-17 en función de la temperatura

Se realizaron experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS) para conocer el estado de agregación de la ovocleidina-17, utilizando un equipo DynaPro-801 TC (Protein Solutions Co.), el cual cuenta con controlador de temperatura.

La metodología consistió en filtrar una solución de proteína que tenía una concentración de 1.0 mg/ml a través de un filtro con apertura de malla de 0.2 μm para remover cualquier partícula extraña. La solución fue introducida inmediatamente al equipo de DLS, el cual cuenta con un diodo láser con una longitud de onda de 830 nm y un fotodetector ubicado a 90°. Una vez introducida la muestra se realizó un barrido de temperaturas a partir de 6°C.

2.2 Cristalogénesis y cristalografía

2.2.1 Cristalización de la proteína ovocleidina-17

En función de que la banda mayoritaria en el gel de poliacrilamida (más del 95%) correspondía a un peso molecular de aproximadamente 17 kDa, se montaron pruebas de cristalización.

La proteína purificada fue concentrada hasta 12.5 mg/ml. Las pruebas iniciales se llevaron a cabo utilizando el Hampton Research Crystal Screen 1 (Jancarik & Kim, 1991), que consiste de 50 diferentes condiciones experimentales. Una lista completa de estas 50 condiciones se encuentra en el **Apéndice B**. Todas las pruebas de cristalización fueron realizadas a 4°C usando la técnica de difusión en fase vapor en gota sedente. El volumen total de las gotas fue de 10 μl , al mezclar volúmenes iguales de proteína y solución de agente precipitante y equilibrada contra 750 μl de esta última.

2.2.2 Captación de datos de difracción de rayos X (ánodo rotatorio)

El siguiente paso para la resolución estructural de una proteína por difracción de rayos X una vez obtenidos los cristales es la captación de datos. Esta se realizó utilizando un equipo Rigaku con un generador de ánodo rotatorio (100 kV, 50 mA) y un detector R-Axis IIC Imaging plate a temperatura ambiente en el Laboratorio Universitario de Estructura de Proteínas (LUEP) en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se captaron 31 imágenes con una distancia entre cristal y detector de 100 mm a un intervalo de oscilación de 2° y un tiempo de exposición de 45 minutos para cada imagen.

2.2.3 Captación de datos de difracción de rayos X a alta resolución

Para esta nueva captación de datos en donde era necesario obtener una mayor resolución, la toma de datos se realizó en la línea BM14S del European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) en Grenoble, Francia, utilizando un haz de rayos X con longitud de onda de 0.97 Å y un detector marCCD.

Se captaron 120 imágenes a intervalos de 1° con tiempo de exposición de 12 segundos c/u, utilizando como crioprotector PEG 400 al 20% y tomando los datos a una temperatura de 100 K.

2.2.4 Resolución estructural

Debido al conocimiento previo de la identidad en estructura primaria (30%) de la ovocleidina-17 con la litostatina de cálculos pancreáticos humanos y a que de ésta última ya se conocía su estructura tridimensional (Bertrand et al., 1996), se optó por intentar la resolución por técnicas de Reemplazo Molecular (MR).

En la figura 3 se muestra el alineamiento de secuencias entre la ovocleidina-17 y la litostatina de cálculos pancreáticos humanos.

```

CLUSTAL X (1.8) multiple sequence alignment

Ovocleidina-17      -----DPDGGCGPWVPTPGGCLGFFSRELSWSRAESFCRRWGPESH
Litostatina         QEAQTELPQARISCPGEGTNAYRSYCYFNEEDRETWVDADLYCQNMNSG-N
                   * * * * * * * * * *

Ovocleidina-17      LAAVRSAAELRLLAELLNASRGGDGSSEGADGRVWIGLHRPAGSRWRWS
Litostatina         LVSVLTQAEAFVAVSLIKESGTDDFN-----VWIGLHDPKKNRAHWS
                   * * ** * * * * * * * * * *

Ovocleidina-17      DGTAPRFASWHRTAKARRG-GRCAALRDEEAFTSWAARPCTERNAFVCKA
Litostatina         SGSLVSYKSWGIGAPSSVNPYCVSLTSSTGFQKWKDVPCEDKFSFVCKF
                   * ** * * * * * * * *

Ovocleidina-17      AA
Litostatina         KN
  
```

Figura 3. Alineación de secuencias de la ovocleidina-17 y la litostatina de cálculos pancreáticos humanos. * indica los aminoácidos conservados en ambas secuencias.

El procesamiento de datos se llevó a cabo realizando los siguientes pasos:

- 1) Determinación de la orientación del cristal, parámetros de la celda unitaria y del posible grupo espacial.
- 2) Generación de un listado de reflexiones e integración de las imágenes.
- 3) Escalamiento y combinación de los datos resultantes.

Los pasos 1 y 2 se realizaron utilizando el programa **MOSFLM** (Leslie, 1992) que sirve para el procesamiento de imágenes de difracción y proporciona las herramientas necesarias para realizar la integración de cada una de las reflexiones observadas en un espectro de difracción de rayos X experimental.

El paso 3 se realizó con los programas **SCALE** y **TRUNCATE**, estos programas están incluidos en el "Collaborative Computational Project Number 4 (CCP4)" (1994). El programa **SCALE** se utilizó para el escalado y la combinación de los datos provenientes de los diferentes patrones de difracción obtenidos, mientras que el programa **TRUNCATE** fue usado para obtener la amplitud de los factores de estructura a partir de las intensidades.

List of possible Laue groups, sorted on penalty index.
 The lower the PENALTY, the better
 Only solutions with PENALTY less than 200 are listed,

No	PENALTY	LATT	a	b	c	alpha	beta	gamma	Possible spacegroups
14	155	tP	59.66	59.73	84.51	90.6	90.7	119.6	P4, P41, P42, P43, P422, P4212, P4122, P41212, P4222, P42212, P4322, P43212
13	155	oP	59.66	59.73	84.51	90.6	90.7	119.6	P222, P2221, P21212, P212121
12	150	mP	59.73	59.66	84.51	90.7	90.6	119.6	P2, P21
11	150	mP	59.66	59.73	84.51	90.6	90.7	119.6	P2, P21
10	13	hP	59.66	59.73	84.51	90.6	90.7	119.6	P3, P31, P32, P312, P321, P3112, P3121, P3212, P3221, P6, P61, P65, P62, P64, P63, P622, P6122, P6522, P6222, P6422, P6322

Figura 4. Primeros datos obtenidos con MOSFLM del autoindizado antes del afinamiento de la celda unitaria. En el recuadro se muestra que la menor penalización es para los grupos espaciales trigonales y hexagonales.

Una vez realizado el afinamiento de la celda para diferentes grupos espaciales trigonales y hexagonales con el programa MOSFLM, así como el proceso de escalamiento y combinación de los datos, se verificaron los valores de R_{sym} para determinar el grupo espacial, aunado a la observación de las ausencias sistemáticas en los archivos que contenían todas las reflexiones (hkl) para cada grupo espacial, basándose en los datos de las Tablas Internacionales de Cristalografía (Hahn, 2002).

No. de Grupo espacial	Grupo espacial	R_{sym}
168	P6	0.47
143	P3	0.051
149	P312	0.475
150	P321	0.053

Figura 5. Valores de R_{sym} para diferentes grupos espaciales trigonales y hexagonales. El número de grupo espacial es el asignado en las tablas internacionales de cristalografía.

A partir de estos valores y en función de las ausencias sistemáticas se dedujo que el grupo espacial era **P321**, pero aún faltaba determinar si era $P3_121$ o $P3_221$, lo cual se determinó hasta la obtención de una solución correcta en el reemplazo molecular.

Antes de realizar el reemplazo molecular, se cambió el formato del archivo de salida proveniente del programa TRUNCATE (mtz) a uno que pudiese ser leído por el programa **CNS_solve** (Crystallography and NMR system) (Brunger et al., 1998). Esto se realizó usando el programa **mtz2various** incluido en CNS.

Una vez con el archivo en un formato para CNS, el cual contiene la lista completa de todas las reflexiones (hkl), los factores de estructura observados y el valor de sigma (error estimado) para cada una de las reflexiones, éste fue utilizado como uno de los archivos de entrada para el reemplazo molecular, junto con el archivo de coordenadas de la litostatina. La cadena principal de la litostatina se mantuvo intacta y en base al alineamiento de secuencias, las cadenas laterales de los aminoácidos no conservados (figura 3) fueron

retiradas o cambiadas por Ala o Gly. Para este caso el porcentaje de cadenas laterales modificadas fue del 64%.

En general el reemplazo molecular se basa en sustituir un modelo molecular conocido (litostatina) dentro de la celda unitaria del cristal bajo estudio (ovocleidina-17), para lo cual hay que aplicar una función de rotación y un vector de traslación. Este proceso se llevó a cabo utilizando el programa AMORE (Navaza, 1994).

El reemplazo molecular fue realizado para los dos posibles grupos espaciales, $P3_121$ y $P3_221$. Para el primero no hubo solución ya que se obtuvieron valores muy bajos del factor de correlación y valores muy altos del factor R. Sin embargo sí hubo solución para el grupo espacial $P3_221$ como se muestra en la figura 6.

```

mr2ic:  OC_17
xout(mod) = rotation * xin(mod) + translation

          -0.11612  0.96836  0.22090          -29.72
xout(mod=11) = 0.98483  0.14113 -0.10097 * xin(mod=11) + 7.01
          -0.12895  0.20582 -0.97006          100.31

c-factor = 27.8      ,      R-factor = 48.1

```

Figura 6. Solución dada para el reemplazo molecular con el grupo espacial $P3_221$ por el programa AMORE. Aquí se muestra la función de rotación y el vector de traslación que debe ser aplicado. Los valores del factor de correlación (c-factor) y R-factor son calculados a partir de los factores de estructura observados y los generados a partir del modelo con la orientación dada.

Una vez aplicada la función de rotación y el vector de traslación a la molécula de litostatina, la cual ha sido "acomodada" en la celda unitaria de la ovocleidina-17, mediante la rutina **REORIENTATE** incluida en el programa AMORE, se comenzó con la construcción del modelo de la ovocleidina-17, cuyos pasos se detallan a continuación.

Preparación de los datos de difracción

Al archivo de las reflexiones se le adicionó la información de "validación cruzada (CV)" = R_{free} , usando una selección de datos al azar con el programa **make_cv** incluido en CNS. El porcentaje de reflexiones utilizadas para los cálculos de R_{free} en este caso fue del 10 %. Este valor es usado para seguir los subsecuentes pasos de afinamiento del modelo.

Construcción del modelo inicial

Las coordenadas del modelo inicial (archivo de salida de AMORE) se cambiaron a un formato para su uso con CNS, para lo cual se utilizó el programa **generate_easy** incluido en CNS, el cual nos dio de salida un archivo con las coordenadas en formato PDB y un archivo en formato MTF que contiene información de la topología molecular de tipo covalente de la molécula.

Verificación del modelo inicial

Antes de comenzar con el afinamiento, el modelo fue verificado usando el programa **model_stats_start** incluido en CNS, el cual se usa para analizar la geometría del modelo y las estadísticas de difracción. El resultado de esta rutina indica si el modelo tiene una geometría pobre. Entre la información obtenida se encuentran los valores de R y R_{free} , así como los valores de rms para enlaces, ángulos, dihedros e impropios.

$$R = 0.5681 \quad R_{\text{free}} = 0.5782$$

De este primer modelo también fue verificado que no existieran superposiciones al generar las moléculas relacionadas por simetría.

Afinamiento inicial por recocido simulado "annealing"

Se comenzó con un afinamiento de cuerpo rígido realizado con el programa **rigid** incluido en CNS, dando como resultado un nuevo archivo de coordenadas en formato PDB.

$$R = 0.496 \quad R_{\text{free}} = 0.501$$

Una vez realizado este afinamiento inicial se procedió a realizar un recocido simulado con el programa **anneal** incluido en CNS, usando dinámica de torsión de ángulos, comenzando a una temperatura de 5000K y disminuyendo a intervalos de 25K. Este

proceso incluye además 2 pasos de minimización de energía, uno antes y uno después del recocido simulado.

$$R = 0.4268 \quad R_{\text{free}} = 0.4836$$

Dado que el modelo inicial tenía los mismos factores-B (factores de temperatura) para todos los átomos, fue necesario afinarlos con el programa **bggroup** incluido en CNS, este programa realiza el afinamiento de 2 factores B para cada residuo, uno para la cadena principal y uno para la cadena lateral.

$$R = 0.412 \quad R_{\text{free}} = 0.466$$

El archivo de salida fue un nuevo archivo de coordenadas en formato PDB.

Localización de las partes por asignar en el modelo

El siguiente paso fue localizar las partes en donde existía densidad electrónica y debían asignarse los átomos correspondientes a las cadenas laterales de la OC-17, así como localizar los átomos incorrectamente posicionados, para lo cual fue necesario calcular dos mapas de densidad electrónica, uno de diferencias $F_o - F_c$, usando la información de las fases del modelo, obteniéndose los picos positivos y negativos de densidad electrónica a 2 y -2.5 sigma respectivamente, los cuales nos ayudaron a trazar el modelo usando un programa de visualización y edición. El otro mapa es un mapa $2F_o - F_c$ calculado a 1 sigma. La generación de los mapas se realizó con el programa **model_map** de CNS.

Una vez obtenidos los 2 mapas de densidad electrónica, fue necesario cambiarles el formato para poder ser leídos por el programa de visualización y edición gráfica **TURBO-FRODO** (Roussel & Cambillau, 1989). Para este paso se utilizó el programa **mapman** incluido en TURBO-FRODO.

A partir de aquí comenzó un proceso interactivo de subsecuentes pasos de reconstrucción manual del modelo acomodando tanto cadena principal como cadenas laterales dentro de los mapas de densidad electrónica, así como mutación de residuos y afinamiento de la geometría. Este proceso fue realizado de manera gradual y después de una serie de cambios fue necesario obtener un nuevo archivo de coordenadas en formato PDB, el cual fue utilizado para un nuevo ciclo de afinamiento por recocido simulado. En cuanto la

mayor parte de la estructura fue trazada correctamente, el afinamiento de los factores-B se realizó usando el programa **bindividual** incluido en CNS. Este proceso fue monitoreado con los valores de R y R_{free} que nos dan una idea de si los cambios realizados paulatinamente han sido correctos.

Una de las partes que fue necesario construir de una manera distinta fue la serina fosforilada (SEP61). Era evidente la densidad electrónica para el grupo fosfato de esta modificación postraduccional, pero para su construcción fue necesario buscar en una base de datos de heterocompuestos (Hetero-compound Information Centre - Uppsala. <http://alpha2.bmc.uu.se/hicup/>) los archivos correspondientes a su topología y parámetros (enlaces, ángulos, dihedros, impropios, etc).

En los archivos generados SEP.top y SEP.param fue necesario realizar una serie de cambios para construir el residuo de serina fosforilada con la geometría adecuada.

El número de pasos de afinamiento realizados en total fue de 15, aumentando paulatinamente la resolución hasta llegar a trabajar a la máxima resolución de 1.5 Å, que fue la máxima resolución obtenida en la captación de datos.

Los valores finales de R y R_{free} fueron los siguientes:

$$\mathbf{R= 0.20} \quad \mathbf{R_{\text{free}}= 0.218}$$

La asignación de la estructura secundaria fue realizada usando el programa **DSSP** (Wolfgang et al., 1983) y la correcta geometría corroborada con el programa **PROCHECK** (Laskowski et al., 1993).

Todo el procesamiento de datos y construcción del modelo fue realizado en estaciones de trabajo Silicon Graphics (SGI).

La resolución de la estructura de la ovocleidina-17 se realizó bajo la supervisión del Dr. Antonio Romero en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del Consejo Superior de Investigación Científica (CSIC), en Madrid, España, durante una estancia de investigación que realicé en su laboratorio de febrero a julio del 2002.

2.3 Influencia de la OC-17 sobre la cristalización del carbonato de calcio

Con la finalidad de determinar el efecto de la ovocleidina-17 sobre la morfología macroscópica de cristales de carbonato de calcio, se realizó la síntesis *in vitro* de CaCO_3 evaluando el efecto de la concentración de proteína.

La OC-17 utilizada fue parte del mismo lote de proteína utilizado para su cristalización mediante el protocolo descrito en la sección 2.1.1. Dos proteínas intraminerales comercialmente disponibles fueron usadas como control, la ovotransferrina y la proteína ovomucoide (Sigma).

Los cristales de calcita fueron crecidos mediante la técnica de difusión en fase vapor, utilizando un sistema diseñado *ad hoc* para que la síntesis de los cristales se diese con una presión de vapor homogénea de los productos resultantes de la descomposición de una solución 25 mM de carbonato de amonio (Sigma). Esta solución se colocó dentro de una caja Petri, en la que se introdujo otra caja de menor tamaño invertida, sobre la cual se colocaron cubreobjetos siliconizados.

En el mismo sistema se montaron pruebas control (sin influencia de la proteína) y con la influencia de diferentes concentraciones de proteína que fueron de 200 hasta 5 $\mu\text{g/ml}$. La solución de CaCl_2 , a la cual se adicionó la proteína y se colocó sobre el cubreobjetos, se mantuvo a una concentración constante en todos los casos (100 mM) y el sistema se selló perfectamente para evitar fugas. El volumen total de las gotas fue de 50 microlitros y todos los experimentos fueron realizados a 18°C. En la figura 7 se muestra el diseño del sistema experimental.

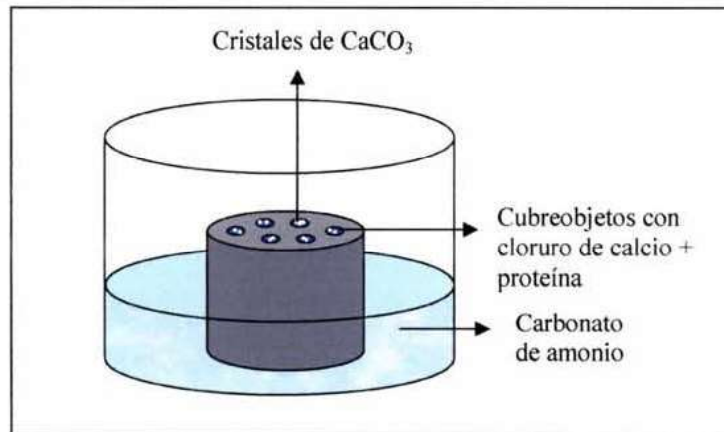


Figura 7. Sistema experimental diseñado para la síntesis de cristales de CaCO_3 .

Después de 72 horas de adición del carbonato de amonio, los cristales fueron lavados con agua grado MilliQ, secados a temperatura ambiente y preparados para su caracterización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los estudios de SEM de los cristales de CaCO_3 se llevaron a cabo usando un equipo de microscopía electrónica de barrido JEOL JSM5900 LV a 20kV, acoplado a un sistema de microanálisis.

Microscopía de fuerza atómica (AFM).

Para el caso de la obtención de imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM), éstas se obtuvieron utilizando un equipo Multimode con un controlador Nanoscope III (Digital Co.) en el modo "tapping" (intermitente), con puntas de nitruro de silicio y velocidades de barrido de 1Hz.

La proteína a una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ en agua se absorbió sobre mica recién clivada (en donde el clivaje es la tendencia de un mineral a romperse a lo largo de una superficie plana) y se secó a temperatura ambiente, realizando barridos a diferentes amplificaciones. Esto se realizó dado el hecho de que las proteínas en solución a un pH menor al de su punto isoeléctrico se encuentran cargadas positivamente interactuando así con las cargas negativas de la mica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización bioquímica

3.1.1 Aislamiento y purificación de la ovocleidina-17

La metodología utilizada para el aislamiento y la purificación de la ovocleidina-17 consistió en algunas modificaciones del protocolo descrito por Mann (1999), para obtener un mayor rendimiento.

