

BIOMINERALIZACION DE CARBONATO DE CALCIO Y LA EVOLUCION DE LAS AVES

DR. ABEL MORENO CARCAMO

Departamento de Química Biomacromolecular Instituto de Química UNAM E-mail-address : <u>carcamo@unam.mx</u> <u>abel.moreno@mac.com</u>

¿Qué significa la biomineralización?

La Biomineralización es el estudio de la formación, estructura y propiedades de sólidos inorgánicos depositados en sistemas biológicos.

Esta es una ciencia emergente que está conectada a la Biología, la Química, la Física y la Ciencia de los Materiales.

BIOMINERALIZACIÓN

Este proceso se puede dividir en los seres vivos en dos tipos:

• 1) Patológico: cálculos renales y biliares así como la precipitación cardiovascular.

 2) No patológico: como la formación de hueso, cascarones de huevo, concha nácar, formación de cristales de oxalato de calcio en plantas.

Biomineralización de Carbonato de Calcio (CaCO₃)

- Calcita
- •Aragonita
- Vaterita



Mg-CaCO₃(Calcita)





CaCO₃ (Vaterita)



10 µm



10 µm

$CaCO_3 * nH_2O$ (Amorfo)

Reserva Refuerzo mecánico

BIOMINERALIZACIÓN de CaCO₃



- Addadi, L.; Weiner, S. 1992. Control and Design Principles in Biological Mineralization. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 31, 153-169.
- Mann, S.; Webb, J & Williams, J. P. (ed). 1989. Biomineralization. Chemical and biochemical perspectives. VCH. N. Y. USA. 541 pp.

...biomineralización de CaCO₃ en cascarones de huevos...





















...los cascarones de huevos de aves están compuestos de CaCO₃...



- Dauphin, Y.; Cuif, Jean-Pierre.; Salome, M.; Susini, J.; Williams, C. T. 2006. Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 386, 1761-1771.
- Hincke, M. T.; Gautron, J.; Panheleux, M.; García-Ruíz, J. M.; McKee, M. D.; Nys, Y. 2000.
 Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and eggshell matrix. Matrix Biol. 19, 443-453

... ¿ Cómo se forman los núcleos cristalinos de CaCO₃?...



• Fernández, M. S.; Passalacqua, K.; Arias, J. I.; Arias, J. L. 2004. Partial biomimetic reconstitution of avian eggshell formation. Journal of Structural Biology. 148, 1-10

... proteínas intraminerales del cascarón de huevo de algunas aves ...



• Mann, K.; Siedler, F. 2006. Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell Ctype lectin-like proteins. Comparative Biochemistry and Phisiology, Part B. 160-170.

Alineamiento deca-2 Secuencias



 Mann, K.; Siedler, F. 2006. Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell Ctype lectin-like proteins. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 160-170.

... proteínas con dominios similares al de Lectina tipo-C (CTLD)



- Zelensky, A. N.; Gready, J. E. 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. FEBS Journal. 272, 6179– 6217
- Reyes-Grajeda, J. P.; Moreno, A.; Romero, A. 2004. Crystal Structure of Ovocleidin-17, a Major Protein of the Calcified Gallus gallus Eggshell. Journal of Biological Chemistry. 279, 40876-40881.

Grupo espacial	P3 ₂ 21 (OC-17)
Parámetros de celda (Å)	a = b = 58.26 c = 82.46
Ángulos	$\alpha = 90.00 \ \beta = 90.00 \ \gamma = 120.000$
Limite de Resolución (Å)	1.5
Volumen de la celda	279888.008
unitaria	
Rmerge(%)	0.63
Número de moléculas en	1
ASU	
Mosaicity:	0.2



Cristal de Ovocleidin-17. Escala de barra = 0.1mm

Estructura 3D de la OC-17 a 1.5Å de resolución

Patrón de Difracción



Mapa de densidad electrónica a 1.5 Å

Molecular surface and electrostatic potential

... proteínas intraminerales (CTLD) sin conservación de los motivos de unión a Ca²⁺...

<u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html</u>

1. AISLAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS SCA-1 Y SCA-2

Protocolo de aislamiento y purificación

EXTRACCIÓN

- * Lavar con abundante agua y fraccionar en trozos grandes
- Lavar, EDTA 5 % (1 h, 4 °C)
- Secar a temp. ambiente.
- Mortero-polvo cascarón
- Extraer ác. acético 10 %

(20 mL/g polvo cascarón, 36-48 h, 4 °C)

- Filtrar extracto (eliminar trozos de cascarón, 0.2 µm)
- Concentrar-Amicón-YM3

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA ANTES DEL HPLC

- Dializar (5x10 vol., ác. acético 5 %, eliminar iones calcio)
- Precipitar fracción soluble (sulfato de amonio, 24 h).
- Centrifugar (90 min, 4 °C, se descarta sobrenadante, se resuspende el botón en ác. acético 5 %)
- Dializar (5x10 vol., ác. acético 5 %, eliminar el sulfato de amonio)
- Filtrar, PVDF, 0.2 μm.
- Muestra lista para HPLC

HPLC-FASE REVERSA (C-18, acetonitrilo, TFA 0.1 %) o Exclusión molecular Sephadex-75.

2. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS PROTEÍNAS SCA-1 Y SCA-2

Figura 1. a) SDS-PAGE 12.5 % (extracto intramineral), b) Cromatograma del extracto intramineral (HPLC fase reversa), c) Proteínas SCA-1 y SCA-2

5. INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS SCA-1 y SCA-2 CON IONES CARBONATO

Quartz Platinum hterdigital array

- E T : electrodo de trabajo
- ER: electrodo de referencia
- EA: electrodo auxiliar
- ÄV : voltaje entre ET y ER
- I: corriente entre ET y EA

Liliana Marín-García, et al., Crystal Growth and Design 8 (2008) 1340-1345

... interacción proteína-carbonato...

Registro de la señal

voltamperométrica

INTERACCIÓN PROTEÍNA-CARBONATO

...interacción proteína-carbonato...

d

1.5

Liliana Marín-García, et al., Crystal Growth and Design 8 (2008) 1340-1345

...interacción proteína-carbonato...

Concentración de iones carbonato (mM)

Proteína intramineral

Liliana Marín-García, et al., Crystal Growth and Design 8 (2008) 1340-1345

3. ESTUDIOS DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ

Malvern Nano S

...estudios de dispersión dinámica de luz (DLS)...

... determinación de los estados de agregación de las proteínas SCA-1 y SCA-2 en función de la temperatura...

¡Se forman templados de SCA-1 en presencia de CO₃²⁻!

Núcleo cristalino de carbonato de calcio

Templado de proteína con d_H constante

4. INFLUENCIA DE LAS PROTEÍNAS SCA-1 Y SCA-2 SOBRE LA CRISTALIZACIÓN DEL CARBONATO DE CALCIO

0.1 M CaCl₂ 0.1 M Carbonato de Amonio Proteínas: 50, 100, 200 μg

Liliana Marín-García, et al., Crystal Growth and Design 8 (2008) 1340-1345

... estudios de DLS: ¿Se forman templados de proteínas?...

• Fernández, M. S.; Passalacqua, K.; Arias, J. I.; Arias, J. L. 2004. Partial biomimetic reconstitution of avian eggshell formation. Journal of Structural Biology. 148, 1-10.

Estudios de agregación a través de DLS

LYS ANCA SCA-1 SCA-2

188 62

Experimento de adición: 10 mM, 70 mM, 100mM of Na₂CO₃

SCA-1

SCA-2

Ansocalcina obtenida del cascaron de huevo de ganso: : a) filtered, b) 10 mM, c) 70 mM, d) 100mM of Na₂CO₃

DLS on Lysozyme at: a) filtered, b) 10 mM, c) 70 mM, d) 100mM of Na₂CO₃

MECANISMO PROPUESTO PARA LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-CARBONATO Y PARA LA OXIDACIÓN DE ÉSTE EN UN ELECTRO DE PASTA DE CARBONO