En el primer análisis electroforético realizado se determinaron las proteínas intraminerales presentes con nuestro método de extracción, pudiéndose determinar que la OC-17 era la más abundante (figura 8). En todas las cromatografías, la OC-17 siempre apareció en un doble pico (figura 9) y mediante SDS-PAGE se determinó que se trataba de la misma proteína (figura 10) por lo que las dos fracciones se trabajaron posteriormente en conjunto. Estas observaciones concuerdan con las reportadas por Mann (1999), quien determinó mediante SDS-PAGE y secuenciación del amino terminal que se trataba de la misma proteína. Sin embargo, es posible que existan diferentes grados de modificaciones postraduccionales en cada una, por lo cual pueden ser separadas. Las modificaciones realizadas en el protocolo de purificación resultaron ser óptimas para la purificación de la OC-17, ya que se pudo obtener un mayor rendimiento y gran pureza. A partir de los 75 gramos de cascarón con los que se comenzó la purificación fue posible obtener 3 mg de la proteína OC-17, los cuales mediante análisis por SDS-PAGE mostraron una pureza de más del 95%.

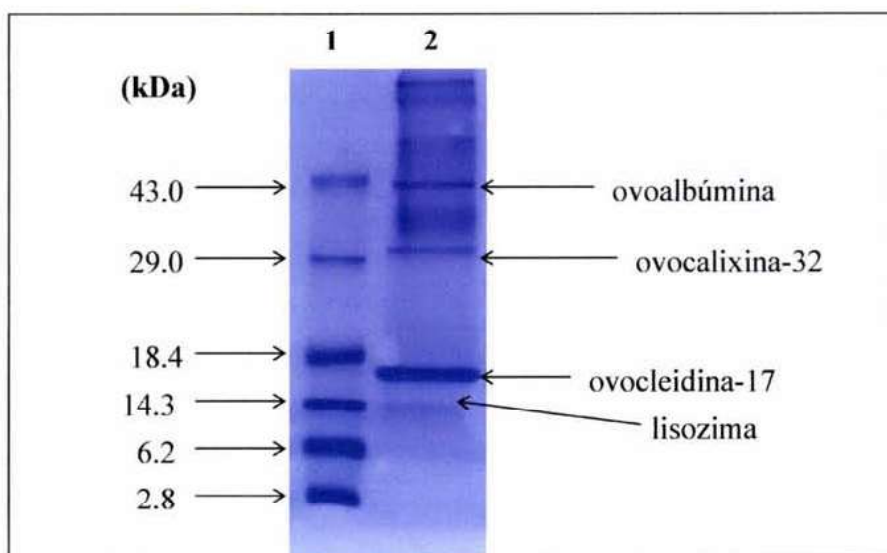


Figura 8. Gel homogéneo 15%. Carril 1. Marcadores de peso molecular (GIBCO). Carril 2. Extracto intramineral.

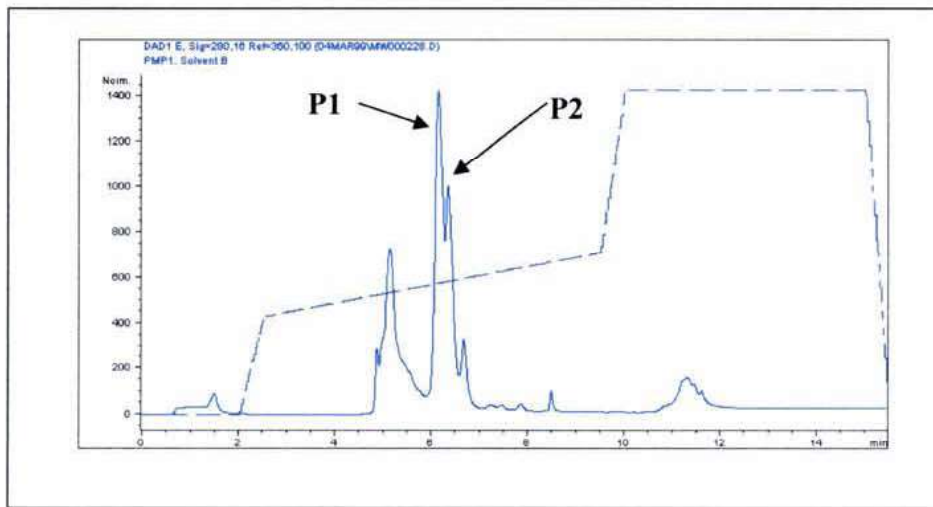


Figura 9. Cromatograma del extracto intramineral usando una columna Vydac C-4 de HPLC fase reversa.

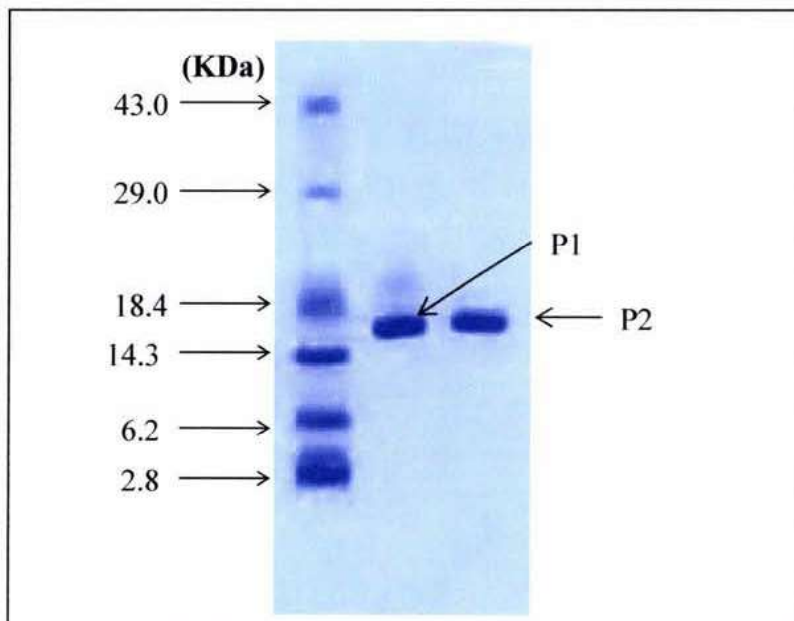


Figura 10. Gel homogéneo 20% SDS-PAGE.
 Carril 1. Marcadores de peso molecular (GIBCO).
 Carril 2. Pico 1 (P1) RP-HPLC.
 Carril 3. Pico 2 (P2) RP-HPLC

3.1.2 Pruebas de hemoaglutinación

El extracto intramineral del cascarón de huevo dio positivo en las pruebas de hemoaglutinación, reconociendo al tipo sanguíneo B humano. Por otro lado, las pruebas de hemoaglutinación en todos los casos para la proteína ovocleidina-17 purificada fueron negativas.

Estos resultados indican que aunque por secuencia la ovocleidina-17 tiene un dominio similar al de lectina tipo-C (CTLD), no une por lo menos a los polisacáridos encontrados en eritrocitos humanos. Sin embargo, en el extracto intramineral debe encontrarse alguna otra proteína con la capacidad de reconocer carbohidratos, aunque no se determinó específicamente cuál es. Es importante mencionar que en ninguno de los casos se adicionó Ca^{2+} al sistema experimental.

3.1.3 Determinación de los estados de agregación de la ovocleidina-17 en función de la temperatura

Como se observa en la figura 11, la ovocleidina-17 parece ser muy sensible a los cambios de temperatura, mostrando un comportamiento de agregación y desagregación en función de ésta. Este fenómeno de agregación para la OC-17 ha sido reportado con anterioridad en diferentes trabajos (Hincke et al., 1995; Mann, 1999) y es posible que los agregados sean su estado funcional *in vivo*. El radio hidrodinámico en nanómetros corresponde a agregados de varios cientos a más de mil kDa deducido a partir de la ecuación de Kratochvil, el cual es calculado por el programa Dynamics (Protein Solutions Co.). La temperatura a la cual la proteína se encuentra en un estado menor de agregación corresponde a 32°C donde aparece como trímero-tetramero.

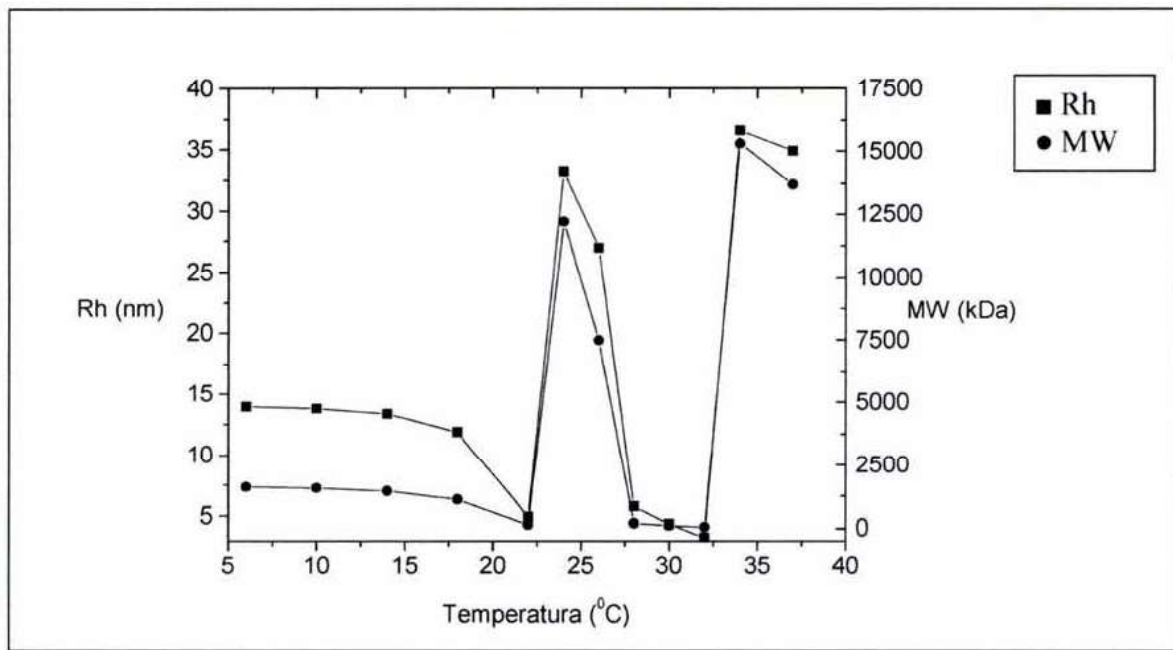


Figura 11. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína ovocleidina-17.

3.2 Cristalogénesis y cristalografía

3.2.1 Cristalización de la ovocleidina-17

Los primeros cristales de la OC-17 se obtuvieron en 0.1 M de acetato de sodio pH 4.6 y 8% w/v de PEG 4000 (condición experimental 37 del Hampton Research Crystal Screen 1) en un lapso de 10 a 20 días (figura 12).



Figura 12. Cristales de ovocleidina-17 (20 días). La escala corresponde a 0.1mm

Para optimizar el crecimiento de los cristales se utilizaron las técnicas de difusión en fase vapor (gota colgante y gota sedente), en lote (batch), acupuntura en geles y una variante de la técnica en lote utilizando aceites de diferentes densidades.

Asimismo, se realizó un barrido de pH para optimizar el crecimiento de los cristales, obteniéndose precipitado amorfo en todos los pH probados (5.6, 6.6 y 7.6), descartándose la variación del pH en la optimización de los cristales.

Los mejores cristales se obtuvieron a una concentración de proteína de 6 mg/ml en agua y una concentración de agente precipitante de 6% de PEG 4000 en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4.6 en la técnica de difusión en fase vapor en gota sedente, como el mostrado en la figura 13. Estos cristales fueron los utilizados en la caracterización por difracción de rayos X.

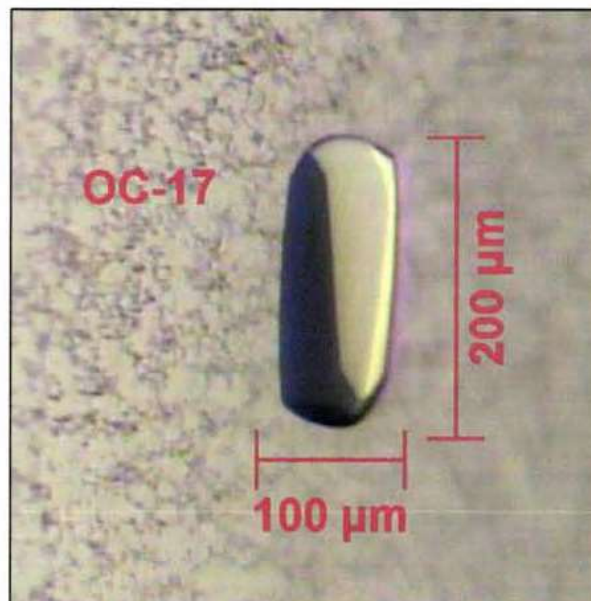


Figura 13. Monocristal de ovocleidina-17.

3.2.2 Captación de datos de difracción de rayos X (ánodo rotatorio)

Con la captación de datos a temperatura ambiente en el equipo de ánodo rotatorio fue posible la caracterización preliminar de los cristales a una resolución de 3 Å, la cual fue publicada en la revista *Protein Pept. Lett.* 2002. 9(3):253-257. Dicho artículo se encuentra anexado en el **Apéndice C**.

La finalidad de una caracterización preliminar es determinar si un cristal es de proteína o no, la resolución de las difracciones, el grupo espacial del cristal, la calidad de éste y los parámetros de la celda unitaria.

3.2.3 Captación de datos de difracción de rayos X a alta resolución

En la captación de datos de difracción de rayos X en el sincrotrón de Grenoble, Francia, se llegó a un límite máximo de resolución de 1.5 Å. En la figura 14 se muestra uno de los patrones de difracción de rayos X obtenidos en sincrotrón.

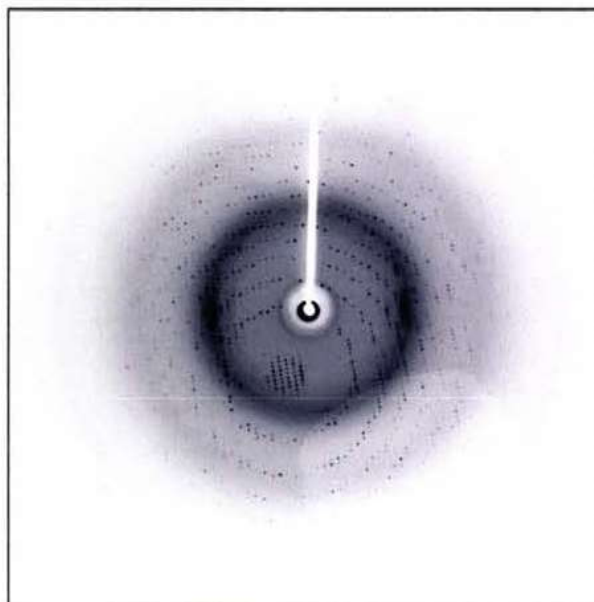


Figura 14. Patrón de difracción de rayos X obtenido mediante radiación de sincrotrón de un cristal de OC-17.

La siguiente figura resume los datos cristalográficos más importantes obtenidos con radiación de sincrotrón.

Grupo espacial	P3 ₂ 21
Parámetros de la celda unitaria	a=b= 58.26 Å, c= 82.46 Å $\alpha=\beta= 90^\circ$, $\gamma= 120^\circ$
Límite de resolución	1.5 Å
Volumen específico	2.38 Å ³ Da ⁻¹
Número de moléculas en la unidad asimétricas	1
Número total de reflexiones	384,514
Número de reflexiones únicas	26,325
Integridad (%)	99.5
R _{merge} (%)	6.3

Figura 15. Datos cristalográficos de un cristal de OC-17 obtenidos con radiación de sincrotrón.

3.2.4 Resolución estructural de la OC-17

De los 142 residuos de la molécula, no fue posible trazar las zonas del Asp 1 al Asp 3 y de la Gly 64 a la Gly 68, debido a la falta de densidad electrónica. Esto se atribuye a que la zona del amino terminal (del Asp 1 al Asp 3) es una zona muy móvil, al igual que la zona de la Gly 64 a la Gly 68 que forma parte de un asa.

La estructura final tuvo un valor de R y R_{free} de 0.20 y 0.218 respectivamente y fue posible localizar 153 moléculas de las denominadas "aguas estructurales".

Dentro de la estructura tridimensional de la proteína se localizó y construyó uno de los residuos con modificación postraducciona correspondiente a la serina 61, denominada SEP61 en el archivo final de coordenadas, pero el otro residuo con modificación postraducciona correspondiente a la serina 67 no pudo modelarse, debido a que se encontraba en la zona flexible del asa. Sin embargo, se trazó la cadena polipeptídica para los residuos de esta asa dándoseles ocupancia de cero y substituyéndolos por glicinas.

Los valores de desviación (r.m.s. = root mean square) fueron de 0.005 Å para los valores ideales de longitud de enlace y de 1.3 grados para los valores ideales de ángulos de enlace. Los cálculos realizados con el programa PROCHECK y la gráfica de Ramachandran de los ángulos de torsión phi y psi mostraron que el 93.6% de los residuos se encontraban en las regiones más favorables (rojo) y ninguno de ellos en las regiones no permitidas (blanco) (figura 16), lo cual indica que la geometría y calidad estereoquímica de nuestro modelo son correctas.

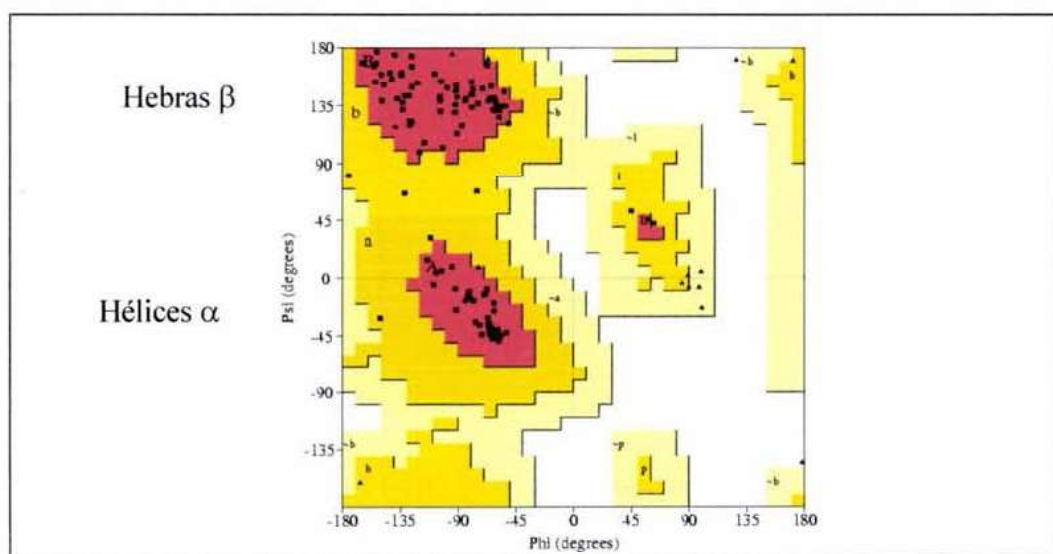


Figura 16. Gráfica de Ramachandran de la OC-17. Los residuos de glicina se muestran como triángulos, ya que existen menores restricciones en su localización.

Estructura global

La ovocleidina-17 contiene 142 residuos de aminoácidos y un solo dominio similar al de lectinas tipo-C (CTLD). En su topología general se encuentran estructuras α y β . Está compuesta de tres hélices y ocho hebras, dos de estas hélices son del tipo α y una del tipo 3_{10} . Las hebras β se encuentran agrupadas en dos láminas β antiparalelas opuestamente orientadas ($\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 8$ - $\beta 3$ y $\beta 5$ - $\beta 4$ - $\beta 6$ - $\beta 7$).