DATOS RECIENTES SOBRE LA ESTRUCTURA 3D DE SCA-1

Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 (SCA-1)
Parámetros de celda (Å)	a = 32.67 b = 55.91 c = 72.06
Ángulos	a=90.00 b=90.00 g=90.00
Limite de Resolución	1.5
(Å)	
Volumen de la celda	131623.328
unitaria	
Rmerge(%)	0.145
Número de moléculas	1
en ASU	
Mosaicity:	0.7
Grupo espacial	P3 ₂ 21 (OC-17)
Grupo espacial Parámetros de celda (Å)	P3₂21 (OC-17) a = b = 58.26 c = 82.46
Grupo espacial Parámetros de celda (Å) Ángulos	P3 ₂ 21 (OC-17) $a = b = 58.26$ c = 82.46 $a = 90.00$ b = 90.00 g=120.000
Grupo espacial Parámetros de celda (Å) Ángulos Limite de Resolución (Å)	P3 ₂ 21 (OC-17) $a = b = 58.26$ c = 82.46 $a = 90.00$ b = 90.00 g= 120.000 1.5
Grupo espacial Parámetros de celda (Å) Ángulos Limite de Resolución (Å) Volumen de la celda	P3 ₂ 21 (OC-17) $a = b = 58.26$ c = 82.46 $a = 90.00$ b = 90.00 g=120.000 1.5 279888.008
Grupo espacial Parámetros de celda (Å) Ángulos Limite de Resolución (Å) Volumen de la celda unitaria	P3 ₂ 21 (OC-17) $a = b = 58.26 \ c = 82.46$ $a = 90.00 \ b = 90.00 \ g = 120.000$ 1.5 279888.008
Grupo espacial Parámetros de celda (Å) Ángulos Limite de Resolución (Å) Volumen de la celda unitaria Rmerge(%)	P3 ₂ 21 (OC-17) $a = b = 58.26 \ c = 82.46$ $a = 90.00 \ b = 90.00 \ g = 120.000$ 1.5 279888.008 0.63
Grupo espacial Parámetros de celda (Å) Ángulos Limite de Resolución (Å) Volumen de la celda unitaria Rmerge(%) Númer o de moléculas en	P3_221 (OC-17) $a = b = 58.26 \ c = 82.46$ $a = 90.00 \ b = 90.00 \ g = 120.000$ 1.5 279888.008 0.63 1
Grupo espacial Par ámetr os de celda (Å) Ángulos Limite de Resolución (Å) Volumen de la celda unitaria Rmerge(%) Númer o de moléculas en ASU	P3_221 (OC-17) $a = b = 58.26 \ c = 82.46$ $a = 90.00 \ b = 90.00 \ g = 120.000$ 1.5 279888.008 0.63 1

Comparación de las dos estructuras SCA-1 y OC-17

SCA-1 con puentes disulfuro

Superposición de ambas proteínas

Ovocleidina-17 (azul) con Estrutiocalcina-1 (rojo)

"We all know that crystals nucleate and grow from saturated solutions. And so they do in vitro, but not necessarily in vivo. Biology has chosen another pathway., crystals are grown from an unstable solid colloidal phase, almost devoid water!"

"MANY ANIMALS DO NOT FORM THEIR CRYSTALS DIRECTLY, THEY FIRST PRODUCE A TRANSIENT PRECURSOR MINERAL PHASE THAT SUBSEQUENTLY TRANSFORMS INTO THE MATURE PHASE"

Stephen Weiner, J. Structural Biology 163 (2008) 229-234. Review

Valdría la pena volver a la vida a animales extintos para entender algunos de los procesos de Biomineralización?

Mi gran deseo...

Dinosaur Eggshell (NHM-London)

Aepyornis eggs Muséum national d'Histoire

Elephant Bird

Skull of an Elephant bird

Dodo-bird Oxford University MNH

CONCLUSIONES

- Los minerales que son producidos o sintetizados en seres vivos, permiten desarrollar propiedades y funciones específicas en combinación con macromoléculas biológicas.
- Estos biominerales participan inclusive en la estereo selectividad química, para elegir la incorporación de Laminoácidos en proteínas y D-azúcares en polisacáridos, así como en la síntesis de sencillas y grandes biomoléculas hasta los grandes complejos macromoleculares proteína-DNA o proteína-RNA.
- La formación de huesos, dientes y algunas otras formas de estructuras biológicas, quizás siguen las teorías de crecimiento cristalino, pero la morfología (no-cristalográfica) quizás está gobernada por genes.
- La relación: estructura-función, no puede atribuirse solamente a la resolución estructural de una sola biomolécula, sino que requiere de la resolución estructural de varias macromoléculas y los aspectos químicos que rigen dichos procesos.

AGRADECIMIENTOS

CARBONATO DE CALCIO:

- Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda, INMEGEN, México.
- •Dr. Hugo Javier Serrano Posada, Facultad de Química, UNAM
- Dra. María Liliana Marín García, Instituto Politécnico Nacional, IPN
- Dr. Vivian Stojanoff, Brookhaven National Laboratory (BNL), USA.
- Dr. Jean Jakoncic, Brookhaven National Laboratory (BNL), USA
- C.D. Rayana R. Ruiz-Arellano, PhD Thesis IQ-UNAM.
- DGAPA-UNAM Proyecto IN214506 / IN201811
- CONACYT proyecto 82888, 175924.

FOSTATO DE CALCIO:

- Dra. Azucena E. Jiménez Corona, CINVESTAV, México.
- Dr. Eduardo Villarreal Ramírez, Mineralized Tissue Laboratory. HSS-New York, USA.
- Apoyo de CONACYT: Proyectos 58515/82888
- **OXALATO DE CALCIO EN PLANTAS**
- Dr. David Jáuregui Zúñiga, IBT UNAM.
- BIOSILIFICACIÓN
- Dra. Nuria Sanchez Puig, IQ-UNAM