La estructura puede ser dividida en dos partes: una que contiene las dos hélices α que se encuentran perpendicularmente orientadas una con relación a la otra y rodeando a 4 hebras β ($\beta 1$ - $\beta 2$ - $\beta 8$ - $\beta 3$), y otra, formada por las otras cuatro hebras β ($\beta 5$ - $\beta 4$ - $\beta 6$ - $\beta 7$) y una pequeña hélice 3_{10} que conecta a las hebras $\beta 5$ y $\beta 6$ (figura 17).

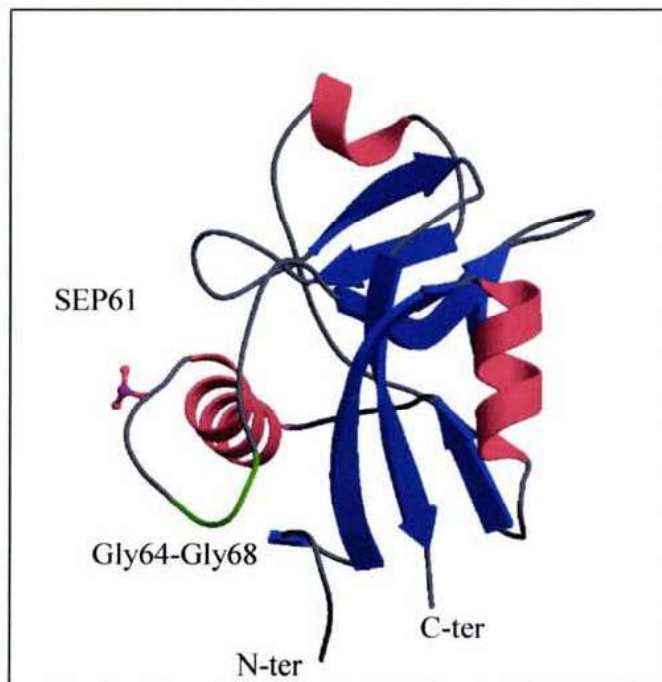


Figura 17. Representación esquemática de la estructura de la OC-17. La figura fue realizada con MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) y RASTER3D (Merritt et al., 1994).

En la figura 18 se muestra la secuencia de aminoácidos y los elementos de estructura secundaria para la OC-17.

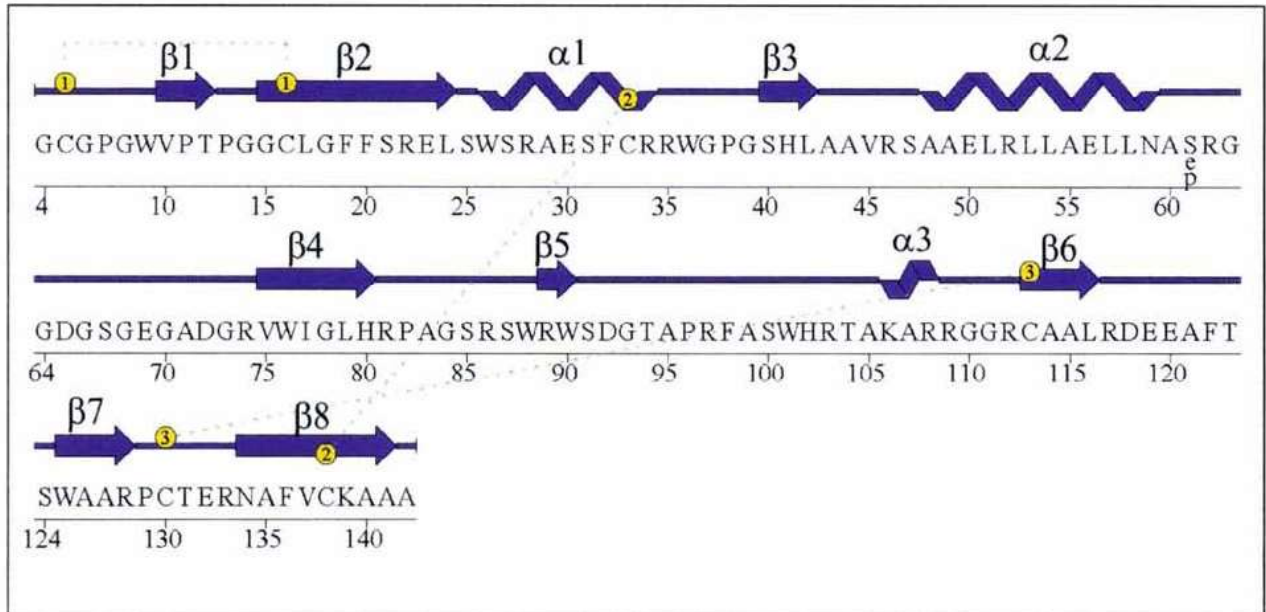


Figura 18. Secuencia de aminoácidos y elementos de estructura secundaria de la OC-17. Los círculos amarillos con los números indican los aminoácidos unidos mediante puentes disulfuro (líneas punteadas).

La estructura de la OC-17 se encuentra estabilizada por tres puentes disulfuro (figura 19), los cuales se encuentran conservados en la forma larga de las lectinas tipo-C (<http://www.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00537>).

El puente disulfuro Cys5-Cys16 conecta al asa que precede a la hebra β 1 con el amino terminal de la hebra β 2, otro más (Cys33-Cys138) conecta a la hélice α 1 con la hebra β 8 y el formado entre las Cys113-Cys130 une al amino terminal de la hebra β 6 con el asa que precede a la hebra β 8.

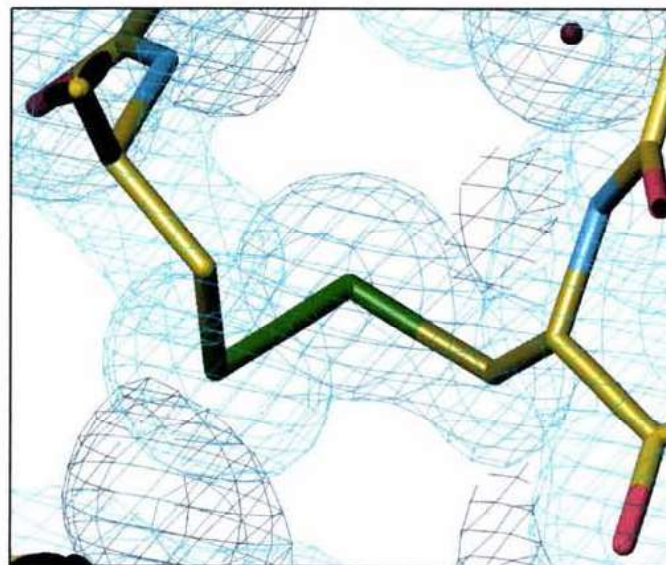


Figura 19. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc a 1σ y resolución de 1.5 Å de la zona del puente disulfuro Cys5-Cys16. La imagen fue generada con Turbo-Frodo.

Como se esperaba, y dado que la OC-17 es una fosfoproteína con 2 serinas fosforiladas (Sep61 y Sep67), se encontró densidad evidente de un grupo fosforilo en la vecindad de la Ser61 (figura 20). Ésta fue designada SEP61 durante la resolución estructural. Este tipo de residuos son capaces de unir iones tales como Ca^{2+} . Asimismo, en diferentes sistemas biomineralizados se ha descrito su presencia, como es el caso de la proteína orquestina del crustáceo terrestre *Orchestia cavimana*, la cual al ser enzimáticamente desfosforilada pierde la capacidad de unión a calcio (Hecker et al., 2003). También se ha descrito su presencia en proteínas tales como la DMP1 (dentin matrix phosphoprotein) reportada en dentina y hueso, DMP2 de dentina y RP-1 de concha de moluscos (Hecker et al., 2003). Es importante mencionar que la litostatina de cálculos pancreáticos no se encuentra fosforilada pero sí glicosilada en la Thr5 en la zona del amino terminal.

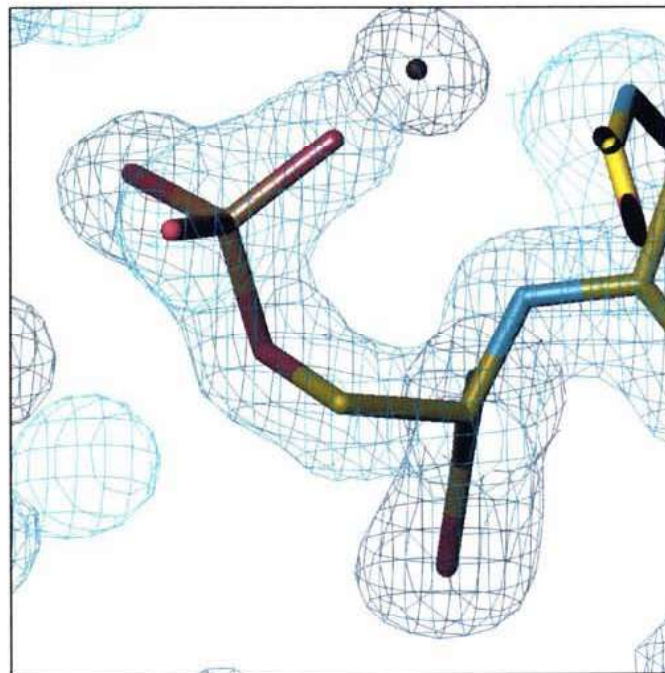


Figura 20. Mapa de densidad electrónica 2Fo-Fc a 1σ y resolución de 1.5 Å en la zona de la serina fosforilada (SEP61). La imagen fue generada con Turbo-Frodo.

Relación estructural con otras proteínas con dominio de lectina tipo-C

La OC-17 adopta el plegamiento típico de lectina tipo-C de manera similar a la litostatina de cálculos pancreáticos humanos. Los datos estructurales disponibles hasta ahora demuestran una arquitectura en común en el plegamiento de las proteínas con un dominio similar al de lectinas tipo-C (CTLD).

En la proteína de unión a manosa de rata (rat mannose binding protein = RMBP), el dominio de unión a carbohidratos (CDR) contiene una serie de asas estabilizadas por dos iones Ca^{2+} . La unión a carbohidratos se produce a través de la coordinación directa de uno de los iones Ca^{2+} mediante puentes de hidrógeno con la cadena lateral de ciertos aminoácidos, formando así un complejo proteína-calcio-polisacárido.

Existen hasta ahora 37 estructuras resueltas que contienen un CTLD (Zelensky, 2003), de las cuales aproximadamente la mitad no tienen la capacidad de unión a carbohidratos. Este es el caso de la OC-17 y la litostatina, las cuales no conservan los residuos responsables de coordinar al ion calcio.

En la zona correspondiente a la hélice 3_{10} (Ala 105 – Arg 109) en la OC-17 se encuentran los aminoácidos homólogos en posición a los responsables en coordinar al ion calcio en la RMBP (figura 21). Sin embargo, comparando la densidad de cargas entre éstas, se observó que son opuestas, por lo que por efectos de repulsión esta densidad previene la unión de iones con carga positiva, evitando así la subsecuente unión de polisacáridos.

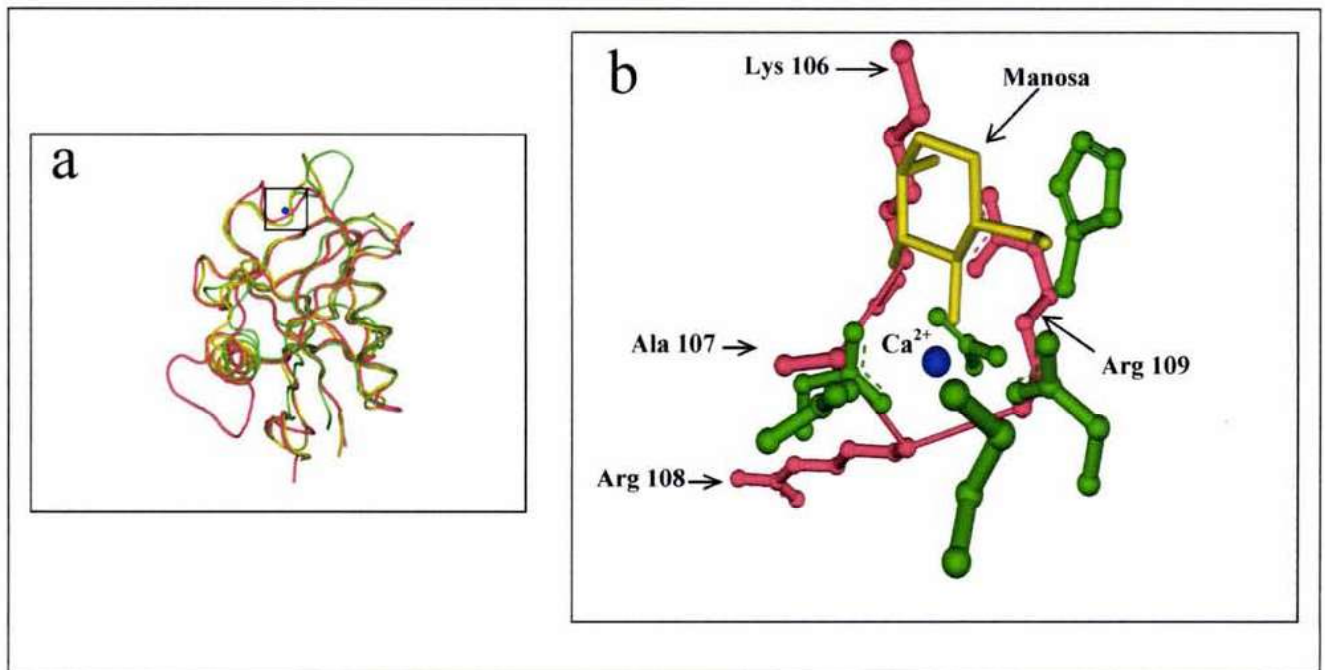


Figura 21. (a) Superposición OC-17 (rojo) – litostatina (amarillo) – RMBP (verde). En azul se muestra el ion Ca^{2+} principal de la RMBP. (b) Acercamiento a la zona de unión a calcio y manosa de la RMBP superpuesta con los aminoácidos homólogos en posición de la OC-17 (hélice 3_{10}). El código de colores es el mismo que en la figura a y fueron generadas con los programas Pymol (DeLano, 2002), ViewerLite (Accelrys) y PovRay.

La figura 22 muestra la alineación de secuencias de la OC-17 con otras proteínas asociadas con una fase mineral de carbonato de calcio. En esta comparación se incluyó a la proteína de unión a manosa de rata (RMBP), ya que ésta es el prototipo del plegamiento de lectinas tipo-C. Ésta es la única que pertenece al tipo corto de lectinas tipo-C con sólo 2 puentes disulfuro.

La ansocalcina es una proteína intramineral de cascarón de huevo de ganso recientemente reportada (Lakshminarayanan et al., 2002), la cual tiene una identidad de aproximadamente el 50% con la OC-17, mientras que la perlucina es una proteína asociada a la fase mineral de aragonita (nácar) en conchas de abulón, *Haliotis laevigata* (Mann et al., 2000; Weiss et al., 2000).

OC17	DPDGC	CGPGWV	PTPGGC	CLGFF	SRELSWSRAE	SFC	RRWGPGS	HLAAVRSAAE	50																												
Ansocalcin	--NKCP	KGWL	DFRGS	CYGYF	GQELTWRKAE	AW	CKVIHAGC	HLASLHSPEE	48																												
Perlucin	---GC	PLGFH	QNRRS	CYWFS	TIKSSFAEAA	GY	CRYLES--	HLAIISNKDE	45																												
Lithostathine	ARISC	PEGTN	AYRSY	CYYFN	EDRETWVDAD	LY	CQNMNSG-	NLVSFLTQAE	49																												
RMBP	-----		-SGK	FFVTN	HERMPFSKVK	AL	CSELRG--	TVAIPRNAEE	37																												
OC17	LRLLA	EELNA	SRGGD	GSGEG	ADGRVWIGLH	RPAG	SRSWRW	SDGTAPRFAS	100																												
Ansocalcin	HAAVAR	FIK	FQRE	-----	EEDNVWIGLH	HWN	QAR--VW	IDGSKKRYSA	91																												
Perlucin	DSFIR	GYATR	LG	-----	EAFNYWLGAS	DLN	IEGRWLW	EGQRRMXYTN	87																												
Lithostathine	GAFVAS	LIKE	SGTDD	-----	--FNVWIGLH	DPK	KNRWHW	SSGSLVSYKS	92																												
RMBP	NKAIQ	EVAKT	SA	-----	-----FLGIT	DEV	TEGQFMY	VTGGRLTYSN	74																												
OC17	WHR--	TAKAR	RGGRC	CAALRD	EEAFTSWAAR	P	C	TERNAFVC	KAAA 142																												
Ansocalcin	WD---	DDELP	RGKY	CTVLEG	SSGFMSWEDN	A	C	SERNPFVC	KYSA 132																												
Perlucin	WSPGQ	PDNAG	GIEH	CLELRR	DLGNYLWNDY	Q	C	QKPSHFIC	EKER 131																												
Lithostathine	WGIG-	APSSV	NPGY	CVSLTS	STGFQWKVDV	P	C	EDKFSFVC	KFKN 135																												
RMBP	WKKD	E	P	N	D	H	G	S	E	D	C	V	T	I	V	D	NG---	L	W	N	D	I	S	C	Q	A	S	H	T	A	V	C	E	F	P	A	115

Figura 22. Alineamiento de secuencias.

En amarillo se encuentran marcadas las seis cisteínas que forman los tres puentes disulfuro de la forma larga del dominio de lactina tipo-C.

En azul se muestran los aminoácidos responsables de formar el anillo de coordinación con el ion Ca^{2+} en la RMBP (PDB 2MSB).

Comparación estructural con la litostatina de cálculos pancreáticos

Los resultados de la alineación de secuencias (figura 22) muestran una identidad del 32% entre la litostatina (144 aminoácidos) y la OC-17 (142 aminoácidos). Sin embargo, la superposición de estructuras tridimensionales indican una arquitectura en común (figura 21a), con valores de r.m.s. en la superposición de carbonos α de 0.86 Å, encontrándose las mayores variaciones en las regiones de las asas.

Asimismo, un cálculo de superficie molecular (figura 23) y potencial electrostático (figura 24) muestran que la OC-17 se encuentra fuertemente polarizada y cargada positivamente. Esta gran polarización es debida al gran número de aminoácidos cargados positivamente que se encuentran en la OC-17 y particularmente por los 19 residuos de arginina que se encuentran en su secuencia.

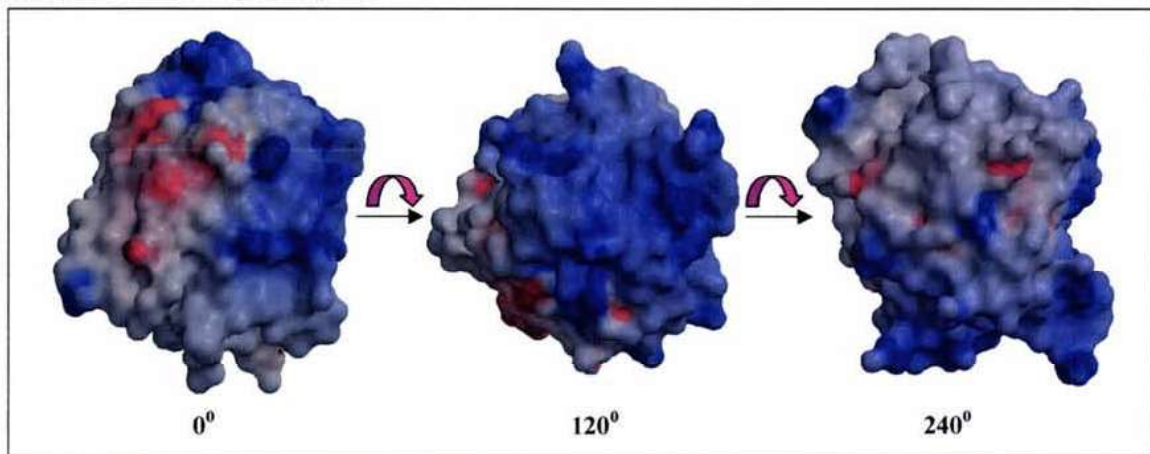


Figura 23. Superficie molecular de la OC-17. Las superficies cargadas negativa y positivamente se muestran en rojo y azul respectivamente. Cada una de las imágenes se encuentra girada 120° una con respecto a la otra.

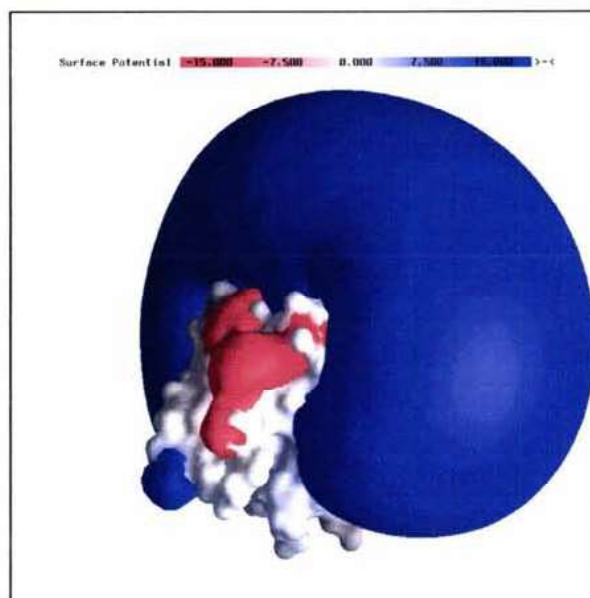


Figura 24. Potencial electrostático de la superficie molecular de la OC-17. La figura fue generada con GRASP (Nicholls et al., 1993) y Raster 3D.

Análisis de factores de temperatura (B)

El análisis de los factores de temperatura o factores B nos provee información de la vibración de los átomos. Este valor debe de ser más alto en las zonas de asas y menor en el núcleo hidrofóbico de la proteína. Nuestro análisis corrobora esto para la proteína OC-17 y precisamente en los aminoácidos vecinos a la zona del asa formada entre la Gly64 – Gly68, la cual no pudo ser construida debido a la falta de densidad electrónica (figura 25), observándose una tendencia a aumentar el valor de los factores B en esta zona, así como en otras dos asas, en la zona del amino terminal y para algunos aminoácidos con cadenas laterales largas como la arginina.

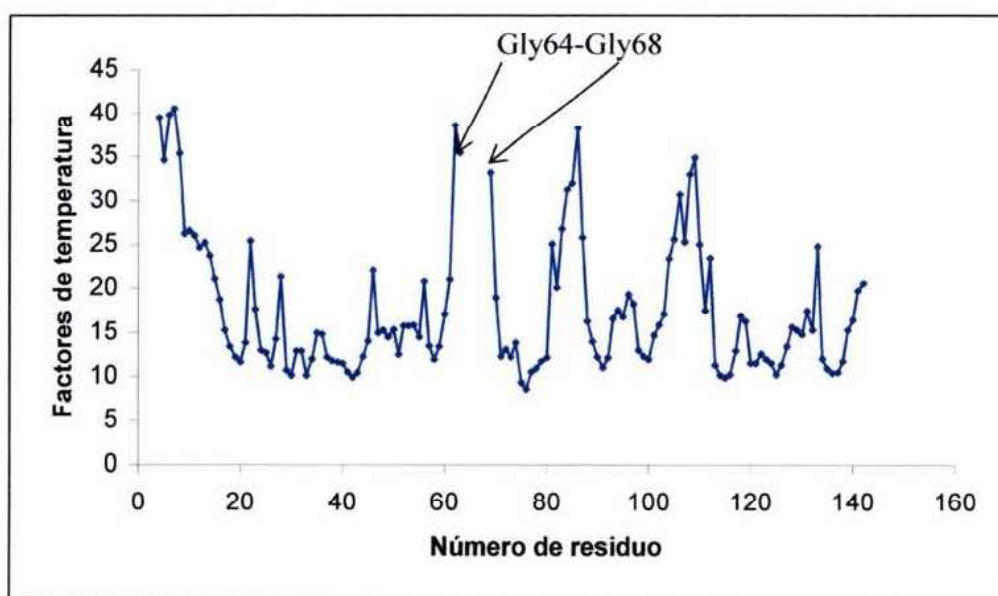


Figura 25. Factores de temperatura (B) vs número de residuo. Las flechas indican la región del asa Gly64-Gly68 que no pudo ser modelada.

La estructura tridimensional de la proteína ovocleidina-17 es la primer estructura resuelta por difracción de rayos X de una proteína específica de la sección intramineral de cascarón de huevo de *Gallus gallus*, y es la primera estructura de una proteína directamente involucrada en un proceso de biomineralización no patológico. Las coordenadas han sido depositadas en Protein Data Bank (PDB) con el código **PDB ID: 1GZ2**.

3.3 Influencia de la OC-17 sobre la cristalización del carbonato de calcio

SEM

Las proteínas usadas como controles no produjeron efectos relevantes sobre la morfología de los cristales de carbonato de calcio, por lo que su registro microfotográfico no se incluye en esta tesis.

Como se esperaba, en ausencia de la OC-17 se observaron cristales romboédricos de calcita (figura 26a), mientras que una fuerte agregación de cristales fue inducida por la presencia de la OC-17. Esta influencia fue directamente proporcional a la concentración de la proteína, como se muestra en la figura 26 b a i. En cuanto a su morfología, estos agregados cristalinos de CaCO_3 son muy similares a los observados en la zona mamilar del cascarón de huevo de *Gallus gallus* (figura 1). La fase mineral se mantiene como calcita dado que el hábito cristalino de la aragonita es generalmente acicular y el de la vaterita esferulítico.

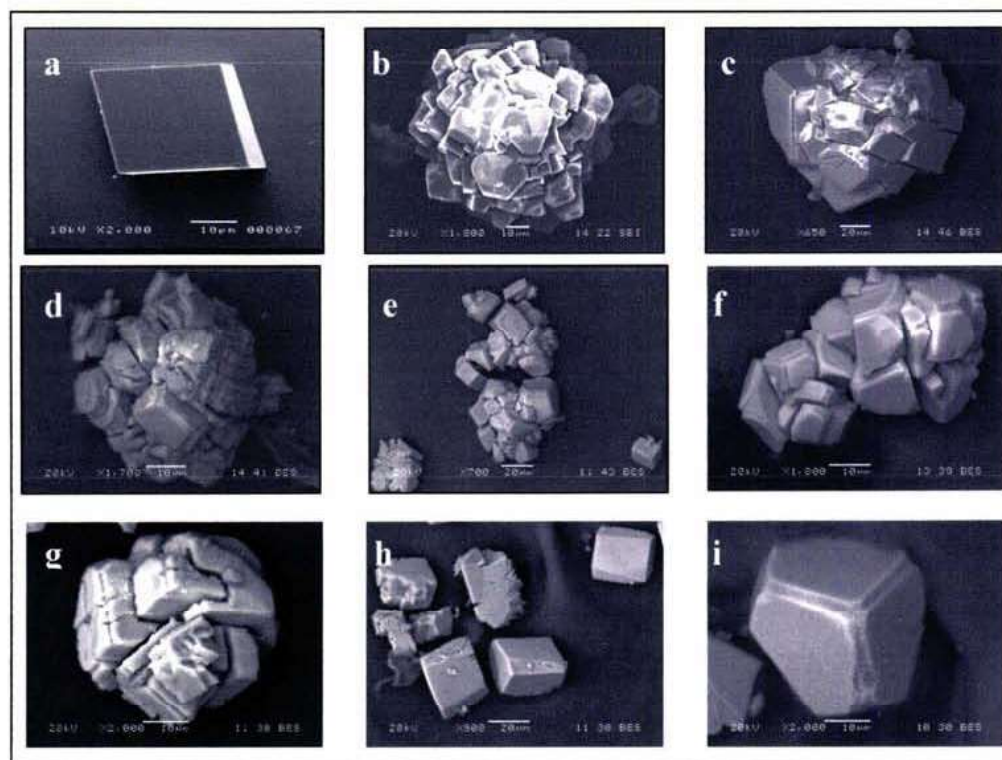


Figura 26. Micrografías de carbonato de calcio por SEM: (a) control, (b) 200 μg de OC-17, (c) 100 μg de OC-17, (d) 75 μg de OC-17, (e) 50 μg de OC-17, (f) 25 μg de OC-17, (g) 12.5 μg de OC-17, (h) 10 μg de OC-17, (i) 5 μg de OC-17.

La mayor influencia sobre la morfología de los cristales de carbonato de calcio se observó en el intervalo de entre 200 y 12.5 μg de proteína. Estas observaciones soportan la hipótesis de que la OC-17 tiene cierta influencia en el control del crecimiento de los cristales de calcita y como consecuencia juega un papel importante en la organización estructural y propiedades mecánicas del cascarón de huevo.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los experimentos de AFM sobre la ovocleidina-17 inmovilizada sobre mica, muestran que ésta tiende a agregarse formando así nanoesferas (figura 27), con una distribución de tamaños heterogénea.

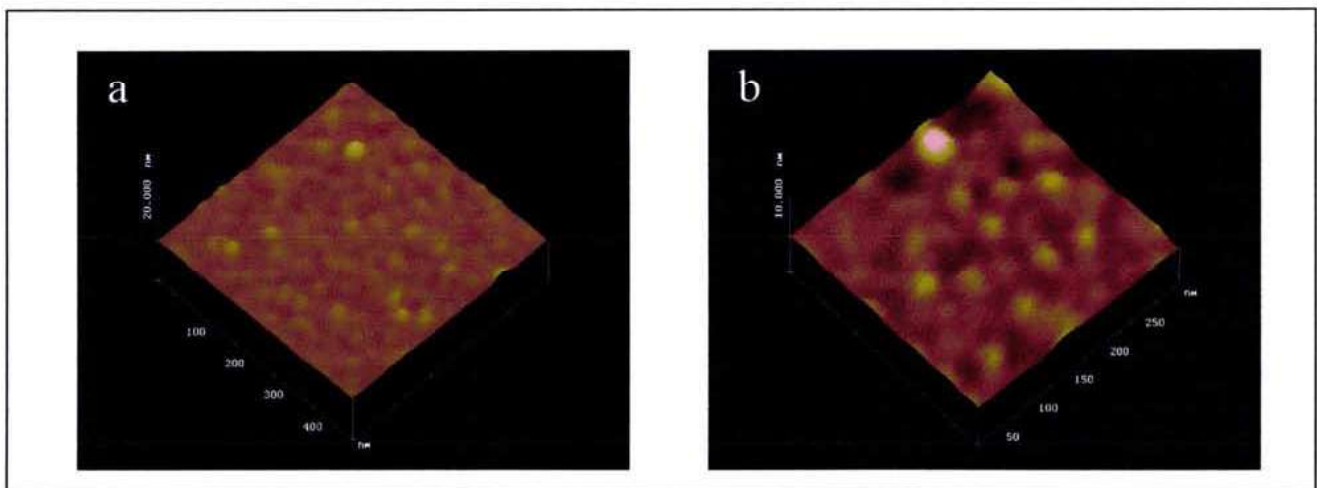


Figura 27. Nanoesferas de OC-17 observadas mediante microscopía de fuerza atómica. (a) 500 x 500 nm. (b) 250 x 250 nm.

Estas nanoesferas podrían ser las responsables de formar centros de nucleación, teniendo una influencia directa en el fenómeno de agregación de cristales de calcita, de manera similar a lo propuesto para las proteínas amelogeninas involucradas en la biomineralización del esmalte dental (Moradian-Oldak et al., 1998; Moradian-Oldak et al., 2000; Fincham et al., 1999).

3.4 Modelo preliminar de interacción OC17 – CaCO₃

Hasta ahora no existe un modelo de interacción para interfaces proteína-mineral. Sin embargo, se ha postulado que los aminoácidos con carga negativa y positiva posiblemente interactúan con los iones calcio y carbonato respectivamente, proveyendo de alguna manera de sitios específicos para la nucleación en los biominerales (Hare, 1963). En el modelo propuesto para el caso de una proteína anticongelante tipo II (antifreeze protein II = AFP II) del pez de la familia Hemitripterae, *Hemitripterus americanus*, cuya estructura fue resuelta por RMN (Gronwald et al., 1998) y que tiene un dominio similar al de lectina tipo-C, se demostró por mutagénesis dirigida que el sitio de unión a hielo es diferente al sitio de unión a carbohidratos (Loewen et al., 1998), mientras que para otra proteína del mismo tipo (AFP II), pero de arenque, se determinó que el sitio de interacción corresponde al sitio de unión a carbohidratos (Ewart et al., 1998).

Por otro lado, el papel que juega la proteína de cálculos pancreáticos humanos, litostatina, al inhibir o promover la cristalización del CaCO₃ es muy controvertido (Patard et al., 2003) y no existe más que un modelo de interacción de un undecapéptido producto de su hidrólisis (Gerbaud et al., 2000).

Con el modelo tridimensional de la ovocleidina-17 y las coordenadas cristalográficas reportadas para la calcita (Effenberger et al., 1981), se construyó manualmente un modelo preliminar de interacción. Para la construcción de este modelo se buscaron los aminoácidos cargados positiva y negativamente en la estructura de la OC-17 que se encontraran a las distancias adecuadas para interactuar ya sea con iones carbonato o calcio respectivamente en la red cristalina de la calcita. En esta búsqueda fue posible localizar una zona probable de interacción. Esta zona corresponde a la porción con carga negativa observada en la superficie molecular (figuras 23 y 24) de la ovocleidina-17.

En la figura 28 se muestra la celda unitaria de la calcita en donde la distancia entre dos iones calcio en los ejes a y b es de 4.98 Å, por lo que cada dos celdas unitarias hay dos iones calcio a una distancia de 9.97 Å. Esta distancia es muy similar a la que se encuentran el Asp72 y el Glu69 (9.79 Å) en la estructura de la OC-17, pudiendo interaccionar estos residuos con los iones calcio de los planos 100 y 010 de la calcita.

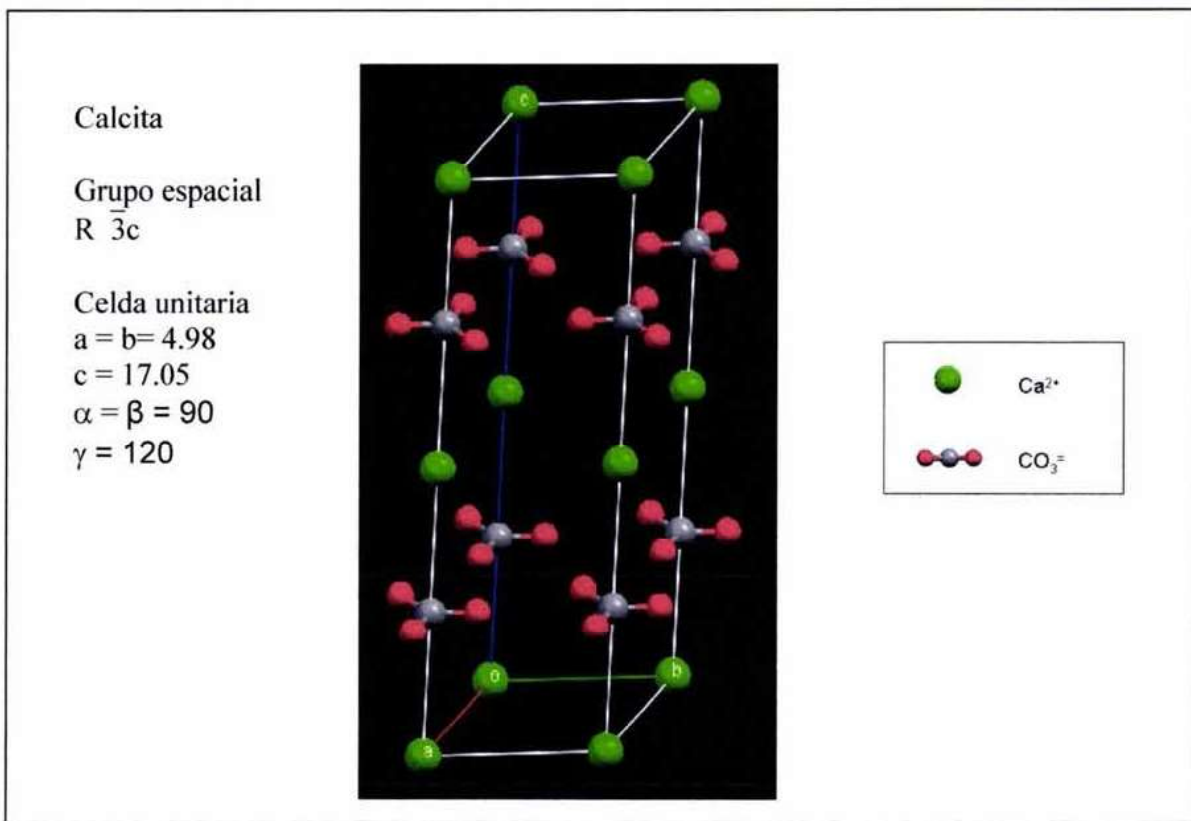


Figura 28. Celda unitaria de la calcita

En la figura 29a está representada la superficie molecular de la OC-17 y la posición del Asp72 y el Glu69. En la figura 29b y 29c se muestra la disposición de los iones calcio de cuatro celdas unitarias (2 x 2 en los ejes a y b) y su posible interacción con las cadenas laterales de los aminoácidos Asp72 y Glu69 (en la figura 29b no se incluyeron los iones carbonato por claridad en la figura). Las dos figuras se encuentran vistas desde el plano 001 de la calcita el cual corta al eje c.

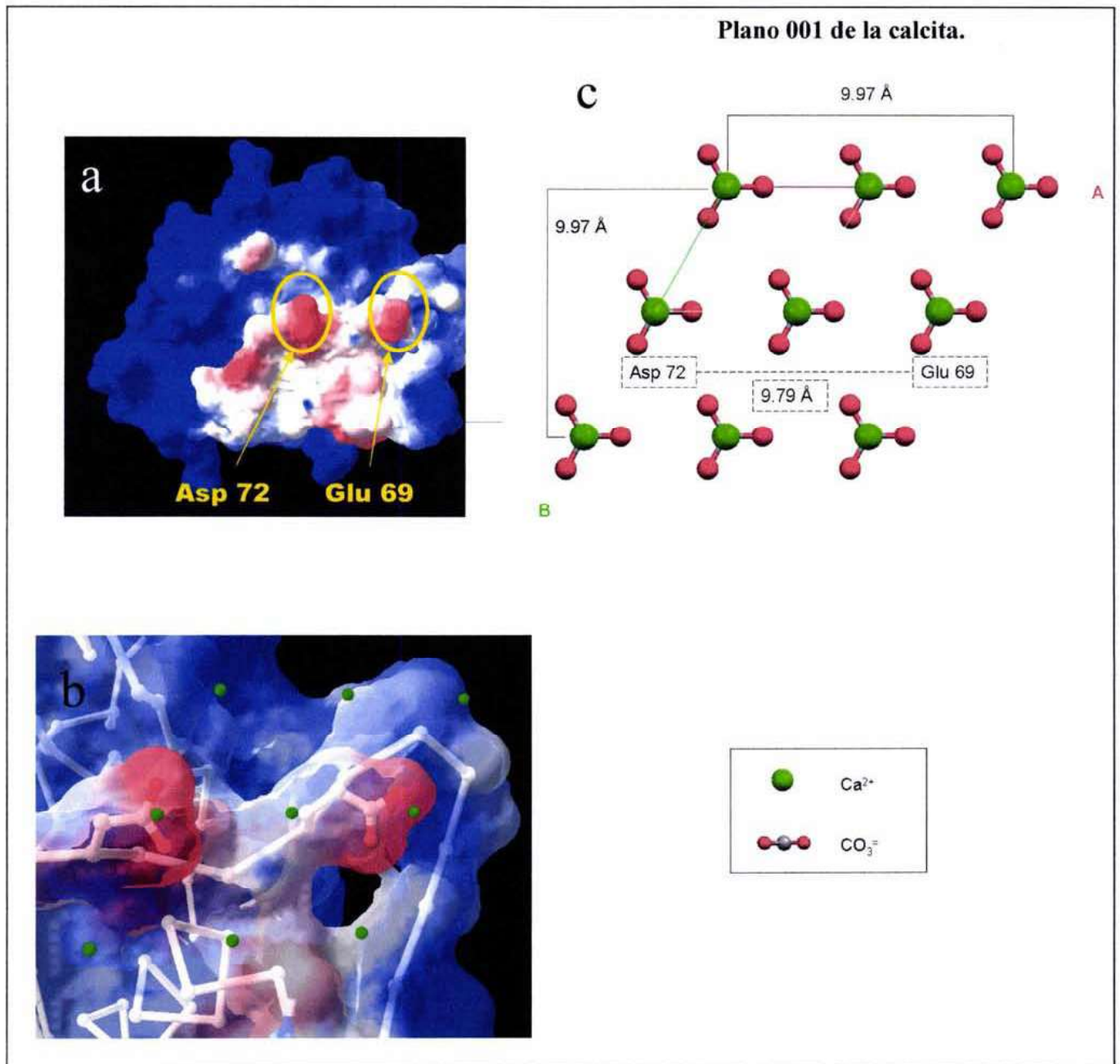


Figura 29. Modelo preliminar de interacción entre la ovocleidina-17 y la red cristalina de la calcita.

De ser posible esta interacción, cada 10 celdas unitarias de calcita en el eje A o B, se encontraría una molécula de proteína (figura 30). Estas proteínas podrían estar en un principio promoviendo la mineralización del carbonato de calcio. Extrapolando nuestro modelo a las posibles interacciones *in vivo*, la OC-17 podría estar jugando un papel importante en la biomineralización del cascarón de huevo.

Sin embargo, este es un modelo preliminar que debe ser ajustado geométrica y energéticamente, y eventualmente validado experimentalmente. No descartándose tampoco la participación de otras moléculas.

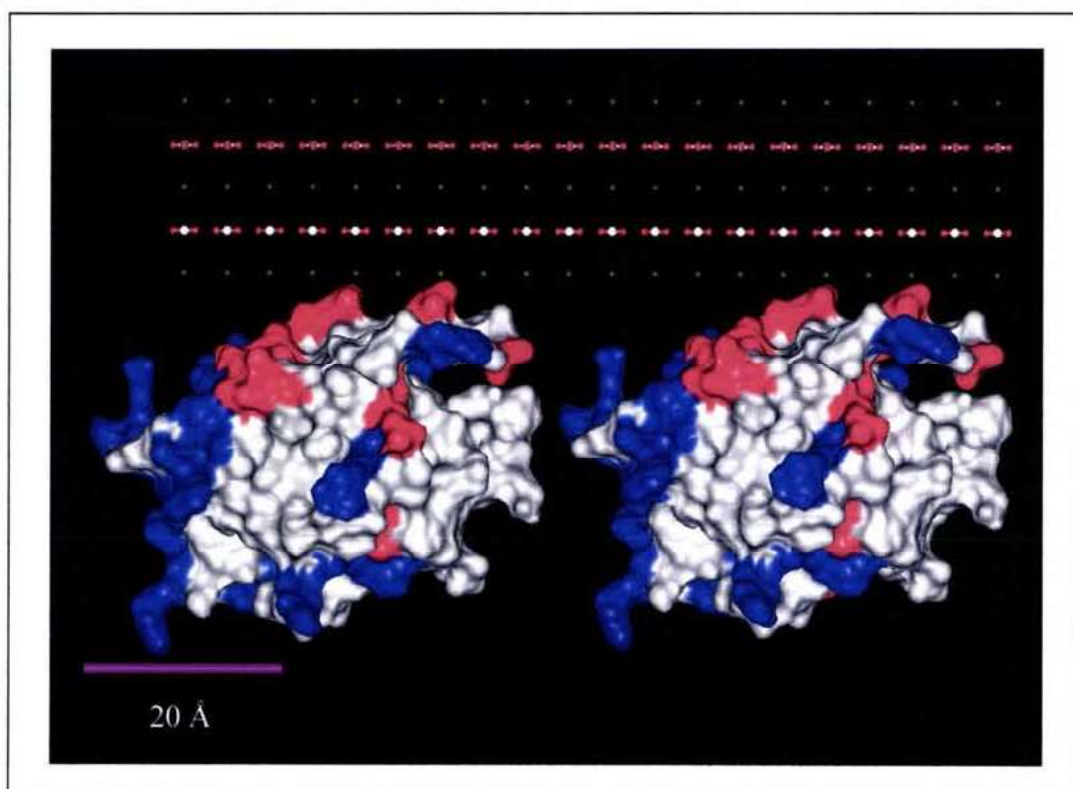


Figura 30. Posible orientación de la ovocleidina-17 en relación con la red de calcita (vista lateral). La superficie molecular de la OC-17 se encuentra en color rojo y azul para los aminoácidos con carga negativa y positiva respectivamente.

La ausencia de una orientación cristalográfica preferencial en la zona mamilar del cascarón de huevo, determinada por Silyn-Roberts & Sharp (1986) mediante difracción de rayos X de polvos, y el modelo generalmente propuesto, en el que la nucleación de

cristales ocurre alrededor de esferas de origen proteico y que todos los cristales crecen hacia afuera de la esfera con la misma dirección cristalográfica de manera radial, puede explicarse en parte con nuestro modelo de interacción ovocleidina 17 – calcita. En este modelo, la OC-17 estaría formando parte de estas esferas (nanoesferas) controlando la depositación de carbonato de calcio en sitios específicos como se muestra en la figura 31a. En la figura 31b se muestra el modelo de una nanoesfera de proteína sobre fibras de colágena, en donde el color rojo representa las cargas negativas expuestas para el control de la depositación del carbonato de calcio (basados en el modelo de las figuras 29 y 30), mientras que en azul se muestra el núcleo de la nanoesfera cargada positivamente. Sin embargo, es necesario tener evidencias experimentales que corroboren que estas nanoesferas pueden inducir la precipitación mineral a como lo hemos propuesto aquí.

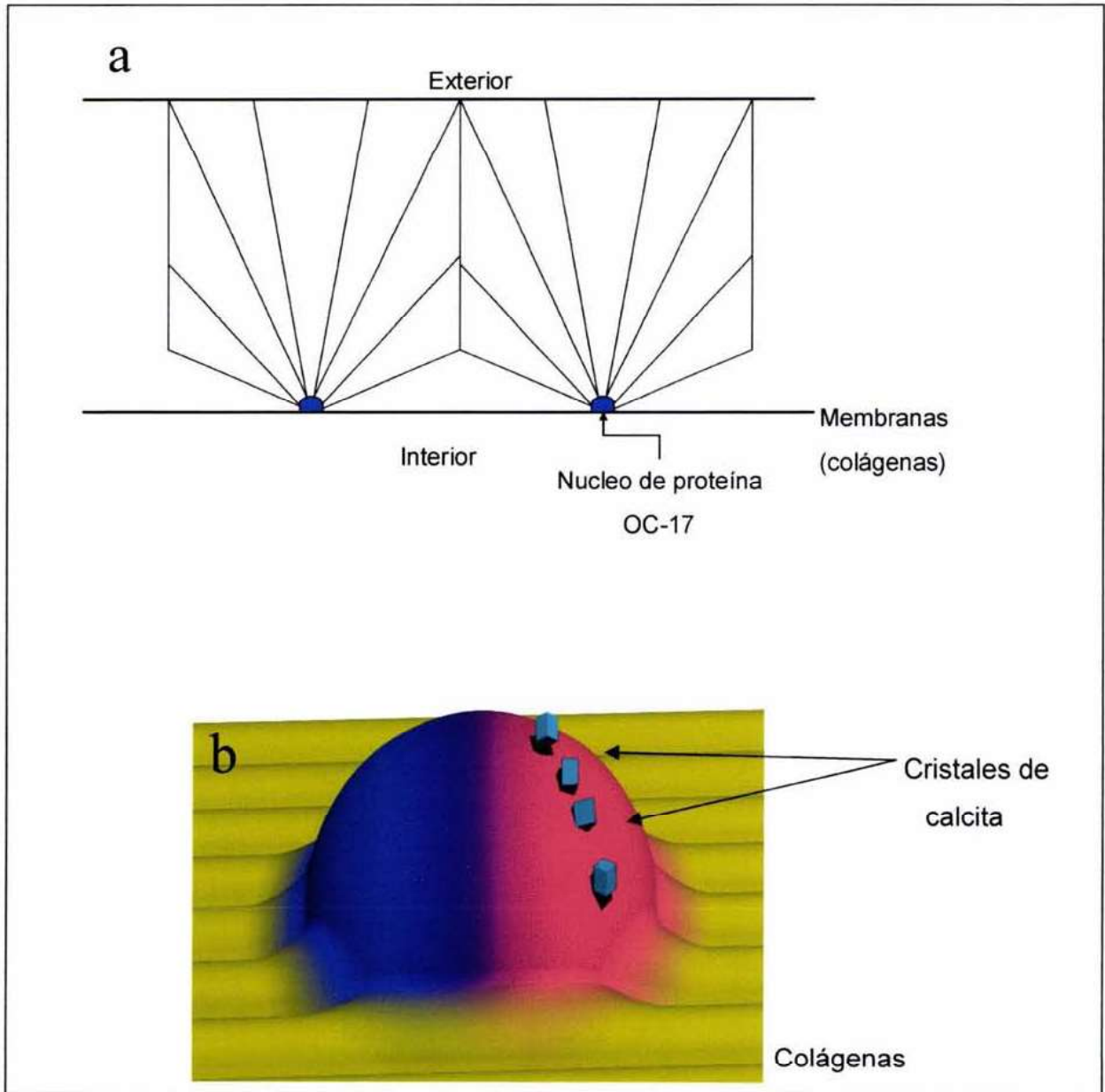


Figura 31. (a) Centros de nucleación compuestos por nanoesferas de OC-17. (b) Modelo de una nanoesfera de proteína controlando la deposición de cristales de calcita.

4. CONCLUSIONES GENERALES

- De los datos de aislamiento y purificación de la ovocleidina-17, concluimos que las modificaciones realizadas al protocolo descrito por Mann (1999), los cuales se encuentran en la sección 2.1.1, fueron óptimas para obtener la proteína en un estado de gran pureza (95%).
- De la optimización de las pruebas de cristalización, se deduce que la técnica más adecuada para obtener cristales de la OC-17 es la de difusión en fase vapor en gota sedente a una concentración de proteína de 6 mg/ml, usando como agente precipitante 6% de PEG 4000 en amortiguador de acetatos 0.1 M pH 4.6.
- La resolución estructural de la ovocleidina-17, la cual es la primera estructura resuelta de una proteína de la sección intramineral de cascarón de huevo de *Gallus gallus*, y la primer estructura de una proteína directamente involucrada en un proceso de biomineralización no patológico, muestra que el plegamiento general es muy similar al de la litostatina (1LIT) de cálculos pancreáticos humanos, siendo las asas las partes en las que hay una mayor diferencia. El plegamiento corresponde a un dominio globular que consiste de 3 hélices y 8 hebras β que forman dos láminas β antiparalelas. De las hélices, dos son del tipo α y una del tipo 3_{10} . Asimismo, en la estructura se encuentran tres puentes disulfuro formados entre la Cys5-Cys16, Cys33-Cys138, Cys113-Cys130, los cuales se encuentran incluidos en el dominio largo de lectinas tipo C. De manera similar a la litostatina, la ovocleidina-17 no contiene ni en secuencia ni en posición a los aminoácidos responsables de formar un anillo de coordinación con el ion Ca^{2+} para la subsecuente unión a polisacáridos.
- Las pruebas de hemoaglutinación para la detección de lectinas, las cuales fueron negativas para la OC-17, sugieren que esta proteína no es una lectina, tal como se había predicho en función de la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional.
- De los experimentos de la influencia *in vitro* sobre la morfología macroscópica de cristales de carbonato de calcio se deduce que la OC-17 tiene un papel fundamental en el control de la depositación mineral, pero no hay que descartar que pueden establecerse procesos sinérgicos de interacción *in vivo*.

-
- De los estudios de agregación determinados por técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS), se observó que la temperatura tiene un marcado efecto sobre OC-17, lo cual podría ser un indicio de su estado funcional *in vivo* formando nanoesferas a como lo observamos mediante microscopía de fuerza atómica de la proteína inmovilizada sobre mica.
 - El modelo preliminar de interacción proteína-mineral muestra que los residuos Glu69 y Asp72 podrían interactuar con iones calcio cada dos celdas unitarias en el eje A y B de la calcita.
 - De ser posible la interacción propuesta en el modelo, esto podría explicar la ausencia de una dirección cristalográfica preferencial en la zona mamilar del cascarón de huevo, sin embargo es necesario contar con nuevas evidencias experimentales que corroboren esta hipótesis.

5. REFERENCIAS

- Arias, J.L., Fink, D.J., Xiao, S.P., Heuer, A.H. & Caplan, A.I. 1993. Biomineralization and eggshell: cell mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *International Review of Cytology*. 145, 217-250.
- Bertrand, J. A, Pignol, D., Bernard, J.P., Verdier, J.M., Dagorn, J.C., Fontecilla-Camps, J.C. 1996. Crystal structure of human lithostathine, the pancreatic inhibitor of stone formation. *EMBO J*. 15, 2678-2684.
- Brunger, A.T. 1992. The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*. 355, 472-474.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., & Warren, G.L. 1998. Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination, *Acta Cryst*. D54, 905-921.
- Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr*. D 50, 760-763.
- Chasteen, N.D., & Harrison, P.M. 1999. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *Journal of Structural Biology*. 126, 182-194.
- Chow, G-M. & K, Gonsalves. (ed). 1996. Nanotechnology. Molecularly designed materials. ACS Symposium series 622. American Chemical Society. USA. 413pp.
- DeLano, W.L. 2002. The PyMOL Molecular Graphics System on World Wide Web <http://www.pymol.org>
- Ducruix, A. & R, Giegé. (ed). 1992. Crystallization of nucleic acids and proteins. Oxford University Press. USA. pp.127-143.
- Effenberger, H., Mereiter, K. & Zemann, J. 1981. Crystal structure refinements of magnesite, calcite, rhodochrosite, siderite, smithsonite, and dolomite, with discussion of some aspects of the stereochemistry of calcite type carbonates. *Z. Krist*. 156, 233-243.
- Ewart, K.V., Li, Z., Yang, D.S.C., Fletcher, G.L., & Hew, Ch. L. 1998. The ice-binding site of atlantic herring antifreeze protein corresponds to the carbohydrate-binding site of C-type lectins. *Biochemistry*. 37, 4080-4085.

- Fernández, M.S., Araya, M., & Arias, J.L. 1997. Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biology*. 16, 13-20.
- Fincham, A.G., Moradian-Oldak, J., Simmer, J.P. 1999. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *Journal of Structural Biology*. 126, 270–299.
- Gautron, J., Bain, M., Solomon, S. and Nys, Y. 1996. Soluble matrix of hen's eggshell extracts changes in vitro the rate of calcium carbonate precipitation and crystal morphology. *British Poultry Science*. 37 (4), 853.
- Gautron J, Hincke, M.T & Nys Y. 1997. Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connect Tissue Res*. 36, 195-210.
- Gerbaud, V., Pignol, D., Loret, E., Bertrand, J.A., Berland, Y., Fontecilla-Camps, J-C., Canselier, J.P., Gabas, N., & Verdier, J-M. 2000. Mechanism of calcite crystal growth inhibition by the N-terminal undecapeptide of lithostathine. *Journal of Biological Chemistry*. 275(2), 1057-1064.
- Gronwald, W., Loewen, M.C., Lix, B., Daugulis, A.J., Sönnichsen, F.D., Davies, P.L. & Sykes, B.D. 1998. The solution structure of type II antifreeze protein reveals a new member of the lectin family. *Biochemistry*. 37, 4712-4721.
- Hahn, T. (ed). 2002. *International Tables for Crystallography. Volume A: Space-group symmetry*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands. 912 pp.
- Hare, P.E. 1963. Amino acids in the proteins from aragonite and calcite in the shells of *Mytilus californianus*. *Science*. 139, 216-217.
- Hecker, A., Testenière, O., Marin, F. & Luquet, G. 2003. Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of Orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures. *FEBS Letters*. 535, 49-54.
- Hincke, M.T. 1995. Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. *Connect. Tissue Res*. 31, 227-233.
- Hincke, M.T., Tsang, C.P.W., Courtney, M., Hill, V. & Narbaitz, R. 1995. Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17). *Calcif. Tiss. Int*. 56, 578-583.

- Hincke, M. T., Gautron, J., Panheleux, M., Garcia-Ruiz, J. M., McKee, M. D. & Nys, Y. 2000. Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and shell matrix. *Matrix Biol.* 19, 443-453
- Hull, D. 1981. *An introduction to composite materials.* Cambridge University Press. USA. 246 pp.
- Jancarik, J. & S-H, Kim. 1991. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* 24: 409-411.
- Jiménez-Lopez, C., Rodriguez-Navarro, A., Dominguez-Vera, J.M. & Garcia-Ruiz, J.M. 2003. Influence of lysozyme on the precipitation of calcium carbonate: A kinetic and morphologic study. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 67 (9), 1667–1676.
- Kraulis, P. 1991. MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *Journal of Applied Crystallography.* 24, 946-950.
- Lakshminarayanan, R., Manjunatha Kini, R. and Valiyaveetil, S. 2002. Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix. *PNAS.* 99 (8), 5155-5159.
- Laskowski, R. A., Arthur, M. W. Mac, Moss, D. S., & Thornton, J. M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 283-291.
- Leslie, A.G.W. 1992. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography,* No. 26.
- Loewen, M.C., Gronwald, W., Sönnichsen, F.D., Sykes, B.D., & Davies, P.L. 1998. The ice-binding site of sea raven antifreeze protein is distinct from the carbohydrate-binding site of the homologous C-type lectin. *Biochemistry.* 37, 17745-17753.
- Lowenstam, H. 1981. Minerals formed by organisms. *Science.* 211, 1126-1131.
- Mann, K. & F. Siedler. 1999. The aminoacid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer. *Biochemistry and molecular biology international.* 47, 997-1007.
- Mann, K. 1999. Isolation of a glycosylated form of the chicken eggshell protein ovocleidin and determination of the glycosylation site. *Alternative glycosylation/phosphorylation at an N-glycosylation sequon.* *FEBS Letters.* 463,12-14.

- Mann, K., Weiss, I.M., André, S., Gabius, H-J. & Fritz, M. 2000. The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevigata*) nacre protein perlucin. Detection of a functional C-type lectin domain with galactose/mannose specificity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5257-5264.
- Mann, S., Webb, J & Williams, J.P. (ed). 1989. *Biom mineralization. Chemical and biochemical perspectives.* VCH. N.Y. USA. 541 pp.
- Mann, S. 2001. *Biom mineralization. Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry.* Oxford University Press. 198 pp.
- Mark, J.E. & Y-C, Lee. (ed). 1995. *Hybrid organic-inorganic composites.* ACS Symposium series 585. American Chemical Society. USA. 378pp.
- McPherson, A. 1990. Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* 189, 1-23.
- Merritt, E.A. & Murphy, M.E.P. 1994. Raster3D version 2.0. A Program for photorealistic molecular graphics. *Acta Cryst.* D50, 869-873.
- Mizuno, M., Fujimoto, Z., Koizumi, M., Kano, H., Atoda, H., & Morita, T. 1999. Crystal structure of coagulation factor ix-binding protein from habu snake venom at 2.6 Å: implication of central loop swapping based on deletion in the linker region. *JMB.* 289, 103-112.
- Moradian-Oldak, J., Tan, J., Fincham, A.G. 1998. Interaction of amelogenin with hydroxyapatite crystals: An adherence effect through amelogenin molecular self-association. *Biopolymers.* 46, 225–238.
- Moradian-Oldak, J., Paine, M.L., Lei, Y.P., Fincham, A.G., & Snead, M.L. 2000. Self-assembly properties of recombinant engineered amelogenin proteins analyzed by dynamic light scattering and atomic force microscopy. *Journal of structural biology.* 131, 27-37.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.*, A50, 157-163.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R. & Honig, B. 1993. Grasp: a graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.* 64:A166.

- Panheleux, M., Kalin, O., Gautron, J. & Nys, Y. 1999a. Features of eggshell formation in guinea fowl : kinetics of shell deposition, uterine protein secretion and uterine histology. *British poultry science*. 40, 632-643.
- Panheleux, M., Bain, M., Fernández, M.S., Morales, I., Gautron, J., Arias, J.L., Solomon, S.E., Hincke, M. & Nys, Y. 1999b. Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: a comparative study. *British Poultry Science*. 40, 240-252.
- Patard, L., Lallemand, J-Y. & Stoven, V. 2003. An insight into the role of human pancreatic lithostathine. *JOP. J Pancreas (Online)*. 4, 92-103.
- PhastSystem Separation Technique File No. 111. 1998. Amersham Biosciences.
- Rodriguez-Navarro, A., Messier, R., Jimenez-Lopez, C., & Garcia-Ruiz, J.M. 2000. Importance of electrostatic interactions between calcite surfaces and proteins. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 599, 353–359.
- Roussel, A. & Cambillau, C. 1989. Turbo-Frodo. Silicon Graphics Geometry Partners Directory. Pp. 77-79. Silicon Graphics, Mountain View, CA.
- Sarashina, I. & Endo, K. 1998. Primary structure of a soluble matrix protein of scallop shell: Implications for calcium carbonate biomineralization. *American Mineralogist*. 83, 1510–1515.
- Sarikaya, M. 1994. An introduction to biomimetics: a structural viewpoint. *Microscopy Research and Technique*. 27, 360-375.
- Solomon, S.E. 1999. An egg ist ein ei, es un huevo, est un oeuf. *British Poultry Science*. 40, 5-11.
- Souza, D., Selistre-de Araujo, H., Garratt, R. 2000. Determination of the three-dimensional structure of toxins by protein crystallography. *Toxicon*. 38, 1307-1353.
- Silyn-Roberts, H. & Sharp, R.M. 1986. Crystal growth and the role of the organic network in eggshell biomineralization. *Proc. Roy. Soc. London B*. 227, 303-324.
- Tyler, C. 1964. Wilhelm von Nathusius 1821-1899 on avian eggshells. University of Reading, UK. 104 pp.
- Watabe, N. 1974. Crystal growth of calcium carbonate in biological systems. *Journal of Crystal Growth*. 24/25, 116-122.

-
- Weiss, M., Kaufmann, S., Mann, K. & Fritz, M. 2000. Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*. *Biophys. Biochem. Res. Comm.* 267, 17-21.
 - Wilt, F. 1999. Matrix and mineral in the sea urchin larval skeleton. *Journal of Structural Biology.* 126, 216–226.
 - Weiner, S. & Addadi, L. 2002. At the cutting edge. *Science.* 298, 375-376.
 - Wolfgang, K. & Sander, Ch. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers.* 22, 2577-637.
 - Young, J., Davis, S. A., Bown, P.R., & Mann, S. 1999. Coccolith ultrastructure and biomineralisation. *Journal of Structural Biology.* 126, 195–215.
 - Zelensky, A. & Gready, J. 2003. Comparative analysis of structural properties of the C-type-lectin-like domain (CTLTD). *Proteins.* 52, 466-477.

APÉNDICE A. ÍNDICE DE FIGURAS.

- Figura 1. Micrografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) en vista transversal del cascarón de huevo de *Gallus gallus*.
- Figura 2. Diagrama de fases (Ostwald-Miers).
- Figura 3. Alineación de secuencias entre la ovocleidina-17 y la litostatina de cálculos pancreáticos humanos.
- Figura 4. Primeros datos obtenidos con MOSFLM del autoindizado antes del afinamiento de la celda unitaria.
- Figura 5. Valores de R_{sym} para diferentes grupos espaciales trigonales y hexagonales.
- Figura 6. Solución dada para el reemplazo molecular con el grupo espacial $P3_221$ por el programa AMORE.
- Figura 7. Sistema experimental para la síntesis de cristales de $CaCO_3$.
- Figura 8. SDS-PAGE. Gel homogéneo 15%. Proteínas intraminerales.
- Figura 9. Cromatograma del extracto intramineral usando una columna Vydac C-4 de HPLC fase reversa.
- Figura 10. SDS-PAGE. Gel homogéneo 20%. OC-17 purificada.
- Figura 11. Efecto de la temperatura sobre el estado de agregación de la proteína ovocleidina-17.
- Figura 12. Cristales de Ovocleidina-17.
- Figura 13. Monocristal de Ovocleidina-17.
- Figura 14. Patrón de difracción de rayos X obtenido en sincrotrón.
- Figura 15. Datos cristalográficos obtenidos en sincrotrón.
- Figura 16. Gráfica de Ramachandran de la OC-17.
- Figura 17. Representación esquemática de la estructura de la OC-17.
- Figura 18. Secuencia de aminoácidos y elementos de estructura secundaria de la OC-17.
- Figura 19. Mapa de densidad electrónica de la zona del puente disulfuro Cys5-Cys16.
- Figura 20. Mapa de densidad electrónica en la zona de la serina fosforilada (SEP61).
- Figura 21. Superposición OC-17-Litostatina-RMBP.
- Figura 22. Alineamiento de secuencias.
- Figura 23. Superficie molecular de la OC-17 en tres diferentes orientaciones.

-
- Figura 24. Potencial electrostático de la superficie molecular de la OC-17.
- Figura 25. Factores de temperatura de la OC-17.
- Figura 26. Influencia de la OC-17 sobre la cristalización de CaCO_3 .
- Figura 27. Nanoesferas de OC-17 observadas mediante microscopía de fuerza atómica.
- Figura 28. Celda unitaria de la calcita.
- Figura 29. Modelo preliminar de interacción entre la ovocleidina-17 y la calcita.
- Figura 30. Posible orientación de la ovocleidina-17 en relación con la red de calcita.
- Figura 31. Modelo del control de la depositación de cristales de calcita sobre nanoesferas de proteína.

APÉNDICE B. Composición de las 50 condiciones experimentales del Hampton Research Crystal Screen 1

Crystal Screen

Reagent Formulation

Tube Number	Salt	Tube Number	Buffer †	Tube Number	Precipitant
1.	0.02 M Calcium Chloride dihydrate	1.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	1.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
2.	None	2.	None	2.	0.4 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
3.	None	3.	None	3.	0.4 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
4.	None	4.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	4.	2.0 M Ammonium Sulfate
5.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	5.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	5.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
6.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	6.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	6.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
7.	None	7.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	7.	1.4 M Sodium Acetate trihydrate
8.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	8.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	8.	30% v/v iso-Propanol
9.	0.2 M Ammonium Acetate	9.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	9.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
10.	0.2 M Ammonium Acetate	10.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	10.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
11.	None	11.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	11.	1.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
12.	0.2 M Magnesium Chloride hexahydrate	12.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	12.	30% v/v iso-Propanol
13.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	13.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	13.	30% v/v Polyethylene Glycol 400
14.	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	14.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	14.	28% v/v Polyethylene Glycol 400
15.	0.2 M Ammonium Sulfate	15.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	15.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
16.	None	16.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	16.	1.5 M Lithium Sulfate monohydrate
17.	0.2 M Lithium Sulfate monohydrate	17.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	17.	30% Polyethylene Glycol 4000
18.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	18.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	18.	20% Polyethylene Glycol 8000
19.	0.2 M Ammonium Acetate	19.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	19.	30% v/v iso-Propanol
20.	0.2 M Ammonium Sulfate	20.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	20.	25% w/v Polyethylene Glycol 4000
21.	0.2 M Magnesium Acetate tetrahydrate	21.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	21.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
22.	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	22.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	22.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
23.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	23.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	23.	30% v/v Polyethylene Glycol 400
24.	0.2 M Calcium Chloride dihydrate	24.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	24.	20% v/v iso-Propanol
25.	None	25.	0.1 M Imidazole pH 6.5	25.	1.0 M Sodium Acetate trihydrate
26.	0.2 M Ammonium Acetate	26.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	26.	30% v/v 2-Methyl-2,4-pentanediol
27.	0.2 M tri-Sodium Citrate dihydrate	27.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	27.	20% v/v iso-Propanol
28.	0.2 M Sodium Acetate trihydrate	28.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	28.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
29.	None	29.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	29.	0.8 M Potassium Sodium Tartrate tetrahydrate
30.	0.2 M Ammonium Sulfate	30.	None	30.	30% w/v Polyethylene Glycol 8000
31.	0.2 M Ammonium Sulfate	31.	None	31.	30% w/v Polyethylene Glycol 4000
32.	None	32.	None	32.	2.0 M Ammonium Sulfate
33.	None	33.	None	33.	4.0 M Sodium Formate
34.	None	34.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	34.	2.0 M Sodium Formate
35.	None	35.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	35.	0.8 M mono-Sodium dihydrogen phosphate 0.8 M mono-Potassium dihydrogen phosphate
36.	None	36.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	36.	8% w/v Polyethylene Glycol 8000
37.	None	37.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	37.	8% w/v Polyethylene Glycol 4000
38.	None	38.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	38.	1.4 M tri-Sodium Citrate dihydrate
39.	None	39.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	39.	2% v/v Polyethylene Glycol 400, 2.0 M Ammonium Sulfate
40.	None	40.	0.1 M tri-Sodium Citrate dihydrate pH 5.6	40.	20% v/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
41.	None	41.	0.1 M HEPES - Na pH 7.5	41.	10% v/v iso-Propanol, 20% w/v Polyethylene Glycol 4000
42.	0.05 M mono-Potassium dihydrogen Phosphate	42.	None	42.	20% w/v Polyethylene Glycol 8000
43.	None	43.	None	43.	30% w/v Polyethylene Glycol 1500
44.	None	44.	None	44.	0.2 M Magnesium Formate
45.	0.2 M Zinc Acetate dihydrate	45.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	45.	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
46.	0.2 M Calcium Acetate hydrate	46.	0.1 M Sodium Cacodylate pH 6.5	46.	18% w/v Polyethylene Glycol 8000
47.	None	47.	0.1 M Sodium Acetate trihydrate pH 4.6	47.	2.0 M Ammonium Sulfate
48.	None	48.	0.1 M Tris Hydrochloride pH 8.5	48.	2.0 M mono-Ammonium dihydrogen Phosphate
49.	1.0 M Lithium Sulfate monohydrate	49.	None	49.	2% w/v Polyethylene Glycol 8000
50.	0.5 M Lithium Sulfate monohydrate	50.	None	50.	15% w/v Polyethylene Glycol 8000

† Buffer pH is that of a 1.0 M stock prior to dilution with other reagent components; pH with HCl or NaOH.

Crystal Screen contains fifty unique reagents. To determine the formulation of each reagent, simply read across the page.



Solutions for Crystal Growth

34 Journey
Aliso Viejo, CA 92656-3317 U.S.A.
Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
e-mail: tech@hrmail.com
Website: www.hamptonresearch.com

© 2000-2005 Hampton Research Corp. all rights reserved
Printed in the United States of America. This guide or parts thereof may not be reproduced in any form without the written permission of the publishers.

**CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY ANALYSIS
OF OVOCLEIDIN-17 A MAJOR PROTEIN OF THE *Gallus gallus*
EGGSHELL CALCIFIED LAYER**

¹Juan Pablo Reyes-Grajeda, ¹David Jáuregui-Zúñiga, ¹Adela Rodríguez-Romero, ¹Alejandra Hernández-Santoyo, ²Victor M. Bolanos-Garcia and Abel Moreno

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química U.N.A.M. Circuito Exterior, C.U. México, D.F. 04510 México. ²Department of Biochemistry, Cambridge University CB2 1GA, Cambridge, UK.

Abstract: In this work, we report the crystallization of ovocleidin-17, the major protein of the avian eggshell calcified layer and the preliminary X-ray characterization of this soluble protein which is implied into the CaCO₃ formation of the eggshell in avians. Crystals belong to one of the trigonal space group P3 with cell dimensions a = b = 59.53 Å and c = 83.33 Å, and $\alpha = \beta = 90^\circ$ and $\gamma = 120^\circ$. Crystals diffract up to 3.0 Å.

INTRODUCTION

The avian eggshell acts as a mineral coat protectant of many species. From the evolutionary viewpoint the eggshell not only protects the embryo against microorganisms but also controls the dose of water, gases and the ionic exchange as well as the calcium provision for the avian skeleton formation [1]. The eggshell as a natural nanocomposite material is obtained in less than 24 hours [2]. In terms of the biomineralization phenomena, the knowledge about the ultrastructure of the eggshell is a quite interesting task for understanding the organic-inorganic interactions in living organisms. The knowledge of the structure-function relationship is essential from the biological point of view in order to understand fundamental evolutionary aspects of mineral coats protectants in general and of ovocleidin-17, in particular. Moreover, based on this knowledge, it might be possible to better design strategies to preserve species that face risk of extinction.

In avian eggshells, there are several specific proteins of the intra-mineral compartment, including ovocleidin-17, which is the major soluble protein of the calcified layer. It consists of 142 amino acids residues including two phosphorylated serines. The sequence of this protein reported by Mann and Siedler shows a single C-type lectin-like domain (CTL.D). We have also determined that this protein contains 30 % of structural similarity with litostatine that is implied in the pancreas stones disease [3]. In this work, we report the

crystallization of the protein ovocleidin-17 from the intra-mineral part of the eggshell calcified layer in *Gallus gallus* and its preliminary X-ray analysis.

MATERIALS AND METHODS

Protein purification was done essentially as described by Mann and Siedler [3]. All steps in the purification scheme were done at 4 °C. Eighteen not fertilized eggs from *Gallus gallus* were properly washed to remove the internal content. The membrane and the cuticle were removed after treatment using a 5% (w/v) EDTA (Aldrich 10, 631-3) solution for 30 minutes and clean eggshells were ground. Then all biological macromolecules were extracted from the mineral powder using a solution 20% (v/v) acetic acid (Sigma A-6283) (10 milliliters of acetic acid per gram were added to the eggshell powder). The solution was kept and stirred during 24 h. The extract was centrifuged at 22,100 x g for 90 minutes. The supernatant was dialyzed against 5 x 10 volumes of acetic acid (5% v/v) containing 5 mM EDTA and 0.025% (w/v) sodium azide. To precipitate all proteins, ammonium sulfate (Sigma A-6387) was added to saturate the dialyzed solution. After 24 h, the solution was centrifuged at 64,500 x g during 50 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended and dialyzed against 10% (v/v) acetic acid in order to remove the ammonium sulfate. The resulting solution was centrifuged at 29,500 x g during 5 minutes and the supernatant solution was filtered using PVDF filters of 0.2 µm. The solution was then injected to a Vydac C4 HPLC reverse phase column (50 X 4.6 mm) and eluted using a gradient of acetonitrile (30 to 70 %) with 0.1 % (v/v) TFA for 10 minutes at a rate flow of 0.5 ml/min. The molecular weight of the protein was 17,000 as determined by SDS-PAGE. Nevertheless, using the amino acid sequence of the protein, a molecular weight value of 15,300 was obtained [4]. Mann and Siedler reported the sequence and the molecular weight of this protein by using mass spectrometry giving a value of 15,454. A biophysical characterization of the molecular weight of the protein solution using dynamic light scattering methods was done as described in reference [5]. This discrepancy found in the MW determination by SDS-PAGE of ovocleidin-17 compared to mass spectrometry, the amino acid sequence of this protein, and our biophysical determination by dynamic light scattering methods could be explained from the basis of the transport phenomena either in solution or in gel media. Any protein in solution behaves different, based on its movility and diffusivity properties, than into a porous material (SDS-PAGE, using polyacrylamide's gel). In several methods, the MW is determined by the use of diffusion coefficients and the Stokes-Einstein equation. So that, it is plausible to express that the molecular weight determination by mass spectrometry and the amino acid sequence is usually recommended as the most precise determination for biochemical and biophysical calculations.

On the other hand, crystals suitable for X-ray analysis were obtained by the sitting-drop vapor diffusion method [6]. Five microliters of freshly purified protein solution at a concentration of 12.5 mg/ml, were mixed with 5 microliters of reservoir solution containing 0.1 M Na Acetate buffer pH 4.6, 8% (w/v) PEG 4000 (Reagent 37, Hampton Research KIT 1); crystals appeared after 10 to 20 days at 4°C. The crystals obtained

diffracted up to 3.0 Å using a Rigaku rotating anode generator (100kV, 50 mA) and an R-Axis IIC imaging plate detector at a crystal/detector distance of 100 mm., 31 frames of 45 min were collected using an oscillation range of 2°, and the raw data were processed using the Biotex Program. Additionally, the DENZO Program [8] and CCP4 [9] were also used to reduce the data.

RESULTS AND DISCUSSION

Under the conditions described above, suitable crystals for X-ray analysis were obtained (Figure 1). The crystals belong to the trigonal space group P3 with cell dimensions $a = b = 59.53\text{Å}$, $c = 83.33\text{Å}$ and $\alpha = \beta = 90^\circ$ and $\gamma = 120^\circ$. On the basis of the space group and unit cell volume, there were six asymmetric units per cell. The size of the crystals was 0.2 x 0.05 x 0.05 mm. The amount of solvent in the crystal was determined by the Matthews formula [7]. For this calculation a molecular weight of 15,454 was considered. We determined the same molecular weight by means of light scattering techniques using the Kratochvil's equation and the total intensity light scattering (TILS) method using the DYNAMICS software provided by Protein Solutions Co. [5].

$$V_{\text{protein}} = 1.23 / V_M \quad \text{therefore the } V_{\text{solvent}} = 1 - (1.23/V_M)$$

Where $V_M = V_{\text{cell}} / (\text{MW } Z)$ and where, V_{cell} = volume of the unit cell (Å^3), and Z = number of the asymmetric units per unit cell. For the space group P3, $Z=6$ and $\text{MW} = 15,454$. The amount of the protein in the crystal is therefore $255,743 \text{ Å}^3 / (15,454 \times 6)$, $V_M = 2.76$, $V_{\text{protein}} = 1.23 / 2.76 = 0.446$. In consequence, the volume of solvent is 55.4%.

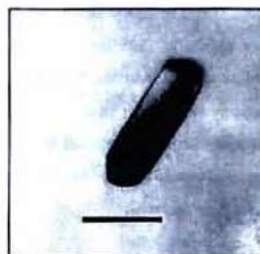


Figure 1. Crystal of ovoceleidin-17 from *Gallus gallus* eggshell grown at 4°C in 8 % (v/v) PEG 4000, pH 4.6. Trigonal crystal as described in the text was 0.2 x 0.05 x 0.05 mm. Bar scale corresponds to 0.1 mm.

Statistics on the collection of the diffraction data are given in the next table.

Table 1. Data Collection Statistics of ovocleidin-17 from *Gallus gallus* eggshell

Space group	P3
Unit cell parameters	a=b= 59.53, c= 83.33, $\alpha=\beta=90^\circ$ $\gamma=120^\circ$
Resolution limit (Å)	3.0
Specific volume	2.76
Number of Asymmetric units	6
Number of total reflections	29,400
Number of unique reflections	6,425
Completeness (%)	91.9
R _{merge} (%)	17.7

$R_{\text{merge}} = \sum hkl |I - \langle I \rangle| / \sum I$, the inner summation is over duplicated reflections, the outer is over unique reflections, and the nominator is summarized over all reflections.

A preliminary analysis based on synchrotron radiation was also carried out. Crystals were shooted using a wavelength of 0.934 Å (ADSC Q4R CCD detector) (ESRF, Grenoble Station ID14-EH1). Maximal resolution was 3.0 Å. Although, we obtained poor diffraction quality from all our protein crystals, it was possible to obtain the preliminary X-ray characterization and the crystal symmetry. This poor diffraction data acquisition was due to the fact that all crystals were extremely thin and small. Optimization of conditions for growing better crystals for X-ray analysis at cryogenic conditions is underway. This optimization will allow us to determine the three dimensional structure of ovocleidin-17. The 3D structure of this protein, as the first major intra-mineral crystallized protein of the avian eggshells calcified layer, undoubtedly will highlight valuable information about the mechanism involved in natural occurring biomineralization. On the other hand, crystal modeling coupled with atomic force microscopy will permit us to determine the specific crystallographic faces that are modified by the presence of this protein during the eggshell formation. This will allow us to propose a theoretical model for explaining how this protein is taking place into the mechanisms of nucleation and crystal growth phenomena of CaCO₃ biomineralization in nature.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by grant from DGAPA-UNAM to AM (IN200199). This is the publication number 1700 from the Instituto de Química, UNAM. A.R-R acknowledges to IUEP-UNAM for X-ray diffraction facilities. V. Bolanos acknowledges to Steffi Arzi, (Station manager 14-1 EH1, ESRF-Grenoble) for the kind help during data collection.

REFERENCES

- [1] Arias, J.L., Fink, D.J., Xiao, S.P., Heuer, A.H. & Caplan, A.I. (1993) *International Review of Cytology*, 145, 217-250.
- [2] Denis, J.E., Xiao, S.P., Agarwal, M., Fink, D.J. Heuer, A.H. and Caplan, A.I. (1996) *J. Morphol.* 228, 287-306.
- [3] Mann, K. & Siedler, F. (1999) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47, 997-1007.
- [4] Appel, R.D., Bairoch, A. and Hochstrasser, d.F. (1994) *Trends Biochem. Sci.* 19, 258-260.
- [5] Juárez-Martínez, G., Garza, C., Castillo, R. and Moreno, A. (2001) *J. Cryst. Growth* 232, 119-131.
- [6] McPherson, A. (1999) *Crystallization of Biological Macromolecules*, CSHL Press, New York.
- [7] Matthews, B.W. (1968) *J. Mol. Biol.* 33, 491-497.
- [8] Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In *Methods in Enzimology*, Volume 276, C.W. Carter, Jr. and R.M. Sweet, eds. (New York: Academic Press), pp. 307-326.
- [9] CCP4 (Collaborative Computational Project 4). (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* 50, 760-763.

Received on October 4, 2001, accepted on January 30, 2002

APÉNDICE D. Manuscrito enviado para ser publicado en el Journal of Biological Chemistry

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Crystal Structure of Ovocleidin-17, a major protein of the calcified Gallus gallus eggshell: implications in the calcite mineral growth pattern

Juan Pablo Reyes-Grajeda¹, Abel Moreno and Antonio Romero^{2*}

¹Instituto de Química, U.N.A.M. Circuito Exterior, C.U. México, D.F. 04510, Mexico.

²Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040-Madrid, Spain.

* Corresponding author: Antonio Romero, Departamento de Estructura y Función de Proteínas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040-Madrid, Spain.
Tel: +34 91 8373112 Ext. 4244
Fax: +34 91 5360432
E-mail: romero@cib.csic.es

Running Title: Crystal Structure of Ovocleidin-17

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Summary

Ovocleidin-17 (OC17) from *Gallus gallus* is one of the best candidates to control and regulate the deposition of calcium carbonate in the calcified eggshell layer. Here, the crystal structure of monomeric OC-17, determined at a resolution of 1.5 Å, was refined to a crystallographic R-factor of 20.1 %. This is the first protein directly involved in a non-pathological biomineralization process resolved by x-ray diffraction to date. The protein has a mixed α/β structure containing a single C-type lectin-like domain. However, although OC-17 shares the conserved scaffold of the C-type lectins, it does not bind carbohydrates. Nevertheless, in vitro OC-17 modifies the crystalline habit of calcium carbonate (CaCO_3) and the pattern of crystal growth at intervals of 5 to 200 $\mu\text{g/ml}$. Determining the 3D structure of OC-17 contributes to a better understanding of the biological behavior of structurally related biomolecules and of the mechanisms involved in eggshell and other mineralization process.

Keywords: Biomineralization; Eggshell; C-type lectin-like proteins; OC17; calcium carbonate.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Introduction

The avian eggshell is a highly ordered nanocomposite structure that is deposited in an acellular milieu. It is secreted by the distal part of the oviduct, the uterus and isthmus, and it is in the latter that the inner and the outer shell membranes are produced (1). During their transition in the isthmus (tubular shell gland) and the uterus, spherulitic crystal growth is initiated by the deposition of calcium carbonate onto specific-protein aggregates that are the precursors of the mammillary knobs (2). Indeed, some of the most important macromolecules that regulate the nucleation and crystal growth of calcite are present in these knobs. Thereafter, the bulk of the calcite is deposited in the uterus, a process that is controlled by competitive crystal growth and that gives rise to the cone and palisade layers (3). As a result two preferred crystallographic orientations are generated and that reach a maximum towards the surface of the palisade layer (4).

A complex array of proteins exists in the uterine fluid and eggshell extract of *Gallus gallus*. While one family of matrix proteins corresponds to the egg white proteins: lysozyme (14.4 kDa), ovotransferrin (78 kDa) and ovoalbumin (43 kDa; 5, 6), another group of proteins in the eggshell are the bone matrix proteins osteopontin and sialoprotein (7). Finally, the third group of proteins that are specifically found in the uterus includes the ovocleidins and ovocalyxins. Indeed, Ovocleidin-116 has been cloned and corresponds to the core protein of an eggshell dermatan sulfate proteoglycan (8).

The intramineral protein Ovocleidin-17 (OC17) is an abundant component of the soluble fraction and it is also glycosylated (OC23; 9). This protein can be obtained by acidic extraction of the *Gallus gallus* eggshell and when sequenced it was shown to contain 142 amino acids including two phosphorylated serines (10). Based on this amino acid sequence, OC17 was seen to contain a C-type lectin-like domain (CTLN; 11), similar to lithostathine in human pancreatic stones (12) and perlucin of the nacreous layer of *Haliotis laevigata* shell

Crystal Structure of Ovocleidin-17

(13, 14). Notably, all these CTLD containing proteins are associated with the mineral phase of calcium carbonate.

OC17 is the major protein component of the eggshell matrix and one of the best candidates to regulate mineral deposition. However, the binding of carbohydrates in a Ca^{2+} dependent manner typical of C-type lectins has not been attributed to this protein. OC17 is remarkable well conserved in the eggshell matrix of a number of avian species, suggesting that it plays a fundamental role in the process of eggshell formation (15). Indeed, a specific antiserum against OC17 shows that it is present in the mammillary knobs and palisade layer, as well as in the tabular gland cells of the shell gland (16).

Our aim is to gain a better understanding of the mechanisms underlying the phenomena of CaCO_3 biomineralization, which may be useful when considering their possible biomimetical applications. With this in mind, we have centered our efforts on studying the proteins that play an important role in crystal growth during the eggshell formation. Here, for the first time we describe the three-dimensional structure of a non-pathological protein involved in a biomineralization process, OC-17. In addition, we develop a preliminary model of the protein-calcite interaction based on our SEM and AFM observations.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Experimental procedures

Crystallization and Data Collection

Ovocleidin-17 was purified and crystallized as described by Reyes-Grajeda *et al.* (17). Crystals of OC-17 were grown at 4° C by sitting droplet vapor diffusion. The protein solution, 5 μ l of 6 mg ml⁻¹, was added to 5 μ l of reservoir buffer (6% (w/v) PEG 4000, 0.1 M Na Acetate, pH 4.6) and the droplets were equilibrated with 1ml of reservoir buffer. Crystals grew over 10 to 20 days, reaching maximum dimensions of 0.2 x 0.05 x 0.05 mm.

A complete data set was collected from a single crystal at a resolution of 1.5 Å at the ESRF beamline BM14S (Grenoble, France) with a MarCCD detector system, using a crystal to detector distance of 80 mm and a wavelength of 0.97 Å. All data were integrated using the MOSFLM program (18) and then reduced with SCALE and TRUNCATE (19), yielding a unique data set of 26,123 reflections with a R_{merge} factor of 6.3%. The crystals belonged to the P3₂21 space group with one monomer per asymmetric unit, corresponding to a 45% (v/v) solvent content. The data collection parameters and statistics are presented in Table 1.

Structure determination and refinement

The structure of the native OC17 crystal was solved by molecular replacement with AMoRe (20) using data up to 3.5 Å. The search model was derived from the human pancreatic stones lithostathine (1lit) at 1.55 Å resolution. The rotational search showed two solutions with relatively low correlation values of 2.8 and 2.4 σ . A translational search and rigid body fitting for these two solutions produced a correlation value of 0.28 (R-value of 48.1%) over 0.15 for the next highest peak. This solution was applied to the model and the resulting co-ordinates were then used for refinement. The initial model, oriented and positioned according to the molecular replacement solution, was examined using the program TURBO/FRODO (21).

Crystal Structure of Ovocleidin-17

To improve the model, rounds of model building and iterative simulated annealing were performed using torsion angle dynamics (starting at $T=5000$ K with a cooling rate of 50 K per cycle), energy minimization and B-factor refinement using CNS tasks (22). At this point the model still had ambiguous zones (R_{work} 41.2%; R_{free} 46.6%; with approximately 10% of reflections in the test set for cross validation). The refinement started at a resolution of 2.5 Å with temperature factors for all atoms set to 20 Å². By increasing the resolution stepwise, the model was refined to a resolution of 1.5 Å. The combination of crystallographic refinement and model building improved the initial model, solving the ambiguities. Water molecules were automatically inserted using CNS and accepted if the corresponding F_o-F_c density map was at least 3.0σ and the geometric requirements for hydrogen bonding were fulfilled. Finally, one phosphate group was modeled and refined to fit the extra electron density found in the vicinity of Ser61. The crystallographic R-factor of the model is 20.1% for all unique reflections at 1.5 Å resolution ($R_{\text{free}} = 21.8\%$).

Crystal Growth Experiments

Crystallization experiments were carried out at 18°C inside an *ad hoc* designed chamber for the synthesis of CaCO₃ crystals. This system maintains the same CO₂ vapor pressure generated by the decomposition of ammonium carbonate (25mM). The chamber is composed of a dual-glass Petri dish in which one of the compartments holds several glass coverslips onto which the OC17 could be poured. In all the experiments the concentration of CaCl₂ was 0.1 M in a volume of 50 µl. For each experiment, different concentrations of OC17 were added to the droplet (5 to 200µg/ml). After 3 days the crystals were rinsed with Milli-Q water, air-dried and prepared for a SEM-EDS analysis using JEOL JSM9000 LV scanning electron microscopy at 20Kv.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Atomic force microscopy studies on OC17 nanospheres.

Samples for tapping mode atomic force microscopy were prepared by adsorbing several microliters of protein solution (1 μ g/ml) at room temperature onto freshly cleaved mica. The surface was then lightly rinsed with double distilled water and dried at room temperature. A Nanoscope-IIIa from DIGITAL Instruments was used for atomic force microscopy (AFM) acquisition. The AFM images were obtained in tapping-mode at room temperature in air at a scanning rate of 1.0 Hz for a range of resolutions. The installed NanoScope Software (Version 4.42r7) was used to produce three-dimensional color graphics.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Results and Discussion

Structure determination

We first established conditions that yielded crystals of ovocleidin-17 (OC17) that belonged to the trigonal space group $P3_221$ ($a=b= 58.26 \text{ \AA}$ and $c = 82.46 \text{ \AA}$), with one molecule in the asymmetric unit. These crystals were used to solve the structure by molecular replacement using the previously reported lithostathine structure as a search probe (12). In the final model, the first three N-terminal residues Asp1, Pro2 and Asp3 were ill defined and were therefore not incorporated into the model. In addition, the side chains at the surface loop Gly64-Gly68 were also poorly defined in the electron density maps. Nevertheless, the root mean square (r.m.s.) deviations were 0.005 \AA from the ideal bond lengths and 1.3 degrees from the ideal bond angles. Calculations with the program PROCHECK (23) indicated that almost all residues (93.6%) in the asymmetric unit were located in the most favorable regions, with none of the residues in the disallowed regions. The data collection and refinement statistics are listed in Table I.

The crystallized OC17 is 142 amino acids in length and contains a single C-type lectin-like domain (24) of $46 \times 44 \times 38 \text{ \AA}$ (Fig. 1). The general topology is that of a mixed $\alpha\beta$ structure, which is comprised of three α -helices and eight β -strands, the latter being clustered in two oppositely oriented antiparallel β -sheets ($\beta1-\beta2-\beta8-\beta3$ and $\beta5-\beta4-\beta6-\beta7$). The structure can be divided into two parts: a lower part of the molecule containing the two major helices $\alpha1$ and $\alpha2$, which are oriented perpendicular to one another and surround the four β -strands ($\beta1, \beta2, \beta8$ and $\beta3$). The upper half includes the second four-stranded ($\beta5-\beta4-\beta6-\beta7$) β -sheet with a short 3_{10} helix connecting strands $\beta5$ and $\beta6$. The OC17 structure is further stabilized by three disulphide bridges (Fig. 2A), which are conserved in the long-form C-type

Crystal Structure of Ovocleidin-17

lectins (<http://us.expasy.org/cgi-bin/prosite-search-ac?PDOC00537>). Thus, in the lower half of the molecule, the Cys5-Cys16 bridge connects the loop preceding strand $\beta 1$ with the N terminus of the $\beta 2$ strand, while the other disulphide bond (Cys33-Cys138) joins $\alpha 1$ to $\beta 8$. In the top half of the molecule, a disulphide bridge between Cys113-Cys130 crosslinks strand $\beta 6$ to the preceding $\beta 8$ loop.

Given that the major form of ovocleidin (OC17) is a phosphoprotein with two phosphorylated serines (Ser61 and Ser67; 10), the phosphoryl group density observed in the vicinity of Ser61 was not unexpected. Structurally, the electron density was unambiguously pinpointed to a covalently attached, tetrahedrally component (Fig. 2B). PhosphoSer61 is located at the C-terminal end of the $\alpha 2$ -helix in the loop connecting $\alpha 2$ with $\beta 4$ in the lower lobe of the structure. However, it was not possible to model the potential phosphorylation at Ser67 due to a disordered region in the crystal structure. The phosphoryl group at Ser61 might interact specifically with Ca^{2+} ions. However, when we soaked OC17 crystals in a solution of calcium chloride in order to determine specific binding sites, we do not find any changes in density that might correspond to the attachment of Ca^{2+} ions in a $F_o - F_c$ electron density map. It is possible that the chemical affinity of OC17 is more specific to carbonate than Ca^{2+} ions, but this hypothesis remains to be tested.

Structural relationship with other C-Type Lectin Domains (CTLDs)

The sequence of OC17 was aligned with several proteins associated with crystal growth in a mineral phase, as well as with the rat mannose-binding protein (RMBP) that is the prototype of the C-type lectin fold (Table 2). RMBP was the only protein belonging to the short C-type lectin domain with 2 disulphide bridges (as shown in Table 2). In RMBP, the carbohydrate recognition domain (CDR) consists of a compactly folded region that contains a series of loops stabilized by two Ca^{2+} ions. Carbohydrate binding occurs directly and is coordinated by one of the Ca^{2+} ions designated as the principal calcium. Interactions with several side-chains

Crystal Structure of Ovocleidin-17

via hydrogen bonds produces a structure that selectively binds Ca^{2+} , thereby forming an intimately linked ternary complex of protein, Ca^{2+} and sugar (25). However, OC17 and lithostathine do not conserve the residues implicated in the association with Ca^{2+} . Thus, as a consequence of both sequence and structural differences, the calcium-binding sites in the mannose-binding protein are not present in either OC17 or lithostathine. Indeed, the failure to bind to carbohydrates was demonstrated by means of hemagglutination assays.

When the structure of OC17 was analyzed, the potential calcium-binding site in the 3_{10} helix region, corresponding to residues Ala 105 to Arg 109, was seen to be highly positive charged. This implies that the putative calcium-binding site is lost as a result of repulsive forces, thereby preventing the binding of carbohydrates. Unlike lithostathine, the sequence homology between OC17 and RMBP is very low in this region. Nevertheless, although the sequence identity of 32 % between the pancreatic inhibitor of stone formation (lithostathine) and OC17 is relatively low, they share a common tertiary architecture (Fig. 3) with an r.m.s. deviation for all the $\text{C}\alpha$ atoms of 0.86 Å. The main structural variability was found in the regions of the loops and turns. Until now, the structural data available for this large family has demonstrated a common scaffold with a variety of functions in the CTLD fold, which can bind carbohydrates, proteins and inorganic substrates (24). Hence the familial relationships regarding protein folding may result from convergent evolution and may reflect the specificity for certain minerals and biocomposites.

Surface features and mechanistic implications

The electrostatic potential on the surface of OC17 reveals a regular distribution of charged residues and a particularly eye-catching feature is the high degree of polarization at the top of the molecule (Fig. 4A). Accordingly, on one side of the OC17 molecule, the surface of the protein presents an extended solvent-exposed basic stretch including seventeen of the 21 basic residues. The concentration of the positive charge in OC17 is distributed mostly in a

Crystal Structure of Ovocleidin-17

pseudo ring around the molecule, with the greatest extension at the top. This can be seen in a close-up view of successive rotating images of the electrostatic charges in three consecutive positions (rotating 120° each; Fig. 4B). Accordingly, this charge distribution intuitively implies the binding of the calcite ionic crystal surface through a periodic array of local binding sites for ions of opposite charge. This assumption is reinforced by the fact that solvent-exposed residues are conserved, as depicted in Figure 4B, mainly clustered at the top part of the molecule. The highly degree of polarization coupled to a unique array of positive charges on its surface strongly supports the idea that binding could be directed through the interaction with carbonate ions. Interestingly, lithostathine has been implicated in the inhibition of the growth and nucleation of calcium carbonate crystals (12, 26) and shows a highly acidic polarized surface distribution (Fig. 5). In turn, these subtle differences in the location of surface residues may explain the functional differences between OC17 and lithostathine despite the presence of a conserved C-type lectin domain scaffold.

Protein-Crystal interaction. A preliminary model

The influence of the purified OC17 upon calcite crystallization was also investigated *in vitro* and some of the more representative calcite crystal structures formed in the presence of the OC17 are shown in Figure 6. As expected, the common rhombohedral habit of calcite crystals was observed in the absence of the protein (Fig. 6A). However, in the presence of OC17 there was a strong aggregation of calcite crystals in a concentration dependent manner, similar to that observed in the mammillary zone of the *Gallus gallus* eggshell (Fig. 6B). Indeed, the fact that OC17 is found in the mammillary knob, could explain the aggregation of calcite crystals in the presence of OC17 *in vitro*. Using AFM techniques, we showed the aggregation of the protein into nanospheres (Fig. 7) might promote the formation of nucleation centers that would directly influence the aggregation of calcite crystals. This is a similar phenomenon to

Crystal Structure of Ovocleidin-17

the model proposed for the amelogenin proteins involved in the biomineralization of dental enamel (27, 28).

Due to the large extent of the surface of OC17 that is positively charged and the aggregates that tend to form, it may be possible that large surfaces are exposed to interactions with carbonate ions or with specific crystal lattices of calcite. Hence, we propose a preliminary CaCO_3 protein- CaCO_3 interaction model, where nanospheres are responsible for the control and nucleation of crystals. However, we cannot discard the influence of synergistic interactions and other macromolecular constituents, although this would have to be tested in order to fully understand the process of eggshell biomineralization and draw inferences regarding the function of similar proteins in other biological systems.

Concluding Remarks

It is becoming very important to search for new strategies to understand the mechanisms and the biomolecules that are involved in the crystallization process of the eggshell formation. The implications of this knowledge are important from the biomedical point of view as they can be extended to processes as critical as the formation of pancreatic and kidney stones, as well as arterial calcification and cardiovascular disease. On the basis of the information that we have so far gleaned, certain aspects of the mechanism involved can be inferred. We now intend to focus our attention on characterizing those genes involved in regulating the expression of OC17 and other proteins related to the biomineralization of calcite in eggshells. With this information, the existence of these genes in different avian species can be determined, not only to understand their evolution but also, coupled to what we already know, to draw some correlation between structure, function and evolution.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Protein Data Bank accession numbers

The coordinates for the final model have been deposited in the Protein Data Bank under the ID code **1GZ2**.

Acknowledgements

The authors thank the financial support of CONACyT (Mexico) Grant No. 36155E, DGAPA-UNAM (Mexico) project No. IN204702 and BIO01-1290 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (Spain). J.P.R-G. was supported by a PhD fellowship from the 'Consejo Superior de Ciencia y Tecnología' (CONACyT), México.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

References

1. Roberts, J.R. & Brackpool, C.E. (1994). The ultrastructure of avian egg shells. *Poultry Science Rev.* 5, 245-272.
2. Nys, Y., Hincke, M.T., Arias, J.L., Garcia-Ruiz, J.M. & Solomon, S.E. (1999). Avian eggshell mineralization. *Poult. Avian Biol. Rev.* 10, 143-166.
3. Garcia-Ruiz, J.M. & Rodriguez-Navarro, A.B. (1994). The mineral structure of the avian eggshell: A case of competitive crystal growth. In 7th *International Symposium on Biomineralization*. (Allemand, D. & Cuif, J-P., eds) pp.85, Bulletin de l'Institut océanographique, Numéro spécial 14, I. Monaco.
4. Silyn-Roberts, H. & Sharp, R.M. (1986). Crystal growth and the role of the organic network in eggshell biomineralization. *Proc. Roy. Soc. London B.* 227, 303-324.
5. Hincke, M. T., Gautron, J., Panbeleux, M., Garcia-Ruiz, J. M., McKee, M. D. & Nys, Y. (2000). Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and shell matrix. *Matrix Biol.* 19, 443-453
6. Hincke, M. T. (1995). Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix. *Connect. Tissue Res.* 31, 227-233
7. Solomon, S. (1999). An egg ist ein ei, es un huevo, est un oeuf. *Brit. Poultry. Sci* 40, 5-11
8. Hincke, M.T., Gautron, J., Tsang, C.P., McKee, M.D. & Nys, Y. (1999). Molecular Cloning and Ultrastructural Localization of the Core Protein of an Eggshell Matrix Proteoglycan, Ovocleidin-116. *J. Biol. Chem.* 274, 32915-32923.
9. Mann, K. (1999). Isolation of a glycosylated form of the chicken eggshell protein ovocleidin and determination of the glycosylation site. Alternative glycosylation/phosphorylation at an N-glycosylation sequon. *FEBS Letters.* 463, 12-14.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

10. Mann, K. & Siedler, F. (1999). The aminoacid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47, 997-1007.
11. Drickamer, K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 585-590.
12. Bertrand, J.A., Pignol, D., Bernard, J.P., Verdier, J.M., Dagorn, J.C. & Fontecilla-Camps, J.C. (1996). Crystal structure of human lithostathine, the pancreatic inhibitor of stone formation. *EMBO J.* 15, 2678-2684.
13. Mann, K., Weiss, I.M., André, S., Gabius, H-J. & Fritz, M. (2000). The amino-acid sequence of the abalone (*Haliotis laevis*) nacre protein perlucin. Detection of a functional C-type lectin domain with galactose/mannose specificity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5257-5264.
14. Weiss, M., Kaufmann, S., Mann, K. & Fritz, M. (2000). Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevis*. *Biophys. Biochem. Res. Comm.* 267, 17-21.
15. Panheleux, M., Bain, M., Fernández, M.S., Morales, I., Gautron, J., Arias, J.L., Solomon, S.E., Hincke, M. & Nys, Y. (1999). Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: a comparative study. *Brit. Poultry. Sci.* 40, 240-252.
16. Hincke, M.T., Tsang, C.P.W., Courtney, M., Hill, V. & Narbaitz, R. (1995). Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17). *Calcified Tissue Int.* 56, 578-583.
17. Reyes-Grajeda, J.P., Jáuregui-Zúñiga, D., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Santoyo, A., Bolanos-Garcia V.M. & Moreno A. (2002). Crystallization and Preliminary X-Ray analysis of Ovocleidin-17 A Major Protein of the *Gallus gallus* Eggshell Calcified Layer. *Protein. Peptide. Lett.* 9, 253-257.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

18. Leslie, A.G.W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. Joint CCP4 + ESF-EAMCB. *Newsletter on Protein Crystallography*. No. 26.
19. Collaborative Computational Project, Number 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D*. 50, 760-763
20. Navaza, J. (1994). AMoRe: an Automated Package for Molecular Replacement. *Acta Crystallogr. A*. 50, 157-163.
21. Jones, T.A. (1978). A Graphics Model Building and Refinement System for Macromolecules. *J. Appl. Cryst.*, 11, 268-272
22. Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T., & Warren, G.L. (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D*. 54, 905-921.
23. Laskowski, R.A., Arthur, M. W.Mac, Moss, D.S., & Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
24. Zelensky, A.N. & Gready, J.E. (2003) Comparative analysis of structural properties of the C-type-lectin-like domain (CTLN). *Proteins* 52, 466-477
25. Ng, K., Kolatkar, A., Park-Snyder, S., Feinberg, H., Clark, D., Drickamer, K. & Weis, W. (2002). Orientation of Bound Ligands in Mannose-binding Proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 16088-16095.
26. Gerbaud, V., Pignol, D., Loret, E., Bertrand, J.A., Berland, Y., Fontecilla-Camps, J.-C., Canselier, J.-P., Gabast, N. & Verdier, J.-M. (2000) Mechanism of Calcite Crystal

Crystal Structure of Ovocleidin-17

- Growth Inhibition by the N-terminal Undecapeptide of Lithostathine. *J. Biol. Chem.* **275**, 1057-1064
27. Moradian-Oldak, J., Tan, J. & Fincham, A.G. (1998). Interaction of Amelogenin with Hydroxyapatite Crystals: An Adherence Effect Through Amelogenin Molecular Self-Association. *Biopolymers*. **46**, 225–238.
28. Fincham, A.G., Moradian-Oldak, J. & Simmer, J.P. (1999). The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix. *J. Struct. Biol.* **126**, 270–299.
29. DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) on World Wide Web <http://www.pymol.org>
30. Nicholls A., Bharadwaj R. & Honig B. (1993). Grasp: a graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys. J.* **64**, A166
31. Merritt, E.A. & Murphy, M.E.P. (1994). Raster3D Version 2.0. A Program for Photorealistic Molecular Graphics. *Acta Crystallogr. D.* **50**, 869-873
32. Lakshminarayanan, R., Manjunatha Kini, R. & Valiyaveetil, S. (2002). Investigation of the role of ansocalcin in the biomineralization in goose eggshell matrix. *PNAS* **99**, 5155-5159.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Figure Legends

Figure 1. Ribbon representation of OC17 showing the secondary structural elements. The Gly64–Gly68 loop in green, belongs to a flexible zone where no electron density was observed. The figure was prepared with PyMol (29)

Figure 2. (A) $2F_o-F_c$ electron density map of the Cys5–Cys16 disulphide bridge, contoured at 1.0σ , at a resolution of 1.5\AA . The figure was drawn with TURBO/FRODO (21). **(B)** Final refined $2F_o-F_c$ electron density contoured at 1.0σ , around Ser61 at a resolution of 1.5\AA . The red sphere represents a water molecule.

Figure 3. Superimposition of the OC17 (red) and lithostathine (yellow) structures, as well as the rat mannose binding protein (green), with the bound metal Ca^{2+} ion (blue sphere) in RMBP shown. The figure was generated by PyMol (29).

Figure 4. Representation of the electrostatic surface charge of OC17 with positive charges shown as blue and negative charge in red. **(A)** electrostatic potential showing the highly polarized surface **(B)** close-up view of the relative spatial orientation relative to the main view in **(A)**. The figure was prepared with GRASP (30) and Raster 3D (31).

Figure 5. Surface electrostatic representation of lithostathine (12) showing the same relative orientation as in Figure 4(A).

Figure 6. SEM images of calcite: (a) control, (b) with $200\ \mu\text{g}$ of OC17, (c) $100\ \mu\text{g}$ of OC17, (d) $50\ \mu\text{g}$ of OC17, and (e) $5\ \mu\text{g}$ of OC17.

Figure 7. Three-dimensional view of atomic force micrographs obtained in tapping mode in air of OC17 adsorbed onto a mica surface. (a) 500 by $500\ \text{nm}$ field (b) 250 by $250\ \text{nm}$ field.

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Table 1. Data collection and refinement statistics

Data collection	
Space Group	P3 ₂ 21
Unit cell parameters (Å)	a=b= 58.26, c=82.46
Resolution limit (Å)	1.5
Specific volume	2.38
Number of molecules in the asymmetric unit	1
Number of unique reflections	26123
Completeness (% last shell)	99.5 (98.5)
R _{merge} ^a	6.3
Crystallographic refinement	
Resolution range (Å)	7.98-1.5
No. of reflections	26123
R _{factor} ^b (%)	0.20
R _{free} (%)	0.218
No. of non-H protein atoms	1046
No. of water molecules	153
r.m.s. Deviations from ideal values	
Bond lengths (Å)	0.005
Bond angles (°)	1.3
Dihedral angles (°)	22.7
Improper angles (°)	3.94

$$^a R_{\text{merge}} = \frac{\sum |I_{hkl} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum I_{hkl}}$$

$$^b R_{\text{factor}} = \frac{\sum_{hkl} ||F_o| - |F_c||}{\sum_{hkl} |F_o|}$$

for all data except 10%, which was used for the R_{free} calculation.

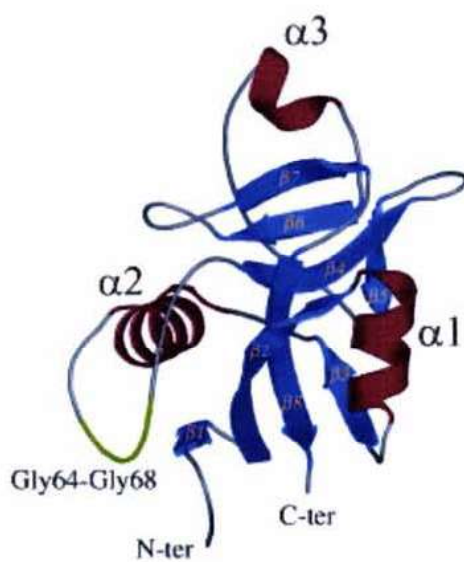
Crystal Structure of Ovocleidin-17

Table 2. Alignment of the amino acid sequences of OC17, ansocalcin (32), perlucin (13), lithostathine (12) and rat mannose binding protein (RMBP). Conserved cysteine residues in the long form of the CTLD are shown in yellow. The six amino acids that bind the main Ca²⁺ ion in RMBP are shown in blue.

OC17	DPDGC CG PGWV	PTPG C LGFF	SRELSWSRAE	S F CRRWPGS	HLAAVRSAAE	50
Ansocalcin	--NK C PKGWL	DFRG S CYGYF	GQELTWKAE	AW C KVIHAGC	HLASLHSPEE	48
Perlucin	---G C PLGFH	CNRR S CYWFS	TIKSSFAEAA	G Y CRYLES--	HLAIISNKDE	45
Lithostathine	ARIS C PEGTN	AYRS Y CYYFN	EDRETWVDAD	LY C QNMNSG-	NLVSVLTQAE	49
RMBP	-----	-SG K KFFVTN	HERMPFSKVK	AL C SELRG--	TVAIPRNAEE	37
OC17	LRLLAELLNA	SRGGDGS G EG	ADGRVWIGLH	RPAGRSWRW	SDGTAPRFAS	100
Ansocalcin	HAAVARFIAK	FORRE-----	EEDNVWIGLH	HWNQAR--VW	IDGSKKRYSA	91
Perlucin	DSFIRGYATR	LG-----	EAFNYWLGAS	DLNIEGRWLW	EQRRHXYTN	87
Lithostathine	GAFVASLIKE	SGTDD-----	--FNVWIGLH	DPKKNRRWHW	SSGSLVSYKS	92
RMBP	NKAIQEVAKT	SA-----	-----FLGIT	DEVTEGQFHY	VTGGRLTYSN	74
OC17	WHR--TAKAR	RGG R CAALRD	EEAFTSWAAR	P C TERNAFVC	KAAA	142
Ansocalcin	WD---DDELP	RG Y CTVLEG	SSGFMSWEDN	AC S ERNPFVC	KYSA	132
Perlucin	WSPGQPDNAG	GIEH C LELRR	DLGNYLWNDY	QC Q RPSHFIC	EKER	131
Lithostathine	WGIG-APSSV	NPG Y CVSLTS	STGFQWKDV	PC E DKFSFVC	KFKN	135
RMBP	WK K DE P NDHG	SG E DCVTIVD	NG---L W ND I	SC Q ASHTAVC	EPPA	115

Crystal Structure of Ovocleidin-17

Figure 1



Crystal Structure of Ovocleidin-17

Figure 2 (A)

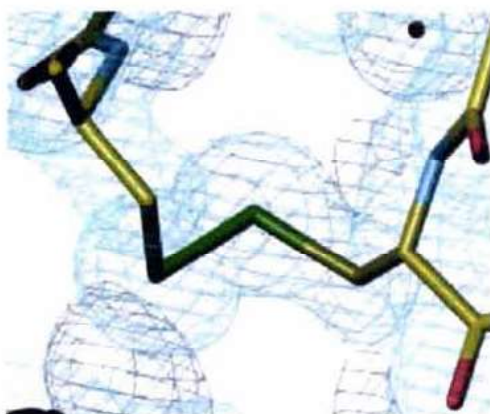
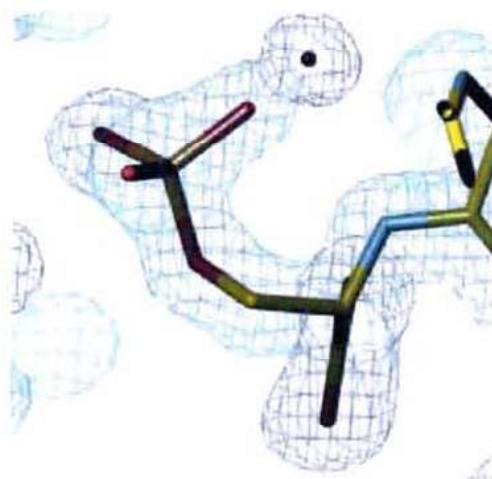
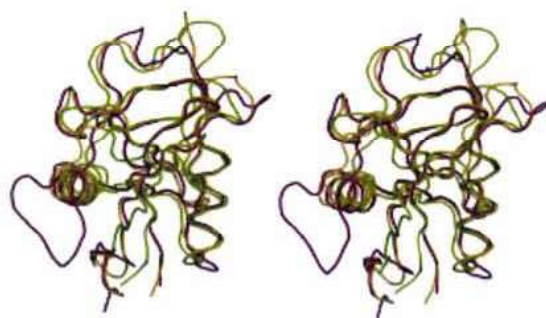


Figure 2 (B)



Crystal Structure of Ovocleidin-17

Figure 3

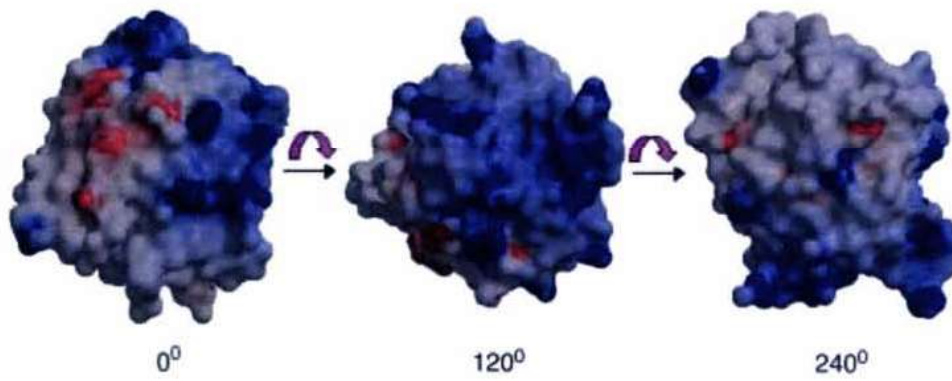


Crystal Structure of Ovocleidin-17

Figure 4 (A)



Figure 4 (B)



Crystal Structure of Ovocleidin-17

Figure 5

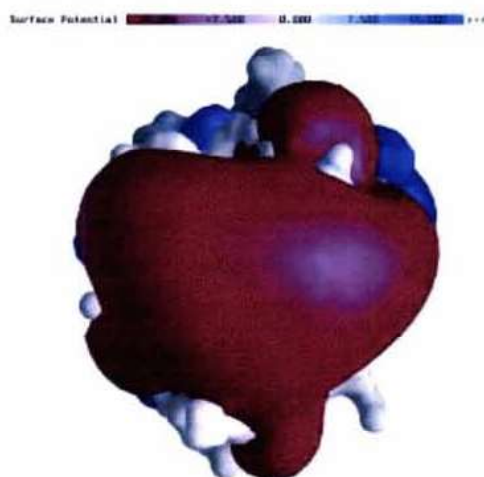
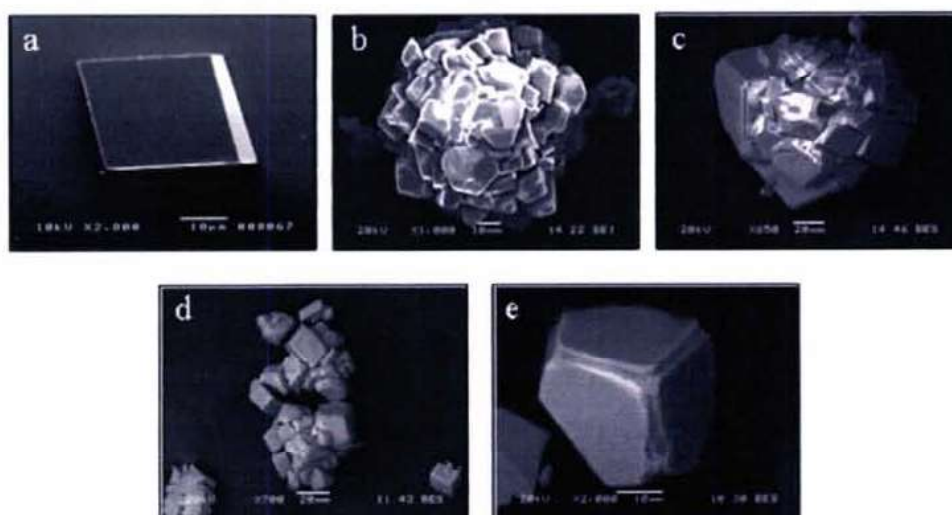


Figure 6



Crystal Structure of Ovocleidin-17

Figure 7

